

Estudios PET con FMISO para la localización de regiones hipóxicas *in vivo* en modelos experimentales

Noemí Gómez Lado

Tesis doctoral UDC

Año 2022

Directores:

Dr. Pablo Aguiar Fernández

Ca. Dr. Álvaro Ruibal Morell

Tutor:

Dr. Antonio Manuel Castro Castro

Programa de doctorado en Neurociencia y Psicología Clínica



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Grupo de Imagen Molecular y Física Médica
Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela
(CHUS)
Servicio de Medicina Nuclear
Universidad de Santiago de Compostela (USC)
Departamento de Psiquiatría, Radiología, Salud Pública, Enfermería
y Medicina

**Estudios PET con FMISO para la localización de
regiones hipóxicas *in vivo* en modelos experimentales**

Memoria presentada para optar al Grado de Doctora por
Noemí Gómez Lado

A Coruña, 2022

*A mi hermana,
por ser siempre un ejemplo de superación.*

*A mi familia,
por todo y por siempre.*

AGRADECIMIENTOS

Han pasado casi 6 años desde que empecé esta gran aventura llamada Tesis Doctoral. Como todo lo bueno que sucede en la vida, este viaje comenzó con euforia y con algo de miedo, sin ser realmente consciente de la gran oportunidad que estaba viviendo. La experiencia que he adquirido durante estos años me ha permitido mejorar como profesional y también como persona.

El secreto de este trabajo fue haberme rodeado de maravillosas e inolvidables personas que me brindaron su ayuda, me transmitieron sus conocimientos y me apoyaron durante todo este tiempo. Quiero agradecerles a todos ellos lo que han hecho por mí durante estos intensos años para que este proyecto pudiera hacerse realidad.

En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincero y enérgico agradecimiento a mis directores. Al **Doctor Pablo Aguiar Fernández** porque, además de transmitirme tu vocación investigadora, me orientaste y me ayudaste en todos los aspectos posibles de esta investigación a lo largo de todos estos años. Quiero agradecerte la confianza que me has demostrado desde el primer momento, así como la dedicación y la atención que me has ofrecido. Gracias por haberme brindado la oportunidad de formar parte de tu grupo de investigación y por haber hecho fácil lo difícil. Todavía recuerdo aquel momento en el que me dijiste “Sin dolor no hay gloria”. Espero que estés orgulloso con el resultado de este trabajo. Al **Catedrático y Doctor Álvaro Ruibal Morell**, por todos tus consejos y por preguntarme cómo estaba cada mañana. Ha sido un privilegio poder contar con tu guía y apoyo.

En segundo lugar, quiero darle las gracias a mi tutor, el **Doctor Antonio Manuel Castro Castro**, por todas las llamadas que hiciste y los correos que me enviaste simplemente para preguntarme cómo estaba y qué tal llevaba la tesis. Gracias por aconsejarme que disfrutase de esta etapa lo máximo posible y por asegurarme que todo saldría bien. Y, por supuesto, no puedo olvidar la

gran ayuda que me diste con todos los trámites administrativos, y por la paciencia y el apoyo que me demostraste al hacerlo.

En tercer lugar, me gustaría darles las gracias a mis compañeros de laboratorio por todo el apoyo que he recibido de vuestra parte y por los buenos momentos que hemos compartido juntos. A **Jesús Silva Rodríguez**, por haberme mostrado el mundo de la imagen clínica y ofrecerme tu ayuda y opinión siempre que lo necesitaba. A **Lara García Varela**, por enseñarme a dar mis primeros pasos en el mundo de la imagen preclínica. A **Alexis Moscoso Rial**, por todo el soporte técnico, el apoyo y los ánimos que me has brindado desde el principio. Y por esas tardes en el Servicio de Medicina Nuclear. A **Anxo Fernández Ferreiro**, por tu interés y los consejos que me has dado durante todo el proceso. A **Manuel Piñeiro Fiel**, por los ratos que has sacado entre entrenamientos para escucharme y ayudarme siempre que has podido, y por las veces que cambiaste el colimador de la gammacámara para que pudiera trabajar. Por los momentos que pasamos juntos en los descansos y en el laboratorio, y, sobre todo, por tus canciones navideñas personalizadas que nunca olvidaré. A **David Rey Bretal**, por haber sido mi compañero de batallas en el laboratorio (a veces, hasta altas horas de la noche). Por los conocimientos que compartimos y por ser siempre tan dramático durante los experimentos. Gracias por haber estado conmigo, tanto en los momentos buenos como en los difíciles. A **Xurxo García Otero**, por encontrar siempre el lado bueno de las cosas y por tu buen carácter. Porque, a pesar de pertenecer a ámbitos diferentes, hacemos un gran equipo. A **Cristina Mondelo García**, por los breves aunque divertidos momentos que pasamos en el microPET/CT, por tu constante sonrisa y por tu gran carácter. Por nuestros interesantes debates de camino al trabajo. A **Alejandro Costoya Sánchez**, por ser capaz de sacarme una sonrisa y por las divertidas anécdotas que me cuentas sobre la historia de Roma. A **Andrea Cuartero** que, a pesar de tu reciente incorporación al grupo, tu simpatía y palabras de ánimo me han ayudado en la recta final. A **Iria Seoane Viaño**, por haber sido una gran compañera y amiga desde el día en que nos conocimos. Gracias por la positividad que me transmitiste a lo largo

de estos años. Y por aquella vez que me dijiste que “Lo más importante de la vida es aquello que no se ve”.

En cuarto lugar, quiero agradecer a los **Doctores Francisco Campos Pérez** y **Tomás Sobrino Moreiras** por haberse implicado en el primer estudio experimental de mi tesis doctoral. A **Esteban López Arias** y a **Ramón Iglesias Rey** por haber generado el modelo y haber realizado los estudios de imagen por MR. Al **Doctor Diego Caicedo Valdés** por haber trabajado conmigo en la realización del segundo estudio experimental de esta tesis. También quiero agradecer sinceramente el trabajo de los investigadores con los que he tenido la oportunidad de poder colaborar a lo largo de estos años. Porque, tal y como dijo David Attenborough, “La colaboración con otras personas nos permite lograr muchas más metas de las que conseguiríamos alcanzar en solitario”. Gracias a todos por vuestro incalculable esfuerzo y apoyo.

Quiero destacar la gran profesionalidad de todo el personal que trabaja en el Servicio de Medicina Nuclear del CHUS. Quiero mencionar especialmente el cariño y la amabilidad recibida por parte de las enfermeras **Elena, Pilar, Livi, Eva, Carmen,** y **Natalia,** y los enfermeros **Manuel, Damián** y **Sergio.** Quiero destacar el cariño recibido por parte de Elena y Pilar, mis mamás postizas del Servicio de Medicina Nuclear, por ofrecerme siempre vuestra ayuda y darme valiosos consejos. A las técnicas en imagen **Iria, Paula** y **Luz,** por haberos interesado por mi trabajo. A las médicas nucleares **Inés, Patricia, Sonia** y **Julia** por haber resuelto mis dudas y curiosidades, y por animarme a seguir investigando. A la **Doctora Virginia Pubul,** actualmente al frente del Servicio de Medicina Nuclear, por facilitar nuestro trabajo cuando fue necesario. A los radiofarmacéuticos de Galaria, **Santiago** y **Lucía,** por sacar un hueco en vuestra ajetreada agenda para producir FMISO y brindarme vuestra ayuda cuando lo necesitaba. Al personal del Servicio de Protección Radiológica del CHUS, **Julio, Miguel, Manuel, Lucía, Juan** y **Ana,** por vuestra amabilidad e interés en mis investigaciones.

Gracias a todas las personas que he ido conociendo a lo largo de estos años y que he tenido la maravillosa suerte de poder tenerlas en mi vida. A **Ana Cives**, por todas las dudas que me has resuelto sobre Física y Protección Radiológica, por las veces que me preguntabas si había comido y te quedabas conmigo para asegurarte de que lo hacía, y por las tardes que nos ayudábamos la una a la otra (sobre todo, me ayudabas tú con la gammacámara). Espero que puedas dedicarte a lo que realmente te apasiona. A **Olga García-Minguillán**, por haberme animado a seguir siempre adelante, y por el tiempo que pasamos en Vigo y en Madrid. A **Alba Guillín**, por ser una maravillosa compañera de viajes. Gracias por compartir conmigo una muestra de tu gran talento diseñando las preciosas ilustraciones de la cubierta de esta tesis.

A mis biólogas favoritas, que me habeis acompañado desde el primer día que empecé el Grado en Biología hasta hoy. A **María**, por estar siempre que lo necesito, por darme apoyo y ánimos, por esos cafés que tomamos para ponernos al día, por creer en mí y por ayudarme en todo lo que has podido. Te mereces lo mejor por ser una amiga incondicional. A **Belén**, por ser tú misma, por tus mensajes de apoyo y por todos los momentos que hemos compartido.

A mis amigos de la infancia. A **Iago**, por ser tú, por confiar en mí, por llenar mis días de alegría e ilusión, por hacerme reír y por tu forma de ver el mundo. Gracias por evitar que la distancia afectase a nuestra amistad. A **Natalia**, por ser la divertida de la pandilla y por formar parte de mi vida durante todos estos años.

A mi familia, por contar con vuestro respaldo en cada paso que doy. A mis padres **Lucy** y **Jose** por confiar en mí, apoyarme y ayudarme siempre. A mi hermana gemela, **Antía**, por ser la extrovertida y la divertida de las dos, y por ser un ejemplo de superación para mí. Por asegurarme que puedo conseguir todo aquello que me proponga. A mis abuelos **Victoria** y **Juan**, por intentar comprender a qué me dedico y por todo el cariño que me dais. A mi tío

Juanjo, por estar siempre disponible para acompañarme y ayudarme en todo lo posible. Espero sinceramente que este trabajo sirva para compensaros el tiempo que no os he podido dedicar. Esta Tesis Doctoral es tan vuestra como mía.

A toda mi familia por interesaros en mi trabajo. Siempre recordaré a todas las personas que he perdido estos últimos años. Quiero dar una mención especial a mi primo **Getulio Landeira** y a mi padrino **José Andrade**, por enseñarme que la felicidad se esconde tras las pequeñas cosas de la vida. Todavía teníais mucho que enseñarme, pero os habeis ido antes de tiempo. Siempre os mantendré vivos en mis recuerdos.

Estos últimos años están cargados de grandes recuerdos, anécdotas y, lógicamente, de altibajos. Gracias a todas las personas que, de una manera más o menos directa, me habeis acompañado y apoyado todos estos años, puedo cerrar uno de los capítulos de mi vida y empezar otro nuevo. Espero poder seguir contando con vosotros en los próximos proyectos de mi vida.

También me gustaría pedir disculpas y dar las gracias a todas aquellas personas que, de un modo u otro, han aportado su grano de arena pero que, por simple olvido y sin mala intención, no aparecen mencionadas en los anteriores párrafos.

Finalmente, me veo en la necesaria obligación de incluir a las ratas de laboratorio en este apartado de agradecimientos por haberme aportado y enseñado tanto.

¡Muchísimas gracias a todos!

Resumen

El Fluoromisonidazol ($[^{18}\text{F}]$ FMISO) es un radiofármaco que se emplea para la detección de tejidos hipóxicos *in vivo* mediante la PET. Debido a que el acúmulo de este trazador está inversamente relacionado con la presión parcial de oxígeno celular, podría ser un indicador potencial de la penumbra, es decir, del tejido dañado potencialmente salvable. El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es explorar el uso del FMISO en modelos experimentales de hemorragia cerebral y enfermedad arterial periférica inducidos en ratas. Esta Tesis Doctoral ha permitido confirmar la viabilidad de la técnica de PET con FMISO para el estudio de la presencia de regiones hipóxicas *in vivo*, tratándose de una herramienta útil para el seguimiento de la evolución de una determinada patología en ensayos clínicos con pacientes.

Resumo

O Fluoromisonidazol ($[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$) é un radiofármaco que se emprega para a detección de tecidos hipóxicos *in vivo* mediante a PET. Debido a que o acúmulo deste trazador está inversamente relacionado coa presión parcial de osíxeno celular, podería ser un indicador potencial da penumbra, é dicir, do tecido danado potencialmente salvable. O obxectivo principal desta Tese Doutoral é explorar o uso do FMISO en modelos experimentais de hemorraxia cerebral e enfermidade arterial periférica inducidos en ratas. Esta Tese Doutoral permitiu confirmar a viabilidade da técnica de PET con FMISO para o estudo da presenza de rexións hipóxicas *in vivo*, tratándose dunha ferramenta útil para o seguimento da evolución dunha determinada patoloxía en ensaios clínicos con pacientes.

Abstract

Fluoromisonidazole ($[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$) is a radiopharmaceutical used for the detection of hypoxic tissues *in vivo* by PET. Because the accumulation of this tracer is inversely related to cellular oxygen partial pressure, it could be a potential indicator of penumbra, that is, potentially salvageable damaged tissue. The main objective of this PhD Thesis is to explore the use of FMISO in experimental models of cerebral hemorrhage and peripheral arterial disease induced in rats. This Doctoral Thesis has confirmed the feasibility of the PET technique with FMISO for the study of the presence of hypoxic regions *in vivo*, being a useful tool for monitoring the evolution of a particular pathology in clinical trials with patients.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALN	Alúmina neutra o Alúmina-N
BGO	<i>Bismuth germanate</i> (Germanato de bismuto)
^{11}C	Carbono-11
^{13}C	Carbono-13
^{14}C	Carbono-14
CT	<i>Computed Tomography</i> (Tomografía Computarizada)
^{64}Cu	Cobre-64
EAP	Enfermedad Arterial Periférica
ET	<i>Echo Time</i> (Tiempo de eco)
^{18}F	Flúor-18
^{19}F	Flúor-19
FA	<i>Flip Angle</i> (Ángulo de giro)
^{18}F FDG	^{18}F Fluorodeoxyglucose (^{18}F Fluorodesoxiglucosa)
^{18}F FMISO	^{18}F Fluoromisonidazole (^{18}F Fluoromisonidazol)
FOV	<i>Field Of View</i> (Campo de visión)
Gd	Gadolinio
GSO	<i>Cerium-doped gadolinium oxyorthosilicate</i> (Oxiortosilicato de gadolinio dopado con cerio)
^1H	Hidrógeno-1
HIF-1	<i>Hypoxia Inducible Factor</i> (Factor de transcripción inducible por hipoxia)
HUs	Hounsfield
ICH	<i>Intracerebral Hemorrhage</i> (Hemorragia cerebral)

I/D	Izquierda/Derecha
¹¹¹ In	Indio-111
LSO	<i>Cerium-doped lutetium oxyorthosilicate</i> (Oxiortosilicato de lutecio dopado con cerio)
LYSO	<i>Cerium-doped lutetium-yttrium oxyorthosilicate</i> (Oxiortosilicato de lutecio ytrio dopado con cerio)
MAPMT	<i>Multi-Anode Photomultiplier</i> (Tubo fotomultiplicador multiánodo)
MLEM	<i>Maximum Likelihood Expectation Maximization</i> (Algoritmo máximo de probabilidad de expectativa de maximización)
⁹⁹ Mo	Molibdeno-99
MR	<i>Magnetic Resonance</i> (Resonancia Magnética)
¹³ N	Nitrógeno-13
²³ Na	Sodio-23
NA	<i>Number of Averages</i> (Número de promedios)
NaI(Tl)	Ioduro de sodio dopado o activado con talio
O ₂	Oxígeno
¹⁷ O ₂	Oxígeno-17
[¹⁸ O ₂]H ₂ O	Agua enriquecida con oxígeno-18
³¹ P	Fósforo-31
PBS	Tampón fosfato salino
PET	<i>Positron Emission Tomography</i> (Tomografía por Emisión de Positrones)
PMTs	<i>Photomultiplier Tubes</i> (Tubos fotomultiplicadores)

RARE	<i>Rapid Acquisition Relaxation Enhancement</i> (Secuencia de adquisición rápida con realce de la relajación)
RF	<i>Radiowave Frequency</i> (Radiofrecuencia)
ROIs	<i>Regions Of interest</i> (Regiones de interés)
RT	<i>Repetition time</i> (Tiempo de repetición)
SiPM	<i>Silicon Photomultiplier</i> (Fotodetector de silicio)
SPE	Extracción en fase sólida
SPECT	<i>Single Photon Emission Tomography</i> (Tomografía por Emisión de Fotón Simple)
SUV	<i>Standard Uptake Value</i> (Valor estandarizado de captación)
$t_{1/2}$	Período de semidesintegración
^{99m}Tc	Tecnecio-99 metaestable
^{201}Tl	Talio-201
^{99m}Tc DMSA	^{99m}Tc Succímero
^{99m}Tc DTPA	^{99m}Tc Pentetato
^{99m}Tc HMPAO	^{99m}Tc Exametazima
^{99m}Tc MAG3	^{99m}Tc Mertiatida
^{99m}Tc MIBI	^{99m}Tc Sestamibi
^{99m}Tc TTF	^{99m}Tc Tetrofosmin (^{99m}Tc Tetrofosmina)
US	<i>Ultrasound</i> (Ultrasonidos)
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
^{90}Y	Itrio-90
^{90}Y DOTATOC	^{90}Y DOTA-Tyr3-octreotide

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Capítulo 1: Introducción	29
1.1 Técnicas de imagen molecular	31
1.1.1 Introducción	31
1.1.2 Tomografía por Emisión de Positrones (PET)	34
1.1.2.1 Definición	34
1.1.2.2 Instrumentación	34
1.1.2.3 Radiofármacos	36
1.1.2.4 [¹⁸ F]FDG en procesos inflamatorios	40
1.1.3 Tomografía por Emisión de Fotón Simple (SPECT)	40
1.1.3.1 Definición	40
1.1.3.2 Instrumentación	41
1.1.3.3 Radiofármacos	42
1.1.3.4 [^{99m} Tc]TTF en estudios de perfusión	43
1.1.4 Técnicas de imagen morfológica	44
1.1.4.1 Tomografía Computarizada (CT)	44
1.1.4.2 Resonancia Magnética (MR)	47
1.2 Hipoxia	50
1.2.1 Introducción	50
1.2.2 Hipoxia isquémica	53
1.2.2.1 Definición	53
1.2.2.2 Tipos y causas principales	54
1.2.3 Hemorragia cerebral	55
1.2.3.1 Definición	55

1.2.3.2 Causas	55
1.2.3.3 Procesos de hipoxia	56
1.2.4 Enfermedad arterial periférica	57
1.2.4.1 Definición.....	57
1.2.4.2 Causas	57
1.2.4.3 Procesos de hipoxia	58
1.2.5 Detección de hipoxia	59
1.2.5.1 Técnicas convencionales	59
1.2.5.2 Técnicas de imagen PET	63
1.3 Bibliografía	65
Capítulo 2: Justificación y objetivos	73
2.1 Justificación.....	75
2.2 Objetivos	77
2.2.1 Objetivos generales.....	77
2.2.2 Objetivos específicos.....	77
Capítulo 3: Detección longitudinal de hipoxia en un modelo de hemorragia cerebral a través de estudios de imagen [¹⁸F]FMISO PET	81
3.1 Introducción.....	83
3.1.1 Hemorragia cerebral.....	83
3.1.2 Detección de hipoxia en infarto cerebral mediante FMISO PET	84
3.2 Justificación y objetivos.....	85
3.3 Material y métodos	85
3.3.1 Modelo de hemorragia cerebral en rata.....	85
3.3.2 Diseño del estudio	87

3.3.3 Radiosíntesis de FMISO.....	90
3.3.4 Protocolo de imágenes FMISO PET/CT.....	90
3.3.5 Protocolo de imágenes MR.....	91
3.3.6 Análisis de las imágenes PET/CT y MR.....	93
3.3.7 Ensayo de inmunofluorescencia.....	94
3.3.8 Tamaño muestral y análisis estadístico.....	95
3.4 Resultados.....	95
3.4.1 Estudios de imagen en ratas con hemorragia cerebral.....	95
3.4.2 Estudios de imagen en animales control.....	99
3.4.3 Evaluación de la integridad de la barrera hematoencefálica.....	101
3.4.4 Ensayo de inmunofluorescencia.....	102
3.5 Discusión.....	104
3.6 Conclusiones.....	107
3.7 Bibliografía.....	108
Capítulo 4: Detección longitudinal de hipoxia en un modelo de enfermedad arterial periférica a través de estudios de imagen [¹⁸F]FMISO PET.....	115
4.1 Introducción.....	117
4.1.1 Enfermedad arterial periférica.....	117
4.1.2 PET y SPECT en enfermedad arterial periférica.....	118
4.2 Justificación y objetivos.....	120
4.3 Material y métodos.....	121
4.3.1 Modelo de enfermedad arterial periférica en rata.....	121
4.3.2 Diseño del estudio.....	123

4.3.3 Radiosíntesis de FDG	124
4.3.4 Preparación de TTF.....	124
4.3.5 Radiosíntesis de FMISO.....	124
4.3.6 Protocolo de imágenes PET/CT y SPECT	125
4.3.7 Análisis de las imágenes PET/CT y SPECT.....	128
4.4 Resultados	130
4.4.1 Estudios de inflamación FDG PET/CT	130
4.4.2 Estudios de perfusión TTF SPECT.....	131
4.4.3 Estudios de hipoxia FMISO PET/CT	133
4.5 Discusión.....	135
4.6 Conclusiones.....	138
4.7 Bibliografía	138
Capítulo 5: Discusión.....	147
Capítulo 6: Conclusiones	159
Anexo: Publicaciones	165

CAPÍTULO 1

Introducción



1.1 Técnicas de imagen molecular

1.1.1 Introducción

La imagen molecular permite la visualización no invasiva y en tiempo real de procesos bioquímicos a nivel celular y molecular en células vivas, tejidos y/o sujetos vivos (Massoud & Gambhir, 2003; Weissleder & Pittet, 2008). La imagen molecular implica el empleo de una instrumentación especializada para visualizar las características de los tejidos y/o marcadores bioquímicos por sí misma o a través del uso de agentes de contraste específicos. La información obtenida permite comprender fenómenos biológicos e identificar regiones patológicas y sus mecanismos. En consecuencia, la imagen molecular presenta un papel importante en el diagnóstico, la supervisión de terapias, el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos, y el estudio de la fisiopatología de las enfermedades.

En comparación con los ensayos realizados *in vitro*, que requieren que las células sean extraídas del entorno biológico, la imagen molecular permite estudiar las células en su ambiente natural de forma no invasiva (James & Gambhir, 2012). A diferencia de los experimentos basados en cultivos celulares o tisulares, los estudios *in vivo* permiten incorporar todos los complejos factores fisiológicos (neuronales, hormonales, nutricionales, inmunológicos, etc.) que se encuentran presentes en un organismo vivo. Además, la imagen molecular permite investigar las vías de señalización y transducción sin producir alteraciones y en tiempo real. Debido a que se tratan de técnicas no invasivas, permiten realizar un análisis en serie (longitudinal) de una determinada enfermedad a lo largo de todo el proceso patológico, y evaluar la eficacia y la seguridad de un determinado tratamiento. En definitiva, las técnicas de imagen molecular permiten evaluar las funciones y estructuras biológicas *in vivo* de forma no invasiva, proporcionando información a nivel cuantitativo, espacial y temporal de tejidos sanos y patológicos.

Las principales técnicas de imagen molecular son la Tomografía por Emisión de Positrones (PET) y la Tomografía por Emisión de Fotón Simple



(SPECT). También se incluyen en este grupo las técnicas de imagen óptica (bioluminiscencia y fluorescencia), aunque en este caso no se trata de una herramienta trasladable, y únicamente puede ser usada en el ámbito de la investigación con animales de laboratorio. Las técnicas de imagen molecular se combinan con otro grupo de modalidades que proporcionan información estructural o anatómica con una excelente resolución espacial (Zanzonico, 2017). Se tratan de técnicas de imagen basadas en el uso de rayos X, como pueden ser la radiografía simple y la Tomografía Computarizada (CT), la Resonancia Magnética (MR) y los ultrasonidos (US) (Figura 1.1). Además, estas técnicas de imagen morfológica también permiten obtener información funcional, como es el caso de la MR funcional, la MR de difusión y el CT de perfusión.

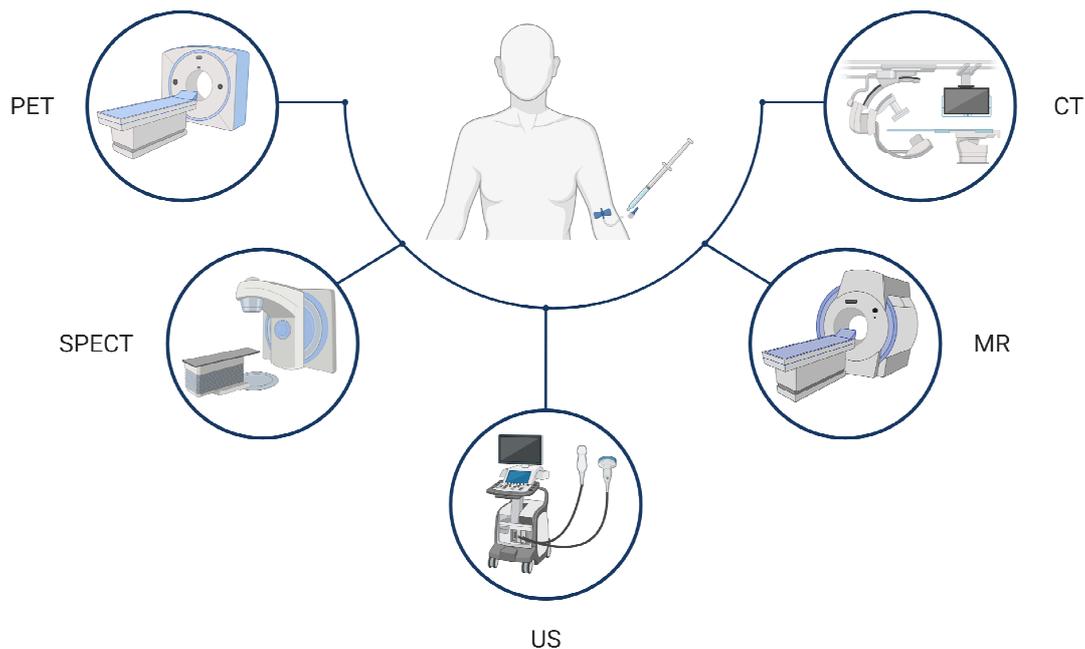


Figura 1.1. Modalidades de imagen empleadas en rutina clínica que permiten explorar la función y la anatomía de determinadas estructuras del cuerpo. Estas técnicas no invasivas emplean, según el caso, radiaciones ionizantes, ultrasonidos, ondas de radiofrecuencia y rayos X para obtener las imágenes. La especialidad de Medicina Nuclear utiliza radiofármacos con fines diagnósticos o terapéuticos. Por otro lado, las técnicas de imagen estructural usan contrastes para aumentar su capacidad diagnóstica. La Figura fue creada con BioRender (<https://biorender.com>).



Las técnicas de imagen molecular PET y SPECT están basadas en el uso de radionúclidos, es decir, fuentes de radiactividad no encapsuladas que funcionan como radiotrazadores biológicos (conocidos también como radiofármacos) y que se administran de forma sistémica y normalmente por vía intravenosa. El diagnóstico por imagen con radionúclidos en pacientes forma parte de la especialidad clínica conocida como Medicina Nuclear. Las técnicas de imagen molecular PET y SPECT presentan una gran cantidad de ventajas con respecto a otras modalidades de imagen. En primer lugar, la actividad específica, es decir, la actividad por unidad de masa de los radiofármacos y la sensibilidad de detección de los equipos de imagen son lo suficientemente elevadas como para que las actividades administradas necesarias para la obtención de las imágenes (del rango subnanomolar) carezcan de efectos terapéuticos y no induzcan ningún tipo de cambio en el organismo. Este hecho contrasta con la CT y la MR, por ejemplo, en las que las unidades de masa de los agentes de contraste son mucho más elevadas (en el rango de micromolar a milimolar) y, por lo tanto, no es posible garantizar que no se produzcan alteraciones en el organismo. En segundo lugar, las técnicas PET y SPECT permiten obtener imágenes cuantitativas cuya intensidad (cuentas radiactivas medidas por unidad de tiempo) refleja la concentración radiactiva. En otras modalidades de imagen, la relación entre el agente de contraste y las intensidades de la imagen no suele ser tan directa. En tercer y último lugar, se han desarrollado gran cantidad de radiotrazadores molecularmente dirigidos a vías de interés (como metabolitos y análogos de metabolitos, neurotransmisores, fármacos, ligandos de unión a receptores, anticuerpos, etc.) para la caracterización específica de procesos biológicos *in situ*. Las técnicas de imagen PET y SPECT también tienen un par de inconvenientes que deben ser citados. Entre estos inconvenientes se encuentra la resolución espacial, que es muy inferior a otras técnicas de imagen como la CT y la MR. Además, el uso de moléculas marcadas radiactivamente implica que es necesario administrar una determinada dosis de radiación a los sujetos objeto de estudio. Aunque se tratan de niveles de radiación muy bajos, es necesario tenerlos en



cuenta para trabajar con precaución y emplear procedimientos bien establecidos.

1.1.2 Tomografía por Emisión de Positrones (PET)

1.1.2.1 Definición

La PET es una técnica de imagen que se basa en el empleo de moléculas marcadas con isótopos radiactivos emisores de positrones. De esta forma, la molécula marcada radiactivamente se administra a un sujeto (normalmente, mediante una inyección intravenosa) y se estudia su biodistribución a través de su detección en un escáner o tomógrafo PET. Los detectores de radiación se distribuyen en forma de anillo y están compuestos por un cristal centelleador acoplado a un fotodetector. Los radioisótopos emisores de positrones empleados en PET son sintetizados en un ciclotrón y presentan un período de semidesintegración ($t_{1/2}$) corto, como pueden ser el Oxígeno-15 ($t_{1/2} = 2$ min), el Nitrógeno-13 ($t_{1/2} = 10$ min), el Carbono-11 ($t_{1/2} = 20.3$ min) y el Flúor-18 ($t_{1/2} = 109.8$ min) (Pimlott & Sutherland, 2011). En los últimos años se han desarrollado otros radioisótopos emisores de positrones, como el Galio-68 ($t_{1/2} = 67.8$ min), que tiene la ventaja de que no es generado en un ciclotrón, y el Zirconio-89 ($t_{1/2} = 78.4$ h), que presenta una vida media óptima para el estudio de procesos biológicos con cinéticas largas.

1.1.2.2 Instrumentación

Los positrones son partículas de antimateria que tienen la misma masa que el electrón pero con carga positiva y que son emitidos por los radionúclidos que presentan una relación protón-neutrón inestablemente alta. De esta forma, una vez administrada la molécula radiactiva, el positrón se libera en el organismo y es aniquilado con un electrón, dando lugar a dos fotones que se liberan en la misma dirección pero en sentidos opuestos. La PET se basa en la detección por coincidencia de estos dos fotones procedentes de la aniquilación, que tienen una energía de 511 keV y forman un ángulo de 180° (Phelps, 2000) (Figura 1.2). Cuando los dos fotones de un mismo evento de aniquilación son detectados simultáneamente, es decir, dentro de una ventana temporal del



orden de los nanosegundos, el circuito se dispara y se genera un evento de coincidencia. La detección individual de cada uno de los fotones se realiza a través de la interacción del fotón con el cristal centelleador, y la consecuente producción de luz que es captada por los fotodetectores. Se emplean tanto fotodetectores analógicos, como pueden ser los tubos fotomultiplicadores (PMTs), como dispositivos digitales de estado sólido, como en el caso de los fotodetectores de silicio (SiPM). En ambos casos, la señal lumínica que llega a los fotodetectores se convierte en una señal eléctrica que se amplifica en diferentes etapas y finalmente se genera un evento, que contiene la posición en la que ha sido detectado el fotón. La combinación de dos eventos detectados en coincidencia da lugar a una línea que une los puntos en los que los fotones han sido detectados (línea de coincidencia). En un escáner PET se emplean detectores posicionados alrededor del paciente, lo que permite adquirir datos de forma simultánea a lo largo de todo el campo de visión (FOV), sin necesidad de mover los detectores. Asimismo, la generación de proyecciones alrededor del paciente facilita la obtención de una distribución tridimensional del radiofármaco inyectado a través de la aplicación de unos métodos matemáticos denominados algoritmos de reconstrucción tomográfica.

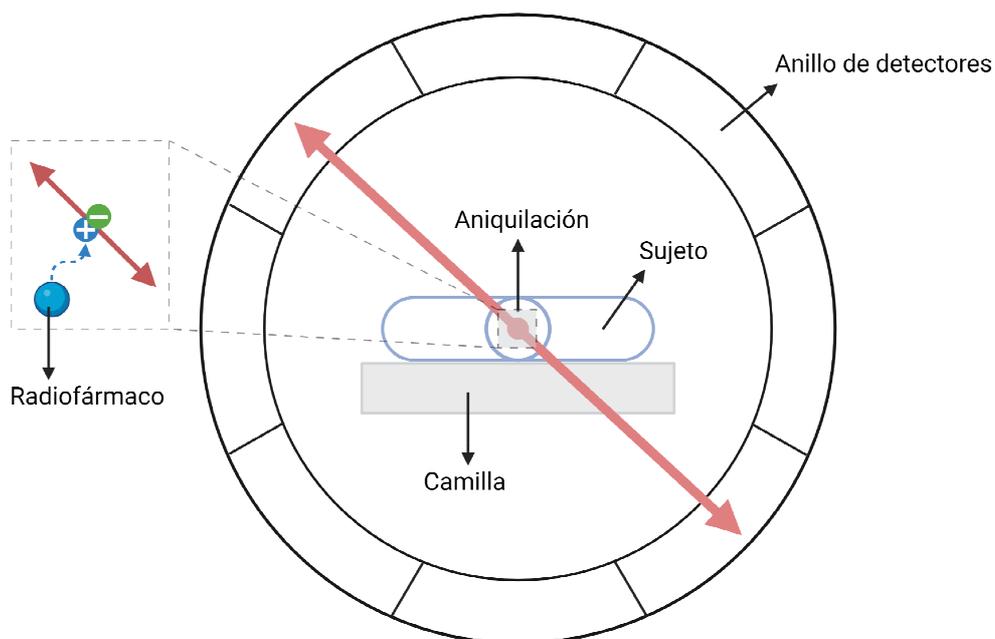




Figura 1.2. Esquema del anillo de detectores de un equipo PET. El proceso de aniquilación de un positrón con un electrón da lugar a dos fotones que se liberan en la misma dirección pero en sentidos opuestos. La detección de dicha aniquilación permite obtener tanto información sobre su existencia como del lugar donde se ha producido. La Figura fue creada con BioRender (<https://biorender.com>).

Los escáneres PET suelen emplear una serie de anillos compuestos por detectores discretos de área reducida, es decir, detectores de bloque formados por cristales individuales o pixelados, que rodean al sujeto. Los materiales de los detectores de centelleo más utilizados en la PET son el germanato de bismuto (BGO, $\text{Bi}_4\text{Ge}_3\text{O}_{12}$), oxiortosilicato de gadolinio dopado con cerio (GSO(Ce) o GSO, $\text{Gd}_2\text{SiO}_5:\text{Ce}$), oxiortosilicato de lutecio dopado con cerio (LSO(Ce) o LSO, $\text{Lu}_2\text{SiO}_5:\text{Ce}$), y oxiortosilicato de lutecio ytrio dopado con cerio (LYSO(Ce) o LYSO, $\text{Lu}_2\text{YSiO}_5:\text{Ce}$), siendo los detectores de LSO y LYSO los más empleados.

La imagen PET es útil en el diagnóstico de determinadas patologías y en el seguimiento de tratamientos ya que, de forma general, los cambios bioquímicos se producen antes que los anatómicos. Esta característica ha hecho que, en los últimos años, la evaluación de los pacientes en base a cambios bioquímicos se haya impuesto a una valoración basada en cambios morfológicos. En la rutina clínica actual es común combinar las imágenes de PET con las imágenes morfológicas, principalmente en equipos híbridos PET/CT y, en menor medida, PET/MR (Pichler *et al.*, 2008). Este tipo de enfoque se conoce como imagen multimodal, ya que se combinan dos o más modalidades de imagen para compensar las carencias de cada una de ellas. A pesar de que la imagen PET/CT y PET/MR es una técnica relativamente cara, existen una amplia lista de indicaciones clínicas en diferentes ámbitos de la medicina.

1.1.2.3 Radiofármacos

Aunque pueden emplearse una gran variedad de radiofármacos para estudiar determinados procesos moleculares, la realidad es que la mayoría



de indicaciones clínicas actuales se realizan con un único radiofármaco. La [^{18}F]Fluorodesoxiglucosa ([^{18}F]FDG) es un análogo de la glucosa, en la que se ha sustituido el grupo hidroxilo del carbono 2 por un átomo de ^{18}F . Tras su administración por vía intravenosa, la FDG se distribuye por el sistema circulatorio y se incorpora a las células por los mismos mecanismos de transporte que la glucosa no marcada (los transportadores sodio-glucosa a través de un gradiente de concentración y los transportadores específicos de membrana). En el interior de la célula, la FDG se fosforila a FDG-6-fosfato mediante la acción de la hexoquinasa que, a diferencia de su análogo no marcado, no puede ser metabolizada por la vía glucolítica o de la síntesis del glucógeno. La rápida fosforilación de la FDG tras su entrada en la célula previene su difusión al exterior, ya que el grupo fosfato impide que la FDG 6-fosfato pueda atravesar la membrana plasmática. Además, la enzima glucosa-6-fosfatasa que cataliza el paso inverso a la hexoquinasa se encuentra exclusivamente en el hígado y los riñones. De esta forma, la FDG sufre un atrapamiento metabólico en la célula (Figura 1.3). El enclaustramiento de la FDG permite que pueda ser considerado como un biomarcador del metabolismo glucídico celular.

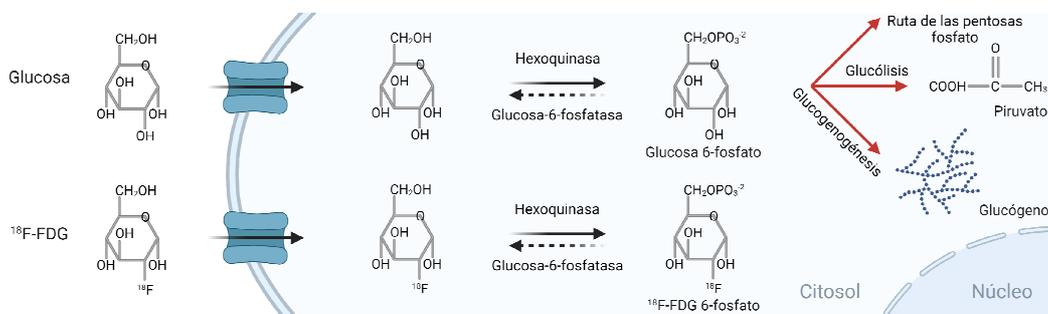


Figura 1.3. Metabolismo intracelular del radiofármaco FDG, marcador del metabolismo glucídico celular. La FDG atraviesa la membrana celular a través de los transportadores de glucosa y sufre una fosforilación por acción de la enzima hexoquinasa. A diferencia de la glucosa, la FDG 6-fosfato no puede ser metabolizada por la vía glucolítica, de la síntesis del glucógeno o de la ruta de las pentosas fosfato, lo que provoca su enclaustramiento celular. La enzima glucosa 6-fosfatasa se localiza exclusivamente en el hígado y en los riñones, lo que evita que la FDG regrese al medio extracelular. La Figura fue creada con BioRender (<https://biorender.com>).



La FDG es el radiofármaco PET más empleado en rutina clínica debido a su aplicación en el estudio de patologías muy diversas, a sus características metabólicas, a la rapidez de su síntesis y, sobre todo, por el período de semidesintegración del Flúor-18. Los estudios de imagen PET con FDG son una herramienta fundamental en Oncología para la detección, estadificación, sospecha de recidiva y respuesta al tratamiento, ya que el radiofármaco se incorpora a las células que presentan un mayor metabolismo glucídico. En las lesiones neoplásicas, que cursan con un elevado consumo de glucosa, existe un incremento de los transportadores de membrana que condiciona una mayor incorporación de FDG, lo que provocará un elevado contraste entre la actividad presente en el tumor respecto a la actividad localizada en el tejido sano circundante. De esta forma, la concentración de FDG en las células tumorales es un reflejo del aumento de su metabolismo glucídico para poder mantener una elevada tasa de crecimiento o proliferación. En consecuencia, una captación elevada de FDG se relaciona con el grado de malignidad tumoral. Los estudios PET con FDG son especialmente útiles para la detección de metástasis.

La FDG es un radiofármaco capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, lo que permite su empleo en el campo de la Neurología. La glucosa es la principal fuente de energía del cerebro, de manera que cualquier daño cerebral provocará una disminución del consumo de glucosa y se traducirá en un hipometabolismo glucídico en las imágenes de PET con FDG. En consecuencia, la FDG se emplea en rutina clínica para diagnosticar demencias, identificar el foco epileptógeno y estudiar la extensión del daño en un traumatismo craneoencefálico. La PET cerebral con FDG permite diagnosticar las demencias (enfermedad de Alzheimer, demencia de cuerpos de Lewy y demencia frontotemporal) en las fases evolucionadas de la enfermedad y también de forma precoz, antes de que se detecten cambios morfológicos en las técnicas de imagen anatómica (CT y MR).



La PET con FDG permite estudiar el metabolismo miocárdico en casos sospechosos de infarto cardíaco. De esta forma, las imágenes funcionales mostrarán una región hipometabólica en caso de infarto.

A pesar de la amplia utilización de la FDG en diferentes campos de la Medicina, este radiofármaco no es un trazador específico de los tejidos tumorales, siendo necesario el empleo de otros radiotrazadores PET para el estudio de la patología tumoral. La colina es un componente de la fosfatidilcolina, elemento esencial de las membranas celulares. Debido a que la actividad proliferativa tumoral requiere un consumo de colina para cubrir la demanda de síntesis de fosfolípidos para sus membranas, es posible detectar una elevada captación de colina marcada radiactivamente (con ^{11}C o ^{18}F) en varios tipos de tumores mediante imagen PET. La colina se emplea fundamentalmente para estudiar la extensión del tumor en pacientes recién diagnosticados con cáncer de próstata y su recurrencia en pacientes previamente sometidos a tratamiento. Por otro lado, la L-metionina es un aminoácido esencial necesario para la síntesis proteica. La ^{11}C -metionina es un radiofármaco que accede al interior celular mediante la vía de los transportadores de aminoácidos, que se encuentran incrementados en los tumores malignos. El estudio PET con ^{11}C -metionina está indicado en el diagnóstico de tumores cerebrales, en la planificación del tratamiento y, principalmente, en la detección de recidiva tras el tratamiento.

En el campo de la Neurología, se dispone de trazadores que permiten analizar el depósito de β amiloide de las placas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer (^{11}C -PIB, ^{18}F -florbetapir, ^{18}F -flutemetanol, ^{18}F -florbetaben, etc.), estudiar la sinapsis dopaminérgica en los síndromes parkinsonianos (^{18}F -fluorodopa y ^{11}C -raclopride) e investigar el foco epileptógeno en las epilepsias (^{11}C -flumazenil).

Los radioisótopos PET pueden ser empleados tanto para el diagnóstico y seguimiento de determinadas patologías como para el tratamiento de las



mismas. En el caso del tratamiento de tumores neuroendocrinos se emplean radioisótopos marcados con análogos de la somatostatina como el ^{90}Y -Tyr3-DOTA-octreotida (DOTATOC). También se utilizan esferas radiactivas de vidrio (Therasphere[®]) o resina (SIR-spheres[®]) marcadas con ^{90}Y como tratamiento paliativo para los tumores hepáticos no resecables.

1.1.2.4 [^{18}F]FDG en procesos inflamatorios

Los estudios de imagen PET con FDG también se emplean para la detección de infección e inflamación activa, debido al acúmulo del radiofármaco en los macrófagos y en tejidos de granulación (heridas). Este radiofármaco es útil para la identificación de procesos inflamatorios e infecciosos, como pueden ser la vasculitis de grandes vasos, enfermedades granulomatosas (sarcoidosis) y procesos inflamatorios politópicos o poliarticulares (artritis reumatoide, polimialgia reumática, etc.). Los estudios PET con FDG están indicados para el diagnóstico de la infección en caso de infección crónica de huesos o de estructuras adyacentes, infección de tejidos blandos, prótesis de cadera dolorosa y prótesis vascular; y para la detección de la extensión de la inflamación en caso de sarcoidosis, enfermedad intestinal inflamatoria y vasculitis que afecta a grandes vasos.

1.1.3 Tomografía por Emisión de Fotón Simple (SPECT)

1.1.3.1 Definición

La SPECT es la técnica de imagen más empleada en Medicina Nuclear, ya que se trata de una modalidad utilizada desde hace más de 50 años. El SPECT se basa en el empleo de radioisótopos emisores de fotones, entre los cuales se encuentran el Tecnecio-99 metaestable ($t_{1/2} = 6 \text{ h}$), el Iodo-123 ($t_{1/2} = 13.3 \text{ h}$) y el Indio-111 ($t_{1/2} = 2.8 \text{ días}$). La base fundamental de la SPECT es muy similar a la de la PET, de forma que se administra la molécula marcada radiactivamente a un sujeto (generalmente, por vía intravenosa) y se estudia su biodistribución a través de un detector de radiación externo.



1.1.3.2 Instrumentación

En la SPECT se emplea un detector que consiste en una gammacámara formada por cristales de centelleo no pixelados compuestos por ioduro de sodio dopado con talio (NaI(Tl)), con un grosor del orden de 1 centímetro. Estos cristales detienen el 95% de los fotones emitidos por los radioisótopos como en el caso del radionucleido más empleado en los estudios SPECT, el Tecnecio-99 metaestable (^{99m}Tc), que presenta una energía de 140 keV. Debido a que no existen dos fotones en coincidencia, es necesario emplear un colimador que permita estimar la dirección en la que es emitido cada fotón. De esta forma, se trata de un dispositivo compuesto por una placa de plomo con agujeros (aberturas), a través de los cuales pasará la radiación para alcanzar el cristal. La función del colimador es “direccionar” la radiación entrante, de manera que cualquier radiación que viaje en un ángulo oblicuo a los ejes de las aberturas golpeará las paredes de plomo (septos) y no alcanzará el cristal, permitiendo que sólo la radiación que viaje paralela o casi paralela a los ejes de las aberturas alcance el cristal y contribuya a la generación de la imagen. Una vez que la radiación incidente atraviesa la abertura del colimador, incide y produce luz dentro del cristal centelleador. Siguiendo un proceso similar al caso de la PET, la señal luminosa resultante se distribuye entre un conjunto de PMTs que se encuentran unidos al cristal (Figura 1.4).

La gammacámara permite obtener imágenes planares del cuerpo en diferentes localizaciones anatómicas. Por ello, si la gammacámara gira alrededor del sujeto se pueden adquirir proyecciones en 360°, que serán empleadas para generar una distribución tridimensional del trazador radiactivo inyectado a través de la aplicación de algoritmos de reconstrucción tomográfica. Este tipo de imagen recibe el nombre de SPECT.

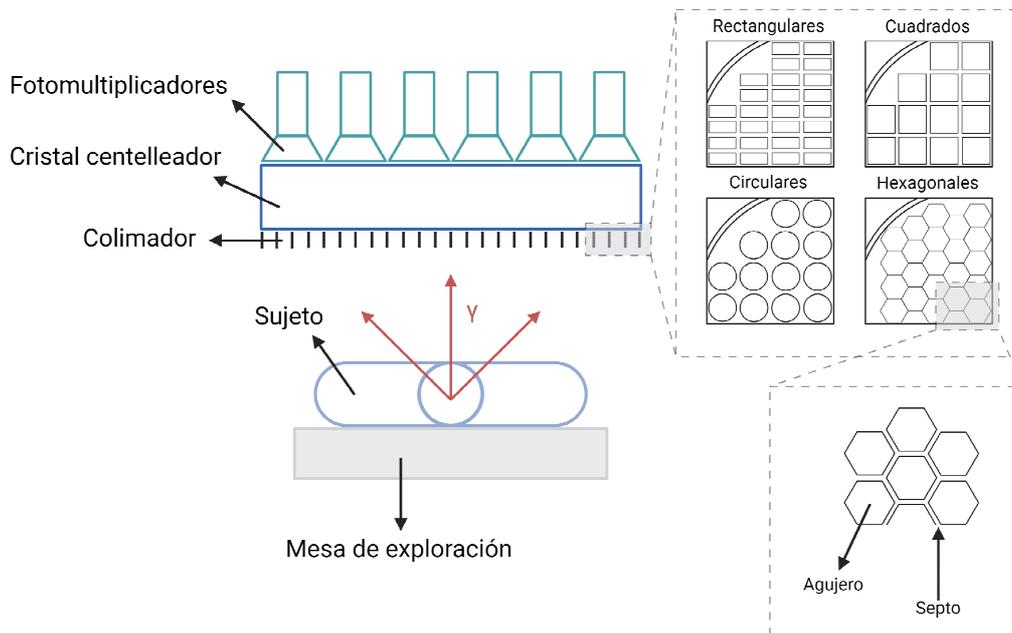


Figura 1.4. Esquema de una gammacámara que consta de un cristal de centelleo que está acoplado a un colimador por su cara inferior y a un conjunto de fotomultiplicadores en su cara superior. El colimador está formado por una gruesa lámina de plomo o tungsteno y está lleno de orificios para poder seleccionar los fotones que proceden de una determinada dirección. La Figura fue creada con BioRender (<https://biorender.com>).

1.1.3.3 Radiofármacos

La imagen SPECT es muy útil en el diagnóstico de determinadas patologías. Sin embargo, al igual que la PET, la imagen SPECT carece de una referencia anatómica que permita identificar con precisión los eventos moleculares. Por ello, en la actualidad se realiza un uso combinado de imagen SPECT y CT en equipos híbridos SPECT/CT. Aunque la resolución espacial es inferior a la de la PET, la técnica SPECT permite estudiar múltiples procesos bioquímicos de forma simultánea a través del uso de radioisótopos que emiten fotones de diferentes energías y al disponer de un amplio abanico de radiofármacos disponibles, mayor que en el caso de la PET.

Los radiofármacos tecneciosos son los más empleados en los estudios de gammagrafía en Medicina Nuclear. El uso de compuestos químicos con



fósforo (polifosfatos) marcados con ^{99m}Tc permite realizar estudios de gammagrafía para detectar lesiones óseas, identificar depósitos anormales de fosfato cálcico, osificaciones heterotópicas (fuera del hueso) o calcificaciones en el tejido blando, y detectar metástasis óseas. Los radiofármacos ^{99m}Tc -DTPA, ^{99m}Tc -DMSA y ^{99m}Tc -MAG3 se emplean para estudiar patologías que puedan alterar la función renal, siendo común el estudio de afecciones que obstruyan la vía urinaria y el control posquirúrgico de un paciente trasplantado renal. El radiotrazador ^{99m}Tc -MIBI permite identificar, localizar y valorar la extensión de una cardiopatía isquémica. Las partículas coloides marcadas con ^{99m}Tc (Nanocol[®]) permiten estudiar el ganglio centinela en pacientes con cáncer de mama. El ^{99m}Tc -HMPAO se emplea para certificar la muerte encefálica.

1.1.3.4 [^{99m}Tc]TTF en estudios de perfusión

La [^{99m}Tc]Tetrofosmina ([^{99m}Tc]TTF) es un trazador que se emplea en estudios de perfusión miocárdica. En concreto, se utiliza para identificar regiones de isquemia miocárdica en pacientes con sospecha de enfermedad arterial coronaria y para evaluar la función ventricular en pacientes con posibles enfermedades cardíacas. Este radiofármaco es un complejo cargado positivamente cuyo acúmulo es proporcional al flujo sanguíneo. El mecanismo de fijación de la TTF depende de la diferencia de potencial transmembrana, incorporándose al citosol en proporción al gradiente metabólico celular. Su mecanismo de captación y retención tiene lugar en las mitocondrias de los cardiomiocitos (Figura 1.5) debido a la presencia de un potencial de membrana negativo (Arbab *et al.*, 1996). La TTF se acumula principalmente en el miocardio, se elimina rápidamente de la sangre, el hígado y los pulmones, y se excreta principalmente a través del sistema urinario. Además, presenta un aclaramiento hepático superior a su análogo [^{99m}Tc]Sestamibi ([^{99m}Tc]MIBI).

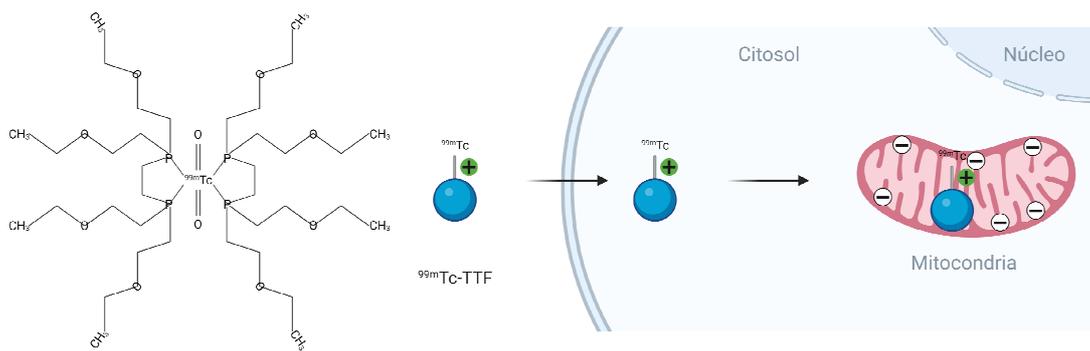


Figura 1.5. Estructura química de la TTF y mecanismo de acúmulo del radiofármaco de perfusión en cardiomiocitos. La TTF atraviesa la membrana celular mediante difusión pasiva. El acúmulo del trazador depende del flujo sanguíneo, viabilidad tisular, permeabilidad vascular, demanda metabólica y actividad mitocondrial. La Figura fue creada con BioRender (<https://biorender.com>).

1.1.4 Técnicas de imagen morfológica

La generación de imágenes multimodales ha llevado al desarrollo de equipos de imagen capaces de adquirir varias modalidades al mismo tiempo. En consecuencia, los equipos híbridos permiten combinar dos modalidades de imagen en un mismo equipo. La posibilidad de fusionar ambas técnicas en un mismo sistema integrado permite suplir las carencias de una con las ventajas de la otra. De esta forma, los equipos híbridos más comunes son la PET/CT, la SPECT/CT y la PET/MR. Las técnicas de imagen molecular permiten estudiar procesos bioquímicos y fisiológicos, mientras que las técnicas de imagen anatómica, con una alta resolución espacial, permiten detectar cambios anatómicos y lesiones, además de obtener una imagen de referencia para los estudios de imagen PET y SPECT.

1.1.4.1 Tomografía Computarizada (CT)

La Tomografía Computarizada (CT) es una modalidad de imagen radiográfica que proporciona mapas tridimensionales de la atenuación relativa de los rayos X por parte de los tejidos de un organismo para obtener imágenes anatómicas. La CT, a diferencia de las radiografías que emplean rayos X, es una técnica tomográfica que permite obtener imágenes anatómicas



tridimensionales. Un equipo CT está compuesto por un tubo de rayos X y un detector que giran alrededor del paciente obteniendo múltiples proyecciones radiográficas que posteriormente son procesadas para generar una imagen tridimensional (Figura 1.6).

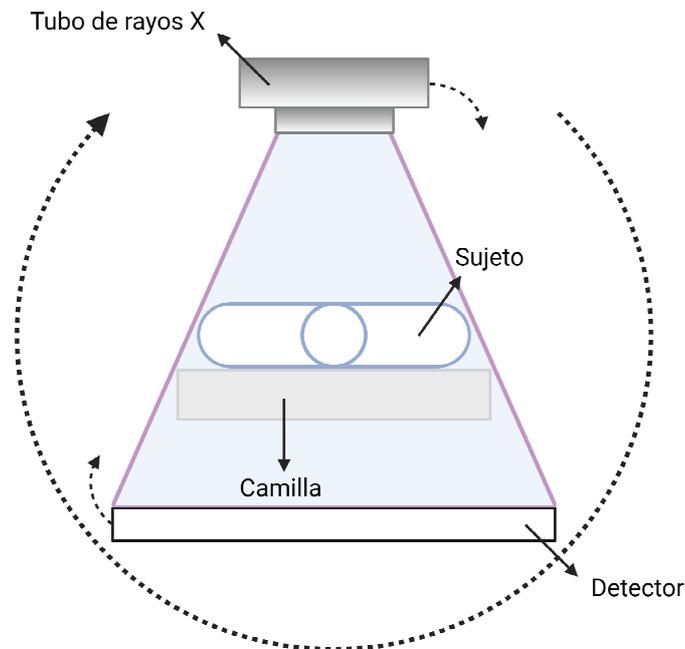


Figura 1.6. Ilustración esquemática de la Tomografía Computarizada. El tubo emite un haz de rayos X que atraviesan al paciente y que es recogido por un sensor. El tubo de rayos X y el detector giran simultáneamente alrededor del cuerpo del paciente. La Figura fue creada con BioRender (<https://biorender.com>).

En los escáneres de CT, los rayos X emanan como un haz cónico desde el punto focal del tubo de rayos X, pasan a través del sujeto e inciden en un detector de radiación en el lado opuesto, obteniendo una imagen de transmisión que se denomina imagen de proyección. Los detectores están formados por materiales radiosensibles que transforman los rayos X absorbidos en luz visible. Posteriormente, el fotodiodo acoplado al detector capta dicha luz y la transforma en una señal eléctrica. Finalmente, el sistema electrónico se encarga de procesar y transmitir esa información. Una vez adquirida la primera proyección, todo el conjunto gira en un determinado ángulo (del orden de $1-2^\circ$) en torno al eje longitudinal del sujeto para adquirir otra imagen de proyección.



El conjunto completo de imágenes de transmisión adquiridas alrededor del sujeto se reconstruye matemáticamente para obtener un conjunto de imágenes transversales, coronales y sagitales contiguas con una excelente resolución espacial (del orden de 100 μm o mejor).

Las imágenes de CT suelen parametrizarse en unidades Hounsfield (HUs), definidas como:

$$HUs = 1000 \frac{\mu - \mu_{\text{agua}}}{\mu}$$

donde μ y μ_{agua} son los coeficientes de atenuación del tejido y del agua, respectivamente. En la escala HU, el agua tiene un valor de 0, el aire de -1000, y el hueso de 1000. Los valores HU para la mayoría de los tejidos blandos se encuentran en un estrecho rango de -100 a 100, de forma que resulta difícil o imposible distinguir los diferentes tejidos blandos sin la administración de agentes de contraste radiográficos (Lusic & Grinstaff, 2013; Wathen *et al.*, 2013).

El poder de detención de los rayos X de un determinado medio viene definido por su densidad de electrones, es decir, del número de electrones por centímetro cúbico que, a su vez, se encuentra determinada por el número atómico y la densidad de masa del medio. En consecuencia, el hueso (con un número atómico y una densidad de electrones altos debido a su contenido en calcio), el pulmón (con unas densidades de masa y de electrones bajas debido a su contenido en aire) y los tejidos blandos pueden distinguirse fácilmente entre ellos en las imágenes de CT. Sin embargo, los distintos tejidos blandos son difíciles o imposibles de diferenciar, tal y como se mencionó previamente. En la rutina clínica, se suelen administrar agentes de contraste iodados por vía intravenosa para aumentar temporalmente la densidad electrónica de los diferentes tejidos, con el consiguiente realce radiográfico de los órganos relacionados con su contenido diferencial de sangre y, por lo tanto, de agente de contraste. Sin embargo, los agentes de contraste de uso clínico son solubles



en agua, excretándose rápidamente a través de los riñones y provocando que el realce del contraste tenga una corta duración.

La CT es una técnica de imagen rápida que presenta una gran resolución espacial (de 0.5-1 mm en equipos clínicos) y un elevado poder de penetración. Sin embargo, debido al uso de radiación, existe un número limitado de estudios CT que se pueden realizar en un mismo paciente en un período determinado. Además, debido a que la CT no permite distinguir los diferentes tejidos blandos, es necesario el uso de agentes de contraste iodados (Massoud & Gambhir, 2003). Este tipo de contrastes no suelen ser específicos y, por lo tanto, no proporcionan información sobre procesos bioquímicos. Además, los contrastes iodados suelen producir toxicidad renal y no pueden ser suministrados en todos los pacientes.

1.1.4.2 Resonancia Magnética (MR)

La Resonancia Magnética (MR) es una modalidad de imagen muy versátil que permite visualizar la estructura interna y la morfología de los tejidos blandos sometiendo al organismo a la acción de un campo magnético. En la MR, los tejidos absorben energía y la devuelven al medio, y la obtención del contraste de los tejidos se basa en la distinta respuesta de los mismos al ser sometidos a las ondas electromagnéticas.

Un equipo de MR presenta tres componentes básicos para la producción de las imágenes anatómicas. El primer elemento es el imán, que genera un campo magnético estático. El segundo elemento es el sistema de gradientes, que se encarga de generar variaciones espaciales del campo magnético. El tercer elemento es la parte de radiofrecuencia (RF), que excita la muestra mediante pulsos y recoge la señal que emite la muestra después de la excitación (Figura 1.7).

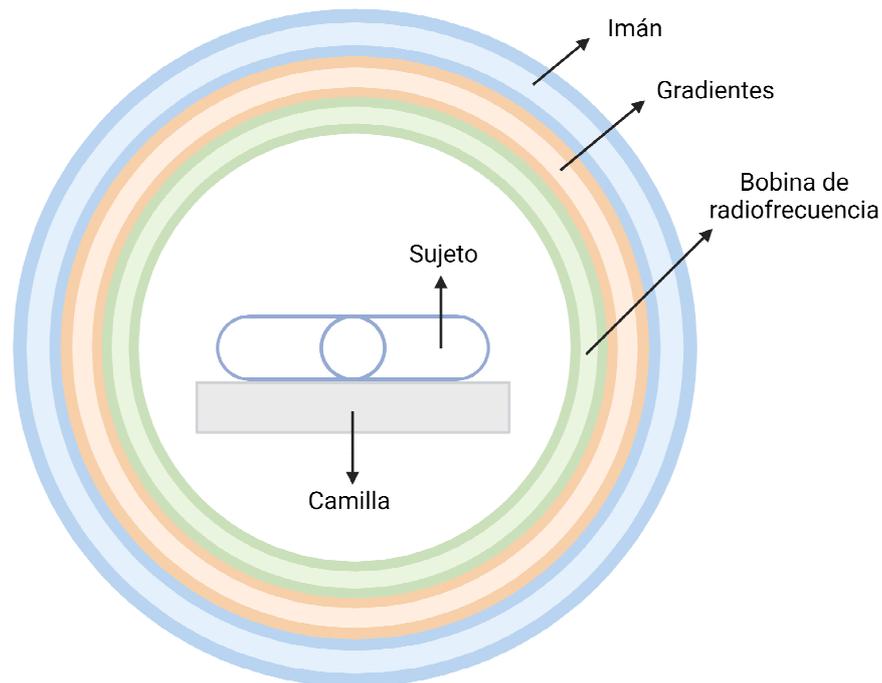


Figura 1.7. Esquema general de los elementos que componen un equipo de Resonancia Magnética. Estos tres elementos principales están conectados a una sala técnica en la que se alojan los armarios de gradientes, de radiofrecuencia, los procesadores de datos y los sistemas de refrigeración del equipo. La Figura fue creada con BioRender (<https://biorender.com>).

Durante la adquisición de las imágenes de MR, el sujeto vivo se encuentra colocado en el interior de un imán. Algunos núcleos atómicos (del cuerpo u otros lugares) tienen características de espín y propiedades magnéticas específicas. Cuando estos núcleos se colocan en un campo magnético externo, se comportan como dipolos magnéticos y se alinean de forma paralela o antiparalela al campo magnético. La imagen de MR se genera a partir de la diferencia neta pequeña obtenida del número de dipolos magnéticos que se alinean en paralelo frente a los que se alinean en antiparalelo. En consecuencia, la MR tiene una sensibilidad pobre (de 10^{-3} a 10^{-5} M), que es muy inferior a la obtenida en las técnicas de imagen basadas en el uso de radionucleidos (de 10^{-10} a 10^{-12} M). La señal de la MR es proporcional a la concentración de núcleos, la relación giromagnética y a la polarización. Además, la señal de MR depende de la abundancia natural del isótopo del elemento magnéticamente activo. Todos los núcleos de Hidrógeno (^1H) son



magnéticamente activos pero sólo el 1% del Carbono existe en la forma detectable por MR (^{13}C), siendo necesario el empleo de un agente de contraste exógeno. Otros núcleos que se pueden visualizar mediante MR, además del hidrógeno y el carbono citados previamente, son el Fósforo-31 (^{31}P), Sodio-23 (^{23}Na), Flúor-19 (^{19}F) y Oxígeno-17 ($^{17}\text{O}_2$).

En general, un escáner de MR está compuesto por un conjunto de bobinas incrustadas: una bobina que genera el campo magnético homogéneo principal; bobinas de gradiente que producen variaciones en el campo magnético en las direcciones x, y y z que se utilizan para localizar la fuente de la señal de MR; y, por último, bobinas de RF que generan un pulso de radiofrecuencia que altera la alineación de los dipolos magnéticos. Después de cada pulso de radiofrecuencia, los dipolos magnéticos del sujeto se alejan del equilibrio y experimentan dos formas de relajación hacia el equilibrio conocidas como relajación de espín-red o longitudinal y de espín-espín o transversal. El contraste entre los diferentes tejidos presentes en las imágenes de MR se genera debido a los diferentes tiempos de relajación de cada tejido: tiempo de relajación longitudinal en el caso de la imagen T1 y tiempo de relajación transversal en el caso de la imagen T2.

La MR presenta una serie de ventajas importantes en comparación con otras modalidades de imagen, entre las que se incluyen la ausencia de radiación ionizante, una profundidad de penetración ilimitada, una alta resolución espacial (del orden de pocos milímetros en equipos clínicos y de micrómetros en equipos preclínicos), un contraste de tejidos blandos superior al que se puede obtener por CT, la obtención simultánea de datos fisiológicos o metabólicos con imágenes anatómicas de alta resolución, e incluso la adquisición de información molecular a través del empleo de agentes de imagen específicos compatibles con la MR. Una de las principales limitaciones de la MR es su escasa sensibilidad en comparación con otras modalidades de imagen molecular. La elevada cantidad de agente de contraste necesaria para obtener una señal adecuada (mucho más elevada que la requerida para la PET



y la SPECT) puede ser problemática debido a la probabilidad de alterar el sistema biológico de interés a través de efectos farmacológicos (generalmente proporcionales a la masa de agente administrada). Los problemas de toxicidad asociados a la administración de grandes dosis de agentes de contraste de MR son un factor a tener en cuenta. Además, los equipos de MR son muy caros (suelen superar el millón de euros) y los más potentes emplean imanes superconductores y, por lo tanto, criógenos como el helio líquido, siendo necesario el empleo de salas blindadas magnéticamente para albergar el imán. En general, la MR es una modalidad de imagen extremadamente útil. Aunque no tiene la sensibilidad más favorable y es una técnica cara, su altísima resolución espacial ha revolucionado los diagnósticos médicos clínicos y también ha demostrado su utilidad en el ámbito de la investigación, aportando información de procesos moleculares en células individuales, órganos perfundidos y modelos murinos de determinadas patologías (Chatham & Blackband, 2001).

1.2 Hipoxia

1.2.1 Introducción

La hipoxia se define como una insuficiente concentración de oxígeno para realizar las funciones metabólicas, como consecuencia de un menor aporte de oxígeno o una incapacidad de la célula para utilizarlo. El aporte de oxígeno a los tejidos depende de la perfusión tisular y del oxígeno presente en la sangre arterial, que es la suma del oxígeno disuelto en plasma y del oxígeno unido a la hemoglobina. Existen cuatro tipos fundamentales de hipoxia que se producen mediante diversos mecanismos (Cloutier & Thrall, 2018) (Figura 1.8). La **hipoxia hipoxémica o hipóxica** es la más frecuente y se produce por insuficiencia respiratoria ocasionada por diversas enfermedades pulmonares (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis pulmonar, enfermedades neuromusculares, etc.), por obstrucción de la vía aérea o por exposición a una atmósfera pobre en oxígeno, que provocan una reducción de la presión parcial de oxígeno en sangre arterial (hipoxemia) y, por lo tanto, una disminución del aporte tisular de oxígeno. Una segunda categoría es la **hipoxia anémica**, que



está debida a la incapacidad de la sangre para transportar una cantidad suficiente de oxígeno por una disminución en la concentración de hemoglobina (anemia), por la incapacidad de la misma para transportar oxígeno (como sucede en los casos de intoxicación por monóxido de carbono) o por una alta afinidad de la hemoglobina por el oxígeno (tal y como ocurre en ciertas hemoglobinopatías). La tercera categoría es la **hipoxia isquémica** (también denominada hipoxia estancada, hipoxia circulatoria, hipoxia por hipoperfusión o hipoxia circulatoria de estasis), que se debe a la reducción del flujo de sangre a un órgano, estando relacionado con una enfermedad vascular o cortocircuito arteriovenoso. La última categoría de hipoxia se denomina **hipoxia histotóxica o disóxica** y es ocasionada por venenos (cianuro, sodio acídico y algunos pesticidas) que bloquean la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias e impiden el uso del oxígeno por parte de las células. Asimismo, se puede producir hipoxia histotóxica en la exposición aguda al monóxido de carbono y en el shock séptico. Los fenómenos hipóxicos están asociados con una gran variedad de procesos patológicos, como pueden ser el infarto de miocardio, el ictus isquémico y el cáncer. La hipoxia celular puede ser transitoria en el caso de que se produzca un desajuste temporal entre el suministro de oxígeno y la demanda metabólica celular, o crónica debido a una insuficiencia vascular permanente (Lee *et al.*, 2020).

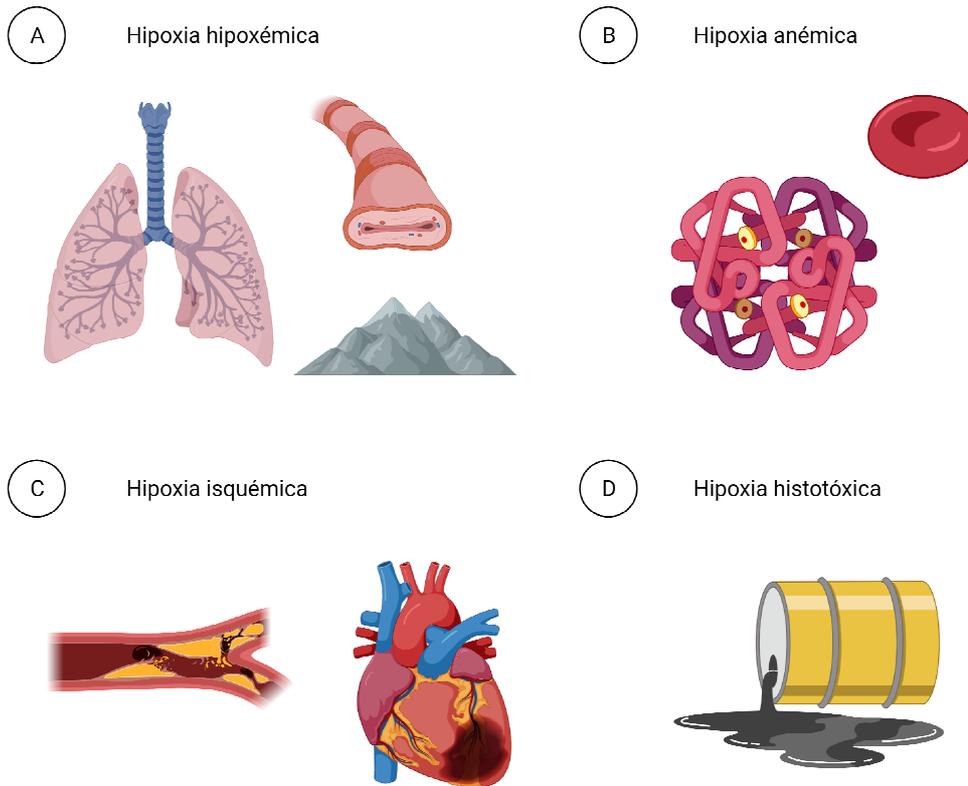


Figura 1.8. La hipoxia es la deficiencia de oxígeno o la incapacidad para utilizarlo a nivel tisular. La hipoxia se clasifica según sus causas en cuatro tipos. (A) La hipoxia hipoxémica es debida a insuficiencia respiratoria y a exposición a atmósfera pobre en oxígeno. (B) La hipoxia anémica se produce por un descenso de la concentración de hemoglobina (anemia), por un menor transporte de oxígeno por la hemoglobina y por una alta afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. (C) La hipoxia isquémica tiene lugar en casos de insuficiencia circulatoria. (D) La hipoxia histotóxica ocurre por intoxicación por cianuro, exposición aguda al monóxido de carbono y en el shock séptico. La Figura fue creada con BioRender (<https://biorender.com>).

El organismo presenta diferentes mecanismos de compensación de la hipoxia (Laso-Guzmán, 2015). Uno de ellos se basa en el aumento de la ventilación pulmonar para elevar la presión parcial de oxígeno. Otro mecanismo es el aumento del gasto cardíaco a través del incremento del volumen sistólico y de la frecuencia cardíaca con el objetivo de asegurar el flujo sanguíneo en los tejidos corporales. También se produce una redistribución del flujo sanguíneo a través de la vasoconstricción para conservar preferentemente la irrigación del corazón y en encéfalo en detrimento del resto de órganos. Además de lo



mencionado anteriormente, se produce un aumento del número de hematíes circulantes (policitemia) y de hemoglobina, optimizando la capacidad del transporte sanguíneo de oxígeno. Finalmente, se produce un incremento de la liberación tisular de oxígeno a través del aumento de la concentración intraeritrocitaria de 2,3-difosfoglicerato que disminuye la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. El factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1) se activa en condiciones de hipoxia y desencadena algunos de los mecanismos de compensación descritos previamente.

En condiciones de hipoxia, las células realizan la glucólisis anaerobia para obtener energía. La acumulación de lactato provoca una acidosis láctica intracelular. En el caso de la hipoxia isquémica, disminuye el aporte de glucosa a los tejidos además del oxígeno, siendo necesario el uso de las reservas de glucógeno. También se genera un exceso de radicales libres en la hipoxia isquémica. El defecto de obtención de energía y la acidosis láctica intracelular activan enzimas lisosómicas que conducen a una lesión y, eventualmente, a la muerte celular. En los tejidos con hipoxia también se desarrolla inflamación inducida por el HIF-1 y por radicales libres de oxígeno. La situación puede agravarse todavía más ya que la inflamación produce más lesión tisular, la fagocitosis de los restos celulares necróticos promueve la inflamación, y la disfunción endotelial de la inflamación produce isquemia y mayor hipoxia. Los mecanismos de compensación de la hipoxia también producen manifestaciones clínicas, como pueden ser la taquicardia, la disnea por aumento de la frecuencia respiratoria y la policitemia.

1.2.2 Hipoxia isquémica

1.2.2.1 Definición

La hipoxia isquémica o circulatoria se produce como resultado de una perfusión inadecuada de los tejidos para hacer frente a sus necesidades metabólicas (isquemia). En consecuencia, existe un defecto en el aporte tisular de oxígeno y de sustratos para el metabolismo celular, fundamentalmente la glucosa. Las causas de la hipoxia isquémica pueden ser sistémicas (fallo



cardíaco) o locales (oclusión arterial). En este tipo de hipoxia el contenido de oxígeno en la sangre es normal. La hipoxia (o deficiencia de oxígeno) debe distinguirse de la isquemia, que se define como la pérdida de irrigación a nivel tisular debida a la disminución o bloqueo del flujo arterial o venoso. En consecuencia, la isquemia es la causa principal de hipoxia.

1.2.2.2 Tipos y causas principales

La hipoxia circulatoria puede ser localizada (se produce una obstrucción arterial crónica o transitoria) o generalizada (tiene lugar una disminución del flujo arterial debido a una insuficiencia cardíaca). La hipoxia circulatoria induce la policitemia, es decir, activa la secreción de eritropoyetina en el riñón y dicha hormona estimula la eritropoyesis en la médula ósea con el objetivo de aumentar la hemoglobina y, por lo tanto, la capacidad para transportar oxígeno. Los tejidos utilizan el oxígeno unido a la mioglobina (oxígeno almacenado) cuando no reciben oxígeno de la sangre y, una vez agotado, consumen la energía de los compuestos ricos en ella (adenina trifosfato y creatina fosfato), cuya disponibilidad es limitada. En consecuencia, la tolerancia a la hipoxia de los diferentes tejidos es variable, siendo mínima en las neuronas (3 min), moderada en el riñón y el hígado (15-20 min) y elevada en el tejido muscular esquelético (60-90 min) o el músculo liso vascular (24-72 h) (Pérez-Arellano, 2019).

Las causas que pueden provocar la falta de llegada de sangre a un determinado tejido son múltiples, desde la obstrucción de las arterias que transportan dicha sangre (embolias, trombos, etc.) hasta la disminución del volumen de sangre a nivel del organismo (hemorragias) o la incapacidad coronaria para inyectar sangre en los tejidos. En consecuencia, la hipoxia isquémica tiene lugar en patologías vasculares como pueden ser el ictus cerebral de tipo isquémico y el infarto de miocardio. La hipoxia es una causa de lesión y de muerte celular si no se consigue revertir el daño ocasionado, provocando disfunción y lesión a nivel tisular.



1.2.3 Hemorragia cerebral

1.2.3.1 Definición

La hemorragia cerebral es un tipo de enfermedad cerebrovascular en la que se produce la extravasación de sangre en el parénquima cerebral ocasionado por una rotura vascular espontánea (Figura 1.9A). La hemorragia cerebral representa el 20% de los casos incidentes de ictus (excluyendo las hemorragias derivadas de traumatismos craneoencefálicos), localizándose frecuentemente en los ganglios de la base (50%), lóbulos (35%), cerebelo y tronco cerebral (6%).

1.2.3.2 Causas

A pesar de que la hemorragia cerebral representa solo el 10-15% de todos los ictus, muestra un peor pronóstico al tener unas tasas más elevadas de morbilidad y mortalidad. De esta forma, la tasa de mortalidad es del 35% al 52% a los 30 días, estando relacionada con el tamaño y la localización de la hemorragia. La mitad de dichas muertes suceden en los primeros 2 días y sólo el 20% de los supervivientes son independientes a los 6 meses. Algunos de los factores de riesgo exógenos (modificables) son la hipertensión arterial, la angiopatía cerebral amiloidea, malformaciones vasculares, enfermedades hematológicas, tumores, vasculitis, consumo de alcohol, abuso de drogas y fármacos (anticoagulantes).

En función de la causa del sangrado, la hemorragia cerebral puede clasificarse como primaria o secundaria. La hemorragia cerebral primaria es la más frecuente (85%) y se origina por la rotura de un vaso encefálico cuya pared se ha debilitado por procesos degenerativos. Este tipo de hemorragia suele estar relacionada con la hipertensión arterial y angiopatía amiloide. Por otro lado, la hemorragia cerebral secundaria se produce por la rotura de vasos anormales o que presentan alteraciones en su pared o en la coagulación. Este tipo de hemorragia está asociado a tumores, malformaciones arteriovenosas, alteraciones en la coagulación y consumo de drogas.



1.2.3.3 Procesos de hipoxia

En la hemorragia cerebral se produce un sangrado agudo y masivo que destruye el tejido cerebral, penetra el sistema ventricular y produce un aumento de la presión craneal. Posteriormente, el hematoma crece y se expande de forma gradual y lenta. El volumen de sangre acumulada en el cerebro produce un aumento de la presión local e interfiere en el correcto funcionamiento de estructuras colindantes. Los hematomas son dinámicos en el tiempo, de manera que crecen en las primeras horas (26% en la primera hora y un 38% en las primeras 20 h), siendo los responsables del deterioro neurológico en las primeras 24 h. En la hemorragia cerebral se ha observado un halo de hipoperfusión debido a la baja disponibilidad de oxígeno en el tejido dañado. La presencia de sangre extravasada produce la liberación de componentes tóxicos al espacio intersticial y la formación de edema, provocando un daño neuronal en el parénquima circundante. El edema se inicia a las 24-48 horas de la hemorragia.

El hematoma tiene 5 fases según estudios de MR realizados en pacientes con hemorragia cerebral (Figura 1.9B): fase hiperaguda (inferior a 24 h), aguda (de 1 a 3 días), subaguda precoz (de 2 a 7 días), subaguda tardía (de 7 a 14 días) y crónica (a partir de los 14 días). En la **fase hiperaguda** los hematíes contienen oxihemoglobina diamagnética y se empieza a formar un edema vasógeno periférico. En la **fase aguda** los hematíes presentan desoxihemoglobina y aparece un edema marcado. Posteriormente, en la **fase subaguda precoz**, la desoxihemoglobina en los hematíes intactos se oxida a metahemoglobina y empieza a formarse metahemoglobina en la periferia del hematoma. A continuación, en la **fase subaguda tardía-crónica precoz**, se produce la lisis de hematíes, liberando metahemoglobina al espacio extracelular, y disminuye el edema. Finalmente, en la **fase crónica** los macrófagos invaden los hematíes lisados y el coágulo, la metahemoglobina se convierte en ferritina y hemosiderina, y remite el edema y la inflamación.

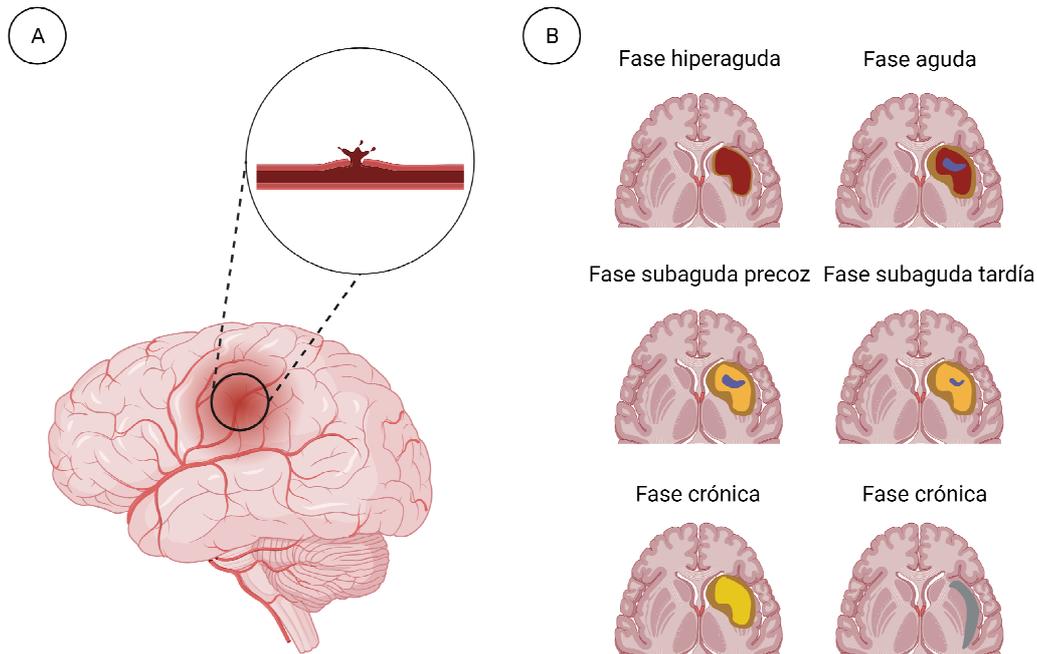


Figura 1.9. (A) La hemorragia cerebral o ictus hemorrágico se produce cuando una arteria cerebral se rompe, provocando que se libere sangre en el interior del órgano. (B) Evolución de la hemorragia cerebral: fase hiperaguda (oxihemoglobina intracelular), fase aguda (desoxihemoglobina intracelular con edema circundante), fase aguda precoz (metahemoglobina intracelular), fase aguda tardía (metahemoglobina extracelular) y fase crónica (cavidad quística con depósito de hemosiderina). La Figura fue creada con BioRender (<https://biorender.com>).

1.2.4 Enfermedad arterial periférica

1.2.4.1 Definición

La enfermedad arterial periférica (EAP) es una patología que se produce por la obstrucción total o parcial de una o más arterias periféricas (Figura 1.10A).

1.2.4.2 Causas

Los factores de la EAP son similares a los de las enfermedades cerebrovasculares y cardiovasculares, siendo muy frecuente en edades avanzadas. De esta forma, algunos de los factores de riesgo exógenos (modificables) son el tabaquismo, la diabetes, la hipertensión, la presión arterial, la obesidad y el consumo de alcohol. En consecuencia, la EAP está



asociada a un riesgo elevado de mortalidad por enfermedad coronaria y enfermedad cerebrovascular. La enfermedad arterial periférica sintomática empeora la calidad de vida del paciente al producir dolor en la extremidad inferior al caminar, y en algunos casos es necesaria la revascularización quirúrgica o la amputación del miembro.

1.2.4.3 Procesos de hipoxia

La EAP está causada por aterosclerosis en más del 90% de los casos, una enfermedad sistémica que se basa en el acúmulo de lípidos y material fibroso en la capa más interna de las arterias (Libby *et al.*, 2019). La placa aterosclerótica o ateroma así formada puede ser más fibrosa y acumular calcio con el tiempo. De esta forma, los ateromas pueden invadir la luz arterial, obstruyendo el flujo sanguíneo y provocando una isquemia tisular (Figura 1.10B). La EAP comienza con un proceso aterosclerótico en las arterias principales que irrigan las extremidades inferiores. En los casos más graves, se produce la isquemia crítica de la extremidad y que se caracteriza por la presencia de dolor en reposo y/o presencia de lesiones cutáneas (gangrena o úlceras). El pronóstico de los pacientes con isquemia crítica es desfavorable, ya que el riesgo de muerte o de amputación oscila entre el 33 y el 50%. En la isquemia crítica de la extremidad se suele producir una oclusión arterial múltiple y distal, afectando con más frecuencia a los vasos tibiales y a las arterias femoral y poplítea, y provocando una reducción del flujo sanguíneo y del suministro de oxígeno a los tejidos distales.

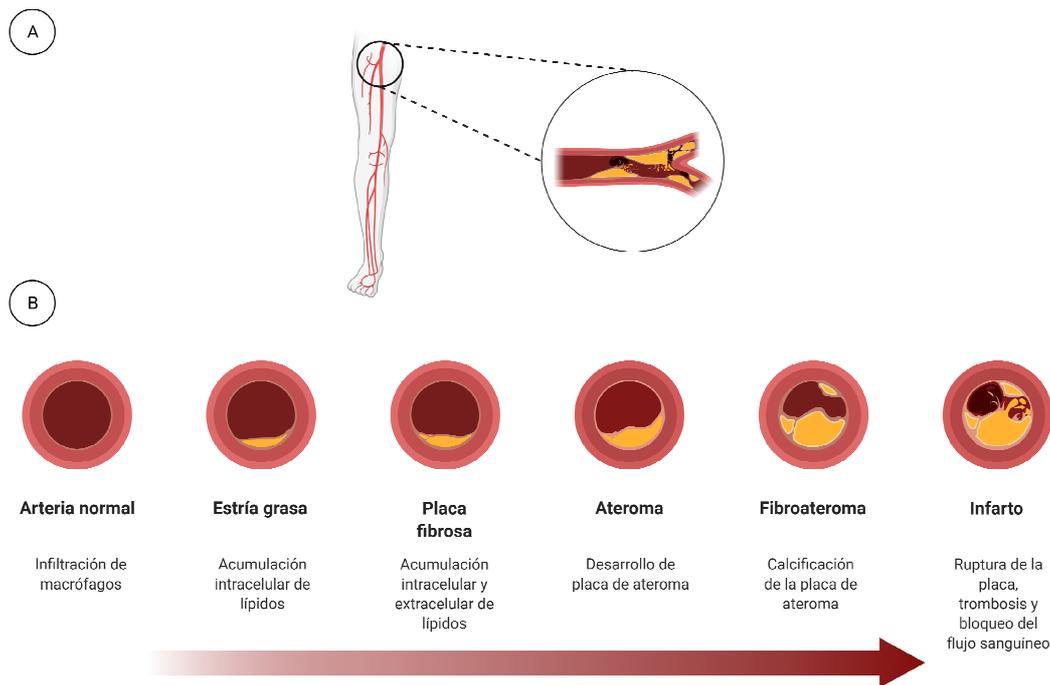


Figura 1.10. (A) La enfermedad arterial periférica es la afectación oclusiva de las arterias de las extremidades inferiores, provocando una reducción en el flujo sanguíneo en las mismas. La EAP está ocasionada por aterosclerosis en el 90% de los casos. (B) La aterosclerosis es una enfermedad sistémica que afecta a las arterias elásticas y musculares. Se basa en la generación de lesiones en la pared vascular de las arterias (placa de ateroma), compuesta fundamentalmente de lípidos, tejido fibroso y células inflamatorias. Las placas de ateroma pueden ocasionar la obstrucción directa del riego sanguíneo. En el caso de que se produzca la ruptura de una placa, se forma un trombo en su superficie que puede desprenderse y bloquear el flujo sanguíneo. La Figura fue creada con BioRender (<https://biorender.com>).

1.2.5 Detección de hipoxia

1.2.5.1 Técnicas convencionales

La hipoxia juega un papel importante en la evolución y el tratamiento de diversas patologías, por lo que existe un gran interés en el desarrollo de métodos que permitan detectar y medir dicho fenómeno. De esta forma, la hipoxia puede ser evaluada en órganos, tejidos o células a través del empleo de métodos invasivos y no invasivos (Evans *et al.*, 2011; Bonnitcha *et al.*, 2018).



La hipoxia puede ser evaluada a nivel celular mediante técnicas invasivas que se basan en el análisis *ex vivo* de biopsias de tejidos patológicos. Los métodos histoquímicos permiten el estudio de fenómenos hipóxicos a través de la administración de moléculas exógenas que se acumulan en las células hipóxicas o del estudio de la expresión de moléculas endógenas que se expresan abundantemente durante la hipoxia. La inmunohistoquímica muestra enlaces químicos específicos por medio de una reacción antígeno-anticuerpo, siendo necesario incubar el tejido en el que se desea demostrar un componente químico (antígeno) con una solución que contiene un anticuerpo específico contra el antígeno de interés. En consecuencia, el anticuerpo se une al antígeno, demostrando su localización *in situ*. Otras técnicas de detección de hipoxia se basan en el estudio de ADN dañado y en la medida de los niveles de moléculas de oxigenación endógenas (como los HIFs). Sin embargo, la información obtenida mediante estas técnicas no refleja los procesos que tienen lugar en la globalidad de un tejido y no permiten obtener información a lo largo del tiempo.

La detección de la hipoxia se suele realizar a nivel tisular empleando tanto técnicas invasivas (electrodos) como no invasivas (fluorescencia, espectroscopía de cuasi-infrarrojos, PET y MR). La hipoxia cerebral es una de las causas principales de lesión cerebral, sobre todo en el caso de la hipoxia isquémica. El manejo de la patología neurocrítica requiere el uso de la monitorización cerebral para conocer el estado de oxigenación del tejido cerebral. Inicialmente, la oxigenación cerebral se evaluaba a través de la monitorización de la presión craneal. Sin embargo, se demostró que la presencia de una presión craneal normal no garantiza una adecuada oxigenación cerebral. Entre los métodos que exploran la hipoxia cerebral, caben destacar la saturación de la hemoglobina en el bulbo de la vena yugular interna, la saturación regional de oxígeno mediante haces de luz (espectroscopía de cuasi-infrarrojos), la presión tisular de oxígeno cerebral y la microdiálisis cerebral (Marín-Caballeros *et al.*, 2008). La saturación del bulbo de la yugular se basa en la inserción de un catéter en la vena yugular interna,



siendo necesario confirmar su correcto posicionamiento por radiología. La saturación del bulbo de la yugular interna es una medida global de la oxigenación cerebral, pudiendo no sufrir alteraciones ante la presencia de áreas focales de isquemia y manteniéndose en valores normales hasta que el 13% del cerebro se encuentra isquémico. La espectroscopia cercana al infrarrojo se basa en la habilidad de las ondas de luz cercanas al infrarrojo para penetrar la piel. Estas ondas son absorbidas por cromóforos como la hemoglobina, pudiendo estimar su concentración relativa tisular en tiempo real. Se trata de una técnica cuyo uso está limitado a la evaluación quirúrgica debido a la atenuación óptica en tejidos como la piel y el músculo. La monitorización de la presión tisular de oxígeno cerebral es el método más útil y directo para estudiar la oxigenación cerebral. Se han desarrollado dos sistemas de monitorización de la presión tisular de oxígeno comercialmente disponibles: Licox[®] y Neurotrend[®]. El sistema Licox[®] constituye la técnica de referencia y se basa en un electrodo que permite cuantificar la presión de oxígeno en un medio (Figura 1.11). Este electrodo está constituido por una membrana semipermeable al oxígeno que recubre un cátodo y un ánodo bañados en una solución electrolítica, y que puede reducir el oxígeno generando una corriente eléctrica que es proporcional a la presión tisular de oxígeno en el medio y que se puede cuantificar. El catéter se coloca en tejido no lesionado o en área de penumbra próxima a la lesión encefálica, siendo necesaria la realización de una CT para confirmar su posición. La implantación del catéter provoca microtraumatismos con edema y microhemorragias alrededor del canal de inserción, siendo necesario esperar un tiempo de adaptación para realizar las mediciones. Otra limitación de este tipo de monitorización es que la medición de la presión tisular de oxígeno es local y se monitoriza un pequeño volumen de tejido (la superficie del sensor mide 14 mm²). Además, se trata de una técnica invasiva que precisa la intervención de Neurocirugía para la implantación del catéter. Asimismo, este tipo de monitorización puede generar complicaciones como el desarrollo de hematoma parenquimatoso (derivado de la punción cerebral), infección, ruptura del catéter y trombosis. Finalmente, la microdiálisis es una técnica que monitoriza el metabolismo cerebral y que



permite, de forma indirecta, detectar fenómenos de hipoxia (la hipoxia o isquemia cerebral se asocian a incrementos en los niveles de lactato, glicerol, glutamato y aspartato). Esta técnica se basa en la inserción de un catéter en el parénquima cerebral que se perfunde con una solución isotónica para realizar un intercambio de moléculas con el líquido intersticial y cuya composición se analiza.

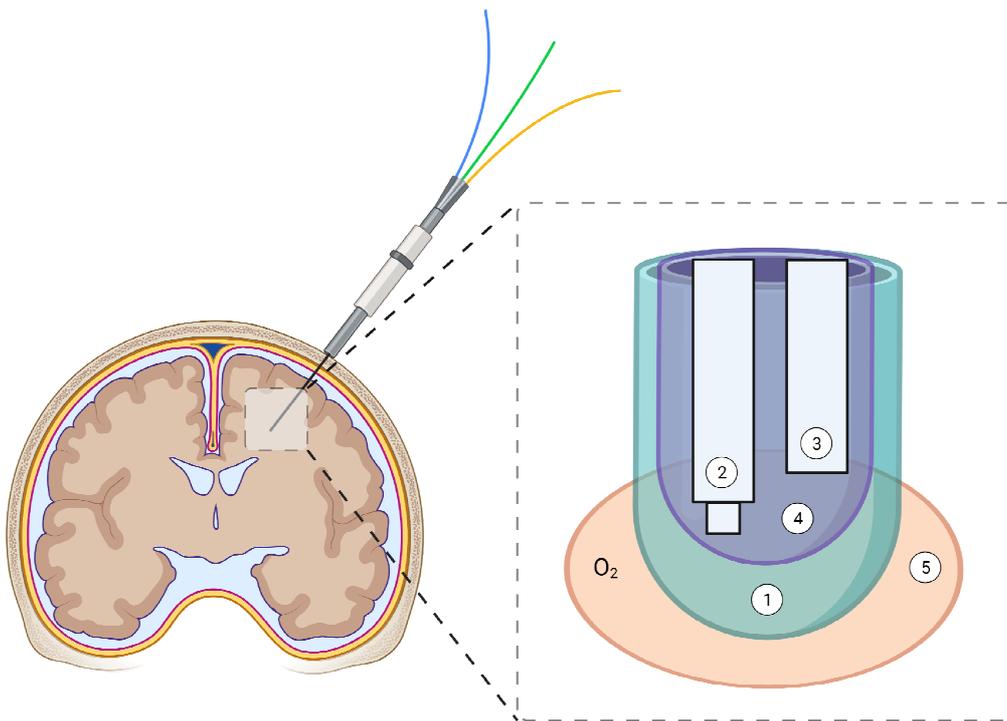


Figura 1.11. Monitorización de la oxigenación cerebral con un electrodo de Clark que incorpora tres sensores para medir la presión parcial de oxígeno a nivel tisular, la presión craneal y la temperatura en el parénquima encefálico en pacientes neurocríticos. El electrodo de Clark presenta una membrana permeable al oxígeno (1) que recubre un cátodo (2) y un ánodo (3) bañados en una solución electrolítica (4) que, a un potencial determinado, genera una corriente electrónica proporcional a la presión parcial de oxígeno en el tejido (5). La Figura fue creada con BioRender (<https://biorender.com>).

Tal y como se comentó previamente, la hipoxia es un fenómeno que se evalúa en ensayos clínicos y en estudios de investigación. En la rutina clínica, únicamente se monitoriza la oxigenación cerebral en pacientes neurocríticos



que hayan sufrido un traumatismo craneoencefálico, una isquemia cerebral o una hemorragia cerebral.

1.2.5.2 Técnicas de imagen PET

Se han desarrollado radiotrazadores de hipoxia para su uso en la PET con el objetivo de poder identificar regiones hipóxicas *in vivo* de forma no invasiva y obtener información longitudinal, es decir, a lo largo del tiempo. La detección de fenómenos hipóxicos a través de la PET ha sido ampliamente investigada en los últimos años. El primer radiofármaco desarrollado para la detección de hipoxia mediante imagen fue el misonidazol marcado con ^{14}C en 1981 (Chapman *et al.*, 1981). Posteriormente, se procedió al marcaje de nitroimidazoles, compuestos cuyo acúmulo a nivel tisular dependen de la oxigenación del tejido (Rajendran & Krohn, 2005; Padhani *et al.*, 2007).

El Fluoromisonidazol ($[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$) es un radiofármaco derivado del nitroimidazol que se encuentra marcado con el isótopo ^{18}F y que fue desarrollado en el año 1986 (Jerabek *et al.*, 1986; Grierson *et al.*, 1989). El FMISO es el radiofármaco más utilizado para la detección de tejidos hipóxicos *in vivo* mediante el empleo de la PET (Lee & Scott, 2007; Lopci *et al.*, 2014). Se trata de un compuesto lipofílico que atraviesa la membrana celular de las células viables por difusión pasiva, y posteriormente es reducido por la enzima nitrorreductasa que transfiere un electrón al grupo nitro del nitroimidazol en el medio intracelular. Sin embargo, este proceso es reversible, de manera que en las células normoxigenadas, el trazador sufre un proceso de reoxigenación y difunde nuevamente fuera de la célula. En condiciones de hipoxia, en las que la presión parcial de oxígeno es inferior a 10 mmHg, el trazador sufre la transferencia de un segundo electrón obteniendo como resultado un metabolito intermedio que se une a las proteínas intracelulares y al ARN, lo que provoca su atrapamiento celular (Figura 1.12). Debido a que el FMISO sólo se acumula en células hipóxicas con enzimas nitrorreductasas funcionales, solo puede acumularse en células viables, pero no en las células necróticas muertas (Takasawa *et al.*, 2008; Hoigebazar & Jeong, 2013).

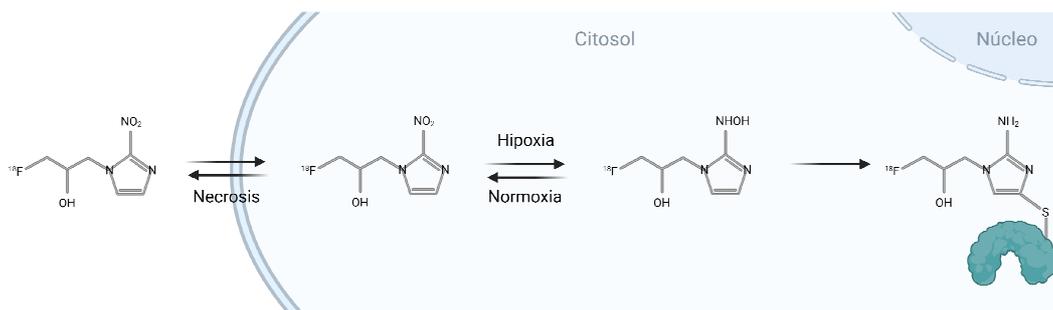


Figura 1.12. Mecanismo de captación y retención del radiofármaco FMISO en células hipóxicas. El FMISO atraviesa la membrana celular mediante difusión pasiva y sufre una reducción progresiva por acción de la enzima nitrorreductasa a niveles bajos de presión parcial de oxígeno. Este proceso es reversible en presencia de suficiente oxígeno, lo que permite que la molécula pueda salir de la célula. En condiciones de hipoxia, la molécula reducida de FMISO se une de forma covalente a proteínas intracelulares, lo que provoca su enclaustramiento celular. El FMISO no sufre ningún proceso de reducción en células necróticas y sale de la célula. La Figura fue creada con BioRender (<https://biorender.com>).

El FMISO es un radiofármaco capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, lo que permite su uso para la detección de regiones hipóxicas en el cerebro. El FMISO es metabolizado por el hígado y excretado a través del sistema urinario (Lee & Scott, 2007). Es notoria su captación por parte del intestino ocasionada por la presencia de bacterias anaeróbicas (Koh *et al.*, 1992). Algunos estudios realizados en animales de laboratorio mostraron que la mayor captación de este radiofármaco se encontraba en la orina, intestino, hígado y riñones, mientras que su captación era baja en sangre, bazo, corazón, pulmones, músculo, hueso y cerebro (Tochon-Danguy *et al.*, 2002).

El acúmulo celular de FMISO está influido por la concentración de oxígeno, existiendo una buena correlación entre la captación del radiofármaco y la presión de oxígeno (Gagel *et al.*, 2004) o la identificación de hipoxia por inmunohistoquímica (Troost *et al.*, 2006). La retención selectiva del radiofármaco FMISO en el tejido hipóxico requiere un período de captación de 2-4 h tras la inyección intravenosa. Además, a pesar de este período de captación, el acúmulo del trazador sigue siendo relativamente bajo. Estos



aspectos representan los principales inconvenientes del trazador FMISO, limitando su aplicabilidad en la práctica clínica.

El uso principal del trazador FMISO ha sido en pacientes oncológicos ya que se ha demostrado que la presencia de tejido hipóxico confiere resistencia a la quimioterapia y la radioterapia, y acelera la progresión del tumor. El FMISO también se ha empleado para estudiar su poder de predicción de la respuesta a un determinado tratamiento y evaluar el pronóstico del paciente. Además de lo mencionado anteriormente, el FMISO se ha empleado para evaluar la hipoxia a nivel cerebral y miocárdica. Debido al hecho de que el acúmulo de FMISO está inversamente relacionado con la presión parcial de oxígeno celular, podría ser un indicador potencial de la penumbra isquémica, es decir, del tejido dañado potencialmente salvable (Touzani *et al.*, 2001). La penumbra isquémica dará lugar a una región necrótica si no se produce una reperfusión. Algunos estudios realizados en animales (Saita *et al.*, 2004; Takasawa *et al.*, 2007; Rojas *et al.*, 2011) y en pacientes con ictus isquémico (Read *et al.*, 1998; Read *et al.*, 2000) han demostrado la capacidad de la PET con FMISO para detectar la penumbra alrededor del núcleo isquémico.

1.3 Bibliografía

Arbab, A. S.; Koizumi, K.; Toyama, K. & Araki, T. (1996). Uptake of technetium-99m-tetrofosmin, technetium-99m-MIBI and thallium-201 in tumor cell lines. *Journal of Nuclear Medicine*, 37 (9): 1551-1556.

Bonnitcha, P.; Grieve, S. & Figtree, G. (2018). Clinical imaging of hypoxia: Current status and future directions. *Free Radical Biology and Medicine*, 126: 296-312.

Chapman, J. D.; Franko, A. J. & Sharplin, J. (1981). A marker for hypoxic cells in tumours with potential clinical applicability. *British Journal of Cancer*, 43 (4): 546-550.



- Chatham, J. C. & Blackband, S. J. (2001). Nuclear magnetic resonance spectroscopy and imaging in animal research. *ILAR Journal*, 42 (3): 189-208.
- Cloutier, M. M. & Thrall, R. S. (2018). Ventilación, perfusión y relaciones ventilación/perfusión. En B. M. Koeppen y B. A. Stanton (Eds.), *Berne y Levy. Fisiología* (pp. 466-479). Barcelona: Elsevier.
- Evans, C. E.; Mattock, K.; Humphries, J.; Saha, P.; Ahmad, A.; Waltham, M.; Patel, A.; Modarai, B.; Porter, L.; Premaratne, S. & Smith, A. (2011). Techniques of assessing hypoxia at the bench and bedside. *Angiogenesis*, 14 (2): 119-124.
- Gagel, B.; Reinartz, P.; Dimartino, E.; Zimny, M.; Pinkawa, M.; Maneschi, P.; Stanzel, S.; Hamacher, K.; Coenen, H. H.; Westhofen, M.; Büll, U. & Eble, M. J. (2004). pO₂ Polarography versus positron emission tomography ([¹⁸F] fluoromisonidazole, [¹⁸F]-2-fluoro-2'-deoxyglucose). An appraisal of radiotherapeutically relevant hypoxia. *Strahlentherapie und Onkologie*, 180 (10): 616-622.
- Grierson, J. R.; Link, J. M.; Mathis, C. A.; Rasey, J. S. & Krohn, K. A. (1989). A radiosynthesis of fluorine-18 fluoromisonidazole. *Journal of Nuclear Medicine*, 30 (3): 343-350.
- Hoigebazar, L. & Jeong, J. M. (2013). Hypoxia imaging agents labeled with positron emitters. *Recent Results in Cancer Research*, 194: 285-299.
- James, M. L. & Gambhir, S. S. (2012). A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications. *Physiological Reviews*, 92 (2): 897-965.



- Jerabek, P. A.; Patrick, T. B.; Kilbourn, M. R.; Dischino, D. D. & Welch, M. J. (1986). Synthesis and biodistribution of ^{18}F -labeled fluoronitroimidazoles: potential *in vivo* markers of hypoxic tissue. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part A, Applied radiation and isotopes*, 37 (7): 599-605.
- Koh, W. J.; Rasey, J. S.; Evans, M. L.; Grierson, J. R.; Lewellen, T. K.; Graham, M. M.; Krohn, K. A. & Griffin, T. W. (1992). Imaging of hypoxia in human tumors with [F-18]fluoromisonidazole. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 22 (1): 199-212.
- Laso-Guzmán, F. J. (2015). Patología inducida por hipoxia. En F. J. Laso-Guzmán (Ed.), *Introducción a la medicina clínica: fisiopatología y semiología* (pp. 53-58). Barcelona: Elsevier.
- Lee, S. T. & Scott, A. M. (2007). Hypoxia positron emission tomography imaging with ^{18}F -Fluoromisonidazole. *Elsevier*, 37 (6): 451-461.
- Lee, P.; Chandel, N. S. & Simon, M. C. (2020). Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21 (5): 268-283.
- Libby, P.; Buring, J. E.; Badimon, L.; Hansson, G. K.; Deanfield, J.; Bittencourt, M. S.; Tokgözoğlu, L. & Lewis, E. F. (2019). Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 5 (1): 56.
- Lopci, E.; Grassi, I.; Chiti, A.; Nanni, C.; Cicoria, G.; Toschi, L.; Fonti, C.; Lodi, F.; Mattioli, S. & Fanti, S. (2014). PET radiopharmaceuticals for imaging of tumor hypoxia: a review of the evidence. *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 4 (4): 365-384.



- Lusic, H. & Grinstaff, M. W. (2013). X-ray-computed tomography contrast agents. *Chemical Reviews*, 113 (3): 1641-1666.
- Marín-Caballos, A. J.; Murillo-Cabezas, F.; Domínguez-Roldan, J. M.; Leal-
Noval, S. R.; Rincón-Ferrari, M. D. & Muñoz-Sánchez, M. A. (2008).
Monitorización de la presión tisular de oxígeno (PtiO₂) en la hipoxia
cerebral: aproximación diagnóstica y terapéutica. *Medicina Intensiva*, 32
(2): 81-90.
- Massoud, T. F. & Gambhir, S. S. (2003). Molecular imaging in living subjects:
seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes &
Development*, 17 (5): 545-580.
- Padhani, A. R.; Krohn, K. A.; Lewis, J. S. & Alber, M. (2007). Imaging
oxygenation of human tumours. *European Radiology*, (4): 861-872.
- Phelps, M. E. (2000). Positron emission tomography provides molecular
imaging of biological processes. *Proceedings of the National Academy of
Sciences of the United States of America*, 97 (16): 9226-9233.
- Pérez-Arellano, J. L. (2019). Insuficiencia respiratoria (II). En J. L. Pérez-
Arellano (Ed.), *Sisinio de Castro. Manual de patología general* (pp. 519-
539). Barcelona: Elsevier.
- Pichler, B. J.; Judenhofer, M. S. & Pfannenbergl, C. (2008). Multimodal
Imaging Approaches: PET/CT and PET/MRI. En W. Semmler y M.
Schwaiger (Eds.), *Molecular Imaging I. Handbook of Experimental
Pharmacology 185/1* (pp. 109-132). Berlín: Springer.
- Pimlott, S. L. & Sutherland, A. (2011). Molecular tracers for the PET and
SPECT imaging of disease. *Chemical Society Reviews*, 40 (1): 149-162.



- Rajendran, J. G. & Krohn, K. A. (2005). Imaging hypoxia and angiogenesis in tumors. *Radiologic Clinics of North America*, 43 (1): 169-187.
- Read, S. J.; Hirano, T.; Abbott, D. F.; Sachinidis, J. I.; Tochon-Danguy, H. J.; Chan, J. G.; Egan, G. F.; Scott, A. M.; Bladin, C. F.; McKay, W. J. & Donnan, G. A. (1998). Identifying hypoxic tissue after acute ischemic stroke using PET and ^{18}F -fluoromisonidazole. *Neurology*, 51 (6): 1617-1621.
- Read, S. J.; Hirano, T.; Abbott, D. F.; Markus, R.; Sachinidis, J. I.; Tochon-Danguy, H. J.; Chan, J. G.; Egan, G. F.; Scott, A. M.; Bladin, C. F.; McKay, W. J. & Donnan, G. A. (2000). The fate of hypoxic tissue on ^{18}F -fluoromisonidazole positron emission tomography after ischemic stroke. *Annals of Neurology*, 48 (2): 228-235.
- Rojas, S.; Herance, J. R.; Abad, S.; Jiménez, X.; Pareto, D.; Ruiz, A.; Torrent, È.; Figueiras, F. P.; Popota, F.; Fernández-Soriano, F. J.; Planas, A. M. & Gispert, J. D. (2011). Evaluation of hypoxic tissue dynamics with ^{18}F -FMISO PET in a rat model of permanent cerebral ischemia. *Molecular Imaging and Biology*, 13 (3): 558-564.
- Saita, K.; Chen, M.; Spratt, N. J.; Porritt, M. J.; Liberatore, G. T.; Read, S. J.; Levi, C. R.; Donnan, G. A.; Ackermann, U.; Tochon-Danguy, H. J.; Sachinidis, J. I. & Howells, D. W. (2004). Imaging the ischemic penumbra with ^{18}F -fluoromisonidazole in a rat model of ischemic stroke. *Stroke*, 35 (4): 975-980.
- Takasawa, M.; Beech, J. S.; Fryer, T. D.; Hong, Y. T.; Hughes, J. L.; Igase, K.; Jones, P. S.; Smith, R.; Aigbirhio, F. I.; Menon, D. K.; Clark, J. C. & Baron, J. C. (2007). Imaging of brain hypoxia in permanent and temporary middle cerebral artery occlusion in the rat using ^{18}F -



fluoromisonidazole and positron emission tomography: a pilot study. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27 (4): 679-689.

Takasawa, M.; Moustafa, R. R. & Baron, J. C. (2008). Applications of nitroimidazole *in vivo* hypoxia imaging in ischemic stroke. *Stroke*, 39 (5): 1629-1637.

Tochon-Danguy, H. J.; Sachinidis, J. I.; Chan, F.; Chan, J. G.; Hall, C.; Cher, L.; Stylli, S.; Hill, J.; Kaye, A. & Scott, A. M. (2002). Imaging and quantitation of the hypoxic cell fraction of viable tumor in an animal model of intracerebral high grade glioma using [¹⁸F]fluoromisonidazole (FMISO). *Nuclear Medicine and Biology*, 29 (2): 191-197.

Touzani, O.; Roussel, S. & MacKenzie, E. T. (2001). The ischaemic penumbra. *Current Opinion in Neurology*, 14 (1): 83-88.

Troost, E. G.; Laverman, P.; Kaanders, J. H.; Philippens, M.; Lok, J.; Oyen, W. J.; van der Kogel, A. J.; Boerman, O. C. & Bussink, J. (2006). Imaging hypoxia after oxygenation-modification: comparing [¹⁸F]FMISO autoradiography with pimonidazole immunohistochemistry in human xenograft tumors. *Radiotherapy and Oncology*, 80 (2): 157-164.

Wathen, C. A.; Foje, N.; van Avermaete, T.; Miramontes, B.; Chapaman, S. E.; Sasser, T. A.; Kannan, R.; Gerstler, S. & Leevy, W. M. (2013). *In vivo* X-ray computed tomographic imaging of soft tissue with native, intravenous, or oral contrast. *Sensors*, 13 (6): 6957-6980.

Weissleder, R. & Pittet, M. J. (2008). Imaging in the era of molecular oncology. *Nature*, 452 (7187): 580-589.



Zanzonico, P. (2017). Noninvasive imaging for supporting basic research. En F. Kiessling, B. J. Pichler y P. Hauff (Eds.), *Small animal imaging. Basics and practical guide* (pp. 3-32). Berlín: Springer.

CAPÍTULO 2

Justificación y objetivos



2.1 Justificación

La hipoxia se define como la oxigenación inadecuada de los tejidos para su correcto funcionamiento, ocasionada por la falta de aporte de oxígeno o por la incapacidad de las células para utilizarlo. La hipoxia, independientemente de cuál sea su origen, es una de las causas principales de morbilidad o mortalidad en los pacientes críticamente enfermos. La hipoxia tisular es un proceso característico que tiene lugar en diversas patologías, como pueden ser el cáncer, la aterosclerosis y el infarto de miocardio. La hipoxia es un fenómeno importante en la evolución de dichas enfermedades, ya que está relacionada con la recuperación funcional en procesos isquémicos como el infarto de miocardio o el ictus cerebral. Además, la hipoxia está asociada a un incremento de la resistencia a la terapia en tumores.

Teniendo en cuenta el papel que juega la hipoxia en el desarrollo y el tratamiento de todas estas patologías, existe un creciente interés en el desarrollo de técnicas que permitan detectar y cuantificar la hipoxia de una manera eficaz y poco invasiva.

La detección de un proceso hipóxico se puede realizar a nivel celular y/o tisular. La evaluación a nivel celular se lleva a cabo mediante técnicas invasivas que se basan en el análisis *ex vivo* de biopsias de tejidos patológicos. Dentro de dichas técnicas, destacan la inmunohistoquímica, el estudio de ADN dañado y la medida de los niveles de moléculas de oxigenación endógenas (como los HIFs). Sin embargo, se trata de técnicas invasivas que no permiten obtener información a lo largo del tiempo y, además, los datos obtenidos a nivel celular pueden no reflejar los procesos que tienen lugar en el tejido. Con respecto a la hipoxia tisular, puede ser evaluada empleando tanto técnicas invasivas (electrodos) como no invasivas (fluorescencia, espectroscopía de cuasi-infrarrojos, PET y MR). Sin embargo, los electrodos constituyen un método que puede provocar complicaciones y los resultados obtenidos pueden verse afectados por la localización de los electrodos y por otros parámetros como la temperatura. En consecuencia, las técnicas de imagen suponen la



mejor alternativa para el estudio de la hipoxia ya que se trata de técnicas no invasivas que permiten obtener información a lo largo del tiempo y que no dependen de la localización o accesibilidad de la zona de interés.

Dentro de las técnicas de imagen, la PET permite investigar fenómenos hipóxicos *in vivo* de una forma no invasiva y a lo largo del tiempo. El FMISO es el primer radiofármaco PET empleado para detectar hipoxia. Dicho radiofármaco entra por difusión pasiva en el interior de las células y sufre varios procesos de reducción en aquellas que presentan niveles bajos de oxígeno, uniéndose covalentemente a moléculas intracelulares y provocando su enclaustramiento en el interior celular. Este radiofármaco ha sido evaluado en ensayos clínicos y en animales de laboratorio para predecir la respuesta al tratamiento y evaluar el pronóstico en oncología. En el campo de la neurología, el FMISO se ha empleado para evaluar la penumbra isquémica, es decir, la región viable pero potencialmente salvable, en pacientes y en animales de laboratorio con ictus cerebral. Sin embargo, hay muchas otras patologías en las que la hipoxia juega un papel relevante y todavía no se ha explorado el interés de desarrollar técnicas de detección de hipoxia basadas en estudios de PET con FMISO.

En primer lugar, en el campo de la neurología, en casos de **hemorragia cerebral** los estudios de PET con FMISO son limitados y los resultados obtenidos son poco concluyentes. No ha sido posible evidenciar la presencia de tejido hipóxico en la zona perihematoma ni, por lo tanto, su evolución temporal en las horas posteriores al accidente cerebrovascular.

En segundo lugar, en el caso de **enfermedad arterial periférica**, en donde se produce un fenómeno de hipoxia como resultado de la isquemia vascular, nunca se han empleado técnicas de imagen PET para detectar longitudinalmente la evolución y la extensión del tejido hipóxico.



El impacto de los avances en las dos patologías mencionadas anteriormente es muy alto. Es necesario tener en cuenta que las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de muerte para el conjunto de la población española (29% en hombres y 38% en mujeres). Las tres grandes enfermedades de etiología vascular que causan una mayor mortalidad son la cardiopatía isquémica, la enfermedad cerebrovascular y la insuficiencia cardíaca de origen no isquémico. Además de lo mencionado previamente, las tasas de mortalidad debidas a las enfermedades cardiovasculares en España son muy elevadas, lo que supone un elevado coste médico, farmacológico y hospitalario. Asimismo, representan una de las causas más importantes de morbilidad y discapacidad a largo plazo. Estas graves enfermedades vasculares se pueden prevenir siguiendo hábitos de vida saludables y a través de la detección precoz.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivos generales

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es desarrollar una técnica de detección de hipoxia *in vivo* en modelos animales que potencialmente puedan presentar fenómenos de hipoxia celular, basada en estudios de imagen de PET con el radiofármaco FMISO. Todo ello, con el objetivo final de desarrollar nuevos biomarcadores de imagen de PET para el diagnóstico y el seguimiento de procesos de hipoxia en pacientes.

2.2.2 Objetivos específicos

Para abordar dicho objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos específicos, que hacen referencia a las dos patologías descritas anteriormente:



Estudios de hipoxia en un modelo de hemorragia cerebral

- Desarrollar una nueva aplicación de la técnica de PET con FMISO para evaluar la presencia de tejido hipóxico cerebral en un modelo animal de hemorragia cerebral.
- Emplear dicha técnica para localizar la ventana temporal poshemorragia óptima para la correcta detección de la presencia de tejido hipóxico.
- Estudiar la captación de FMISO cerebral poshemorragia de manera longitudinal en el modelo de hemorragia cerebral y compararlo con un grupo control.

Estudios de hipoxia en un modelo de enfermedad arterial periférica

- Desarrollar una nueva aplicación de la técnica de PET con FMISO para evaluar la presencia de hipoxia en la extremidad inferior de un modelo animal de enfermedad arterial periférica.
- Emplear dicha técnica para estudiar la extensión y evolución temporal del tejido hipóxico después de la inducción del modelo de enfermedad arterial periférica.
- Buscar relaciones entre los fenómenos de hipoxia, inflamación y perfusión en el modelo de enfermedad arterial periférica.

CAPÍTULO 3

Detección longitudinal de hipoxia en un modelo de
hemorragia cerebral a través de estudios de imagen
[¹⁸F]FMISO PET



3.1 Introducción

3.1.1 Hemorragia cerebral

La hemorragia cerebral o ictus hemorrágico (en inglés, ICH) es un tipo de ictus cerebral junto con la isquemia cerebral o ictus isquémico. La hemorragia cerebral representa del 10 al 15% del total de los ictus cerebrales (van Asch *et al.*, 2010) y su mortalidad varía del 32 al 52% en los primeros 30 días después de haber sufrido una hemorragia cerebral. Sólo el 10% de los pacientes consigue vivir de forma independiente a partir del mes y sólo 1 de cada 5 lo hace a partir de los 6 meses (Adeoye & Broderick, 2010). Hasta la fecha, no existen tratamientos farmacológicos para esta enfermedad a pesar de tratarse del ictus con peor pronóstico (van Asch *et al.*, 2010). El enfoque quirúrgico ha permitido incrementar la supervivencia de los pacientes con hemorragia cerebral superficial espontánea sin hemorragia ventricular (Mendelow *et al.*, 2013). Sin embargo, el aumento en la supervivencia conseguido a través de la intervención quirúrgica sigue siendo pequeño y, por lo tanto, la búsqueda de alternativas terapéuticas es de vital importancia.

La hemorragia cerebral se produce por la ruptura de un vaso sanguíneo, lo que provoca que la sangre se libere dentro del parénquima cerebral. La formación del hematoma junto con la perturbación mecánica de los vasos sanguíneos colindantes conduce a un incremento del sangrado y del crecimiento del hematoma, dañando a las funciones neuronales. En consecuencia, el deterioro neurológico temprano y un peor pronóstico están asociados al tamaño y crecimiento del hematoma (Davis *et al.*, 2006; Steiner & Bosel, 2010). Estudios preliminares han mostrado evidencias de que un área de "penumbra isquémica" alrededor del hematoma puede desarrollarse cuando el hematoma alcanza un gran tamaño (Castillo *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2005). Este hecho podría provocar la aparición de fenómenos similares a los que tienen lugar en un ictus de tipo isquémico. La hipoxia es un fenómeno que ha sido ampliamente estudiado tanto en pacientes como en modelos animales de ictus isquémico mediante el empleo de diferentes técnicas. Sin embargo, los



estudios basados en la detección de hipoxia han sido muy limitados en el caso del ictus hemorrágico.

3.1.2 Detección de hipoxia en infarto cerebral mediante FMISO PET

Para la detección de hipoxia *in vivo* mediante imagen por Tomografía por Emisión de Positrones (PET) se han empleado radiofármacos para visualizar hipoxia *in vivo* basados en grupos nitroimidazol, ya que son capaces de acumularse en tejidos hipóxicos pero viables. El [¹⁸F]-Fluoromisonidazol ([¹⁸F]-FMISO) es un trazador que se ha propuesto como un posible indicador de la penumbra isquémica (Spratt *et al.*, 2011), al detectarse un acúmulo de FMISO en el área del infarto cerebral en estudios previos y, por lo tanto, se ha sugerido que dicho radiofármaco puede ser empleado para la detección de la penumbra isquémica *in vivo* sin producir efectos tóxicos (Saita *et al.*, 2004; Takasawa *et al.*, 2007; Rojas *et al.*, 2011; Spratt *et al.*, 2011; Nieto *et al.*, 2015). Considerando su potencial utilidad, este trazador ha sido empleado en la evaluación de regiones hipóxicas en pacientes con ictus isquémico. Varios estudios clínicos han demostrado que el FMISO puede detectar tejidos hipóxicos en la zona periinfarto tras un ictus isquémico, pudiendo representar la penumbra isquémica (Read *et al.*, 1998; Read *et al.*, 2000; Markus *et al.*, 2003; Baskin *et al.*, 2015).

Sin embargo, en el caso de la hemorragia cerebral la información es limitada y poco concluyente. A pesar de que se ha podido detectar tejido hipóxico a través del empleo de FMISO en pacientes sintomáticos (Sarrafzadeh *et al.*, 2010; Zenonos *et al.*, 2010) y en modelos animales de hemorragia subaracnoidea (Fernández-Maza *et al.*, 2018), no se han realizado estudios preclínicos en modelos de hemorragia cerebral y solo un estudio clínico ha realizado estudios de PET con FMISO, no detectando evidencia de tejido hipóxico en pacientes con hemorragia cerebral (Hirano *et al.*, 1999).



3.2 Justificación y objetivos

Los estudios realizados en pacientes no permiten llevar a cabo una evaluación longitudinal en condiciones controladas, provocando que las investigaciones publicadas hasta el momento se limiten a la adquisición de estudios de PET con FMISO en momentos muy concretos posteriores a la hemorragia. En consecuencia, el objetivo de este estudio es detectar evidencias de tejido hipóxico alrededor del hematoma a través de estudios longitudinales de PET con FMISO en un modelo de hemorragia cerebral en rata, comparando dichos resultados con otras técnicas de imagen (CT y MR) que aporten información estructural complementaria.

3.3 Material y métodos

3.3.1 Modelo de hemorragia cerebral en rata

Los procedimientos con animales fueron realizados de acuerdo a las recomendaciones del Convenio Europeo sobre la protección de los animales vertebrados utilizados para experimentación y otros fines científicos, y las directrices de la Guía ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) (<https://arriveguidelines.org>). Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (número de referencia: ES1507802928[01]), de acuerdo a las leyes vigentes de la Unión Europea y España (86/609/CEE, 2003/65/CE, 2010/63/EU y RD53/2013). Las ratas macho de la cepa Sprague Dawley con un peso de 300-400 g sufrieron un período de aclimatación en la sala de estabulación de un mínimo de 5 días antes de la realización de la cirugía. Las ratas fueron estabuladas en una sala con ciclos de día/noche de 12 h a una temperatura media de 22 ± 1 °C y una humedad de 60 ± 5 %, con acceso a agua y alimentadas *ad libitum*.

El modelo de hemorragia cerebral en rata fue inducido según la descripción plasmada en estudios previos (da Silva-Candal *et al.*, 2015) (ver Figura 3.1). Los niveles de glucosa en sangre fueron medidos antes de la



cirugía (media 147.2 ± 24.1 mg/dL). Las ratas fueron anestesiadas con sevoflurano al 6 % en una mezcla de $O_2:N_2O$ (proporción 30:70) en una cámara de inducción y posteriormente fueron posicionadas en un aparato estereotáxico (Stoelting Co, Wood Dale, IL). Tras la apertura de un trépano en el hueso craneal, se procedió a la inyección de 1 μ L de suero salino con 0.2 U/L de colagenasa VII en el cuerpo estriado derecho (0.6 mm anterior, -3.00 mm lateral y 5.5 mm profundidad con respecto a bregma) empleando una jeringa Hamilton equipada con una aguja 30 G. La inserción de la aguja en el tejido cerebral se realizó en 10 min y posteriormente se llevó a cabo la inyección de la colagenasa a una tasa de 0.1 μ L/min. Una vez finalizada la inyección, la aguja permaneció otros 10 min en el lugar de inyección antes de su extracción. Posteriormente, el agujero craneal fue sellado con cera ósea (Ethicon, Somerville, NJ) y la incisión realizada en la piel de la cabeza se cerró con sutura de 4 ceros. Durante todo el procedimiento, el animal permaneció anestesiado con sevoflurano al 4 % en una mezcla de $O_2:N_2O$ (30:70), y su temperatura corporal se mantuvo a 37 ± 0.5 °C a través del empleo de una manta calefactora. A lo largo de todo el estudio, se comprobó que el animal presentase un comportamiento locomotor normal.

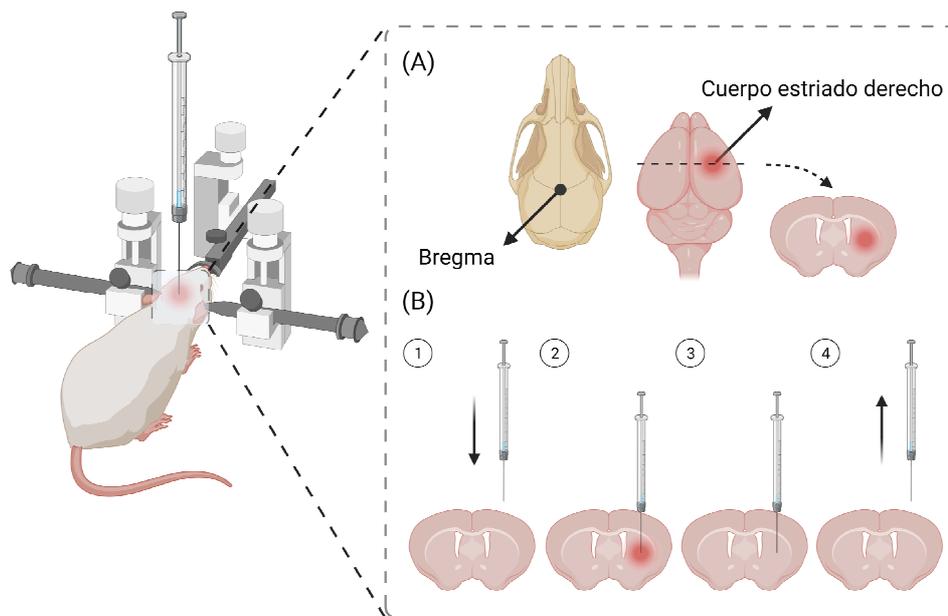




Figura 3.1. Esquema de la generación del modelo animal de hemorragia cerebral. La enzima bacteriana colagenasa VII degrada el colágeno presente en la lámina basal de los vasos sanguíneos provocando su ruptura. En consecuencia, induce una lesión vascular *in situ* que deriva en un sangrado en el parénquima cerebral que, a su vez, conduce a la formación de un hematoma expansivo. (A) Lugar de inserción de la aguja en las coordenadas correspondientes con respecto a bregma. (B) Protocolo de inyección de colagenasa VII para la inducción del modelo. (1) La inserción de la aguja en el tejido cerebral se realiza a través de un trépano. (2) Posteriormente, se procede a la inyección de 1 μL de colagenasa VII en el cuerpo estriado derecho del animal a una tasa de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. (3) Tras la inyección, la aguja permanece en el lugar de administración para permitir la difusión de la enzima. (4) Finalmente, se procede a la retirada de la aguja y al sellado del trépano. Cada uno de estos pasos tiene una duración estimada de 10 min. La Figura fue creada con BioRender (<https://biorender.com>).

3.3.2 Diseño del estudio

En este proyecto, los estudios de imagen FMISO PET/CT y MR fueron realizados en ratas para investigar la fisiología de la hemorragia cerebral. El diseño experimental de los estudios de imagen realizados aparece representado en la Figura 3.2. El protocolo llevado a cabo para la adquisición de los estudios de imagen se detalla en el apartado correspondiente.

En el primer experimento, se administró FMISO en ratas con hemorragia cerebral (grupo ICH I) ($n = 6$) a las 18, 24, 42 y 48 h posinducción. Las imágenes de MR fueron adquiridas 1 h después de la inyección de la colagenasa (correspondiendo con el estudio basal) para confirmar la presencia de hemorragia cerebral y a los 3 y 7 días después de la cirugía. Todas las imágenes de MR fueron realizadas tras los escáneres FMISO PET/CT. Se diseñó un grupo control normal ($n=3$) compuesto por ratas sanas que no fueron sometidas a ningún tipo de cirugía cerebral para investigar el acúmulo del radiofármaco FMISO en el cerebro, y se realizó un escáner FMISO PET/CT 2 h después de la inyección del radiofármaco. Se procedió a la adquisición de un único estudio de MR 8 días después de la realización de la PET/CT. Se diseñó un grupo control salino ($n=2$) que fue sometido a la misma intervención quirúrgica que el grupo ICH pero se administró 1 μL de suero fisiológico (0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$) sin colagenasa en el cuerpo estriado derecho. El grupo control sham



(n=2) fue sometido a la misma intervención quirúrgica que el grupo ICH pero no se administró ni colagenasa ni suero salino. Se inyectó FMISO en los grupos control salino y sham a las 18, 24, 42 y 48 h poscirugía y se procedió a la adquisición de los estudios de PET/CT 2 h después de la inyección del radiofármaco. Los escáneres de MR fueron realizados a las 1 h, 3 días y 7 días después de la cirugía.

En el segundo experimento, se diseñó un nuevo estudio para evaluar la integridad de la barrera hematoencefálica en ratas con hemorragia cerebral. Para ello, se realizó un seguimiento exhaustivo de la evolución de la hemorragia mediante imagen por MR en ratas con ictus hemorrágico (grupo ICH II) (n=8) a las 1 (basal), 3, 5, 8, 24, 72 h y 7 días después de la inyección de colagenasa. Se adquirieron más secuencias de MR en 2 animales de este grupo antes y después de la administración de un agente de contraste (Gd, gadolinio) a las 1, 3, 6 y 24 h después de la inyección de colagenasa.

Con el objetivo de investigar la presencia de hipoxia en la región circundante al hematoma, se realizó un tercer experimento con 18 ratas. De esta forma, ratas con hemorragia cerebral, ratas control salino y ratas sham fueron sacrificadas y perfundidas a las 5 h (2 ratas por grupo experimental), 18 h (2 ratas por grupo experimental) y 24 h (2 ratas por grupo experimental) después de la cirugía para la realización de análisis por inmunofluorescencia. Se procedió a la adquisición de estudios de MR después de la cirugía y antes del sacrificio de los animales para confirmar la presencia de hemorragia cerebral en el grupo ICH y ausencia de hemorragia cerebral en los grupos control salino y sham.

Los animales que presentaron una hemorragia localizada lejos de los ganglios basales (n=1) fueron excluidos del estudio. Una vez finalizado el estudio, todos los animales involucrados fueron sacrificados a través de la inyección intracardíaca de 5 mL de cloruro potásico.

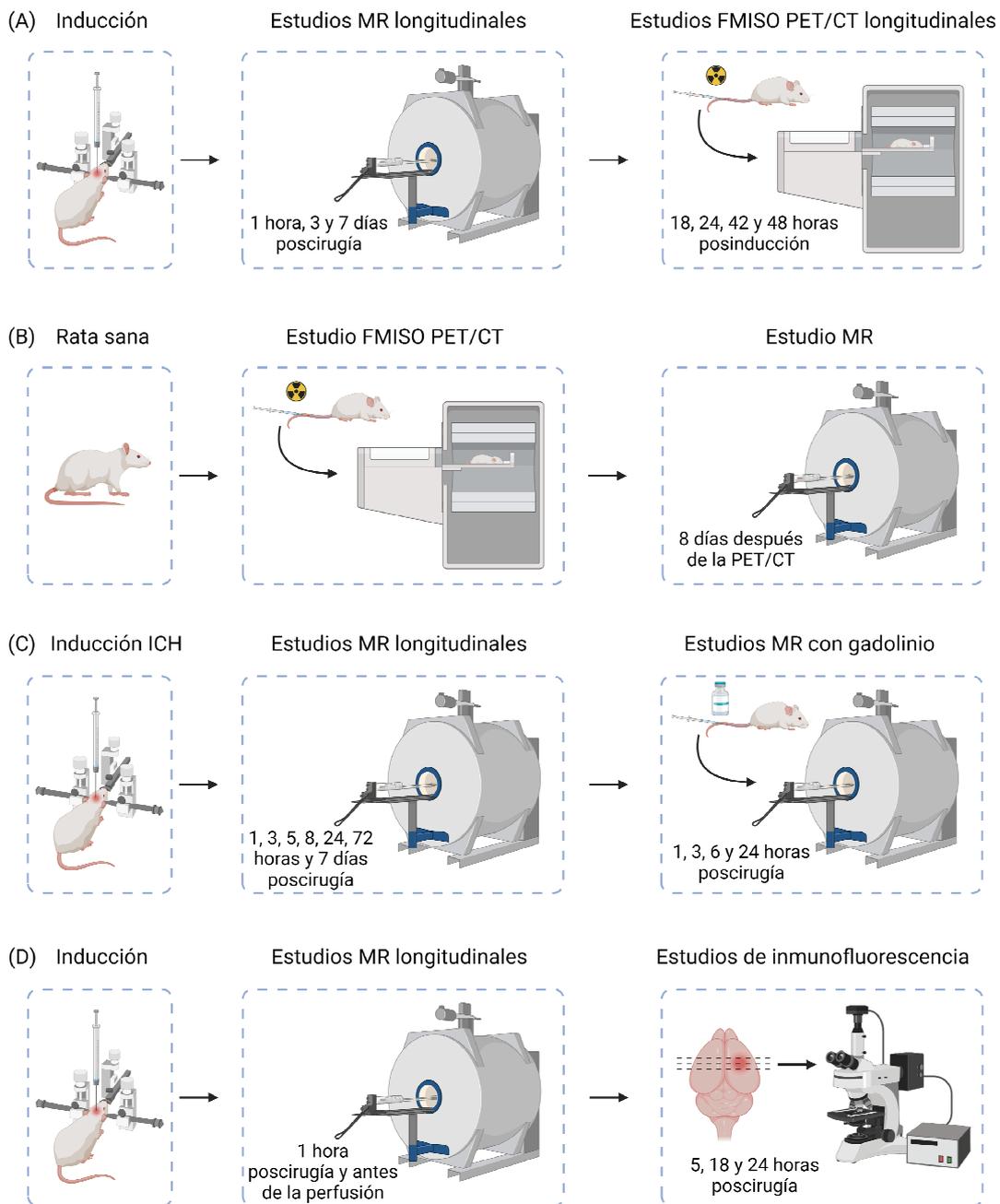


Figura 3.2. Diseño de los estudios realizados en los diferentes grupos experimentales: (A) Grupo ICH I, grupo control salino y grupo control sham, (B) Grupo control normal, (C) Grupo ICH II y (D) grupo de animales ICH, salino y sham. Los animales pertenecientes a los grupos control salino y control sham fueron sometidos a la misma intervención quirúrgica que los grupos ICH pero, en lugar de inocular la colagenasa VII, se procedió a la inyección de suero fisiológico o no se administró ninguna solución, respectivamente. Las ratas del grupo control normal no fueron intervenidas quirúrgicamente. La Figura fue creada con BioRender (<https://biorender.com>).



3.3.3 Radiosíntesis de FMISO

La síntesis de FMISO se llevó a cabo en módulos Tracerlab MX-FDG (GE Healthcare) a través del uso de un casete desechable y de reactivos. Dicha síntesis se basa en la sustitución nucleofílica del grupo tosilo en el precursor 1-(2'-nitro-1'-imidazolil)-2-O-tetrahidropiranyl-3-O-tolueno-sulfonilpropanodiol (NITTP), seguida de una hidrólisis ácida del grupo 2-tetrahidropiranyl (Tang *et al.*, 2005). La purificación del producto final se realizó en 3 cartuchos de SPE. Los reactivos, los casetes y la ruta de síntesis fueron suministrados por ABX advanced biochemical compounds GmbH.

3.3.4 Protocolo de imágenes FMISO PET/CT

Los estudios de PET/CT fueron adquiridos en un equipo de imagen preclínico microPET/CT Albira Bruker (Bruker Biospin Corp., Billerica, MA) compuesto por un detector de 3 anillos que define un campo de visión o FOV axial de 124 mm y un FOV transaxial de 80 mm. Cada anillo PET está compuesto por 8 módulos que forman un octágono y dichos módulos contienen cristales de oxiortosilicato de lutecio ytrio (LYSO) y un tubo fotomultiplicador multiánodo. Por otro lado, el equipo CT está formado por un tubo de rayos X y un detector de yoduro de cesio.

Para la realización de los estudios de imagen PET/CT con FMISO, los animales fueron anestesiados con isoflurano al 3% en una cámara de inducción. Posteriormente, los animales (con un peso de 356.50 ± 50.82 g antes de la cirugía) fueron conectados a una mascarilla al 2.5-2% de isoflurano y se procedió a la inyección intravenosa de 15.56 ± 2.79 MBq de FMISO en la vena de la cola de los animales. A continuación, los animales fueron devueltos a sus cubetas y permanecieron en las mismas durante 110 min con acceso a agua y comida. Una vez transcurrido dicho tiempo, los animales fueron anestesiados de nuevo y fueron posicionados en prono en la cama del equipo preclínico. Finalmente, se procedió a la adquisición de las imágenes FMISO PET/CT a los 120 min posinyección (Spratt *et al.*, 2011), con una duración de 20 min para la PET y otros 10 min para la CT. Una vez finalizada la adquisición



de las imágenes cerebrales, los animales fueron devueltos a sus cubetas. Las imágenes de PET fueron reconstruidas empleando un algoritmo máximo de probabilidad de expectativa de maximización (MLEM) con 12 iteraciones y un tamaño de pixel de $0.5 \times 0.5 \times 0.5 \text{ mm}^3$. Se realizaron correcciones de dispersión y eventos aleatorios en la reconstrucción de las imágenes de PET, pero no se llevó a cabo la corrección de atenuación. El estudio CT fue centrado en el cráneo del animal correspondiente, y los parámetros del protocolo de adquisición fueron 35 kV de tensión y 200 μA de intensidad con 250 proyecciones.

En el grupo patológico, el radiofármaco fue administrado a las 18, 24, 42 y 48 h posinducción, y la adquisición de las imágenes de PET/CT se llevó a cabo 2 h después de la inyección de FMISO (a las 20, 26, 44 y 50 h posinducción, respectivamente). Una vez realizados los estudios de imagen PET/CT con FMISO, los animales fueron trasladados al Laboratorio de Investigación en Neurociencias Clínicas (LINC) del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) para realizar los estudios de imagen por MR a las 72 h y 7 días después de la cirugía. En el grupo control normal, se adquirió un estudio FMISO PET/CT 2 h después de la inyección del radiofármaco. En los grupos control salino y sham, los animales fueron sometidos al mismo seguimiento por imagen PET/CT que los animales del grupo patológico (grupo ICH I). Se adquirieron un total de 43 estudios FMISO PET/CT.

3.3.5 Protocolo de imágenes MR

Los estudios de MR fueron adquiridos en un equipo de imagen preclínico de resonancia magnética Biospec 94/20 USR Bruker (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) que posee un campo magnético de 9.4 T, un diámetro interno de 20 cm y un gradiente de campo magnético de 440 mT/m.

Para la realización de los estudios de imagen de MR, los animales fueron anestesiados con sevoflurano al 6% en una mezcla de $\text{O}_2:\text{N}_2\text{O}$



(proporción 30:70) en una cámara de inducción. Una vez anestesiados, los animales fueron posicionados en prono en la cama del escáner preclínico. La temperatura corporal fue mantenida a 37 ± 0.5 °C a través del empleo de una manta homeotérmica conectada a una sonda rectal.

Las imágenes de MR fueron adquiridas con un sistema emisión-recepción de antenas que consiste en un emisor lineal de 7 cm de diámetro y una antena de superficie de 4 elementos. Las imágenes potenciadas en T2 fueron adquiridas empleando los siguientes parámetros: tiempo de eco (ET) = 33 ms; repeticiones = 1; tiempo de repetición (RT) = 2.5 s; número de promedios (NA) = 3.36 kHz de ancho de banda espectral; ángulo de giro (FA) = 90°; campo de visión (FOV) = 25.6 x 25.6 mm²; matriz de la imagen = 256 x 256 puntos (resolución isotrópica de 0.1 mm/píxel), sin eliminar la señal de tejido graso. Se adquirieron 18 cortes coronales consecutivos de 0.5 mm de grosor y el tiempo total de adquisición fue de 4 min. Adicionalmente, se adquirieron secuencias T2 de adquisición rápida con realce de la relajación (RARE) para localizar la lesión y fusionar dichas imágenes con las obtenidas mediante imagen PET. Las secuencias de imagen potenciada en T2 fueron empleadas para estudiar el volumen del hematoma a las 1 h (estudio basal), 72 h y 7 días después de la inyección de la colagenasa en el grupo ICH I, y a las 1 (basal), 3, 5, 8, 24, 72 h y 7 días después de la inyección de colagenasa en el grupo ICH II (teniendo en cuenta el seguimiento exhaustivo realizado en un estudio previo) (da Silva-Candal *et al.*, 2015). Se adquirieron más secuencias de imagen potenciadas en T1 en 2 animales del grupo ICH II antes y después de la administración de 1 mL/kg de gadolinio (0.5 mmol/mL, Guerbet) a las 1, 3, 6 y 24 h después de la inyección de colagenasa. En los grupos control salino y sham se procedió a la adquisición de imágenes de MR a las 1 h, 72 h y 7 días después de la cirugía. En el grupo control normal se realizó un único estudio de MR 8 días después del estudio PET/CT con FMISO. Se adquirieron un total de 116 estudios de MR.



3.3.6 Análisis de las imágenes PET/CT y MR

Las imágenes FMISO PET y CT fueron automáticamente fusionadas empleando el software de reconstrucción del equipo Albira microPET/CT. Las imágenes FMISO PET/CT se emplearon para realizar un análisis cuantitativo de la captación del radiotrazador en el cerebro de los animales. Finalmente, las imágenes FMISO PET/CT y las imágenes de MR fueron fusionadas a través del uso de algoritmos implementados en el software de análisis de imagen PMOD (versión 3.7; PMOD Technologies LLC, Zurich, Switzerland). Las imágenes obtenidas fueron empleadas para estudiar la distribución del trazador FMISO con respecto a la zona hemorrágica.

El acúmulo cerebral del trazador FMISO fue estimado a través del empleo de dos regiones de interés (ROIs) diseñadas manualmente: región de interés (localizada en la zona de la lesión hemorrágica) y región de referencia (posicionada en el límite entre el cerebro y el cerebelo). Se seleccionó dicha región de referencia al encontrarse lejos de la hemorragia y al carecer de una captación específica de FMISO. Cada ROI fue dibujada sobre las imágenes de CT usando una geometría esférica ($5 \times 5 \times 5 \text{ mm}^3$) y se centró en la zona de máxima captación de trazador (en el caso de la región de interés) y en el límite entre el cerebelo y el cerebro (para la región de referencia). Finalmente, las ROIs fueron trasladadas a las imágenes de PET y se calculó la proporción entre la captación media de FMISO en la zona hemorrágica y la zona sana para cada uno de los grupos experimentales y a lo largo del tiempo. Las imágenes potenciadas en T2 fueron empleadas para identificar y estimar el volumen del hematoma a lo largo del tiempo a través de su delineado en las ratas con hemorragia. Además, se estudió la integridad de la barrera hematoencefálica a través de la evaluación de la señal en el perihematoma en las secuencias T1 adquiridas antes y después de la administración de gadolinio. El análisis de las imágenes de PET/CT y MR se llevó a cabo empleando los softwares Amide (<http://amide.sourceforge.net>) e ImageJ (<http://imagej.nih.gov>).



3.3.7 Ensayo de inmunofluorescencia

En el tercer experimento, animales con hemorragia cerebral, animales control salino y animales control sham fueron perfundidos a través de la administración intracardíaca de 80 mL de tampón fosfato salino (PBS) y 80 mL de formaldehído al 4% a las 5, 18 y 24 h poscirugía. Inmediatamente después se procedió a la extracción del cerebro y a su inmersión en un recipiente con formaldehído al 4% durante 12 horas. Una vez transcurrido dicho tiempo, el cerebro fue trasladado a una solución de sacarosa al 20% en PBS. Posteriormente, el cerebro fue seccionado en cortes de 25 μm de grosor y se mantuvieron en remojo con una solución anticongelante a -20°C . Se emplearon 6 cortes para realizar un estudio de inmunofluorescencia y fueron separados por 500 μm de grosor. Dichas secciones cubrían el hematoma completo en las ratas con hemorragia y la misma región anatómica en las ratas control.

Con el objetivo de identificar células hipóxicas, se empleó un anticuerpo policlonal anti-HIF-1 α de conejo (#NB100-479, Novus Biologicals, Centennial, CO) que fue incubado en una dilución 1:25 a temperatura ambiente durante toda la noche. Como anticuerpo secundario, se empleó el anticuerpo de caballo anti-IgG de ratón (H + L) conjugado con DyLight 488 (#DI-2488, Vector Laboratories, Burlingame, CA) y que fue incubado en una dilución 1:200 a temperatura ambiente durante 2 h. Previa a la incubación con el anticuerpo primario, se procedió a la recuperación del antígeno calentando las secciones histológicas a 99°C durante 30 min en un tampón de citrato (pH 6). Los anticuerpos fueron incubados y diluídos con PBS con 0.25 % de Tritón X-100 y 5 % de suero de caballo. Los núcleos fueron detectados con Hoechst 33342 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) que fue incubado en una dilución 1:4000 durante 5 min. Todos los lavados fueron realizados con PBS. Los cortes histológicos de 25 μm fueron observados en el microscopio invertido Leica CTR6000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Las imágenes fueron obtenidas a través del empleo del software de LAS (Leica Application Suite) X Life (Leica Microsystems Wetzlar, Germany).



3.3.8 Tamaño muestral y análisis estadístico

El tamaño muestral de los experimentos fue calculado teniendo en cuenta el diseño de estudios previos centrados en isquemia cerebral (Takasawa *et al.*, 2007; Rojas *et al.*, 2011) para detectar un incremento de un 25% en la captación de FMISO en las ratas con hemorragia con respecto a las ratas control (prueba t de 2 colas). De esta forma, basados en la literatura previa, se estimó la necesidad de incluir 6 ratas por grupo para constatar dicha diferencia con una potencia de 0.8 y una significancia de 0.05. El tamaño muestral fue calculado a través del empleo del software EPIDAT (<http://www.sergas.es/Saude-publica/EPIDAT-4-2>). Todos los resultados fueron expresados como media \pm desviación estándar y el análisis estadístico fue realizado empleando una prueba t de Student. La relación entre variables fue evaluada a través del coeficiente de correlación de Spearman y los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando poseían un valor p inferior a 0.05. El análisis estadístico fue realizado en el paquete estadístico PASW Statistics 18 para Mac (SPSS Inc, Chicago, IL).

3.4 Resultados

3.4.1 Estudios de imagen en ratas con hemorragia cerebral

La lesión hemorrágica fue identificada en la región estriatal en 5 de 6 ratas con hemorragia cerebral por MR, por lo que uno de los animales fue descartado debido a la inducción fallida del modelo. El volumen del hematoma presentó un rango comprendido entre los 10.4 y 41.2 mm³ a 1 h posinducción y entre 59.1 y 77.2 mm³ a las 24 h posinducción. Las imágenes de MR del grupo control normal fueron consideradas normales al carecer de lesiones a nivel cerebral. La Figura 3.3 muestra las imágenes representativas de MR adquiridas a las 24 h poscirugía en un animal del grupo hemorrágico fusionadas con las imágenes FMISO PET adquiridas a las 18 h posinducción. Dichas imágenes muestran un claro incremento de captación de FMISO alrededor del hematoma en ratas con hemorragia cerebral, detectable tanto en los cortes transversales como en los horizontales. También se observó un acúmulo importante de FMISO en el bulbo olfativo de los animales. La Figura 3.3 también muestra una



correlación positiva entre el volumen basal del hematoma y la captación de FMISO ($r^2 = 0.528$, $p < 0.0001$). Por otro lado, no se constataron relaciones entre el volumen del hematoma medido a las 24 h posinducción y la captación de FMISO.

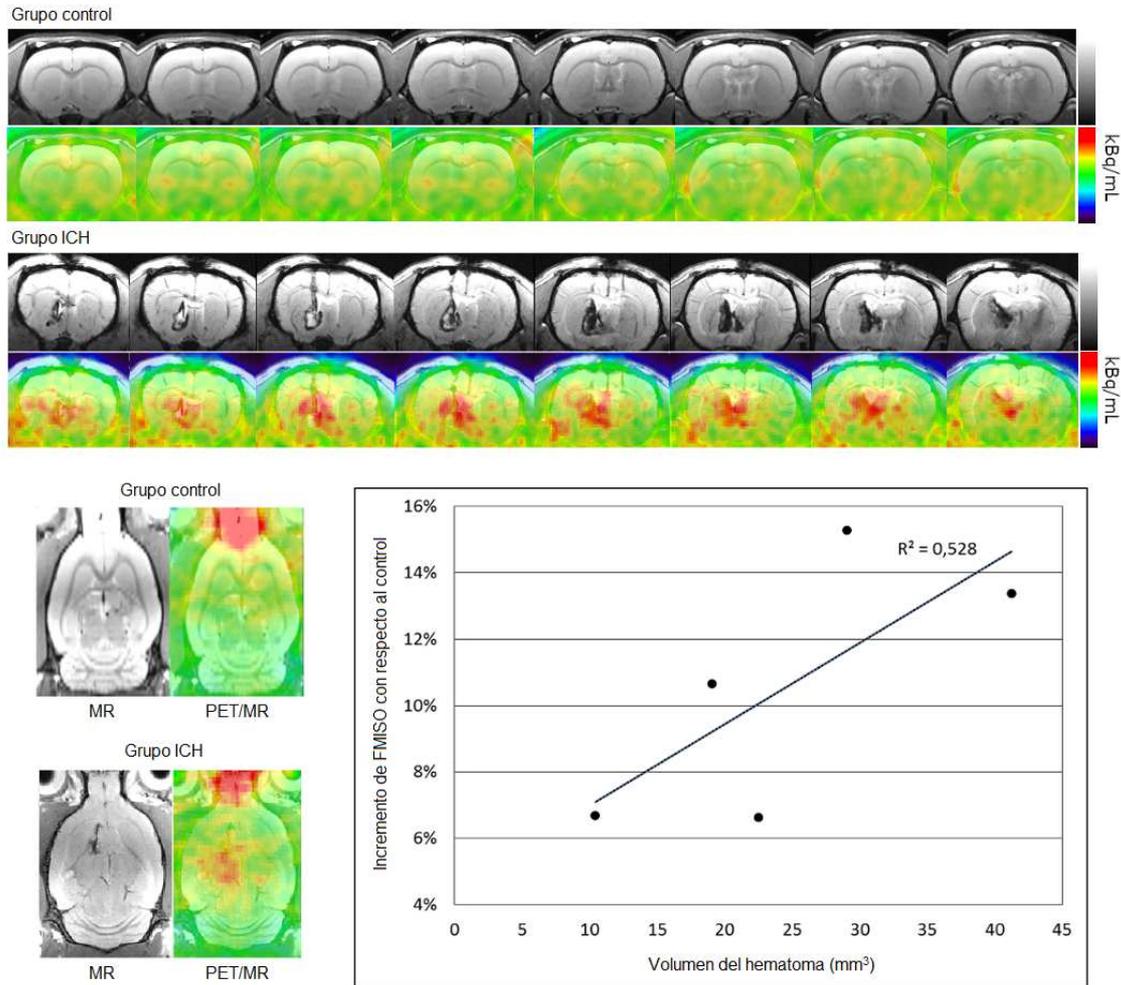


Figura 3.3. Cortes transversales (imagen superior) y horizontales (imagen inferior) de las imágenes FMISO PET adquiridas a las 18 h posinducción e imágenes de MR adquiridas a las 24 h poscirugía de un animal con hemorragia y un animal control. Gráfica que muestra la relación entre la captación de FMISO y el volumen del hematoma ($r^2 = 0.528$) en ratas con hemorragia cerebral.

La Figura 3.4A muestra las imágenes funcionales FMISO PET (18, 24, 42 y 48 h posinducción) fusionadas con la imagen de MR inicial en un animal con hemorragia cerebral. Dichas imágenes muestran un incremento significativo de la captación del radiofármaco a las 18 y 24 h posinducción, y



que dicho acúmulo decrece posteriormente. La Figura 3.4B muestra el volumen del hematoma (grupo ICH II) y el incremento del acúmulo de FMISO a lo largo del tiempo (grupo ICH I) con respecto al grupo control normal. La Figura 3.5 representa la evolución de la hemorragia cerebral estudiada mediante MR en una rata con ictus hemorrágico perteneciente al grupo ICH II. El volumen máximo del hematoma fue detectado a las 5 h posinducción ($72 \pm 6 \text{ mm}^3$), disminuyendo posteriormente a las 72 h posinducción ($55 \pm 14 \text{ mm}^3$) y reabsorbiéndose a los 7 días. Por otro lado, el incremento máximo de FMISO fue detectado a las 18 h posinducción ($11 \pm 4\%$, $p = 0.004$), decreciendo considerablemente a las 24 h posinducción ($6 \pm 3\%$, $p = 0.0025$). Posteriormente, el incremento de captación de FMISO no fue significativo, mostrando valores de $4 \pm 3\%$ ($p = 0.189$) a las 42 h posinducción y de $2 \pm 5\%$ ($p = 0.591$) a las 48 h posinducción. En consecuencia, los resultados obtenidos muestran un incremento significativo de la captación cerebral de FMISO a las 18-24 h posinducción una vez el hematoma ha alcanzado su máximo volumen (5 h posinducción) y dicho incremento desaparece a partir de las 42 h, pese al hecho de que el volumen del hematoma permanece prácticamente invariable hasta las 72 h posinducción.

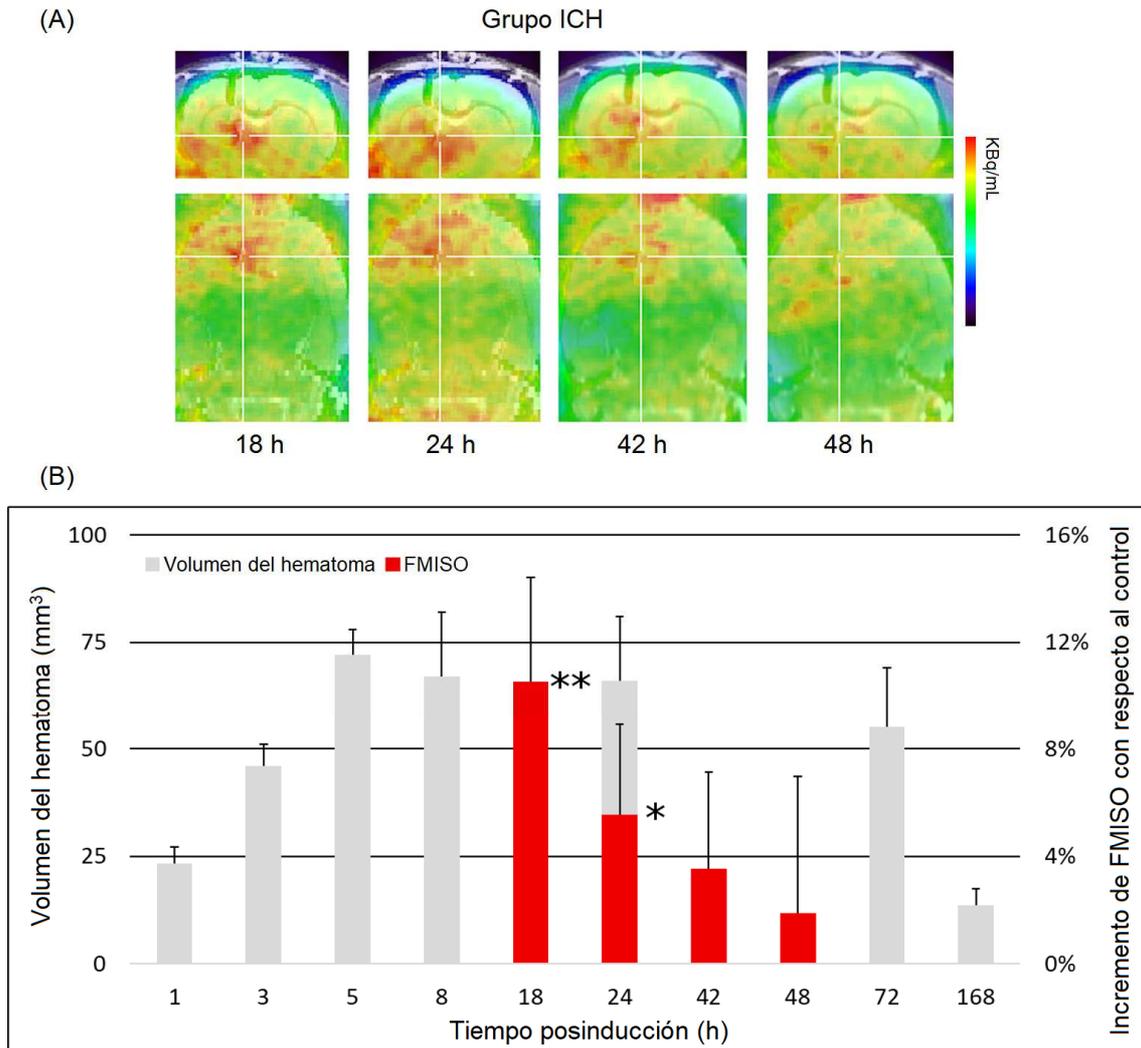


Figura 3.4. (A) Cortes transversales y horizontales de las imágenes longitudinales FMISO PET (18, 24, 42 y 48 h posinducción) adquiridas en ratas con hemorragia cerebral. (B) Volumen del hematoma cerebral a lo largo del tiempo (1, 3, 5, 8, 24, 72 y 168 h) en ratas con hemorragia cerebral e incremento de la captación de FMISO con respecto a los animales control. Los resultados están expresados como media \pm desviación estándar y las diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control fueron indicadas según el siguiente código: $p < 0.05$ (*) y $p < 0.01$ (**).

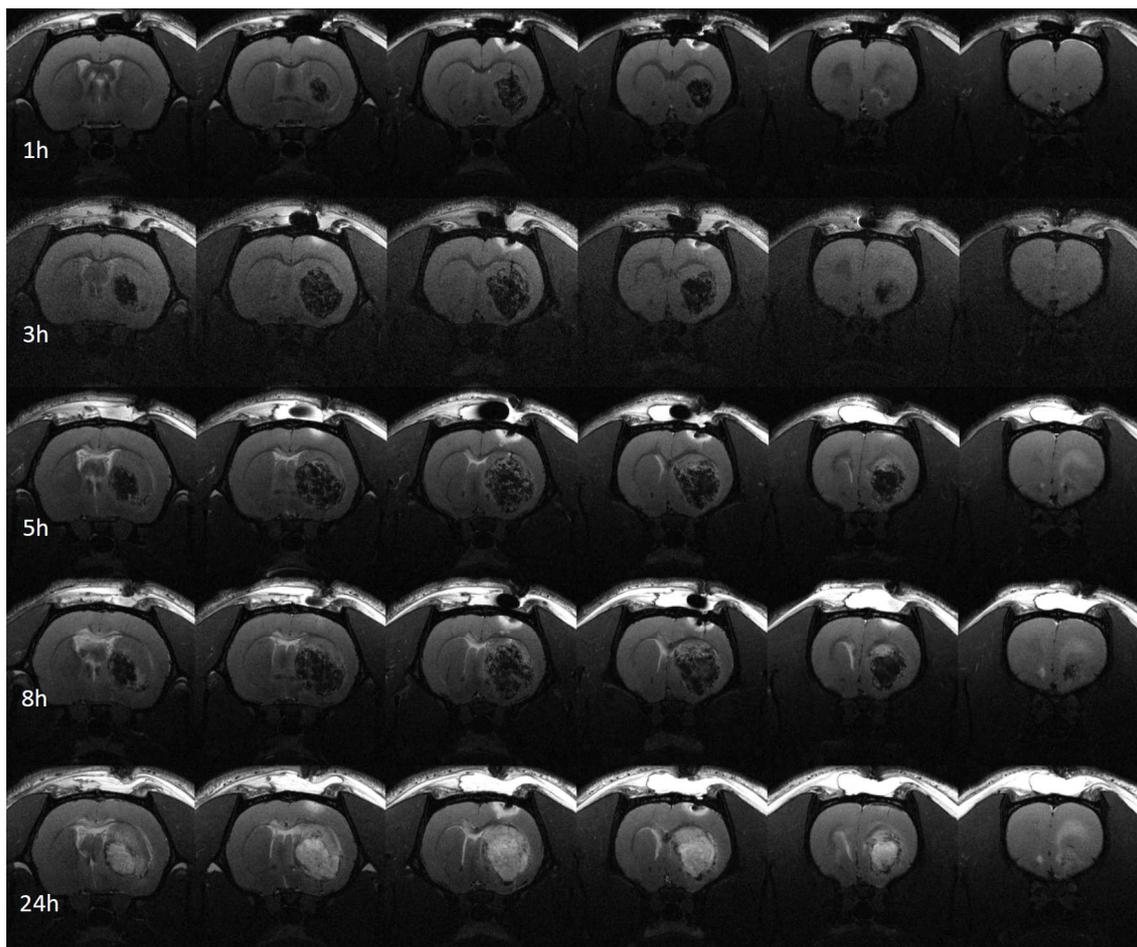


Figura 3.5. Imágenes representativas de MR que muestran la evolución del hematoma en las primeras 24 horas después de la inducción de la hemorragia cerebral.

3.4.2 Estudios de imagen en animales control

La Figura 3.6A muestra las imágenes funcionales FMISO PET fusionadas con las imágenes estructurales CT adquiridas a diferentes tiempos poscirugía en el grupo control salino. Dichas imágenes muestran una ausencia de captación específica de FMISO a nivel cerebral. Por otro lado, la Figura 3.6B enseña las imágenes funcionales FMISO PET fusionadas con las imágenes estructurales CT adquiridas a diferentes tiempos poscirugía en el grupo control sham. Al igual que en el grupo anterior, las imágenes mostraron una ausencia de captación específica de FMISO a nivel cerebral. La Figura 3.6C presenta las imágenes obtenidas por resonancia magnética a diferentes tiempos poscirugía (1 h, 3 días y 7 días) en animales pertenecientes a los grupos control salino y sham. Las imágenes de MR del animal del grupo control sham no mostraron



ningún tipo de hiperintensidad. Sin embargo, las imágenes de MR del animal del grupo control salino mostraron una hiperintensidad leve a lo largo de la región de inserción de la aguja en el parénquima cerebral a las 1 y 3 días posinducción, que se vuelve imperceptible a los 7 días. La Figura 3.6D expone el incremento del acúmulo cerebral de FMISO a lo largo del tiempo en los grupos control salino y sham con respecto al estudio basal (grupo control normal). Según lo esperado, no se observó una captación cerebral específica de FMISO en ninguno de los grupos control salino y sham. El acúmulo cerebral de FMISO se mantuvo a lo largo del tiempo en los momentos posinducción estudiados y no se detectaron diferencias significativas entre los grupos control salino y sham. Las imágenes FMISO PET/CT mostraron una mayor captación cerebral en ratas con hemorragia cerebral que en las ratas control, demostrando que dicha captación no es debida al proceso quirúrgico.

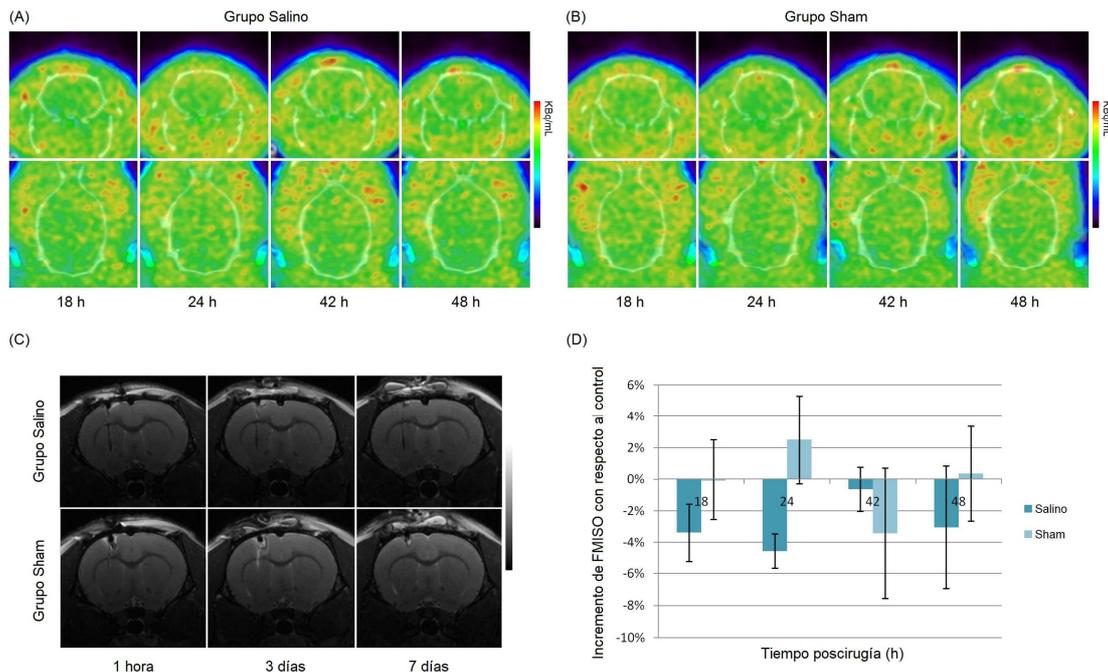


Figura 3.6. (A) Cortes transversales y horizontales de las imágenes longitudinales FMISO PET/CT (18, 24, 42 y 48 h posinducción) adquiridas en ratas del grupo control salino. (B) Cortes transversales y horizontales de las imágenes longitudinales FMISO PET/CT (18, 24, 42 y 48 h posinducción) adquiridas en ratas del grupo control sham. (C) Cortes transversales de las imágenes de MR adquiridas a las 1 h, 3 días y 7 días poscirugía en los mismos animales mostrados anteriormente. (D) Incremento de la captación de FMISO con respecto al grupo control en los grupos control salino y sham.



3.4.3 Evaluación de la integridad de la barrera hematoencefálica

Con respecto a la integridad de la barrera hematoencefálica, la Figura 3.7 muestra las secuencias de MR adquiridas antes y justo después de la administración intravenosa de gadolinio a las 1, 3, 6 y 24 h posinducción. Las secuencias de imagen anatómica exhibieron un incremento de la señal tras la inyección del agente de contraste a nivel de la región perihematoma a las 1 y 3 h posinducción. Sin embargo, dicho realce no fue tan evidente a las 6 h posinducción y desaparece por completo a las 24 h. Por lo tanto, dichos resultados confirman que la barrera hematoencefálica se encuentra dañada en las primeras 3 h posinducción, siendo parcialmente restaurada a las 6 h y encontrándose completamente intacta a las 24 h.

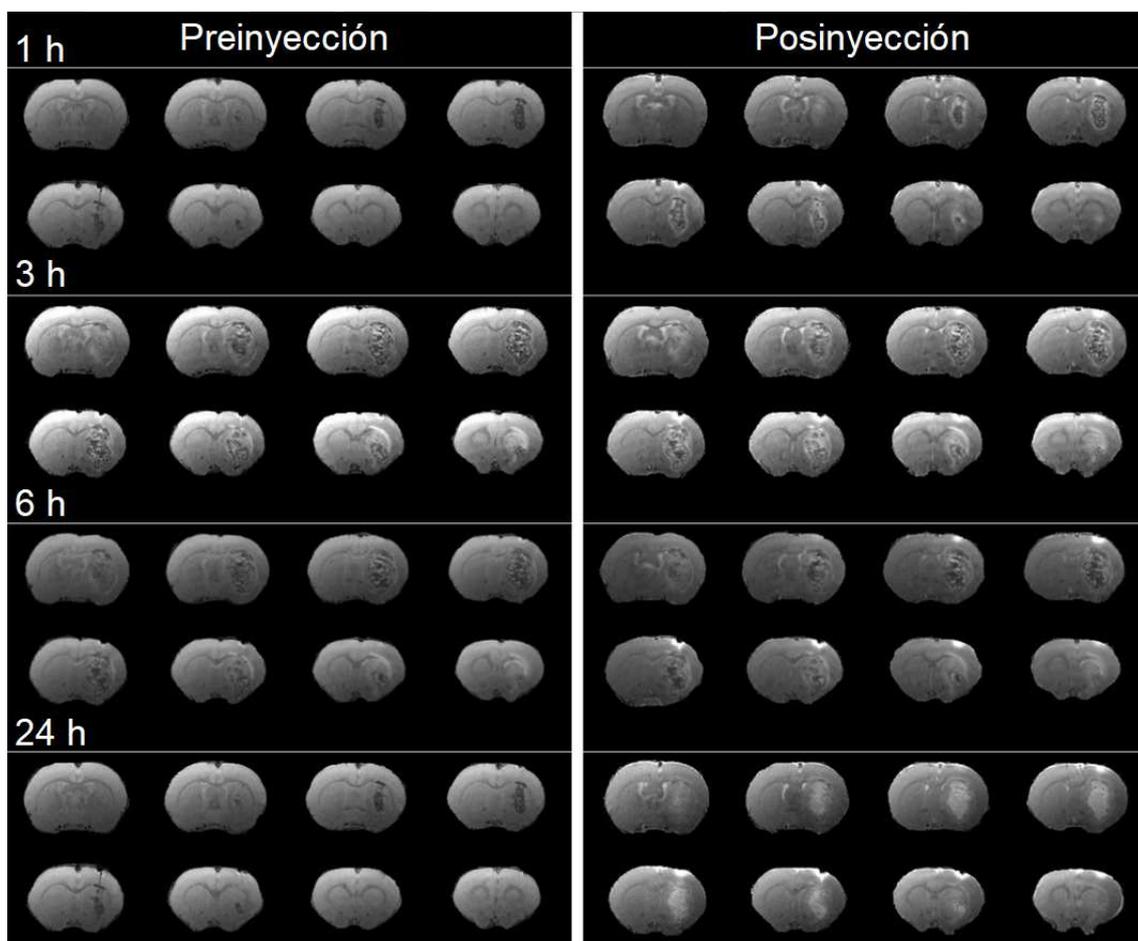


Figura 3.7. Integridad de la barrera hematoencefálica evaluada mediante imagen por MR a las 1, 3, 6 y 24 h después de la inducción del modelo de hemorragia cerebral. A la izquierda, las



imágenes de MR adquiridas antes de la administración de gadolinio. A la derecha, las imágenes de MR adquiridas tras la administración intravenosa de gadolinio.

3.4.4 Ensayo de inmunofluorescencia

Finalmente, los resultados del estudio de inmunofluorescencia aparecen representados en la Figura 3.8. Se identificaron células positivas para HIF-1 α a nivel cerebral en las ratas a las que se les indujo la hemorragia cerebral con colagenasa VII pero no en las ratas pertenecientes a los grupos control salino y sham en los tres tiempos poscirugía evaluados. Se confirmó la presencia de hemorragia en los animales del grupo hemorrágico. Los resultados obtenidos por inmunofluorescencia permitieron confirmar la presencia de tejido hipóxico perihematoma entre las 5 y 24 h después de la inducción de la hemorragia cerebral.

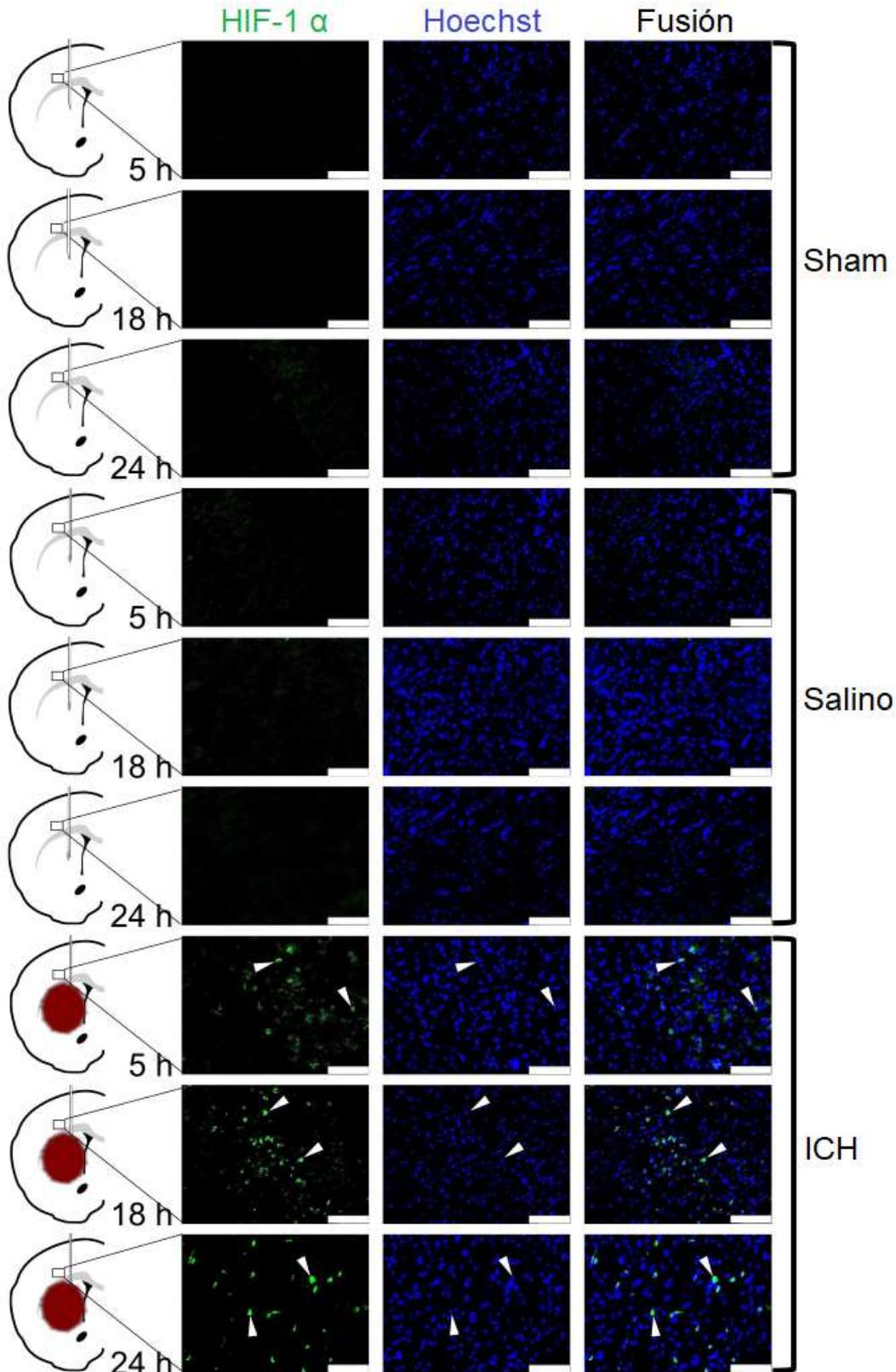


Figura 3.8. Imágenes representativas del análisis de inmunofluorescencia con HIF-1 α a las 5, 18 y 24 h después de la cirugía en los cerebros de animales pertenecientes a los grupos con hemorragia, control salino y control sham. Todas las imágenes fueron captadas en la corteza



prefrontal con respecto al hematoma en el grupo con hemorragia y en la misma región u equivalente en los grupos control salino y sham. La señal de HIF-1 α aparece representada en color verde y los núcleos marcados con Hoechst aparecen representados en color azul. Las puntas de flecha de color blanco señalan células positivas para HIF-1 α y sus correspondientes núcleos marcados con Hoechst. La escala empleada en las imágenes es de 100 μm .

3.5 Discusión

De acuerdo a la bibliografía consultada, este trabajo es el primer estudio preclínico que evalúa la presencia de regiones hipóxicas alrededor del hematoma a través del empleo de estudios de imagen FMISO PET/MR en un modelo experimental de hemorragia cerebral. Las imágenes FMISO PET/MR realizadas en el grupo de ratas hemorrágicas mostraron un incremento de la captación del radiofármaco alrededor del hematoma, a diferencia de los hallazgos observados en los grupos control, en los cuales no se identificó una captación específica de FMISO. Los resultados obtenidos también mostraron que las ratas con hemorragia cerebral exhibían regiones hipóxicas después de que el hematoma alcanzase su máximo volumen. Por consiguiente, el acúmulo de FMISO decreció rápidamente con el paso del tiempo, especialmente entre las 18 y 24 h posinducción. Dicha disminución puede ser debida a una reducción en el volumen del edema perihematoma, el cual tiene una relación directa con el volumen del hematoma, o a un descenso en la presión sanguínea (ver Figura 3.4B a las 24 h poscirugía). Dichos resultados parecen indicar que el descenso de la captación cerebral de FMISO sucede cuando se produce una estabilización en el tamaño del hematoma. En consecuencia, la disminución de FMISO no puede ser relacionada con la desaparición de isquemia, la cual tiene lugar a los 7 días poscirugía aproximadamente. En un estudio preclínico realizado en ratas con isquemia cerebral permanente (Rojas *et al.*, 2011), se observó un descenso en la captación de FMISO según aumentaba el tiempo tras la inducción de la isquemia. Además, los investigadores detectaron una pérdida de tejido viable capaz de unirse al FMISO, identificando una ausencia de captación del radiofármaco a las 48 h después de la inducción del ictus isquémico. Igualmente, se observó una elevada captación de FMISO en el bulbo olfatorio en las ratas hemorrágicas y



en las del grupo control. Estudios recientes han mostrado que el bulbo olfatorio es susceptible a condiciones hipóxicas (Hoffmann *et al.*, 2016). Además, otros estudios han mostrado que algunos factores como el olor (Lecoq *et al.*, 2009) o la anestesia inhalatoria (Lyons *et al.*, 2016) pueden provocar una reducción en la presión parcial de oxígeno. Dichos parámetros podrían causar un incremento en la captación de FMISO en el bulbo olfatorio. En consecuencia, este estudio demuestra por primera vez la existencia de tejido hipóxico y daño cerebral asociado al crecimiento del hematoma en hemorragia cerebral. También se procedió a la adquisición de imágenes de MR con contraste para confirmar que la captación de FMISO no se debía a la ruptura de la barrera hematoencefálica, pudiendo observar que ésta se encontraba parcialmente restaurada a las 6 h y completamente intacta a las 24 h, realizándose los estudios de PET/CT con FMISO a partir de las 18 h posinducción. Con respecto a los resultados del estudio de inmunofluorescencia, se pudo confirmar la presencia de células positivas para HIF-1 α a las 5, 18 y 24 h posinducción en ratas con hemorragia cerebral, mientras que no se observaron células positivas en ninguno de los grupos control salino y sham. Por consiguiente, los resultados histológicos muestran la presencia de células hipóxicas alrededor del hematoma y el trazador FMISO se localiza próximo a dicha región.

A pesar de que varios estudios clínicos y preclínicos han demostrado que la PET con FMISO puede detectar tejido hipóxico en la región periinfarto tras un ictus isquémico (Read *et al.*, 1998; Read *et al.*, 2000; Markus *et al.*, 2003; Baskin *et al.*, 2015), así como también en pacientes sintomáticos y modelos animales con hemorragia subaracnoidea aneurismática (Sarrafzadeh *et al.*, 2010; Zenonos *et al.*, 2010; Fernández-Maza *et al.*, 2018), no se han realizados estudios de PET preclínicos con FMISO para evaluar la existencia de tejido hipóxico en hemorragia cerebral. Sólo se ha realizado un estudio clínico en el que se adquirieron estudios de PET con FMISO en pacientes (Hirano *et al.*, 1999), manifestando la ausencia de tejido hipóxico en un número limitado de pacientes con ictus hemorrágico. Dicha controversia con respecto a los resultados obtenidos en este proyecto puede ser explicada por el protocolo



clínico, debido a que en el estudio de Hirano *et al.* (1999) no se realizaron estudios longitudinales, llevando a cabo una única adquisición PET con FMISO en cada uno de los pacientes. Dicho diseño dificulta enormemente la posibilidad de encontrar el momento óptimo para detectar la presencia de tejido hipóxico. Otro hecho a tener en cuenta es que la ventana temporal óptima para la detección de regiones hipóxicas puede ser diferente en ratas y en humanos (Saita *et al.*, 2004). En resumen, los resultados obtenidos en este estudio experimental sugieren que podría ser interesante la realización de estudios clínicos longitudinales y multicéntricos para estudiar la presencia de tejido hipóxico asociado al crecimiento del hematoma en pacientes con hemorragia cerebral, prestando especial atención al momento poshemorragia.

Este estudio experimental presenta varias limitaciones que deben ser mencionadas. Las imágenes FMISO PET/CT y los estudios de MR se adquirieron a diferentes tiempos posinducción debido a algunos impedimentos técnicos. En nuestro centro de investigación no está disponible un equipo híbrido PET/MR que permita adquirir imágenes funcionales y estructurales de forma simultánea o consecutiva. Además, los escáneres PET/CT y MR se encuentran localizados en diferentes áreas del centro de investigación, por lo que los animales no pueden ser exportados del área radiactiva tras la administración del radiofármaco. En consecuencia, debido a que las imágenes FMISO PET/CT fueron adquiridas a las 20, 26, 44 y 50 h posinducción, fue imposible la realización de los estudios de imagen por MR durante dicho intervalo de tiempo. Es necesario mencionar que estudios científicos previos describieron la evolución de la hemorragia cerebral de forma extensa (da Silva-Candal *et al.*, 2015). Las técnicas de imagen PET y MR permiten la adquisición de varios estudios *in vivo* en el mismo animal, limitando el número de ratas necesarias para la obtención de las medidas de hipoxia y del volumen del hematoma durante el seguimiento. Además, las técnicas de imagen molecular permiten cuantificar regiones hipóxicas en determinadas áreas del cerebro. Por otro lado, la hemorragia cerebral es un tipo de ictus cerebral causado por la liberación de sangre dentro del tejido cerebral. Teniendo en cuenta la



fisiopatología de esta enfermedad, no se llevaron a cabo estudios de PET/CT con FMISO en las primeras horas después de la inducción de la hemorragia cerebral. La realización de estudios en estadíos tempranos de la enfermedad podría mostrar una captación inespecífica de FMISO debido a un sangrado activo en el parénquima cerebral. Tampoco se realizaron análisis por inmunofluorescencia a partir de las 24 h posinducción.

3.6 Conclusiones

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio permiten confirmar que es posible la detección de tejido hipóxico *in vivo* mediante el empleo de los estudios FMISO PET/CT, aportando información a lo largo del tiempo de la hemorragia cerebral en un mismo animal. Estos resultados abren la puerta al desarrollo de nuevas terapias que permitan reducir el daño isquémico asociado a un ictus hemorrágico. En consecuencia, el efecto terapéutico de nuevos fármacos sobre la reducción de regiones hipóxicas podría ser evaluado de forma efectiva y sencilla a través de estudios de imagen FMISO PET/CT. Una vez que los resultados obtenidos pudiesen ser confirmados en pacientes, los estudios de PET con FMISO podrían ser empleados como una técnica de seguimiento en ensayos clínicos, ya que los estudios realizados en pacientes con hemorragia cerebral han fracasado en conseguir una mejoría en el pronóstico del paciente (Adeoye & Broderick, 2010; van Asch *et al.*, 2010; Mendelow *et al.*, 2013), y, por lo tanto, se deberían realizar nuevos ensayos clínicos centrados en la reducción del daño isquémico a través de la monitorización de la penumbra hipóxica con FMISO PET. Además, si el crecimiento del hematoma conduce a una hipoxia cerebral, los estudios de PET con FMISO podrían aportar información crucial para evaluar el tejido viable y potencialmente salvable.

Los resultados de este trabajo demuestran la presencia de tejido hipóxico alrededor del hematoma a través de la técnica de imagen PET con FMISO. Estos hallazgos abren la puerta al desarrollo de nuevas terapias que permitan reducir el daño isquémico asociado a un ictus hemorrágico.



3.7 Bibliografía

- Adeoye, O. & Broderick, J. P. (2010). Advances in the management of intracerebral hemorrhage. *Nature Reviews Neurology*, 6: 593–601.
- Baskin, A.; Buchegger, F.; Seimbille, Y.; Ratib, O. & Garibotto, V. (2015). PET Molecular Imaging of Hypoxia in Ischemic Stroke: An Update. *Current Vascular Pharmacology*, 13: 209–217.
- Castillo, J.; Dávalos, A.; Álvarez-Sabín, J.; Pumar, J. M.; Leira, R.; Silva, Y.; Montaner, J. & Kase, C. S. (2002). Molecular signatures of brain injury after intracerebral hemorrhage. *Neurology*, 58: 624–629.
- da Silva-Candal, A.; Vieites-Prado, A.; Gutiérrez-Fernández, M.; Rey, R. I.; Argibay, B.; Mirelman, D.; Sobrino, T.; Rodríguez-Frutos, B.; Castillo, J. & Campos, F. (2015). Blood glutamate grabbing does not reduce the hematoma in an intracerebral hemorrhage model but it is a safe excitotoxic treatment modality. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 35: 1206–1212.
- Davis, S. M.; Broderick, J.; Hennerici, M.; Brun, N. C.; Diringer, M. N.; Mayer, S. A.; Begtrup, K. & Steiner, T.; Recombinant Activated Factor VII Intracerebral Hemorrhage Trial Investigators. (2006). Hematoma growth is a determinant of mortality and poor outcome after intracerebral hemorrhage. *Neurology*, 66: 1175–1181.
- Fernández-Maza, L.; Egea-Guerrero, J. J.; Balcerzyk, M.; Civantos-Jubera, G.; Gordillo-Escobar, E.; Vilches-Arenas, A.; Fernández-Gómez, I.; Parrado-Gallego, A. & Murillo-Cabezas, F. (2018). Rapid and simplified synthesis of [¹⁸F]Fluoromisonidazole and its use in PET imaging in an experimental model of subarachnoid hemorrhage. *Applied Radiation and Isotopes*, 132: 79–84.



- Hirano, T.; Read, S. J.; Abbott, D. F.; Sachinidis, J. I.; Tochon-Danguy, H. J.; Egan, G. F.; Bladin, C. F.; Scott, A. M.; McKay, W. J. & Donnan, G. A. (1999). No evidence of hypoxic tissue on ^{18}F -fluoromisonidazole PET after intracerebral hemorrhage. *Neurology*, 53: 2179–2182.
- Hoffmann, A.; Kunze, R.; Helluy, X.; Milford, D.; Heiland, S.; Bendszus, M.; Pham, M. & Marti, H. H. (2016). High-field MRI reveals a drastic increase of hypoxia-induced microhemorrhages upon tissue reoxygenation in the mouse brain with strong predominance in the olfactory bulb. *PLoS One*, 11: e0148441.
- Lecoq, J.; Tiret, P.; Najac, M.; Shepherd, G. M.; Greer, C. A. & Charpak, S. (2009). Odor-evoked oxygen consumption by action potential and synaptic transmission in the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 29: 1424–1433.
- Lyons, D. G.; Parpaleix, A.; Roche, M. & Charpak, S. (2016). Mapping oxygen concentration in the awake mouse brain. *eLife*, 5: e12024.
- Markus, R.; Reutens, D. C.; Kazui, S.; Read, S.; Wright, P.; Chambers, B. R.; Sachinidis, J. I.; Tochon-Danguy, H. J. & Donnan, G. A. (2003). Topography and temporal evolution of hypoxic viable tissue identified by ^{18}F -fluoromisonidazole positron emission tomography in humans after ischemic stroke. *Stroke*, 34: 2646–2652.
- Mendelow, A. D.; Gregson, B. A.; Rowan, E. N.; Murray, G. D.; Gholkar, A.; Mitchell & P. M.; STICH II Investigators. (2013). Early surgery versus initial conservative treatment in patients with spontaneous supratentorial lobar intracerebral haematomas (STICH II): a randomised trial. *The Lancet*, 382: 397–408.



- Nieto, E.; Delgado, M.; Sobrado, M.; de Ceballos, M. L.; Alajarín, R.; García-García, L.; Kelly, J.; Lizasoain, I.; Pozo, M. A. & Álvarez-Builla, J. (2015). Preliminary research on 1-(4-bromo-2-nitroimidazol-1-yl)-3-[(¹⁸F)]fluoropropan-2-ol as a novel brain hypoxia PET tracer in a rodent model of stroke. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 101: 604–615.
- Read, S. J.; Hirano, T.; Abbott, D. F.; Sachinidis, J. I.; Tochon-Danguy, H. J.; Chan, J. G.; Egan, G. F.; Scott, A. M.; Bladin, C. F.; McKay, W. J. & Donnan, G. A. (1998). Identifying hypoxic tissue after acute ischemic stroke using PET and ¹⁸F-fluoromisonidazole. *Neurology*, 51: 1617–1621.
- Read, S. J.; Hirano, T.; Abbott, D. F.; Markus, R.; Sachinidis, J. I.; Tochon-Danguy, H. J.; Chan, J. G.; Egan, G. F.; Scott, A. M.; Bladin, C. F.; McKay, W. J. & Donnan, G. A. (2000). The fate of hypoxic tissue on ¹⁸F-fluoromisonidazole positron emission tomography after ischemic stroke. *Annals of Neurology*, 48: 228–235.
- Rojas, S.; Herance, J. R.; Abad, S.; Jiménez, X.; Pareto, D.; Ruiz, A.; Torrent, E.; Figueiras, F. P.; Popota, F.; Fernández-Soriano, F. J.; Planas, A. M. & Gispert, J. D. (2011). Evaluation of hypoxic tissue dynamics with ¹⁸F-FMISO PET in a rat model of permanent cerebral ischemia. *Molecular Imaging and Biology*, 13: 558–564.
- Saita, K.; Chen, M.; Spratt, N. J.; Porritt, M. J.; Liberatore, G. T.; Read, S. J.; Levi, C. R.; Donnan, G. A.; Ackermann, U.; Tochon-Danguy, H. J.; Sachinidis, J. I. & Howells, D. W. (2004). Imaging the ischemic penumbra with ¹⁸F-fluoromisonidazole in a rat model of ischemic stroke. *Stroke*, 35: 975–980.



- Sarrafzadeh, A. S.; Nagel, A.; Czabanka, M.; Denecke, T.; Vajkoczy, P. & Plotkin, M. (2010). Imaging of hypoxic-ischemic penumbra with (18 F)-fluoromisonidazole PET/CT and measurement of related cerebral metabolism in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 30: 36–45.
- Silva, Y.; Leira, R.; Tejada, J.; Lainez, J. M.; Castillo, J. & Dávalos, A.; Stroke Project, Cerebrovascular Diseases Group of the Spanish Neurological Society. (2005). Molecular signatures of vascular injury are associated with early growth of intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 36: 86–91.
- Spratt, N. J.; Donnan, G. A.; McLeod, D. D. & Howells, D. W. (2011). ‘Salvaged’ stroke ischaemic penumbra shows significant injury: studies with the hypoxia tracer FMISO. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31: 934–943.
- Steiner, T. & Bosel, J. (2010). Options to restrict hematoma expansion after spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 41: 402–409.
- Takasawa, M.; Beech, J. S.; Fryer, T. D.; Hong, Y. T.; Hughes, J. L.; Igase, K.; Jones, P. S.; Smith, R.; Aigbirhio, F. I.; Menon, D. K.; Clark, J. C. & Baron, J. C. (2007). Imaging of brain hypoxia in permanent and temporary middle cerebral artery occlusion in the rat using 18 F-fluoromisonidazole and positron emission tomography: a pilot study. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 27: 679–689.
- Tang, G.; Wang, M.; Tang, X.; Gan, M. & Luo, L. (2005). Fully automated one-pot synthesis of [18 F]Fluoromisonidazole. *Nuclear Medicine and Biology*, 32: 553–558.
- van Asch, C. J.; Luitse, M. J.; Rinkel, G. J.; van der Tweel, I.; Algra, A. & Klijn, C. J. (2010). Incidence, case fatality, and functional outcome of



intracerebral haemorrhage over time, according to age, sex, and ethnic origin: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurology*, 9: 167–176.

Zenonos, G. & Kim, J. E. (2010). ^{18}F -fluoromisonidazole PET/CT and related gauges of cerebral metabolism identify salvageable tissue in ischemic penumbra following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*, 66: N13–N15.

CAPÍTULO 4

Detección longitudinal de hipoxia en un modelo de enfermedad arterial periférica a través de estudios de imagen [^{18}F]FMISO PET



4.1 Introducción

4.1.1 Enfermedad arterial periférica

La Enfermedad Arterial Periférica (EAP) es una patología que se basa en la obstrucción parcial o total de una o más arterias periféricas. La oclusión aguda de la irrigación arterial de una extremidad se produce cuando el tejido es privado bruscamente de su perfusión arterial, pudiendo originarse como resultado de oclusiones embólicas o trombosis *in situ*. La EAP está asociada a muchos de los mismos factores de riesgo que las enfermedades cerebrovascular y cardiovascular ateroscleróticas, siendo muy frecuente en edades avanzadas. Esta patología vascular afecta a la calidad de vida de los pacientes, siendo necesaria la revascularización periférica y, en el peor de los casos, la amputación de la extremidad (Kumbhani *et al.*, 2014; Kullo & Rooke, 2016). Además, la EAP está asociada a un riesgo muy elevado de mortalidad por enfermedad coronaria y cerebrovascular (Agnelli *et al.*, 2020). La EAP está causada por la aterosclerosis en más del 90% de los casos, una enfermedad sistémica que afecta a todas las arterias del cuerpo y que se inicia como una placa (colesterol y plaquetas, entre otros productos) que, a medida que crece, obstruye el flujo arterial. El resultado de la aterosclerosis es la aparición de tejido isquémico, inflamación y restricción de la perfusión, procesos patológicos que tienden a ser compensados a través de la neovascularización (arteriogénesis principalmente y angiogénesis en menor medida). Los procesos bioquímicos asociados a la EAP han sido ampliamente estudiados en modelos animales de isquemia vascular periférica (Limbourg *et al.*, 2009; Krishnasamy *et al.*, 2017), que se basan en la obstrucción de la ramificación superficial de la arteria femoral con el objetivo de provocar una isquemia y una restricción de la perfusión, reproduciendo fielmente los procesos fisiopatológicos que tienen lugar en los pacientes con EAP. Las investigaciones preclínicas realizadas con estos modelos animales facilitan su traslación a la clínica (Hendrikx *et al.*, 2016b). Sin embargo, las limitaciones en la evaluación longitudinal de los procesos bioquímicos que tienen lugar en la EAP han dificultado enormemente su relevancia clínica, impidiendo la traslación eficiente de los hallazgos en las investigaciones preclínicas a los pacientes. Dichas limitaciones se deben a que



los procesos bioquímicos han sido tradicionalmente investigados empleando técnicas *ex vivo* que requieren la toma de muestras tisulares, prohibiendo la realización de estudios longitudinales en animales vivos.

4.1.2 PET y SPECT en enfermedad arterial periférica

En los últimos años, la imagen molecular *in vivo* ha recibido una atención creciente como una alternativa a procedimientos invasivos. El uso de técnicas de imagen molecular preclínica similares a las que se emplean en pacientes permitirá acelerar la traslación de las investigaciones realizadas en modelos animales a los pacientes (Aguiar *et al.*, 2019). La Tomografía por Emisión de Positrones (PET) y la Tomografía por Emisión de Fotón Simple (SPECT) son las técnicas de imagen más empleadas para estudiar procesos bioquímicos en animales vivos, al proporcionar una gran sensibilidad a través del empleo de moléculas marcadas con radioisótopos denominados radiofármacos. En particular, el uso de las técnicas de imagen PET y SPECT para la visualización *in vivo* de la isquemia y posterior neovascularización en las extremidades inferiores ha experimentado un incremento en los últimos años a través del empleo de radiofármacos que permiten identificar los procesos bioquímicos que tienen lugar en la EAP.

La gran mayoría de los radiofármacos PET y SPECT empleados en modelos animales de EAP han sido desarrollados para estudiar procesos de neovascularización, tanto de arteriogénesis como de angiogénesis. En primer lugar, se emplearon diferentes radiotrazadores de perfusión como indicadores de arteriogénesis en modelos animales de EAP, ya que es necesario el desarrollo de radiofármacos específicos de arteriogénesis multifactoriales (Orbay *et al.*, 2013; Hendrikx *et al.*, 2016b; Aguilar *et al.*, 2019). Los estudios de imagen SPECT con ^{201}Tl fueron empleados para monitorizar a lo largo del tiempo la perfusión tras la oclusión de la arteria femoral en un modelo porcino, demostrando su utilidad para la identificación de procesos de arteriogénesis en las extremidades inferiores (Stacy *et al.*, 2014). Además, los radiotrazadores [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Sestamibi ([$^{99\text{m}}\text{Tc}$]MIBI) y [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tetrofosmina ([$^{99\text{m}}\text{Tc}$]TTF) son



moléculas catiónicas lipofílicas que se distribuyen en el tejido muscular de forma proporcional a la perfusión sanguínea. El uso de la técnica SPECT con [^{99m}Tc]MIBI permitió detectar la recuperación de la perfusión tras la oclusión de la arteria femoral en un modelo murino antes que la imagen láser Doppler (Hendrikx *et al.*, 2016a). La técnica de imagen PET con [^{13}N]Amonio fue empleada también para evaluar los cambios que tenían lugar en la perfusión a lo largo del tiempo tras la oclusión de la arteria ilíaca en un modelo de ratón (Peñuelas *et al.*, 2007). Por otro lado, existen radiofármacos de angiogénesis disponibles, estando la gran mayoría de ellos enfocados a integrinas $\alpha\text{v}\beta 3$ y receptores VEGF. A pesar de que la angiogénesis presenta un papel menor que la arteriogénesis en la restauración de la perfusión en la EAP, su estudio a través del empleo de radiofármacos específicos ha aportado información valiosa sobre la fisiopatología de la EAP (Hendrikx *et al.*, 2016b). El estudio de la integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ se realizó a través del empleo de péptidos RGD (compuestos por arginina, glicina y ácido aspártico) marcados con ^{99m}Tc para la adquisición de imágenes SPECT. Los resultados obtenidos en modelos animales en roedores mostraron la localización de células endoteliales en aquellas regiones que presentaban un incremento en la angiogénesis (Hua *et al.*, 2005; Dobrucki *et al.*, 2009a). Por otro lado, el empleo de receptores VEGF marcados con ^{111}In para la adquisición de imágenes SPECT (Lu *et al.*, 2003) y con ^{64}Cu para la adquisición de imágenes PET (Willmann *et al.*, 2008), permitieron evaluar procesos angiogénicos a lo largo del tiempo en modelos experimentales de lagomorfo y roedor, respectivamente. En un estudio reciente, el empleo de anticuerpos monoclonales marcados con ^{64}Cu para imagen PET permitió monitorizar la evolución de la angiogénesis en un modelo murino (Ferreira *et al.*, 2018).

La imagen PET también permite identificar procesos inflamatorios, estudiar la evolución de la aterosclerosis y evaluar la respuesta a un determinado tratamiento en pacientes con EAP (Rudd *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2008; Pande *et al.*, 2011). Además de lo mencionado anteriormente, la imagen PET permite investigar la viabilidad tisular (Ghosh *et al.*, 2010) ya que el



metabolismo glucídico puede ser evaluado a través del uso de [^{18}F]Fluorodesoxiglucosa ([^{18}F]FDG), un radiofármaco análogo de la glucosa que se acumula en las células metabólicamente activas que utilizan glucosa como fuente principal de energía, aumentando su acúmulo en áreas ricas en macrófagos y células endoteliales. La PET con [^{18}F]FDG ha sido ampliamente utilizada para evaluar la inflamación en modelos animales de isquemia vascular periférica (Sun *et al.*, 2013; Thackeray *et al.*, 2014; Bankstahl *et al.*, 2017) y, de manera más reciente, para validar nuevas moléculas como trazadores de angiogénesis en modelos murinos de isquemia vascular periférica (Ferreira *et al.*, 2018; Moyon *et al.*, 2018).

4.2 Justificación y objetivos

Los estudios mencionados anteriormente mostraron que la inflamación tiene lugar un par de días después de la oclusión arterial y que es seguida por una fase de recuperación de la perfusión, demostrando la existencia de una relación entre los procesos de inflamación y perfusión. Además, la respuesta inicial a la restricción del flujo sanguíneo y, por lo tanto, a la disminución del oxígeno disponible, se basa en la liberación de factores inducibles por hipoxia y mediadores inflamatorios para provocar la vasodilatación, aumentar la permeabilidad vascular (y, por consiguiente, el acúmulo de monocitos y macrófagos) y, finalmente, dar lugar a nuevos capilares alrededor de las áreas isquémicas. Debido a esto, la hipoxia generada tras la restricción de la perfusión es un potente estimulante de la neovascularización (Dobrucki *et al.*, 2009b) y ha sido ampliamente estudiada en modelos animales de EAP a través del empleo de técnicas *ex vivo* (Kajiwara *et al.*, 2009; Rishi *et al.*, 2015; Zaccagnini *et al.*, 2019). A pesar de que todas estas investigaciones han mostrado que la hipoxia debería ser considerada como el principal objetivo para el diagnóstico y la monitorización del tratamiento de la EAP, su detección *in vivo* en modelos animales de isquemia arterial periférica no ha sido explorada.



La finalidad de este estudio fue evaluar el uso del radiofármaco [^{18}F]Fluoromisonidazol ([^{18}F]FMISO), un trazador de hipoxia para imagen de PET que ha sido ampliamente utilizado en cáncer (Rajendran & Krohn, 2015; Tamaki & Hirata, 2016), ictus cerebral (Baskin *et al.*, 2015) e infarto de miocardio (Handley *et al.*, 2011). En este estudio también se emplearon radiofármacos de metabolismo ([^{18}F]FDG) y perfusión ([$^{99\text{m}}\text{Tc}$]TTF) para investigar de forma longitudinal fenómenos de hipoxia, inflamación y perfusión en un modelo de enfermedad arterial periférica en rata.

4.3 Material y métodos

4.3.1 Modelo de enfermedad arterial periférica en rata

Las 29 ratas macho de la cepa Sprague Dawley con un peso inicial de 297.9 ± 51.3 g fueron suministradas por el Animalario de Producción de la Universidad de Santiago de Compostela (USC). Los animales sufrieron un período de aclimatación en la sala de estabulación de un mínimo de 5 días antes de la realización de la cirugía. Las ratas fueron estabuladas en cubetas individuales en una sala con ciclos de día/noche de 12 h a una temperatura media de 22 ± 2 °C y una humedad de 65 ± 5 %, con acceso a agua y alimentadas *ad libitum*.

El modelo de enfermedad arterial periférica en rata fue inducido a través de la oclusión de las arterias femoral, epigástrica, poplítea, safena e ilíaca (ver Figura 4.1). Para la generación del modelo de enfermedad arterial periférica, los animales fueron anestesiados con isoflurano al 3% en una cámara de inducción. Posteriormente, fueron colocados en decúbito supino en una mesa de cirugía equipada con manta calefactora y se procedió a la depilación del área quirúrgica (muslo de la extremidad posterior izquierda y bajo vientre del animal) y a la desinfección de la piel con clorhexidina. A continuación, se realizó una incisión inguinal en la extremidad posterior con un bisturí, tras la cual se procedió a la obstrucción de la arteria femoral a través del empleo de sutura de 6 ceros y de sus colaterales mediante electrocauterización. Posteriormente, se bloquearon también las arterias epigástrica, poplítea y



safena con sutura de 7 ceros. Una vez finalizada la cirugía a nivel de la extremidad posterior izquierda del animal, se realizó una laparotomía en la cual se empleó un separador (retractor palpebral) y se procedió al bloqueo de la arteria ilíaca común con sutura de 6 ceros y de sus colaterales mediante electrocauterización. Una vez finalizadas las oclusiones, se extirpó la sección arterial bloqueada y se procedió al cierre de ambas incisiones empleando sutura de 6 ceros en la extremidad posterior y de 5 ceros en el abdomen del animal, y a su desinfección con clorhexidina. Finalmente, los animales fueron devueltos a sus cubetas con completa disponibilidad a agua y comida. Todas las cirugías fueron realizadas en condiciones similares de temperatura ambiental, con una duración estimada de 30 ± 10 min. El animal permaneció anestesiado durante todo el procedimiento con isoflurano al 2.5-2% y su temperatura corporal se mantuvo a 37 ± 0.5 °C a través del empleo de una manta calefactora. Se procedió a vigilar el estado del animal durante todo el estudio para detectar signos de dolor o sufrimiento.

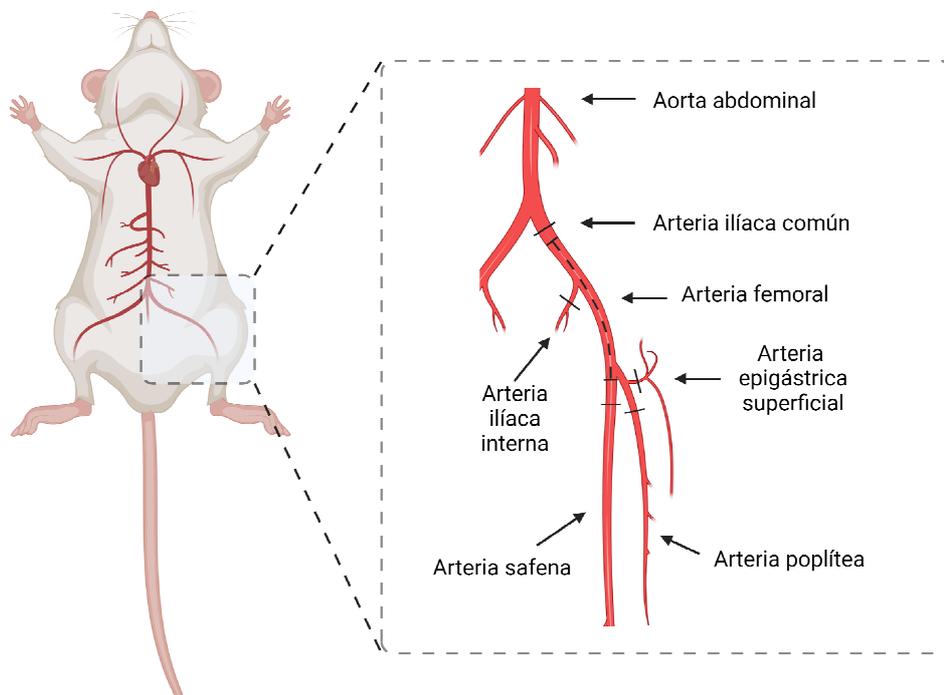


Figura 4.1. Esquema de la generación del modelo animal de enfermedad arterial periférica. Las líneas rectas representan los lugares de oclusión de las arterias y sus colaterales. La línea



curva discontinua simboliza la sección arterial extirpada. La Figura fue creada con BioRender (<https://biorender.com>).

4.3.2 Diseño del estudio

Los estudios de PET/CT y SPECT fueron realizados para evaluar fenómenos de hipoxia, inflamación y perfusión en un modelo de enfermedad arterial periférica en rata. El diseño experimental de los estudios de imagen aparece representado en la Figura 4.2. El protocolo llevado a cabo para la adquisición de los estudios de imagen se detalla en el apartado correspondiente.

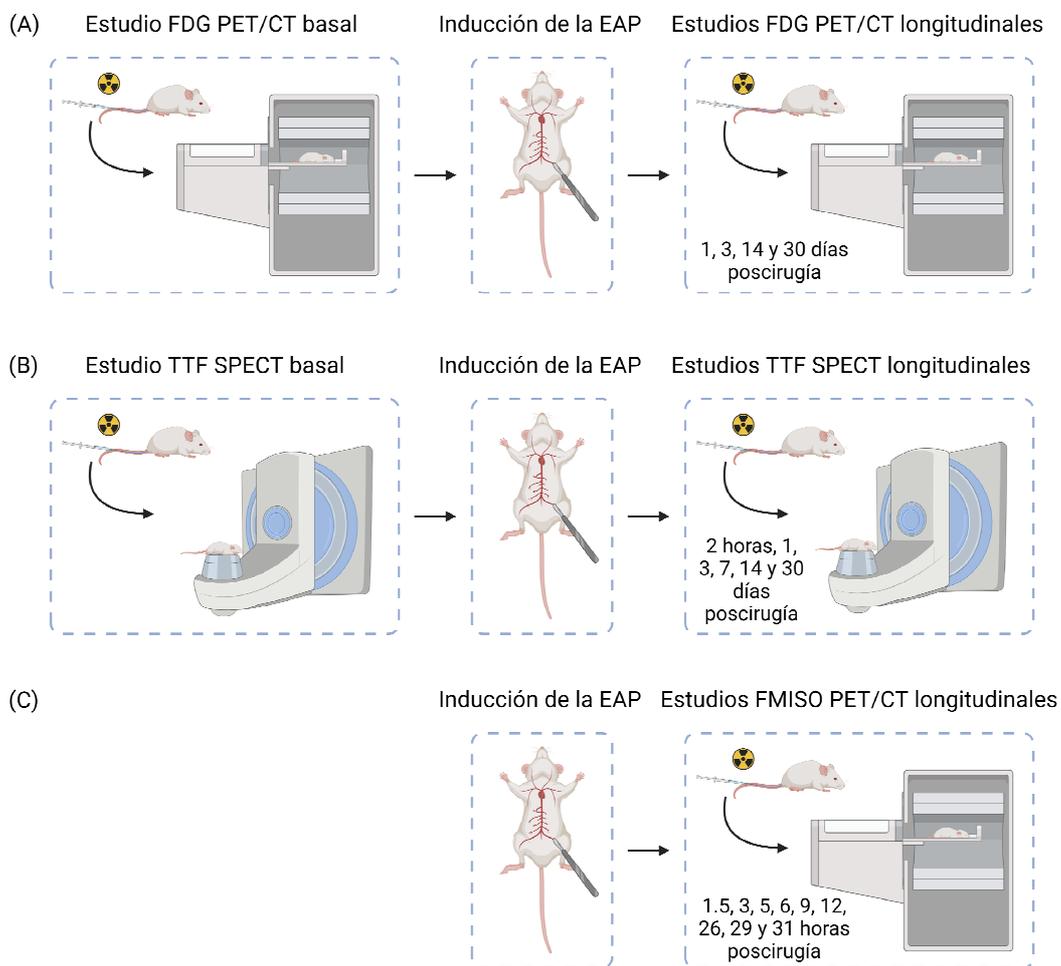


Figura 4.2. Diseño experimental de los estudios de imagen (A) [^{18}F]FDG PET/CT, (B) [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]TTF SPECT y (C) [^{18}F]FMISO PET/CT adquiridos en el modelo animal de enfermedad arterial periférica. La Figura fue creada con BioRender (<https://biorender.com>).



4.3.3 Radiosíntesis de FDG

La síntesis automatizada de FDG se llevó a cabo en módulos Tracerlab MX-FDG (GE Healthcare) a través del uso de un casete desechable y de reactivos. Dicha síntesis tiene lugar a través de la sustitución nucleofílica del precursor triflato de manosa (1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-O-trifluorometanosulfonilo- β -D-manopiranos), seguida de una hidrólisis básica (Rahmani *et al.*, 2017). La solución de FDG fue purificada a través de su paso por un cartucho tC18 (Sep-Pak Plus, Waters) y un cartucho de ALN (Sep-Pak Plus, Waters) con el objetivo de retener cualquier residuo del ión [^{18}F]Fluoruro sin reaccionar. Todas las sustancias químicas, los reactivos y los casetes fueron suministrados por ABX advanced biochemical compounds GmbH. El agua enriquecida con Oxígeno-18 ($[^{18}\text{O}_2]\text{H}_2\text{O}$) se adquirió a CortecNet (París, Francia).

4.3.4 Preparación de TTF

La preparación de TTF fue realizada en un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ con un agente reactivo (Myoview GE Healthcare). La obtención de TTF está basada en el estado oxidativo del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ en presencia de cloruro de estaño. El control de calidad se realiza a través de una cromatografía de capa fina que se evalúa en un radiocromatógrafo.

4.3.5 Radiosíntesis de FMISO

La síntesis de FMISO se llevó a cabo en módulos Tracerlab MX-FDG (GE Healthcare) a través del uso de un casete desechable y de reactivos. Dicha síntesis se basa en la sustitución nucleofílica del grupo tosilo en el precursor 1-(2'-nitro-1'-imidazolil)-2-O-tetrahidropiranil-3-O-tolueno-sulfonilpropanodiol (NITTP), seguida de una hidrólisis ácida del grupo 2-tetrahidropiranil (Tang *et al.*, 2005). La purificación del producto final se realizó en 3 cartuchos de SPE. Los reactivos, los casetes y la ruta de síntesis fueron suministrados por ABX advanced biochemical compounds GmbH.



4.3.6 Protocolo de imágenes PET/CT y SPECT

Los estudios de PET/CT fueron adquiridos en equipos de imagen preclínicos diseñados para pequeños animales. Dichos equipos presentan una buena resolución espacial y una elevada sensibilidad con el objetivo de poder obtener imágenes moleculares en roedores con una calidad similar a las imágenes obtenidas en pacientes.

Los estudios de PET/CT fueron adquiridos en un equipo de imagen preclínico microPET/CT Albira Bruker (Bruker Biospin, Woodbridge, Connecticut, United States) que permite obtener tanto imágenes funcionales como anatómicas. Por un lado, el sistema PET está formado por un detector de 3 anillos con 8 módulos que se distribuyen formando un octágono. Cada módulo contiene cristales de oxiortosilicato de lutecio ytrio (LYSO) y un tubo fotomultiplicador multiánodo (MAPMTs). Los anillos de detectores presentan un campo de visión o FOV axial de 14.8 cm y un FOV transaxial de 8 cm. La resolución espacial de las imágenes PET es de 1.2 mm y la sensibilidad es de 100 kcps/MBq en el centro del FOV. Por otro lado, el sistema CT está compuesto por un tubo de rayos X de 50 kVp y un detector de ioduro de cesio. La CT presenta un FOV axial y transaxial de 5.2 cm, generando imágenes con una resolución espacial de aproximadamente 90 μm .

Los estudios FDG PET/CT fueron adquiridos para investigar los procesos inflamatorios asociados a una isquemia vascular periférica. Con este objetivo, el radiofármaco fue administrado el día antes de la cirugía (basal) y a las 24 h, 3 días, 14 días y 30 días posoclusión en 8 ratas. Para la realización de los estudios de imagen PET/CT con FDG, los animales fueron anestesiados con isoflurano al 3% en una cámara de inducción. Posteriormente, las ratas fueron conectadas a una mascarilla al 2.5-2% de isoflurano y se procedió a la inyección intravenosa de 12.98 ± 1.50 MBq de FDG en la vena de la cola de los roedores. A continuación, los animales fueron devueltos a sus cubetas y permanecieron en las mismas durante 35 min con acceso a agua y comida. Una vez transcurrido dicho tiempo, los animales fueron anestesiados de nuevo



y fueron posicionados en decúbito supino en la cama del equipo preclínico. Finalmente, se procedió a la adquisición de las imágenes FDG PET/CT a los 45 min posinyección (45.50 ± 2.35 min), con una duración de 10 min para la PET y otros 20 min para la CT. Una vez finalizada la adquisición de las imágenes de las extremidades inferiores, los animales fueron pesados y devueltos a sus cubetas. Las imágenes PET fueron reconstruidas empleando un algoritmo máximo de probabilidad de expectativa de maximización (MLEM) con 12 iteraciones y un tamaño de píxel de $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ mm³. Se realizaron correcciones de dispersión y eventos aleatorios en la reconstrucción de las imágenes PET, pero no se llevó a cabo la corrección de atenuación. El estudio CT fue centrado en las extremidades inferiores del animal correspondiente, y los parámetros del protocolo de adquisición fueron 35 kV de tensión y 200 μ A de intensidad con 250 proyecciones por cama.

Los estudios SPECT fueron adquiridos en una gammacámara Siemens Orbiter Digrac 7500 (Siemens Medical Solutions, Inc., USA) empleando un colimador de baja energía. La evaluación de estudios de imagen realizados previamente en roedores (Aguilar *et al.*, 2014a; Aguilar *et al.*, 2014b; Silva-Rodríguez *et al.*, 2015) muestra que la resolución espacial de las imágenes SPECT obtenidas en este equipo es de 1.2 mm y su sensibilidad es de 150 cps/MBq en el centro del FOV.

Los estudios TTF SPECT fueron adquiridos para investigar la perfusión en el modelo animal de isquemia vascular periférica. Con este objetivo, el radiofármaco fue administrado el día antes de la cirugía (basal) y a las 2 h, 24 h, 3 días, 7 días, 14 días y 30 días posoclusión en 8 ratas. Para la realización de los estudios de imagen SPECT con TTF, los animales fueron anestesiados con isoflurano al 3% en una cámara de inducción. Posteriormente, las ratas fueron conectadas a una mascarilla al 2.5-2% de isoflurano y se procedió a la inyección intravenosa de 12.97 ± 1.13 MBq de TTF en la vena de la cola de los roedores. Inmediatamente después, los animales fueron colocados en decúbito prono sobre el colimador y se centraron sus extremidades inferiores en el



centro del mismo. Finalmente, se procedió a la adquisición de las imágenes SPECT a los 2 min posinyección, con una duración de 15 min. Una vez finalizada la adquisición de las imágenes de perfusión de cuerpo entero, los animales fueron pesados y devueltos a sus cubetas. Las imágenes SPECT planares fueron adquiridas en la gammacámara constituida por un único detector y empleando un colimador diseñado para fotones de baja energía (140 keV) y con una elevada resolución espacial. Los datos fueron adquiridos en modo lista con el objetivo de realizar correcciones de energía, linealidad espacial y uniformidad.

Los estudios FMISO PET/CT fueron adquiridos para investigar la presencia de la hipoxia en una isquemia vascular periférica. Con este objetivo, el radiofármaco fue administrado a las 1.5, 3, 5, 6, 9, 12, 26, 29 y 31 horas posoclusión en 13 ratas. Cada animal involucrado en el experimento fue escaneado a diferentes tiempos poscirugía con el objetivo de realizar un estudio exhaustivo de la evolución de la hipoxia tras la oclusión arterial. Para la realización de los estudios de imagen PET/CT con FMISO, los animales fueron anestesiados con isoflurano al 3% en una cámara de inducción. Posteriormente, las ratas fueron conectadas a una mascarilla al 2.5-2% de isoflurano y se procedió a la inyección intravenosa de 15.71 ± 3.09 MBq de FMISO en la vena de la cola de los roedores. A continuación, los animales fueron devueltos a sus cubetas y permanecieron en las mismas durante 110 min con acceso a agua y comida. Una vez transcurrido dicho tiempo, los animales fueron anestesiados de nuevo y fueron posicionados en decúbito supino en la cama del equipo preclínico. Finalmente, se procedió a la adquisición de las imágenes FMISO PET/CT a los 120 min posinyección (Spratt *et al.*, 2011), con una duración de 10 min para la PET y otros 20 min para la CT. Una vez finalizada la adquisición de las imágenes de las extremidades inferiores, los animales fueron pesados y devueltos a sus cubetas. Las imágenes PET fueron reconstruidas empleando un algoritmo máximo de probabilidad de expectativa de maximización (MLEM) con 12 iteraciones y un tamaño de píxel de $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ mm³. Se realizaron correcciones de



dispersión y eventos aleatorios en la reconstrucción de las imágenes PET, pero no se llevó a cabo la corrección de atenuación. El estudio CT fue centrado en las extremidades inferiores del animal correspondiente, y los parámetros del protocolo de adquisición fueron 35 kV de tensión y 200 μ A de intensidad con 250 proyecciones por cama.

Una vez finalizado el estudio, todos los animales involucrados fueron sacrificados a través de la inyección intracardíaca de 5 mL de cloruro potásico.

4.3.7 Análisis de las imágenes PET/CT y SPECT

Las imágenes FDG PET/CT se emplearon para realizar un análisis cuantitativo de la captación del radiotrazador en las extremidades inferiores de los animales. Las imágenes FDG PET y CT fueron automáticamente fusionadas empleando el software de reconstrucción del equipo Albira microPET/CT. El acúmulo periférico del trazador FDG fue estimado a través del empleo de dos regiones de interés (ROIs) diseñadas manualmente en cada una de las extremidades posteriores: región proximal (localizada en el muslo del animal) y región distal (centrada en el pie de la rata). Cada ROI fue dibujada sobre las imágenes CT usando una geometría esférica ($11 \times 14 \times 12 \text{ mm}^3$ en el caso de la región proximal y $20 \times 40 \times 20 \text{ mm}^3$ en el caso de la región distal) y se centró en la zona de máxima captación de trazador en cada una de las extremidades posteriores. Finalmente, las ROIs fueron trasladadas a las imágenes PET y se calculó la proporción entre la captación máxima de FDG en la extremidad posterior izquierda u operada y la extremidad posterior derecha o sana (proporción I/D) para cada una de las regiones de interés y a lo largo del tiempo. El análisis de las imágenes PET/CT se llevó a cabo empleando el software Amide (<http://amide.sourceforge.net>).

Las imágenes TTF SPECT se emplearon para llevar a cabo un análisis cuantitativo de la perfusión en las extremidades inferiores de los animales. El acúmulo periférico del trazador TTF fue estimado a través del empleo de dos regiones de interés (ROIs) diseñadas manualmente en cada una de las



extremidades posteriores: región proximal (localizada en el muslo del animal) y región distal (centrada en el pie de la rata). Cada ROI fue dibujada usando una geometría esférica ($9 \times 8 \text{ mm}^3$ en el caso de la región proximal y $5 \times 10 \text{ mm}^3$ en el caso de la región distal). Finalmente, se calculó la proporción entre la captación media de TTF en la extremidad posterior izquierda u operada y la extremidad posterior derecha o sana (proporción I/D) para cada una de las regiones de interés y a lo largo del tiempo. El análisis de las imágenes SPECT se llevó a cabo empleando el software Amide (<http://amide.sourceforge.net>).

Las imágenes FMISO PET/CT se emplearon para efectuar un análisis cuantitativo de la captación del radiotrazador en las extremidades inferiores de los animales. Las imágenes FMISO PET y CT fueron automáticamente fusionadas empleando el software de reconstrucción del equipo Albira microPET/CT. El acúmulo periférico del trazador FMISO fue estimado a través del empleo de dos regiones de interés (ROIs) diseñadas manualmente en cada una de las extremidades posteriores: región proximal (localizada en el muslo del animal) y región distal (centrada en el pie de la rata). Cada ROI fue dibujada sobre las imágenes CT usando una geometría esférica ($20 \times 20 \times 20 \text{ mm}^3$ en el caso de la región proximal y $10 \times 10 \times 40 \text{ mm}^3$ en el caso de la región distal) y se centró en la zona de máxima captación de trazador en cada una de las extremidades posteriores. Finalmente, las ROIs fueron trasladadas a las imágenes PET y se calculó la proporción entre la captación máxima de FMISO en la extremidad posterior izquierda u operada y la extremidad posterior derecha o sana (proporción I/D) para cada una de las regiones de interés y a lo largo del tiempo. Además de lo mencionado previamente, se estimó el volumen hipóxico en el muslo de la extremidad operada a través de la delineación de la región de máxima captación radiactiva, cuyos valores estaban comprendidos en un rango entre los 0.078 y 0.02 MBq. El análisis de las imágenes PET/CT se llevó a cabo empleando el software Amide (<http://amide.sourceforge.net>).



4.4 Resultados

4.4.1 Estudios de inflamación FDG PET/CT

La Figura 4.3A muestra las imágenes moleculares FDG PET fusionadas con las imágenes estructurales CT adquiridas en un animal con enfermedad arterial periférica a lo largo del tiempo. Las extremidades inferiores de los animales fueron visualizadas a través de la imagen CT. Dichas imágenes muestran la presencia de procesos inflamatorios en la extremidad posterior izquierda correspondiendo con áreas que presentan un mayor acúmulo de FDG, especialmente a los 3 y 14 días posoclusión. La alta captación de FDG presente en la extremidad operada no tiene lugar ni en la condición basal ni en la extremidad contralateral. El análisis cuantitativo de las imágenes FDG PET/CT permitió realizar un seguimiento de la inflamación presente en la extremidad operada con respecto a la sana a lo largo del tiempo. La Figura 4.3B plasma la proporción de la captación de FDG en la región distal (pie) de la extremidad operada con respecto a la sana. Por otro lado, la Figura 4.3C expone la proporción de la captación de FDG en la región proximal (muslo) de la extremidad operada con respecto a la control. Con respecto a la región distal, se produce un descenso de la captación de FDG en las primeras 24 horas después de la oclusión arterial en la extremidad operada con respecto a la sana. A partir de ese momento, el metabolismo del pie afectado aumenta lentamente hasta recuperar sus valores basales. Por otra parte, en la región proximal se produce un incremento de la captación de FDG en la extremidad izquierda a los 3 días, que se mantiene hasta los 14 y finalmente disminuye para recuperar sus valores iniciales a los 30 días posoclusión. De forma generalizada, los resultados mostraron una disminución del metabolismo en la extremidad intervenida a las 24 horas posoclusión y posteriormente se observó un aumento del mismo a partir de los 3 días, siendo mayor en el caso de la región proximal que en la distal.

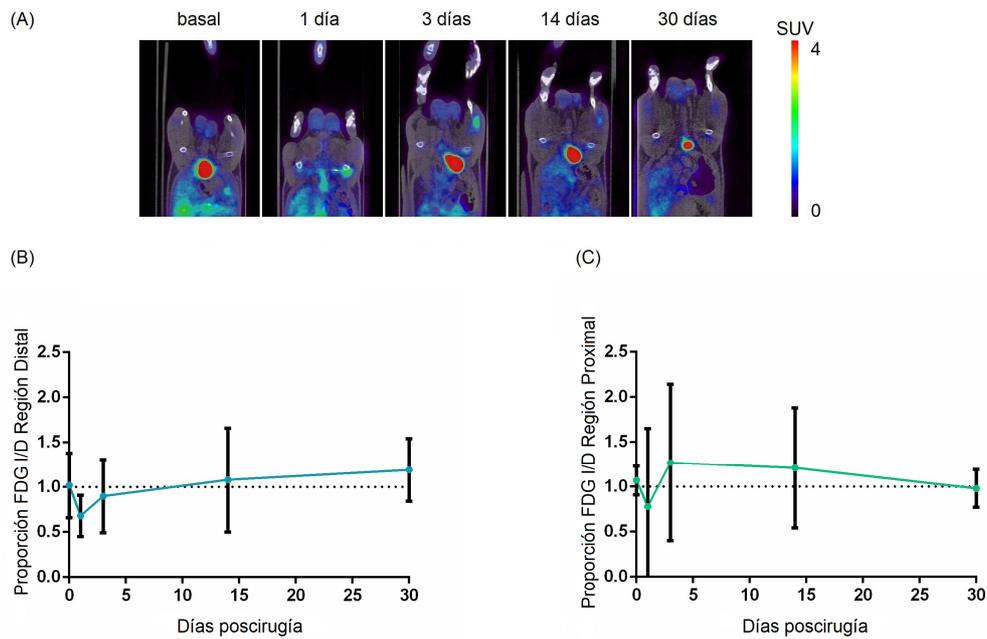


Figura 4.3. (A) Imágenes FDG PET/CT adquiridas en una rata con enfermedad arterial periférica a lo largo del tiempo. La actividad radiactiva se encuentra codificada en una escala de colores que va desde el color azul (bajo acúmulo de FDG) al rojo (elevado acúmulo de FDG). Es necesario destacar la elevada captación de FDG en la extremidad operada en los días 3-14 posoclusión. (B) Proporción de la captación de FDG en la región distal de la extremidad operada con respecto a la extremidad sana. (C) Proporción de la captación de FDG en la región proximal de la extremidad operada con respecto a la extremidad sana.

4.4.2 Estudios de perfusión TTF SPECT

La Figura 4.4A presenta las imágenes moleculares TTF SPECT adquiridas en un animal con enfermedad arterial periférica a lo largo del tiempo. Las imágenes muestran una clara reducción de la perfusión sanguínea en la extremidad posterior izquierda del animal con respecto a la extremidad contralateral. Dicha decadencia es detectable tanto en la región proximal como en la distal de la extremidad operada, siendo especialmente importante en las primeras 72 horas después de la oclusión. Posteriormente, se produce una recuperación espontánea de la perfusión a los 30 días. El análisis cuantitativo de las imágenes TTF SPECT permitió realizar un seguimiento de la perfusión de la extremidad operada con respecto a la sana a lo largo del tiempo. La



Figura 4.4B plasma la proporción de la captación de TTF en la región distal (pie) de la extremidad operada con respecto a la sana. Por otro lado, la Figura 4.4C expone la proporción de la captación de TTF en la región proximal (muslo) de la extremidad operada con respecto a la control. Con respecto a la región distal, se produce un drástico descenso de la captación de TTF en los primeros 3 días, aumentando ligeramente con el paso del tiempo. Sin embargo, dicho incremento no alcanza los valores obtenidos en la condición basal (antes de la oclusión femoral) o los detectados en la extremidad control. Por otro lado, en la región proximal se aprecia un claro descenso de la perfusión en las primeras 24 horas, aumentando de forma progresiva posteriormente y recuperando sus valores a partir de los 7 días. Tal y como se apreciaba en las imágenes SPECT, los datos cuantitativos muestran un notable descenso de la perfusión global de la extremidad posterior izquierda en las primeras 24 horas después de la cirugía.

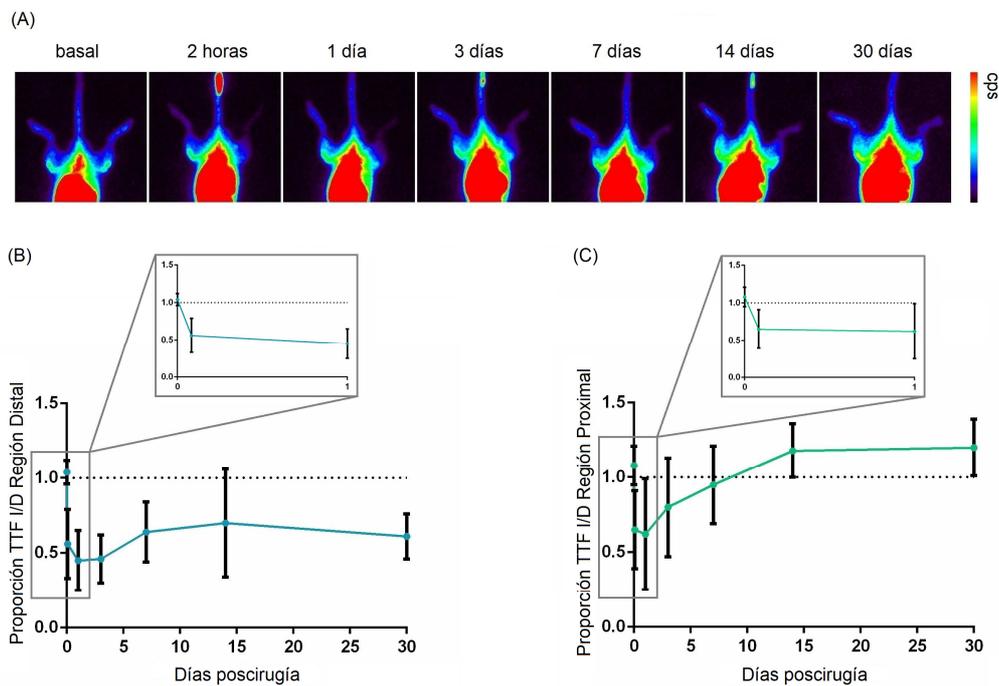


Figura 4.4. (A) Imágenes TTF SPECT adquiridas en una rata con enfermedad arterial periférica a lo largo del tiempo. La actividad radiactiva se encuentra codificada en una escala de colores que va desde el color azul (bajo acúmulo de TTF) al rojo (elevado acúmulo de TTF). Es necesario destacar la baja captación de TTF en la extremidad operada entre las 2 h y los 7 días posocclusión. (B) Proporción de la captación de TTF en la región distal de la extremidad



operada con respecto a la extremidad sana. (C) Proporción de la captación de TTF en la región proximal de la extremidad operada con respecto a la extremidad sana. Los valores de perfusión fueron expresados como la actividad radiactiva medida en la región correspondiente con respecto al tiempo de adquisición (cps).

4.4.3 Estudios de hipoxia FMISO PET/CT

La Figura 4.5A muestra las imágenes moleculares FMISO PET fusionadas con las imágenes estructurales CT adquiridas en un animal con enfermedad arterial periférica a lo largo del tiempo. Se detectaron fenómenos de hipoxia en las imágenes PET/CT correspondiendo con áreas que presentaban un mayor acúmulo de FMISO, especialmente en las primeras horas después de la oclusión arterial. La elevada captación de FMISO presente en la extremidad operada no tiene lugar ni en la condición basal ni en la extremidad contralateral, confirmando que se trata de una captación específica. En una fase más temprana, el trazador de hipoxia aparece distribuido por todo el muslo de la extremidad operada mientras que, según va pasando el tiempo, termina delimitando la región proximal de la extremidad posterior. El análisis cuantitativo de las imágenes FMISO PET/CT permitió realizar un seguimiento de la evolución de la hipoxia en la extremidad operada con respecto a la sana a lo largo del tiempo. La Figura 4.5B plasma la proporción de la captación de FMISO en la región distal (pie) de la extremidad operada con respecto a la sana. Por otro lado, la Figura 4.5C expone la proporción de la captación de FMISO en la región proximal (muslo) de la extremidad operada con respecto a la control. Con respecto a la región distal, se detecta la máxima captación de FMISO a las 1.5 horas posocclusión, desapareciendo de forma drástica a las 3 horas. Por otro lado, en la región proximal también se detecta el máximo acúmulo de FMISO a las 1.5 horas, disminuyendo lentamente hasta desaparecer a las 26 horas. De esta forma, los resultados muestran que la máxima captación de FMISO tiene lugar a las 1.5 horas poscirugía en la extremidad posterior izquierda, disminuyendo posteriormente hasta su desaparición.

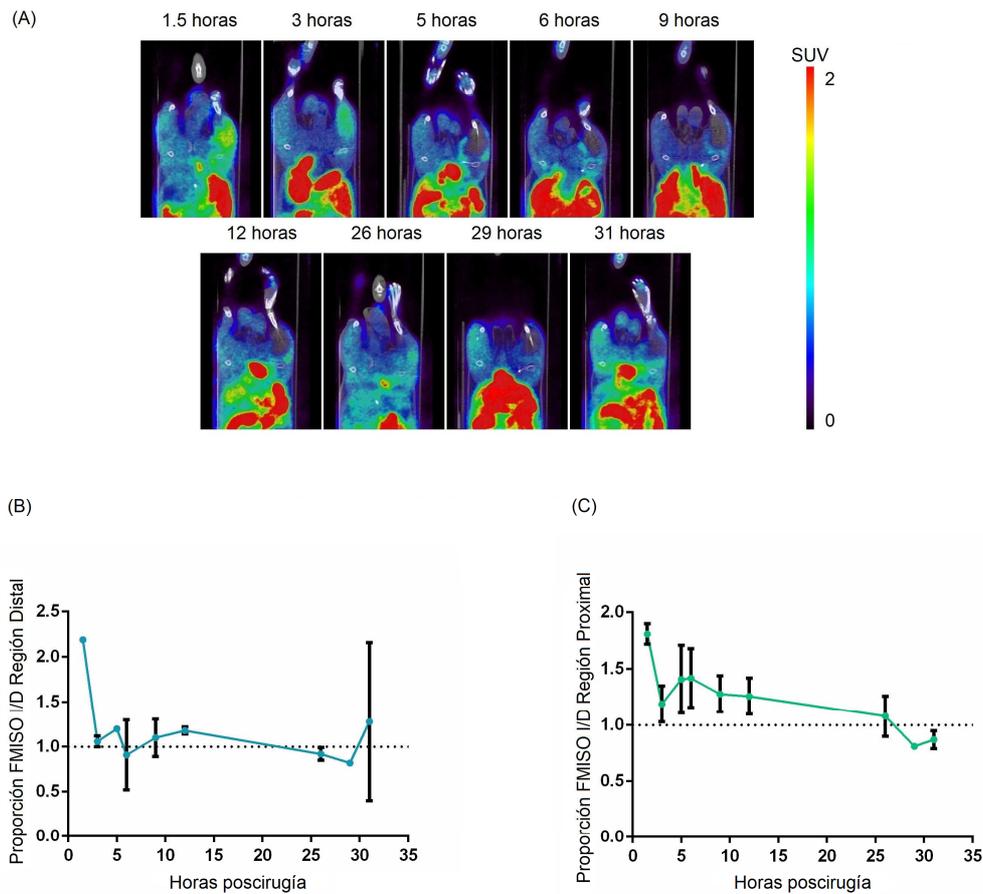


Figura 4.5. (A) Imágenes FMISO PET/CT adquiridas en diferentes animales con enfermedad arterial periférica a lo largo del tiempo. La actividad radiactiva se encuentra codificada en una escala de colores que va desde el color azul (bajo acúmulo de FMISO) al rojo (elevado acúmulo de FMISO). (B) Proporción de la captación de FMISO en la región distal de la extremidad operada con respecto a la extremidad sana. (C) Proporción de la captación de FMISO en la región proximal de la extremidad operada con respecto a la extremidad sana.

La Figura 4.6 expone el volumen hipóxico estimado en la región proximal (muslo) de la extremidad posterior izquierda de los animales con enfermedad arterial periférica. El volumen hipóxico extraído de las imágenes FMISO PET/CT presenta su máximo valor a las 1.5 y 3 horas posoclusión. Posteriormente, dicho volumen decrece progresivamente hasta prácticamente desaparecer a las 26 horas poscirugía.

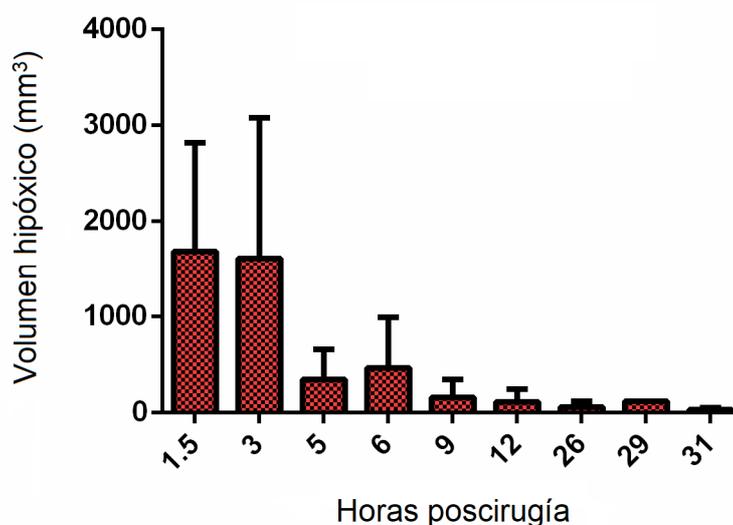


Figura 4.6. Estimación del volumen hipóxico presente en la región proximal de la extremidad posterior ocluída en el modelo animal de enfermedad arterial periférica.

4.5 Discusión

De acuerdo a la bibliografía consultada, este proyecto es el primer estudio preclínico que evalúa la presencia de regiones hipóxicas *in vivo* a través del empleo de estudios de imagen FMISO PET/CT en un modelo experimental de EAP. Las imágenes FMISO PET/CT mostraron un incremento de la captación del radiofármaco en la extremidad posterior operada, a diferencia de los hallazgos observados en la extremidad contralateral, en la cual no se identificó una captación específica de FMISO. Los resultados obtenidos también mostraron que las ratas con EAP exhibían regiones hipóxicas en las primeras 3 h después de la oclusión arterial, momento en el que la hipoxia alcanza su máximo volumen. Posteriormente, el acúmulo de FMISO decreció rápidamente con el paso del tiempo, especialmente después de las 26 h posinducción. Dicha disminución puede ser debida a una recuperación parcial de la vascularización periférica. La enfermedad vascular periférica es una patología que se caracteriza por la presencia de placas (ateroesclerosis) o trombos (isquemia vascular) en el interior de los vasos sanguíneos, los cuales provocan una reducción en el suministro de sangre a nivel tisular. Debido a este hecho, la evolución de la EAP y del ictus cerebral



podría presentar similitudes. En un estudio PET preclínico con FMISO realizado en un modelo animal de isquemia cerebral se pudo detectar captación de FMISO a las 4 h poscirugía (Rojas *et al.*, 2011), decreciendo posteriormente a partir de las 8 h después del ictus. Además, no se apreció acúmulo de FMISO a partir de las 24 h posoclusión, indicando la pérdida de tejido viable. En consecuencia, este estudio demuestra por primera vez la existencia de tejido hipóxico en un modelo de EAP.

Los estudios FDG PET/CT y TTF SPECT permitieron analizar procesos de inflamación y perfusión, respectivamente, en el modelo animal de EAP. Los resultados obtenidos mediante imagen mostraron un descenso del metabolismo y de la perfusión en las primeras 24 horas a nivel de la región distal. Con respecto a la región proximal, se observó un incremento de la captación de FDG y de TTF en la extremidad operada en los primeros 3 días. Posteriormente, se detectó un aumento de captación de FDG y de TTF en el muslo de la extremidad operada, recuperando sus valores basales a los 30 y 14 días, respectivamente. Por otro lado, el máximo volumen de hipoxia fue detectado a las 1.5 y 3 horas poscirugía, momento en el que se manifestó el menor acúmulo de TTF (hipoperfusión) en la extremidad operada. Varios investigadores han visto que la captación de FDG se reduce hasta un 51% en las regiones media y distal de la extremidad posterior tras la oclusión de la arteria femoral, observando un aumento a los 3 y 7 días a nivel de la región media y proximal de la extremidad (Thackeray *et al.*, 2014). Dichos investigadores explicaron que la FDG indicaba inflamación localizada en el modelo murino. Además de este radiofármaco, el trazador [^{99m}Tc]MIBI fue empleado para estudiar la perfusión tras la oclusión de la arteria femoral y los investigadores detectaron que la perfusión se veía reducida en un 76% a las 24 h, recuperando sus valores basales al día 7 (Bankstahl *et al.*, 2017). También observaron una reducida captación de FDG tras la oclusión arterial, que posteriormente aumentaría en un 76% al día 7 hasta recuperar sus niveles basales a los 15 días. Los autores concluyeron que una considerable inflamación tiene lugar hasta los 10 días posoclusión, seguida de una fase de



recuperación de la perfusión y de un proceso de angiogénesis. En un modelo unilateral, el [^{99m}Tc]MIBI mostró que los valores de SUV tras la oclusión arterial en la extremidad operada eran significativamente menores que los de la extremidad contralateral y continuaron disminuyendo hasta los 3 días poscirugía (Hendriks *et al.*, 2016a). Sorprendentemente, los investigadores detectaron una recuperación de la perfusión a los 7 y 14 días posocclusión. Otras investigaciones preclínicas mostraron resultados similares en un modelo de isquemia periférica basado en la ligadura de la arteria femoral (Kapanadze *et al.*, 2019). Los autores observaron una supresión de la perfusión tisular y del metabolismo en las primeras 24 h tras la oclusión de la arteria femoral, produciéndose un incremento del consumo de glucosa a los 3 días. La perfusión tisular recuperó sus valores iniciales a los 7-10 días, mientras que el metabolismo glucídico continuó elevado. Los investigadores explicaron que la perfusión tisular se normaliza en períodos tardíos debido a un incremento en la permeabilidad, procesos de arteriogénesis y a las adaptaciones microvasculares que tienen lugar, como puede ser la restauración de ramas colaterales en las arterias.

Este estudio experimental presenta varias limitaciones que deben ser mencionadas. Las imágenes FDG PET/CT y TTF SPECT se adquirieron a diferentes tiempos posinducción debido a que en nuestro centro de investigación no está disponible un equipo híbrido PET/SPECT que permita adquirir las imágenes moleculares de forma simultánea o consecutiva. Además, las imágenes FMISO PET/CT fueron adquiridas en las primeras horas después de la oclusión arterial, siendo inviable el empleo de estos animales para la adquisición de los estudios de imagen molecular con FDG y TTF. Igualmente, los estudios PET/CT con FMISO fueron realizados en 2-3 ratas por cada momento poscirugía evaluado con el objetivo de realizar un seguimiento exhaustivo de la evolución de la hipoxia en las primeras horas después de la oclusión arterial y para reducir el número de animales involucrados en el estudio. Finalmente, es necesario mencionar que las técnicas de imagen empleadas son técnicas no invasivas que permiten evaluar procesos



fisiopatológicos *in vivo* y, por lo tanto, reducir el número de animales involucrados en el proyecto al poder realizar estudios longitudinales en el mismo individuo. Además, la imagen molecular permite identificar y cuantificar procesos fisiopatológicos como la inflamación, la perfusión y la hipoxia en determinadas regiones anatómicas de la extremidad inferior, evitando el uso de técnicas invasivas que impliquen el sacrificio de los animales.

4.6 Conclusiones

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio permiten confirmar que las técnicas de imagen PET/CT y SPECT son métodos fiables para la monitorización del modelo animal de EAP a lo largo del tiempo. Este estudio permite confirmar la detección de tejido hipóxico *in vivo* mediante el empleo de la PET con FMISO, aportando información sobre la evolución de la patología en un mismo animal. Estos resultados abren la puerta al desarrollo de nuevas terapias que permitan reducir el daño isquémico asociado a una isquemia vascular.

4.7 Bibliografía

- Agnelli, G.; Belch, J. J. F.; Baumgartner, I.; Giovas, P. & Hoffmann, U. (2020). Morbidity and mortality associated with atherosclerotic peripheral artery disease: a systematic review. *Atherosclerosis*, 293: 94-100.
- Aguiar, P.; Silva-Rodríguez, J.; Herranz, M. & Ruibal, Á. (2014a). Preliminary Experience with Small Animal SPECT Imaging on Clinical Gamma Cameras. *BioMed Research International*, 2014: 369509.
- Aguiar, P.; Silva-Rodríguez, J.; González-Castaño, D. M.; Pino, F.; Sánchez, M.; Herranz, M.; Iglesias, A.; Lois, C. & Ruibal, Á. (2014b). A portable device for small animal SPECT imaging in clinical gamma-cameras. *Journal of Instrumentation*, 9 (07): P07004-P07004.



- Aguiar, P.; Fernández-Ferreiro, A.; Galli, F. & Tsoumpas, C. (2019). Imaging Biomarkers in Translational Small Animal Models. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2019: 9469041.
- Bankstahl, J.; Wittneben, A.; Thackeray, J.; Ross, T. L.; Bengel, F. & Limbourg, F. (2017). Multi-tracer characterization of ischemic inflammation and perfusion in a murine model of hindlimb ischemia. *Journal of Nuclear Medicine*, 58 (supplement 1): 32-32.
- Baskin, A.; Buchegger, F.; Seimbille, Y.; Ratib, O. & Garibotto, V. (2015). PET Molecular Imaging of Hypoxia in Ischemic Stroke: An Update. *Current Vascular Pharmacology*, 13 (2): 209-217.
- Dobrucki, L. W.; Dione, D. P.; Kalinowski, L.; Dione, D.; Mendizabal, M.; Yu, J.; Papademetris, X.; Sessa, W. C. & Sinusas, A. J. (2009a). Serial noninvasive targeted imaging of peripheral angiogenesis: validation and application of a semiautomated quantitative approach. *Journal of Nuclear Medicine*, 50 (8): 1356-1363.
- Dobrucki, L. W.; Meoli, D. F.; Hu, J.; Sadeghi, M. M. & Sinusas, A. J. (2009b). Regional hypoxia correlates with the uptake of a radiolabeled targeted marker of angiogenesis in rat model of myocardial hypertrophy and ischemic injury. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 60 (supplement 4): 117-123.
- Ferreira, C. A.; Hernández, R.; Yang, Y.; Valdovinos, H. F.; Engle, J. W. & Cai, W. (2018). ImmunoPET of CD146 in a Murine Hindlimb Ischemia Model. *Molecular Pharmaceutics*, 15 (8): 3434-3441.
- Ghosh, N.; Rimoldi, O. E.; Beanlands, R. S. B. & Camici, P. G. (2010). Assessment of myocardial ischaemia and viability: role of positron emission tomography. *European Heart Journal*, 31 (24): 2984-2995.



- Handley, M. G.; Medina, R. A.; Nagel, E.; Blower, P. J. & Southworth, R. (2011). PET imaging of cardiac hypoxia: opportunities and challenges. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51 (5): 640-650.
- Hendrikx, G.; Vries, M. H.; Bauwens, M.; De Saint-Hubert, M.; Wagenaar, A.; Guillaume, J.; Boonen, L.; Post, M. J. & Mottaghy, F. M. (2016a). Comparison of LDPI to SPECT perfusion imaging using (^{99m}Tc)-sestamibi and (^{99m}Tc)-pyrophosphate in a murine ischemic hind limb model of neovascularization. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Research*, 6 (1): 44.
- Hendrikx, G.; Vöö, S.; Bauwens, M.; Post, M. J. & Mottaghy, F. M. (2016b). SPECT and PET imaging of angiogenesis and arteriogenesis in pre-clinical models of myocardial ischemia and peripheral vascular disease. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 43 (13): 2433-2447.
- Hua, J.; Dobrucki, L. W.; Sadeghi, M. M.; Zhang, J.; Bourke, B. N.; Cavaliere, P.; Song, J.; Chow, C.; Jahanshad, N.; van Royen, N.; Buschmann, I.; Madri, J. A.; Mendizabal, M. & Sinusas, A. J. (2005). Noninvasive imaging of angiogenesis with a ^{99m}Tc-labeled peptide targeted at alphavbeta3 integrin after murine hindlimb ischemia. *Circulation*, 111 (24): 3255-3260.
- Kajiwara, H.; Luo, Z.; Belanger, A. J.; Urabe, A.; Vincent, K. A.; Akita, G. Y.; Cheng, S. H.; Mochizuki, S.; Gregory, R. J. & Jiang, C. (2009). A hypoxic inducible factor-1 alpha hybrid enhances collateral development and reduces vascular leakage in diabetic rats. *Journal of Gene Medicine*, 11 (5): 390-400.
- Kapanadze, T.; Bankstahl, J. P.; Wittneben, A.; Koestner, W.; Ballmaier, M.; Gamrekelashvili, J.; Krishnasamy, K.; Limbourg, A.; Ross, T. L.; Meyer,



- G. J.; Haller, H.; Bengel, F. M. & Limbourg, F. P. (2019). Multimodal and Multiscale Analysis Reveals Distinct Vascular, Metabolic and Inflammatory Components of the Tissue Response to Limb Ischemia. *Theranostics*, 9 (1): 152-166.
- Krishnasamy, K.; Limbourg, A.; Kapanadze, T.; Gamrekelashvili, J.; Beger, C.; Häger, C.; Lozanovski, V. J.; Falk, C. S.; Napp, L. C.; Bauersachs, J.; Mack, M.; Haller, H.; Weber, C.; Adams, R. H. & Limbourg, F. P. (2017). Blood vessel control of macrophage maturation promotes arteriogenesis in ischemia. *Nature Communications*, 8 (1): 952.
- Kullo I. J. & Rooke, T. W. (2016). Clinical Practice. Peripheral Artery Disease. *The New England Journal of Medicine*, 374 (9): 861-871.
- Kumbhani D. J.; Steg P. G.; Cannon C. P.; Eagle, K. A.; Smith, S. C. Jr.; Goto, S.; Ohman, E. M.; Elbez, Y.; Sritara, P.; Baumgartner, I.; Banerjee, S.; Creager, M. A. & Bhatt, D. L.; REACH Registry Investigators. (2014). Statin therapy and long-term adverse limb outcomes in patients with peripheral artery disease: insights from the REACH registry. *European Heart Journal*, 35 (41): 2864-2872.
- Lee, S. J.; On, Y. K.; Lee, E. J.; Choi, J. Y.; Kim, B. T. & Lee, K. H. (2008). Reversal of vascular ^{18}F -FDG uptake with plasma high-density lipoprotein elevation by atherogenic risk reduction. *Journal of Nuclear Medicine*, 49 (8): 1277-1282.
- Limbourg, A.; Korff, T.; Napp, L. C.; Schaper, W.; Drexler, H. & Limbourg, F. P. (2009). Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nature Protocols*, 4 (12): 1737-1746.
- Lu, E.; Wagner, W. R.; Schellenberger, U.; Abraham, J. A.; Klivanov, A. L.; Woulfe, S. R.; Csikari, M. M.; Fischer, D.; Schreiner, G. F.;



- Brandenburger, G. H. & Villanueva, F. S. (2003). Targeted *in vivo* labeling of receptors for vascular endothelial growth factor: approach to identification of ischemic tissue. *Circulation*, 108 (1): 97-103.
- Moyon, A.; Garrigue, P.; Balasse, L.; Fernández, S.; Brige, P.; Nollet, M.; Hache, G.; Blot-Chabaud, M.; Dignat-George, F. & Guillet, B. (2018). Early prediction of revascularisation by angiomin-targeting positron emission tomography. *Theranostics*, 8 (18): 4985-4994.
- Orbay, H.; Hong, H.; Zhang, Y. & Cai, W. (2013). PET/SPECT imaging of hindlimb ischemia: focusing on angiogenesis and blood flow. *Angiogenesis*, 16 (2): 279-287.
- Pande, R. L.; Park, M. A.; Perlstein, T. S.; Desai, A. S.; Doyle, J.; Navarrete, N.; Copeland-Halperin, R. S.; Redline, W.; Di Carli, M. F. & Creager, M. A. (2011). Impaired skeletal muscle glucose uptake by [¹⁸F]fluorodeoxyglucose-positron emission tomography in patients with peripheral artery disease and intermittent claudication. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 31 (1): 190-196.
- Peñuelas, I.; Aranguren, X. L.; Abizanda, G.; Martí-Climent, J. M.; Uriz, M.; Eca, M.; Collantes, M.; Quincoces, G.; Richter, J. A. & Prósper, F. (2007). (¹³N)-ammonia PET as a measurement of hindlimb perfusion in a mouse model of peripheral artery occlusive disease. *Journal of Nuclear Medicine*, 48 (7): 1216-1223.
- Rahmani, S.; Shahhoseini, S.; Mohamadi, R. & Vojdani, M. (2017). Synthesis, Quality Control and Stability Studies of 2-[¹⁸F]Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose (¹⁸F-FDG) at Different Conditions of Temperature by Physicochemical and Microbiological Assays. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 16 (2): 602-610.



- Rajendran, J. G. & Krohn, K. A. (2015). F-18 fluoromisonidazole for imaging tumor hypoxia: imaging the microenvironment for personalized cancer therapy. *Seminars in Nuclear Medicine*, 45 (2): 151-162.
- Rishi, M. T.; Selvaraju, V.; Thirunavukkarasu, M.; Shaikh, I. A.; Takeda, K.; Fong, G. H.; Palesty, J. A.; Sánchez, J. A. & Maulik, N. (2015). Deletion of prolyl hydroxylase domain proteins (PHD1, PHD3) stabilizes hypoxia inducible factor-1 alpha, promotes neovascularization, and improves perfusion in a murine model of hind-limb ischemia. *Microvascular Research*, 97: 181-188.
- Rojas, S.; Herance, J. R.; Abad, S.; Jiménez, X.; Pareto, D.; Ruiz, A.; Torrent, È.; Figueiras, F. P.; Popota, F.; Fernández-Soriano, F. J.; Planas, A. M. & Gispert, J. D. (2011). Evaluation of Hypoxic Tissue Dynamics with ¹⁸F-FMISO PET in a Rat Model of Permanent Cerebral Ischemia. *Molecular Imaging and Biology*, 13 (3): 558-564.
- Rudd, J. H. F.; Warburton, E. A.; Fryer, T. D.; Jones, H. A.; Clark, J. C.; Antoun, N.; Johnström, P.; Davenport, A. P.; Kirkpatrick, P. J.; Arch, B. N.; Pickard, J. D. & Weissberg, P. L. (2002). Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [¹⁸F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Circulation*, 105 (23): 2708-2711.
- Silva-Rodríguez, J.; Cortés, J.; Pardo-Montero, J.; Pérez-Fentes, D.; Herranz, M.; Ruibal, Á. & Aguiar, P. (2015). *In vivo* quantification of renal function in mice using clinical gamma cameras. *Physica Medica*, 31 (3): 242-247.
- Spratt, N. J.; Donnan, G. A.; McLeod, D. D. & Howells, D. W. (2011). 'Salvaged' stroke ischaemic penumbra shows significant injury: studies with the hypoxia tracer FMISO. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31: 934-943.



- Stacy, M. R.; Yu, D. Y.; Maxfield, M. W.; Jaba, I. M.; Jozwik, B. P.; Zhuang, Z. W.; Lin, B. A.; Hawley, C. L.; Caracciolo, C. M.; Pal, P.; Tirziu, D.; Sampath, S. & Sinusas, A. J. (2014). Multimodality imaging approach for serial assessment of regional changes in lower extremity arteriogenesis and tissue perfusion in a porcine model of peripheral arterial disease. *Circulation Cardiovascular Imaging*, 7 (1): 92-99.
- Sun, Z.; Tong, G.; Lang, L.; Cao, F.; Niu, G. & Chen, X. (2013). Multimodality longitudinal imaging of tissue remodeling in a murine hindlimb ischemia model. *Journal of Nuclear Medicine*, 54 (supplement 2): 463-463.
- Tamaki, N. & Hirata, K. (2016). Tumor hypoxia: a new PET imaging biomarker in clinical oncology. *International Journal of Clinical Oncology*, 21 (4): 619-625.
- Tang, G.; Wang, M.; Tang, X.; Gan, M. & Luo, L. (2005). Fully automated one-pot synthesis of [¹⁸F]fluoromisonidazole. *Nuclear Medicine and Biology*, 32 (5): 553-558.
- Thackeray, J.; Eilert, S.; Bengel, F.; Limbourg, F. & Bankstahl, J. (2014). Characterization of murine hindlimb ischemia using intra-aortic administration of Tc-99m-HSA-microspheres and F-18-FDG. *Journal of Nuclear Medicine*, 55 (supplement 1): 1703-1703.
- Willmann, J. K.; Chen, K.; Wang, H.; Paulmurugan, R.; Rollins, M.; Cai, W.; Wang, D. S.; Chen, I. Y.; Gheysens, O.; Rodríguez-Porcel, M.; Chen, X. & Gambhir, S. S. (2008). Monitoring of the biological response to murine hindlimb ischemia with ⁶⁴Cu-labeled vascular endothelial growth factor-121 positron emission tomography. *Circulation*, 117 (7): 915-922.
- Zaccagnini, G.; Maimone, B.; Fuschi, P.; Longo, M.; Da Silva, D.; Carrara, M.; Voellenkle, C.; Perani, L.; Esposito, A.; Gaetano, C. & Martelli, F. (2019).



Hypoxia-Induced miR-210 Is Necessary for Vascular Regeneration upon Acute Limb Ischemia. *International Journal of Molecular, Sciences* 21 (1): 129.

CAPÍTULO 5

Discusión



La obtención de imágenes *in vivo* de pequeños animales de laboratorio (ratón y rata) está establecida como un componente crucial de la investigación biomédica preclínica y traslacional. El empleo de las técnicas de imagen en estudios preclínicos permite definir cada animal como su propio control, reduciendo la variabilidad y minimizando el número de animales necesarios para llevar a cabo un determinado proyecto. Los modelos animales permiten reproducir fielmente la evolución de los procesos patológicos que tienen lugar en una determinada enfermedad, siendo de gran interés estudiar su progreso a largo plazo. Los modelos animales también permiten el estudio de procesos sistémicos de la enfermedad que son difíciles o imposibles de reproducir en técnicas *ex vivo*, como puede ser la metástasis en el cáncer. Además, debido al hecho de que muchas de las modalidades de imagen que se utilizan en la rutina clínica también se emplean en los estudios realizados en animales de laboratorio, los resultados obtenidos en preclínica son fácilmente trasladables a los pacientes. Finalmente, los estudios de imagen desarrollados y validados en modelos animales proporcionan información de la respuesta terapéutica, permitiendo a los médicos distinguir a los pacientes que responden a dicho tratamiento de los que no, y cambiar la terapia ineficaz a otra potencialmente más eficaz en estos últimos, evitando así toxicidades, gastos y pérdidas de tiempo innecesarias.

Entre las diferentes técnicas de imagen, la Tomografía por Emisión de Positrones (PET) es una técnica de imagen molecular no invasiva que permite obtener información *in vivo* de procesos biológicos mediante el uso de moléculas o compuestos marcados con radioisótopos denominados radiofármacos. De esta forma, la PET es una herramienta que permite detectar y cuantificar la distribución de un radionúclido emisor de positrones y, por lo tanto, de una molécula en el interior de un organismo vivo. La gran utilidad de la PET se basa en que ciertos fenómenos biológicos o patologías, como pueden ser las enfermedades neurológicas u oncológicas, son sensibles a esta técnica en estadios asintomáticos de la enfermedad cuando todavía no existe



evidencia de cambios anatómicos por técnicas de imagen estructural como la Resonancia Magnética (MR).

El [^{18}F]Fluoromisonidazol ([^{18}F]FMISO) es un radiofármaco empleado para la detección de tejidos hipóxicos *in vivo* mediante el uso de la PET. El FMISO es una molécula lipofílica capaz de penetrar en las células viables mediante difusión pasiva, siendo reducido por la enzima nitrorreductasa. En condiciones normales de concentración de oxígeno, este proceso es reversible y se produce una reoxidación que permite a la molécula fluir libremente de nuevo al medio extracelular. Sin embargo, en condiciones de hipoxia no se realiza dicha reoxidación y se produce un segundo proceso de reducción, obteniendo como resultado un metabolito intermedio reactivo capaz de unirse a las proteínas intracelulares y al ARN, lo que provoca su atrapamiento celular. En consecuencia, los estudios PET con FMISO permiten obtener imágenes que muestran regiones con una reducida concentración de oxígeno.

Debido a sus características, el radiofármaco FMISO ya se ha propuesto como un posible indicador de la penumbra isquémica, es decir, de la zona hipoperfundida pero potencialmente salvable que se encuentra alrededor del núcleo de un infarto. Dicho proceso isquémico se produce por una reducción del aporte sanguíneo hasta unos niveles insuficientes para mantener el metabolismo y funcionamiento normal de las células. Cuando tiene lugar la oclusión arterial se establece la denominada lesión de ictus, en la que existe un núcleo central isquémico que evolucionará a infarto y unas áreas de isquemia a su alrededor de menor intensidad en las que las células se encuentran estructuralmente intactas pero funcionalmente inactivas. Esta zona perifocal se denomina penumbra isquémica y está compuesta por un área isquémica que se recupera de forma espontánea y un área que progresa a cambios irreversibles a menos que se instaure un tratamiento adecuado. Los factores que determinan la progresión de la penumbra al infarto son el grado de circulación arterial colateral, la duración de la isquemia y el estado funcional y



metabólico previos de la célula. Desde el punto de vista clínico, la penumbra es la diana más relevante y el foco principal de futuras investigaciones.

En esta Tesis Doctoral se han explorado los conceptos anteriores desde una perspectiva multidisciplinar, haciendo uso de la tecnología PET para estudiar la hipoxia en modelos animales de hemorragia cerebral y enfermedad arterial periférica, lo que ha permitido alcanzar resultados de interés en diferentes ámbitos, que se discuten a continuación.

Hemorragia cerebral

La hemorragia cerebral es un accidente cerebrovascular que se produce cuando una arteria se rompe, lo que provoca que la sangre se libere dentro del cerebro y se forme un acúmulo de sangre o hematoma que termina dañando el tejido cerebral afectado. A pesar de que los ictus hemorrágicos son menos frecuentes que los ictus isquémicos (representando del 10 al 15% del total de los ictus), se caracterizan por su extrema gravedad. La hemorragia cerebral sigue siendo el ictus con peor pronóstico y con menos opciones terapéuticas. La mortalidad en la fase aguda, así como la morbilidad asociada a la hemorragia cerebral son muy elevadas. El enfoque quirúrgico no ha sido satisfactorio y el tratamiento neuroprotector o con fármacos procoagulantes no ha demostrado eficacia. Actualmente, la mejor alternativa terapéutica es ofrecer al paciente el mejor cuidado neurológico en la fase aguda de la enfermedad. Por todo ello, urge la necesidad de incrementar el número y la calidad de los estudios preclínicos en esta patología utilizando modelos animales que puedan mimetizar el cuadro fisiopatológico de la hemorragia cerebral en condiciones controladas.

El objetivo del **Capítulo 3** fue evaluar la presencia de tejido hipóxico cerebral potencialmente salvable en un modelo animal de hemorragia cerebral y localizar la ventana temporal poshemorragia óptima para la correcta detección de la presencia de tejido hipóxico. Además, se estudió la captación de FMISO cerebral poshemorragia, la evolución de la hemorragia y los cambios



que se producían en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a lo largo del tiempo.

Para alcanzar dicho objetivo, se administró el FMISO a las 18, 24, 42 y 48 horas poscirugía en ratas con hemorragia cerebral y en animales pertenecientes al grupo control salino y al grupo control sham para investigar la presencia de regiones hipóxicas asociadas a la enfermedad cerebrovascular mediante imagen PET/CT. Se realizaron estudios de imagen por MR en esos mismos animales 1 hora después de la inducción y a los 3 y 7 días poscirugía para confirmar la presencia y/o ausencia de hemorragia y estudiar su evolución. También se evaluó la biodistribución normal de FMISO en el grupo control normal que no fue sometido a ningún proceso quirúrgico y en el cual se adquirió un único estudio PET/CT y solamente un estudio de MR. Además, se investigó la evolución del hematoma a través de la adquisición de estudios de imagen por MR a las 1, 3, 5, 8, 24, 72 horas y 7 días poscirugía, y se evaluó la integridad de la barrera hematoencefálica a través de estudios de MR adquiridos antes y después de la administración de gadolinio a las 1, 3, 6 y 24 horas en ratas con hemorragia cerebral. Finalmente, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia para estudiar la presencia de regiones hipóxicas a nivel cerebral en ratas con hemorragia cerebral y control (salino y sham) a las 5, 18 y 24 horas poscirugía.

Las imágenes FMISO PET/MR realizadas en el grupo de ratas con hemorragia cerebral mostraron un incremento de la captación del radiofármaco alrededor del hematoma, a diferencia de los hallazgos observados en los grupos control, en los cuales no se identificó una captación específica de FMISO. Los resultados obtenidos también mostraron que las ratas con hemorragia cerebral exhibían regiones hipóxicas después de que el hematoma alcanzase su máximo volumen. Por consiguiente, el acúmulo de FMISO decreció rápidamente con el paso del tiempo, especialmente entre las 18 y 24 h posinducción. Dicha disminución puede ser debida a una reducción en el volumen del edema perihematoma, el cual tiene una relación directa con el



volumen del hematoma, o a un descenso en la presión sanguínea. Dichos resultados parecen indicar que el descenso de la captación cerebral de FMISO sucede cuando se produce una estabilización en el tamaño del hematoma. En consecuencia, la disminución de FMISO no puede ser relacionada con la desaparición de isquemia, la cual tiene lugar a los 7 días poscirugía aproximadamente. Como resultado, este estudio demuestra por primera vez la existencia de tejido hipóxico y daño cerebral asociado al crecimiento del hematoma en hemorragia cerebral. También se procedió a la adquisición de imágenes de MR con contraste para confirmar que la captación de FMISO no se debía a la ruptura de la barrera hematoencefálica, pudiendo observar que ésta se encontraba parcialmente restaurada a las 6 h y completamente intacta a las 24 h, realizándose los estudios PET/CT con FMISO a partir de las 18 h posinducción. Con respecto a los resultados del estudio de inmunofluorescencia, se pudo confirmar la presencia de células positivas para HIF-1 α a las 5, 18 y 24 h posinducción en ratas con hemorragia cerebral, mientras que no se observaron células positivas en ninguno de los grupos control salino y sham. Por consiguiente, los resultados histológicos muestran la presencia de células hipóxicas alrededor del hematoma y el trazador FMISO se localiza próximo a dicha región.

Enfermedad arterial periférica

La Enfermedad Arterial Periférica (EAP) es una patología vascular que provoca la obstrucción del flujo sanguíneo arterial sistémico, excluyendo las arterias coronarias y cerebrales. En consecuencia, se basa en la obstrucción de las arterias que irrigan las extremidades que causa un descenso del flujo arterial y, por lo tanto, la aparición del dolor en dichas extremidades. En los cuadros más graves, la EAP puede llegar a provocar una isquemia. La EAP está causada por la aterosclerosis en más del 90% de los casos. La aterosclerosis es una enfermedad sistémica que afecta a todas las arterias del cuerpo y que se inicia como una placa (colesterol y plaquetas, entre otros productos) que, a medida que crece, obstruye el flujo arterial. Entre los factores de riesgo caben destacar el sexo (1 de cada 5 personas mayores de 65 años



padece EAP), la edad, el tabaco y la diabetes mellitus. La importancia de la EAP no viene dada solo por el riesgo de pérdida de la extremidad, sino también por el peligro que tiene el paciente de presentar complicaciones cardiovasculares graves. Al ser la aterosclerosis una enfermedad sistémica, es frecuente encontrar afectación en los vasos coronarios y cerebrales, por lo que la comorbilidad es frecuente. En consecuencia, el riesgo de pérdida de extremidad es de un 2% a los 5 años mientras que el riesgo de sufrir un episodio cardiovascular no mortal en el mismo período es del 20%. La mortalidad es de un 10-15% y, de este porcentaje, el 75% se debe a causas cardiovasculares. El diagnóstico precoz es importante para poder mejorar la calidad de vida del paciente y reducir el riesgo de eventos secundarios mayores, como el infarto agudo de miocardio o el ictus. En lesiones segmentarias se realiza un tratamiento endovascular que no es efectivo en las oclusiones arteriales mientras que en lesiones más extensas se lleva a cabo una cirugía convencional.

El objetivo del **Capítulo 4** fue evaluar la presencia de tejido hipóxico potencialmente salvable en un modelo animal de isquemia periférica y localizar la ventana temporal posoclusión óptima para la correcta detección de la presencia de tejido hipóxico. Además, se estudiaron fenómenos de inflamación y perfusión *in vivo* en un modelo animal de EAP a lo largo del tiempo.

Para alcanzar dicho objetivo, se indujo un modelo de EAP en ratas a través de la oclusión de las arterias femoral, epigástrica, poplítea, safena e ilíaca de la extremidad posterior izquierda. Los estudios FDG PET/CT fueron adquiridos para investigar los procesos inflamatorios asociados a una isquemia vascular periférica. De esta forma, el radiofármaco fue administrado el día antes de la cirugía (basal) y a las 24 h, 3 días, 14 días y 30 días posoclusión. Se realizaron estudios SPECT con TTF para evaluar la perfusión en el modelo animal de isquemia vascular periférica. En consecuencia, el radiofármaco fue administrado el día antes de la cirugía (basal) y a las 2 h, 24 h, 3 días, 7 días, 14 días y 30 días posoclusión. Finalmente, se procedió a la adquisición de



estudios PET/CT con FMISO para investigar la presencia de hipoxia en una isquemia vascular periférica. Con este objetivo, el radiofármaco fue administrado a las 1.5, 3, 5, 6, 9, 12, 26, 29 y 31 horas posoclusión.

Las imágenes FMISO PET/CT mostraron un incremento de la captación del radiofármaco en la extremidad posterior operada, a diferencia de los hallazgos observados en la extremidad contralateral, en la cual no se identificó una captación específica de FMISO. Los resultados obtenidos también mostraron que las ratas con EAP exhibían regiones hipóxicas en las primeras 3 h después de la oclusión arterial, momento en el que la hipoxia alcanza su máximo volumen. Posteriormente, el acúmulo de FMISO decreció rápidamente con el paso del tiempo, especialmente después de las 26 h posinducción. Dicha disminución puede ser debida a una recuperación parcial de la vascularización periférica. Los estudios FDG PET/CT y TTF SPECT permitieron estudiar procesos de inflamación y perfusión, respectivamente, en el modelo animal de EAP. Los resultados obtenidos mediante imagen mostraron un descenso del metabolismo y de la perfusión en las primeras 24 horas a nivel de la región distal. Con respecto a la región proximal, se observó un incremento de la captación de FDG y de TTF en la extremidad operada en los primeros 3 días. Posteriormente, se detectó un aumento de captación de FDG y de TTF en el muslo de la extremidad operada, recuperando sus valores basales a los 30 y 14 días, respectivamente. Por otro lado, el máximo volumen de hipoxia fue detectado a las 1.5 y 3 horas poscirugía, momento en el que se manifestó el menor acúmulo de TTF (hipoperfusión) en la extremidad operada.

Discusión general

De forma general, los diferentes trabajos realizados y descritos en esta Tesis Doctoral permiten concluir que el empleo de modelos animales junto con el uso de técnicas de imagen no invasivas constituye una herramienta útil para estudiar los procesos biológicos que tienen lugar en una determinada patología. En concreto, los estudios PET con FMISO permitieron detectar



regiones hipóxicas y estudiar su evolución *in vivo* en un modelo de hemorragia cerebral y de enfermedad arterial periférica.

Estos resultados abren la puerta al desarrollo de nuevas terapias que permitan reducir el daño isquémico asociado a una enfermedad vascular de tipo hemorrágico o isquémico. En consecuencia, el efecto terapéutico de nuevos fármacos sobre la reducción de regiones hipóxicas podría ser evaluado de forma efectiva y sencilla a través de estudios de imagen FMISO PET/CT. Una vez que los resultados obtenidos pudiesen ser confirmados en pacientes, los estudios PET con FMISO podrían ser empleados como una técnica de seguimiento en futuros ensayos clínicos.

CAPÍTULO 6

Conclusiones



La principal conclusión de esta Tesis Doctoral es la viabilidad del uso de la técnica PET con FMISO para el estudio de la presencia de regiones hipóxicas *in vivo* en dos tipos de modelos animales que presentan fenómenos de hipoxia como resultado de un proceso isquémico. En consecuencia, se trata de una herramienta útil para el seguimiento de la evolución de ambas patologías en ensayos clínicos con pacientes.

Además, los hallazgos obtenidos en los estudios de imagen realizados en los diferentes modelos animales conducen a las siguientes conclusiones específicas para cada una de las patologías investigadas:

Estudios de hipoxia en un modelo de hemorragia cerebral

- Se ha desarrollado un nuevo protocolo para realizar estudios de PET con FMISO en modelos de hemorragia cerebral en rata.
- Los estudios de PET con FMISO realizados en animales con hemorragia cerebral permitieron localizar la ventana temporal poshemorragia con una alta captación del radiofármaco alrededor de las 18 y 24 h poscirugía, disminuyendo posteriormente hasta desaparecer a las 48 h.
- La captación cerebral de FMISO en las ratas con hemorragia cerebral no es detectable en las ratas pertenecientes a los grupos control, demostrando que se trata de un acúmulo específico.
- La técnica de PET con FMISO ha permitido evidenciar por primera vez la existencia de una región hipóxica asociada a la hemorragia cerebral.



Estudios de hipoxia en un modelo de enfermedad arterial periférica

- Se ha desarrollado un nuevo protocolo para realizar estudios de PET con FMISO en modelos de enfermedad arterial periférica.
- Los estudios de PET con FMISO realizados en animales con enfermedad arterial periférica permitieron identificar la mayor captación del radiofármaco en las primeras 1.5 h poscirugía en la región proximal de la extremidad inferior operada, disminuyendo posteriormente hasta desaparecer a las 29 y 31 h.
- El mayor acúmulo de FMISO se produce cuando la perfusión de la extremidad es menor, pudiendo confirmar una relación entre ambos procesos. Por otro lado, cuando no es visible una captación de FMISO a nivel proximal en la extremidad operada, se observa un aumento de la perfusión y de inflamación en la misma.
- La técnica de PET con FMISO ha sido empleada por primera vez para visualizar *in vivo* una región hipóxica asociada a la enfermedad arterial periférica.

ANEXO

Publicaciones



Artículos derivados de esta tesis doctoral

Gómez-Lado, N.; López-Arias, E.; Iglesias-Rey, R.; Díaz-Platas, L.; Medín-Aguerre, S.; Fernández-Ferreiro, A.; Posado-Fernández, A.; García-Varela, L.; Rodríguez-Pérez, M.; Campos, F.; Del Pino, P.; Ruibal, Á.; Pardo-Montero, J.; Castillo, J.; Aguiar, P. & Sobrino, T. (2020). [^{18}F]-FMISO PET/MRI imaging shows ischemic tissue around hematoma in intracerebral hemorrhage. *Molecular Pharmaceutics*, 17 (12): 4667-4675.

Gómez-Lado, N.; Rey-Bretal, D.; Piñeiro-Fiel, M.; Medín-Aguerre, S.; Díaz-Platas, L.; Fernández-Ferreiro, A.; Ruibal, Á.; Caicedo, D. & Aguiar, P. (*Submitted*). Longitudinal PET/SPECT evaluation of hypoxic tissue, inflammation and perfusion in a hindlimb ischemia rat model.

Artículos publicados

Fernández-Ferreiro, A.; Silva-Rodríguez, J.; Otero-Espinar, F. J.; González-Barcia, M.; Lamas, M. J.; Ruibal, Á.; Luaces-Rodríguez, A.; Vieites-Prado, A.; Lema, I.; Herranz, M.; **Gómez-Lado, N.**; Blanco-Méndez, J.; Gil-Martínez, M.; Pardo, M.; Moscoso, A.; Cortés, J.; Sánchez-Martínez, M.; Pardo-Montero, J. & Aguiar, P. (2017). *In vivo* eye surface residence determination by high-resolution scintigraphy of a novel ion-sensitive hydrogel based on gellan gum and kappa-carrageenan. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 114: 317-323.

Goyanes, Á.; Fernández-Ferreiro, A.; Majeed, A.; **Gómez-Lado, N.**; Awad, A.; Luaces-Rodríguez, A.; Gaisford, S.; Aguiar, P. & Basit, A. W. (2018). PET/CT imaging of 3D printed devices in the gastrointestinal tract of rodents. *International Journal of Pharmaceutics*, 536 (1): 158-164.

Luaces-Rodríguez, A.; Touriño-Peralba, R.; Alonso-Rodríguez, I.; García-Otero, X.; González-Barcia, M.; Rodríguez-Ares, M. T.; Martínez-Pérez, L.; Aguiar, P.; **Gómez-Lado, N.**; Silva-Rodríguez, J.; Herranz, M.; Ruibal,



Á.; Lamas, M. J.; Otero-Espinar, F. J. & Fernández-Ferreiro, A. (2018). Preclinical characterization and clinical evaluation of tacrolimus eye drops. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 120: 152-161.

Seoane-Viaño, I.; **Gómez-Lado, N.**; Lázare-Iglesias, H.; Barreiro-de Acosta, M.; Silva-Rodríguez, J.; Luzardo-Álvarez, A.; Herranz, M.; Otero-Espinar, F.; Antúnez-López, J. R.; Lamas, M. J.; Aguiar, P.; Fernández-Ferreiro, A. Ruibal, Á. (2018). Longitudinal PET/CT evaluation of TNBS-induced inflammatory bowel disease rat model. *International Journal of Pharmaceutics*, 549 (1-2): 335-342.

Leira, Y.; Iglesias-Rey, R.; **Gómez-Lado, N.**; Aguiar, P.; Campos, F.; D'Aiuto, F.; Castillo, J.; Blanco, J. & Sobrino, T. (2019). Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced periodontitis and serum amyloid-beta peptides. *Archives of Oral Biology*, 99: 120-125.

Moscoso, A.; Silva-Rodríguez, J.; Aldrey, J. M.; Cortés, J.; Fernández-Ferreiro, A.; **Gómez-Lado, N.**; Ruibal, Á. & Aguiar, P.; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2019). Prediction of Alzheimer's disease dementia with MRI beyond the short-term: Implications for the design of predictive models. *Neuroimage Clinical*, 23: 101837.

Moscoso, A.; Silva-Rodríguez, J.; Aldrey, J. M.; Cortés, J.; Fernández-Ferreiro, A.; **Gómez-Lado, N.**; Ruibal, Á. & Aguiar, P.; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2019). Staging the cognitive continuum in prodromal Alzheimer's disease with episodic memory. *Neurobiology of Aging*, 84: 1-8.

Leira, Y.; Iglesias-Rey, R.; **Gómez-Lado, N.**; Aguiar, P.; Sobrino, T.; D'Aiuto, F.; Castillo, J.; Blanco, J. & Campos, F. (2019). Periodontitis and vascular inflammatory biomarkers: an experimental *in vivo* study in rats. *Odontology*, 108 (2): 202-212.



Folgueira, C.; Beiroa, D.; Porteiro, B.; Duquenne, M.; Puighermanal, E.; Fondevila, M. F.; Barja-Fernández, S.; Gallego, R.; Hernández-Bautista, R.; Castelao, C.; Senra, A.; Seoane, P.; **Gómez-Lado, N.**; Aguiar, P.; Guallar, D.; Fidalgo, M.; Romero-Pico, A.; Adan, R.; Blouet, C.; Labandeira-García, J. L.; Jeanrenaud, F.; Kallo, I.; Liposits, Z.; Salvador, J.; Prevot, V.; Diéguez, C.; López, M.; Valjent, E.; Frühbeck, G.; Seoane, L. M. & Nogueiras, R. (2019). Hypothalamic dopamine signaling regulates brown fat thermogenesis. *Nature Metabolism*, 1 (8): 811-829.

Seoane-Viaño, I.; **Gómez-Lado, N.**; Lázare-Iglesias, H.; Rey-Bretal, D.; Lamela-Gómez, I.; Otero-Espinar, F. J.; Blanco-Méndez, J.; Antúnez-López, J. R.; Pombo-Pasín, M.; Aguiar, P.; Ruibal, Á.; Luzardo-Álvarez, A. & Fernández-Ferreiro, A. (2019). Evaluation of the therapeutic activity of melatonin and resveratrol in inflammatory bowel disease: A longitudinal PET/CT study in an animal model. *International Journal of Pharmaceutics*, 572: 118713.

Gómez-Lado, N.; Seoane-Viaño, I.; Matiz, S.; Madla, C. M.; Yadav, V.; Aguiar, P.; Basit, A. W. & Goyanes, Á. (2020). Gastrointestinal tracking and gastric emptying of coated capsules in rats with or without sedation using CT imaging. *Pharmaceutics*, 12 (1): 81.

Luaces-Rodríguez, A.; Del Amo, E. M.; Mondelo-García, C.; **Gómez-Lado, N.**; González, F.; Ruibal, Á.; González-Barcia, M.; Zarra-Ferro, I.; Otero-Espinar, F. J.; Fernández-Ferreiro, A. & Aguiar, P. (2020). PET study of ocular and blood pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab and aflibercept in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 154: 330-337.

Rey-Bretal, D.; Moscoso, A.; **Gómez-Lado, N.**; Fernández-Ferreiro, A.; Silva-Rodríguez, J.; Ruibal, Á. & Aguiar, P. (2020). Feasibility of longitudinal



brain PET with real-time Arterial Input Function in rats. *Molecular Imaging and Biology*, 23 (3): 350-360.

Piñeiro-Fiel, M.; Moscoso, A.; Lado-Cacheiro, L.; Pombo-Pasín, M.; Rey-Bretal, D.; **Gómez-Lado, N.**; Mondelo-García, C.; Silva-Rodríguez, J.; Pubul, V.; Sánchez, M.; Ruibal, Á. & Aguiar, P. (2020). Is FDG-PET texture analysis related to intratumor biological heterogeneity in lung cancer? *European Radiology*, 31 (6): 4156-4165.

Seoane-Viaño, I.; **Gómez-Lado, N.**; Lázare-Iglesias, H.; García-Otero, X.; Antúnez-López, J. R.; Ruibal, Á.; Varela-Correa, J. J.; Aguiar, P.; Basit, A. W.; Otero-Espinar, F. J.; González-Barcia, M.; Goyanes, Á.; Luzardo-Álvarez, A. & Fernández-Ferreiro, A. (2020). 3D printed tacrolimus rectal formulations ameliorate colitis in an experimental animal model of inflammatory bowel disease. *Biomedicines*, 8 (12): 563.

Martínez-Ordoñez, A.; Seoane, S.; Avila, L.; Eiro, N.; Macía, M.; Arias, E.; Pereira, F.; García-Caballero, T.; **Gómez-Lado, N.**; Aguiar, P.; Vizoso, F. & Pérez-Fernández, R. (2021). POU1F1 transcription factor induces metabolic reprogramming and breast cancer progression via LDHA regulation. *Oncogene*, 40 (15): 2725-2740.

Díez-Villares, S.; Pellico, J.; **Gómez-Lado, N.**; Grijalvo, S.; Alijas, S.; Eritja, R.; Herranz, F.; Aguiar, P. & de la Fuente, M. (2021). Biodistribution of ^{68/67}Ga-radiolabeled sphingolipid nanoemulsions by PET and SPECT imaging. *International Journal of Nanomedicine*, 16: 5923-5935.

