ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

DAVID
REY BRETAL

Tesis doctoral

# DESARROLLO DE NUEVOS PROTOCOLOS DE PET CEREBRAL PRECLÍNICO PARA EL ESTUDIO DE TUMORES CEREBRALES

Santiago de Compostela, 2022

**Programa de doctorado en Neurociencia y Psicología Clínica**

CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESIS DOCTORAL

# DESARROLLO DE NUEVOS PROTOCOLOS DE PET CEREBRAL PRECLÍNICO PARA EL ESTUDIO DE TUMORES CEREBRALES

DAVID REY BRETAL

**ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN NEUROCIENCIA Y PSICOLOGÍA CLÍNICA**

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2022

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

# DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

DESARROLLO DE NUEVOS PROTOCOLOS DE PET CEREBRAL PRECLÍNICO PARA EL ESTUDIO DE TUMORES CEREBRALES

D. David Rey Bretal

Presento mi tesis en base a la modalidad Monográfica con reproducción parcial o total de publicaciones, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

*En Santiago de Compostela, 16 de marzo de 2022*

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

# AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

DESARROLLO DE NUEVOS PROTOCOLOS DE PET CEREBRAL PRECLÍNICO PARA EL ESTUDIO DE TUMORES CEREBRALES

Prof. Pablo Aguiar Fernández
Prof. Álvaro Ruibal Morell

INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D. David Rey Bretal, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne l os requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación del doctorando fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

*En Santiago de Compostela, 16 de marzo de 2022*

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

# AGRADECIMIENTOS

Agradecer sempre é grato, tanto para o que agradece como para o que é agradecido, pero non é unha tarefa sinxela lembrarse de todos os que che axudaron durante o camiño. Polo tanto, comezo desculpándome por todos aqueles que non se atopen nestas liñas e que si deberían estalo.

É obrigatorio comezar coa familia: meus pais, Ángela e José Manuel, os meus avós, Juan (a miña imaxe a seguir) e Angelita e a José e Juanita. Os seis son os fundamentos da miña personalidade. Contan que os primeiros anos da túa vida son determinantes para xerar a túa personalidade e que ata a adolescencia esa influencia está moi latente. Nesta familia o día a día é unha ensinanza constante: unha aprendizaxe continua, neste caso, a chave é ensinar e aprender sen notalo. Cando miro recordos de cando era cativo é o que sinto. Pode que eles non sexan conscientes, pero son os responsables da miña interese constante por adquirir coñecementos. Nunca lles poderei agradecer o suficiente o seu legado: discreción, humildade, naturalidade, constancia e devoción. Neste parágrafo tamén me gustaría facer unha especial alusión a Juan e a Ana, os cales sempre me trataron coma un fillo máis, coidándome e animándome para que ningunha barreira me deteña. A estas ensinanzas de coñecementos e valores únense outros familiares que non foron menos importante e cuxa lista é interminable, a todos eles, gracias.

Sen cambiar directamente de tema é necesario un apartado especial, gustaríame agradecerlle ao meu imán todos estes anos xuntos. Todo o mundo pensa que temos unha relación especial, tendo en conta o ben que nos levamos para ter unha diferencia de idade de case 9 anos pero, aínda que el non sexa consciente disto, foi e será un pilar fundamental na obtención deste recoñecemento. A nosa paixón polos videoxogos uniunos e separounos de igual maneira, os enfados constantes por ver quen gañaba ou perdía foron parte do proceso, o cal recordo con agarimo. Lembra que podes conseguir o que desexes e, nos teus momentos máis baixos, terás un irmán sempre para o que necesites.

Da miña educación, dende infantil ata secundaria, teño especiais recordos. Unha das mellores cousas que me sucedeu foi coñecer amizades incribles durante esas etapas. É certo que con grandes amigos, por motivos de traballo e estudos, a distancia provocou un afastamento da nosa relación pero, aínda así, recordo eses momentos con gran estima, a todos gracias por formar parte deste camiño. Agradecerlle aos meus amigos a gran influencia que tiveron en min durante todos estes anos, principalmente a Martín e Bea, a Tekken e Nerea, e a Marta. O feito de que se caractericen por un gran nivel intelectual e humano obríganme a intentar poñerme ao seu nivel, aínda que para iso, aínda falta…

Antes de comezar a universidade aventureime no mundo da Formación Profesional, un sistema educativo moi ben estruturado que me permitiu adquirir coñecementos tanto de tipo teórico como de tipo práctico, dando un enfoque moi importante ás competencias que deben adquirir os futuros técnicos superiores. Durante este período coñecín a Berto, un gran amigo que me acompañou ata a universidade. A súa competitividade principalmente nos deportes, xunto coa miña, eran un cóctel explosivo de pique tras pique. Teño que recoñecer que no que respecta aos deportes, só lembro gañarlle unha vez, algo que teño que mellorar en próximos partidos de tenis…

O meu interese pola investigación comezou neste intre, levado da man de dous grandes docentes e investigadores cos que tiven a oportunidade de facer as prácticas do ciclo, a Dra. Rosalía Gallego e o Dr. Tomás García-Caballero. Sen dúbida, son eles os responsables de que

este facendo a tese de doutoramento, con estas palabras quero agradecer o bo trato que me brindáchedes durante os meses de prácticas e as palabras de motivación que me dades cada vez que nos atopamos de novo. Espero que con este traballo esteades orgullosos do que conseguíchedes, motivar a un rapaz a intentar chegar ao máis alto nivel educativo.

Dende pequeno sempre quixen ser Fisioterapeuta, é máis, teño escritos da escola onde especificaba querer ser Fisioterapeuta do Real Madrid. Entre unhas cousas e outras, as ideas cambian, ás veces por mor de malos consellos do profesorado, e foi por iso polo que en bacharelato cambiei a miña idea de Fisioterapia por Medicina. A esixencia que me levou alcanzar notas moi altas acabou danando a miña saúde, derivando no que aínda fai poucos anos me diagnosticaron como migrañas vestibulais, o que por aquel entón eran simples vértigos. Con todo isto, e tras finalizar o ciclo, cabezota coma eu so, volvín a facer a antiga PAU para, outra vez, intentar estudar Medicina. De novo, non puido ser e, sinceramente, alégrome que así fora, anos despois percataríame que non estaba feito para ser médico, pero si para unha profesión moito máis próxima e centrada no benestar do enfermo, como é o caso da Enfermaría.

Xa embarcado no mundo universitario fixen grandes amizades. Ao igual que pasa en todos os casos, de novo, a distancia e tomar camiños distintos fixo que separásemos o marabilloso grupo de "Enfermeruchos", aínda que non foi así con todos. A Xaime teño que agradecerlle todo. Unha belísima persoa que, coma el diría: "Fuches o gran descubrimento de Enfermaría". Sen dúbida, es e serás a persoa máis importante dese período académico, máis ca un amigo, considérote un irmán, unha persoa na que podo confiar cegamente. Aínda que non che fai falta, deséxoche o mellor, serás, sen dúbida, o mellor enfermeiro comunitario da historia.

No ámbito docente, gustaríame destacar a varios profesores que me marcaron especialmente e que me axudaron durante o meu período de doutoramento. A Raquel Rodríguez, polos teus consellos, por ensinarme todo o entramado que existe tras a docencia universitaria, moitas gracias por invertir todo ese tempo en min. A Marcos Pazos, María Isabel Pérez, Silvia Novio, Pedro Faraldo e Chus, por confiar en min e darme a oportunidade de ser cotutor e docente dos alumnos, tanto de TFG como da especialidade Obstétrico Xinecolóxica, unha experiencia que gardo con agarimo e que sen vos, non sería posible. Para rematar neste apartado, gustaríame facer mención a Ana María Míguez que sempre confiou en min e quero agradecerlle todas as boas palabras que tivo durante os nosos encontros. Espero, algún día, poder devolvervos o favor a todos e axudarvos tanto como o fixéchedes comigo.

Ao rematar o grao, aventureime, gracias a unha recomendación dun dos meus directores de tese, a facer o máster de Neurociencias co obxectivo de seguir os meus estudos enfocados na tese de doutoramento. Nesta etapa, coñecín a tres grandísimas persoas, ás que aínda hoxe en día comparto unha moi boa amizade. A Patri, Natalia e Paulo, polos vosos ánimos, por compartir a dureza deste proceso educativo e ser unhas belísimas persoas, foi unha honra coñecervos.

Chegados á tese de doutoramento, gustaríame facer os agradecementos pertinentes aos meus directores, ao Dr. Álvaro Ruibal Morell e ao Dr. Pablo Aguiar Fernández, os cales fixéronme un oco nas súas desbordadas axendas para guiarme no meu período doutoral. Eles ensináronme as entrañas da investigación e a necesidade de compartir o que aprendes. Abríronme as portas sen dubidar nin un segundo, aínda que un enfermeiro non fora o perfil habitual dun investigador e, gracias a eles, aprendín un método de traballo conciso e constante. Que dúas eminencias coma eles me tratasen coma un máis enorgulleceume e alentoume dende o primeiro día. Gracias de corazón.

Por suposto, toda esta aventura non sería posible sen un marabilloso grupo de investigación, responsables de que todo funcione o mellor posible. A Noemí, pola súa dedicación desinteresada que me brindou ao logo de todo este proceso. Fuches unha gran mestra, aínda que non che guste a docencia. Sen ti, a metade desta tese non se podería levar a cabo. Gracias polo teu tempo e paciencia. A Manu, o gran triatleta e futuro medallista olímpico, un exemplo de constancia e dedicación en todos os sentidos, espero que cando sexa famoso se siga acordando de nos coma o primeiro día. A Xurxo, polo seu compromiso coa investigación, unha persoa na que podes confiar, está claro que con el os estudos van a ser un éxito. A Cris, a nosa Juan Rodés, un exemplo de traballo e esforzo, é incrible que siga tomando o café cos mortais despois de conseguir o contrato. A Iria, unha gran investigadora, unha pena que sexa un desastre xogando ao pádel. Ao gran fichaxe, Alejandro, tamén coñecido como Alejandro III de Macedonia, colega de ximnasio, gran amante do anime e do manga e, principalmente, da historia de Roma, sigo pensando que se confundiu de traballo, debería ser historiador. Á última incorporación, Andrea, belísima persoa e mellor investigadora, deséxoche o mellor nesta nova etapa. A Alexis, Jesús, Lara, Anxo e Andrea L., por ser uns referentes para min en moitos aspectos, senón en todos. Espero que a nosa relación continúe tan produtiva tanto a nivel investigador como persoal e que, ao longo desta viaxe, fora capaz de demostrarvos o agradecido que estou polo voso apoio.

Conta unha lenda oriental que as persoas destinadas a coñecerse están conectadas por un fío vermello invisible o cal nunca desaparece e permanece constantemente atado aos dedos a pesar do tempo e a distancia. Non importa o que tardes en coñecer a dita persoa, nin importa o tempo que pases sen vela, o fío estirarase ata o infinito, pero nunca romperá. Con esta lenda, gustaríame rematar estes agradecementos á miña compañeira de vida, á persoa máis importante que me leva aturando dende 2010 e que toda esta viaxe non tería sentido sen ela. Estas palabras van dirixidas a ela, á persoa que máis admiro e da que me sinto máis orgulloso por todo o que conseguiu dende que a coñezo. Crecín en todos os aspectos xunto e gracias a ela. Un exemplo de paciencia e tranquilidade, preparada sempre para escoitar, axudar e traballar. Sen dúbida a mellor mestra que poderá existir. Estas palabras van dirixidas a ti Sarola, quérote.

Moitas gracias a todos, que a forza vos acompañe.

David

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

*“Never say never,*
*because limits, like fears,*
*are often just an illusion”.*

*Michael Jordan*

*“I tried to be someone else*
*But nothing seemed to change*
*I know now, this is who I really am inside*
*I've finally found myself*
*Fighting for a chance*
*I know now, this is who I really am”.*

*The Kill - 30 Seconds to Mars*

*“I've become so numb*
*I can't feel you there*
*Become so tired*
*So much more aware*
*I'm becoming this*
*All I want to do*
*Is be more like me*
*And be less like you”.*

*Numb - Linkin Park*

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

# CONTENIDOS

**RESUMEN** ..... **- 15 -**

**ABSTRACT** ..... **- 21 -**

**RESUMO** ..... **- 27 -**

**ABREVIATURAS** ..... **- 33 -**

**CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL** ..... **- 37 -**

1. BASES Y FUNDAMENTOS FÍSICOS DE LA MEDICINA NUCLEAR ..... - 39 -
   *1.1. ORÍGENES DE LA MEDICINA NUCLEAR* ..... *- 39 -*
   *1.2. ESTRUCTURA BÁSICA DE LA MATERIA* ..... *- 40 -*
   *1.3. RADIACTIVIDAD Y REACCIONES NUCLEARES* ..... *- 41 -*
   *1.4. DEFINICIÓN Y BASES DEL USO DE RADIOFÁRMACOS* ..... *- 43 -*
   *1.5. FUNDAMENTOS DE PROTECCIÓN RADIOLÓGICA* ..... *- 45 -*
2. INTRODUCCIÓN A LA PET ..... - 48 -
   *2.1. BASES FÍSICAS* ..... *- 48 -*
   *2.2. INDICACIONES CLÍNICAS DE LA PET* ..... *- 50 -*
   *2.3. BASES DE LA PET PRECLÍNICA* ..... *- 53 -*
   *2.4. ANATOMÍA Y ESTUDIO DE LA IMAGEN MOLECULAR PRECLÍNICA DE PET CEREBRAL* ..... *- 56 -*
   *2.5. MODELOS ANIMALES DE TUMORES CEREBRALES* ..... *- 57 -*
   *2.6. LIMITACIONES PARA EL ESTUDIO DE MODELOS DE TUMORES CEREBRALES CON PET PRECLÍNICO* ..... *- 62 -*
3. PRINCIPIOS DE LA NEOPLASIA CEREBRAL: EL GLIOMA ..... - 63 -
   *3.1.DEFINICIÓN DE GLIOMA* ..... *- 63 -*
   *3.2.EPIDEMIOLOGÍA* ..... *- 64 -*
   *3.3.FISIOPATOLOGÍA DE LOS GLIOMAS* ..... *- 65 -*
   *3.4.FACTORES DE RIESGO Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS* ..... *- 66 -*
   *3.5.MÉTODO DIAGNÓSTICO* ..... *- 68 -*
   *3.6.TRATAMIENTO Y EVOLUCIÓN DE LA SINTOMATOLOGÍA* ..... *- 73 -*
4. REFERENCIAS ..... - 76 -

**CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS GENERALES** ..... **- 85 -**

1. JUSTIFICACIÓN ..... - 87 -
2. OBJETIVOS ..... - 89 -

**CAPÍTULO III: MEDIDAS DE ARTERIAL INPUT FUNCTION EN TIEMPO REAL PARA ESTUDIOS DE PET CEREBRAL DINÁMICOS** ..... **- 91 -**

1. RESUMEN ..... - 93 -
2. INTRODUCCIÓN ..... - 95 -
3. MATERIAL Y MÉTODOS ..... - 97 -
4. RESULTADOS ..... - 105 -
5. DISCUSIÓN ..... - 110 -
6. CONCLUSIÓN ..... - 111 -

7. AGRADECIMIENTOS ..... - 112 -
8. CONFLICTOS DE INTERÉS ..... - 112 -
9. CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES ..... - 112 -
10. REFERENCIAS ..... - 113 -

**CAPÍTULO IV: VIABILIDAD DE ESTUDIOS LONGITUDINALES DE PET CEREBRAL DINÁMICO CON MEDIDAS EN TIEMPO REAL DE ARTERIAL INPUT FUNCTION ..... - 115 -**

1. RESUMEN ..... - 117 -
2. INTRODUCCIÓN ..... - 119 -
3. MATERIAL Y MÉTODOS ..... - 120 -
4. RESULTADOS ..... - 123 -
5. DISCUSIÓN ..... - 128 -
6. CONCLUSIONES ..... - 130 -
7. AGRADECIMIENTOS ..... - 130 -
8. CONFLICTOS DE INTERÉS ..... - 130 -
9. CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES ..... - 130 -
10. REFERENCIAS ..... - 131 -

**CAPÍTULO V: EFECTO DEL NIVEL DE GLUCOSA EN SANGRE SOBRE LA CUANTIFICACIÓN DE ESTUDIOS DE PET CEREBRAL DINÁMICOS ..... - 135 -**

1. RESUMEN ..... - 137 -
2. INTRODUCCIÓN ..... - 139 -
3. MATERIAL Y MÉTODOS ..... - 140 -
4. RESULTADOS ..... - 142 -
5. DISCUSIÓN ..... - 146 -
6. CONCLUSIONES ..... - 149 -
7. AGRADECIMIENTOS ..... - 149 -
8. CONFLICTOS DE INTERÉS ..... - 149 -
9. CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES ..... - 149 -
10. REFERENCIAS ..... - 150 -

**CAPÍTULO VI: CUANTIFICACIÓN DE ESTUDIOS DE PET CEREBRAL DINÁMICO EN MODELOS DE TUMORES CEREBRALES ..... - 155 -**

1. RESUMEN ..... - 157 -
2. INTRODUCCIÓN ..... - 159 -
3. MATERIAL Y MÉTODOS ..... - 160 -
4. RESULTADOS ..... - 164 -
5. DISCUSIÓN ..... - 168 -
6. CONCLUSIONES ..... - 170 -
7. AGRADECIMIENTOS ..... - 170 -
8. CONFLICTOS DE INTERÉS ..... - 170 -
9. CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES ..... - 171 -
10. REFERENCIAS ..... - 172 -
11. ANEXOS ..... - 175 -

**CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN GENERAL ..... - 177 -**

**CAPÍTULO VIII: CONCLUSIONES GENERALES ..... - 183 -**

**LISTA DE PUBLICACIONES ..... - 187 -**

USC UNIVERSIDADE

# RESUMEN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

## RESUMEN

La patología cerebral abarca una gran diversidad de afectaciones entre las que se encuentran las neoplasias. En España, la última estimación hace referencia a que en 2021 se alcanzó una cifra de 276.239 pacientes con tumores, de los cuales, el 2% representó neoplasias primarias del sistema nervioso central en el adulto y un 15% en los menores de 15 años clasificando, este último dato, como la segunda causa de mortalidad por tumores cerebrales pediátricos después de la leucemia. Con esta información se puede constatar que las neoplasias cerebrales en la edad adulta son poco frecuentes, representando una incidencia mayor en los varones (55%). En todos estos porcentajes, los meningiomas y los gliomas son los más comunes.

Por otro lado, las metástasis son las neoplasias más frecuentes en el sistema nervioso central, entre los que destacan como principales factores de riesgo los pacientes con tumores mamarios, pulmonares y dérmicos, debido a su alto grado de metastatización. Aún así, la mayor parte de los tumores cerebrales tiene un carácter benigno (66%), aunque dichos tumores, por complicaciones ajenas a esta afectación, no son confirmados mediante histología, lo que la incidencia de tumores malignos podría estar cerca del 34% de la totalidad. En este caso las neoplasias malignas más frecuentes son el glioblastoma (3,2 por 100.000 habitantes), astrocitoma de grado III (0,51 por 100.000 habitantes) y el linfoma (0,43 por 100.000 habitantes).

Con esta premisa, se denomina glioma al crecimiento incontrolado de las células gliales que se origina en el parénquima encefálico, las cuales pueden afectar también a la médula espinal. Estas células gliales son esenciales en el correcto funcionamiento del sistema nervioso, cuya función es aportar soporte a las células cerebrales, las neuronas. Los gliomas se clasificarán dependiendo del tipo de célula glial que esté involucrado en el desarrollo del tumor, así como de sus características genéticas. Por lo tanto, dentro de este tipo de patología, se pueden diferenciar tres tipos de tumores gliales: Astrocitoma, que a su vez incluyen astrocitomas, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas; Ependimoma, formadas por ependimomas anaplásicos, ependimomas mixopapilares y gliomas subependimarios; Oligodendroglioma, formado por oligodendrogliomas, oligodendrogliomas anaplásicos y oligoastrocitoma anaplásico.

Este tipo de tumores se desarrollan en el propio tejido intraparenquimatoso de forma difusa, sin estar totalmente delimitados del resto del parénquima. Su rápido crecimiento y la agresión del tejido normal circundante acaba afectando en la producción de una reacción denominada edema cerebral, lo que supone un peor funcionamiento a nivel neuronal y, por tanto, el aumento del volumen intracraneal. Todo esto conlleva el rápido crecimiento de la patología, lo que hace que, en sus zonas más internas, la llegada de la circulación sanguínea se vea comprometida, derivando en un proceso denominado como muerte celular o necrosis.

Estos tumores van a provocar dos tipos de sintomatologías: debido a la situación de hipertensión intracraneal que genera el crecimiento del tumor dentro del cráneo produce una sintomatología de cefalea, náuseas, vómitos y edema papilar y, de una forma progresiva, se afectará el nivel de conciencia; por otro lado, los síntomas focales pueden ser por déficit funcional, dependiendo de la localización tumoral y por irritación y exceso de función, lo que deriva en epilepsia parcial o focal. Dichos déficits neurológicos, al mismo tiempo, van a verse más o menos desarrollados dependiendo de la región del cerebro donde se inicia el desarrollo de la patología neuronal, al mismo tiempo que van a depender o no de que afecte a las zonas silentes del cerebro.

Las pruebas diagnósticas se utilizan en dos fases, la primera para conocer la tipología de la neoplasia y la segunda, para comenzar la línea terapéutica que se llevará a cabo dependiendo del lugar y tipo de tumor. Si se sospecha de una neoplasia cerebral se realizarán una serie de pruebas y procedimientos como un examen neurológico o pruebas diagnósticas por imagen como la Resonancia Magnética (MR), la Tomografía Computarizada (CT) y la Tomografía por Emisión de Positrones (PET). Además del diagnóstico por imagen, suele ser común realizar un diagnóstico diferencial. Como último recurso, y que hoy en día no es habitual, se encuentra el diagnóstico quirúrgico, aunque la aparición de las técnicas por imagen ha provocado que la detección de los tumores cerebrales se realice de una manera más precoz que hace 20 años. Por consiguiente, se está cambiando la visión neuroquirúrgica de estas afectaciones, ya que los tumores se diagnostican con menor tamaño y, por lo tanto, con menos lesiones neurológicas.

El tratamiento usado para la neoplasia del glioma depende del tipo, tamaño, grado y ubicación del mismo, así como de otros factores como la edad, el estado funcional del paciente, los antecedentes personales y los resultados de las pruebas hematológicas. Las medidas que se aplican en los distintos subtipos de gliomas recién diagnosticados son la extirpación del tumor mediante cirugía acompañada de terapias que reduzcan los signos y los síntomas causados por el tumor, como la quimioterapia y radioterapia, principalmente. Sin embargo, estos tratamientos convencionales son poco específicos, no siempre son efectivos y muy frecuentemente están acompañados de efectos adversos, por lo que resultaría interesante encontrar alternativas y tratamientos que sean más tolerables.

Para ello es fundamental el uso de la investigación preclínica, debido a la falta de opciones para evitar el uso de animales de investigación. Los modelos de pequeños animales representan un puente crítico entre el descubrimiento a nivel molecular y la implementación de nuevos diagnósticos o de nuevos tratamientos clínicos, de una forma relevante. En etapas preclínicas del estudio de nuevas terapias es común el uso de animales de experimentación para estudiar la eficacia *in vivo* de nuevos tratamientos y compararlos, si es posible, con las terapias vigentes en la práctica clínica. En este ámbito, es común el uso de técnicas de imagen molecular preclínica como el PET, que permiten, entre otras cosas, realizar un análisis del metabolismo cerebral, por ejemplo, en modelos animales a los que se le ha inducido un tumor cerebral. El desarrollo de protocolos de adquisición y métodos de cuantificación adecuados para el estudio de glioma es fundamental, pues se trata de experimentos de una alta complejidad y que requieren de

condiciones muy bien definidas para que las medidas obtenidas sean fiables. Por otro lado, los modelos animales varían entre la inducción química y el trasplante de células tumorales directamente en la región seleccionada, caracterizándose este último por tener un período de latencia más corto, un mejor control sobre la localización del tumor, produciendo neoplasias únicas e involucrando un coste menor. Una de las principales limitaciones de las técnicas de imagen preclínica PET es la estimación de la concentración del radiofármaco en sangre, que es fundamental para medir la actividad de radiofármaco que llega al tumor y la cantidad que continúa en circulación durante el procedimiento diagnóstico. Los métodos actuales de detección del contaje de trazador en circulación se limitan a la obtención, mediante contaje por goteo manual, del trazador de una forma muy rudimentaria, el cual limita la técnica. En los últimos años se han propuesto otros mecanismos, como la circulación extracorpórea, que reducirían los niveles de radiación manipulados por el investigador, y permitirían llevar a cabo nuevas estrategias terapéuticas ante patologías como el glioma. En este aspecto, dispositivos complementarios al PET como el equipo Swisstrace Twilite Two, aportan la tecnología necesaria para realizar un contaje en tiempo real de la cantidad de radiofármaco en la sangre a través de la mencionada circulación extracorpórea.

Con el fin último de evaluar alternativas terapéuticas para el tratamiento de los tumores cerebrales como los gliomas, en la presente tesis doctoral se desarrolló y validó un protocolo de cirugía extracorpórea para cuantificar el metabolismo cerebral con $^{18}$F-fluorodesoxiglucosa (FDG) y, posteriormente, se realizaron estudios del metabolismo de la glucosa mediante PET con FDG en animales con diferentes niveles de glucemia. En la segunda parte de la tesis se desarrolló un modelo animal de glioblastoma para validar una nueva técnica de imagen PET con anticuerpos radiomarcados con $^{89}$Zr y estudiar la evolución del tumor.

En primer lugar, respecto al estudio del nuevo protocolo de cirugía extracorpórea, se estudió la viabilidad de las derivaciones arterio-venosas dobles en ratas en la región inguinal y se analizaron las reproducibilidades de la Arterial Input Function (AIF) inter-animal e intra-animal. Se realizaron estudios dinámicos de FDG PET cerebral para estimar las constantes cinéticas y la tasa metabólica cerebral de la glucosa, las cuales se obtuvieron a partir del análisis estándar de dos compartimentos tisulares y de Patlak. Los resultados demostraron que las AIF longitudinales de las derivaciones arterio-venosas dobles pueden obtenerse con un éxito muy alto en las cirugías. Además, proporcionaron mediciones de AIF con una alta reproducibilidad tanto inter-animal como intra-animal, incluidos en los modelos cinéticos. En vista de los resultados obtenidos, se puede comentar que se ha demostrado la viabilidad y la alta reproducibilidad de llevar a cabo mediciones de AIF longitudinales y, por tanto, de un modelado cinético preciso utilizando el protocolo de la derivación arterial propuesto.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En segundo lugar, se seleccionaron tres grupos experimentales con diferentes rangos de glucemia: normal, hiperglucemia e hipoglucemia. Los resultados manifestaron que todos los protocolos juntos conducen a un amplio rango del nivel de glucosa dependiendo de las condiciones. En la cuantificación se mostró que el metabolismo cerebral global

aumenta claramente entre los animales de glucagón y los de control y entre los de control y los de insulina. Con respecto a la modelización, los resultados muestran que el ajuste fue mejor cuando se utilizó el nivel de glucosa medido antes de la inyección de FDG. En el caso de la cuantificación regional, se confirmó que no hay diferencias significativas en el metabolismo de todo el cerebro, no obstante, los resultados mostraron que el metabolismo en las regiones del mesencéfalo y del cerebro central está ligeramente aumentado/disminuido con respecto a otras regiones del cerebro. De esta manera se puede exponer la importancia de la corrección de los datos de PET por el nivel de glucosa en sangre.

En tercer y último lugar, se indujeron modelos de glioblastoma mediante la inyección de células F98 en la región frontal del cerebro. A continuación, se inyectó a los animales $^{89}$Zr-Bevacizumab o $^{89}$Zr-Aflibercept y se realizaron múltiples exploraciones PET de seguimiento tras la inducción del tumor. Los resultados mostraron que $^{89}$Zr-Bevacizumab presentaba una relación tumor-cerebro alta, sin embargo, el $^{89}$Zr-Aflibercept no atravesó la barrera hematoencefálica, por lo que no mostró ninguna captación en el interior del tumor. A nivel sistémico, la tasa de eliminación de los dos antiVEGF fue similar. $^{89}$Zr-Aflibercept mostró un mayor SUV en el hígado que en la primera exploración con $^{89}$Zr-Bevacizumab. Por todo esto, los resultados sugieren que el Bevacizumab permanece en circulación sanguínea durante un período de tiempo más largo, teniendo la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica en fases tempranas del desarrollo del tumor, siendo una terapia antiVEGF más adecuada para tratar los glioblastomas que el Aflibercept.

A modo de conclusión general, se puede comentar que la imagen molecular PET es una herramienta traslacional de gran utilidad para la preparación y evaluación de nuevos tratamientos en el campo de los tumores cerebrales. En la primera parte de la tesis hemos ampliado el conocimiento sobre el metabolismo cerebral y, así, ser más preciso a la hora de realizar estudios con anticuerpos para aplicar nuevas terapias ante patologías tumorales. Finalmente, los dos anticuerpos evaluados en esta tesis doctoral han demostrado, en el caso del Bevacizumab, una capacidad para incorporarse al tumor en estadios iniciales, a diferencia del Aflibercept, el cual no es capaz de penetrar en el tumor hasta estadios avanzados de la enfermedad, jugando un papel importante en las futuras terapias clínicas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# ABSTRACT

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

## ABSTRACT

Brain pathology encompasses a wide range of disorders, including neoplasms. In Spain, the latest estimate was of 276,239 patients with tumors in 2021, of which 2% represented primary neoplasms of the central nervous system in adults, and 15% in children under 15 years of age, which also represented the second cause of mortality in pediatric patients after leukemia. This information shows that brain neoplasms in adulthood are infrequent, with a higher incidence in males (55%). In all cases, meningiomas and gliomas are the most common.

On the other hand, metastases are the most frequent neoplasms in the central nervous system, mainly from primary tumors of breast, lung and dermal tumors, due to their high degree of metastaticity. Even so, many brain tumors are benign (66%), although these tumors, due to complications unrelated to this affectation, are not confirmed by histology, so that the incidence of malignant tumors could be close to 34% of the total cases. In this case, the most frequent malignant neoplasms are glioblastoma (3.2 per 100,000 inhabitants), grade III astrocytoma (0.51 per 100,000 inhabitants) and lymphoma (0.43 per 100,000 inhabitants).

According to this premise, glioma is the uncontrolled growth of glial cells originating in the brain parenchyma, which can also affect the spinal cord. These glial cells are essential for the proper functioning of the nervous system, whose function is to support the brain cells, the neurons. Gliomas will be classified depending on the type of glial cell involved in the development of the tumor, as well as its genetic profile. Therefore, gliomas can be classified into three types tumors: astrocytoma (consisting of astrocytoma, anaplastic astrocytoma and glioblastomas), ependymoma (consisting of anaplastic ependymomas, myxopapillary ependymomas and subependymal gliomas) and oligodendroglioma (consisting of oligodendrogliomas, anaplastic oligodendrogliomas and anaplastic oligoastrocytoma).

Gliomas follow a diffuse grow in the intraparenchymal tissue, without being completely delimited from the rest of the parenchyma. Their rapid growth and the aggression of the surrounding normal tissue ends up affecting the generation of a phenomenon called cerebral oedema, that is, impairment at the neuronal level and, therefore, increase in the intracranial volume. All this leads to the rapid growth of the pathology, such that blood circulation is compromised, resulting in cell death or necrosis.

Gliomas cause two types of symptomatology: due to the intracranial hypertension generated by the growth of the tumor inside the skull, the patients suffer from headache, nausea, vomiting and papillary edema and, progressively, the level of consciousness is also affected; on the other hand, the focal symptoms may be due to functional deficit depending on the tumor location, and due to excess of function, which leads to partial or focal epilepsy. These neurological deficits will be developed depending on the region of

the brain where the neuronal pathology begins, as well as depending on whether the silent areas of the brain are affected.

Diagnostic tests are used in two phases, the first to diagnose the type of neoplasm and the second to select the therapeutic line to be carried out, depending on the location and type of tumor. If a brain neoplasm is suspected, a series of tests and procedures will be carried out, such as neurological examination and diagnostic imaging tests, such as Magnetic Resonance Imaging (MRI), Computed Tomography (CT) and Positron Emission Tomography (PET). The advent of these imaging techniques has led to earlier detection of brain tumors than 20 years ago. Consequently, the neurosurgical view of these affectations is changing, as tumors are diagnosed at a smaller size and therefore with less neurological lesions.

The treatment used for glioma neoplasia depends on the type, size, grade, and location of the glioma, as well as other factors such as age, functional status of the patient, medical history, and hematological test results. The measures applied in the different subtypes of newly diagnosed gliomas are surgery (removal of the tumor), chemotherapy, and radiotherapy. However, the current treatments are unspecific, ineffective and have side effects, so it would be a good option to find alternatives and more targeted and effective treatments.

The use of preclinical research is essential, due to the lack of options to avoid the use of research animals. Small animal models represent a critical bridge between discovery at the molecular level and the implementation of new diagnostics or new clinical treatments. In the preclinical stages of new therapies, it is common to use experimental animals to study *in vivo* efficacy of the treatments and compare them with existing therapies in clinical practice. In this field, it is common to use preclinical molecular imaging techniques such as PET, which allow, among others, an analysis of the brain metabolism in animal models with brain tumors. The development of appropriate PET acquisition protocols and image quantification methods for the study of glioma is essential, as these experiments are highly complex and require well-defined conditions for reliable measurements. Moreover, animal models vary between chemical induction and transplantation of tumor cells directly into the selected region, the latter being characterized by a shorter latency period, better control over tumor localization, producing single neoplasms and involving lower cost. One of the main limitations of preclinical PET imaging techniques is the estimation of the concentration of the radiopharmaceutical in blood, which is essential to measure the radiopharmaceutical activity that reaches the tumor and the amount that remains in circulation during the diagnostic procedure. Current methods of detecting circulating radiopharmaceutical counts are limited to obtaining the tracer in a very rudimentary way by manual sampling, which limits the technique. In the last few years, other mechanisms have been proposed, such as extracorporeal circulation, which would reduce the levels of radiation manipulated by the researcher and would allow new therapeutic strategies to be implemented for pathologies such as glioma. For that reason, devices complementary to PET, such as the Swisstrace Twilite II, provide the necessary technology for real-time

counting of the amount of radiopharmaceutical in the blood through this extracorporeal circulation.

With the aim of evaluating therapeutic alternatives for the treatment of brain tumors such as gliomas, this PhD developed and validated an extracorporeal surgery protocol to quantify brain metabolism with $^{18}$F-fluorodeoxyglucose (FDG) and subsequently performed studies of glucose metabolism by FDG PET in animals with different glycaemia levels. In the second part of the thesis, new PET imaging technique with $^{89}$Zr radiolabeled antibodies was developed and validated in an animal model of glioblastoma.

Firstly, regarding the study of the new extracorporeal surgery protocol, the feasibility of double arterio-venous shunts in rats in the inguinal region was studied and the reproducibility of inter-animal and intra-animal Arterial Input Function (AIF) was analyzed. Dynamic brain FDG PET studies were performed to estimate kinetic constants and cerebral metabolic rate glucose, which were obtained from standard two-compartment tissue and Patlak analysis. The results demonstrated that longitudinal AIFs of dual arterio-venous shunts can be obtained with very high success in surgeries. Furthermore, they provided AIF measurements with high inter-animal and intra-animal reproducibility, including in kinetic models. In view of the results obtained, it can be commented that the feasibility and high reproducibility of performing longitudinal AIF measurements and thus accurate kinetic modelling using the arterial shunt protocol has been demonstrated.

Secondly, three experimental groups were selected with different blood glucose ranges: normal, hyperglycemia and hypoglycemia. The results showed that all protocols together lead to a wide range of glucose level depending on the conditions. Quantification showed that global brain metabolism clearly increases between glucagon and control animals and between control and insulin animals. Regarding modelling, the results show that the fit was better when the glucose level measured before FDG injection was used. In the case of regional quantification, it was confirmed that there are no significant differences in whole brain metabolism, however, the results showed that metabolism in midbrain and midbrain regions is slightly increased/decreased compared to other brain regions. Thus, the importance of correcting PET data for blood glucose level can be exposed.

Third and finally, glioblastoma models were induced by injecting F98 cells into the frontal region of the brain. The animals were then injected with $^{89}$Zr-Bevacizumab or $^{89}$Zr-Aflibercept and multiple follow-up PET scans were performed after tumor induction. The results showed that $^{89}$Zr-Bevacizumab had a high tumor-to-brain ratio, but $^{89}$Zr-Aflibercept did not cross the blood-brain barrier, showing no uptake within the tumor. At the systemic level, the clearance rate of the two anti-VEGFs was similar. $^{89}$Zr-Aflibercept showed a higher SUV in the liver than in the first $^{89}$Zr-Bevacizumab scan. Therefore, the results suggest that Bevacizumab remains in blood circulation for a longer period, having the ability to cross the blood-brain barrier in early stages of tumor development, making it a more suitable anti-VEGF therapy to treat glioblastomas than Aflibercept.

As a general conclusion, it can be concluded that PET molecular imaging is a very useful translational tool for the preparation and evaluation of new treatments in the field of brain tumors. In the first part of the PhD, we have increased our knowledge of brain metabolism and thus become more precise when carrying out studies with antibodies in order to apply new therapies to tumor pathologies. Finally, the two antibodies evaluated in this PhD have demonstrated, in the case of Bevacizumab, an ability to incorporate into the tumor in early stages, unlike Aflibercept, which is not able to penetrate the tumor until advanced stages of the disease, playing an important role in future clinical therapies.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

# RESUMO

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

## RESUMO

A patoloxía cerebral engloba unha gran diversidade de afectacións entre as que se atopan as neoplasias. En España, a última estimación fai referencia a que no 2021 alcanzouse unha cifra de 276.239 pacientes con tumores, dos cales, o 2% representou neoplasias primarias do sistema nervioso central no adulto e un 15% nos menores de 15 anos clasificando, este último dato, como a segunda causa de morte por tumores cerebrais pediátricos despois da leucemia. Con esta información pódese determinar que as neoplasias cerebrais na idade adulta son pouco frecuentes, representando unha incidencia maior nos varóns (55%). En todas estas porcentaxes os meninxiomas e os gliomas son os máis frecuentes.

Por outro lado, as metástases son as neoplasias máis frecuentes no sistema nervioso central, entre as que destacan, como principais factores de risco, os pacientes con tumores mamarios, pulmonares e dérmicos, debido ao seu grao de metastatización. Aínda así, a maior parte dos tumores cerebrais teñen un carácter benigno (66%), aínda que ditos tumores, por complicacións alleas a esa afectación, non son confirmados mediante histoloxía, o que a incidencia de tumores malignos podería estar cerca do 34% da totalidade. Neste caso as neoplasias malignas máis frecuentes son o glioblastoma (3,2 por 100.000 habitantes), astrocitoma de grao III (0,51 por 100.000 habitantes) e o linfoma (0,43 por 100.000 habitantes).

Con esta premisa, denomínase glioma ao crecemento incontrolado das células gliais que se orixinan no parénquima encefálico, as cales poden afectar tamén á médula espiñal. Estas células gliais son esenciais no correcto funcionamento do sistema nervioso, que presenta a función de aportar soporte ás células cerebrais, as neuronas. Os gliomas clasifícanse dependendo do tipo de célula glial que este involucrado no desenrolo do tumor, así como das súas características xenéticas. Polo tanto, dentro deste tipo de patoloxía, pódense diferenciar tres tipos de tumores gliais: Astrocitoma, que a súa vez inclúen astrocitomas, astrocitomas anaplásicos e glioblastomas; Ependimoma, formados por ependimomas anaplásicos, ependimomas mixopapilais e gliomas subependimarios; Oligodendroglioma, formado por oligodendrogliomas, oligodendroglioma anaplásicos e oligoastrocitoma anaplásico.

Este tipo de tumores desenrólanse no propio tecido intraparenquimatoso de forma difusa, sen estar totalmente delimitados do resto do parénquima. O seu rápido crecemento e a agresión do tecido normal circundante acaba afectando na produción dunha reacción denominada edema cerebral, o que supón un peor funcionamento a nivel neuronal e, polo tanto, o aumento do volume intracraneal. Todo isto axuda ao rápido crecemento da patoloxía, o que fai que, nas súas zonas máis internas, a chegada de circulación sanguínea se vexa comprometida, derivando nun proceso denominado como morte celular ou necrose.


USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Estes tumores provocarán dous tipos de sintomatoloxía: Debido á situación de hipertensión intracranial que xera o crecemento do tumor dentro do cranio produce unha sintomatoloxía de cefalea, náuseas, vómitos e edema papila e, dunha forma progresiva, afectará ao nivel de conciencia; por outro lado os síntomas focais poden ser por déficit funcional, o que deriva en epilepsia parcial ou focal. Ditos déficits neurolóxicos, ao mesmo tempo, veranse mais ou menos desenrolados dependendo da rexión do cerebro onde se inicie o desenrolo da patoloxía neuronal, ao mesmo tempo que dependerán ou non de que afecte ás zonas silentes do cerebro.

As probas diagnósticos utilízanse en dúas fases, a primeira para coñecer a tipoloxía da neoplasia e a segunda, para comezar a liña terapéutica que se levará a cabo dependendo do lugar e tipo de tumor. Se se sospeita dunha neoplasia cerebral realizaranse unha serie de probas e procedementos como un exame neurolóxico ou probas diagnósticas por imaxe como a Resonancia Magnética (MR), a Tomografía Computarizada (CT) e a Tomografía por Emisión de Positróns (PET). Ademais do diagnóstico por imaxe, é común realizar unha diagnose diferencial. Como último recurso, e que hoxe en día non é habitual, atópase o diagnóstico cirúrxico, aínda que a aparición das técnicas por imaxe provocaron que a detección dos tumores cerebrais realízase dunha maneira mais precoz que fai 20 anos. Por conseguinte, estase cambiando a visión neurocirúrxica destas afeccións, xa que os tumores diagnostícanse con menor tamaño e, polo tanto, con menor lesión neurolóxica.

O tratamento que se utiliza para a neoplasia do glioma depende do tipo, tamaño, grao e localización do mesmo, así como de outros factores como a idade, o estado funcional do paciente, os antecedentes persoais e os resultados das probas hematolóxicas. As medidas que se aplican nos distintos subtipos de gliomas recén diagnosticados son a extirpación do tumor mediante cirurxía acompañada de terapias que reduzan os signos e os síntomas causados polo tumor, como a quimioterapia e radioterapia, principalmente. Sen embargo, estes tratamentos convencionais son pouco específicos, non sempre son efectivos e moi frecuentemente están acompañados de efectos adversos, polo que resultaría interesante atopar alternativas e tratamentos que fosen máis tolerables.

Para iso é fundamental o uso da investigación preclínica, debido á falta de opcións para evitar o uso de animais de investigación. Os modelos de pequenos animais representan unha ponte crítica entre o descubrimento a nivel molecular e a posta en marcha de novos diagnósticos ou de novos tratamentos clínicos, dunha forma relevante. Nestas etapas preclínicas de estudo de novas terapias é común o emprego de animais de experimentación para estudar a eficacia *in vivo* de novos tratamentos e comparalos, se é posible, coas terapias vixentes na práctica clínica. Neste ámbito é común o uso de técnicas de imaxe molecular preclínica como a PET, que permiten, entre outras cousas, facer unha análise do metabolismo cerebral, por exemplo, en modelos animais aos que se lles induciu un tumor cerebral. O desenrolo de protocolos de adquisición e métodos de cuantificación axeitados para o estudo de glioma é fundamental, pois trátase de experimentos dunha alta complexidade e que requiren de condicións moi ben definidas para que as medidas obtidas sexan fiables. Por outro lado, os modelos animais varían entre a indución química e o transplante de células tumorais directamente na rexión seleccionada, caracterizándose

este último por ter un período de latencia máis curto, un mellor control sobre a localización do tumor, producindo neoplasias únicas e involucrando un coste menor. Unha das principais limitacións das técnicas de imaxe preclínicas PET é a estimación da concentración do radiofármaco en sangue, que é fundamental para medir a actividade de radiofármaco que chega ao tumor e a cantidade que continúa en circulación durante o procedemento diagnóstico. Os métodos actuais de detección da contaxe do trazador en circulación limítanse á obtención, mediante contaxe por goteo manual, do trazador dunha forma moi rudimentaria, o cal limita a técnica. Nos últimos anos propuxéronse outros mecanismos, coma a circulación extracorpórea, que reduciría os niveis de radiación manipulado polo investigador e permitiría levar a cabo novas estratexias terapéuticas ante patoloxías como o glioma. Neste aspecto, dispositivos complementarios ao PET como o equipo Swisstrace Twilite Two, aportan a tecnoloxía necesaria para realizar unha contaxe en tempo real da cantidade de radiofármaco no sangue a través de dita circulación extracorpórea.

Co fin de avaliar alternativas terapéuticas para o tratamento dos tumores cerebrais coma os gliomas, na presente tese de doutoramento desenrolouse e avaliouse un protocolo de cirurxía extracorpórea para cuantificar o metabolismo cerebral con $^{18}$F-fluorodesoxiglucosa (FDG) e posteriormente realizáronse estudos do metabolismo da glucosa mediante PET con FDG en animais con diferentes niveis de glicemia. Na segunda parte da tese desenrolouse un modelo animal de glioblastoma para validar unha nova técnica de imaxe PET con anticorpos radiomarcados con $^{89}$Zr e estudar a evolución do tumor.

En primeiro lugar, respecto ao estudo do novo protocolo de cirurxía extracorpórea, estudouse a viabilidade das derivación arterio-venosas dobres en ratas na rexión inguinal e analizáronse as reproducibilidades da Arterial Input Function (AIF) inter-animal e intra-animal. Realizáronse estudos dinámicos de FDG PET cerebral para estimar as constantes cinéticas e a taxa metabólica cerebral da glicosa, as cales se obtiveron a partir do análise estándar dos compartimentos tisulares e de Patlak. Os resultados amosaron que as AIF lonxitudinais das derivacións arterio-venosas dobres poden obterse cun éxito moi alto nas cirurxías. Ademais, proporcionaron medicións de AIF cunha alta reproducibilidade tanto inter-animal coma intra-animal, incluídos nos modelos cinéticos. En vista dos resultados obtidos, pódese comentar que demostrouse a viabilidade e a alta reproducibilidade de levar a cabo medicións de AIF lonxitudinais e, polo tanto, dun modelado cinético preciso usando o protocolo da derivación arterial proposto.

En segundo lugar, seleccionáronse tres grupos experimentais con diferentes rangos de glicemia: normal, hiperglicemia e hipoglicemia. Os resultados manifestaron que todos os protocolos xuntos conducen a un extenso rango do nivel de glicemia dependendo das condicións. Na cuantificación mostrouse que o metabolismo cerebral global aumenta claramente entre os animais de glucagón e os de control e entre os de control e os de insulina. Con respecto á modelización, os resultados amosan que o axuste foi mellor cando se utilizou o nivel de glicosa medido antes da inxección de FDG. No caso da cuantificación rexional, confirmouse que non existen diferenzas significativas no

metabolismo de todo o cerebro, non obstante, os resultados amosaron que o metabolismo nas rexións do mesencéfalo e do cerebro central están lixeiramente aumentadas/diminuídas con respecto a outras rexións do cerebro. Desta maneira pódese expoñer a importancia da corrección dos datos da PET polo nivel de glicosa no sangue.

En terceiro e último lugar, inducíronse modelos de glioblastoma mediante a inxección de células F98 na rexión frontal do cerebro. A continuación, inxectouse aos animais $^{89}$Zr-Bevacizumab ou $^{89}$Zr-Aflibercept e realizáronse múltiples exploracións PET de seguimento trala indución do tumor. Os resultados amosaron que $^{89}$Zr-Bevacizumab presentaba unha relación tumor-cerebro, sen embargo, o $^{89}$Zr-Aflibecept non atravesou a barreira hematoencefálica, polo que non amosou ningunha captación no interior do tumor. A nivel sistémico, a taxa de eliminación dos dous antiVEGF foi similar. $^{89}$Zr-Aflibercept amosou un maior SUV no fígado na primeira exploración que $^{89}$Zr-Bevacizumab. Por isto, os resultados indican que o Bevacizumab permanece en circulación sanguínea durante un período de tempo máis longo, tendo a capacidade de atravesar a barreira hematoencefálica en fases temperás do desenrolo do tumor, sendo unha terapia antiVEGF máis axeitada para tratar os glioblastomas que o Aflibercept.

A modo de conclusión xeral, pódese concluír que a imaxe médica por PET é unha ferramenta útil para a preparación e avaliación de novos tratamentos no campo do tumores cerebrais. Na primeira parte da tese ampliamos os coñecementos acerca do metabolismo cerebral e, así, ser máis precisos á hora de facer estudos con anticorpos para aplicar novas terapias ante patoloxías tumorais. Finalmente, os dous anticorpos nesta tese de doutoramento amosaron, no caso do Bevacizumab, unha capacidade para incorporarse ao tumor en estadios iniciais, a diferenza do Aflibercept, o cal non é capaz de penetrar no tumor ata estadios avanzados da enfermidade, xogando un papel importante nas futuras terapias clínicas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# ABREVIATURAS

- 2TCM: Dos compartimentos tisulares
- $^{18}$F-CPFPX: [$^{18}$F]-8-cyclopentyl-3(3-fluoropropyl)-1-propylxanthine
- $^{18}$F-FDG: 2-desoxi-2[$^{18}$F]fluoro-D-glucosa
- $^{18}$F-FDOPA: [$^{18}$F]-Fluoro-L-Dihy-droxyphenylalanine
- $^{18}$F-FET: [$^{18}$F]-fluoro-ethyl-tyrosine
- $^{18}$F -flt: [$^{18}$F]-fluoro-3'-deoxy-3'-L
- $^{18}$F-FMISO: [$^{18}$F]-fluoromisonidazole
- $^{18}$F-FSPG: [$^{18}$F]-(S)-4-(3-fluoropropyl)-L-glutamic acid
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AIF: “Arterial input function”
- ALA: “As Low As Reasonably Achievable”
- antiVEGF: Agentes antiangiogénicos
- AUC: Área bajo la curva
- BCE: Bombas de circulación extracorpórea
- BGL: Niveles de glucosa en sangre
- BHE: Barrera hematoencefálica
- C: Carbono
- CBF: Flujo sanguíneo cerebral
- CEBEGA: Centro de Biomedicina Experimental
- CEC: Circulación Extracorpórea
- CHUS: Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela
- CIEMAT: Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas
- cm: Centímetros
- CMRglc: Tasa metabólica cerebral de glucosa
- COV: Coeficiente de variación
- $C_p$: Concentración plasmática en el tiempo
- cps: Cuentas por segundo
- $C_t$: Concentración tisular del trazador
- CSN: Consejo de Seguridad Nuclear
- CT: Tomografía Computarizada
- DMEM: Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium
- $e^+$: Positrón
- $e^-$: Electrón
- ENU: N-Ethyl-N-nitrosourea
- F: Flúor
- FDG: Fluorodesoxiglucosa o 2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa
- FOV: Field of View
- FWE: Family-wise
- GB: Glioblastoma
- Gd-DTPA: Gadolinio-DTPA
- GLUT-1: Transportador de glucosa cerebral tipo 1
- He: Helio
- HIC: Hipertensión intracraneal
- H&E: Hematoxilina y eoxina
- IAEA: Organismo Internacional de Energía Atómica
- ICRP: Comisión Internacional de Protección Radiológica

- ICRU: Comisión Internacional de Unidades Radiológicas
- IDIF: Image-Derived Input Function
- INSST: Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo
- $K_1$: Constante de tasa de afluencia aparente
- $k_2$: Constante de tasa de eflujo
- $k_3$: Constante de tasa de fosforilación
- $k_4$: Constante de tasa de defosforilación
- keV: Kilo-electrón voltio
- kHz: Kilohercio
- LC: Lumped constant
- mAbs: Anticuerpos monoclonales
- MAPMT: Tubos fotomultiplicadores multianódicos
- MCA: Arteria cerebral media
- mg/dl: Miligramos/decilitro
- MLEM: Maximum-Likelihood Expectation-Maximization Algorithm
- mm: Milímetros
- MNU: N-metilnitrosourea
- MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina
- MR: Resonancia Magnética
- MRf: Resonancia Magnética Funcional
- MRglu: Tasa metabólica de glucosa
- MS: Muestreo manual
- N: Nitrógeno
- ns: Nanosegundos
- O: Oxígeno
- PCV: Procarbazina, Lomustina y Vincristina
- PET: Tomografía por Emisión de Positrones
- PIGF: Factor de crecimiento placentario
- PPE: Persona Profesionalmente Expuesta
- ppm: Partes por millón
- PPNE: Persona Profesionalmente No Expuesta
- Rb: Rubidio
- RCP: Pureza radioquímica
- ROI: Región de interés
- SNC: Sistema Nervioso Central
- SPECT: Tomografía Computarizada con Emisión de Fotón Único
- SUV: Valor de captación estandarizado
- Sv: Sievert
- $T_{1/2b}$: Eliminación biológica mediante la excreción del radiofármaco y metabolitos
- $T_{1/2e}$: Periodo de semidesintegración efectiva
- $T_{1/2f}$: Periodo de semidesintegración radiactiva
- TCA: Ácido tricloroacético
- UI: Unidades de insulina
- UNSCEAR: Comité Científico de las Naciones Unidas para el estudio de las Radiaciones Atómicas
- VEGF: Factore de crecimiento endotelial vascular
- VOI: Volumen de interés
- $V_t$: Volumen de distribución
- $^{89}Zr$: Zirconio-89
- µL: Microlitros

- μm: Micrómetros
- α: Alfa
- β: Beta
- γ: Gamma

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

# CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

# 1. BASES Y FUNDAMENTOS FÍSICOS DE LA MEDICINA NUCLEAR

## 1.1.ORÍGENES DE LA MEDICINA NUCLEAR

La Medicina Nuclear centra sus principios en la administración, a un ser vivo, de una sustancia emisora de radiaciones ionizantes denominada radiofármaco, que está formado bien por un radionúclido aislado o bien ligado a una molécula de interés biológico. En el momento en el que este radiofármaco es metabolizado en el órgano o tejido diana, la radiación que emite se puede detectar con diferentes tipos de equipos, desde los primeros sistemas basados en gammacámaras, hasta los equipos más modernos basados en las técnicas SPECT (Tomografía por Emisión de Fotón Único) y PET (Tomografía por Emisión de Positrones). Desde la emisión de la radiación hasta su detección en los diferentes equipos están involucradas múltiples interacciones al nivel de las leyes fundamentales de la Física. Por este motivo, la Medicina Nuclear representa uno de los campos de aplicación de los agentes físicos en medicina y, actualmente, está considerada como esencial tanto para estudiar los aspectos desconocidos del organismo como para el tratamiento de enfermedades [1].

Para poder alcanzar la definición anteriormente citada, es necesario recordar los acontecimientos que llevaron a lo que hoy en día se conoce como Medicina Nuclear [2]:

**1895**: Descubrimiento de los Rayos X - *Roentgen*.
**1896**: Descubrimiento de la radioactividad de uranio - *Becquerel*.
**1898**: Descubrimiento de la radioactividad natural - *Marie Curie*.
**1913**: Desarrollo del concepto de isotopía - *Soddy*.
**1923**: Primer uso de los trazadores en la exploración biológica - *Hevesey*.
**1927**: Puesta a punto de un detector de radiaciones - *Geiger y Müller*.
**1931**: Construcción del primer ciclotrón.
**1934**: Descubrimiento radioactividad artificial - *Curie y Joliot*.
**1938**: Primeros estudios de la fisiología del tiroides ($^{131}$I).
**1939**: Primeras aplicaciones terapéuticas.
**1946**: Construcción del primer reactor productor de radionúclidos.
**1951**: Construcción del escáner con cristal de centelleo de yoduro sódico, que permite realizar las primeras gammagrafías - *Reed y Libby*.
**1952**: El término "Medicina Nuclear" sustituye al de "Medicina Atómica" que se había empleado hasta entonces.
**1956**: Desarrollo del radio Inmuno-Análisis.
**1962**: Aparición de los generadores de $^{99m}$Tc, con cualidades idóneas como trazadores y posibilidades de unión a diversos fármacos.
**1963**: Construcción de la cámara de centelleo - *Anger*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 1.2.ESTRUCTURA BÁSICA DE LA MATERIA

A partir de los años 60, la Medicina Nuclear se desarrolla de forma imparable siendo de gran importancia la puesta en marcha, en los años 70, de las técnicas de SPECT cerebral y en los años 80 el inicio de los estudios de PET. Para entender los pilares básicos de la Medicina Nuclear es necesario conocer los fundamentos físicos sobre los que se sostiene, desde la estructura básica de la materia, concepto de radiactividad y el funcionamiento de los sistemas de detección de radiación.

En la primera parte del siglo XX surgieron varios modelos que explicaban el origen de las fuerzas de enlace químico y, a su vez, las fuerzas moleculares. De todos ellos tuvo especial relevancia el modelo descrito por Rutherford, el cual definía al átomo como el elemento básico de la materia que está formado por un núcleo, que contiene protones (con una carga positiva) y neutrones (sin carga), y una corteza, formada por electrones (con carga negativa) moviéndose a su alrededor. Por otro lado, la teoría de Bohr describía los estados energéticos del electrón dentro del átomo, así los electrones se situaban en órbitas llamadas K, L, M, N, etc. Cada órbita presenta una energía bien definida y según se van alejando del núcleo presentan una energía mayor. La emisión o absorción de energía por parte del átomo se traduce en un cambio de órbita por parte del electrón, hacia órbitas de menor energía o mayor energía, respectivamente [3,4].

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, los átomos se encuentran en un estado eléctrico neutro cuando el número de protones es igual al número de electrones, denominándose este número como número atómico o "Z". La totalidad de las partículas que forman el núcleo (los protones y los neutrones) se les conoce como el número másico o "A" y el número de neutrones se nombra N, siendo $N = A - Z$. De esta manera, la composición del núcleo es $^{A}X$, siendo X el nombre del elemento que se utilizará. Un ejemplo sería el átomo $^{18}F$. En este caso se indica un número atómico de 9 (Flúor) y un número másico de 18, por lo que el átomo $^{18}F$ presenta 9 neutrones, 9 protones y 9 electrones.

El número atómico de un átomo determina su posición en la tabla periódica y por tanto el tipo de elemento químico que representa. Sin embargo, pueden existir varios átomos de un mismo elemento químico, es decir, núcleos con el mismo número atómico y diferente número másico. Los diferentes átomos de un mismo elemento químico se denominan isótopos y algunos de ellos se caracterizan por ser inestables. La Medicina Nuclear se basa precisamente en el uso de estos isótopos inestables denominados radioisótopos o radionúclidos, que deben emitir radiación para alcanzar un estado estable, tal y como se explicará en la próxima sección. Estos radioisótopos son administrados al paciente o utilizados para realizar pruebas analíticas con fines principalmente diagnósticos y terapéuticos [5].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 1.3.RADIACTIVIDAD Y REACCIONES NUCLEARES

El descubrimiento de la radiactividad por **Becquerel** en el año 1896 despertó el interés por el estudio de los núcleos atómicos y la estructura nuclear. La radiactividad es una reacción nuclear que engloba la "descomposición espontánea" de un nucleido inestable en otro más estable, a la vez que emite una radiación determinada. En estos casos, los núcleos experimentan una serie de transiciones entre un estado de inicio hasta un estado final, los cuales pueden ocurrir de modo espontáneo, que es lo que se denomina desintegración radiactiva, o también pueden suceder de forma artificial, a los que se les atribuye el nombre de reacción nuclear. El nucleido hijo, que es el resultante de la desintegración, puede que continúe siendo inestable, lo que conlleva una segunda descomposición obteniendo un tercer elemento y así sucesivamente hasta alcanzar un nucleido estable [6]. Los sucesivos nucleidos de un conjunto de desintegraciones generan lo que se denomina familia o serie radiactiva.

Existen tres tipos de desintegraciones radiactivas a través de las cuales los núcleos buscan alcanzar de forma espontánea un estado estable [7]:

- **Emisión de partículas alfa** ($\alpha$), que son núcleos de $^{4}He$ (átomos de Helio sin electrones, y por tanto tienen carga positiva), que contienen 2 protones y 2 neutrones. La emisión de estas partículas es característica de la desintegración de los elementos radiactivos pesados como el $^{225}Ac$ y el $^{223}Ra$. Aunque estas partículas emiten mucha energía, la agotan en distancias cortas, por lo que su efecto radiobiológico se relaciona con su exposición cercana y su ingesta/inhalación. La radiación $\alpha$ carece de capacidad de penetración suficiente como para atravesar la epidermis, sin embargo, si se incorporan al interior del organismo, pueden provocar grandes daños a nivel celular y generar mutaciones en el ADN, pues son altamente ionizantes.
- **Emisión de partículas beta** ($\beta$), que pueden ser de dos tipos: electrones ($\beta^{-}$) y positrones ($\beta^{+}$). Estas partículas son emitidas por ciertos átomos inestables como el $^{131}I$ y pueden ser detenidas por una delgada capa de milímetros (mm) de aluminio. A diferencia de las partículas $\alpha$, su capacidad de penetración es mayor, aunque son menos dañinas en el tejido vivo y ADN, ya que su poder de ionización es menor.
- **Emisión de partículas gamma** ($\gamma$) representan un tipo de radiación que no es corpuscular, como el caso de las anteriores, sino electromagnética, es decir, se trata de partículas sin masa que se llaman fotones (partículas gamma). Es generada por núcleos excitados o por procesos de carácter subatómico como la aniquilación. Su principal característica es que poseen un alto poder de penetración, pues al no tener masa interaccionan menos que las partículas $\alpha$ y $\beta$. Tanto su poder de penetración como su poder de ionización dependen de su energía. Como ejemplo, para partículas con energías del orden de kilo-electrón voltio (keV) se requieren de materiales de números atómicos y densidades altas, siendo mm de plomo el elemento más usado.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE

En el caso particular de la imagen PET, campo en el que se centra el presente trabajo de tesis, el radioisótopo que se emplea es el $^{18}F$. Como se mencionaba anteriormente, se trata de un radioisótopo con 9 protones y 9 neutrones que es inestable y por tanto emite partículas $\beta^+$. En una desintegración $\beta^+$ se produce una conversión de un protón en un neutrón a través de la emisión de positrones (partículas $\beta^+$). El resultado final es una emisión de rayos gamma como resultado de la aniquilación de las partículas $\beta^+$ emitidas y los electrones presentes en el medio.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 1.4.DEFINICIÓN Y BASES DEL USO DE RADIOFÁRMACOS

La definición de radiofármaco engloba a cualquier producto que contenga un radionucleido para su uso de tipo diagnóstico o terapéutico. Cada radiofármaco presenta una serie de características físicas y biológicas que le confieren unas propiedades únicas para una finalidad específica.

Entre las **características físicas** del radioisótopo se debe destacar: el tipo de emisión radiactiva, la energía de emisión y su periodo de semidesintegración radiactiva [8-10].

- El tipo de emisión del radionucleido determina su utilidad en el ámbito diagnóstico o en el terapéutico. Si se centran en los estudios de carácter diagnóstico, la preferencia es el uso de radionucleidos emisores γ o de positrones, que finalmente resultan en una emisión de partículas γ que interaccionan poco con los tejidos. La emisión de otro tipo de radiación no aportaría ningún beneficio diagnóstico al paciente, pues se atenúan dentro del cuerpo y no podrían ser detectados por los diferentes equipos. Si la finalidad es terapéutica, se emplean radionúclidos β o α, que son capaces de interaccionar con los átomos del tejido y por tanto depositar una buena parte de su energía.
- La energía de emisión radiactiva es importante en el caso de la desintegración gamma, e indica la energía de los fotones (rayos γ) emitidos. Los radiofármacos convencionales de carácter diagnóstico contienen un radionucleido que emite rayos γ con una energía comprendida entre los 80 y los 250 KeV (energías menores no excitarían los átomos de los cristales de los detectores de las gammacámaras). Como se ha mencionado anteriormente, en el caso de la técnica PET se usan los radiofármacos emisores de positrones, los cuales necesitan gammacámaras específicas para detectar los fotones resultantes de la aniquilación de los positrones, pues tienen una energía de 511 KeV. En el caso de los radiofármacos empleados con una finalidad terapéutica, el radionucleido se desintegra con la emisión de partículas con un alto poder de ionización, es decir, las partículas α y β, como se ha visto anteriormente.
- El periodo de semidesintegración radiactiva ($T_{1/2f}$) es el tiempo de eliminación física que posee un radioisótopo determinado, para decaer a un radioisótopo más estable. Se trata de una característica importante pues determina el tiempo durante el que realiza la emisión de radiación, cuestión esencial tanto en el diagnóstico como en el tratamiento con radioisótopos.

Las **características biológicas** del radiofármaco se definen a través de la incorporación de moléculas específicas para cada patología, lo que conllevó al estudio y aprovechamiento de los mecanismos fisiológicos exclusivos de las patologías que se pretendían estudiar [10]. En los últimos años, la especificidad ha sido el objetivo que más esfuerzos ha concentrado para el desarrollo de nuevos radiofármacos. La incorporación de moléculas biológicas a un radioisótopo conlleva una redefinición del periodo de eliminación, como un $T_{1/2}$ efectiva ($T_{1/2e}$), que es un parámetro que depende de la eliminación física a través de la $T_{1/2f}$ y también de la eliminación biológica a través de la excreción del radiofármaco y metabolitos ($T_{1/2b}$), de forma que:

$$1/(T_{1/2e}) = 1/(T_{1/2f}) + 1(T_{1/2b})$$

La definición del parámetro óptimo de $T_{1/2e}$ es muy diferente si se trata de estudios de Medicina Nuclear en el campo del diagnóstico o del tratamiento. En el caso de exploraciones diagnósticas, se deben realizar en el mínimo tiempo posible teniendo en cuenta dos puntos de vista bien diferenciados: el **biológico** [8] y el **físico** [9].

Desde el punto de vista biológico, los radiofármacos de uso diagnóstico deben cumplir una serie de requisitos para su administración:

- La incorporación al órgano, compartimento o diana (región de estudio) que se pretende estudiar se debe realizar sin producir alteraciones de su fisiología.
- La mayor especificidad posible para que, de esta forma, se dirija la máxima cantidad del radiofármaco a la región de estudio y la mínima cantidad al resto del organismo (relación diana-fondo).
- La duración del radiofármaco una vez alcanzada la región de estudio debe permanecer el tiempo suficiente para obtener la información y presentar, a su vez, una vida media biológica corta para reducir la exposición del paciente a la radiación.

Desde el punto de vista físico, los requisitos básicos que deben cumplir abarcan:

- Una mayor proporción de emisión γ respecto a otros tipos de desintegración que no es posible detectar.
- Un espectro de energía de radiación γ en el rango de 120-160 KeV, con excepción de los isótopos emisores de positrones, los cuales inevitablemente emitirán energías de 511 KeV.
- Un período de semidesintegración que se ajuste a la cinética de la molécula que se pretende estudiar.

Los requisitos anteriores nos llevan a determinar las ventajas y cualidades de las técnicas de Medicina Nuclear, las cuales deben presentar las siguientes características:

- Permiten aportar información fisiológica.
- Se realizan a nivel ambulatorio, ya que no es necesario el ingreso del paciente tras la administración del radiofármaco.
- La exposición a la radiación es baja si son comparadas con otros métodos de diagnóstico basado en rayos X.
- Con una sola administración es posible observar la totalidad del cuerpo, permitiendo la obtención de múltiples proyecciones y la repetición de exploraciones separadas en el tiempo.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 1.5.FUNDAMENTOS DE PROTECCIÓN RADIOLÓGICA

A pesar de las grandes ventajas que supone el uso de radiaciones ionizanes en el campo de la Medicina Nuclear, es necesario realizar un control detallado de los procedimientos que minimicen el riesgo para las personas. En este sentido, se denomina **protección radiológica** a la especialidad que agrupa todos los métodos y medios para utilizar las radiaciones ionizantes con la máxima seguridad. La finalidad de estas medidas abarca la protección de los individuos, sus descendientes y la humanidad en su conjunto contra los riesgos que puedan derivarse de las actividades humanas que impliquen irradiaciones [11].

Todo sistema realista de protección radiológica debe tener un alcance definido y cubrir un amplio espectro de circunstancias de forma coherente, ya que todos los humanos están expuestos a radiaciones procedentes de fuentes radiactivas naturales o artificiales. Para establecer este criterio, se deben tener en cuenta las consideraciones tanto de tipo social-económico como científico, ya que su meta es proporcionar un nivel adecuado de protección para el ser humano sin limitar las prácticas que tengan un carácter beneficioso.

En este apartado es importante mencionar la diferencia existente entre los posibles efectos perjudiciales que pueden ocurrir, incluso en exposiciones pequeñas [12,13]:

- **Efectos deterministas**: Hace referencia a aquellos efectos que, debido a elevadas exposiciones, resultan en daños en un número elevado de células. Tienen un umbral y, conforme aumenta la dosis, lo hace la severidad de la lesión. Un ejemplo son los eritemas cutáneos tras radioterapia. Por ello, es posible evitarlos al restringir la dosis recibida.
- **Efectos estocásticos**: No es posible evitarlos ya que carecen de umbral; conforme aumenta la dosis, lo hace la posibilidad de la lesión; un ejemplo de ello es la aparición de un tumor. Por tanto, la finalidad con respecto a estos efectos es evitar su aparición manteniendo las dosis por debajo de los umbrales aplicables, asegurando que se toman todas las acciones razonables para reducir la inducción de efectos estocásticos.

La emisión de normas y recomendaciones en materia de protección radiológica que constituyen la base para la elaboración del reglamento de todos los Estados fue creado por los siguientes organismos de competencia internacional [11]:

- La Comisión Internacional de Protección Radiológica (**ICRP**), creada en 1928 y cuyo objetivo es la elaboración de las reglas de protección referente a los problemas que se planteaban para los sanitarios y el paciente en la utilización de todas las radiaciones ionizantes y no ionizantes.
- La Comisión Internacional de Unidades Radiológicas (**ICRU**), encargada de resolver los problemas de medida y normalización en radiología (magnitudes y unidades).
- El Organismo Internacional de Energía Atómica (**IAEA**), encargado de promover la utilización de la energía atómica para la paz, la salud y la prosperidad en todo el mundo.

- El Comité Científico de las Naciones Unidas para el estudio de las Radiaciones Atómicas (**UNSCEAR**), organismo encargado de evaluar los niveles de radiactividad en el espacio y el uso de Rayos X e isótopos radiactivos con fines sanitarios o industriales.

Debido al desarrollo alcanzado en España por las actividades nucleares, a partir de 1957 se consideró oportuno separar las funciones de investigación y aplicación tecnológica de las de control y protección radiológica, surgiendo:

- El Consejo de Seguridad Nuclear (**CSN**), creado en 1980 y único organismo español competente en materia de seguridad y protección radiológica. Sus funciones abarcan la asesoría, información e inspección de las actividades radiológicas, al mismo tiempo que evalúa y controla el diseño de las instalaciones nucleares y radiactivas.
- El Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas (**CIEMAT**), que se dedica a la investigación, desarrollo tecnológico y formación del personal científico y técnico.

Para llevar a cabo la normativa establecida por la ICRP, este organismo propone, en su publicación nº 60, la adopción del Sistema de Protección Radiológica. Esta recomendación recogida en el RD 1439/2010, BOE del 18 de noviembre de 2010 de la legislación española (Reglamento de protección sanitaria contra las radiaciones ionizantes) está basada en dos principios:

- **Justificación**: Este criterio permite evaluar el balance coste-beneficio de las actividades que se realicen, valorando los aspectos negativos relacionados con el daño a la salud o el medioambiente y los beneficios que puedan favorecer a la sociedad: "No deben ser autorizadas las actividades que originan exposición humana a las radiaciones ionizantes si su introducción no produce un beneficio neto positivo" [11].
- **Optimización**: El perfeccionamiento de la protección radiológica está basado en el criterio ALARA ("As Low As Reasonably Achievable"), lo que indica que las exposiciones a la radiación deben ser tan bajas como sea razonablemente posible, teniendo en cuenta, no solo factores sanitarios, sino también los sociales y económicos. Si este criterio se aplica al campo de la Medicina Nuclear, se debe asegurar que las imágenes de carácter diagnóstico tengan la calidad suficiente para atribuir una información adecuada al menor coste posible y con la menor exposición del paciente y del personal sanitario.

Por otro lado, en el caso de la Protección Radiológica del personal que trabaja con radiaciones y del público general, se aplica un sistema de **limitación de la dosis individual**. Este sistema se aplica a la suma de las dosis procedentes de las exposiciones externas en períodos específicos y permite asegurar una protección adecuada a los individuos que están sometidos a radiaciones ionizantes. El objetivo es alcanzar unos niveles de exposición laboral que puedan ser considerados como ***justamente tolerables***. Los límites establecidos por la ICRP corresponden a los valores que no deben ser sobrepasados en cada una de las circunstancias, estableciéndose límites inferiores de acuerdo con los estudios de optimización y justificación. Las exposiciones se pueden

clasificar en **Previstas** (las que se asumen antes de la operación de las instalaciones) o **Potenciales**, que son las que podrían producirse por motivo de un fallo del sistema o un error de los procedimientos. En el caso de las exposiciones de carácter potencial el riesgo no es directamente aplicable a los límites de dosis, por lo que se le atribuye el término de límite de riesgo, el cual es necesario definir y cuantificar. Los límites que se establecen tanto para los trabajadores expuestos como para el público global no tienen en cuenta la dosis del fondo radiológico natural ni las derivadas de las exposiciones sanitarias y se expresan en el término de dosis efectiva, excepto la irradiación parcial de cristalino, piel y extremidades, en la que se utilizará la dosis equivalente (ver Tabla 1.1).

| | | | |
|---|---|---|---|
| DOSIS EFECTIVA | PPE | Trabajadores | 100 mSv/5 años oficiales consecutivos (Máximo: 50 mSv/ cualquier año oficial) |
| | | Aprendices y estudiantes entre 16 y 18 años | 6 mSv/año oficial |
| | PPNE | Público, aprendices y menores de 16 años | 1 mSv/año oficial |
| DOSIS EQUIVALENTE | PPE | Trabajadores | |
| | | Cristalino | 150 mSv/año oficial |
| | | Piel | 500 mSv/año oficial |
| | | Manos, antebrazos, pies y tobillos | 500 mSv/año oficial |
| | | Aprendices y estudiantes (entre 16 y 18 años) | |
| | | Cristalino | 50 mSv/año oficial |
| | | Piel | 150 mSv/año oficial |
| | | Manos, antebrazos, pies y tobillos | 150 mSv/año oficial |
| | PPNE | Público, aprendices y estudiantes (menores de 16 años) | |
| | | Cristalino | 15 mSv/año oficial |
| | | Piel | 50 mSv/año oficial |

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1.1: Límite de dosis establecido por el RD 1439/2010. PPE: Persona Profesionalmente Expuesta; PPNE: Persona Profesionalmente No Expuesta; mSv/año: El Sievert (medida del efecto sobre la salud) es la unidad de dosis que equivale a 1 J/kg.

# 2. INTRODUCCIÓN A LA PET

## 2.1.BASES FÍSICAS

El aspecto fundamental en la historia de la PET comienza con el descubrimiento teórico y experimental del positrón. El **positrón** ($e^+$) es una partícula subatómica que posee la misma masa que el electrón ($e^-$), pero con carga opuesta, y por ello se considera como la antimateria del electrón. Estas propiedades y su propio descubrimiento fueron predichas en 1927 por el físico francés Paul Adrien Maurice Dirac, el cual atribuyó al positrón la característica fundamental de que, al encontrarse con un electrón, estos se aniquilaban. Aunque esta predicción era correcta, fue necesario esperar hasta 1932 cuando el físico estadounidense Carl David Anderson observó por primera vez el positrón mientras fotografiaba los rastros de rayos cósmicos en una cámara de ionización [14].

A finales de los años cincuenta, el médico **Gordon L. Brownell** fue el pionero en aplicar las propiedades de la aniquilación de los positrones en la detección de los cánceres cerebrales con la ayuda de sistemas de detección muy simples. A pesar de que la instrumentación y la obtención de las imágenes con estos equipos no eran muy sofisticados, las imágenes obtenidas con respecto al resto de dispositivos de diagnóstico del momento eran sensiblemente mejores. Fue necesario esperar a 1961 para la creación de la primera cámara de positrones, pero su utilidad práctica como técnica diagnóstica no comienza a ser útil hasta que **Michel Ter-Pogossian** en los años setenta, uno de los considerados "padres" de la PET, describe los algoritmos que posibilitan la reconstrucción de los datos obtenidos para la generación de las imágenes. Debido a esta descripción, a mediados de 1975 el físico **Michael E. Phelps** desarrolló la versión más moderna de este equipo, lo que permitió centrarse en la producción de otros radionúclidos emisores de positrones y, así, poder aumentar la producción de los radiofármacos PET [15,16].

Todo esto llevó a definir lo que actualmente se conoce como PET, una técnica diagnóstica no invasiva que permite obtener imágenes para la detección y cuantificación de la actividad biológica de los diferentes fenómenos fisiológicos y patológicos otorgando una información funcional *in vivo* de dichos procesos. Tras la inyección por vía intravenosa del radiofármaco, los positrones emitidos por los radionúclidos recorren una distancia de unos pocos mm hasta encontrar un electrón y provocando la aniquilación. El resultado de esta aniquilación acaba generando dos fotones, con una energía de 511 KeV (como se había visto anteriormente, la unidad de energía), que viajan en la misma dirección, pero en sentidos opuestos, lo que permite que sean detectados por **coincidencia** de los rayos γ (detección simultánea de los dos fotones) en los cristales de los detectores de la cámara PET y cuyo resultado determina las imágenes de la tomografía [17].

Además de todos los autores anteriormente citados, tiene especial relevancia **Louis Sokoloff**, un neurocientífico estadounidense considerado como el pionero en el campo de la imagen funcional del cerebro y, a su vez, uno de los "padres" de la Tomografía por Emisión de Positrones. La atribución de este papel es debido a que fue el principal investigador en demostrar, en tiempo real, la posibilidad de obtener imágenes derivadas del flujo sanguíneo en cerebros de animales utilizando trazadores con 2-desoxiglucosa. Sus estudios consiguieron explicar, mediante diferentes condiciones fisiológicas, las regiones del cerebro que estaban más activas dependiendo de la condición pautada y el momento dado. Con todo esto, se consiguió vincular las actividades metabólicas regionales a funciones cerebrales particulares, siendo esta investigación esencial en el estudio del **mapeo cerebral** [18].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 2.2.INDICACIONES CLÍNICAS DE LA PET

Los radioisótopos emisores de positrones más utilizados en la rutina clínica de la PET son producto de un acelerador de partículas denominado **ciclotrón**, de entre los que se encuentran el $^{11}C$, $^{13}N$, $^{15}O$ y $^{18}F$. Estos permiten marcar radiactivamente cualquier sustancia, sustituyendo en su molécula átomos de C, N, O o H por los anteriormente mencionados. Por tanto, se pueden utilizar como radiofármacos para PET sustancias químicas que sean análogas a muchas moléculas endógenas, que se introducirán en distintos mecanismos bioquímicos [19,20].

Los radioisótopos mencionados anteriormente tienen un **$T_{1/2f}$ corto**, lo que permite su uso en la rutina clínica, pero esto también limita el uso de algunos de ellos ($^{11}C$, 20.4 minutos; $^{13}N$, 10 minutos; $^{15}O$, 2 minutos) a centros PET con un ciclotrón en sus proximidades. Únicamente la estabilidad *in vivo* y el $T_{1/2f}$ del $^{18}F$ ($^{18}F$, 110 minutos) permiten su transporte a otras unidades o centros con tomógrafo PET, siendo este el único trazador que se puede emplear sin necesidad de disponer de un ciclotrón propio [20].

La molécula **$^{18}$F-FDG**, también conocida como fluorodesoxiglucosa o 2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa, es uno de los radiofármacos más utilizados en la actualidad en la rutina clínica de la PET. Este radiofármaco es un análogo de la glucosa y, como ésta, penetra en las células empleando los transportadores de sodio-glucosa y los transportadores específicos de membrana, como el transportador de glucosa cerebral tipo 1 (GLUT-1). Una vez que esta se ha incorporado a las células, las hexocinasas la fosforilan y la convierten en FDG-6-P, la cual no sigue las vías metabólicas de la glucólisis o síntesis de glucógeno de la glucosa, quedando retenida en la célula. Esa retención depende de la cantidad de fosfatasas que haya en la célula, ya que esta enzima facilita la desfosforilación a FDG [21]. En nuestro organismo, a excepción de los hepatocitos, la concentración intracelular de fosfatasas es baja, por lo que la retención celular de FDG es, en condiciones de normalidad, la suficiente como para conseguir imágenes estáticas con la PET [22].

El **modelo compartimental** de la FDG está validado, por lo que es posible la obtención de imágenes paramétricas absolutas del consumo regional y global de glucosa en los diversos órganos. La cuantificación absoluta obliga a una metodología más exhaustiva, con adquisición dinámica de imágenes, infusión continua de FDG y extracción de sangre arterial, por lo que no se usa en la clínica debido a su complejidad. Esto conlleva que, los estudios clínicos, se ejecuten mediante la inyección intravenosa de FDG para estudios estáticos de cuerpo entero a partir de los 45 minutos post-inyección y a la cuantificación relativa.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

El radiofármaco FDG es el más empleado en la rutina clínica, cubriendo la práctica totalidad de las indicaciones clínicas. Sin embargo, existen otras indicaciones que actualmente ya se cubren con otros radiofármacos, que son capaces de proporcionar información sobre otros procesos biológicos más específicos:

- **Cardiología**:

  La PET es uno de los métodos de referencia para el estudio del flujo sanguíneo y del metabolismo miocárdico. El flujo se estudia con radiofármacos como el $^{13}$N-amonio o el $^{82}$Rb (Rubidio-82). En estados en los que el corazón se encuentra en lo que se denomina isquemia miocárdica, hay una mayor utilización de glucosa, a través de la glucólisis anaerobia. Por lo tanto, la captación de radiofármacos como la FDG es un factor predictivo de la recuperación contráctil tras una correcta revascularización, existiendo una buena correlación entre dicha captación y la recuperabilidad de la función cardíaca [23].

- **Inflamación y procesos infecciosos**:

  En las lesiones inflamatorias e infecciosas se ha descrito una mayor captación de FDG. Ejemplos que podrían ser diagnosticados a través de esta técnica serían las sobreinfecciones de prótesis osteoarticulares, injertos vasculares, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, la sarcoidosis, la enfermedad inflamatoria intestinal crónica o el síndrome febril de origen desconocido. Aún teniendo toda esta información, la evidencia no es suficiente como para que la situación clínica contribuya a una indicación clínica de la PET como primera opción [24,25].

- **Neurología**:

  El cerebro tiene como sustrato energético la glucosa por lo que, en la actualidad, se acepta el uso de la PET con FDG como la forma más exacta de valorar el metabolismo cerebral. Para ello, el síndrome neurológico más estudiado con la técnica anteriormente citada es la **demencia**, ya que esta es capaz de detectar una disminución en el metabolismo regional en pacientes asintomáticos con riesgo genético de padecer esta clase de enfermedades. A su vez, es posible predecir su evolución, al igual que determinar cambios metabólicos en el córtex, coincidiendo con hallazgos obtenidos a través de la **Resonancia Magnética** (MR) en pacientes con deterioro cognitivo leve. Por tanto, la PET con FDG puede contribuir al diagnóstico diferencial de las demencias neurodegenerativas y diferenciar entre demencia tipo Alzheimer y pseudodemencia depresiva y, por supuesto, valorar la eficacia de los diferentes tratamientos disponibles en el mercado [26-27].

  A pesar de todo lo mencionado, la gran sensibilidad diagnóstica de la PET con FDG en las demencias no ha sido suficiente para que sea establecida como una indicación clínica en este ámbito, seguramente debido al pobre impacto clínico de sus hallazgos, ya que estos no suponen grandes cambios en la estrategia terapéutica [34].

  Para el estudio de las lesiones de las neuronas nigroestriatales en pacientes con enfermedad de **Parkinson** se utiliza la denominada [18F]Fluoro-L-Dihydroxyphenylalanine ($^{18}$F-FDOPA) (una forma fluorada de la L-DOPA sintetizada), la cual es capaz de detectar la hipocaptación estriatal de predominio putaminal, unilateral o bilateral asimétrica dependiendo de la fase evolutiva de este proceso [28,29].

En el caso de las enfermedades cerebrovasculares como las isquemias o los infartos, estos pueden ser evaluados mediante estudios de PET con $^{15}O$. Este radiofármaco es utilizado en los estudios de neuroactivación cognitiva, sensorial o motora, que se emplean en la evaluación de la función cerebral [30].

Con respecto a los **focos epileptógenos** en pacientes con epilepsia refractaria al tratamiento, la técnica de PET con FDG es el método de estudio interictal de referencia para la localización prequirúrgica de lesiones temporales y, en menor medida, lesiones extratemporales [31,32].

- **Oncología**:

La alta captación del radiofármaco en las neoplasias está íntimamente ligado a la celularidad tumoral y, por tanto, a la proliferación celular [33]. En el caso de la FDG, la alta tasa metabólica que presentan las células tumorales y la ausencia de fosfatasas en dichas células provoca una intensa retención metabólica de FDG-6-P, lo que permite diferenciar el tejido patológico del tejido sano [34].

Las principales características que permiten definir a la PET como una **herramienta idónea** en el diagnóstico oncológico son:

1. La posibilidad de hacer estudios volumétricos/tomográficos de cuerpo entero en la misma técnica de exploración.
2. La gran sensibilidad para la detección de lesiones tumorales, demostrando la posible infiltración tumoral en las adenopatías de tamaño normal y en los órganos que aún no presentan alteraciones anatómicas.
3. Las exploraciones tienen menos artefactos que los que se obtienen con la **Tomografía Computarizada** (CT) o la MR en la existencia de fibrosis cicatrizal residual postoperatorio.
4. La presencia de un alto valor predictivo negativo, describiendo muy pocos falsos negativos en esta prueba.

Por el contrario, es necesario mencionar que los tumores necróticos, mucinosos y de bajo grado pueden captar poco radiofármaco por lo que, junto con los tumores de pequeño tamaño, pueden pasar inadvertidos. Así pues, los principales **inconvenientes** de esta técnica son [35,36]:

1. La dificultad para detectar masas tumorales muy pequeñas y micrometástasis demostraron no tener una buena acogida como técnica de cribado del cáncer en sujetos sanos.
2. Las falsas captaciones debido a procesos no malignos, tales como neumonías, bronquitis o abscesos. Estas captaciones, asociadas a procesos inflamatorios o infecciosos suelen ser inferiores a las lesiones neoplásicas. Aún así, todo esto puede conllevar a la descripción de falsos positivos en los procesos anteriormente mencionados.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 2.3.BASES DE LA PET PRECLÍNICA

Además de las indicaciones clínicas anteriormente expuestas, la imagen PET tiene un papel fundamental para estudiar las bases fisiológicas de las enfermedades humanas en modelos animales. Se trata de una **técnica no invasiva**, que permite hacer estudios longitudinales sin tener que sacrificar a los animales en distintos tiempos para estudiar lo que está ocurriendo en ese momento, como sucede, por ejemplo, tras la administración de ciertas terapias para una determinada patología. Por tanto, esta técnica permite visualizar, *in vivo*, precozmente y de forma eficiente, el cuerpo entero de un animal tras la administración de un radiofármaco, que irá a la diana que se pretende estudiar, proporcionando una investigación traslacional o puente desde estudios preclínicos a estudios clínicos.

La técnica PET preclínica se complementa con otras muchas modalidades de imagen que tienen diferentes características de resolución espacial y de sensibilidad, y que se deben tener en cuenta a la hora de los diseños experimentales. La resolución espacial de los dispositivos PET preclínicos se encuentran entre los 700-1500 μm, mientras que el SPECT preclínico muestra una resolución espacial de 500-900 μm, CT preclínico se encuentra entre los 50-200 μm y MR preclínico sobre 25-200 μm. Con respecto al apartado de sensibilidad, los dispositivos PET y SPECT presentan una sensibilidad picomolar, mientras que los equipos MR y CT tienen una sensibilidad nanomolar [37]. Debido a todas estas ventajas y características complementarias, en los últimos años se han producido numerosos avances tecnológicos que han llevado a que actualmente existan diferentes dispositivos para realizar estudios de imagen multimodal en pequeños animales de experimentación, como los equipos **microPET/CT**, microPET/MR, microSPECT/CT, microMR y microCT. Todos estos equipos tienen resoluciones adecuadas para el estudio de roedores, principalmente rata y ratón. Esta tecnología aporta una gran información de los múltiples procesos biológicos que ocurren en el organismo, como puede ser el metabolismo de la glucosa, el estado de neuroreceptores y de neurotransmisores, el flujo sanguíneo, el consumo de oxígeno y la división celular, entre otros muchos. Además del estudio de los procesos biológicos, estas técnicas facilitan analizar diferentes patologías moleculares en modelos animales de enfermedades humanas, así como la evaluación preclínica de numerosas terapias, constituyendo una herramienta esencial en numerosas líneas de investigación biomédica.

Estos dispositivos permiten obtener, como de un estudio clínico se tratase, la información necesaria para determinar la distribución del trazador a lo largo del organismo y así estudiar las patologías que se encuentran asociadas a diferentes órganos. Esta clase de estudios facilitan el análisis de las características de las patologías en los roedores para después, de una forma traslacional, aplicar las mismas terapias en humanos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Debido a esta alta traslacionalidad, las áreas de aplicación de la imagen PET preclínica están íntimamente relacionadas con las indicaciones clínicas. Así pues, la oncología es una de las áreas más activas en este campo de investigación, ya que permite el estudio de las características de las células tumorales y de los procesos biológicos implicados en la carcinogénesis: proliferación, diferenciación, angiogénesis y apoptosis. Otro de los campos de estudio en los que se utiliza esta técnica es en la neurociencia, donde se permite visualizar los procesos de neurotransmisión, activación y funcionalidad cerebral alterados en patologías neurológicas, neurodegenerativas y alteraciones psiquiátricas como la depresión o la ansiedad. También, la cardiología es otro de los campos, pues evalúa la funcionalidad cardiovascular, la detección de enfermedades coronarias y el análisis de los infartos, como se ha visto recientemente [38].

Como se ha mencionado anteriormente, el uso de la técnica de la PET se debe complementar con la información obtenida mediante otros dispositivos de imagen, como puede ser el caso del CT. En este caso, lo que se utilizarían son rayos X que atraviesan al roedor y, en función de la **atenuación** de esos rayos, se obtendrá una imagen en 3 dimensiones que permitirá, con mayor precisión, localizar la región anatómica donde se encuentre una lesión o región de interés que se quiera estudiar y, de esta forma, permitir la realización de estudios cuantitativos. Este enfoque presenta una gran traslación clínica, ya que demuestra una alta resolución espacial para localizar anatómicamente la información de la PET.

Se debe destacar que la experimentación animal está regulada para asegurar el correcto uso de los animales de experimentación, recogida por el **Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia** [39]. Para entender el concepto de imagen preclínica es necesario conocer la definición de **procedimiento**. Un procedimiento es cualquier uso, tanto invasivo como no invasivo, de un animal con fines de experimentación u otros como los educativos, que pueda causarle un nivel de dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero equivalente o superior al causado por la introducción de una aguja. A partir de ese momento, cualquier proceso de este tipo o más dañino, deberá ser autorizado mediante un Comité de Ética por la entidad competente encargada de la investigación. De este modo, se publicó en 1959, por parte de **William Russell y Rex Burch**, el libro en defensa de los animales, lo que derivó en un nuevo pensamiento acerca del cuidado de los mismos, creando lo que se conoce como el mecanismo de las **Tres Erres**, cuyo enfoque sigue la línea establecida por las técnicas de imagen PET preclínica al permitir estudiar *in vivo* los procesos biológicos [39, 40]:

- **Reemplazo**: sustitución de animales *in vivo* por técnicas *in vitro*, como modelos de ordenadores, vídeos, simuladores u otros animales para obtener el mismo resultado.

- **Reducción**: disminución del número de animales utilizados mediante un diseño experimental cuidadoso y la estandarización de los mismos, lo que conlleva una menor variabilidad de los resultados. Por tanto, se premia la utilización de menos animales por experimento, evitar experimentos innecesarios o repetitivos y programas de bioestadística.

- **Refinamiento**: disminución del sufriente producido en los animales para mejorar no solo su bienestar, sino la calidad de los resultados. Para ello es necesario el enriquecimiento ambiental que permita cubrir las necesidades fisiológicas y de comportamiento y técnicas adecuadas de anestesia y de analgesia.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 2.4. ANATOMÍA Y ESTUDIO DE LA IMAGEN MOLECULAR PRECLÍNICA DE PET CEREBRAL

La imagen molecular de PET cerebral abre numerosas posibilidades para implementar las técnicas de diagnóstico, diseño de nuevas terapias y validación y optimización del pronóstico de nuevos protocolos [41]. Estas técnicas establecen un puente esencial para trasladar los resultados obtenidos en modelos animales de experimentación a la práctica clínica.

Debido a la gran calidad de imagen que se necesita para estudiar una región tan pequeña como puede ser el cerebro de los roedores, como los ratones o las ratas, se necesitan modalidades de imagen de **alta resolución**. Para ello, es imprescindible encontrar un balance entre la resolución espacial, la habilidad de un sistema de imagen para demostrar pequeños detalles, la sensibilidad y la capacidad del observador para dar como casos positivos los realmente enfermos ya que, si se quieren ver detalles muy pequeños, surge una disminución de la sensibilidad [42,43].

En este contexto se debe tener en cuenta la parte anatómica del cerebro de los roedores a la hora de realizar estas técnicas de imagen y sus diferencias con los humanos. Cada una de las estructuras cerebrales ha ido evolucionando en un grado diferente según la especie debido a sus necesidades individuales. Así, en los roedores se observan unos **bulbos olfatorios** relativamente más evolucionados que en los humanos y, sin embargo, los humanos presentan unas **áreas del lenguaje** relativamente más desarrolladas en la corteza cerebral. Las principales estructuras que permiten diferenciar ambos cerebros, además del tamaño, son la corteza cerebral y el bulbo olfatorio.

La corteza corresponde a la estructura más amplia de ambos cerebros, pero la gran diferencia entre ambos es la inexistencia de pliegues en el cerebro del roedor, el cual es liso. Estos pliegues cerebrales, asociados a un aumento de la superficie del cerebro, permiten que esta estructura encaje dentro del cráneo permitiendo, a su vez, que la corteza sea mayor. Gran parte de la corteza humana está altamente relacionada con funciones cognitivas y del lenguaje, por lo que se cree que la diferencia de intelecto entre las ratas y los humanos está ligado a un mayor tamaño cortical en estos últimos. Con respecto al bulbo olfatorio, en humanos es prácticamente insignificante a diferencia del enorme bulbo olfatorio que presentan los roedores [44]. Esto está íntimamente relacionado con la interacción con el mundo que les rodea, es decir, el uso de su sentido del olfato como medio de supervivencia.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 2.5.MODELOS ANIMALES DE TUMORES CEREBRALES

El desarrollo de modelos representativos de los distintos tipos de patologías en animales de experimentación como reflejo de las mismas, es fundamental para entender cómo se originan y evolucionan, así como para desarrollar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas [45]. Un **modelo animal inducido** permite estudiar la formación de la neoplasia desde un inicio, identificando las etapas de su progresión y las diferentes alteraciones que pueda sufrir e inducir en el microambiente circundante. Teniendo en cuenta lo anterior, se puede constatar que los modelos animales representativos del desarrollo de enfermedades son necesarios para ahondar en procesos complejos como es la capacidad invasiva y la interacción con el entorno, difíciles de evidenciar en cultivos celulares [46].

Un buen modelo animal es aquel que muestra un balance adecuado entre la **protección** de las condiciones básicas del animal, la **fidelidad** al desarrollo de la enfermedad en humanos y la **herramienta** que represente para el investigador, en este caso, el uso de radiofármacos y de equipos de imagen molecular, principalmente. El modelo ideal de neoplasia debería mostrar una histopatología comparable a las que se observa en muestras tumorales incluyendo infiltración, diseminación a distancia y angiogénesis a medida que evoluciona la enfermedad. En los modelos a analizar, las vías de señalización prominentes en neoplasias humanas deberían estar igualmente preservadas, así como la evidencia de heterogeneidad celular y molecular en los distintos estadios. A su vez, cuando sea posible, las interacciones estromales deben ser fieles a sus homólogos humanos. Además de estos aspectos, el modelo ideal debería permitir desarrollar neoplasias en períodos cortos y mostrar una evolución predecible para permitir un control exhaustivo y, así, detectar cualquier cambio. Evidentemente, **no existe** ningún modelo que satisfaga todos estos requisitos altamente demandantes y cada modelo *in vivo* tiene distintas ventajas y desventajas; sin embargo, el uso de modelos experimentales es una herramienta valiosa para el estudio de diferentes patologías.

Tal y como es de suponer, los primeros modelos tumorales de animales fueron modelos de carcinogénesis química producido por el suministro de sustancias químicas capaces de alterar la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN), introduciendo mutaciones y aumentando la capacidad de transformación celular y el desarrollo de neoplasias espontáneas, no evidenciables en los animales control. Desde entonces, la exposición a determinados factores ambientales químicos, físicos como la radiación o biológicos como virus patógenos han dado lugar a modelos útiles para estudios preclínicos, así como analizar el potencial carcinogénico o quimiopreventivo de diversos compuestos químicos [47]. Hoy en día, debido a la espontaneidad de los tumores que aparecen en los inducidos, junto a su desarrollo en **animales inmunocompetentes** y en un estroma no modificado, hacen que estos modelos sean de un gran valor en la investigación científica. Sin embargo, es evidente que existen limitaciones en los modelos de inducción, que puede afectar a sus diferentes facetas y, ello, puede dificultar su implementación en la práctica.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

El desarrollo de los modelos de tumores cerebrales ha experimentado un gran auge en los últimos 60 años, habiéndose conseguido mejoras significativas como el establecimiento de gliomas altamente invasivos. Aunque está claro que ninguno de los modelos animales actuales refleja plenamente la patología humana, los diversos sistemas disponibles han otorgado información sobre mecanismos específicos del desarrollo de estas neoplasias.

Los modelos de rata, en su mayoría, no están genéticamente modificados, por lo que el objetivo de una cierta vía y la exploración de interacciones tumor-estroma es preferentemente estudiado en los modelos de ratón. Sin embargo, en el caso del cerebro, los modelos de rata se han utilizado para evaluar numerosas modalidades de diagnóstico y tratamiento, ya que, en ciertos aspectos, reproducen mejor la enfermedad humana. Esto se debe a que el **tamaño del animal** mejora su uso como modelo de la enfermedad cerebral, no solo debido a la capacidad para realizar mejor los procedimientos quirúrgicos, sino también al tamaño proporcional de los órganos y sus estructuras. En el caso del Sistema Nervioso Central (**SNC**), es particularmente importante el empleo de técnicas de imagen en las cuales las discriminaciones espaciales son una variable limitante [37]. El tamaño del cerebro de la rata, aproximadamente tres veces superior al del ratón, puede llegar a tolerar volúmenes mayores a la hora de la administración de los compuestos o células, posibilitando probar agentes terapéuticos y nuevos fármacos.

Los mecanismos de inducción de los gliomas en el ámbito preclínico pueden ser clasificados del siguiente modo:

- **Inducción química**: El desarrollo de métodos de inducción basados en procesos químicos comenzó en la década de los 60. Desde entonces, las nitrosoureas (medicamento contra el cáncer que puede cruzar la barrera hematoencefálica) demostraron ser la mejor alternativa para inducir selectivamente la aparición de gliomas [47]. Estos nitrocompuestos alquilan las bases del ADN en un proceso, en varios pasos, que se inicia con la ruptura del carcinógeno bajo la influencia catalítica de un grupo tiol u otra base sin la necesidad de participación de una enzima. El lugar, así como la tasa y mecanismo de alquilación, depende principalmente del agente alquilante en cuestión. Un ejemplo sería en el caso del N-metilnitrosourea (**MNU**), una N-nitrosamina, en la cual la posición del $O^6$ de la guanina es el blanco preferencial. Durante la duplicación celular, estos cambios en la base promueven eventos mutágenos por la adquisición de nuevas propiedades químicas que promueven apareamientos incorrectos, lo que puede servir como punto de partida en el **proceso oncogénico** (como puede ser en el caso del $O^6$-metilguanina que se aparea con una timidina en vez de una citosina) [48]. La selectividad del sistema nervioso, por estos agentes alquilantes, es consecuencia de un proceso de reparación defectuoso que involucra directamente el mecanismo de acción de las nitrosoureas, en donde la $O^6$-alquilguanina químicamente estable no es rápidamente reparada, como sucede en los demás tejidos del organismo. La carencia, por parte del SNC, que involucra la presencia de proteínas aceptoras de grupos alquilo que transfieren los grupos alquilo a un residuo de cisteína propio desde las guaninas modificadas, podría explicar la

acumulación de bases alteradas en el SNC y la selectividad con la que se induce el tumor mediante agentes como MNU. Existen varios modelos inducidos por MNU y N-Ethyl-N-nitrosourea (**ENU**) que tienen características neuropatológicas similares a los gliomas malignos desarrollados en los humanos: pleomorfismo celular, actividad mitótica elevada, microvascularización, invasión local y necrosis; que varían en el tiempo de exposición, la forma de administración del carcinógeno y el momento de la vida del animal en el que es suministrado. Existen modelos en donde es posible inducir gliomas en ratas adultas suministrando una dosis de 10 ppm en el agua del bebedero del roedor durante 20 semanas para la aparición de tumores con una latencia de 20 a 50 semanas, pero esto conlleva un uso sostenido del agente tóxico y, por tanto, es una técnica difícil de implementar. **Druckrey** y colaboradores, en 1966 implementaron un modelo que se acabaría convirtiendo en el más popular, el cual involucraba una menor cantidad del carcinógeno [49]. Este modelo consiste en la administración intravenosa de una solución de ENU en una hembra preñada en el día 21 de gestación exponiendo, por vía trasplacentaria, a los fetos durante las etapas finales de gliogénesis y de la diferenciación de la glía.

Este período de vulnerabilidad y modificaciones en el SNC, sumado a la deficiencia de los mecanismos de reparación, posibilitan que una única inyección a la madre derive en la aparición de gliomas en el 100% de su descendencia. Los tumores inducidos por agentes mutágenos, como es el caso de los anteriormente citados, crecen dentro del tejido cerebral y, desde un punto de vista histopatológico, son reminiscentes de las neoplasias humanas. Los agentes carcinógenos, además, pueden causar mutaciones al azar en cualquiera de los genes del organismo, lo que impide conocer la causa primaria de los gliomas. Esta variabilidad de blancos provoca que este método de inducción química sea poco reproducible y que los tumores obtenidos sean de perfil genético desconocido y que difieran en tipo, localización y latencia, pudiendo incluso ocasionar la generación de más de un tumor primario. Además, el gran problema que conlleva esta técnica es la administración del carcinógeno a una hembra gestante en estado avanzado, lo que impide el uso de ciertos mecanismos de anestesia profunda. Estas desventajas, sumadas al peligro para la salud que conlleva la manipulación de dichas sustancias, hacen que estos modelos hayan caído en desuso y fueran paulatinamente reemplazados por los modelos celulares.

- **Modelo de trasplante de células**: Los modelos de trasplante de células de glioma tienen un período de latencia más corto, un mejor control sobre la localización del tumor, producen neoplasias únicas e involucran un menor coste. A partir del modelo de inyección ENU se generaron las líneas altamente invasivas **RG2** [50] y **F98** [51]. En cambio, en el caso de las MNU, la exposición repetida en distintas cepas dio origen a distintas líneas como **CNS-1** (procedente de la cepa Lewis), la **9L** (derivada de un gliosarcoma procedente de ratas Fischer) y la **C6** (derivada del astrocitoma). Todas estas líneas celulares ofrecen una gran diversidad y una ventaja significativa en cuanto a predictibilidad y correlación en resultados *in vitro* [52].

Uno de los requerimientos que presenta la implementación de los modelos celulares es la manipulación de una cirugía compleja. Al inicio, se realizaban **modelos ectópicos** donde las células se inyectaban de forma subcutánea fuera del órgano donde se generaría la patología; un ejemplo sería en una pata de un roedor. Sin embargo, en el caso de los tumores cerebrales, el **implante celular ortotópico** es el que produce mejores aproximaciones; por eso, la inyección estereotáxica intraparenquima cerebral de células tumorales da como resultado una incidencia del 90% en la mayoría de los modelos utilizados, por lo que se ha convertido en la técnica estándar para el trasplante de las líneas celulares del glioma desde finales de los años 80. Se debe tener en cuenta algunos de los aspectos técnicos del procedimiento para la reproducibilidad del modelo, independientemente de la línea celular utilizada. Los autores **Kobayashi y colaboradores** fueron los primeros en demostrar las ventajas de la administración estereotáxica en inyección a mano alzada, aunque con el paso de los años, se demostró que la administración de las células directamente en el cerebro de los roedores con una retirada lenta de la aguja usada para el procedimiento esterotáxico ha minimizado el riesgo de diseminación extracerebral [53].

Existen factores asociados al huésped que son importantes a la hora de que se realice con éxito el trasplante del glioma, como la edad o la cepa de la rata intervenida. La edad del roedor es importante, ya que los animales neonatales tienden a aceptar el trasplante intracerebral de las células mejor que los adultos, por lo que se disminuye la eficiencia de los modelos con la edad. Al centrarse en sistemas singénicos que utilizan las mismas cepas y líneas de glioma, la tasa de éxito, incluso en los animales adultos, es próxima al 100%, indicando que los **factores genéticos** son más importantes que la edad del roedor en la incidencia del tumor. El sexo del animal es un factor que no influye en el éxito del trasplante, aunque en la mayoría de los estudios se utilizan machos para evitar la interacción hormonal.

Otro de los factores a tener en cuenta es la cantidad de células inoculadas por inyección para el desarrollo de la neoplasia. La dosis más común, que se utiliza para la generación del modelo, oscila entre 10.000 al 1.000.000 en volúmenes de 2 a 50μL, aunque se recomienda el uso de volúmenes pequeños para evitar el aumento de la **presión intracraneal**. Estos datos se obtuvieron mediante la dosis respuesta en la producción de células C6 implantadas en ratas **Wistar**, trabajando entre un rango de dosificación de entre 5 células hasta 100.000, observando una incidencia del tumor de hasta el 100% en los casos en cuya dosis era superior a las 10.000 células. Administraciones de menos de 500 células no llegaron a desarrollar el tumor [54].

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Con el fin de desarrollar modelos lo más representativos de la enfermedad humana, los trasplantes de células humanas de gliomas fueron considerados. Los primeros estudios de gliomas humanos *in vivo* se vieron obstaculizados por la presencia de **rechazos inmunológicos** de los xenotrasplantes. La inmunosupresión con corticosteroides y radiación, aunque es útil en el trasplante de algunos tumores subcutáneos, no es eficaz para prevenir el rechazo de xenoinjertos de glioma humano

en el cerebro del roedor y, para ello, es necesario el uso de roedores “nude” atímicos, como mejor modelo, ya que la producción tumoral oscila entre el 76 y el 100% de los casos. El hecho de que el porcentaje no sea siempre el 100% radica en las diferencias de la biología del glioma humano particular implantado [55].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 2.6. LIMITACIONES PARA EL ESTUDIO DE MODELOS DE TUMORES CEREBRALES CON PET PRECLÍNICO

Los modelos de glioma en roedores parecen proporcionar un equilibrio entre un cerebro de tamaño razonable, para el estudio ***in situ***, junto con un mantenimiento de los animales de una forma relativamente económica. Los modelos de glioma de roedor han manifestado un perfeccionamiento en los últimos años, en donde los modelos de nitrosourea tienen la ventaja de producir tumores autóctonos, pero con períodos latentes muy amplios y variables. El cuidado de los animales a largo plazo y las instalaciones a implementar para trabajar con carcinógenos puede incrementar el precio de las técnicas, siendo este más caro que el propio modelo del trasplante. En el caso de los modelos de trasplante celular, como se ha visto en el apartado anterior, tienden a ser más previsibles y menos costosos, ya que las células trasplantadas son el producto del proceso de selección artificial del cultivo celular, además de demandar la inmunosupresión de los animales y de presentar, usualmente, rasgos histopatológicos que difieren de los gliomas humanos. A la hora de la selección del modelo es importante reconocer las limitaciones mencionadas tanto de eficiencia como de latencia de producción de tumores, gasto, respuesta al tratamiento, características histológicas y comportamiento biológico.

En este campo se reconoce que, si bien estos modelos tienen ventajas considerables con el fin de obtener mejores datos trasladables a la patología humana, es necesario la implementación de nuevas estrategias que permitan el desarrollo de modelos más fiables desde un punto de vista de la Medicina Nuclear, histopatológico, interacción tumor-microambiente y que a su vez ofrezcan altas tasas de éxito [56].

Esta no es la única problemática asociada a la selección de los modelos tumorales, ya que en Medicina Nuclear es fundamental tener en cuenta la actividad de radiofármaco que se introduce en el tumor y el que continúa en circulación durante el proceso de diagnóstico de la patología. En la actualidad, los modelos de detección del contaje de trazador en circulación se limitan en la obtención, mediante contaje por goteo y de forma manual, del trazador de una forma muy rudimentaria que limita la técnica y, a su vez, puede ver expuesto al manipulador en unos niveles excesivos, existiendo otros mecanismos mediante circulación extracorpórea que reducirían los niveles de radiación manipulados por el trabajador. Esta limitación impide ser preciso a la hora de realizar estudios de anticuerpos marcados radiactivamente para aplicar nuevas terapias ante patologías como el glioma y, por tanto, es fundamental la implementación de nuevas técnicas pioneras en este campo asociado a la Medicina Nuclear.

Con todo esto, es importante mencionar que la principal limitación del PET preclínico en modelos animales viene dada por la propia técnica PET en las cuales la resolución espacial, el muestreo de sangre arterial y el uso de trazadores más específicos que los habitualmente utilizados, como la FDG, deterioran el estudio preclínico de patologías como los tumores cerebrales debido a su alta especificidad y complejidad.

# 3. PRINCIPIOS DE LA NEOPLASIA CEREBRAL: EL GLIOMA

## 3.1.DEFINICIÓN DE GLIOMA

Para entender la definición de una neoplasia como el glioma, es necesario mencionar la función y las partes de las que consta un órgano como el cerebro. El cerebro es la estructura encargada de la coordinación y del control del organismo. Se trata de una masa de tejido blando protegido por el hueso craneal y las membranas meníngeas (duramadre, aracnoides y piamadre), por donde fluye el líquido cefalorraquídeo encargado, entre otras funciones, de dar soporte y nutrición [57]. Esta estructura está constituida por el encéfalo (hemisferios cerebrales, tronco del encéfalo y cerebelo) y por la médula espinal, esta última alojada en una estructura ósea denominada columna vertebral, rodeada de las meninges y encargada de continuar con la comunicación con el resto del organismo. Los dos hemisferios cerebrales, anteriormente citados, están unidos por el cuerpo calloso y se dividen, a su vez, en varios lóbulos: **frontal** (razonamiento, emociones, parte del habla y movimientos), **parietal** (sensaciones del contacto, dolor, temperatura y parte del habla), **temporal** (memoria, sentido del oído y parte del habla) y **occipital** (visión). El tronco del encéfalo tiene la mayor ruta de comunicación entre el cerebro, la médula espinal y los nervios periféricos, incluyendo también la respiración, el ritmo cardíaco y aspectos primarios de la localización del sonido. Con respecto al cerebelo, se localiza en la parte posterior del cráneo y tiene, como función principal, el mantenimiento de la coordinación y del equilibrio [58]. El conjunto de todas las estructuras anteriormente mencionadas se denomina SNC [59].

Para conocer el comportamiento de los tumores cerebrales, es importante hacer hincapié en la función del líquido cefalorraquídeo, ya que no tiene drenaje linfático y su diseminación a través de la sangre es rara, por lo que los tumores cerebrales que se desarrollan como originarios del cerebro, es decir, de carácter primario, no suelen metastatizarse al resto del cuerpo [60,61]. En términos generales, se denomina **neoplasia cerebral** al crecimiento de una masa en el interior del cerebro.

Como descripción global, se denomina **glioma** al crecimiento incontrolado de las células gliales que se origina en el parénquima encefálico, pudiendo afectar también a la médula espinal. Estas células gliales son fundamentales para el correcto funcionamiento del sistema nervioso, aportando soporte a las células cerebrales, las neuronas. Los gliomas se clasificarán dependiendo del tipo de célula glial que esté involucrado en el desarrollo del tumor, así como de sus características genéticas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 3.2.EPIDEMIOLOGÍA

En España, según los últimos registros poblacionales, se estimó que el cáncer en el año 2021 alcanzó los 276.239 casos de la población española, representando los tumores primarios del sistema nervioso central el 2% del total de estas neoplasias en el adulto y significando un 15% en los niños menores de los 15 años. Este último dato clasifica a los tumores cerebrales pediátricos como la **segunda causa de muerte** por cáncer, después de la leucemia [62].

Todo esto indica que, a diferencia de la edad pediátrica, en el caso de la edad adulta se trata de un tipo de neoplasia poco frecuente, presentando una incidencia mayor en los hombres (55%). Dentro de estos porcentajes, los meningiomas (afectación tumoral en las meninges) seguidos de los gliomas, como los oligodendrogliomas o los astrocitomas anaplásicos, son los más frecuentes.

Si por el contrario se analizan los datos por grupos histológicos, las **metástasis** son las neoplasias más frecuentes en el sistema nervioso central, destacando como principales factores de riesgo los portadores de los tumores mamarios, pulmonares y dérmicos, ya que tienen un alto grado de metastatización.

Teniendo en cuenta lo anterior, la mayor parte de los tumores cerebrales son benignos (66%), aunque muchos tumores benignos no son confirmados mediante histología, por lo que la incidencia de tumores malignos podría ser mayor del 34% recogido hasta la fecha. Las **neoplasias malignas** más frecuentes son el glioblastoma (3,2 por 100.000 habitantes), astrocitoma de grado III (0,51 por 100.000 habitantes) y el linfoma (0,43 por 100.000 habitantes). Por el contrario, los **tumores benignos** más frecuentes son el meningioma (7,93 por 100.000 habitantes), adenoma hipofisario (3,65 por 100.000 habitantes) y el Schwannoma (1,81 por 100.000 habitantes) [62].

La localización más frecuente de los tumores cerebrales son las **meninges** (36,1%) debido a la alta incidencia de meningiomas. De las neoplasias denominados intra-axiales, la localización más frecuente es el lóbulo frontal (8,6%), seguido del temporal (6,4%), parietal (4%) y el occipital (1,1%). Con respecto a otras ubicaciones, destacan la región hipofisaria y el conducto cráneo-cervical (16,2%), pares craneales (6,7%), cerebelo (2,6%), tronco cerebral (1,5%), sistema ventricular (1,1%) y glándula pineal (0,5%) [63].

Si la comparativa se realiza por edades, la incidencia total de tumores cerebrales es mayor en pacientes de avanzada edad, aquellas personas mayores de 85 años (81,16 por 100.000 habitantes) y menor en niños de entre 0-14 años (5,26 por 100.000 habitantes). Los astrocitomas pilocíticos, tumores de células germinales y tumores embrionarios son más frecuentes en los grupos de menor edad, disminuyendo su incidencia en los grupos de mayor edad, al contrario de lo que pasa con los meningiomas, cuya incidencia aumenta con aquella [64].

## 3.3.FISIOPATOLOGÍA DE LOS GLIOMAS

Como se ha visto hasta el momento, los gliomas son un tipo de neoplasia cerebral que se puede desarrollar tanto a nivel del cerebro como a nivel de la medula espinal. Los gliomas se clasifican dependiendo del tipo de célula glial involucrada en la formación del tumor y adquieren importancia las características genéticas, pues pueden ayudar a predecir el comportamiento de la neoplasia con el paso del tiempo. Por lo tanto, dentro de este tipo de patología, se pueden diferenciar tres tipos de tumores gliales [65]:

- **Astrocitoma**, que a su vez incluyen astrocitomas, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas.
- **Ependimomas**, formadas por ependimomas anaplásicos, ependimomas mixopapilares y gliomas subependimarios.
- **Oligodendrogliomas**, grupo formado por oligodendrogliomas, oligodendrogliomas anaplásicos y oligoastrocitoma anaplásico.

En general, dependiendo del tipo de patología que padezca el paciente, el tratamiento y su pronóstico será distinto.

Este tipo de tumores crecen en el propio tejido intraparenquimatoso de forma difusa sin estar totalmente delimitados del resto del parénquima. La rapidez de su crecimiento y la agresión del tejido normal circundante acaba derivando en la producción de una reacción denominada edema cerebral, ya que el tumor lesiona la **barrera hematoencefálica** (BHE). Esta barrera se presenta a nivel de la unión de la glía, la cual protege y aísla las neuronas del medio ambiente, con los capilares sanguíneos. Este edema extracelular supone el aumento de la cantidad de agua entre las células, lo que implica un peor funcionamiento a nivel neuronal y, por tanto, el aumento del volumen intracraneal [66].

Existe la posibilidad de que se segregue un líquido hiperproteico en el interior del tumor, lo que acaba adquiriendo un **componente quístico**, unilobulado o multilobulado, provocando que el ritmo de crecimiento de dicho tumor sea mayor que si se tratase de una simple división celular.

Otra de las posibles situaciones que se pueden encontrar con este tipo de neoplasias es que el rápido crecimiento de la patología hace que en sus zonas más internas la llegada de la circulación sanguínea se vea comprometida, lo que acaba derivando en un proceso denominado muerte celular o **necrosis**.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 3.4.FACTORES DE RIESGO Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Existen muchos factores de riesgo asociados con la aparición de tumores cerebrales, pero solo los siguientes mencionados presentan una relación estudiada con la aparición de este tipo de neoplasias [67,68]:

- **Radiaciones ionizantes**

  Con respecto a las radiaciones ionizantes, existe una relación causa-efecto bien descrita hasta la fecha. Los estudios realizados a la población expuesta a radiaciones desde la edad infantil, por estudios médicos, han demostrado estar relacionado con la aparición de tumores cerebrales años posteriores a la administración de tratamientos de radioterapia (linfoma, leucemia, hemangioma cutáneo, hipertrofia amigdaliana u otro tipo de patologías que requieran de esta terapia). Los tumores radioinducidos más frecuentes son los meningiomas y los gliomas, siendo mayor el riesgo de desarrollar el primero de ellos. El tiempo estimado entre la administración del tratamiento y la aparición de la neoplasia oscila entre los 9-18 años en los meningiomas y de 17 a 23 años en el caso de los gliomas. Además, existe una relación entre la dosis administrada y el riesgo de padecer la enfermedad [69,70].

- **Susceptibilidad genética y molecular**

  En los últimos años, este apartado ha obtenido una gran relevancia a la hora de hablar de los factores de riesgo de estas patologías. Aunque es cierto que la gran mayoría de los tumores cerebrales son esporádicos, existe una evidencia genética con respecto a su aparición. El ejemplo más característico son los pacientes con neurofibromatosis tipo I, asociados a los gliomas del nervio óptico o glioma de tronco y hemisferios. Características como la anteriormente citada permiten, mediante biomarcadores, conocer con una mayor certeza como será el pronóstico y la respuesta al tratamiento de una forma predictiva [71].

- **Alergias y relaciones inmuno-mediadas**

  Las alergias y las condiciones autoinmunes parece que están inversamente relacionadas con la aparición de la patología glial. Por eso, todo esto demuestra que existe una evidencia en los pacientes con asma, dermatitis atópica y rinitis alérgica asociados a un menor riesgo de aparición de los gliomas. La evaluación obtenida mediante este resultado incluyó un total de 3.450 pacientes diagnosticados con glioma y 1.070 con meningioma. Todo esto desencadenó que esta deficiencia inmunológica, o los tratamientos usados para esta, tenían un factor protector contra este tipo de neoplasias [72].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad, por su parte, pueden aparecer de muy diversas formas, dependiendo de la región del cerebro que se vea afectada por la neoplasia. Aún mencionando lo anterior, parece que existe una tendencia dependiendo del tipo de glioma que manifieste el paciente. Las **crisis epilépticas** suelen ser la forma más frecuente de presentar un glioma de carácter benigno, mientras que los gliomas malignos suelen ser menos epileptógenos y más productores de déficits neurológicos y de **hipertensión intracraneal** (HIC), acompañados de una evolución relativamente rápida de esta sintomatología [73]. En rasgos generales, este tipo de tumores van a provocar dos tipos de sintomatologías:

- Sintomatología general a consecuencia de la situación de hipertensión intracraneal que genera el crecimiento del tumor dentro de la estructura rígida que es el cráneo; esto genera una **sintomatología** de cefalea, náuseas, vómitos y edema papilar. De una forma progresiva, se va a ver afectado el nivel de conciencia, siguiendo este orden: normal, bradipsiquia, desorientación temporo-espacial, estupor o agitación, coma con respuesta al dolor localizado y muerte cerebral.

- Sintomatología focal, que puede ser de dos tipos: por **déficit funcional**, dependiendo de la localización tumoral (hemiplejia, afasia, hemiapnosia, dismetría y afectación de pares craneales) y **por irritación y exceso de función**, lo que deriva en epilepsia parcial o focal.

El déficit funcional depende de la región del cerebro donde se inicia el desarrollo de la patología neuronal y de que afecte o no a las zonas silentes del cerebro [74].

- **Lóbulo frontal**: Disminución de la capacidad intelectual, alteraciones de la marcha y falta de control de los esfínteres. Si la región afectada es la **región de Broca**, podría generarse una afasia de Broca o incapacidad para decir lo que se piensa si el tumor crece en el lóbulo frontal izquierdo o dominante del lenguaje.
- **Región central o zona Rolándica**: Pérdida de fuerza y sensibilidad en las extremidades contralaterales.
- **Lóbulo temporal**: Pérdida de memoria, perdida de visión en la región contralateral (hemianopsia), alteraciones del lenguaje como la **afasia de Wernicke** (no entiende lo que se le dice) en el caso de que exista afectación del lado izquierdo o hemisferio dominante para el lenguaje.
- **Lóbulo occipital**: Pérdida de la visión en el campo visual contralateral.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 3.5.MÉTODO DIAGNÓSTICO

Las pruebas diagnósticas se utilizan principalmente en dos fases, la primera para conocer con la mayor seguridad posible la tipología de la neoplasia y, la segunda, para comenzar a trazar la línea terapéutica que se llevará a cabo dependiendo del lugar y tipo de tumor. En la actualidad, si se sospecha de una patología cerebral, como de una neoplasia a raíz de una crisis epiléptica que aparece, sin tener previas, por primera vez a partir de los 20 años [75,76], se realizarán una serie de **pruebas y procedimientos** como un examen neurológico o pruebas diagnósticas por imagen. El examen neurológico, el cual debe ir acompañado de una prueba analítica general para valorar indicadores de inflamación/infección y cuantificar las funciones de coagulación sanguínea, suele comprender el control de la visión, audición, equilibrio, coordinación, fuerza y reflejos. La dificultad, en una o más de las pruebas anteriormente citadas, puede determinar que parte del cerebro se puede ver afectado y a que tipo de lesión puede verse dañado. Una vez valorado este apartado y teniendo indicios de una posible patología, se procederá a la realización de las pruebas diagnósticas más importantes, MR, CT y PET [77,78].

- **MR**

  La resonancia magnética es una técnica de imagen no invasiva que permite obtener pruebas anatómicas tridimensionales de una forma detallada, **sin el uso de radiación ionizante**. Su uso está relacionado con la detección de enfermedades, el diagnóstico y la monitorización de tratamientos. Se basa en una sofisticada técnica de estimulación y detección del cambio de dirección del eje de rotación de los protones que se encuentran en el agua del que se componen los tejidos vivos. Para ello, la MR usa imanes que producen un **potente campo magnético** que obliga a los protones en el cuerpo a alinearse con dicho campo. Cuando se pulsa una corriente de radiofrecuencia a través de los pacientes, los protones son estimulados y giran fuera de equilibrio, lo que les obliga a luchar contra la fuerza de ese campo magnético [79]. Cuando se apaga el campo de radiofrecuencia, los sensores de la MR son capaces de detectar la energía liberada mientras los protones se realinean con el campo magnético. El tiempo en el que tarden los protones para realinearse con dicho campo, así como la cantidad de energía liberada, cambian dependiendo del entorno y la naturaleza química de cada molécula. Esto permite, al encargado de examinar dichas imágenes, de identificar la diferencia entre los varios tipos de tejidos basándose en las propiedades magnéticas de este campo. Para la obtención de estas imágenes, el paciente se tiene que colocar dentro de un imán y debe permanecer **inmóvil** durante la adquisición para que la imagen no presente ningún artefacto a causa del movimiento [80]. Los medios de contraste, como es el caso del **Gadolinio**, se administran al paciente por vía intravenosa, normalmente durante la adquisición, para aumentar la velocidad a la que los protones se realinean con el campo magnético, por lo que, cuanto más rápido se realineen los protones, más clara será la imagen que se obtiene.

  Al controlar el pulso de radiofrecuencia y las ondas de gradiente, programas computarizados producen secuencias de pulso específicas que determinarán cómo se

obtiene una imagen (**ponderado**) y cómo aparecen los diversos tejidos. La magnitud y la velocidad de liberación de energía que se produce cuando los protones reanudan la alineación (relajación **T1**) y se balancean durante el proceso (relajación **T2**) se registran como intensidades de señal espacialmente localizadas por una bobina (antena) dentro del resonador magnético. De esta forma, las imágenes pueden ser ponderada en T1, en T2 o por densidad protónica. Una forma que permite seleccionar mejor la imagen dependiendo de la región a estudio es conocer que las imágenes ponderadas en T1 muestran de forma óptima la anatomía normal del tejido blando y grasa (lo que permite confirmar una masa que contiene grasa) y las imágenes ponderadas en T2 muestran de forma óptima el líquido y las alteraciones (como los tumores, inflamación o traumatismos). En la práctica, ambas imágenes proporcionan información complementaria, por lo que **ambas son importantes** para la caracterización de alteraciones. Un ejemplo más visual seria la presencia de tejido adiposo, que aparece con una señal de alta intensidad (brillante) en las imágenes ponderadas en T1 y relativamente con una señal de baja intensidad (oscuras) en las imágenes ponderas T2, mientras que el agua y los líquidos aparecen como señal de baja intensidad en las imágenes ponderadas en T1 y con una señal de alta intensidad en las imágenes ponderadas en T2 [81].

Los escáneres de la MR son los apropiados para la obtención de imágenes de las partes no óseas o de los tejidos blandos del cuerpo. La principal diferencia con respecto a la CT es que no usa rayos X, en este caso, radiación ionizante. El cerebro, la médula espinal y los nervios, así como los músculos, ligamentos y tendones, se ven mucho más claros con la MR que con el uso de la CT. En el caso del cerebro, la MR es tan precisa que puede diferenciar entre la materia blanca y la materia gris, por lo que su uso es ideal para diferenciar patologías cerebrales como pueden ser aneurismas o tumores cerebrales. Debido a que no usa radiaciones ionizantes, esta técnica es la modalidad de imágenes preferida en cuanto a la repetición de pruebas de diagnóstico se refiere, especialmente a nivel cerebral. El principal **inconveniente** de esta técnica es su **alto coste económico**, siendo superior al escaneo con las técnicas de CT [82]. La finalidad de su uso radica en la localización precisa de las patologías cerebrales como método diagnóstico para, posteriormente, aplicar un método quirúrgico con un margen de error muy reducido o la terapia correspondiente a la patología diagnosticada.

Otra clase de MR especializada es la imagen por Resonancia Magnética Funcional (MRf). Es una técnica que es usada para observar las estructuras del cerebro y determinar qué áreas se activan o consumen más oxígeno durante la realización de una tarea cognitiva. Se utiliza para fomentar el conocimiento de la organización cerebral y ofrecer un mecanismo para evaluar el estado neurológico y el riesgo neuroquirúrgico al estudiar la región afectada del cerebro, por ejemplo por una neoplasia [83].

- **CT**

La tomografía computarizada permite evidenciar, mediante la emisión de **rayos X**, la obtención de imágenes de la región cerebral en forma de cortes desde diversos ángulos. Para conocer su funcionamiento, el emisor de rayos gira alrededor del paciente y los detectores situados en el lado opuesto recogen la radiación que le atraviesa. Los datos recogidos por los detectores se envían a un ordenador encargado de integrar y reconstruir la información obtenida presentándola como una imagen morfológica. Por tanto, de una forma rápida, permite determinar la existencia de lesiones intracerebrales, lesiones calcificadas, afectaciones en hueso o incluso si existen desplazamiento de estructuras. Todo esto permite distinguir, con gran resolución, las alteraciones que condicionan y localizan a los tumores. Por las características técnicas que presenta, el CT es idóneo para la visualización de **hemorragias y de calcificaciones**, pero muy limitado en los casos de sospecha de lesiones en la región inferior del encéfalo, ya sea cerebelo o tronco cerebral, debido a la presencia de artefactos técnicos que pueden aparecer. En general, para que la imagen tenga la mejor calidad posible y evitar, dentro de la medida de lo posible estos artefactos, es necesario la administración de contrastes yodados para mejorar la visualización de todas las estructuras a estudio [84]. Los principios de funcionamiento del CT se basan en que la fuente de radiación y los detectores están conectados de forma que tienen un movimiento sincrónico. Cuando el conjunto fuente-detector realiza un barrido o también denominado traslación a través del paciente, las estructuras internas del sujeto atenúan el haz en función de la densidad y el número de átomos de los tejidos de la zona. La intensidad de la radiación se detecta en función de ese patrón y se crea un perfil de intensidades o proyección. Cuando finaliza uno de los barridos, el conjunto fuente-detector gira y comienza un segundo barrido. Durante este, la señal vuelve a ser proporcional a la atenuación del haz, obteniendo así una segunda proyección. Esas proyecciones no se visualizan, si no que se almacenan de forma numérica en el ordenador, ya que el procesado de los datos se realiza mediante la superposición efectiva de cada proyección para reconstruir la estructura anatómica que corresponde a ese corte [85].

Cuanto mayor sea el número de barridos exploratorios que efectúe el sistema, mayor será el número de datos que se enviará al ordenador, reproduciendo con mayor fidelidad la imagen del órgano a estudio. En la práctica, el número de barridos se encuentra limitado por el tiempo que dura la exploración y la dosis recibida por el paciente. Por tanto, cuanto más rápida sea el estudio, menor será la probabilidad de movimientos del paciente reduciendo el número de artefactos producidos durante el escaneo. Es por eso por lo que es necesario buscar la relación más adecuada entre el **mínimo tiempo y la menor dosis de radiación**, lo que permita obtener la cantidad de proyecciones necesarias para que se reconstruya la imagen con la calidad suficiente para estudiar la estructura que se quiera analizar [86]. La principal finalidad de esta técnica es la obtención, de forma rápida, de un diagnóstico para su posterior estudio minucioso de la terapia más indicada.

- **PET**

  En el APARTADO 2 del presente capítulo: INTRODUCCIÓN A LA PET (los subapartados 2.1 y 2.2), se hace mención del funcionamiento y la composición de la PET, así como una breve descripción de la historia de esta técnica diagnóstica. Las pruebas citadas hasta este apartado son pruebas de neuroimagen estructural o anatómica a diferencia de la PET que es una técnica biológica que permite el estudio exhaustivo de los tumores cerebrales.

  En concreto, en los tumores cerebrales como los gliomas, esta técnica permite estudiar el **metabolismo cerebral** y diferenciar entre tumores agresivos, así como entre neoplasias y el seguimiento de los tumores tratados con radioterapia o radionecrosis [87-90].

Además del diagnóstico por imagen, se realiza un **diagnóstico diferencial**, que puede ayudar en ciertas situaciones, completando la información anteriormente mencionada:

- Con los abscesos cerebrales, ya que en la imagen CT o incluso en la MR, son muy similares.
- Con las metástasis cerebrales de otro origen. En las tumoraciones intra o extraparenquimatosa, ya que puede ser difícil de diferenciar un glioma periférico de un meningioma. La arteriografía o angiografía (con el uso de rayos X y de contrastes yodados, permite evaluar el interior de las arterias del organismo, como las cerebrales) en estos casos, puede ayudar en el diagnóstico [90].
- Si se puede tratar de otro tumor de origen intraparenquimatoso. En estos casos, es importante descartar otras neoplasias de origen neuronal o linfomas.
- En el caso de un glioma, la diferenciación entre un astrocitoma, un oligodendroglioma o un ependimoma:

  1. **Oligodendroglioma**: se caracteriza por la presencia de calcio en su interior, con límites precisos, sin edema cerebral circundante y de gran tamaño. Su localización más frecuente suele ser en el lóbulo frontal. Son mucho menos frecuentes que los astrocitomas y suelen desarrollarse en edades jóvenes [91].
  2. **Ependimoma**: La mayor parte de la masa tumoral se encuentra en los ventrículos cerebrales. Su mayor frecuencia radica en los niños y jóvenes [92].
  3. **Astrocitoma**: Es importante valorar el grado de agresividad ya que son tumores frecuentes y, dependiendo de la edad, se dan diferentes tipos. En el caso de los niños, hay localizaciones típicas de astrocitomas benignos, como en el nervio óptico, cerebelo y tronco cerebral, siendo raros los astrocitomas con características malignas. En los jóvenes, suelen cursar con crisis epilépticas y cursar con su localización más frecuente en la corteza cerebral. Suelen presentar características de tumores benignos. En los adultos es más frecuente la lesión que genera una mayor agresividad de la neoplasia. Para finalizar, en edades avanzadas, los astrocitomas son más agresivos, como en el grupo de los adultos de edad avanzada. Los glioblastomas multiformes se hacen indiferenciables de un astrocitoma de grado IV, basándose en los estudios por imagen. Es la anatomía

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

patológica (biopsia quirúrgica) la que determinará si se trata de uno u otro tipo de afectación [93].

- Para conocer datos que indiquen el grado de agresividad o **grado de Kernohan** (clasificación no aplicable a los pacientes pediátricos) se recomienda el uso de: MR, espectroscopia o PET.

El diagnóstico quirúrgico, con la aparición de la MR, CT y PET, ha provocado que la detección de los tumores cerebrales se realice de una manera más precoz que hace 20 años y, por tanto, está cambiando la visión neuroquirúrgica ya que los tumores se diagnostican con menor tamaño y, por consiguiente, con menos lesiones neurológicas. Todo esto obliga a la preparación de las intervenciones con el objetivo de extirpar el máximo de la lesión manteniendo al paciente íntegro, dentro del punto de vista neurológico. Las biopsias, en estos casos, son esenciales y necesarias para el diagnóstico, ya que es la única prueba que permite llevar a cabo el análisis de la muestra del tumor, ya sea mediante una biopsia estereotáxica o con cirugía abierta. Esto motiva a que el planteamiento requiera del proceso preoperatorio conveniente para analizar el mapa neurológico del paciente y, así, obtener todos los datos de carácter anatómico y funcional y la máxima resección tumoral, con la obtención de muestras. Todo esto permite, al equipo de cirugía, tener todos los conocimientos acerca del área donde se encuentra la patología y así determinar sus límites reales.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 3.6.TRATAMIENTO Y EVOLUCIÓN DE LA SINTOMATOLOGÍA

El tratamiento usado para la neoplasia de glioma depende del **tipo, tamaño, grado y ubicación** del mismo, así como de otros factores como la edad, el estado funcional del paciente, los antecedentes personales y los resultados de las pruebas hematológicas. Los marcadores moleculares son fundamentales para guiar el tratamiento de una forma óptima y eficaz [94-96].

- **Pérdida genética en los cromosomas 1p/19q**: La detección de este marcador es importante con el fin de determinar el correcto diagnóstico del glioma con un componente oligodendroglial, ya que refleja una entidad tumoral con un curso más lento de la enfermedad y con una especial sensibilidad tanto a la radioterapia como a la quimioterapia [97].
- **Mutación del gen IDH 1 o 2**: La mutación de este gen, a menudo, está presente tanto en los gliomas de bajo grado como en gliomas anaplásicos, en los que se asocia una mayor supervivencia, independientemente del tratamiento aplicado. Su presencia en gliomas de alto grado sugiere que estos tumores se desarrollan a partir de un previo glioma de bajo grado. Por tanto, los tumores con alto grado con una mutación en el gen IDH, generalmente, tienen un mejor pronóstico, en comparación con los de alto grado sin mutación en dicho gen [98].
- **Metilación del gen MGMT**: La presencia de este marcador indica la incapacidad del tumor para reparar el daño producido en el ADN por quimioterapias llamadas agentes alquilantes, particularmente la Temozolomida. Cuando esta alteración se encuentra en el glioblastoma, se sugiere que el tumor es más sensible a la Temozolomida [98,99].

Independientemente de los datos anteriormente citados, las medidas que se aplican en los distintos subtipos de gliomas recién diagnosticados son la extirpación del tumor mediante cirugía acompañada de terapias que reduzcan los signos y los síntomas causados por el tumor.

- La cirugía, en concreto la **resección quirúrgica del tumor**, es el procedimiento de primera elección en este tipo de patologías, siendo su objetivo la extirpación de la mayor cantidad posible del tumor. La razón de este procedimiento es que ha quedado demostrado que la máxima resección tumoral se traduce en una mayor supervivencia, lo que permite que se puedan administrar terapias postoperatorias más efectivas. Por ejemplo, en algunos casos, los gliomas son pequeños y fáciles de separar del tejido cerebral sano circundante, lo cual permite una extirpación completa de la neoplasia pero existen otros casos en los que las localizaciones son regiones más comprometidas con las funciones neuronales básicas, lo que dificulta la intervención. La extirpación quirúrgica del tumor proporciona una cantidad suficiente de tejido para un diagnóstico histopatológico preciso como para una caracterización molecular de la patología [100,101]. Cuando la cirugía no es factible por riesgo a un alto deterioro de la función

neurológica se debe realizar una **biopsia estereotáxica,** una técnica **menos invasiva** que la realización de una biopsia abierta y, en el 95% de los casos, el diagnóstico histopatológico es suficiente con la cantidad de tejido extraído mediante esta técnica [102,103].

- La **radioterapia y quimioterapia** son los tratamientos postoperatorios más utilizados, aunque su uso difiere según el tipo o subtipo de glioma con el que se encuentren.

1. **Glioma de bajo grado** (grado I y grado II): La radioterapia postoperatoria es el tratamiento estándar para gliomas de bajo grado en los que, generalmente, se administra el tratamiento en 28 sesiones durante 6 semanas. Para que se realice este tratamiento se deben considerar tres o más de los siguientes factores, lo que sugiere una mayor probabilidad de recidiva tumoral: tumores mayores de 5 cm de diámetro, una edad superior a los 40 años, ausencia de un componente oligodendroglial en la histopatología, tumores que se extienden desde un hemisferio cerebral al otro y la presencia de déficits neurológicos antes de la cirugía. En el caso de la quimioterapia, la Temozolomida suministrada oralmente es la mejor opción de tratamiento para los pacientes que no son considerados elegibles para la resección quirúrgica debido a la localización del tumor y la apariencia o dimensiones del mismo [104].
2. **Glioma anaplásico** (grado III): De forma similar a los de bajo grado, este tipo de gliomas comprenden los tipos histológicos de astrocitoma y oligodendroglioma, aunque estos se diferencian del glioma de bajo grado debido a algunas características histológicas. La radioterapia postoperatoria es el tratamiento estándar para el astrocitoma anaplásico, que se administra en 33 sesiones durante 6 semanas y media. La administración de radioterapia sin quimioterapia puede considerarse para el tratamiento de los oligodendrogliomas anaplásicos y los oligoastrocitomas sin pérdida genética en los cromosomas 1p/19q. La radioterapia administrada antes o después de la quimioterapia debería considerarse para el tratamiento del componente oligodendroglial con pérdida genética en los cromosomas 1p/19q.

   Con respecto a la quimioterapia con Temozolomida administrada oralmente o el régimen de quimioterapia de tres medicamentos denominada PCV (Procarbazina, Lomustina y Vincristina) deberían ser una alternativa a la radioterapia en los gliomas anaplásicos. De estos dos tratamientos, se suele preferir la Temozolomida por su tolerancia y su fácil administración [105].

3. **Glioblastoma** (grado IV): el tratamiento estándar es la quimiorradioterapia concurrente, con diferentes variaciones dependiendo de las características del paciente, como la edad o el estado funcional. La quimiorradioterapia concurrente es la administración simultánea de quimioterapia durante la radioterapia y seguidamente quimioterapia sola durante un período de tiempo tras aquella. Este tratamiento es el estándar en los pacientes con glioblastoma de hasta 70 años, siendo también el método preferido en los pacientes ancianos mayores de 70 años con un buen estado de salud

general y cuyo tumor haya resultado positivo en la presencia de metilación del gen MGMT. La técnica consiste en la administración por vía oral de Temozolomida, el cual interactúa interfiriendo con el mecanismo de replicación del ADN de las células cancerosas. La Temozolomida se administra a diario desde el primer día de la radioterapia, la cual se da junto con la Temozolomida durante 5 días a la semana, por un total de 6 semanas, lo que equivale a 30 sesiones separadas.

Los pacientes mayores de 70 años que no se consideren elegibles para la quimioradioterapia concurrente, debido a su estado funcional, serán tratados solo con radioterapia usando una programación hipofraccionada. Esta técnica consiste en la administración de dosis diarias mayores de radioterapia durante un periodo de tiempo más corto, siendo adecuada para pacientes ancianos de los cuales no se dispone de información acerca del estado del MGMT. Por otro lado, la quimioterapia se aplica exclusivamente en pacientes mayores de 70 años que no se consideren elegibles para la quimiorradioterapia concurrente por los motivos anteriormente citados. La quimioterapia se aplicará a base de Temozolomida, siempre que el tumor haya resultado positivo, con respecto a la presencia de metilación del gen MGMT [106,107].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 4. REFERENCIAS


1. James ML, Gambhir SS. A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications. Physiol Rev. 2012;92(2):897-965.

2. Cantone MC, Hoeschen C. The Role of Radiation Physics in Nuclear Medicine. En: Cantone M, Hoeschen C, editor. Radiation Physics for Nuclear Medicine. Springer, Berlin, Heildelberg;2011. pp 3-5.

3. Doménech-Torné FM, Setoain J, Galofré P, Cedró J, García-Alonso MC, Herranz R, et al. Medicina Nuclear, Aplicaciones diagnósticas de los isótopos radiactivos. Barcelona: Editorial científico-médica;1980.

4. Stein J. Isótopos radiactivos. Madrid: Alhambra;1973.

5. Albano D, Bosio G, Bertoli M, Giubbini R, Bertagna F. 18F-FDG PET/CT in primary brain lymphoma. J Neurooncol. 2018;136(3):577-583.

6. Zanzonico P. Routine Quality Control of Clinical Nuclear Medicine Instrumentation: A Brief Review. J Nucl Med. 2008;49(7):1114-31.

7. Soriano A, Martín-Comín A, García J. Tratado de medicina nuclear en la práctica clínica. En: García AM, Martín-Comín J, Soriano A, editor. Aula Médica. 2ª ed; 2012.

8. Chiesa C, De Sanctis V, Crippa F, Schiavini M, Fraigola CE, Bogni A et al. Radiation dose to technicians per nuclear medicine procedure: comparison between technetium-99m, gallium-67, and iodine-131 radiotracers and fluorine-18 fluorodeoxyglucose. Eur J Nucl Med- 1997;24(11):1380-9.

9. Blau M. Radiotracers for functional brain imaging. Semin Nucl Med. 1985;15(4):329-34.

10. Zimmer L, Luxen A. PET radiotracers for molecular imaging in the brain: past, present and future. Neuroimage. 2011;61(2):363-70.

11. Consejo de Seguridad Nuclear. Protección Radiológica. 2001. Disponible en: https://www.csn.es/proteccion-radiologica

12. Cho S, Kim J, Song H. Radiation Safety in Nuclear Medicine Procedures. Nucl Med Mol Imaging. 2017;51(1):11-16.

13. Mattsson S. Introduction: The importance of Radiation Protection in Nuclear Medicine. En: Mattsson S., Hoeschen C, editor. Radiation Protection in Nuclear Medicine. Springer, Berlin, Heildelberg;2012. pp 1-3

14. Thomson WH, Harding LK. Radiation protection issues associated with nuclear medicine out-patients. Nucl Med Commun. 1995;16(11):879-92.

15. Guijarro J. A, Icaza M, Lentati G, Jorge R, Oromendía A, Kostvintseva O. Tomógrafos PET. Rev. Esp. Med. Nuclear. 2001;(561-574).

16. Wieler HJ, Coleman RE. Pet in clinical oncology. En: Wieler HJ, Coleman RE, editor. Steinkopff Verlag, Darmstadt, 2000.

17. Kubota K. From tumor biology to clinical Pet: a review of positron emission tomography (PET) in oncology. Ann Nucl Med. 2001;15(6):471-86.

18. Portnow K, Vaillancourt D, Okun M. The history of cerebral PET scanning. From physiology to cutting-edge technology. Neurology. 2013;80(20):952-956.

19. Sharma R, Aboagye E. Development of radiotracers for oncology – the interface with pharmacology. Br J Pharmacol. 2011;163(8):1565-1585.

20. Bading J R, Shields A F. Imaging of cell proliferation: status and prospects. J Nucl Med. 2008;49 Suppl 2:64S-80S.

21. Bund C, Lhermitte B, Cicek A E, Ruhland E, Proust F, Namer I J. What Does Reduced FDG Uptake Mean in High-Grade Gliomas? Clin Nucl Med. 2019;44(12):936-942.

22. Brix G, Lechel U, Glatting G, Ziegler S I, Münzing W, Müller S P et al. Radiation exposure of patients undergoind whole-body dual-modality 18F-FDG PET/CT examinations. J Nucl Med. 2005;46(4):608-13.Rischpler C, Woodard P K. PET/RM Imaging in Cardiovascular Imaging. PET Clin. 2019;14(2):233-244.

23. Li Y, Zhang W, Wu H, Liu G. Advanced tracers in PET imaging of cardiovascular disease. Biomed Res Int. 2014;504532.

24. Vaidyanathan S, Patel C N, Scarsbrook A F, Chowdhury F U. FDG PET/CT in infection and inflammation - - current and emerging clinical applications. Clin Radiol. 2015;70(7):787-800.

25. Pijl J P, Glaudemans A W J M, Slart R H J A, Kwee T C. 18F-FDG PET/CT in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Patients with Suspected Cyst Infection. J Nucl Med. 2018;59(11):1734-1741.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

26. Shivamurthy V K N, Tahari A K, Marcus C, Subramaniam R M. Brain FDG PET and the diagnosis of dementia. AJR Am J Roentgenol. 2015;204(1):W76-85.

27. Zukotynski K, Kuo P H, Mikulis D, Rosa-Neto P, Strafella A P, Subramaniam R M et al. PET/CT of Dementia. AJR Am J Roentgenol. 2018;211(2):246-259.

28. Glaab E, Trezzi J P, Greuel A, Jäger C, Hodak Z, Drzezga A et al. Integrative analysis of blood metabolomics and PET brain neuroimaging data for Parkinson's disease. Neurobiol Dis. 2019;124:555-562.

29. Darcourt J, Schiazza A, Sapin N, Dufour M, Ouvrier M, Benisvy D et al. 18F-FDOPA PET for the diagnosis of parkinsonian syndromes. Q J Nucl Med Mol Imaging. 2014;58(4):355-65.

30. Matsumoto Y, Oikawa K, Nomura J I, Kojima D, Oshida S, Kobayashi M et al. Optimal Brain 99mTc-Ethyl Cysteinate Dimer SPECT Imaging and Analysis to Detect Misery Perfusion on 150 PET Imaging in Patients With Chronic Occlusive Disease of Unilateral Major Cerebral Artery. Clin Nucl Med. 2017;42(7):499-505.

31. Desarnaud S, Mellerio C, Semah F, Laurent A, Landre E, Devaux et al. 18 F-FDG PET in drug.resistant epilepsy due to focal cortical dysplasia type 2: additional value of electroclinical data and coregistration with MRI. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2018;45(

32. Guerin J, Watson R E, Carr C M, Liebo G B, Kotsenas A L. Autoimmune epilepsy: findings on MRI and FDG-PET. Br J Radiol. 2019;92(1093):20170869.

33. Kaseda K. Recent and Current Advances in FDG-PET Imaging within the Field of Clinical Oncology in NSCLC: A Review of the Literature. Diagnostics (Basel). 2020;10(8):561.

34. Krause B J, Schwarzenböck S, Souvatzoglou M. FDG PET and PET/CT. Recent Results Cancer Res. 2013;187:351-69

35. Treglia G, Sadeghi R, Del Sole A, Giovanella L. Diagnostic performance of PET/CT with tracers other than F-18-FDG in oncology: an evidence-based review. Clin Transl Oncol. 2014;16(9):770-5.

36. Unterrainer M, Eze C, Ilhan H, Marschner S, Roengvoraphoj O, Schmidt-Hegemann NS et al. Recent advances of PET imaging in clinical radiation oncology. Radiat Oncol. 2020 Apr 21;15(1):88.

37. Moses W W. Fundamental Limits of Spatial Resolution in PET. Nucl Instrum Methods Phys Res A. 2011;648 Supplement 1:S236-240.

38. Kirk Robert G. W. Recovering The Principles of Humane Experimental Technique. The 3Rs and the Human Essence of Animal Research. Sci Technol Human Values. 2018;43(3):622-648.

39. Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. (Boletín Oficial del Estado, número 34, de 08 de febrero de 2013). Disponible en: https://www.boe.es/buscar/pdf/2013/BOE-A-2013-1337-consolidado.pdf

40. Russell W M, Burch R L. The principles of humane Experimental Technique. En: Russell W M, Burch R L, editor. Methuen and Co LTD, London;1959. Pp 14-51

41. Krishnamoorthy S, Blankemeyer E, Mollet P, Surti S, Holen R V, Karp J S. Performance evaluation of the MOLECUBES B-CUBE-a high spatial resolution and high sensitivity small animal PET scanner utilizing monolithic LYSO scintillation detectors. Phys Med Biol. 2018;63(15):155013

42. Mittra E S, Koglin N, Mosci C, Kumar M, Hoehne A, Keu K V et al. Pilot Preclinical and Clinical Evaluation os (4S)-4-(3-[18F]Fluoropropyl)-L-Glutamate(18F-FSPG) for PET/CT Imaging of Intracranial Malignancies. PLoS One. 2016;11(2):e0148628

43. Pampaloni MH, Nardo L. PET/MRI radiotracer beyond $^{18}$F-FDG. PET Clin. 2014 Jul;9(3):345-9.

44. Stakic J, Suchanek J M, Ziegler G P, Griff E R. The source of spontaneous activity in main olfatory bulb of the rat. PLoS One. 2011;6(8):e23990.

45. Smith N, Saunders D, Jensen R L, Towner R A. Association of decreased levels of lipopolysaccharide-binding protein with OKN-007-induced regression of tumor growth in an F98 rat glioma model. J Neurosurg. 2019;1-9.

46. Ismail F S, Moinfar Z, Prochnow N, Dambach H, Hinkerohe D, Haase C G et al. Dexamethasone and levetiracetam reduce hetero-cellular gap-junctional coupling between F98 glioma cells and glial cells in vitro. J Neurooncol. 2017;131(3):469-476.

47. Bilzer T, Reifenberger G, Wechsler W. Chemical induction of brain tumors in rats by nitrosoureas: molecular biology and neuropathology. Neurotoxicol Teratol. 1989;11(6):551-6.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

48. Rushing E J, Watson M L, Schold S C, Land K J, Kokkinakis D M. Glial tumors in the MNU rat model: induction of pure and mixed gliomas that do no require typical missense mutations of p53. J Neuropathol Exp Neurol. 1998;57(11):1053-60.

49. Druckrey H, Ivankovic S, Preussmann R. Teratogenic and carcinogenic effects in the offspring after single injection of ethylnitrosourea to pregnant rats. Nature. 1966;210(5043):1378-9.

50. Prezado Y, Jouvion G, Guardiola C, Gonzalez W, Juchaux M, Bergs J et al. Tumor Control in RG2 Glioma-Bearing Rats: A comparison Between Proton Minibeam Therapy and Standard Proton Therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2019;104(2):266-271.

51. Desmarais G, Charest G, Therriault H, Shi M, Fortin D, Bujold R et al. Infiltration of F98 glioma cells in Ficher rat brain is temporary stimulated by radiation. Int J Radiat Biol. 2016;92(8):444-50.

52. Barth R F, Kaur B. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. J Neurooncol. 2009;94(3):299-312.

53. Kobayashi N, Allen N, Clendenon N R, Ko L W. An improved rat brain-tumor model. J Neurosurg. 1980;53(6):808-15

54. Auer RN, Del Maestro R F, Anderson R. A simple and reproducible experimental in vivo glioma model. Can J Neurol Sci. 1981;8(4):325-31

55. Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. Science. 1968;161(3839):370-1.

56. Wang T-C, Hsiao I-T, Cheng Y-K, Wey S-P, Yen T-C, Lin K-J. Noninvasive monitoring of tumor growth in a rat glioma model: comparison between neurological assessment and animal imaging. J Neurooncol. 2011;104(3):669-78.

57. Raichle M E. Two views of brain function. Trends Cogn Sci. 2010;14(4):180-90.

58. Raichle M E, Mintun Mark A. Brain work and brain imaging. Annu Rev Neurosci. 2006;29:449-76.

59. McDonald Skye. Emotions Are Rising: The Growing Field of Affect Neuropsychology. J Int Neuropsychol Soc. 2017;23(9-19):719-731.

60. Wolf A, Kondziolka D. Brain metastases: radiosurgery. Handb Clin Neurol. 2018;149:129-135.

61. Seoane, De Mattos-Arruda L. Brain metastasis: new opportunities to tackle therapeutic resistance. Mol Oncol. 2014;8(6):1120-31.

62. Sociedad Española de Oncología Médica. Tumores Cerebrales. 2019. Disponible en: https://seom.org/info-sobre-el-cancer/tumores-cerebrales

63. McNeill K A. Epidemiology of Brain Tumors. Neurol Clin. 2016;34(4):981-998.

64. Butowski N A. Epidemiology and diagnosis of brain tumors. Continuum (Minneap Minn). 2015;21(2 Neuro-oncology):301-13.

65. Collins V P. Brain tumours: classification and genes. J Neurol Neurosurg Psichiatry. 2004;75 Suppl 2(suppl 2):ii2-11.

66. Collins V P. Gliomas. Cancer Surv. 1998;32:37-51.

67. Ostrom Q T, Bauchet L, Davis F G, Deltour I, Fisher J L, Eastman C et al. The epidemiology of glioma in adults: "a state of the science" review. Neuro Oncol. 2014;16(7):896-913.

68. Inskip P D, Tarone R E, Brenner A V, Fine H A, Black P M, Shapiro W R et al. Handedness and risk of brain tumors in adults. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2003;12(3):223-5.

69. Yamanaka R, Hayano A, Kanayama T. Radiation-induced gliomas: a comprehensive review and meta-analysis. Neurosurg Rev. 2018;41(3):719-731.

70. Aherne N J, Murphy B M. Radiation-Induced Gliomas. Crit Rev Oncog. 2018;23(1-2):113-118.

71. Melin B S, Barnholtz-Sloan, Wrensch M R, Johansen C, Il'yasova D, Kinnersley B. Genome-wide association study of glioma subtypes identifies specific differences in genetic susceptibility to glioblastoma and non-glioblastoma tumors. Nat Genet. 2017;49(5):7

72. Gohar M K, Ammar M G, Alnagar A A, Abd-ElAziz H A. Serum IgE and Allergy Related Genotypes of IL-4R and IL-13 Genes: Association with Gliomas Susceptibility and Glioblastoma Prognosis. Egypt J Immunol. 2018;25(1):19-33.

73. Pietilä S, Ala-Houhala M, Lenko H L, Harmoinen A P, Turjanmaa V, Mäkipernaa A. Renal impairment and hypertension in brain tumor patients treated in childhood are mainly associates with cisplatin treatment. Pediatr Blood Cancer. 2005;44(4):363-9.

74. Hansen A, Pedersen C B, Minet L R, Beier D, Jarden J O, Sogaard K. Hemispheric tumor location and the impact in health-related quality of life, symptomatology, and functional performance outcomes in patients with glioma: an exploratory cross-sectional study. Disabil Rehabil. 2019;1-7.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

75. Englot D J, Chang E F, Vecht C. Epilepsy and brain tumors. Handb Clin Neurol. 2016;134:267-85.

76. Goldstein E D, Feyissa A M. Brain tumor related-epilepsy. Neurol Neurochir Pol. 2018;52(4):436-447.

77. Luo Qian, Li Y, Luo L, Diao W. Comparisons of the accuracy of radiation diagnostic modalities in brain tumor: A nonrandomized, nonexperimental, cross.-sectinoal trial. Medicine (Baltimore). 2018;97(31):e11256.

78. Fink J R, Muzi M, Peck M, Krohn K A. Multimodality Brain Tumor Imaging: MR Imaging, PET, and PET/MR Imaging. J Nucl Med. 2015;56(10):1554-61.

79. Barkovich M J, Barkovich A J. MR Imaging of Normal Brain Development. Neuroimaging Clin N Am. 2019;29(3):325-337.

80. Lequin M, Hendrikse J. Advanced MR Imaging in Pediatric Brain Tumors, Clinical Applications. Neuroimaging Clin N Am. 2017;27(1):167-190.

81. Villanueva-Meyer J E, Mabray M C, Cha S. Current Clinical Brain Tumor Imaging. Neurosurgery. 2017;81(3):397-415.

82. Mabray M C, Cha S. Advanced MR Imaging Techniques in Daily Practice. Neuroimaging Clin N Am. 2016;26(4):647-666.

83. Stein T, Moritz C, Quigley M, Cordes D, Haughton V, Meyerand E. Functional connectivity in the thalamus and hippocampus studied with functional MR imaging. AJNR Am J Neuroradiol. 2000;21(8):1397-401.

84. Seeram E. Computed Tomography: A Technical Review. Radiol Technol. 2018;89(3):279CT-302CT.

85. Useche J N, Bermudez S. Conventional Computed Tomography and Magnetic Resonance in Brain Concussion. Neuroimaging Clin N Am. 2018;28(1):15-29.

86. Berti V, Mosconi L, Pupi A. Brain: normal variations and benign findings in fluorodeoxyglucose-PET/computed tomography imaging. PET Clin. 2014;9(2):129-40

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

87. Herholz K, Langen K-J, Schiepers C, Mountz J M. Brain tumors. Semin Nucl Med. 2012;42(6):356-70.

88. Singnukar A, Poon R, Metser U. Comparison of 18F-FDG-PET/CT and 18F-FDG-PET/MR imaging in oncology: a systematic review. Ann Nucl Med. 2017;31(5):366-378.

89. Boellaard R, O'Doherty M J, Weber W A, Mottaghy F M, Lonsdale M N, Stroobants S G et al. FDG PET and PET/CT: EAM procedure guidelines for tumour PET imaging: version 1.0. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2010;37(1):181-200.

90. Li W, Xu F, Schär M, Liu J, Shin T, Zhao Y et al. Whole-brain arteriography and venopraphy: using improved velocity-selective saturation pulse trains. Magn Reson Med. 2018;79(4):2014-2023.

91. An Y-S, Yoon J-K, Lee S J, Jeong E, Kim I-H. Anaplastic Oligodendroglioma Found as an Incidental Photopenic Lesiono n 18F-FP-CIT PET/CT Image. Clin Nucl Med. 2019;44(3):e168-e169.

92. Bouallègue F B, Vauchot F, Menjot de Champfleur N, Mariano-Goulart D. Pineal Anaplastic Ependymoma With Multifocal Intradural Extramedullary Metastases on MRI and 18FDG-PET. Clin Nucl Med. 2018;43(9):e319-e321.

93. Hashimoto S, Inaji M, Nariai T, Kobayashi D, Sanjo N, Yokota T et al. Usefulness of [11C] Methionine PET in the Differentiation of Tumefactive Multiple Sclerosis from High Grade Astrocytoma. Neurol Med Chir. 2019;59(5):176-183.

94. Bush N A, Chang S M, Berger M S. Current and future strategies for treatment of glioma. Neurosurg Rev. 2017;40(1):1-14.

95. Chen R, Smith-Cohn M, Cohen A L, Colman H. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. Neurotherapeutics 2017;14(2):284-297.

96. Eckel-Passow J E, Lachance D H, Molinaro A M, Walsh K M, Decker P A, Sicotte H et al. Glioma Groups Base don 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. N Engl J Med. 2015;372(26):2499-508.

97. Latysheva A, Emblem K E, Brandal P, Vik-Mo E O, Pahnke J, Roysland K et al. Dynamic susceptibility contrast and diffusion MR imaging identify oligodendroglioma as defined by the 2016 WHO classification for brain tumors: histogram analysis approach. Neuroradiology. 2019;61(5):545-555.

98. Zhou Min, Niu C, Jia L, He H. The value of MGMT promote methylation and IDF-1 mutation on diagnosis of pseudoprogression in patients with high-grade glioma: A meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2019;98(50):e18194.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

99. Wick W, Weller M, Bent M, Sanson M, Weiler M, Deimling A et al. MGMT testing - - the challenges for biomarker-based glioma treatment. Nat Rev Neurol. 2014;10(7):372-85.

100. Garzon-Muvdi T, Kut C, Li X, Chaichana K L. Intraoperative imaging techniques for glioma surgery. Future Oncol. 2017;13(19):1731-1745.

101. Hervey-Jumper S, Berger M S. Maximizing safe resection of low- and high-grade glioma. J Neurooncol. 2016;130(2):269-282.

102. Hart M G, Grant G RI, Solyom E F, Grant R. Biopsy versus resection for high-grade glioma. Cochrane Database Syst Rev. 2019;6(6):CD002034.

103. Gupta N, Goumnerova L C, Manley P, Chi S N, Neuberg D, Puligandla M et al. Prospective feasibility and safety assessment of surgical biopsy for patients with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma. Neuro Oncol. 2018;20(11):1547-1555.

104. Azambuja J H, Silveira E F, Carvalho T R, Oliveira P S, Pacheco S, Couto C T. Glioma sensitive or chemoresistant to temozolomide differentially modulate macrophage protumor activities. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2017;1861(11 pt A):2652-2662.

105. Zhang L, Wu X, Luo C, Qian J, Lu Y. Chemotherapy plus radiotherapy versus radiotherapy alone in patients with anaplastic glioma: a systematic review and meta-analysis. J Cancer Res Clin Oncol. 2013;139(5):719-26.

106. Braun K, Ahluwalia M S. Treatment of Glioblastoma in Older Adults. Curr Oncol Rep. 2017;19(12):81.

107. Batash Ron, Asna N, Schaffer P, Francis N, Schaffer M. Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Revent Literature Review. Curr Med Chem. 2017;24(27):3002-3009.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS GENERALES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

# 1. JUSTIFICACIÓN

El glioma es una patología oncológica basada en el crecimiento incontrolado de células gliales y que puede afectar, de forma indiferenciada, tanto al cerebro como a la médula espinal. Esta patología provoca una sintomatología variada como cefalea, nauseas, vómitos, confusión, pérdida de memoria, cambios en la personalidad, problemas de equilibrio, incontinencia urinaria, alteraciones en la visión, dificultades en el habla y convulsiones, una sintomatología muy limitante y agresiva que acaba mellando en el día a día del paciente con este tipo de neoplasia.

Los datos epidemiológicos indican que, España, presenta una incidencia baja, pero representa una causa de mortalidad importante, destacando un 15% en los niños menores de 15 años, lo que se traduce en la segunda causa de muerte por cáncer, después de la leucemia.

Las técnicas diagnósticas de las que se disponen hoy en día para detectar esta patología abarcan desde el examen neurológico al uso de técnica de imagen como la MR, la CT y la PET. Todas ellas forman un abanico de posibilidades para el diagnóstico de esta patología, siendo fundamental la combinación de varias técnicas de imagen para asegurar el correcto diagnóstico y precisar el nivel de agresividad de la misma.

Los tratamientos basados en cirugía y quimioterapia no funcionan, demostrando una supervivencia muy corta (15-18 meses tras la intervención). Para el avance de nuevos tratamientos (como los que presentan un enfoque biológico), es necesario reorientar las técnicas de diagnóstico, desde una visión morfológica (actualmente basada en CT y MR) hacia una visión molecular (PET), como la Medicina Nuclear. La investigación de nuevas terapias y métodos diagnósticos se apoya en el uso de modelos preclínicos y, por tanto, es necesario el desarrollo de técnicas de imagen PET preclínico que permitan guiar los nuevos tratamientos y convertirse en métodos diagnósticos para seleccionar los pacientes candidatos al tratamiento y personalización de los mismos. Únicamente de esta forma se podrá alcanzar una verdadera personalización de los tratamientos.

Sin embargo, el uso de técnicas de imagen preclínica PET para el estudio del cerebro presenta múltiples desafíos y limitaciones que deben ser abordadas:

- En primer lugar, es fundamental el uso de nuevas tecnologías de cuantificación de la actividad radiactiva en sangre arterial, dejando atrás métodos más rudimentarios como el contaje manual, que permiten conocer, de una forma más precisa, la concentración del radiofármaco en tiempo real, y en particular el transporte de monosacáridos, como es el caso de la glucosa, a través de la BHE.

- La medida de la actividad radiactiva en sangre arterial limita el seguimiento longitudinal de un modelo en diferentes tiempos, por lo que es necesario que estos nuevos métodos de cuantificación se pueden realizar varias veces sobre el mismo animal. De lo contrario, la aplicabilidad de estos métodos sería muy limitada, pues se estaría perdiendo la mayor potencialidad de las técnicas de imagen preclínica.
- El estudio del metabolismo cerebral mediante PET está limitado por la presencia de glucosa en sangre, que compite con la FDG inyectada para la realización del estudio PET. La regulación de la dieta no es suficiente para el control de los niveles de glucosa en sangre y por tanto la técnica PET tiene una fuente de incertidumbre asociada a este efecto que debe ser tomada en consideración.
- La presencia de la BHE puede interferir en los estudios de imagen PET, especialmente en aquellos casos en los que el radiofármaco empleado no es capaz de atravesar la BHE, como es el caso de los anticuerpos monoclonales. Es necesario conocer en detalle cómo se comportan los anticuerpos monoclonales ante la BHE a lo largo del desarrollo del tumor.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# 2. OBJETIVOS

El propósito general de la presente tesis doctoral es el desarrollo y optimización de nuevos protocolos de PET cerebral preclínico que permitan el estudio *in vivo* de nuevos radiofármacos en modelos animales de tumores cerebrales.

Para alcanzar este objetivo, se han definido los siguientes objetivos específicos:

- Implementar y evaluar un nuevo método de estimación en tiempo real de la concentración de radiofármaco en sangre arterial (*Arterial Input Function*) para estudios de PET cerebral dinámicos.
- Aplicar y analizar un nuevo método para realizar estudios longitudinales de PET cerebral dinámicos con muestreo en tiempo real de la concentración de radiofármaco en sangre arterial (*Arterial Input Function*).
- Caracterizar y evaluar un nuevo método de cuantificación de PET cerebral que tenga en cuenta los cambios en el metabolismo cerebral relacionados con el nivel glucosa en sangre.
- Desarrollar un nuevo protocolo de PET cerebral dinámico con anticuerpos monoclonales radiomarcados en un modelo ortotópico de tumores cerebrales en rata.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

# CAPÍTULO III: MEDIDAS DE ARTERIAL INPUT FUNCTION EN TIEMPO REAL PARA ESTUDIOS DE PET CEREBRAL DINÁMICOS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

**CAPÍTULO III**

## 1. RESUMEN

Los estudios dinámicos de PET cerebral representan una herramienta fundamental para el desarrollo de nuevos fármacos, pues aportan información cuantitativa de la concentración del radiofármaco a lo largo del tiempo. Sin embargo, una de las mayores dificultades de este tipo de estudios es el muestreo arterial para medir concentración de actividad en plasma y las técnicas actuales necesitan de una evaluación detallada y una estandarización. Con esta premisa se pretendió implementar y evaluar un nuevo protocolo de cateterización para el muestreo arterial en estudios dinámicos de PET cerebral preclínico y evaluar su impacto sobre los parámetros cinéticos obtenidos de la cuantificación. Se puso en marcha un protocolo de cateterización que permitió la realización conjunta y sincronizada de la administración del radiofármaco, la extracción de sangre arterial en intervalos de pocos minutos y la adquisición de estudios PET en 10 ratas Sprague Dawley sanas. A partir de esto se evaluó el impacto de las diferentes técnicas sobre los parámetros obtenidos del modelo y, con ello, la selección de la técnica más óptima. Con respecto a la evaluación de la repetibilidad de AIF, se puedo observar un pico de 544 ± 65kBq/cm$^3$ centrado en 21,5 ± 0,5 segundos tras la inyección del bolo, con un AUC de 20,8 ± 3MBq/cm$^3$. Del mismo modo, se ha determinado que el trazador FDG se libera rápidamente de la sangre tras el pico, mostrando tasas de trazador de 5-20kBq/cm$^3$/s. En cuanto a la comparación de AIF e IDIF, la estimación del pico de IDIF en el corazón aporta unos datos de 259 ± 90kBq/cm$^3$ a los 23 ± 15 segundos, mientras que el pico de IDIF en la vena cava fue de 272 ± 80kBq/cm$^3$ a los 23 ± 15 segundos tras la inyección del trazador FDG. Estos datos fueron claramente inferiores a los obtenidos con AIF (431 ± 65kBq/cm$^3$). Con todo esto, los resultados sugieren que se ha conseguido la implementación de un nuevo protocolo de cirugía extracorpórea al servicio de imagen del CEBEGA con un 91% de éxito, el cual va a permitir la estimación de la concentración de radiofármaco en sangre arterial en tiempo real permitiendo estimar la constate k con una variabilidad muy inferior a la obtenida a través del método IDIF.

Palabras clave: AIF, IDIF, PET cerebral, FDG, Circulación extracorpórea

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

# 2. INTRODUCCIÓN

La perfusión cerebral, también conocida como **flujo sanguíneo cerebral** (CBF), es la tasa de aporte sanguíneo al tejido cerebral. Este concepto hace referencia al flujo sanguíneo a nivel de los capilares tisulares, en contraste con el flujo sanguíneo en las arterias principales. La perfusión cerebral, generalmente, se mide en unidades de mL $g^{-1}$ $min^{-1}$ y, en la materia gris de tejido sano, generalmente se suministra aproximadamente 60mL $(100g)^{-1}$ $min^{-1}$ de sangre. En el caso de la materia blanca en tejido sano tiene aproximadamente 1/3 de ese valor, por eso los mapas de CBF tienen una materia gris muy contrastada con respecto a la materia blanca. Este flujo es de gran relevancia en el estudio de la fisiología y el funcionamiento cerebral, ya que es responsable del suministro de oxígeno y de nutrientes a los tejidos, al igual que de la eliminación de los productos de deshecho. La viabilidad de cualquier tejido depende de un **suministro de sangre regular**, por lo que una interrupción en la perfusión puede provocar, no solo un mal funcionamiento del mismo, si no también la necrosis del tejido afectado. La función cognitiva está respaldada por un aumento asociado al flujo sanguíneo cerebral en las regiones específicas y, por ello, un correcto flujo condiciona el funcionamiento normal o anormal del cerebro [1].

Como definición, el parámetro "**arterial input function**" (AIF) hace referencia a la concentración del radiofármaco en plasma arterial medido a lo largo del tiempo. Desde un punto de vista histórico, uno de los primeros informes de medición de AIF lo realizaron **Bruce Rosen** y colaboradores, hace más de dos décadas. En su estudio pionero, estos autores compararon la arteria femoral mediante una muestra directa de sangre en un modelo canino de hipercapnia con una región de interés sobre la arteria cerebral media (MCA). Los resultados mostraron importantes datos con los obtenidos de muestras simultáneas de sangre extraídas de la arteria [2].

La AIF puede ser obtenida mediante diferentes técnicas, como métodos invasivos de muestreo continuo de sangre, métodos invasivos de muestras de sangre arterial obtenidas en diferentes tiempos tras la inyección del radiofármaco, métodos mínimamente invasivos basados en la función de entrada estimado a partir de la información previa obtenida de una población anterior o mediante una "**image-derived input function**" (IDIF**)** obtenida mediante la creación de una región de interés (**ROI**) sobre una arteria o región ventricular [3].

Un estudio o escaneo dinámico es un proceso en el cual las imágenes 2D o 3D se adquieren una y otra vez durante un período de tiempo, formando una serie temporal de "**datasets**" de imágenes 2D/3D. Así, durante la exploración **PET dinámica**, las imágenes se adquieren en el **mismo momento** en el que se administra el radiofármaco, obteniéndose los primeros fotogramas de imágenes durante 5 segundos de duración para conocer y precisar la dinámica del radiofármaco. Posteriormente, los fotogramas siguientes son adquiridos durante 30 segundos [4].

Teniendo de referencia lo anteriormente mencionado, los estudios de la PET, fundamentales para el estudio de las características mencionadas, pueden llegar a agruparse dependiendo del objetivo final del mismo, pudiendo diferenciarse las PET de carácter clínico y las PET de carácter preclínico, cuya principal diferencia está ligada con el sujeto al que está dirigida la técnica, el **ser humano** o **roedores**. A su vez, dependiendo del enfoque del estudio que se pretenda realizar y lo que se pretenda observar, los estudios se pueden subdividir en dos grupos, los **estudios estáticos** o también denominados como clásicos y los **estudios dinámicos** o en tiempo real. A continuación, se realizará una breve descripción de cada uno de los enfoques de estos estudios [5,6]:

- **Estudios estáticos o clásicos**: hacen alusión a los estudios cuya principal característica es la estabilidad de la distribución del trazador o, lo que se puede considerar como estable, transcurrido cierto tiempo en el organismo o estructura de estudio. Es común en este campo los estudios con FDG, con un tiempo de espera tras la administración del radiofármaco de 60 minutos antes de la adquisición de las imágenes de estudio [5].

- **Estudios dinámicos o en tiempo real**: al contrario de lo mencionado anteriormente, los estudios con un carácter dinámico muestran el movimiento del trazador durante la adquisición de la imagen, lo que permite obtener una visión global del recorrido y de lo que está ocurriendo en cada momento. En este caso, la adquisición de las imágenes se produce al mismo tiempo que la inyección del radiofármaco, lo que permite ver la distribución de la sustancia radiactiva por todo el organismo. La principal aplicación de este tipo de estudios es el desarrollo de fármacos o el estudio de patologías de las que se desconoce el funcionamiento del trazador [6].

Aunque los estudios de carácter dinámico tienen un gran interés en el campo de la investigación, y principalmente en el campo de la neurociencia, su aplicación se ha visto limitada por la necesidad implícita de disponer de medidas de la concentración de radiofármaco en sangre arterial a lo largo del tiempo. De manera convencional se han utilizado sistemas de recolección de sangre a través de la vena dorsal o lateral en la cola del animal. Estos sistemas de rutina permiten la obtención de una pequeña cantidad de sangre pero, en el caso de los roedores, esto puede suponer una gran limitación debido al **reducido volumen sanguíneo** que presentan. Por lo tanto, con respecto a lo mencionado, no debe ser utilizada en todos los estudios que requieran una valoración constante del flujo sanguíneo. Dicha restricción motivó al desarrollo de diferentes métodos alternativos:

- **Muestreo de volúmenes mediante microfluido**: Esta técnica presenta como objetivo principal la simplificación y automatización del procedimiento de la toma de muestras sanguíneas en ratones, para que la PET en roedores puede aplicarse de forma rutinaria. El mencionado sistema consiste en un chip de dimetilsiloxano con una capa fluídica que contiene entrada/salida de sangre, una entrada/salida del bloque de heparina y un depósito de sangre. En este caso, para que el sistema funcione correctamente es necesario la canalización de la arteria femoral del roedor que, posteriormente, será

conectado al chip para mantener un flujo constante de sangre. Una vez finalizada la intervención, se inyecta el radiofármaco a estudio para poder obtener las imágenes PET correspondientes. Este sistema, presenta el gran inconveniente de la generación del correspondiente chip y la consiguiente intervención para la circulación de la sangre a través del chip [7].

- **Uso de sondas-ß de medición**: A diferencia del muestreo manual, el cual es poco preciso en animales de tamaño reducido por la limitación del volumen de sangre, este sistema microvolémico se basa en la detección directa de positrones sin una bomba peristáltica. En esta ocasión es necesaria la **canulación del roedor** pero seleccionando la arteria carótida y la vena yugular. Una vez finalizada la intervención se colocará al animal en el interior de la PET a la vez que se inyecta la solución radiactiva para la obtención de las imágenes pertinentes. Con este mecanismo se obtendrá una curva de tiempo-actividad en sangre con un nivel de sensibilidad adecuado para la mayoría de los estudios con una finalidad farmacocinética [8].

- **Image-Derived Input Function**: A pesar de los métodos físicos, el principal foco de investigación se ha centrado en el desarrollo del **método IDIF**, donde la radiactividad sanguínea se estima directamente a partir de las imágenes dinámicas de PET, no siendo necesaria la implementación de cirugías para mantener un flujo constante de sangre. La generación del IDIF a partir del análisis simple de los volúmenes de la acumulación de sangre en regiones como el hígado o los ventrículos cardíacos también demuestra dificultades, presentando defectos en la absorción de FDG, siendo mucho más impreciso [9].

Con la premisa de que los estudios dinámicos de PET cerebral representan una herramienta fundamental para el desarrollo de nuevos fármacos y el estudio de nuevas afectaciones, se ha implementado un protocolo de obtención de reproducción interanimal a través de la información cuantitativa de la concentración del radiofármaco a lo largo del tiempo en el organismo de un roedor. Sin embargo, la mayor dificultad de este tipo de investigaciones es el muestreo arterial para medir la concentración de la actividad en sangre, siendo necesaria su estandarización y su evaluación detallada.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### Preparación del animal

El presente trabajo se llevó a cabo con ratas macho Sprague-Dawley (con un peso promedio de 310g) suministradas por las instalaciones de animales de la Universidad de Santiago de Compostela. Antes de los estudios, los animales estuvieron en jaulas individuales bajo condiciones controladas de temperatura (21 ± 2ºC) y humedad (60 ± 5%), con ciclos día-noche regulados por luz artificial (12/12h) y alimentados *ad libitum*. Se llevaron a cabo todas las directrices institucionales y/o nacionales para el uso y cuidado

de los animales. Todos los experimentos con animales siguieron la Directiva de la UR 2010/63/UE para la experimentación con animales, siendo aprobados por la Red Gallega de Comités de Ética de la Investigación y cumplieron las directrices ARRIVE [10].

**Bases de la cirugía y la circulación extracorpórea en preclínica**

En el caso de la circulación extracorpórea para roedores, la cual no involucra una intervención cardíaca, el procedimiento es distinto y más simple que en humanos. Para la realización de la cirugía, es necesario la creación de un protocolo específico para el sistema de muestreo de sangre arterial, el cual será usado para la obtención, en tiempo real, de la actividad en sangre que presenta el roedor. El procedimiento que se ha llevado a cabo para la presente tesis doctoral consta de los siguientes materiales (ver Figura 3.1 y Figura 3.2):

- **Soluciones**:

1. Heparina sódica (1%, 5%) en solución inyectable.

1.1. Catéteres de la bomba peristáltica:
[Heparina]0 = 1000UI/mL (5% heparina).
[Heparina]1 = 200UI/20mL.
200UI x 1mL/1000UI = 0,2mL heparina; 0,2mL heparina x 20mL = 4mL. heparina + 16mL suero fisiológico.

1.2. Catéteres del paquete vascular femoral:
[Heparina]0 = 1000UI/mL (1% heparina).
[Heparina]1 = 50UI/20mL.
50UI x 1mL/1000UI = 0,05mL heparina; 0,05mL heparina x 20mL = 1mL. heparina + 19mL suero fisiológico.

2. Cloruro sódico al 0,9% en solución para perfusión intravenosa.
3. Peróxido de hidrógeno 4,9%.
4. Alcohol 70º.
5. Povidona yodada.
6. Agua.

- **Material de limpieza**:

7. Bastoncillos de algodón higiénicos.
8. Algodón.
9. Papel absorbente.

- **Sistema de circulación**:

10. Catéter de politeno de calibre fino PE 50 (0,58mm ID; 0,96mm OD).
11. Catéter de politeno de calibre fino PE 10 (0,28mm ID; 0,61mm OD).
12. Puntas romas (23G).
13. Jeringas de 2mL, 5mL y 10mL.
14. Tubo de bomba peristáltica.

- **Material quirúrgico**:

15. Microtijeras.
16. Tijeras de punta fina o Iris.
17. Protectores para instrumental quirúrgico.
18. Pinza de punta curva o Bonn.
19. Fórceps estándar recto de tamaño pequeño y grande.
20. Hilo de sutura 4-0.
21. Fórceps de canulación para vasos sanguíneos.
22. Mosquito fórceps.
23. Pinza Halsey.
24. Anillos para fórceps.

- **Equipamiento técnico**:

25. Cama térmica para mantener la temperatura corporal del animal entre los 36 y 37ºC.
26. Lupa binocular con cámara fotográfica.
27. Cámara de inducción.
28. Equipo de anestesia de isoflurano.
29. Adaptador para el cabezal de medición de sangre arterial.

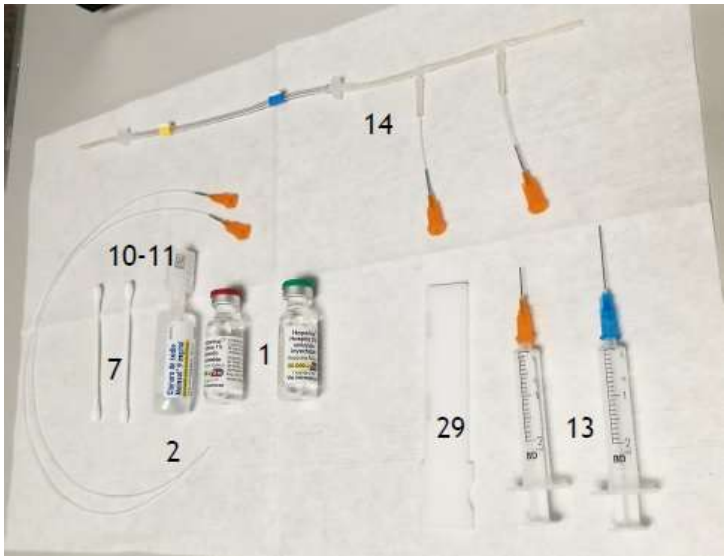



Figura 3.1: Representación del material quirúrgico necesario para la realización de la circulación extracorpórea. En la figura se puede observar la heparina sódica al 1% y 5% en solución inyectable (1), cloruro sódico al 0,9% en solución para perfusión intravenosa (2), bastoncillo para la eliminación del tejido conectivo (7), los catéteres de politeno de calibre fino PE 50 y PE 10 con sus respectivos calibres (10-11), jeringas de 2mL (13), tubo para bomba peristáltica (14) y adaptador (29).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

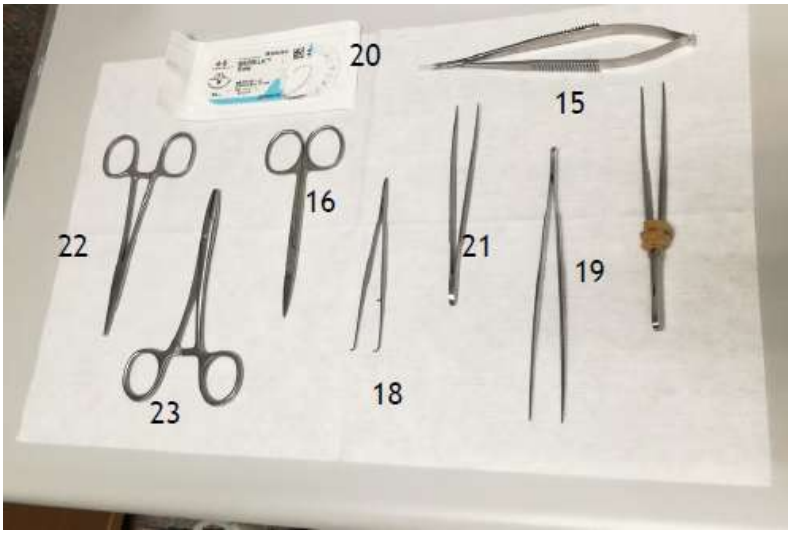



Figura 3.2: Representación del material quirúrgico necesario para la realización de la cirugía extracorpórea. En la figura se puede observar microtijeras (15), tijeras de punta fina o tijeras Iris (16), las pinzas de curva o Bonn (18) fórceps estándar recto de tamaño pequeño y grande (19), hilo de sutura de 4-0 (20), fórceps de canulación para vasos sanguíneos (21), mosquito fórceps (22) y pinza Halsey (23).

**Escáner Albira PET/CT**

El dispositivo del que dispone actualmente el Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA), es el escáner **Albira PET/CT**, diseñado y desarrollado para el estudio de roedores. Su característica más destacable es el hecho de su composición con **cristales centelleantes monolíticos**, ya que la mayoría de los sistemas PET se basan en detectores pixelados, ya sea en cristales de centelleo o en detectores de estado sólido a temperatura ambiente. En el dispositivo que se presenta, los subsistemas se unen en una combinación común con PET en la parte delantera y CT en la parte trasera. La cama de imagen tiene suficiente movimiento con las dos modalidades, lo que permite llegar a un campo axial de hasta 220mm. El sistema CT consiste en un tubo de rayos X de microfoco que utiliza una radiografía de **50kV** con un tamaño de punto focal de 35m y un detector de panel plano pixelado. El tubo de rayos X está sellado y tiene un **ánodo de tungsteno fijo**, además, el conjunto de elementos está empaquetado dentro de un cable de acero inoxidable con un blindaje a 0,25mR/h a 5cm. La refrigeración se coloca dentro del tubo para mejorar la disipación del calor y la fuente de rayos X de microfoco se opera de forma continua, entregando un haz de rayos X de cono con una corriente máxima de 1mA. El sensor de imagen de rayos X consiste en una matriz pixelada de 2400 x 2400 cubriendo una superficie de 120 x 120 $mm^2$, lo que permite una resolución nominal de 8lp/mm (pares de líneas por milímetro) [11].

Este sistema PET se compone de ocho módulos extraíbles e idénticos formando un octágono, en donde cada módulo presenta un grosor de 10mm de cristal LYSO monolítico acoplado a un MA-PMT H8500 de Hamamatsu Photonics. Los cristales seleccionados son continuos para que estos detectores puedan tener una mayor eficacia que los que están

basados en cristales pixelados, junto con una excelente resolución espacial. Además, presenta una reducción del número de señales MA-PMT, aunque en este caso se extraen cinco señales dedicadas a la determinación de la posición. Un circuito adicional, incorporado en la red de ánodos resistivos, mide el ancho de la distribución de la luz, que es directamente el borde "Field of View" (**FOV)** transaxial. La ventana de tiempo puede variar entre 3 a 11ns, aunque en el modo de funcionamiento normal, este valor se establece entorno a los 5 ns. Este subsistema PET tiene un FOV axial de 40mm y un FOV transaxial de 80mm de diámetro, funcionando en modo de adquisición de datos en 3D [12]. Las imágenes PET se pueden reconstruir utilizando algoritmos de máxima probabilidad 3D y maximizando la expectativa del subconjunto ordenado (MLEM y OSEM) (ver Figura 3.3, Figura 3.4 y Figura 3.5).

Con este equipo se realiza una adquisición dinámica, justo en el momento de la administración del radiofármaco $F^{18}$-FDG, de **60 minutos**, cuyo protocolo se lleva a cabo centrando el cerebro en el FOV del equipo. Para la reconstrucción, se debe tener en cuenta que se trata de un estudio de carácter dinámico y que no se hace corrección por decaimiento isotópico ("**Decay**"). Antes de la finalización del PET, en concreto los **15 minutos previos**, se detiene su medición, ya que es el tiempo necesario para poder desconectar la circulación extracorpórea del dispositivo y evitar el movimiento de la camilla. En consecuencia, no se tienen en cuenta los últimos tres frames para el análisis cuantitativo (ver Tabla 3.1).

| FRAMES | TIEMPO (s) |
|---|---|
| 8 | 15 |
| 2 | 30 |
| 2 | 60 |
| 1 | 120 |
| 10 | 300 |

Tabla 3.1: Tabla representativa del protocolo de adquisición con el micro PET/CT Albira. Este protocolo se lleva a cabo para tener controlado el tiempo de adquisición exacto y contemplar, sin problemática, los primeros 10 frames, donde se podrá observar el pico de administración del radiofármaco y como este se distribuye de forma homogénea por el organismo con el paso del tiempo. Todo esto está aplicado para el estudio de circulación extracorpórea con el Swisstrace Twilite II.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

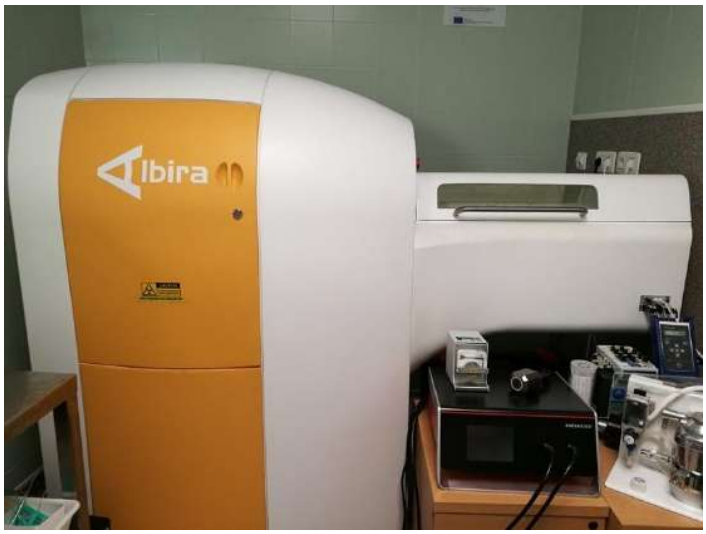



Figura 3.3: Ilustración del dispositivo de microPET/CT Albira Bruker. En la ilustración se puede observar la antigua localización del dispositivo en el Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Clínico Universitarios de Santiago de Compostela (CHUS), previamente a su traslado al CEBEGA.

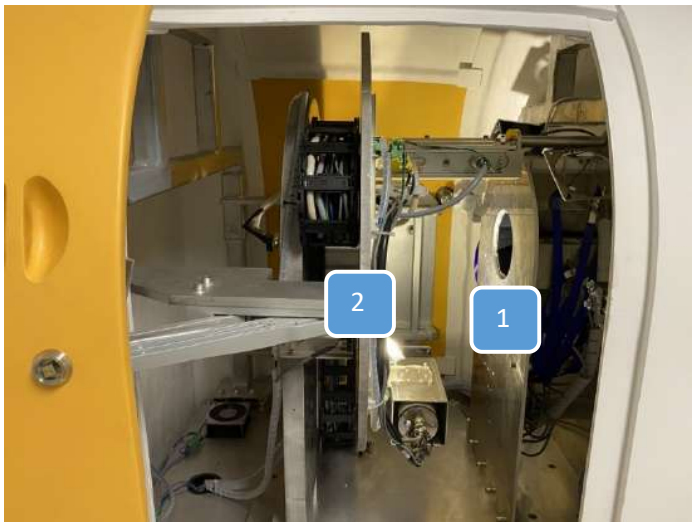



Figura 3.4: Ilustración del interior del dispositivo de microPET/CT Albira. Se puede observar en la imagen el anillo de PET (1) y el anillo del CT (2) a través de los cuales se realiza la adquisición de las imágenes para su posterior reconstrucción y visualización.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 3.5: Ilustración de la camilla del dispositivo microPET/CT Albira. En esa camilla del dispositivo es donde se situará el roedor para realizar las pruebas pertinentes. En el interior de la camilla se puede observar una boquilla, necesaria para que el animal esté en continuo flujo del anestésico isoflurano, para asegurar que el roedor esté anestesiado durante el proceso de adquisición de las imágenes, ya sean de PET, CT o ambas.

**Dispositivo de muestreo sanguíneo Swisstrace**

Por otro lado, con respecto al sistema de muestreo sanguíneo Swisstrace Blood Sampler Twilite Two, el núcleo de dicho sistema es un cabezal de medición compacto, el cual ha sido creado a partir de un metal sólido (Tungsteno), protegiendo los cristales de LYSO de la radiación externa, lo que le permite ser preciso con la medición de la actividad sanguínea que pasa por su interior. Este cabezal presenta unas dimensiones del 80 x 62 x 56mm, con un peso aproximado de 6kg. Este tipo de cristales se caracterizan por su rápida descomposición, su alto rendimiento luminoso y su alta densidad, siendo un material ideal para su uso en Medicina Nuclear. Los centelleos se transmiten a la unidad de detección de fotones a través de dos guías de luz flexibles de alta eficacia, donde los conectores de **LYSO** presentan una longitud de entre 2, hasta 10m para PET/MR con acoplador óptico. La estructura no consta de componentes electrónicos en el cabezal del sensor, evitando de este modo cualquier problema de interferencia electromagnética con el resto de los dispositivos. Su doble uso, tanto en roedores como en humanos, le permite tener el siguiente rendimiento [13]:

- ID del catéter de 0,28mm: 0,2cps/kBq/mL (ratón).
- ID del catéter de 0,58mm: 0,8cps/kBq/mL (rata).
- ID del catéter de 1,00mm: 2,4cps/kBq/mL (humano).

Además, presenta una linealidad completa de hasta 6000cps, con una desviación de 10000cps, que corresponde al 1% (ver Figura 3.6).

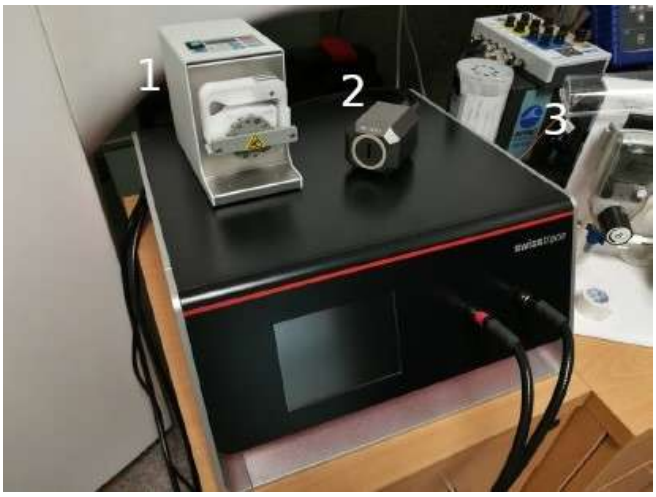



Figura 3.6: Ilustración del equipo de muestreo de sangre arterial Swisstrace Blood Sampler Twilite Two. Además de este dispositivo, en la parte superior izquierda (1) se puede observar la bomba peristáltica, una bomba hidráulica que alterna los mecanismos de compresión y relajación de ambos catéteres con el objetivo de dirigir el contenido que transporta en la dirección programada, encargada de la circulación de la sangre de forma extracorpórea y, a la derecha, encima del dispositivo (2), el cabezal encargado de la medición de la actividad de sangre arterial. En la región derecha (3), separada del equipo, se puede observar el equipo de anestesia necesario para que el roedor se encuentre bajo el flujo de isoflurano a lo largo de todo el estudio.

El equipo consta de un panel táctil que sirve tanto como interfaz de usuario como para mostrar el estado actual y los valores medidos durante el estudio. Todo esto le permite ser un sistema de **medición del curso temporal de la radiactividad en sangre** con una alta resolución temporal tanto, como se ha mencionado, en pequeños como en grandes sujetos para la experimentación, con una frecuencia de muestreo de 1kHz máximo. Los requisitos del sistema soportan el sistema operativo de 64bits de Windows 10, 8, 7, MacOSX y Linux, con hasta 4GB de Ram, siendo su uso idóneo para obtener datos en conjunto con el equipo de PET para preclínica.

Con la ayuda del adaptador del equipo de circulación extracorpórea, se introduce el catéter de la arteria femoral en el cabezal de medición de la actividad. Tras realizar la unión de los catéteres a la bomba peristáltica y de la introducción del catéter arterial en el detector del sistema de circulación, se deja capturar al equipo la **actividad ambiental** durante dos minutos para tener de referencia este valor con respecto al que después se obtendrá una vez que se introduzca la radiación. Una vez terminado el proceso de adquisición, se procede a lanzar el estudio PET y, posteriormente, la administración de la $^{18}$F-FDG en uno de los extremos habilitados en la bomba peristáltica para iniciar el estudio. El método para finalizar la técnica se completa con una administración intracardíaca de 10mL de Cloruro Potásico intraperitoneal.

**Evaluación de IDIF**

Para aplicar y obtener los valores con el método utilizado hasta la fecha se selecciona el espacio ventricular del corazón y la vena cava de un roedor para la comparación de los datos con FDG a través de IDIF. En la Figura 3.10 se muestran las VOIs delineados para las estimaciones de IDIF; una **VOI esférica** (2 x 2 x 2mm$^3$) en la cavidad ventricular del corazón y otra **VOI cilíndrica** (2 x 2 x 10mm$^3$) en la vena cava inferior fueron dibujados y aplicados a cada fotograma para obtener la actividad sanguínea, que fueron multiplicados por $R_{FDG}(t)=0{,}39e^{0{,}19t} + 1{,}17$ para obtener el $IDIF_{Corazón}$ y el $IDIF_{Cava}$, respectivamente (ver Figura 3.7).

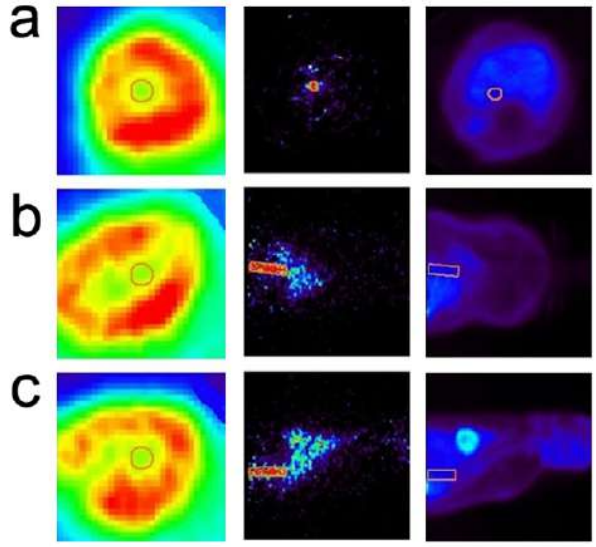



Figura 3.7. Vista transaxial (a), coronal (b) y sagital (c) de los VOIs utilizados para $IDIF_{Corazón}$ (fila superior) e $IDIF_{Cava}$ (fila central e inferior).

# 4. RESULTADOS

**Protocolo implementado para la cirugía**

Al comenzar esta técnica es necesario la optimización del protocolo quirúrgico de cateterización del paquete vascular femoral para la realización de una cirugía inguinal y, así, conseguir la exposición de la arteria y de la vena femoral, necesarias para la circulación extracorpórea. En este caso, el protocolo establecido inicia la cirugía con la anestesia del animal en una cámara de inducción con **isoflurano** a una concentración del 3%. Dicha concentración permite que, el animal en los primeros 6-10 minutos, quede anestesiado y preparado para su colocación en la mesa de intervenciones. Una vez que el roedor está anestesiado, se coloca en la correspondiente zona de intervención, la cual debe constar de una lupa binocular para la realización de la microcirugía, ya que en este caso los vasos son tan pequeños que se necesita de este dispositivo para su intervención. A continuación, para evitar infecciones, se procede a la depilación de la zona inguinal con la ayuda de una cuchilla, siendo necesario el uso de cremas depilatorias posteriores para

la eliminación total del vello restante. Una vez la zona se encuentra libre de pelo, se procede a la administración de antiséptico local, como la povidona yodada. Para evitar que el animal se intoxique con un exceso de isoflurano, con el que se continuará a lo largo de la intervención, se reduce la concentración del anestésico al 2,5% y se realiza el mismo procedimiento con el flujo del dispositivo, reduciéndolo de 3 a 2,5%.

La incisión de la piel en la región inguinal se realiza con un **fórceps estándar recto** y unas tijeras de punta fina de tipo Iris (ver numeración 19 y 16 en la Figura 3.2). De esta forma, lo que se obtiene es un área expuesta justo encima de la arteria y de la vena femoral. Una vez se muestra la región a intervenir, se elimina el tejido conectivo circundante con la ayuda de bastones de algodón. Para una correcta extracción del tejido, se realizan movimientos tirantes a ambos lados de la arteria y de la vena para conseguir la exposición de las mismas. Es necesario abrir la zona tensando la piel con la ayuda de un **hilo de sutura** para mantener el acceso a los vasos abierto. Se separa la arteria y la vena con una pinza de punta curva con movimientos de apertura y cierre. Dichos movimientos se realizarán tanto en la región superior como en la región inferior de ambos vasos con el objetivo de separarlos entre si y conseguir que ambos se encuentren aislados. Es importante conseguir separar el **nervio**, unido a ambas estructuras, sin dañarlo para evitar una afectación en la extremidad del animal y, de esta forma, impedir que pierda la movilidad de esa extremidad.

Se coloca un fórceps debajo de la **arteria** de manera que quede expuesta y lo suficientemente tensa como para conseguir realizar la canulación. Es necesario, llegado este paso, introducir un hilo de sutura en el extremo inferior de la arteria y otros centímetros de sutura en el extremo superior del vaso, ambos situados por fuera del fórceps para permitir la introducción del catéter. Se bloquea el extremo inferior de la arteria cerrando el hilo mediante un nudo simple para evitar, al realizar la incisión, producir sangrado. El extremo superior no llega a cerrarse por completo, ya que el catéter tiene que atravesarlo por el interior de la arteria. Al tener preparada la arteria, que es mejor **canular primero** debido a que esta presenta un calibre menor y, en caso de hemorragia, sería más difícil de cateterizar, se realiza una incisión con la ayuda de las microtijeras en la región medio-distal para introducir el catéter arterial a través de la incisión con la ayuda de unas pinzas, asegurándose que se introduce correctamente.

Una vez el catéter se encuentre en el interior, es importante la sujeción con pinzas para conseguir retirar el fórceps e introducirlo por completo, aproximadamente entre 2 a 4cm. Se sujeta el catéter con la sutura que se había colocado en la zona superior de la arteria realizando varios nudos (uno en la región superior a la incisión, otro en la propia zona de incisión y un tercer nudo en la región inferior a la incisión) para cerciorarse que durante el traslado al PET no se extraiga el catéter (ver Figura 3.8). Para asegurarse que la arteria está bien canalizada, se realiza una aspiración del contenido con una jeringa previamente heparinizada al 1% y, posteriormente, se introduce 1mL de heparina. Para comprobar que realmente la canalización se ha realizado correctamente, durante la aspiración, la sangre tiene que refluir hacia la jeringa previamente colocada en el extremo del catéter.

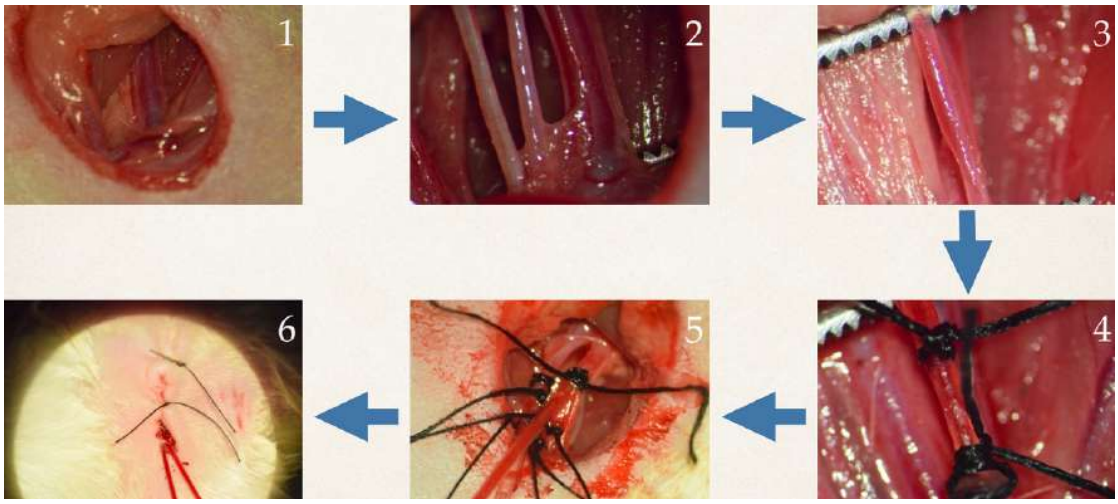



Figura 3.8: Ilustración de la representación por pasos del proceso quirúrgico para la realización de la circulación extracorpórea. En las figuras, se puede comprobar el orden de la cirugía y los pasos que se van siguiendo hasta la realización del cierre final de la incisión. En primer lugar (1), se realiza una incisión en la parte inguinal del roedor para exponer el paquete vascular de la arterial y de la vena femoral. A continuación (2), tras la extracción de todo el tejido conectivo circundante, se exponen ambos vasos y la separación del nervio (representados de izquierda a derecha como nervio, arteria y vena) para evitar la perdida de la movilidad del animal en caso de su extracción o corte. Una vez identificados ambos vasos (3), se procede a la selección de la arteria, como se aprecia en la imagen debido a su menor calibre, separándola y exponiéndola con un fórceps para tensar el vaso y así facilitar su canulación. Para evitar sangrados en el proceso de cateterización (4), se realiza un doble nudo en ocho, uno en la región inferior de la arteria (para evitar hemorragias en el momento de la incisión) y otro en la parte superior, el cual no se llega a cerrar para permitir el paso del catéter. Con unas microtijeras, se realiza una incisión y, una vez canulado, se procede al cierre del nudo superior, como se puede ver en la imagen. El mismo proceso se realiza con la vena (5), consiguiendo tener ambos vasos preparados para la realización de la circulación extracorpórea. Previamente a conectar los catéteres a la bomba peristáltica y comenzar con la circulación, se realiza el cierre de la incisión con puntos de sutura simple para evitar desgarros durante el proceso (6).

El proceso es el mismo con la **vena femoral**. Se debe destacar que el diámetro de la arteria es menor que el de la vena, por lo que es necesario que la punta del catéter arterial sea inferior al que se utiliza en la vena, pudiendo reducir dicho diámetro del catéter con calor. Una vez canalizado ambos vasos se procede al cierre de la incisión con tres puntos de sutura discontinuos para asegurar el cierre correcto y evitar desgarros.

La facilidad para realizar estas técnicas en preclínica permite avanzar en este tipo de investigación, la cual es fundamental para el desarrollo, ya no solo de fármacos, si no también para la implementación de nuevas terapias para las patologías que hoy en día su tratamiento se encuentra limitado [14,15]. Por tanto, en este contexto, la combinación de modalidades y su uso con la CT, proporciona una guía anatómica para ayudar a la integración de las **otras técnicas** mencionadas, PET y SPECT [14-17], proporcionando una localización espacial más exacta en la distribución del cuerpo.

**Evaluación de la repetibilidad de "Real-time AIF"**

Se llevó a cabo la evaluación de la repetibilidad inter-animal para determinar la efectividad en la obtención de los datos. Con el protocolo anteriormente descrito, se ha conseguido obtener **un éxito del 91%**, con solo un error en los 11 animales analizados (ver Tabla 3.2 con los 10 animales incorporados en el estudio). La media de la actividad sanguínea promediada en el primer estudio (n = 10) se muestra en la Figura 3.9. Se puede observar un pico bien definido de 544 ± 65kBq/cm$^3$ centrado en 21,5 ± 0,5 segundos después de la inyección del bolo y un área bajo la curva (AUC) de 20,8 ± 3MBq/cm$^3$. El trazador FDG se libera rápidamente de la sangre justo después del pico, mostrando tasas de trazador de 5-20kBq/cm$^3$/s. Posteriormente, el trazador FDG se absorbe mucho más lentamente, mostrando tasas de trazador G4 kBq/cm$^3$/s más allá de los 50 segundos post-inyección. El COV medio fue tan bajo como 11 ± 4% a lo largo del tiempo, mostrando valores máximos de COV alrededor del pico y los valores más bajos de COV más allá de los 50 segundos post-inyección, donde la tasa de glucosa liberada de la sangre es menor. Los recuentos de fondo estimados antes de la inyección de FDG fueron de 113 ± 2 coincidencias/s.

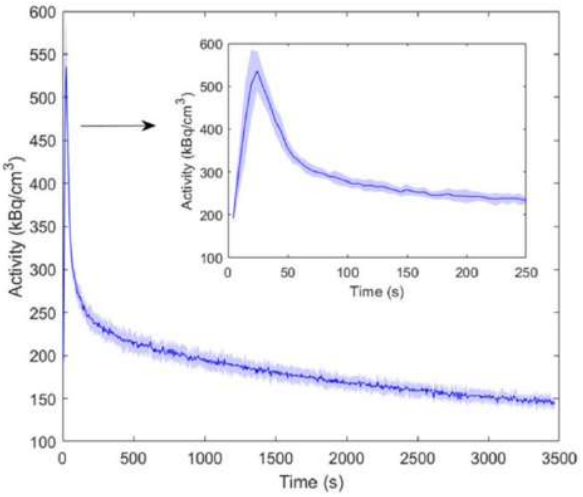



Figura 3.9. Promedio de la actividad sanguínea en "Real-time AIF" en 10 ratas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3.2. Información de los animales y cirugías.

| Animal | Peso (g) | Niveles de glucosa en sangre (mg/dl) | | | Temperatura (ºC) | | Tiempo de la cirugía (min) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Pre-cirugía | Pre-PET | Post-PET | Cuerpo | Habitación | |
| Rata 1 | 289 | 139 | 176 | 150 | 36,1 | 23,3 | 62 |
| Rata 2 | 307 | 166 | 143 | 164 | 36,1 | 22,5 | 56 |
| Rata 3 | 311 | 203 | 172 | 194 | 34,6 | 22,3 | 50 |
| Rata 4 | 347 | 204 | 176 | 210 | 32,1 | 22,9 | 55 |
| Rata 5 | 262 | 207 | 191 | 212 | 34,6 | 22,6 | 47 |
| Rata 6 | 322 | 240 | 197 | 209 | 35,7 | 21,6 | 40 |
| Rata 7 | 327 | 176 | 201 | 217 | 36,1 | 23,3 | 46 |
| Rata 8 | 323 | 161 | 150 | 181 | 36,2 | 23,3 | 29 |
| Rata 9 | 315 | 147 | 174 | 179 | 36,3 | 23,6 | 28 |
| Rata 10 | 297 | 174 | 274 | 305 | 36,1 | 23,4 | 26 |

**Comparación AIF e IDIF**

La Figura 3.10 muestra las medidas de $IDIF_{Corazón}$ (a1) e $IDIF_{Cava}$ (b1) comparadas con la media de "Real-time AIF". La estimación del pico de $IDIF_{Corazón}$ fue de 259 ± 90kBq/cm$^3$ a los 23 ± 15 segundos y el pico de $IDIF_{Cava}$ fue de 272 ± 80kBq/cm$^3$ a los 23 ± 15 segundos después de la inyección del trazador FDG. Ambos están claramente por debajo del pico de "Real-time AIF" (431 ± 65kBq/cm$^3$ después de restar los recuentos de fondo).

Después del pico, el trazador FDG se libera lentamente de la sangre, de forma similar al "Real-time AIF". Sin embargo, más allá de 200 segundos después de la inyección, $IDIF_{Corazón}$ se estabiliza o incluso **aumenta ligeramente** y, a diferencia de AIF e $IDIF_{Cava}$, $IDIF_{Corazón}$ no converge a cero. El COV medio para $IDIF_{Corazón}$ fue de 33 ± 9% a lo largo del tiempo, mostrando los valores de COV más altos alrededor del pico. Al igual que en la Figura 3.10 (c2), las diferencias longitudinales del $IDIF_{Corazón}$ (Fig. 3.10 (a2)) y del $IDIF_{Cava}$ (Fig. 3.10 (b2)) están en torno a cero, lo que demuestra que tampoco existe un sesgo. La repetibilidad evaluada en términos de desviación estándar de estas diferencias longitudinales de IDIF fue de alrededor de ± 40% para $IDIF_{Corazón}$ y de ± 30% para $IDIF_{Cava}$, ambas superiores a las de "Real-time AIF" (± 5-10%).

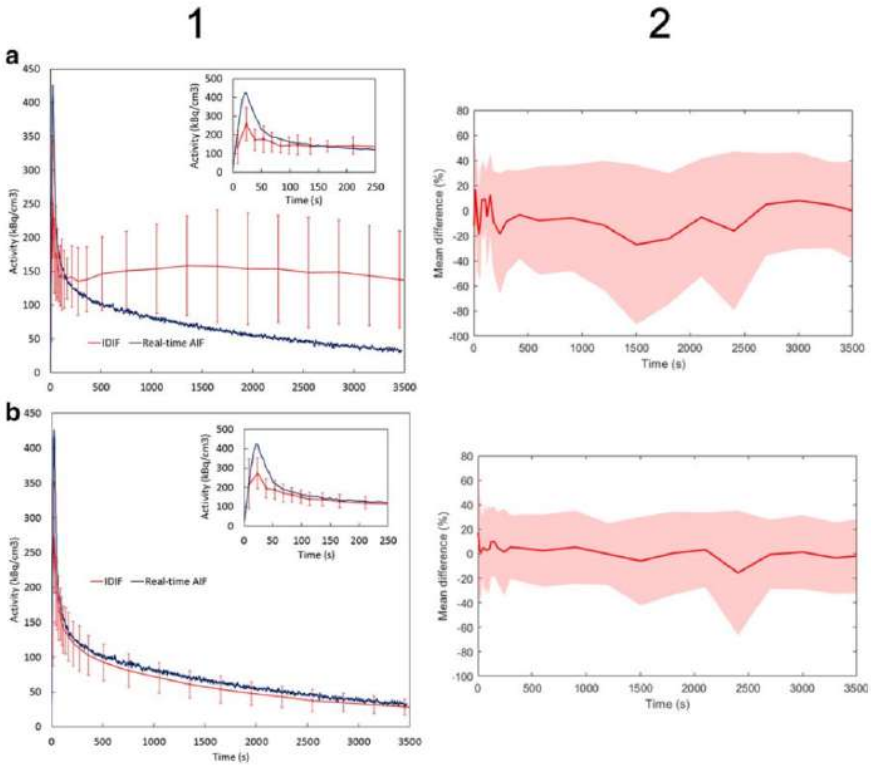



Figura 3.10. Promedio de $IDIF_{Corazón}$ (a1) e $IDIF_{Cava}$ (b1) comparado con "Real-time AIF" a lo largo del tiempo; diferencias longitudinales medias de $IDIF_{Corazón}$ (a2) e $IDIF_{Cava}$ (b2) en las ratas a estudio (a2).

## 5. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha puesto en marcha un novedoso sistema de muestreo de actividad en sangre arterial basado en la generación de una circulación de sangre extracorpórea. Una parte esencial de esta metodología reside en la cirugía necesaria para generar dicha circulación, trabajo que ha sido desarrollado específicamente en el presente capítulo. Para la realización de este trabajo, nos planteamos inicialmente una serie de pruebas para desarrollar y optimizar un protocolo quirúrgico que fuese lo más reproducible posible. Se realizaron un total de **25 cirugías en roedores**, de las cuales las 15 primeras nos permitieron llevar a cabo una optimización del protocolo para poder adecuarlo a nuestras instalaciones.

Los cambios más destacables del protocolo residen en la modificación del nudo de sutura, al cambiar el nudo simple establecido en el protocolo original por un nudo en **Ocho Marinero modificado** para la cirugía. Otro de los cambios que permitió realizar la cirugía con éxito fue la modificación del catéter, fusionando otro catéter de menor calibre colocado en la punta para conseguir una mayor precisión. Esta primera parte del trabajo llevó a un nuevo protocolo quirúrgico que fue incorporado a la unidad de imagen del CEBEGA como técnica de referencia para el muestreo de actividad en sangre para estudios de imagen preclínicos. Empleando dicho protocolo se realizó la segunda parte

del trabajo, en la que se pretendía **evaluar la reproducibilidad de las medidas** de las curvas de actividad en sangre en un grupo de animales sanos con diferentes características. Empleamos una muestra de 11 animales con pesos variables, de los cuales fueron operados con éxito 10/11, mostrando que nuestro protocolo conduce a una eficiencia alta en la generación de la circulación extracorpórea (91% de éxito en la cirugía). El principal motivo del fracaso de uno de los sujetos fue debido a una obstrucción de la arteria femoral, debido a la pérdida de sangre a la que se sometió el roedor a la hora de canalizar la vena femoral. Esta hemorragia, la cual no fue superior a 2 mL, generó dicha obstrucción de la arteria debido a la pérdida de flujo, lo que impidió canalizar dicho vaso y por lo tanto, finalizar la cirugía con éxito. Obviamente este animal no se incorporó al análisis.

Sobre los 10 animales operados con éxito se realizó un estudio de PET cerebral para observar el efecto de la medida de actividad en sangre sobre los parámetros cinéticos obtenidos a través de esta técnica de imagen. Los resultados mostraron que los AIF pueden ser generados con una alta reproducibilidad inter-animal y una tasa de muestreo suficiente para capturar con precisión la función de pico, con un pico bien definido de $544 \pm 65 kBq/cm^3$ centrado en $21,5 \pm 0,5$ segundos después de la inyección del bolo, que es completamente inalcanzable utilizando las medidas derivadas de MS.

Con todo esto, la comparativa de AIF e IDIF demostró que los valores obtenidos con IDIF tanto en cava como en corazón se encuentran **claramente por debajo del pico** obtenido con AIF, aunque la liberación de FDG a la sangre se produzca de una forma similar en ambas, sin llegar a converger a cero.

La puesta en marcha de este protocolo permitirá a la unidad de imagen del CEBEGA el desarrollo de estudios de imagen dinámicos, que aportan información adicional sobre las imágenes estáticas que se obtienen actualmente. Obviamente se trata de un procedimiento muy complejo que no se realizará de rutina, pero diversos trabajos con métodos de muestreo similares ya han mostrado que estos estudios puede aportar información de gran valor diagnóstico, por ejemplo para diferenciar entre tumores cerebrales frente al tejido necrótico [16].

## 6. CONCLUSIÓN

Se ha conseguido implementar un nuevo protocolo de cirugía extracorpórea con un 91% de éxito que permite estimar la concentración de radiofármaco en sangre arterial en tiempo real mostrando que los AIF pueden generarse con una alta reproducibilidad inter-animal y una alta tasa de muestreo, al mismo tiempo que se determinó que las diferencias longitudinales de IDIF fueron superiores a las de “Real-time AIF”.

## 7. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue, parcialmente, apoyado por los proyectos ED431F 2017/04 (Xunta de Galicia), EAPA_791/2018 (Interreg UE) y RYC-2015/17430 (Ramón y Cajal, Pablo Aguiar).

Artículo reproducido con permiso de SPRINGER NATURE.

## 8. CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

## 9. CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

DRB realizó las operaciones y redactó el manuscrito; AM preparó las figuras y contribuyó al análisis de los datos; NGL verificó los métodos analíticos y elaboró casi todos los detalles técnicos; AFF y JSR ayudaron a analizar los resultados; AR ayudó a diseñar e instruir el experimento; PA concibió el estudio y revisó el manuscrito. Todos los autores discutieron los resultados y comentaron el manuscrito.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# 10. REFERENCIAS

1. Slupe AM, Kirsch JR. Effects of anesthesia on cerebral blood flow, metabolism, and neuroprotection. J Cereb Blood Flow Metab. 2018;38(12):2192-2208.

2. Bourassa-Moreau B, Lebel R, Gilbert G, Mathieu D, Lepage M. Increased precision in the intravascular arterial input function with flow compensation. Magn Reson Med. 2019;82(5):1782-1795.

3. Naganawa M, Gallezot J, Shah V, Mulnix T, Young C, Dias M et al. Assessment of population-based input functions for Patlak imaging of whole body dynamic 18 F-FDG PET. EJNMMI Phys. 2020;7(1):67.

4. O'Sullivan F, Kirrane J, Muzi M, O'Sullivan JN, Spence AM, Mankoff DA et al. Kinetic Quantification of Cerebral PET-FDG studies without Concurrent Blood Sampling: Statistical Recovery of the Arterial Input Function. IEEE Trans Med Imaging. 2010;29(39):610-624.

5. Listewnik MH, Piwowarska-Bilska H, Kurantowicz M, Ostrowski M, Borowiecki A, Safranow K et al. Semi-quantitative method for the assessment of focal lesions in parathyroid scintigraphy with relation to histopathology: a prospective study. Nucl Med Rev Cent East Eur. 2017;20(1):18-24.

6. Danesh-Sani SH, Zakavi SR, Oskoueian L, Kakhki VR. Comparison between 99mTc-sestamibi gated myocardial perfusion SPECT and echocardiography in assessment of left ventricular volumes and ejection fraction--effect of perfusion defect and small heart. Nucl Med Rev Cent East Eur. 2014;17(2):70-4.

7. Musteata FM. Pharmacokinetic applications of microdevices and microsampling techniques. Bioanalysis. 2009;1(1):171-85

8. Convert L, Morin-Brassard G, Cadorette J, Archambault M, Bentourkia M, Lecomte R. A new tool for molecular imaging: the microvolumetric beta blood counter. J Nucl Med. 2007;48(7):1197-206.

9. He X, Wedekind F, Kroll T, Oskamp A, Beer S, Drzezga A et al. Image-Derived Input Functions for Quantification of $A_1$ Adenosine Receptors Availability in Mice Brains Using PET and [$^{18}$F]CPFPX. Front Physiol. 2020;10:1617.

10. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guide- lines. Br J Pharmacol 160(7):1577–1579.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

11. Sánchez F, Oreo A, Soriano A, Correcher C, Conde P, González A, et al. ALBIRA: a small animal PET/SPECT/CT imaging system. Med Phys. 2013;40(5):051906.

12. Spinks TJ, Karia D, Leach MO, Flux G. Quantitative PET and SPECT performance characteristics of the Albira Trimodal pre-clinical tomograph. Phys Med Biol. 2014;59(3):715-31.

13. Swisstrace GMBH. 2018. Disponible en: https://www.swisstrace.ch

14. Pandey SK, Kaur J, Easwaramoorthy B, Shah A, Coleman R, Mukherjee J. Multimodality imaging probe for positron emission tomography and fluorescence imaging studies. Mol Imaging. 2014;13:1-7.

15. Miwa K, Inubushi M, Takeuchi Y, Katafuchi T, Koizumi M, Saga T, Sasaki M. Performance characteristics of a novel clustered multi-pinhole technology for simultaneous high-resolution SPECT/PET. Ann Nucl Med. 2015;29(5):460-6.

16. Bolcaen J, Lybaert K, Moerman L, Descamps B, Deblaere K, Boterberg T et al. Kinetic Modeling and Graphical Analysis of 18F-Fluoromethylcholine (FCho), 18F-Fluoroethyltyrosine (FET) and 18F-Fluorodeoxyglucose (FDG) PET for the Fiscrimination between High-Grade Glioma and Radiation Necrosis in Rats. PLoS One. 2016;11(8):e0161845.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# CAPÍTULO IV: VIABILIDAD DE ESTUDIOS LONGITUDINALES DE PET CEREBRAL DINÁMICO CON MEDIDAS EN TIEMPO REAL DE ARTERIAL INPUT FUNCTION

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

## CAPÍTULO IV

# 1. RESUMEN

Los estudios preclínicos de PET cerebral dinámico están limitados por la necesidad de realizar medidas de la AIF durante la adquisición. En este sentido, el uso de una derivación arterio-venosa es un método prometedor para la generación de "Real-time AIF", pero su aplicación en estudios longitudinales no es viable, principalmente debido a las cirugías complejas que involucra y las altas tasas de fracaso. En este capítulo, se ha estudiado la viabilidad y reproducibilidad para llevar a cabo una estrategia de derivación arterio-venosa doble, que permita realizar estudios longitudinales de PET cerebral dinámico. Para ello, se estudió la viabilidad de las derivaciones arterio-venosas dobles en ratas en la región inguinal derecha e izquierda y se evaluó la reproducibilidad de la AIF inter-animal e intra-animal. Por otro lado, también se obtuvo una medida de IDIF, para comparación con la AIF. Siguiendo esta metodología, se realizaron estudios dinámicos de FDG PET cerebral para estimar las constantes cinéticas y la CMRglc obtenidas a partir del análisis estándar 2TCM y de Patlak, empleando tanto AIF como IDIF. En primer lugar, los resultados demostraron que las AIF mediante las derivaciones arterio-venosas dobles pueden obtenerse con una tasa de éxito de la cirugía muy alta (100%). Estos resultados proporcionaron mediciones de AIF altamente reproducibles intra-animal (5-10%). En esta situación, los modelos cinéticos también aportaron buenos resultados, mostrando que tanto las constantes cinéticas como la CMRglc pueden estimarse eficazmente sin sesgo asociado a la doble derivación. Por otro lado, la comparativa con las medidas de IDIF longitudinal mostraron que también es un método válido y que no muestra sesgo a lo largo del tiempo. Sin embargo, las medidas de IDIF mostraron mayores incertidumbres intra-animal que las AIF. Este trabajo demuestra la viabilidad y la alta reproducibilidad de la realización de mediciones de AIF longitudinales y, en consecuencia, de un modelado cinético preciso utilizando el método de la derivación arterial.

Palabras clave: Arterial Input Function, Tasa de glucosa metabólica cerebral, PET dinámico, Modelado cinético, PET preclínico.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

## 2. INTRODUCCIÓN

Los estudios de PET cerebral dinámico representan la técnica de referencia para la evaluación *in vivo* del intercambio de fármacos o radiotrazadores a través de la BHE, la unión de receptores o las tasas de metabolismo y perfusión. En particular, el PET dinámico con [$^{18}$F]F-FDG se utiliza habitualmente para estimar la Tasa Metabólica Cerebral de Glucosa (CMRglc) mediante un modelo de 2 compartimentos tisulares (2TCM) [1] o, alternativamente, el análisis gráfico de Patlak [2]. La mayoría de los modelos cinéticos requieren de la estimación de la concentración de FDG en el plasma arterial a lo largo del tiempo (AIF) y la concentración de FDG en el tejido diana (curva de tiempo-actividad tisular) para proporcionar las constantes cinéticas que describen el transporte de la glucosa a través de la barrera [3]. Actualmente, estos estudios tienen un gran interés en aquellos modelos animales en los que se están evaluando nuevos fármacos o radiotrazadores. Sin embargo, siguen viéndose obstaculizados por el complejo procedimiento relacionado con la medición precisa de AIF. El modelo estándar para adquirir la AIF se basa en el muestreo manual (MS) mediante un catéter colocado a nivel arterial. Como alternativa, la AIF también puede estimarse a partir de imágenes de PET utilizando la captación de FDG en un volumen de interés colocado sobre los ventrículos cardíacos o en un vaso de gran tamaño (IDIF). Ambos métodos presentan importantes limitaciones. El método MS, considerado como la técnica de referencia en los estudios humanos, tiene importantes limitaciones en los estudios preclínicos, principalmente debido al pequeño volumen de sangre en los roedores. En estos casos, el método MS puede producir una pérdida importante de volumen de sangre que afecta a la estabilidad fisiológica [4]. Además, el método MS proporciona un muestreo muy pobre (pocas medidas) y, en consecuencia, estimaciones inexactas de la posición del pico de AIF. Esto es especialmente preocupante para el modelado de radiotrazadores de dinámica rápida, como la FDG, lo que afecta negativamente a las constantes cinéticas obtenidas [5]. Por otro lado, las alternativas basadas en estimaciones de IDIF pueden estar muy sesgadas por el ruido estadístico y el spill-over de los tejidos circundantes, que depende del efecto de volumen parcial [6,7].

Se han propuesto diferentes métodos alternativos al método MS para reducir la pérdida de volumen sanguíneo y aumentar la tasa de muestreo de las estimaciones de AIF [8,9]. El presente trabajo se centra en el uso de una de las soluciones más prometedoras que se basa en las derivaciones arterio-venosas. Este método requiere el uso de un dispositivo que consiste en catéteres conectados a una bomba peristáltica, un detector de centelleo compacto y blindado colocado cerca del animal, conectado al mismo tiempo de tal manera que la sangre circula externamente en un sistema cerrado y pasa a través de los detectores de radiactividad (CAPÍTULO III) [4]. Trabajos anteriores han demostrado que esta derivación arterio-venosa puede ser considerada como una alternativa precisa y eficiente para la generación de AIF con alta tasa de muestreo y sin pérdida de volumen sanguíneo [10-14]. Sin embargo, la realización de estudios PET repetidos en el tiempo utilizando derivaciones arterio-venosas se considera un reto técnico debido a la

complicada cirugía que requiere este método [10]. Se debe hacer mención que la aplicación de derivaciones arterio-venosas en estudios PET longitudinales se ha utilizado escasamente [13] y sigue siendo un procedimiento poco utilizado.

En este trabajo se ha estudiado la viabilidad de una estrategia de doble cirugía para realizar estudios de PET dinámicos longitudinales con "Real-time AIF" en ratas. La estrategia que se ha seguido ha sido diseñada específicamente para aumentar la reproducibilidad de las medidas resolviendo los problemas anteriormente mencionados.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### Preparación del animal

El presente trabajo se realizó con ratas macho Sprague-Dawley (con un peso promedio de 323 ± 30g) suministradas por las instalaciones de animales de la Universidad de Santiago de Compostela. Antes de los experimentos, los animales fueron mantenidos en jaulas individuales bajo condiciones controladas de temperatura (21 ± 2ºC) y humedad (60 ± 5%), con ciclos día-noche regulados por luz artificial (12/12h) y alimentados *ad libitum*. Se siguieron todas las directrices institucionales y/o nacionales aplicables para el cuidado y uso de los animales. Todos los experimentos con animales cumplieron las directrices ARRIVE [15] y se llevaron a cabo de acuerdo con la Directiva de la UR 2010/63/UE para la experimentación con animales, siendo aprobados por la Red Gallega de Comités de Ética de la Investigación.

### Protocolo de derivación arterio-venosa

Se evaluó la viabilidad de realizar derivaciones arterio-venosas longitudinales a lo largo del tiempo en el mismo animal siguiendo el protocolo de generación de circulación extracorpórea, que supone el método de MS. Esta cirugía requirió una optimización y entrenamiento previos para sortear los desafíos que surgen al realizar evaluaciones repetidas en un mismo animal. Cada rata fue colocada en la mesa de operaciones bajo un 2% de isoflurano para realizar una cirugía aséptica con cateterización de la arteria y vena femoral derecha. Se utilizó una combinación de catéteres de polietileno (PE10 con 0,28mm de diámetro interior, 0,61mm de diámetro exterior; PE50 con 0,58mm de diámetro interior, 0,96mm de diámetro exterior) llenos de solución salina heparinizada (50UI/mL) para realizar el cateterismo. Se sujetaron los catéteres con seda trenzada 4-0 rodeando los vasos y se completó la intervención con tres puntos de sutura para asegurar la zona de la cirugía. Tras la optimización de la intervención mencionada, se definió el protocolo óptimo utilizando catéteres fusionados P10 y P50 para facilitar la cateterización de los vasos. Se utilizaron diferentes longitudes de catéter para cada vaso de 0,6mm (PE10) y 47mm (P50) para las arterias y 0,7mm (P10) y 38mm (P50) para las venas. Basándose en la experiencia previa, la buena evolución de los animales, sin mostrar signos de infección tras la cirugía, fue la principal razón para descartar el tratamiento con

antibióticos y analgesia. Todas las ratas fueron sacrificadas con una inyección intracardíaca de cloruro potásico (5mL) al final de los experimentos.

**Adquisición de PET y generación de "Real-time AIF"**

Se utilizó el escáner preclínico Albira microPET/CT (Bruker Bio – spin Corporation) para las adquisiciones de datos PET. La cama se colocó para incluir el corazón y el cerebro en el campo de visión del escáner (axial 15cm). Una vez colocado el animal en la cama, se conectaron los catéteres venoso y arterial a una bomba peristáltica (0,320mL/min) para iniciar la circulación extracorpórea. El contador de BS Twilitte II (modelo Swisstrace) se colocó cerca de la cama del escáner [11] para medir la actividad en sangre. Se estimaron los recuentos de fondo (sin actividad de FDG). Por último, se lanzó una adquisición dinámica de 80 minutos simultáneamente a la inyección manual (1,5mL) de 18F-FDG (12,95 ± 0,3MBq) a través del catéter venoso con una velocidad de infusión de 0,1mL/s. Se utilizó la herramienta PSAMPLE (PMOD Technologies Ltd) para generar el "Real-time AIF", registrando directamente la actividad sanguínea a cada segundo de la MS y siendo multiplicada por $R_{FDG}$ (t) = 0,39e-$^{0,19t}$ + 1,17 para obtener la actividad plasmática [3]. La reconstrucción de los datos PET se realizó sin corrección de atenuación porque la adquisición del CT aumentaría significativamente el tiempo de exploración. El tamaño de los píxeles de la imagen es de 0,4 x 0,4 x 0,4mm$^3$. El archivo de adquisición se dividió en 23 imágenes PET correspondientes a diferentes frames (8x15s; 2x30s; 2x60s; 1x120s; 10x300s). Durante la adquisición del PET, también se controló la frecuencia respiratoria para evitar una depresión respiratoria grave. Se recogió una gota de sangre tres veces en el transcurso del procedimiento para medir los niveles de glucosa: Al principio de la cirugía (en cola) e inmediatamente antes y después de la adquisición de la PET, obtenida de la derivación arterio-venosa.

**Análisis de imágenes PET**

Se utilizó PMOD 3.703 (PMOD Technologies Ltd) para delinear manualmente un volumen de interés (VOI) esférico (3x3x3mm$^3$) en la corteza frontal en las imágenes PET reconstruidas para medir la concentración media de FDG y derivar las curvas de tiempo-actividad del tejido [16].

**Evaluación de la reproducibilidad de "Real-time AIF"**

Para determinar la reproducibilidad de MS para la generación de "Real-time AIF", se estudió la repetibilidad a lo largo de los experimentos.

Las últimas 5 ratas del capítulo anterior, las cuales se mantuvieron vivas después de la cirugía y del estudio PET, se utilizaron para la evaluación de la reproducibilidad del

AIF intra-animal. Estas ratas se mantuvieron vivas mediante la cauterización de los vasos operados y la sutura de la incisión, manteniéndose en las condiciones mencionadas de temperatura y humedad, siendo alimentadas durante los 7 días siguientes. A continuación, se realizó un nuevo cateterismo en la arterial femoral contralateral en las mismas condiciones experimentales (ver Figura 4.1). Para estimar el sesgo intra-animal y la repetibilidad, el AIF de la nueva prueba se restó del AIF de la prueba y, después, se dividió por el AIF de la prueba (en %). Estas diferencias se promediaron en 5 ratas para evaluar el sesgo y la repetibilidad intra-animal a lo largo del tiempo.

El sesgo y la repetibilidad intra-animal se compararon siguiendo el mismo procedimiento, pero utilizando métodos IDIF. Las medidas de fondo se restaron del IDIF para la comparación.

**Modelización cinética longitudinal**

El 2TCM se ajustó a las curvas de actividad cerebral utilizando PMOD 3.703 (PMOD Technologies Ltd), con AIF o IDIF como funciones de entrada. Este modelo proporciona una estimación del $CMR_{glc}$:

$$\mathrm{CMR_{glc}} = \frac{K_{\mathrm{FDG}} \times C_{\mathrm{p}}}{\mathrm{LC}}$$

Donde $C_p$ representa la concentración de glucosa en el plasma, que se deriva directamente de las estimaciones de AIF o IDIF. Lumped Constant (LC) es la constante global, que se fijó en 0,6 para la comparación directa de los resultados con [3]. Por último, la constate de captación de FDG, denominada $K_{FDG}$, se define en términos de constantes cinéticas: $K_1$ (constante de tasa de afluencia aparente), $k_2$ (constante de tasa de eflujo), $k_3$ (constante de tasa de fosforilación) y $k_4$ (constante de tasa de defosforilación), como se especifica a continuación:

$$K_{\mathrm{FDG}} = \frac{K_1 \times k_3}{k_2 + k_3}$$

Además, se utilizó el análisis gráfico de Patlak para estimar $CMR_{glc}$ asumiendo un atrapamiento irreversible del trazador FDG en el cerebro [1], estimando la constante de captación de $K_{FDG}$ gráficamente a partir de la siguiente regresión lineal:

$$\frac{Ct(t)}{Cp(t)} = K_{\mathrm{FDG}} \frac{\int_0^t Cp(\tau)d\tau}{Cp(t)} + v_t$$

Donde el intercepto $v_t$ (unidad: mL de sangre/mL) es el volumen de distribución, $C_t$ (t) es la concentración tisular del trazador y $C_p$ (t) es la concentración plasmática en el tiempo [2].

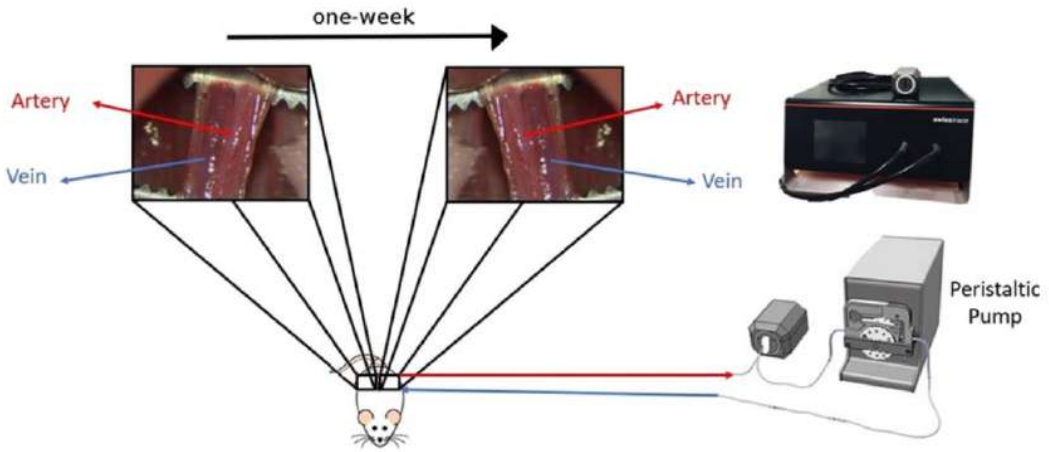



Figura 4.1. Protocolo de la doble cirugía para la generación de "Real-time AIF".

# 4. RESULTADOS

**Viabilidad del esquema de la doble cirugía**

Todas las cirugías se realizaron en condiciones similares de temperatura ambiente y de los animales, con una duración media de la cirugía de 43 ± 11 minutos. Se encontró una gran variabilidad en los niveles iniciales de glucosa en sangre, que oscilaban entre 136 y 240mg/dl, ya que todos los animales fueron examinados en condiciones de no ayuno. Se encontró un efecto diferente de la cirugía sobre los niveles de glucosa en sangre. Los animales con niveles iniciales elevados de glucosa en sangre mostraron valores reducidos después de la cirugía. En cambio, los animales con niveles bajos de glucosa en sangre mostraron valores mayores después de la cirugía (Tabla 4.1). Durante los experimentos, 5/5 cirugías se completaron con éxito en el estudio de repetibilidad entre animales. La frecuencia respiratoria se controló continuamente y se mantuvo en 40-50 respiraciones por minuto.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 4.1. Información de los animales y cirugías en base a la repetición del CAPÍTULO III.

| Animal | Peso (g) | Niveles de glucosa en sangre (mg/dl) | | | Temperatura (ºC) | | Tiempo de la cirugía (min) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Pre-cirugía | Pre-PET | Post-PET | Cuerpo | Habitación | |
| Rata 6R | 385 | 150 | 224 | 265 | 36,1 | 21,6 | 47 |
| Rata 7R | 345 | 174 | 152 | 161 | 36,2 | 23,0 | 33 |
| Rata 8R | 358 | 211 | 166 | 175 | 36,2 | 23,1 | 39 |
| Rata 9R | 337 | 136 | 158 | 142 | 36,2 | 23,3 | 33 |
| Rata 10R | 312 | 184 | 278 | 250 | 36,4 | 23,8 | 49 |

Con todo esto, para asegurar que el estudio no perjudicaba el bienestar animal se realizó un estudio para comprobar la perfusión de uno de los roedores implicados en el trabajo con SPECT. Para la obtención de estas imágenes se empleó la Gammacámara Siemens Orbiter. En este caso, para realizar una comparativa de la evolución de la irrigación sanguínea de la pata afectada, se realizó un estudio antes de la cirugía y después de la misma con $^{99m}$Tc (ver Figura 4.2).

Figura 4.2. Estudio de perfusión sanguínea con imágenes SPECT de $^{99m}$Tc-tetrofosmina en la rata 6 antes de la cirugía (izquierda) y 48 horas después de la cirugía (derecha) (6R), mostrando que no hay regiones isquémicas de necrosis o de hipoperfusión.

**Evaluación de la repetibilidad de "Real-time AIF"**

Con respecto a la repetibilidad intra-animal, la Figura 4.3 muestra los AIF obtenidos para cada rata en las operaciones repetidas (n = 5) y las diferencias medias de AIF entre los estudios longitudinales. Los resultados promediados indicaron que las diferencias AIF longitudinales se centran en torno a cero (Fig. 4.3 (c2)), asegurando así que no existe un sesgo a lo largo del tiempo originado por la estrategia de la doble cirugía. Además, la repetibilidad evaluada en términos de desviaciones estándar de estas diferencias AIF longitudinales fue de alrededor de ± 5 – 10% a lo largo de todo el tiempo de adquisición.

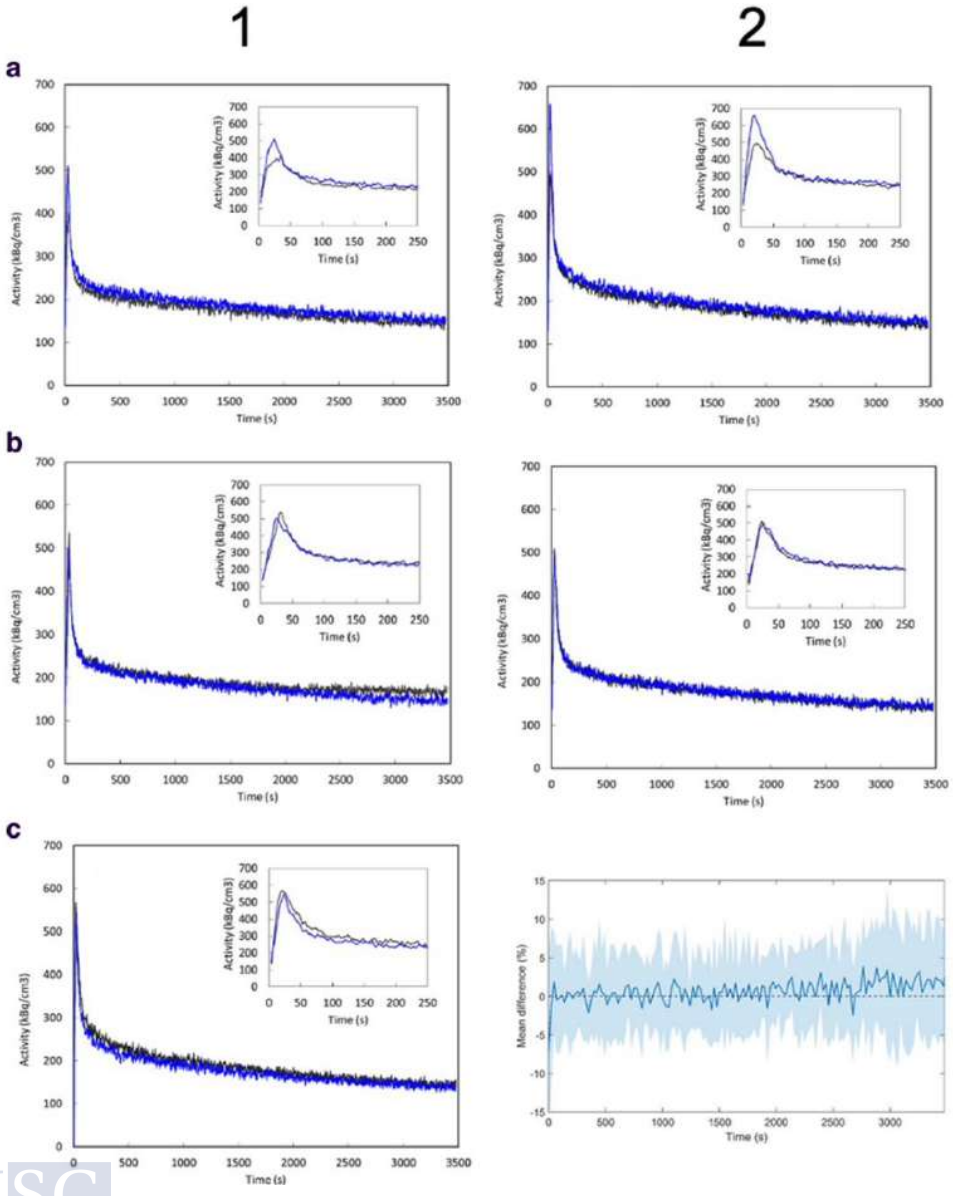



Figura 4.3. AIF longitudinales para cada rata (a1, a2, b1, b2, c1) correspondientes al primer (línea azul) y segundo estudio (línea negra). Promedio de las diferentes AIF longitudinales en 5 ratas (c2).

**Modelización cinética longitudinal**

La Tabla 4.2 muestra las constantes cinéticas y las tasas metabólicas promediadas para los estudios de prueba y repetición. Los resultados indican que tanto las constantes cinéticas ($K_1$, $k_2$ y $k_3$) como $CMR_{glc}$ pueden estimarse con precisión en el estudio de prueba (ver Figura 4.4). Además, el análisis de la prueba t emparejada mostró que no se encontraron cambios significativos entre los estudios de prueba y de repetición: p = 0,25 ($K_1$), p = 0,31 ($k_2$), p = 0,41 (k3) y p = 0,28 ($CMR_{glc}$). Como puede verse en la Figura 4.5 (a1, a2, b1, b2, c1, c2), la comparación de las constantes cinéticas y las tasas metabólicas de cada rata entre los estudios de prueba y de repetición mostraron cambios relativamente pequeños en todos los animales. Además, la Tabla 4.2 también muestra el promedio de CMRglc para los estudios de prueba y repetición utilizando los métodos IDIF. Se encontraron diferencias significativas en los casos de $IDIF_{Cava}$ y 2TCM (p 0 0,002) e $IDIF_{Corazón}$ y Patlak (p = 0,006).

Tabla 4.2. Constantes cinéticas y tasa metabólica promedio en la muestra de prueba y de repetición mediante AIF, $IDIF_{Corazón}$ e $IDIF_{Cava}$.

| Real-time AIF | Real-time AIF | | | | | $IDIF_{Corazón}$ | | $IDIF_{Cava}$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2TCM | | | | Patlak plot | 2TCM | Patlak plot | 2TCM | Patlak plot |
| | $K_1$ (ml/min/cm$^3$) | $k_2$ (1/min) | $k_3$ (1/min) | $CMR_{glc}$ (mmol/min/100 g) | $CMR_{glc}$ (mmol/min/100 g) | $CMR_{glc}$ (mmol/min/100 g) | $CMR_{glc}$ (mmol/min/100 g) | $CMR_{glc}$ (mmol/min/100 g) | $CMR_{glc}$ (mmol/min/100 g) |
| Estudio prueba | 0.10 ± 0.05 | 0.31 ± 0.05 | 0.022 ± 0.004 | 10 ± 3 | 9 ± 3 | 12 ± 8 | 6 ± 4 | 14 ± 3 | 11 ± 3 |
| Estudio repetición | 0.07 ± 0.03 | 0.28 ± 0.05 | 0.022 ± 0.005 | 9 ± 3 | 8 ± 2 | 16 ± 7 | 10 ± 4 | 17 ± 2 | 11 ± 2 |

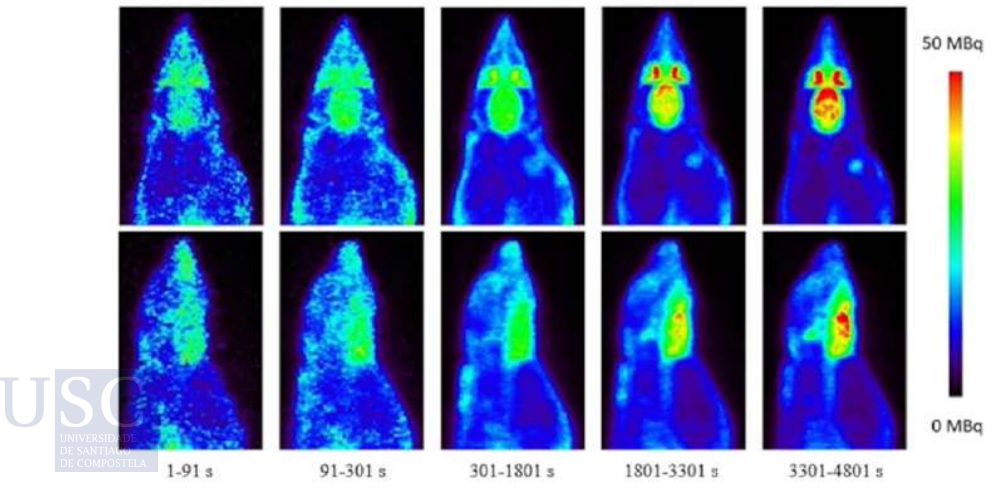
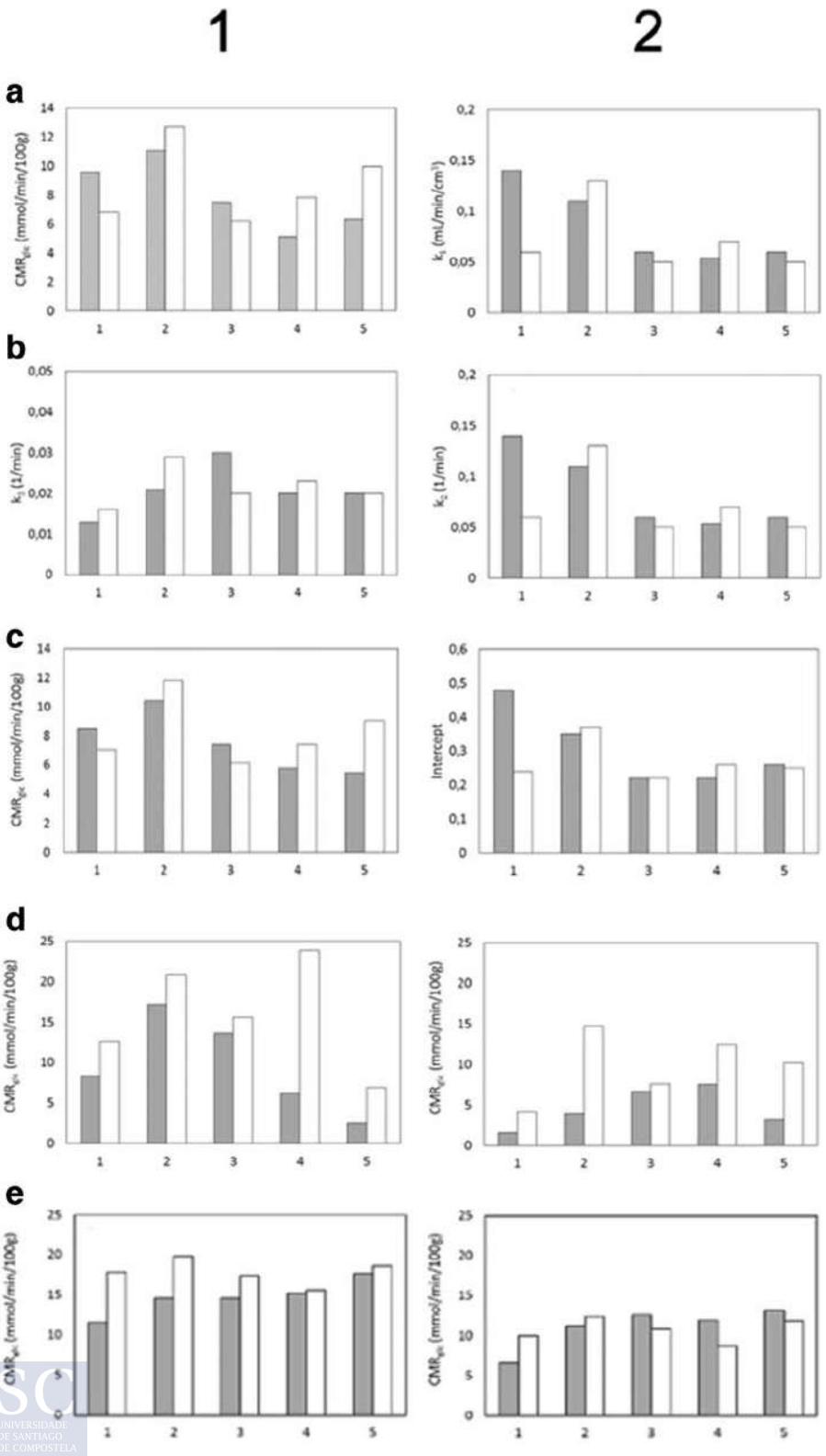



Figura 4.4. Vista coronal (arriba) y sagital (abajo) de las imágenes PET correspondientes a los diferentes *frames* a lo largo del tiempo.




USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 4.5. Constantes cinéticas y tasas metabólicas en el primer estudio (barras grises) y en el segundo estudio (barras blancas) obtenidas del 2TCM (a1, a2, b1, b2) y del análisis gráfico de Patlak (c1, c2) utilizando "Real-time AIF" (promediado en 5 ratas) y obtenidas del 2CTM (d1) y del análisis gráfico de Patlak (d2) utilizando IDIF.

# 5. DISCUSIÓN

Se ha evaluado la viabilidad y la reproducibilidad de los estudios de PET dinámicos longitudinales utilizando mediciones de "Real-time AIF" aplicando un nuevo método de derivación arterial basado en una estrategia de doble cirugía. Los hallazgos presentados en este trabajo representan una contribución para ayudar a que el método de derivación arterial se convierta en el método estándar para los estudios PET dinámicos preclínicos, en particular, cuando el radiotrazador estudiado requiere una estimación precisa del pico de AIF. Esta afirmación se justifica en base a tres cuestiones principales, que se discuten ampliamente a continuación. El trabajo proporciona un nuevo impulso a las ventajas previamente reportadas del método de derivación arterial con respecto al método estándar de MS [10-12, 17, 18]. Todas las AIF se generaron con una alta tasa de éxito de las cirugías y, por tanto, evitando la pérdida de sangre, un problema importante de los métodos de MS en pequeños animales [4,5]. En esta cuestión, se confirma que el método de derivación arterial puede considerarse un método preciso con una alta tasa de muestreo para la generación de "Real-time AIF" que evita las limitaciones del método estándar de MS.

Con todo esto, el trabajo aborda una de las cuestiones más preocupantes que hay que llevar a cabo para considerar la derivación arterial como el nuevo método de referencia para la generación de AIF. En este caso, nos enfrentamos al reto de realizar mediciones longitudinales de AIF en ratas utilizando el método de la derivación arterial. Hasta la fecha, ha habido pocos intentos. La primera idea se basaba en el uso de catéteres fijos [19]. Sin embargo, este método mostraba múltiples problemas cuando hay que realizar evaluaciones repetidas durante varios días, como las infecciones de la piel, especialmente importantes en animales inmunodeprimidos y, además, los catéteres suelen ser arrancados por los animales. Otra propuesta se basó en cánulas subcutáneas tras la cateterización de la arteria femoral derecha y la vena femoral izquierda, lo que permitió realizar con éxito estudios de PET longitudinales en 2 ratas [13, 20]. Sin embargo, es conocido que la heparinización diaria de los catéteres puede dar lugar a una inestabilidad hemodinámica en los días siguientes y, basándonos en nuestra experiencia, este problema suele provocar una fuerte hemorragia, con la consiguiente preocupación por la reproducibilidad e, incluso, la muerte de los animales. En este sentido, habría sido conveniente abordar la tasa de éxito y la reproducibilidad del procedimiento propuesto en [20], en un mayor número de animales. En cambio, el presente trabajo permitió asegurar la viabilidad del procedimiento propuesto, mostrando bajas tasas de fracaso durante el ensayo (4/18 cirugías fallaron en los experimentos preliminares para el entrenamiento y 0/5 en los experimentos incluidos en este trabajo). Esta alta tasa de éxito se debe a que los vasos operados están completamente cauterizados y la incisión se sutura después de la primera cirugía. El motivo de las cirugías fallidas fue la obstrucción de la arteria femoral, sin relación aparente con la estrategia de la doble cirugía. Debemos mencionar que la derivación arterial doble podría ser inapropiada cuando estos fallos de la cirugía tienen

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

consecuencias importantes, por ejemplo, cuando se utilizan modelos animales muy caros o los animales se estudian durante un seguimiento largo. Otra cuestión que debe aclararse es el efecto de la cauterización de los vasos en la perfusión sanguínea a lo largo del miembro posterior operado. En nuestro trabajo estudiamos la perfusión de la extremidad posterior antes y 48 horas después de la cirugía mediante SPECT con $^{99m}$Tc-tetrofosmina, mostrando que la extremidad posterior operada recuperó la perfusión.

Por último, el trabajo evalúa, por primera vez, la reproducibilidad longitudinal de 2TCM y Patlak para FDG obtenidas a partir de estas medidas de AIF mediante nuestro método de derivación arterio-venosa doble. Los resultados indicaron que los AIF longitudinales pueden generarse con precisión, mostrando incertidumbres intra-animal muy bajas, en torno al 5-10%, y sin sesgo a lo largo del tiempo, originado por la estrategia de la doble cirugía. Por otro lado, los resultados indicaron que el IDIF longitudinal también puede generarse sin sesgo a lo largo del tiempo, pero mostrando mayores incertidumbres intra-animal. Las altas incógnitas de las estimaciones de IDIF pueden explicarse por la duración del marco PET en el momento inicial, la subestimación del pico y el efecto de volumen parcial [6, 7, 21]. La figura 4.4 muestra que los *frames* adquiridos de 15 segundos en el momento inicial impiden capturar el pico de forma eficiente y, por tanto, conducen a subestimaciones del IDIF durante el primer minuto. Aunque el uso de *frames* de tiempo más cortos se ha propuesto como una solución factible [22], requeriría aumentar la actividad inyectada de FDG para adquirir suficientes recuentos y, en este caso, el rango dinámico máximo del escáner PET casi se alcanza utilizando las actividades inyectadas para este trabajo. Con respecto a la modelización cinética, se obtuvieron estimaciones similares de $CMR_{glc}$ a partir de los modelos 2TCM y Patlak utilizando "Real-time AIF" (que es lo que se espera para FDG), pero en cambio, Patlak proporcionó estimaciones de $CMR_{glc}$ significativamente más bajas cuando se utilizó IDIF. Esto se debe a que el efecto de volumen parcial conduce a sobreestimaciones de IDIF en los últimos fotogramas, cuando la captación de FDG en miocardio es alta, lo que afecta directamente al análisis gráfico de Patlak y genera un sesgo entre 2TCM y Patlak. Se supone que este problema puede abordarse utilizando correcciones del coeficiente de recuperación para compensar los recuentos de derrame del miocardio o, incluso, a partir de delineaciones precisas de las VOI de IDIF en otras regiones anatómicas utilizando imágenes de MR corregidas [23-25]. En este sentido, se demostró que puede resolverse parcialmente utilizando estimaciones de IDIF de la vena cava directamente en las imágenes PET [26, 27]. En este último apartado, se demostró que el método de derivación arterial basado en una estrategia de doble cirugía y en métodos IDIF adecuadamente optimizados puede proporcionar una alta reproducibilidad longitudinal de los AIF y de las estimaciones de los modelos cinéticos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 6. CONCLUSIONES

El uso del método de derivación arterial basado en una estrategia de doble cirugía es factible para llevar a cabo estudios de PET dinámicos longitudinales con una alta tasa de éxito de las cirugías, una alta reproducibilidad y, en consecuencia, un modelado cinético preciso, lo que ayuda a resolver uno de los principales retos pendientes del método de derivación arterial para ser considerado como el "gold standard" en los estudios de PET dinámicos preclínicos.

## 7. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue, parcialmente, apoyado por los proyectos ED431F 2017/04 (Xunta de Galicia), EAPA_791/2018 (Interreg UE) y RYC-2015/17430 (Ramón y Cajal, Pablo Aguiar).

Artículo reproducido con permiso de SPRINGER NATURE.

## 8. CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

## 9. CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

DRB realizó las operaciones y redactó el manuscrito; AM preparó las figuras y contribuyó al análisis de los datos; NGL verificó los métodos analíticos y elaboró casi todos los detalles técnicos; AFF y JSR ayudaron a analizar los resultados; AR ayudó a diseñar e instruir el experimento; PA concibió el estudio y revisó el manuscrito. Todos los autores discutieron los resultados y comentaron el manuscrito.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# 10. REFERENCIAS

1. Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C et al (1977) The [14C] deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. J Neurochem 28:897–916

2. Patlak CS, Blasberg RG, Fenstermacher JD (1983) Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data. J Cereb Blood Flow Metab 3(1):1–7

3. Alf MF, Martić-Kehl MI, Schibli R, Krämer SD (2013) FDG kinetic modeling in small rodent brain PET: optimization of data acquisition and analysis. Eur J Nucl Med Mol I 3:61

4. Weber B, Burger C, Biro P, Buck A (2002) A femoral arteriovenous shunt facilitates arterial whole blood sampling in animals. Eur J Nucl Med Mol Imaging 29:319–323

5. Pain F, Lanièce P, Mastrippolito R, Gervais P, Hantraye P, Besret L (2004) Arterial input function measurement without blood sampling using a beta-microprobe in rats. J Nucl Med 45(9):1577–1582

6. Fang YH, Muzic RF Jr (2008) Spillover and partial-volume correction for image-derived input functions for small-animal 18F-FDG PET studies. J Nucl Med 49(4):606–614

7. Zanotti-Fregonara P, Chen K, Liow JS, Fujita M, Innis RB (2011) Image-derived input function for brain PET studies: many challenges and few opportunities. J Cereb Blood Flow Metab 31(10):1986–1998

8. Wu HM, Sui G, Lee CC, Prins ML, Ladno W, Lin HD et al (2007) In vivo quantitation of glucose metabolism in mice using small-animal PET and a microfluidic device. J Nucl Med 48(5):837–845

9. Convert L, Morin-Brassard G, Cadorette J, Archambault M, Bentour- kia M, Lecomte R (2007) A new tool for molecular imaging: the microvolumetric beta blood counter. J Nucl Med 48:1197–1206

10. Weber B, Spath N, Wyss M et al (2003) Quantitative cerebral blood flow measurements in the rat using a beta-probe and H2 15º. J Cereb Blood Flow Metab 23:1455–1460

11. Alf MF, Wyss MT, Buck A, Weber B, Schibli R, Kramer SD (2013) Quantification of brain glucose metabolism by 18F-FDG PET with real-time arterial and image derived input function in mice. J Nucl Med 54:132–138

12. Roehrbacher F, Bankstahl JP, Bankstahl M et al (2015) Development and performance test of an online blood sampling system for determination of the arterial input function in rats. EJNMMI Phys 2:1–19

13. Warnock GI, Aerts J, Bahri MA, Bretin F, Lemaire C, Giacomelli F et al (2014) Evaluation of 18F-UCB-H as a novel PET tracer for synaptic vesicle protein 2ª in the brain. J Nucl Med 55(8):1336–1341

14. Herde AM, Keller C, Sephton SM, Mu L, Schibli R, Ametamey SM et al (2015) Quantitative - 132 -áter- 132 -n- 132 - emission tomography of mGluR5 in rat brain with [(18) F]PSS232 at minimal invasiveness and reduced model complexity. J Neurochem 133(3):330–342

15. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guide- lines. Br J Pharmacol 160(7):1577–1579

16. Huang Q, Massey JC, Mińczuk K, Li J, Kundu BK (2019) Non- invasive determination of blood input function to compute rate of myocardial glucose uptake from dynamic FDG PET images of rat heart in vivo: comparative study between the inferior vena cava and the left ventricular blood pool with spill over and partial - 132 -áter- 132 -n corrections. Phys Med Biol 64(16):165010

17. Pain F, Laniece P, Mastrippolito R et al (2000) SIC, an intracerebral radiosensitive probe for in vivo neuropharmacology investigations in small laboratory animals: theoretical considerations and practical characteristics. IEEE Trans Nucl Sci 47:25–32

18. Napieczynska H, Kolb A, Katiyar P, Tonietto M, Ud-Dean M, Stumm R et al (2018) Impact of the arterial input function recording method on kinetic parameters in small-animal PET. J Nucl Med 59(7):1159– 1164

19. Jespersen B, Knupp L, Northcott CA (2012) Femoral arterial and venous catheterization for blood sampling, drug administration and conscious blood pressure and heart rate measurements. J Vis Exp 59:3496

20. Huang CC, Wu CH, Huang YY, Tzen KY, Chen SF, Tsai ML, Wu HM (2017) Performing repeated quantitative small-animal pet with an arterial input function is routinely feasible in rats. J Nucl Med 58(4):611–616

21. Park M-J, Fung GS, Yamane T, Kaiser F, Fukushima K, Higuchi T (2013) Assessment of partial - 132 -áter- 132 -n effect in small animal cardiac PET imaging using Monte Carlo simulation. J Nucl Med 54(suppl 2):1638

22. Kim SJ et al (2008) Kinetic modeling of 3'-Deoxy-3' -$^{18}$F- fluorothymidine for quantitative cell proliferation imaging in subcu- taneous tumor models in mice. J Nucl Med 49:2057–2066

23. Fung EK, Carson RE (2013) Cerebral blood flow with [15º] - 133 -áter PET studies using an image-derived input function and MR-defined carotid centerlines. Phys Med Biol 58(6):1903–1923

24. Islam MM, Tsujikawa T, Mori T, Kiyono Y, Okazawa H (2017) Estimation of arterial input by a noninvasive image derived method in brain H2$^{15}$O PET study: confirmation of arterial location using MR angiography. Phys Med Biol 62(11):4514–4524

25. Deidda D, Karakatsanis NA, Robson PM et al (2019) Hybrid PET/MR kernelised expectation maximisation reconstruction for improved image-derived estimation of the input function from the aorta of rabbits. Contrast Media Mol Imaging 2019:3438093

26. Lanz B, Poitry-Yamate C, Gruetter R (2014) Image-derived input function from the vena cava for 18F-FDG PET studies in rats and mice. J Nucl Med 55(8):1380–1388

27. Thackeray JT, Bankstahl JP, Bengel FM (2015) Impact of image- derived input function and fit time intervals on Patlak quantification of myocardial glucose uptake in mice. J Nucl Med 56(10):1615–1621

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

# CAPÍTULO V: EFECTO DEL NIVEL DE GLUCOSA EN SANGRE SOBRE LA CUANTIFICACIÓN DE ESTUDIOS DE PET CEREBRAL DINÁMICOS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

**CAPÍTULO V**

# 1. RESUMEN

Los estudios cuantitativos con [$^{18}$F]-FDG PET se han utilizado ampliamente para evaluar los cambios del metabolismo cerebral de la glucosa en modelos de enfermedad cerebral. Sin embargo, la precisión de los datos de la técnica [$^{18}$F]-FDG PET suele estar limitada por el manejo de los animales en el ámbito preclínico, lo que tiene un efecto significativo en la reproducibilidad de los parámetros cuantitativos y semicuantitativos obtenidos en los estudios. Con esta premisa, en este trabajo se pretende evaluar el efecto del nivel de glucemia en sangre sobre la cuantificación del metabolismo cerebral mediante [$^{18}$F]-FDG PET. Para ello se seleccionaron tres grupos experimentales con diferentes rangos de glucemia: normal, hiperglucemia e hipoglucemia, estos últimos inducidos por glucagón e insulina, respectivamente. Los niveles de glucosa en sangre se midieron con un medidor de glucosa tomando muestras de sangre en cola. Los valores de SUV calculados se utilizaron para modelar la dependencia del metabolismo cerebral a lo largo del rango de nivel de glucosa, utilizándose posteriormente para la normalización global entre grupos. Los resultados mostraron que el uso de todos los protocolos juntos conduce a un amplio rango del nivel de glucosa, extendiéndose el rango basal desde 100mg/dL hasta 200mg/dL dependiendo de las condiciones de ayuno o no ayuno. Por el contrario, los rangos medidos antes de FDG, antes de la PET y después de la PET eran más amplios, como resultado de los diferentes protocolos. En la cuantificación se mostró que el metabolismo cerebral global aumenta claramente entre los animales de glucagón respecto a los animales con glucemia normal y entre estos últimos y los animales de insulina. Con respecto a la modelización del SUV con los niveles de glucemia los resultados muestran que el ajuste fue mejor cuando se utilizó el nivel de glucosa medido antes de la inyección de FDG (MSE=0,28). En el caso de la cuantificación regional, el análisis Post Hoc de ANOVA confirmó que no hay diferencias significativas en el metabolismo de todo el cerebro (valor p=0203), ni en regiones específicas como el cerebro anterior (valor p=0,12), la corteza (valor p=0,286) y el cerebro posterior (valor p=0,496). No obstante, los resultados mostraron que el metabolismo en las regiones del mesencéfalo (valor p=5,7E-5) y del cerebro central (valor p=0,0015) están ligeramente aumentados/disminuidos con respecto a otras regiones del cerebro. Las conclusiones de este trabajo permiten exponer la importancia de la corrección de los datos de PET por el nivel de glucosa en sangre ayudando, de esta manera, en el estudio de patologías que implican la detección de pequeños cambios a nivel cerebral utilizando muestras de animales más reducidas.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Palabras clave: FDG, Cerebro, SUV, Cuantificación, BGL.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

## 2. INTRODUCCIÓN

La PET con [$^{18}$F]-FDG, en animales pequeños, ofrece oportunidades únicas para evaluar la fisiopatología *in vivo* de modelos de enfermedades cerebrales debido a su viabilidad para proporcionar una cuantificación absoluta del metabolismo de la glucosa cerebral a partir de estudios longitudinales dentro de un mismo sujeto [1]. Hasta la fecha, los estudios cuantitativos con [$^{18}$F]-FDG se han utilizado ampliamente para evaluar los cambios del metabolismo cerebral de la glucosa en modelos de enfermedad, como los **tumores cerebrales** [2,3], las **lesiones traumáticas** [4,5], la **isquemia** [6,7], el **Alzheimer** [8-10], el **Parkinson** [11-13] y los estudios de activación visual [14]. El potencial cuantitativo de la PET se basa en la precisión de los estudios de PET generados y en la modelización farmacocinética del trazador. Con respecto a esto último, está bien establecido que la [$^{18}$F]-FDG entra en el tejido a través de los transportadores de glucosa y, luego, puede ser fosforilada por la hexoquinasa a [$^{18}$F]-FDG-6-fosfato y atrapada dentro de las células, o transportada de nuevo a la sangre. El modelo cinético para la [$^{18}$F]-FDG en el cerebro puede considerarse como un **2TCM** con una captación irreversible del trazador en el compartimento tisular del cerebro. El ajuste de los datos de la PET al 2TCM proporciona mediciones cuantitativas de las constantes de velocidad que representan el transporte de afluencia/eflujo a través de la BHE, la tasa de fosforilación y la CMRglu. Además, se han desarrollado métodos semicuantitativos basados en adquisiciones cortas y estáticas para proporcionar parámetros comúnmente utilizados como SUV.

Sin embargo, la precisión de los datos de la [$^{18}$F]-FDG suele estar limitada por el manejo de los animales, lo que tiene un efecto significativo en la reproducibilidad de los parámetros cuantitativos y semicuantitativos obtenidos en los estudios [15]. Esto suele conducir a una mayor variabilidad inter-animal y a una menor estabilidad de los datos de la PET, lo que reduce la capacidad de la PET para detectar pequeños cambios y obliga a utilizar muestras de animales más grandes [16,17]. Se están realizando grandes esfuerzos para diseñar protocolos de adquisición y cuantificación de PET cerebral **reproducibles y estandarizados**, centrados principalmente en la optimización de la vía de administración del trazador [18,19], los protocolos de anestesia [20,21] y las condiciones dietéticas [19,22]. Se ha demostrado que la mayoría de estas cuestiones pueden afectar a los datos de la PET con [$^{18}$F]-FDG al influir directamente en los **niveles de glucosa en sangre** (BGL). Es bien sabido que la glucosa endógena compite con la [$^{18}$F]-FDG inyectada, por ejemplo, reduciendo la captación de [$^{18}$F]-FDG en el cerebro cuando la glucosa endógena es demasiado elevada. En la rutina clínica, se desaconseja escanear a los pacientes en estado hiperglucémico y se recomienda reprogramar la exploración o utilizar inyecciones de insulina de acción rápida [23]. Sin embargo, en la investigación preclínica, la exploración de roedores normoglucémicos puede ser un reto en muchos casos, porque hay múltiples factores que pueden afectar significativamente a la glucemia, como la anestesia o el estrés, que son difícilmente estandarizables. Por ello, se recomienda proporcionar los datos de la PET corregidos por la BGL cuando la glucemia está por **encima o por debajo del rango normal** [24]. Por otro lado, algunos modelos animales pueden presentar intrínsecamente una BGL muy alta, como los roedores diabéticos y

también una BGL muy baja [25]. En este sentido, no existen recomendaciones específicas para la exploración de roedores que presenten una BGL extrema, muy por encima de los rangos normales.

Hemos realizado estudios de [$^{18}$F]-FDG PET en ratas que presentaban un rango amplio de valores de BGL, desde diferentes valores normales, hasta BGL extremas inducidas por glucagón e insulina. Se obtuvo una relación entre los valores de BGL y la captación de [$^{18}$F]-FDG cerebral, y, posteriormente, se utilizó dicha relación para proporcionar medidas de glucosa cerebral corregidas por BGL cerebral.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### Preparación de los animales y grupos experimentales

Las ratas Sprague-Dawley macho adultas, con un peso de 357 ±56 g, se alojaron individualmente en condiciones estándar en una sala con temperatura controlada con un ciclo invertido de luz y oscuridad de 12 horas.

Se definieron tres grupos experimentales y protocolos:

a) **Grupo control** (n=16): los animales fueron seleccionados aleatoriamente para ser considerados en condiciones de normoglucemia mediante la inyección subcutánea de una solución de NaCl siguiendo diferentes protocolos: condiciones de no ayuno (n=8) y duraciones de ayuno de 12-24h (n=6) y 48h (n=2). Todas las inyecciones se realizaron bajo anestesia con isoflurano (3% para la inducción y 2% para el mantenimiento) y 24 ±6 minutos antes de la inyección de [$^{18}$F]-FDG.

b) **Grupo de insulina** (n=10): Los animales fueron seleccionados aleatoriamente para reducir los niveles de glucemia mediante la inyección subcutánea de diferentes dosis de insulina (Actrapid, Novo Nordisk) en condiciones de ayuno: 1UI/kg (n=6), 2 UI/kg (n=2) y 6UI/kg (n=2). Todas las inyecciones se realizaron bajo anestesia con isoflurano (3% para la inducción y 2% para el mantenimiento) y 115 ±12 minutos antes de la inyección de [$^{18}$F]-FDG.

c) **Grupo de glucagón** (n=14): los animales fueron seleccionados aleatoriamente para aumentar los niveles de glucemia mediante la inyección subcutánea de diferentes dosis de glucagón (GlucaGen Hypokit 1 mg, Novo Nordisk) en condiciones de no ayuno: 1mg/kg (n=8) y 2 mg/kg (n=6). Todas las inyecciones se realizaron bajo anestesia con isoflurano (3% para la inducción y 2% para el mantenimiento) y 22 ±5 antes de la inyección de [$^{18}$F]-FDG.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

**Mediciones de los niveles de glucosa en sangre (BGL)**

Los niveles de glucosa en sangre se midieron con el medidor de glucosa en sangre Accu-Chek® Aviva (Roche) tomando una pequeña muestra de sangre en la cola de la vena antes de las inyecciones de glucagón, insulina y solución de NaCl ("Baseline"), antes de la inyección de [$^{18}$F]-FDG, antes del escaneo PET y después del escaneo PET.

**Adquisición y reconstrucción de la PET**

Se realizaron inyecciones intravenosas de [$^{18}$F]-FDG (332 ±32μCi) 45 ±1 minutos antes de la adquisición de la PET. Los datos de PET se adquirieron utilizando el sistema Albira PET/CT Preclinical Imaging (Bruker Biospin, Woodbridge, Connecticut, Estados Unidos). Como se ha comentado, el subsistema PET consta de tres anillos de ocho módulos compactos basados en **cristales monolíticos acoplados a tubos fotomultiplicadores multianódicos** (MAPMT), formando un octógono con una FOV axial de 14,8cm. Durante la adquisición, se controló la frecuencia respiratoria para evitar una depresión respiratoria grave. Los datos adquiridos se reconstruyeron utilizando el algoritmo de **Maximum-Likelihood Expectation-Maximization Algorithm** (MLEM), 12 iteraciones y un tamaño de píxel de imagen de 0,4 x 0,4 x 0,4mm$^3$. Finalmente se generaron imágenes PET con una resolución espacial de 1,2mm, teniendo en cuenta la relación entre la concentración de radiactividad [kBq/mL], la dosis de FDG inyectada y el peso del animal.

**Cuantificación global de FDG PET cerebral**

Las imágenes de FDG PET se enmascararon para obtener sólo el cerebro y luego se co-registraron a un FDG estándar utilizando PMOD (PMOD Technologies, Suiza) y el atlas de cerebro de rata W. Schiffer. Este atlas se utilizó primero para calcular la captación de FDG en todo el cerebro en términos de SUV.

**Relación entre SUV cerebral global y BGL**

Los valores de SUV cerebral global calculados se representaron gráficamente respecto a los valores de BGL. Esta dependencia se modelizó a través de ajustes a diferentes funciones (lineal, polinómico, exponencial…) y se utilizó posteriormente para la **normalización global entre grupos**, refiriendo todas las imágenes al BGL del grupo de normoglucemia en ayunas (BGL=100). El modelo fue validado en una muestra separada de imágenes FDG PET dinámicas obtenidas previamente de 15 ratas en ayunas y sin ayuno [26]. El modelo se aplicó para estimar los valores SUV cerebral global corregidos por la BGL, pero también la Tasa Metabólica de Glucosa (MRglu) corregida por la BGL, derivada del método de Patlak Plot, que se ha desarrollado para trazadores

con atrapamiento irreversible en un modelo de 2 compartimentos de tejido, como es el caso de la FDG [27].

### Cuantificación regional de FDG PET cerebral

Una vez normalizadas las imágenes PET se realizó un análisis regional para cada VOI cerebral predefinido de la plantilla de cerebro de rata de W. Schiffer.

### Análisis estadístico

Las diferencias entre grupos y protocolos se evaluaron mediante una prueba ANOVA de una vía, seguida del error "Family-wise" (FWE) y comparaciones múltiples post-hoc.

## 4. RESULTADOS

### Rango de BGL durante el procedimiento

La Figura 5.1 representa la BGL durante el procedimiento de PET para cada grupo (control, insulina y glucagón) bajo los diferentes protocolos. Los animales del grupo control en condiciones de no ayuno mostraron una BGL basal más alta y variable, cercana a los 200mg/dL, y un aumento significativo después de la PET. Los animales del grupo control en condiciones de ayuno (12-24h y 48h) mostraron valores basales de BGL en torno a 100mg/dL que se mantuvieron estables durante el experimento PET. En los animales del grupo de insulina se obtuvieron **valores basales de BGL similares**, ya que los animales fueron estudiados en condiciones de ayuno, como se indica en la ficha técnica de la insulina. En estos casos, la BGL posterior disminuyó por debajo de los 100mg/dL, tal y como se esperaba tras la administración de insulina, mostrando una relación significativa entre la disminución de la BGL y la dosis de insulina. Por último, los animales del grupo de glucagón mostraron un **aumento significativo de la BGL** tras la administración de glucagón, también influenciado por la dosis y un posterior aumento sostenido durante el experimento PET hasta la BGL alrededor de 400mg/dL. Todos los protocolos juntos conducen a un amplio rango de BGL. Así, el rango de BGL basal se extendió desde 100mg/dL hasta 200mg/dL dependiendo de las condiciones de ayuno o no ayuno. En cambio, los rangos de BGL medidos antes de la FDG, antes de la PET y después de la PET eran más amplios, como resultado de los diferentes protocolos. El número de animales histogramados a lo largo de estos rangos se puede encontrar en el Figura 5.2. Todo esto demuestra que el rango obtenido de valores de BGL es adecuado para acometer los objetivos de este trabajo.

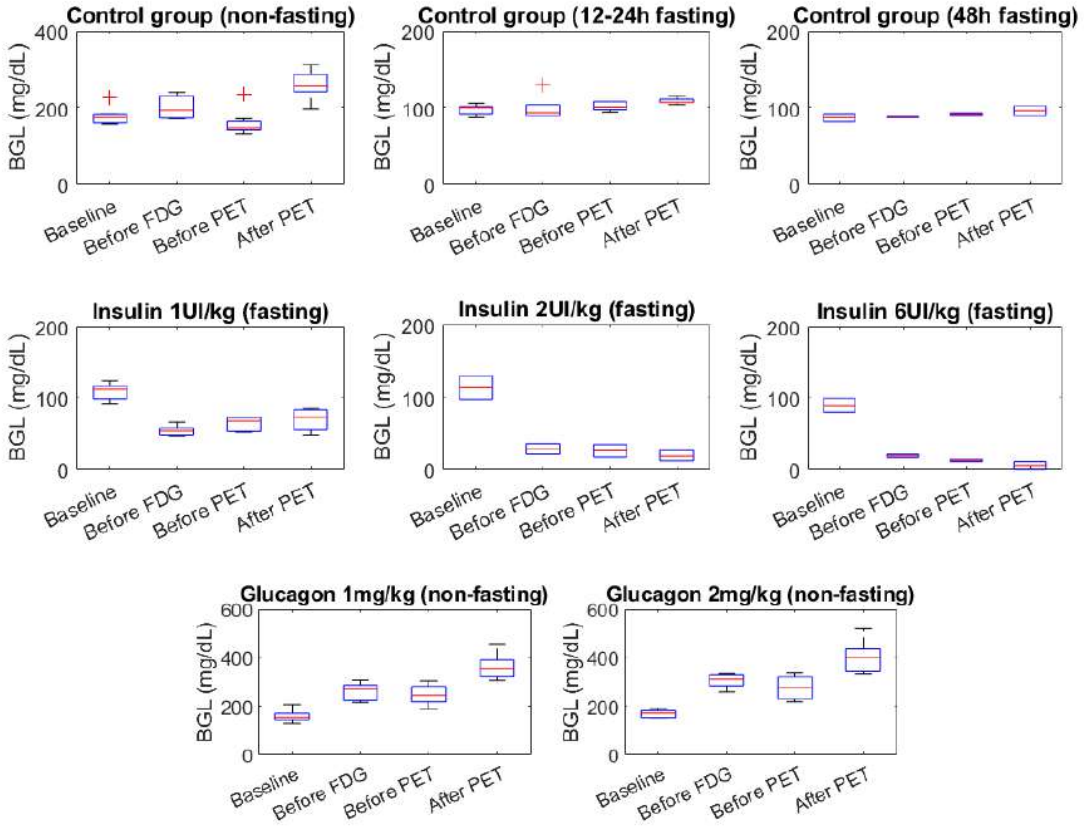



Figura 5.1. BGL (mg/dL) a lo largo del procedimiento PET ("Baseline", antes de la inyección de FDG, antes de la exploración PET y después de la exploración PET) para los grupos control (fila superior), insulina (fila central) y glucagón (fila inferior).

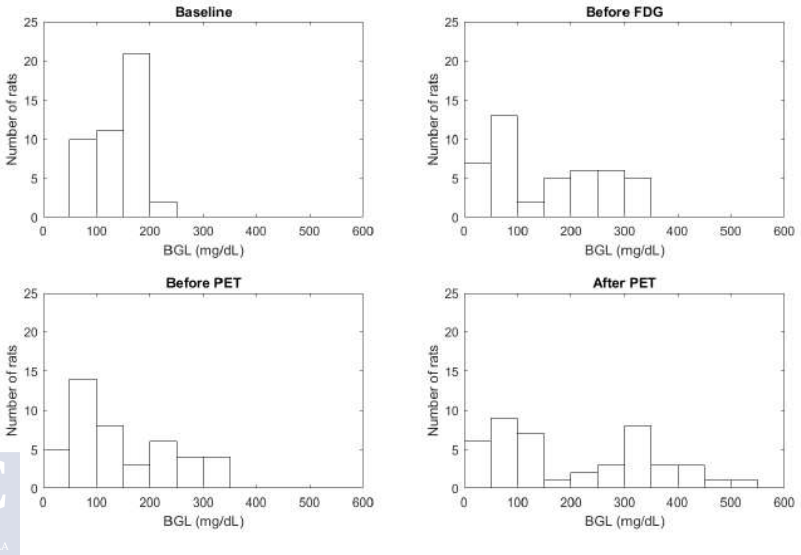



Figura 5.2. Se puede observar que el rango de BGL basal se extendía desde 100mg/dL hasta 200mg/dL dependiendo de las condiciones de ayuno o no ayuno. En cambio, el histograma antes de la FDG, antes de la PET y después de la PET mostró un rango más amplio de BGL como resultado de los diferentes protocolos.

### Cuantificación global de FDG PET cerebral

La Figura 5.3 muestra la captación de FDG cerebral en términos de SUV a lo largo de los diferentes grupos y protocolos (fila superior). Esta figura también ilustra ejemplos de las imágenes PET FDG cerebrales co-registradas al "standard template" obtenidas para diferentes animales (de izquierda a derecha, control sin ayuno, control en ayunas 12-24h, control en ayunas 48h, grupos de 1UI/kg de insulina, 2-6 UI/kg de insulina, 1mg/kg de glucagón y 2mg/kg de glucagón). Los resultados muestran que el metabolismo cerebral global **aumenta claramente entre los animales de glucagón y los de control y entre los de control y los de insulina**. Además, en los animales sin ayuno de glucagón y control se observan claramente las glándulas Harderianas, que generan recuentos de "Spill-out" hacia el cerebro. En cambio, el metabolismo de estas glándulas disminuyó cuando se aplicó el ayuno y de forma más drástica cuando se administró insulina. La comparación estadística entre grupos y protocolos proporcionó diferencias significativas en el metabolismo de todo el cerebro entre grupos (control, glucagón e insulina) y protocolos (ANOVA de una vía p-valor =6E-32), excepto para el grupo de glucagón, que no mostró diferencias significativas entre las dosis probadas.

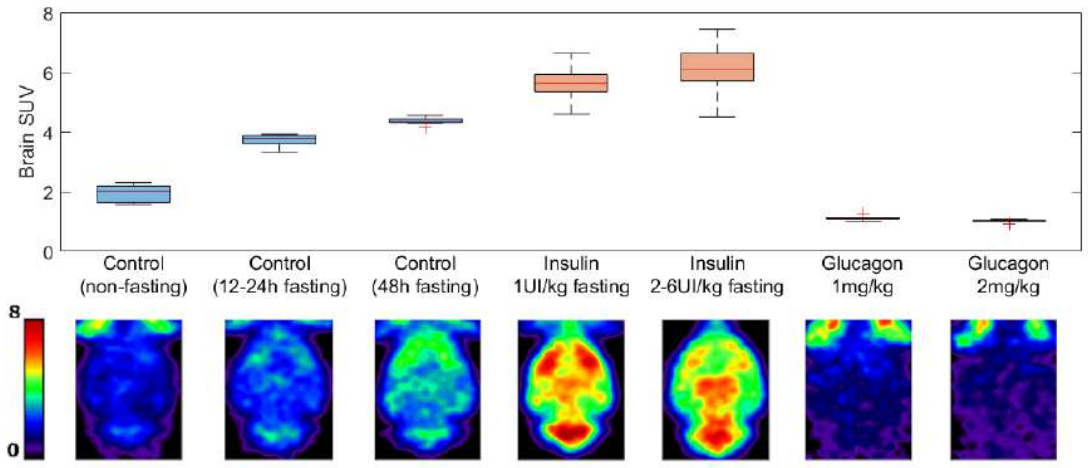



Figura 5.3. Captación de FDG en el cerebro en términos de SUV a lo largo de los grupos y protocolos (fila superior). Ejemplos de imágenes PET coronales de los diferentes grupos y protocolos: control sin ayuno, control 12-24h ayuno, control 48h ayuno, insulina 1UI/kg, insulina 2-6UI/kg, glucagón 1mg/kg y glucagón 2mg/kg (fila inferior).

### Modelización del SUV de todo el cerebro a lo largo del rango de BGL

La Figura 5.4 muestra la variación del SUV de todo el cerebro a lo largo del rango de BGL probado. Se puede observar que es posible modelar con precisión utilizando **ajustes exponenciales**, proporcionando un mejor ajuste a los datos que el enfoque lineal. Los resultados muestran que el ajuste fue mejor cuando se utilizó el BGL medido antes de la inyección de FDG (MSE=0,28). Este modelo exponencial (a=7,588 y b=0,0069) se

empleó para estimar los factores de escala necesarios para la normalización global entre grupos y protocolos con el fin de referir todas las imágenes a la BGL media del grupo de normoglucemia en ayunas de 24h (BGL=100). Los factores de escala oscilaron entre 0,5 para la BGL mínima y 5 para la BGL máxima. Tras el escalado, los valores de SUV cerebral se mantuvieron estables a lo largo de todo el rango de valores de BGL, mostrando un SUV medio=3,80 ±0,65, en lugar de un SUV medio= 2,99 ±2,01.

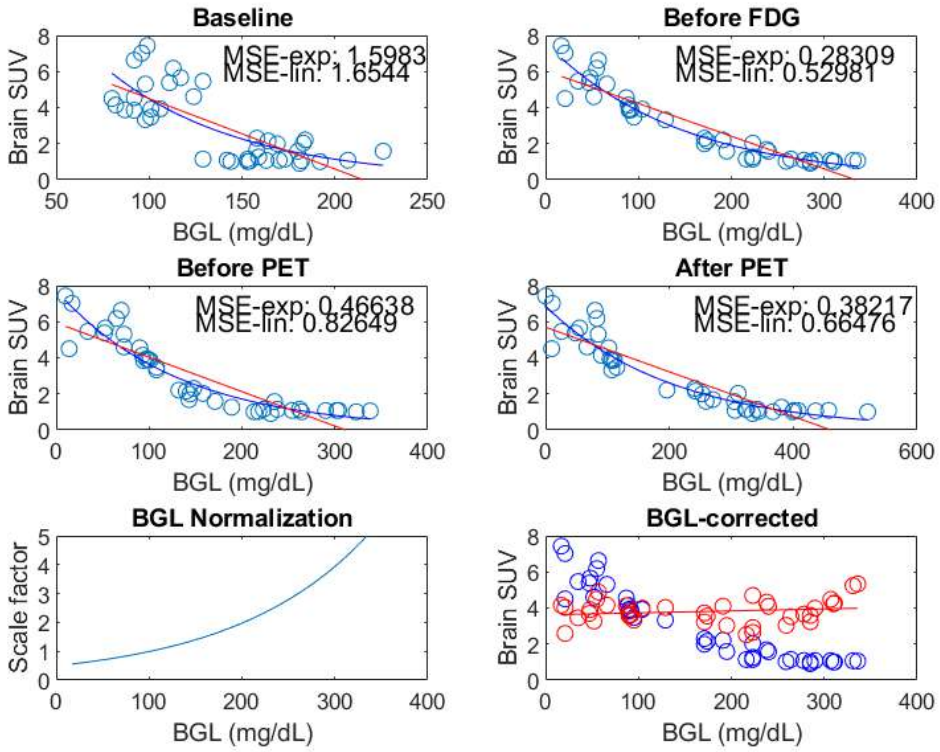



Figura 5.4. Captación de FDG en el cerebro en término de SUV en todo el cerebro a lo largo del rango de BGL medido al inicio, antes de la FDG, antes de la PET y después de la PET, y los correspondientes ajustes polinómicos y lineales (primera y segunda fila). Factores de escala obtenidos del ajuste polinómico a los datos de BGL medidos antes de la PET; y valores de SUV corregidos por BGL referidos a BGL=100mg/dL (fila inferior).

### Normalización global y cuantificación regional de la FDG PET cerebral

La Figura 5.5 representa el metabolismo regional en términos de SUV para las diferentes regiones del cerebro y para el cerebro global después de la normalización global mencionada. Como se esperaba, la prueba Post-Hoc de ANOVA confirmó que no hay diferencias significativas en el metabolismo en el cerebro global, confirmando que la normalización global basada en el modelo anterior funciona correctamente.

Respecto al análisis regional, **no se muestran diferencias en el cerebro anterior** (valor p=0,12), la corteza (valor p=0,286) **ni en el cerebro posterior** (valor p=0,496). No obstante, los resultados mostraron que el metabolismo en las regiones del mesencéfalo (valor p=5,7E-5) y del cerebro central (valor p=0,0015) está ligeramente

aumentado/disminuido con respecto a otras regiones del cerebro a lo largo del rango de BGL. Por ejemplo, el metabolismo aumenta preferentemente en las regiones del mesencéfalo y del cerebro central cuando los BGL disminuyen, lo que da lugar a diferencias en el patrón del metabolismo cerebral cuando se consideran estos BGL extremos (Figura 5.2).

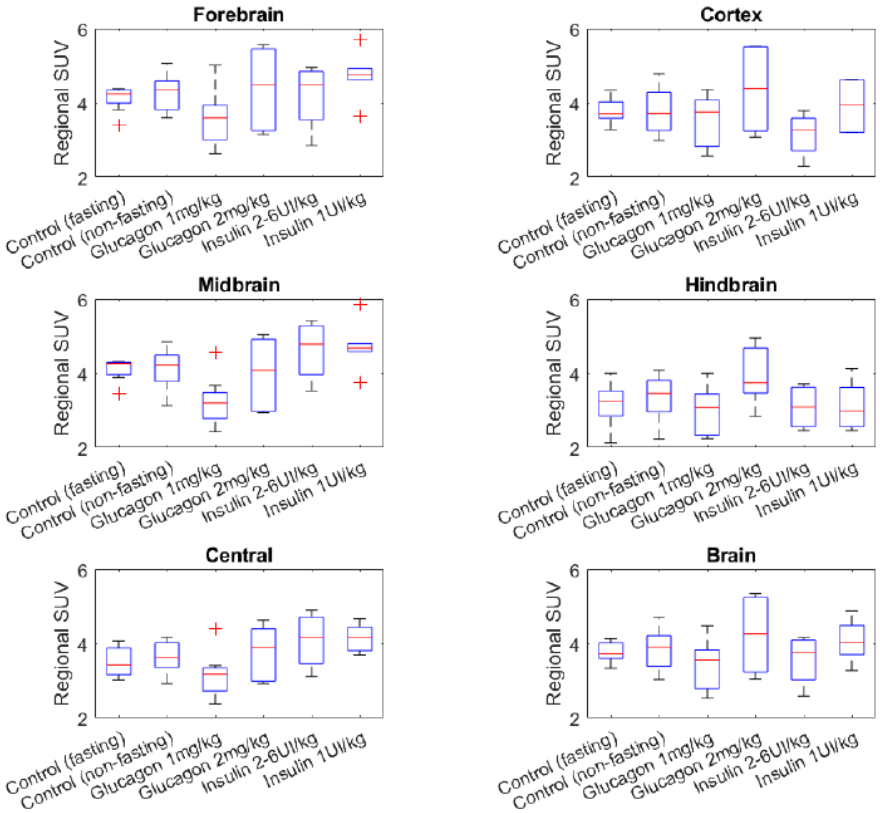



Figura 5.5. Captación regional de FDG en el cerebro en términos de SUV regional (cerebro anterior, corteza, cerebro medio, cerebro posterior, regiones del cerebro central) a lo largo de los diferentes grupos (control, glucagón e insulina) y protocolos (después de referir todas las imágenes al BGL medio en el grupo de normoglucemia en ayunas).

## 5. DISCUSIÓN

Es bien conocido que los niveles de glucosa en sangre afectan a la captación de [$^{18}$F]-FDG en los órganos, entre los que destaca el cerebro. Tanto los estudios de PET en humanos como en roedores que evalúan la captación de [$^{18}$F]-FDG [28] demuestran que la hiperglucemia disminuye la captación de [$^{18}$F]-FDG como resultado de la competencia entre esta y la glucosa endógena para su transporte al interior de las células. Para minimizar la variabilidad inducida por el nivel de glucosa en los resultados de los estudios

estáticos de PET con [$^{18}$F]-FDG, se ha utilizado el **ayuno, junto con algunos fármacos para reducir o aumentar la glucemia** [29]. En el entorno clínico, los pacientes deben ayunar de 4 a 6 horas antes de la correspondiente prueba pero, en los roedores, el ayuno ronda las 6 horas, siendo necesario ampliar esta extensión de tiempo para eliminar el contenido gástrico por completo. Basándonos en estas consideraciones, llevamos a cabo una investigación basada en el ayuno para investigar el efecto que tienen los diversos niveles de glucosa en diferentes situaciones para su posterior captación cerebral de [$^{18}$F]-FDG en ratas.

Es conocido que el SUV cambia con el nivel de glucosa, denominado SUVglc, utilizado ampliamente en el ámbito clínico [30,31]. Cabe señalar que es necesario hacer mención a que el SUV normalizado a la dosis inyectada y al peso del individuo es un índice semicuantitativo de la tasa de captación neta de [$^{18}$F]-FDG y no es una medida cuantitativa de la BGL. Estudios dinámicos como el de Wong y colaboradores [32] determinaron que la BGL cerebral medida no se correlacionaba directamente con el nivel de glucosa en sangre al igual que tampoco con la condición dietética, a diferencia que la tasa de captación de [$^{18}$F]-FDG, la cual si variaba inversamente con los niveles de glucosa en sangre. En este contexto, afectaciones cerebrales como la demencia o los estadios iniciales de neoplasias pueden verse afectados durante los diagnósticos por las variaciones asociadas a los niveles de glucosa en sangre. La actividad metabólica cerebral de la glucosa es un índice de la función y la densidad sináptica [33,34]. La capacidad de medir el metabolismo regional de la glucosa mediante [$^{18}$F]-FDG-PET ha ofrecido una **visión profunda de las fases preclínicas de diversas patologías** y ha demostrado un gran potencial como complemento diagnóstico de los pacientes con déficits cognitivos, ya sean derivados por la demencia [35] o por neoplasias como los glioblastomas [15]. Además, al reconocer patrones específicos del metabolismo cerebral de la glucosa, se pueden diferenciar patologías como el Alzheimer de otras enfermedades neurodegenerativas y subtipos de demencia [36]. En concreto, en la demencia, la pérdida de actividad neuronal efectiva se refleja en el hipometabolismo cortical de la glucosa siendo la información de la CMRgl proporcionada por la [$^{18}$F]-FDG-PET, la cual se considera un biomarcador de imagen con una buena sensibilidad en el diagnóstico de la demencia temprana [37,38]. Sin embargo, la interpretación del metabolismo aberrante sigue siendo confusa. El hecho de que las ratas con demencia como el Alzheimer muestren un hipometabolismo cerebral de la glucosa se debe posiblemente a las **deficiencias en la señalización de la insulina**, principalmente [9]. Los cambios patológicos, en estas vías de señalización, afectan a la supervivencia neuronal, a la homeostasis energética, a la expresión génica y a los procesos de memoria [39,40].

Con respecto a otras patologías, la enfermedad de Parkinson [12,13] con hipometabolismo en áreas como la corteza motora, la SN y el núcleo tegmental pedunculopontino conducen al déficit conductual, en el que estudios como el de Casteels y colaboradores [41] informan que, en modelos de rata con lesión por 6-OHDA, se han podido observar niveles reducidos de metabolismo de la glucosa en la región motora, sensorial y SN ipsilateral a la lesión en comparación con los del hemisferio contralateral. En contraposición a esas afectaciones, en las neoplasias cerebrales la captación de [$^{18}$F]-

FDG del tumor y el contraste de la imagen son menores en el estado de no ayuno (niveles altos de insulina y glucosa) que en el estado de ayuno (niveles bajos de insulina y glucosa) [15]. Además, la insulina aumenta notablemente la captación de [$^{18}$F]-FDG por parte de los **músculos esqueléticos y el miocardio**, aunque en general no tiene ningún efecto sobre la captación de [$^{18}$F]-FDG de las células cancerosas [28].

Finalmente, la biodistribución de la [$^{18}$F]-FDG con respecto a la anestesia ha sido detallado por Lee y colaboradores [42] con ketamina/xilazina y pentobarbital. En este trabajo nos centramos, entre otras cuestiones, en las observaciones con isoflurano. Es conocido que la xilacina y el isoflurano suprimen la secreción de la insulina [42,43], sin embargo, los efectos de la xilacina parecen ser más intensos debido a que esta genera una gran hiperglucemia (>300mg/dL), incluso cuando roedores se encuentran en ayunas durante al menos 8 horas. Al mismo tiempo, algunos estudios demuestran que protocolizar un ayuno de 20 horas antes de la inyección de [$^{18}$F]-FDG atenúa la hiperglucemia que induce la xilacina [15,42]. La problemática radica en que el ayuno prolongado conduce a la pérdida de peso y, por lo tanto, puede repercutir en el seguimiento del tratamiento. En nuestro caso confirmamos que la anestesia con isoflurano sólo provoca un **modesto aumento de los niveles de glucosa en sangre** en los animales en ayunas y sin ayunas, lo que sugiere que su efecto sobre la secreción de insulina es relativamente menor.

Teniendo de referencia los estudiado, se han analizado un amplio rango de BGL desde la normoglucemia, la hiperglucemia y la hipoglucemia en ratas, estas dos últimas inducidas a través de la administración del glucagón y la insulina para la obtención de los límites de glucemia permitidos. Con este planteamiento, se propuso la finalidad de utilizar dichos datos para la proporción de información de PET corregidos por BGL cerebral. Los descubrimientos presentados en este trabajo representan un aporte para demostrar que la metodología del estudio cerebral en roedores debe tener unas recomendaciones específicas para la exploración de los sujetos que presenten una BGL extrema, muy superior a los rangos normales, como podría ser el caso de roedores diabéticos. Todo esto se demuestra centrándose en que el trabajo se enfoca para impulsar las ventajas mencionadas acerca de la estandarización preclínica de los niveles de glucosa cerebral [24-27]. Los resultados demuestran que el metabolismo cerebral global sufre un **aumento** entre los roedores a los que se les ha administrado glucagón y los de control, al igual que se puede constatar que el metabolismo, en regiones como el mesencéfalo (p=5,7E-5) y el cerebro central (p=0,0015), se encuentra aumentado o reducido si se tienen de referencia otras regiones del cerebro en los distintos rangos de BGL [18,21,23]. Además, la variación del SUV cerebral se puede modelar con precisión a partir de ajustes exponenciales, promocionando una **mejor adaptación** que el enfoque lineal.

## 6. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha realizado una caracterización completa de la influencia de los niveles de glucosa en sangre sobre la cuantificación del metabolismo cerebral mediante PET con FDG. La modelización de esta caracterización permite la implementación de un nuevo método para estimar con precisión el metabolismo cerebral a lo largo de un rango amplio de niveles de glucemia, desde animales con niveles de glucosa elevado, como roedores diabéticos, o en estudios que impidan el uso del ayuno por su metodología, hasta modelos animales con niveles de glucosa extremadamente bajos.

## 7. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue, parcialmente, apoyado por los proyectos ED431F 2017/04 (Xunta de Galicia), EAPA_791/2018 (Interreg UE) y RYC-2015/17430 (Ramón y Cajal, Pablo Aguiar).

## 8. CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

## 9. CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

DRB realizó las pruebas y redactó el manuscrito; LGV preparó las figuras y contribuyó al análisis de los datos; NGL y AM verificaron los métodos analíticos y elaboraron casi todos los detalles técnicos; MPF, AFF y JSR ayudaron a analizar los resultados; AR ayudó a diseñar e instruir el experimento; PA concibió el estudio y revisó el manuscrito. Todos los autores discutieron los resultados y comentaron el manuscrito.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# 10. REFERENCIAS

1. Toyama H, Ichise M, Liow J-S, Modell KJ, Vines DC, Esaki T, et al. Absolute quantification of regional cerebral glucose utilization in mice by 18F-FDG small animal PET scanning and 2-14C-DG autoradiography. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med. 2004 Aug;45(8):1398–405.

2. Assadian S, Aliaga A, Del Maestro RF, Evans AC, Bedell BJ. FDG-PET imaging for the evaluation of antiglioma agents in a rat model. Neuro-Oncol. 2008 Jun;10(3):292–9.

3. Fu Y, Ong L-C, Ranganath SH, Zheng L, Kee I, Zhan W, et al. A Dual Tracer 18F-FCH/18F-FDG PET Imaging of an Orthotopic Brain Tumor Xenograft Model. PloS One. 2016;11(2):e0148123.

4. Vállez García D, Otte A, Dierckx RAJO, Doorduin J. Three Month Follow-Up of Rat Mild Traumatic Brain Injury: A Combined [18F]FDG and [11C]PK11195 Positron Emission Study. J Neurotrauma. 2016 15;33(20):1855–65.

5. Brabazon F, Wilson CM, Shukla DK, Mathur S, Jaiswal S, Bermudez S, et al. [18F]FDG-PET Combined with MRI Elucidates the Pathophysiology of Traumatic Brain Injury in Rats. J Neurotrauma. 2017 01;34(5):1074–85.

6. Fu Y-K, Chang C-J, Chen K-Y, Hwang L-C, Wu K-H, Chang K-W, et al. Imaging of regional metabolic activity by (18)F-FDG/PET in rats with transient cerebral ischemia. Appl Radiat Isot Data Instrum Methods Use Agric Ind Med. 2009 Oct;67(10):1743–7.

7. Yuan H, Frank JE, Hong Y, An H, Eldeniz C, Nie J, et al. Spatiotemporal uptake characteristics of [18]F-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose in a rat middle cerebral artery occlusion model. Stroke. 2013 Aug;44(8):2292–9.

8. Macdonald IR, DeBay DR, Reid GA, O'Leary TP, Jollymore CT, Mawko G, et al. Early detection of cerebral glucose uptake changes in the 5XFAD mouse. Curr Alzheimer Res. 2014;11(5):450–60.

9. Lu Y, Ren J, Cui S, Chen J, Huang Y, Tang C, et al. Cerebral Glucose Metabolism Assessment in Rat Models of Alzheimer's Disease: An 18F-FDG-PET Study. Am J Alzheimers Dis Other Demen. 2016;31(4):333–40.

10. Waldron A-M, Wyffels L, Verhaeghe J, Richardson JC, Schmidt M, Stroobants S, et al. Longitudinal Characterization of [18F]-FDG and [18F]-AV45 Uptake in the Double Transgenic TASTPM Mouse Model. J Alzheimers Dis JAD. 2017;55(4):1537–48.

11. Casteels C, Lauwers E, Bormans G, Baekelandt V, Van Laere K. Metabolic-dopaminergic mapping of the 6-hydroxydopamine rat model for Parkinson's disease. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2008 Jan;35(1):124–34.

12. Jang DP, Min H-K, Lee S-Y, Kim IY, Park HW, Im YH, et al. Functional neuroimaging of the 6-OHDA lesion rat model of Parkinson's disease. Neurosci Lett. 2012 Apr 4;513(2):187–92.

13. Lerner RP, Bimpisidis Z, Agorastos S, Scherrer S, Dewey SL, Cenci MA, et al. Dissociation of metabolic and hemodynamic levodopa responses in the 6-hydroxydopamine rat model. Neurobiol Dis. 2016 Dec;96:31–7.

14. Soto-Montenegro ML, Vaquero JJ, Pascau J, Gispert JD, García-Barreno P, Desco M. Detection of visual activation in the rat brain using 2-deoxy-2-[(18)F]fluoro-D: -glucose and statistical parametric mapping (SPM). Mol Imaging Biol. 2009 Apr;11(2):94–9.

15. Fueger BJ, Czernin J, Hildebrandt I, Tran C, Halpern BS, Stout D, et al. Impact of animal handling on the results of 18F-FDG PET studies in mice. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med. 2006 Jun;47(6):999–1006.

16. Sijbesma JWA, van Waarde A, Vállez García D, Boersma HH, Slart RHJA, Dierckx RAJO, et al. Test-Retest Stability of Cerebral 2-Deoxy-2-[18F]Fluoro-D-Glucose ([18F]FDG) Positron Emission Tomography (PET) in Male and Female Rats. Mol Imaging Biol. 2019;21(2):240–8.

17. Bascuñana P, Thackeray JT, Bankstahl M, Bengel FM, Bankstahl JP. Anesthesia and Preconditioning Induced Changes in Mouse Brain [18F] FDG Uptake and Kinetics. Mol Imaging Biol. 2019;21(6):1089–96.

18. Schiffer WK, Mirrione MM, Dewey SL. Optimizing experimental protocols for quantitative behavioral imaging with 18F-FDG in rodents. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med. 2007 Feb;48(2):277–87.

19. Wong K-P, Sha W, Zhang X, Huang S-C. Effects of administration route, dietary condition, and blood glucose level on kinetics and uptake of 18F-FDG in mice. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med. 2011 May;52(5):800–7.

20. Toyama H, Ichise M, Liow J-S, Vines DC, Seneca NM, Modell KJ, et al. Evaluation of anesthesia effects on [18F]FDG uptake in mouse brain and heart using small animal PET. Nucl Med Biol. 2004 Feb;31(2):251–6.

21. Shimoji K, Ravasi L, Schmidt K, Soto-Montenegro ML, Esaki T, Seidel J, et al. Measurement of cerebral glucose metabolic rates in the anesthetized rat by dynamic scanning with 18F-FDG, the ATLAS small animal PET scanner, and arterial blood sampling. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med. 2004 Apr;45(4):665–72.

22. Kreissl MC, Stout DB, Wong K-P, Wu H-M, Caglayan E, Ladno W, et al. Influence of dietary state and insulin on myocardial, skeletal muscle and brain [F]-fluorodeoxyglucose kinetics in mice. EJNMMI Res. 2011 Jul 6;1:8.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

23. Eskian M, Alavi A, Khorasanizadeh M, Viglianti BL, Jacobsson H, Barwick TD, et al. Effect of blood glucose level on standardized uptake value (SUV) in 18F- FDG PET-scan: a systematic review and meta-analysis of 20,807 individual SUV measurements. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2019;46(1):224–37.

24. Deleye S, Verhaeghe J, wyffels L, Dedeurwaerdere S, Stroobants S, Staelens S. Towards a reproducible protocol for repetitive and semi-quantitative rat brain imaging with (18) F-FDG: exemplified in a memantine pharmacological challenge. NeuroImage. 2014 Aug 1;96:276–87.

25. Alf MF, Duarte JMN, Schibli R, Gruetter R, Krämer SD. Brain glucose transport and phosphorylation under acute insulin-induced hypoglycemia in mice: an 18F-FDG PET study. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med. 2013 Dec;54(12):2153–60.

26. Rey-Bretal D, Moscoso A, Gómez-Lado N, Fernández-Ferreiro A, Silva-Rodríguez J, Ruibal Á, et al. Feasibility of Longitudinal Brain PET with Real-Time Arterial Input Function in Rats. Mol Imaging Biol. 2020 Nov 17;

27. Patlak CS, Blasberg RG, Fenstermacher JD. Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data. J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab. 1983 Mar;3(1):1–7.

28. Wahl RL, Henry CA, Ethier SP. Serum glucose: effects on tumor and normal tissue accumulation of 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose in rodents with mammary carcinoma. Radiology. 1992;183(3):643-7.

29. Hildebrandt IJ, Su H, Weber WA. Anesthesia and other considerations for in vivo imaging of small animals. ILAR J. 2008;49(1):17-26.

30. Herholz K. The role of PET quantification in neurological imaging: FDG and amyloid imaging in dementia. Clin Transl Imaging. 2014;321–330.

31. Thientunyakit T, Sethanandha C, Muangpaisan W, Chawalparit O, Arunrungvichian K, Siriprapa T et al. Relationships between amyloid levels, glucose metabolism, morphologic changes in the brain and clinical status of patients with Alzheimer's disease. Ann Nucl Med. 2020;337–348.

32. Wong KP, Sha W, Zhang X, Huang SC. Effects of administration route, dietary condition, and blood glucose level on kinetics and uptake of 18F-FDG in mice. J Nucl Med. 2011;52(5):800-7.

33. Sokoloff L. Relation between physiological function and energy metabolism in the central nervous system. J Neurochem. 1977;29:13–26.

34. Liu X, Erikson C, Brun A. Cortical synaptic changes and gliosis in normal aging, Alzheimer's disease and frontal lobe degeneration. Dementia. 1996;7:128–134.

35. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 2011;7:280–292.

36. Cerami C, Della Rosa PA, Magnani G. Brain metabolic maps in mild cognitive impairment predict heterogeneity of progression to dementia. Neuroimage Clin. 2014;7:187–94.

37. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 2011;7(3):263–269.

38. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement.2011;7(3):280–292.

39. Sato N, Morishita R. Roles of vascular and metabolic components in cognitive dysfunction of Alzheimer disease: short- and long-term modification by non-genetic risk factors. Front Aging Neurosci. 2013;5:64.

40. van Exel E, Eikelenboom P, Comijs H. Insulin-like growth factor-1 and risk of late-onset Alzheimer's disease: findings from a family study. Neurobiol Aging. 2014;35(3):725.

41. Casteels C, Lauwers E, Bormans G, Baekelandt V, Van Laere K. Metabolic-dopaminergic mapping of the 6-hydroxydopamine rat model for Parkinson's disease. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2008;35(1):124-34.

42. Lee KH, Ko BH, Paik JY, et al. Effects of anesthetic agents and fasting duration on $^{18}$F-FDG biodistribution and insulin levels in tumor-bearing mice. J Nucl Med. 2005*;*46*:*1531*–1536.*

43. Pomplun D, Mohlig M, Spranger J, Pfeiffer AF, Ristow M. Elevation of blood glucose following anaesthetic treatment in C57BL/6 mice*.* Horm Metab Res. 2004*;*36*:*67–69.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

# CAPÍTULO VI: CUANTIFICACIÓN DE ESTUDIOS DE PET CEREBRAL DINÁMICO EN MODELOS DE TUMORES CEREBRALES

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

**CAPITULO VI**

# 1. RESUMEN

Bevacizumab y Aflibercept son terapias basadas en mAbs utilizadas en la rutina clínica oncológica, ya que se unen al VEGF, que está relacionado con los procesos de angiogénesis implicados en la proliferación de los tumores cerebrales. Aunque estas terapias basadas en el VEGF han demostrado ser ventajosas para los pacientes con glioblastoma, su distribución sistémica y farmacocinética ha sido poco estudiada. En este caso, se indujeron modelos de glioblastoma en doce ratas macho Sprague-Dawley mediante la inyección de 10.000 y 100.000 células F98 en la región frontal del cerebro. A continuación, se inyectó a los animales $^{89}$Zr-Bevacizumab (n=6) o $^{89}$Zr-Aflibercept (n=6) y se realizaron múltiples exploraciones PET de seguimiento a los 7, 11, 14, 18 y 21 días tras la inducción del tumor. El objetivo del trabajo fue cuantificar la captación dinámica de ambos anticuerpos en el tumor y en el resto de órganos a través de la cuantificación de imágenes PET utilizando VOIs predefinidas del atlas de cerebro de rata de W. Schiffer y una VOI específica que englobaba el tumor. La captación del trazador en el interior del tumor se obtuvo como una relación tumor-cerebro obtenida mediante el SUV(tumor)/SUV(cerebelo), y la captación en otros órganos se analizó como valores de SUV. La tasa de eliminación de los trazadores se calculó dividiendo la concentración total de radiactividad de una VOI y un volumen de cuerpo entero por la dosis inyectada. Los resultados mostraron que $^{89}$Zr-Bevacizumab presentaba una relación tumor-cerebro de 1,32 ± 0,19 en el día 7 que aumentó hasta 2,74 ± 0,49 en el día 11; 2,72 ± 0,62 en el día 14; 3,14 ± 0,65 en el día 18 hasta un valor de 3,02 ± 0,33 en el día 21. Sin embargo, el $^{89}$Zr-Aflibercept no atravesó la BHE, por lo que no mostró ninguna captación en el interior del tumor [relación tumor-cerebro de 0,63 ± 0,003 que no superó el 8,7% del aumento]. A nivel sistémico, la tasa de eliminación de los dos antiVEGF fue similar [0,24 para $^{89}$Zr-Bevacizumab y 0,20 para $^{89}$Zr-Aflibercept]. $^{89}$Zr-Aflibercept mostró una mayor SUV en el hígado en el día 7 [SUV= 2,14 ± 0,38] que $^{89}$Zr-Bevacizumab [SUV=1,03 ± 0,27]. En el día 21, $^{89}$Zr-Aflibercept mantuvo una mayor acumulación en el hígado [SUV= 0,68 ± 0,12 vs SUV= 0,49 ± 0,09]. Por todo esto, nuestros resultados sugieren que el Bevacizumab permanece en circulación sanguínea durante un período de tiempo más largo y es capaz de atravesar la BHE en fases tempranas del desarrollo del tumor, siendo, por tanto, una terapia antiVEGF más adecuada para tratar los glioblastomas que el Aflibercept.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Palabras clave: $^{89}$Zr, Bevacizumab, Aflibercept, antiVEGF, Glioblastoma.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

## 2. INTRODUCCIÓN

Como se ha hecho mención, los tumores cerebrales son patologías complejas que requieren un diagnóstico y unas técnicas de manejo muy específicas [1,2]. En este contexto, los tumores cerebrales más comunes son las metástasis intracraneales debido a cánceres sistémicos, el meningioma y el glioma, especialmente el glioblastoma (GB) [3]. Las metástasis en el SNC pueden producirse en cualquier parte del neuroaxis y suelen requerir una atención médica multidisciplinar como, por ejemplo, la imagen médica, la neurocirugía y la oncología radioterapéutica [4]. Entre los tumores cerebrales primarios, el GB es el tipo de **tumor maligno más común y agresivo**, presentando una importante mortalidad y morbilidad, siendo la respuesta del paciente al tratamiento en la rutina clínica limitada. Su tasa de incidencia es de 0,2 puntos por cada 100.000 personas, con una edad media de 64 años en el momento del diagnóstico [5,6]. Excepto en el tratamiento oncológico, ninguna otra intervención terapéutica puede prolongar la supervivencia global de los pacientes recién diagnosticados [7]. Todos los GB acaban progresando y el tratamiento estándar para evitar que los pacientes presenten recaídas no está todavía claro. En algunos casos, un pequeño número de pacientes con recidivas localizadas pueden recibir una segunda intervención o una nueva radioterapia, pero ninguna de estas intervenciones ha demostrado prolongar la supervivencia, con una **media de 15-18 meses** tras la intervención [8].

La progresión del GB está íntimamente relacionada con su angiogénesis, que se ve afectada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). La familia VEGF incluye cinco miembros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el factor de crecimiento placentarios (PIGF). En la superficie celular, cada uno de los cinco miembros interactúa con el receptor de VEGF (VEGF-R), lo que conduce a su activación, provocando su dimerización y activación mediante la transfosforilación [9]. La activación de VEGF-R provoca señales de migración, proliferación, hematopoyesis y angiogénesis que promueven la expansión y supervivencia de los vasos sanguíneos recién formados [10]. Estos nuevos vasos sanguíneos proporcionan oxígeno y nutrientes, permitiendo que el tumor se expanda e invada los tejidos circundantes. Por ello, los agentes antiangiogénicos (antiVEGF) son actualmente uno de los agentes anticancerígenos más utilizados en la práctica clínica [11]. El **Bevacizumab** es el más utilizado, siendo el principal inhibidor del VEGF, aprobado para el tratamiento de cánceres como el colorrectal, el de pulmón de células pequeñas, el carcinoma o, en el caso de los tumores cerebrales como el GB, se utiliza como terapia de tercera o cuarta línea [12]. Otro antiVEGF interesante para el tratamiento de patologías similares a las mencionadas es el **Aflibercept**, una proteína de fusión recombinante del domino extracelular del VEGF que se une al VEGF-A y al PIGF con una gran afinidad [13]. En este caso, el Aflibercept se ha utilizado para el tratamiento de una gran variedad de tipos de cáncer, incluyendo el de pulmón, de próstata y de ovario. Además, en la práctica preclínica, este antiVEGF también ha demostrado su eficacia en modelos animales de GB [14]. Sin embargo, este antiVEGF aún no ha sido validado como herramienta eficaz frente al GB.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En este sentido, la técnica PET tiene la capacidad de validar la aplicación de los anticuerpos antiVEGF a través del estudio de su farmacocinética mediante imagen, que nunca ha sido evaluada previamente *in vivo*. La técnica PET puede ser empleada para monitorizar y cuantificar *in vivo* estos anticuerpos monoclonales (mAbs) radiomarcados [15]. Esta técnica de obtención de imágenes de anticuerpos proporciona un **método altamente sensible** para la caracterización del fenotipo de la superficie celular, lo que podría mejorar el diagnóstico, el pronóstico, la selección de la terapia y el seguimiento del tratamiento de los GB. Para ello, se necesitan radionúclidos como el Zirconio-89 ($^{89}$Zr), especialmente atractivos para los estudios de farmacocinética y la evaluación clínica de los mAbs debido a su elevada vida media [16]. Este sistema permite el estudio de la evolución de los mAbs radiomarcados en regiones patológicas, como los tumores, a lo largo del tiempo, y en el resto del cuerpo.

Este estudio tiene como objetivo evaluar la farmacocinética de los anticuerpos antiVEGF radiomarcados con $^{89}$Zr utilizando imágenes moleculares PET *in vivo* en un modelo de GB en rata inducidos con la línea tumoral F98.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### Diseño experimental

El estudio ha sido diseñado en base al esquema presentado en la Figura 6.1. Inicialmente se han seleccionado **12 ratas macho Sprague-Dawley** para la inducción del tumor. Se realizan dos grupos de animales, un primer grupo (n=6) a las que se le induce el tumor a través de la inyección de 10.000 células de la línea tumoral F98 en la región frontal del córtex cerebral y, un segundo grupo (n=6) mediante la inyección de 100.000 células F98 para asegurar el correcto desarrollo tumoral. Para cada grupo se realiza un seguimiento mediante PET después de la inyección de $^{89}$Zr-Bevacizumab (n=3) y $^{89}$Zr-Aflibercept (n=3) transcurridos 4 días desde la inducción del modelo.

Figura 6.1. Representación del esquema seguido para la realización de los estudios: momento de inducción del tumor, administración de los antiVEGF radiomarcados con $^{89}$Zr y los días de obtención de las imágenes hasta la extracción del cerebro para su estudio *ex-vivo*.

**Preparación animal**

Los animales se mantuvieron en diferentes jaulas con ciclos de día-noche regulados por luz artificial (12h/12h), bajo condiciones de temperatura controlada (23 ± 3º), humedad (60 ± 5%) y alimentados *ad libitum*. Se siguieron las directrices institucionales y/o nacionales aplicables para el cuidado y uso de los animales. Todos los experimentos con roedores cumplieron las directrices ARRIVE, fueron aprobados por la Red Gallega de Comités de Ética de la Investigación y se llevaron a cabo de acuerdo con la Directiva de la UE 2010/63/UE para la experimentación con animales [17].

**Línea celular**

El modelo de rata F98 GB ha sido descrito previamente [18]. La línea celular F98 (ATCC® CRL-2397) se adquirió de la American Type Culture Collection (ATCC). Esta línea celular se estableció a partir de un glioma maligno indiferenciado desarrollado por carcinogénesis química con N-etil-N-nitrosurea en una rata Fisher embarazada. Estas células de glioblastoma poseen una morfología glial y una capacidad altamente invasiva. La inyección intracerebral de un número reducido de estas células da lugar a un crecimiento tumoral altamente agresivo e infiltrativo en las ratas. Las células F98 se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 10% de FBS y penicilina/estreptomicina a 37ºC en una atmósfera de 5% de CO2 y se subcultivaron cada 2-3 días.

**Protocolo de cirugía esterotáxica**

En este protocolo, describimos la cirugía estereotáxica optimizada para la administración de células F98 en el cerebro del roedor. Para realizar esta técnica, el animal debe ser anestesiado con sevoflurano al 4% para realizar una incisión en la cabeza. Las coordenadas utilizadas para las inyecciones intracraneales fueron +0,6mm anterior; -2mm lateral; 5,5mm ± 0,5 de profundidad al bregma (núcleo caudado derecho) [19]. Una vez localizada la zona, se procedió a la realización de un trépano que permitiese el acceso al cerebro para la posterior administración de las células (en un volumen final de 50µL) mediante un controlador de bomba de microjeringa. Una vez inyectadas las células a un ritmo de 2µL/min, el procedimiento de inducción finaliza con el cierre del trépano con una pasta de fijación, para evitar infecciones y la exposición de la región operada. Posteriormente, se cerró la zona con una sutura quirúrgica de 4-0 para asegurar la región. Por nuestra experiencia, la evolución de los animales **sin signos de infección** después de la cirugía esterotáxica fue la principal razón para descartar la analgesia u otros fármacos.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

**$^{89}$Zr Bevacizumab y Aflibercept**

El marcaje de anticuerpos monoclonales ha sido desarrollado siguiendo los procedimientos previamente descritos por Verel y colaboradores [20]. En este caso, los anticuerpos Bevacizumab y Aflibercept se purifican con agua MilliQ usando los filtros centrífugos de Amicon® Ultra 2-mL (NMWL 30kDa) (Merck® Millipore®) para eliminar los excipientes del producto comercial. Una vez obtenido el anticuerpo purificado es necesario añadir un exceso molar de 2 veces tetrafluorfenil-N-succinildesferrioxamina-B-$Fe^{3+}$ (TFP-N-sucDf-Fe) (ABX®) para conjugar ambas moléculas. La conjugación es necesaria llevarla a cabo a 25ºC durante 30 minutos en movimiento constante, ajustando la solución a pH 9,0-9,5 con $Na_2CO_3$ 0,1M.

Una vez transcurrido el tiempo, el pH se reduce nuevamente a 4,0-4,5 con $H_2SO_4$ 0,25M y se agrega un exceso de 50 veces de 25mg/mL de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para atrapar el hierro presente en el TFP-N-sucDf-Fe y luego se incubarán a 30ºC durante 30 minutos. El conjugado de Bevacizumab y el conjugado de Aflibercept se purifican nuevamente ajustando la concentración de anticuerpos a la misma que la **solución comercial** (25mg/mL para Bevacizumab y 40mg/mL para Aflibercept). Una vez que se completa la conjugación de los anticuerpos, el N-sucDF-aflibercept se almacenarán a -80ºC para su mantenimiento en condiciones óptimas.

El control de calidad es necesario realizarlo mediante una cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño (SE-HPLC) utilizando un sistema de HPLC (Agilent serie 1260; Agilent Technologies®, Santa Clara, CA, EE. UU.) para comprobar si se producen procesos de agregación y fragmentos de anticuerpos durante la conjugación, así como para calcular la relación de conjugación entre el N-sucDf y los anticuerpos. Es necesario utilizar una columna Agilent Bio SEC -5,5µm, 300 Å, 7,8 x 150mm. La fase móvil consiste en solución salina tamponada con fosfato (PBS: NaCl 140mmol/L, $Na_2HPO_4$ 9mmol/L, $NaH_2PO_4$ 1,3mmol/L; pH 7,4). El flujo debe ser de 0,7mL/min y las longitudes de onda del detector UV se establecen en 220, 280 y 430nm. La proporción de TFP-N-sucDf conjugada con respecto a la proteína se determina mediante la señal de 430nm de $Fe^{3+}$ unida al anticuerpo frente a la no unida en SE-HPLC.

Previo al radiomarcaje, los anticuerpos deben mantenerse a **temperatura ambiente** hasta que se descongelan por completo. La cantidad requerida de solución de $^{89}$Zr-oxalato de grado clínico (BV ciclotrón VU, PerkinElmer, Inc.) se recogió con ácido oxálico 1M. Con el fin de realizar la reacción del marcaje correctamente, el pH es necesario elevarlo a un rango de 4,0-4,5 con $Na_2CO_3$ 2M y luego agregar tampón HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) hasta obtener una solución a pH 7.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Una vez alcanzado el pH, se añade a la solución N-sucDf-bevacizumab y N-sucDf-Aflibercept, las cuales se incuban durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos se marcan con una actividad específica máxima de 10MBq/mg para ambos conjugados. Posteriormente se realizó una ultrafiltración con Filtros Centrífugos

Amicon® Ultra-0,5mL, NMWL 100kDa (Merck® Millipore®) para cada anticuerpo marcado con el fin de concentrar y purificar la solución.

La pureza radioquímica (RCP) de los anticuerpos marcados se evalúa mediante la prueba de precipitación con ácido tricloroacético (TCA). Esta prueba de TCA se realiza mezclando cantidades iguales de ácido tricloroacético al 20% en agua milli-Q y HSA (Albúmina de suero humano) al 1% (Albunorm® 20%, Octapharma) en PBS y agregando una alícuota del compuesto marcado. La muestra se centrifuga para separar el precipitado (fracción de proteína) del sobrenadante y la radiactividad en ambas fracciones se mide con un contador de pozo (Atomlab® Wipe test Counter, Biodex®) para determinar el RCP.

**Datos de adquisición**

Para la adquisición de datos PET/CT, se utilizó el escáner preclínico Albira microPET/CT (Bruker Biospin Corporation). Los animales fueron anestesiados inicialmente con isoflurano al 3% y al 2% durante la adquisición. La cama se posicionó para incluir todo el cuerpo en el FOV durante 40 minutos y un estándar de CT de 10 minutos, refiriéndose al tiempo requerido para cada una de las técnicas seleccionadas. El PET se realizó justo después de la inyección y el CT se realizó sin tiempo de asimilación del radiofármaco por tener una vida media demasiado alta. Además, el CT realizado en los últimos 10 minutos del estudio se utilizó para corregistrar la posición del PET y poder comparar las imágenes de los diferentes roedores. La adquisición se realizó a los **7, 11, 14, 18 y 21 días** después de la implantación de las células. Los datos del PET se reconstruyen con 12 interacciones, sin decaimiento y sin corrección de atenuación. El tamaño de los píxeles de la imagen fue de 0,4 x 0,4 x 0,4$mm^3$. Durante la adquisición de la PET/CT se monitorizó la frecuencia respiratoria para vigilar una posible depresión respiratoria. En este apartado es necesario hacer mención al seguimiento por MR que se realizó para tener constancia del correcto desarrollo de la enfermedad. Para ello, el día 7 tras la inducción del tumor, se llevó a cabo la realización de una MR a cada uno de los sujetos con la previa anestesia del roedor con la concentración de isoflurano mencionada en apartados anteriores. El protocolo consistió en una adquisición de **30 minutos**.

**Análisis de la imagen PET**

Se utilizó PMOD 4.201 (PMOD Technologies Ltd) con un atlas de rata W. Schiffer creando diferentes VOIs para analizar todas las regiones del cerebro. Además, se delineó una VOI esférica manual (3 x 3 x 3$mm^3$) sobre el tumor cerebral en las imágenes PET reconstruidas. Además, se crearon otras VOI basadas en el contorno del corazón, hígado, vejiga, músculo y cuerpo completo para analizar la interacción de los antiVEGF con estas regiones. Por otro lado, la MR fue analizada con PMOD para determinar el correcto desarrollo de la enfermedad y que el tumor se desarrollase para poder llevar a cabo el estudio propuesto.

USC DE COMPOSTELA

# 4. RESULTADOS

## MR

En la Tabla 6.1 se puede observar los valores del volumen del tumor a día 7 de todos los sujetos. Es interesante mencionar, que no todos los valores son iguales al inicio, aunque la confirmación por Anatomía Patológica indica la proliferación tumoral. Es necesario hacer alusión al fallecimiento de uno de los sujetos por **causas desconocidas** durante el proceso de adquisición. Dicho sujeto fue eliminado del estudio.

Tabla 6.1: Valores obtenidos para los diferentes sujetos en $cm^3$ a día 7 post-inducción.

| SUJETOS | Sujeto 1 | Sujeto 2 | Sujeto 3 | Sujeto 4 | Sujeto 5 | Sujeto 6 | Sujeto 7 | Sujeto 8 | Sujeto 9 | Sujeto 10 | Sujeto 11 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| VOLUMEN MR TUMOR | 0.012209 | 0.004065 | 0.001511 | 0.001923 | 0.007127 | 0.042998 | 0.039304 | 0.134006 | 0.00249 | 0.0018 | 0.08006 |

## Análisis *ex-vivo*

Inmediatamente después de finalizar los estudios, todas las ratas fueron sacrificadas con una inyección intracardiaca de cloruro potásico (10mL). Tras esto, se extrajo el cerebro y se realizó una limpieza con PBS para eliminar la sangre residual, conservándolo en formol al 10% (dilución 1:9 de una solución de formaldehído) para analizar el tumor y confirmar la evolución de la patología. Se realizaron cortes en el plano coronal de 1mm utilizando parafina. Los bloques se seccionaron a intervalos de 2 micrómetros y los portaobjetos se tiñeron con **hematoxilina y eosina** (H&E). Las secciones cerebrales correspondientes a las regiones exploradas por el tumor se sometieron a una inmunotinción de **Ki-67** para la proteína marcada. Además, se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson (ver Figura 6.2). Los datos se calcularon registrando el porcentaje de núcleos de células tumorales teñidos positivamente. La tinción nuclear distintiva se registró como positiva.

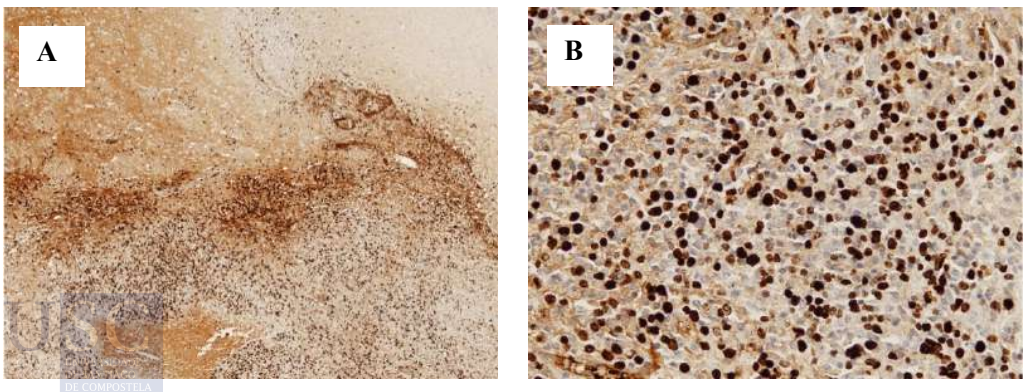



Figura 6.2. Confirmación mediante Anatomía Patológica de la existencia de tumor en los sujetos estudiados. La imagen A representa un corte del tumor con un aumento de 4x mediante el uso de Ki-67 a diferencia de la imagen B, la cual representa el mismo corte con un aumento de 20x.

**Comparativa de la cuantificación de $^{89}$Zr-Bevacizumab y $^{89}$Zr-Aflibercept en el tumor**

La Figura 6.3 representa las imágenes obtenidas a lo largo de los diferentes días de la realización de los escáneres con la PET. Los animales pertenecientes al grupo de $^{89}$Zr-Bevacizumab muestran la aparición del tumor y como este va evolucionando a lo largo del tiempo, lo que indica que el Bevacizumab marcado es capaz de **penetrar en el interior del tumor** a partir del día 6 desde la inducción del tumor. Por el contrario, en el caso de los animales inyectados con $^{89}$Zr-Aflibercept, no se muestra la aparición del tumor, aunque este haya sido confirmado anteriormente.

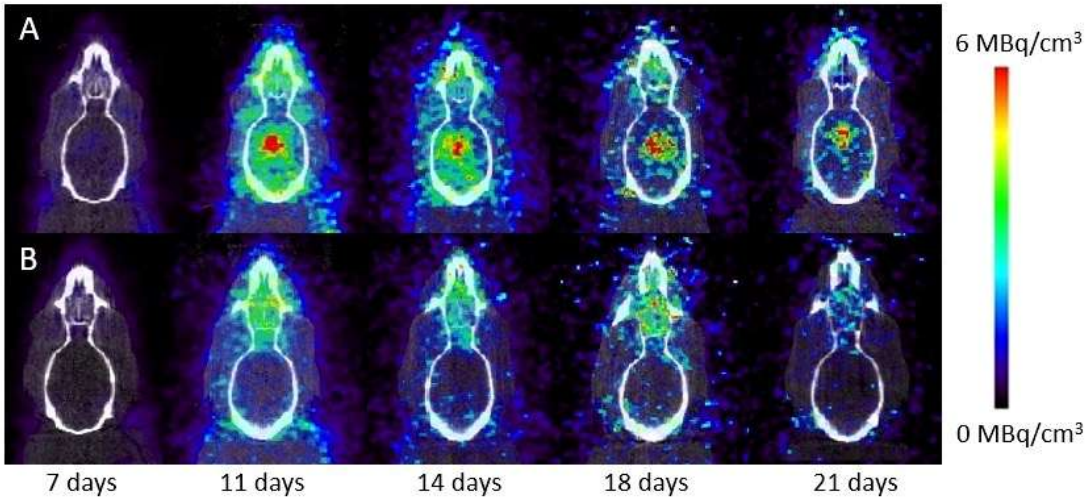



Figura 6.3. Representación de un sujeto inyectado con $^{89}$Zr-Bevacizumab (A) y otro con $^{89}$Zr-Aflibercept (B) a lo largo de los días de seguimiento mediante PET/CT.

Tras el análisis de las imágenes, la Figura 6.4 y la Figura 6.5 muestran lo que a simple vista se puede observar. Los sujetos a los que se les ha administrado $^{89}$Zr-Bevacizumab muestran una ratio tumor-cerebro de 1,32±0,19 a día 7, el cual se incrementa a 2,74±0,49 en el día 11; 2,72±0,62 a día 14; 3,14±0,65 a día 18 hasta un valor de 3,02±0,33 a día 21. Sin embargo, a los sujetos inyectados con $^{89}$Zr-Aflibercept, este antiVEGF no cruza la BHE, por lo tanto, no se muestra ningún valor significativo dentro del tumor, con una ratio tumor-cerebro de 0,63±0,03 el cual no excede el 8,7% de incremento a lo largo de los días.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

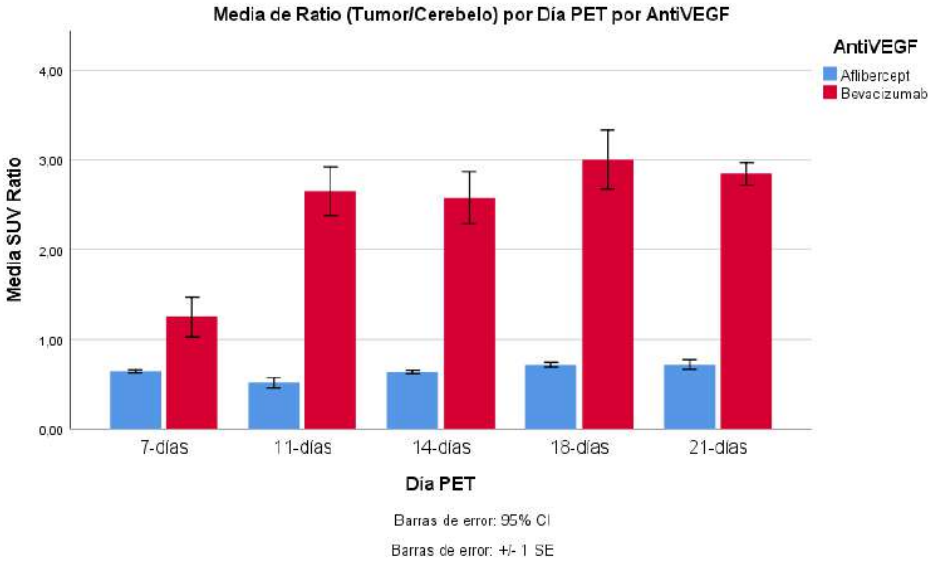



Figura 6.4. Representación detallada de la media de la ratio (Tumor/Cerebelo) de los antiVEGF utilizados a lo largo de los diferentes días de estudio.

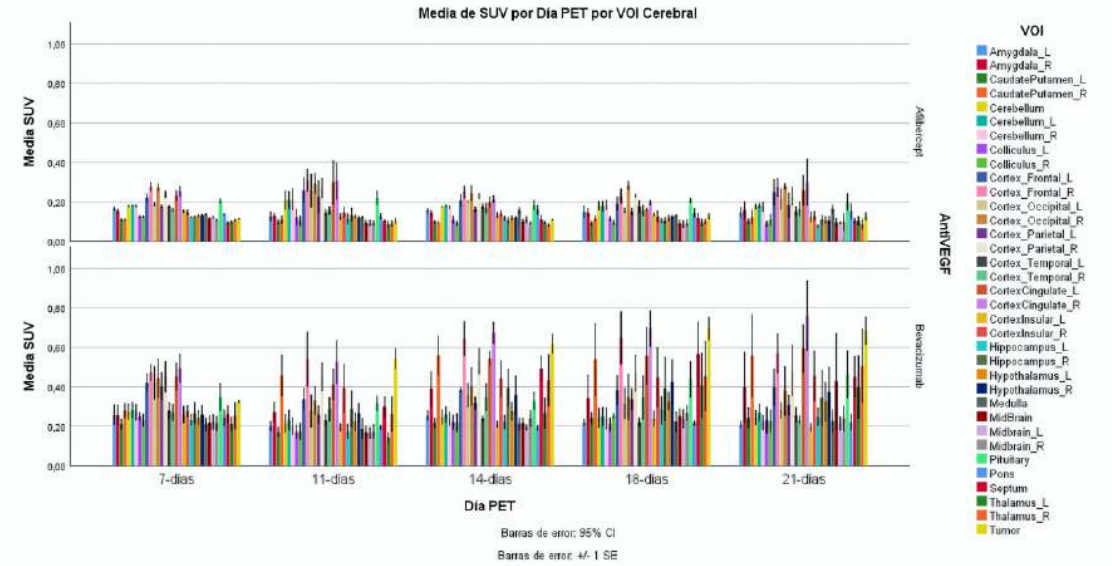



Figura 6.5. Representación de cada una de las regiones cerebrales analizadas para el estudio del glioma en los diferentes sujetos empleados para el estudio.

**Comparativa de la cuantificación de $^{89}$Zr-Bevacizumab y $^{89}$Zr-Aflibercept en otros órganos y tejidos**

A mayores de los datos obtenidos a nivel cerebral, se procedió a realizar un estudio de las principales regiones del organismo del roedor que se podrían ver involucradas en el **acúmulo de los diferentes antiVEGF utilizados**. Para ello, se seleccionaron el Hígado, Corazón, Vejiga, el cuerpo entero, un músculo como el bíceps braquial y, además, se incluyeron el Cerebelo y el propio tumor para obtener la mayor información posible. En este aspecto, la Figura 6.6 muestra que $^{89}$Zr-Aflibercept presenta un mayor SUV en el hígado a día 7, con un SUV de 2,14±0,38, a diferencia de los valores obtenidos con $^{89}$Zr-Bevacizumab, los cuales nos indican un SUV de 1,03±0,27. A lo largo de los días, estos valores disminuyen, hasta encontrar unos datos de SUV de 0,68±0,12 en el caso del $^{89}$Zr-Aflibercept a diferencia del SUV 0,49±0,09 que se puede observar en el caso del $^{89}$Zr-Bevacizumab.

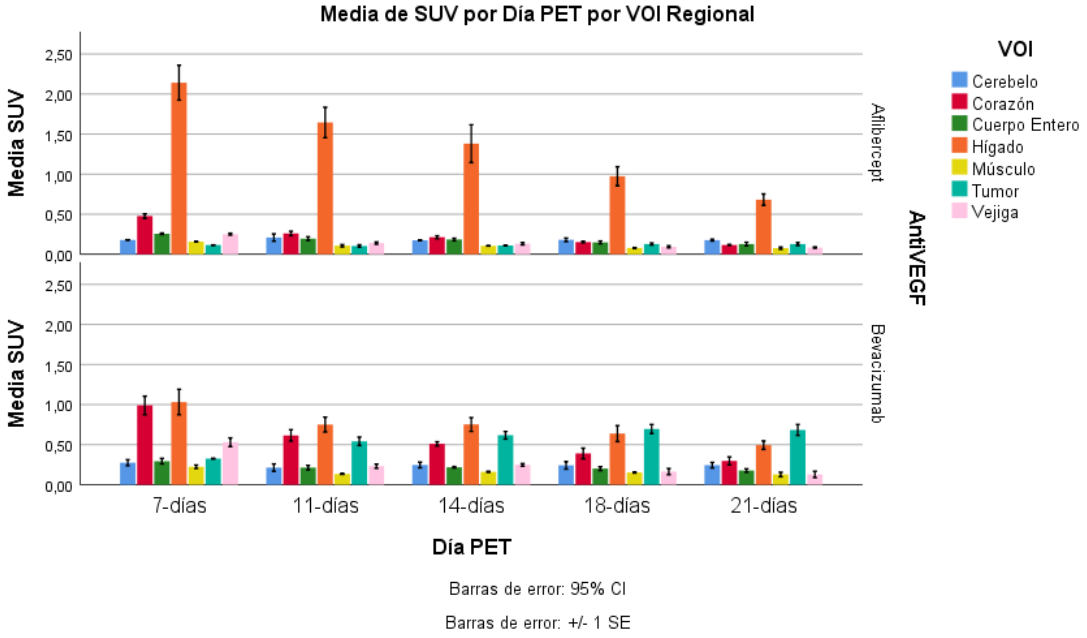



Figura 6.6. Representación de la media de SUV obtenida de las diferentes regiones seleccionadas. Como se puede apreciar, el hígado es la zona que más acumulo presenta en los estadios iniciales desde la administración del $^{89}$Zr-Aflibercept.

Como se puede observar en la figura anterior, a nivel sistémico, la tasa de eliminación de cuerpo entero de los dos antiVEGF fue similar [0,24 para $^{89}$Zr-Bevacizumab y 0,20 para $^{89}$Zr-Aflibercept]. $^{89}$Zr-Aflibercept mostró un mayor SUV en el hígado en el día 7 [SUV= 2,14] que $^{89}$Zr-Bevacizumab [SUV= 1,03]. En el día 21, $^{89}$Zr-Aflibercept mantuvo una mayor acumulación en el hígado [SUV= 0,68 vs SUV= 0,49].

# 5. DISCUSIÓN

El $^{89}$Zr-InmunoPET es una prometedora herramienta no invasiva que permite tener un seguimiento de la diana de los anticuerpos *in vivo* en una región concreta, como podría ser en este caso el cerebro. En la actualidad, debido al creciente interés por las inmunoterapias, los mAbs se aplican como **potentes herramientas** en muchos trastornos neoplásicos. La sencillez del radiomarcaje permite conocer su biodistribución a nivel de cada paciente y, además, la obtención de secuencias de su biodistribución es especialmente atractiva cuando se trata de afectaciones complejas, como los tumores cerebrales [21].

Con esta premisa se analizó la posibilidad de introducir antiVEGF ampliamente utilizados, como el Bevacizumab y el Aflibercept en el ámbito clínico, pero con una finalidad centrada en las neoplasias cerebrales como los gliomas. Los resultados que se presentan en este trabajo proporcionan un aporte sustancial para la estandarización de los tratamientos de los tumores cerebrales, teniendo un mayor conocimiento de su biodistribución y del aporte de estos mAbs como futuras técnicas terapéuticas. Esta premisa se centra en varias cuestiones que se tratarán a lo largo de este apartado. El Bevacizumab parece, a través de nuestros resultados, introducirse en el interior tumoral, el cual se puede observar a través del marcaje con $^{89}$Zr, aunque otros estudios manifiestan lo contrario [22-24]. **Existe mucha controversia** en este aspecto, ya que este tipo de terapias están enfocadas como tercera línea de intervención tras los correspondientes tratamientos convencionales [25]. Algunos estudios reportan que el Bevacizumab no es un candidato óptimo para todos los pacientes ya que, en ciertas ocasiones, no llega al tumor por su mala distribución en el cerebro al tratarse de moléculas grandes, las cuales no son capaces de pasar la BHE [23,26]. Otros estudios con otro enfoque clínico indican que el tratamiento combinado con Bevacizumab no muestra ningún beneficio sobre el uso de Bevacizumab como monoterapia [27,28] aunque, el análisis global, no muestra una ventaja estadísticamente significativa del tratamiento combinado, pudiendo observarse interacciones sinérgicas para las combinaciones individuales. Estos dos puntos de vista mantienen vigente dicha incógnita, la cual podría estar ligada con su biodistribución [22]. Aún con todo esto, nuestro estudio confirma la penetración del Bevacizumab desde estadios iniciales de la enfermedad. Por otro lado, nuestro enfoque se centra en que el Aflibercept no llegaba a la región tumoral durante todo el estudio, valorando la posibilidad de aplicar el mismo proceso pero, en esta ocasión, esperando a la administración del $^{89}$Zr-Aflibercept una vez que el tumor tuviese una mayor evolución. Para eso, se siguió una administración de 10.000 células tumorales de la misma línea celular. En este caso, se espera a día 15 de la inducción del tumor para realizar la administración del antiVEGF radiomarcado para asegurarnos de que la BHE está rota y que, de esta forma, el Aflibercept pueda penetrar en el interior tumoral. Con ese planteamiento, se obtuvieron las imágenes que se pueden comprobar en el Anexo 6.1.

Los valores de la ratio Tumor/Cerebelo obtenidos indican 2,63, un valor similar al obtenido con Bevacizumab.

Con estos valores llegamos a la premisa que **el antiVEGF en circulación y el tiempo de administración** son fundamentales en el momento en que el tumor rompe la BHE, siendo necesario que haya suficiente antiVEGF como para poder penetrar en el interior tumoral y, de este modo, determinar un seguimiento terapéutico de la afectación.

Es necesario mencionar alguna limitación relacionada con este antiVEGF en nuestro estudio. Para ser más exhaustivos, se debería realizar un mayor análisis de los datos obtenidos, ya que una de las limitaciones ligadas a este estudio es la falta de datos relacionados con el proceso de inducción del tumor. Sería necesario ampliar los contenidos simulando la inducción del tumor, pero con otras sustancias inocuas, como PBS o Cloruro Sódico para, así, determinar con éxito que la captación localizada en los roedores del grupo del Bevacizumab no está relacionada más bien con la lesión vascular inducida por su cirugía y su posterior expresión de VEGF, sino por la acumulación específica del tumor.

La resistencia del glioma al tratamiento antiangiogénico es inevitable, entre el que destaca la liberación de factores proangiogénicos alternativos para promover la angiogénesis independiente del VEGF [29]. Se conoce que el PIGF es uno de los posibles factores responsable de la estimulación del crecimiento de los vasos sanguíneos en el entorno de la inhibición del VEGF [30]. En estudios clínicos se ha podido observar cómo los niveles de PIGF aumentan en la sangre de los pacientes tratados con terapias antiangiogénicas, aunque no se conoce si el aumento que se observa es una respuesta al propio fármaco o si el PIGF desempeña un papel activo en la estimulación de la angiogénesis patológica [30,31]. En este caso, el Aflibercept puede tener su **repercusión**.

En el estudio se puede comprobar como, a lo largo de los 21 días de seguimiento desde la inducción, no se puede apreciar la entrada del Aflibercept en la región tumoral. Esto nos hizo pensar en la biodistribución del Aflibercept, la cual es mucho más rápida que el Bevacizumab, provocando una eliminación a través del hígado muy superior desde el primer día de estudio. Con esta información se planteó, como se ha podido comprobar anteriormente, un segundo estudio con Aflibercept para determinar si, con una ruptura de la BHE y con una mayor evolución tumoral, este podría entrar en el interior del glioma. De esta forma, se pudo comprobar como el Aflibercept puede entrar en la región tumoral cuando se dispone de la cantidad suficiente del mismo en el torrente sanguíneo y la barrera se encuentra rota por la evolución del tumor. Estos resultados podrían verse respaldados por información similar obtenida a través de **otros estudios clínicos** [13,32] que afirman que el Aflibercept como agente único parece tener una actividad mínima en el glioma, viendo aumentados sus beneficios sinérgicos en combinación con la radiación y la cirugía.

Para finalizar, el trabajo evalúa, por primera vez, la biodistribución del Bevacizumab y Aflibercept mediante el uso de Zr-89 *in vivo* en un modelo de glioma generado a través de la línea celular F98. Es necesario profundizar de manera más precisa sobre la

biodisponibilidad de ambos antiVEGF en el torrente sanguíneo y aclarar si el mismo procedimiento obtiene los mismos resultados con otras líneas celulares de tumores cerebrales. Otras regiones diana del organismo no se ven afectadas directamente por el uso de estos mAbs, a excepción del **hígado**, el cual disminuye su acumulo con la evolución de los días, como es de esperar. Todo esto puede suponer una cuestión a tener en cuenta con respecto a los posibles efectos secundarios que ambos antiVEGF pueden causar en el organismo. En este último apartado se demostró la importancia del uso de los mAbs en el ámbito de la Medicina Nuclear. Además, con este enfoque, el uso de estos tratamientos combinados con otras terapias cada vez más específicas, como las microcirugías o la radioterapia, podría suponer un enfoque evolutivo hacia una mejora de la calidad de vida de los pacientes.

## 6. CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que Bevacizumab permanece en la circulación sanguínea durante un período de tiempo más largo y es capaz de atravesar la BHE en fases tempranas del desarrollo del tumor, siendo, por tanto, una terapia antiVEGF más adecuada para tratar los glioblastomas que Aflibercept. Aún así, es interesante mencionar que el Aflibercept, en estadios avanzados de la enfermedad, consigue penetrar en el tumor, siendo necesario profundizar más en el conocimiento y actuación de estos antiVEGF para obtener terapias que se adecuen a las necesidades de los pacientes y que estos se puedan ver beneficiados ante las futuras evoluciones de los tumores cerebrales como los gliomas.

## 7. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue, parcialmente, apoyado por los proyectos ED431F 2017/04 (Xunta de Galicia), EAPA_791/2018 (Interreg UE) y RYC-2015/17430 (Ramón y Cajal, Pablo Aguiar).

## 8. CONFLICTOS DE INTERÉS

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

## 9. CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

DRB realizó las operaciones, las adquisiciones y redactó el manuscrito; LGV preparó las figuras y contribuyó al análisis de los datos; NGL verificó los métodos analíticos y elaboró casi todos los detalles técnicos; AM ayudó a analizar los resultados; AR ayudó a diseñar e instruir el experimento; PA concibió el estudio y revisó el manuscrito. Todos los autores discutieron los resultados y comentaron el manuscrito.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# 10. REFERENCIAS

1. Finch A, Solomou G, Wykes V, Pohl U, Bardella C, Watts C. Advances in Research of Adult Gliomas. Int J Mol Sci. 2021;22(2):924..

2. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C et al. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. Neuro Oncol. 2017;19(suppl_5):v1-v88.

3. Lun M, Lok E, Gautam S, Wu E, Wong ET. The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme. J Neurooncol. 2011;105(2):261-73.

4. Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. Lancet Oncol. 2017;18(6):e315-e329.

5. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE et al. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. Neuro Oncol. 2014;16(7):896-913.

6. Young RM, Jamshidi A, Davis G, Sherman JH. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. Ann Transl Med. 2015;3(9):121.

7. Chen R, Smith-Cohn M, Cohen AL, Colman H. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. Neurotherapeutics. 2017;14(2):284-297.

8. Venur VA, Peereboom DM, Ahluwalia MS. Current medical treatment of glioblastoma. Cancer Treat Res. 2015;163:103-15.

9. Seyedmirzaei H, Shobeiri P, Turgut M, Hanaei S, Rezaei N. VEGF levels in patients with glioma: a systematic review and meta-analysis. Rev Neurosci. 2020;32(2):191-202.

10. Ahir BK, Engelhard HH, Lakka SS. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. Mol Neurobiol. 2020;57(5):2461-2478.

11. Xu S, Tang L, Li X, Fan F, Liu Z. Immunotherapy for glioma: Current management and future application. Cancer Lett. 2020;476:1-12.

12. Kim MM, Umemura Y, Leung D. Bevacizumab and Glioblastoma: Past, Present, and Future Directions. Cancer J. 2018;24(4):180-186.

13. de Groot JF, Lamborn KR, Chang SM, Gilbert MR, Cloughesy TF, Aldape K et al. Phase II study of aflibercept in recurrent malignant glioma: a North American Brain Tumor Consortium study. J Clin Oncol. 2011;29(19):2689-95.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

14. Goldbrunner RH, Bendszus M, Sasaki M, Kraemer T, Plate KH, Roosen K et al. Vascular endothelial growth factor-driven glioma growth and vascularization in an orthotopic rat model monitored by magnetic resonance imaging. Neurosurgery. 2000;47(4):921-9; discussion 929-30.

15. Chen KS, Mitchell DA. Monoclonal antibody therapy for malignant glioma. Adv Exp Med Biol. 2012;746:121-41.

16. Nigam S, McCarl L, Kumar R, Edinger RS, Kurland BF, Anderson CJ et al. Preclinical ImmunoPET Imaging of Glioblastoma-Infiltrating Myeloid Cells Using Zirconium-89 Labeled Anti-CD11b Antibody. Mol Imaging Biol. 2020;22(3):685-694.

17. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. Br J Pharmacol. 2010;160(7):1577–1579

18. Bolcaen J, Descamps B, Deblaere K, Boterberg T, Hallaert G, Van den Broecke C et al. MRI-guided 3D conformal arc micro-irradiation of a F98 glioblastoma rat model using the Small Animal Radiation Research Platform (SARRP). J Neurooncol. 2014;120(2):257-66.

19. Ciceroni C, Bonelli M, Mastrantoni E, Niccolini C, Laurenza M, Larocca LM et al. Type-3 metabotropic glutamate receptors regulate chemoresistance in glioma stem cells, and their levels are inversely related to survival in patients with malignant gliomas. Cell Death Differ. 2013;20(3):396-407.

20. Verel I, Visser GW, Boerman OC, van Eerd JE, Finn R, Boellaard R et al. Long-lived positron emitters zirconium-89 and iodine-124 for scouting of therapeutic radioimmunoconjugates with PET. Cancer Biother Radiopharm. 2003;18(4):655-61.

21. Veldhuijzen van Zanten SEM, Sewing ACP, van Lingen A, Hoekstra OS, Wesseling P, Meel MH et al. Multiregional Tumor Drug-Uptake Imaging by PET and Microvascular Morphology in End-Stage Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. J Nucl Med. 2018;59(4):612-615.

22. Jansen MH, Lagerweij T, Sewing AC, Vugts DJ, van Vuurden DG, Molthoff CF et al. Bevacizumab Targeting Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: Results of 89Zr-Bevacizumab PET Imaging in Brain Tumor Models. Mol Cancer Ther. 2016;15(9):2166-74.

23. Jansen MH, Veldhuijzen van Zanten SEM, van Vuurden DG, Huisman MC, Vugts DJ, Hoekstra OS et al. Molecular Drug Imaging: $^{89}$Zr-Bevacizumab PET in Children with Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. J Nucl Med. 2017;58(5):711-716.

24. Li Y, Ali S, Clarke J, Cha S. Bevacizumab in Recurrent Glioma: Patterns of Treatment Failure and Implications. Brain Tumor Res Treat. 2017;5(1):1-9.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

25. Franceschi E, Lamberti G, Paccapelo A, Di Battista M, Genestreti G, Minichillo S et al. Third-line therapy in recurrent glioblastoma: is it another chance for bevacizumab? J Neurooncol. 2018;139(2):383-388.

26. Thompson EM, Frenkel EP, Neuwelt EA. The paradoxical effect of bevacizumab in the therapy of malignant gliomas. Neurology. 2011;76(1):87-93.

27. Taal W, Oosterkamp HM, Walenkamp AM, Dubbink HJ, Beerepoot LV, Hanse MC et al. Single-agent bevacizumab or lomustine versus a combination of bevacizumab plus lomustine in patients with recurrent glioblastoma (BELOB trial): a randomised controlled phase 2 trial. Lancet Oncol. 2014;15(9):943-53.

28. Gleeson JP, Keane F, Keegan NM, Mammadov E, Harrold E, Alhusaini A et al. Similar overall survival with reduced vs standard dose bevacizumab monotherapy in progressive glioblastoma. Cancer Med. 2020 Jan;9(2):469-475.

29. Batchelor TT, Reardon DA, de Groot JF, Wick W, Weller M. Antiangiogenic therapy for glioblastoma: current status and future prospects. Clin Cancer Res. 2014;20(22):5612-9.

30. Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Yamashima T, Yamashita J, Yamamoto H. Placenta growth factor (PlGF) mRNA expression in brain tumors. J Neurooncol. 1998;40(2):123-30.

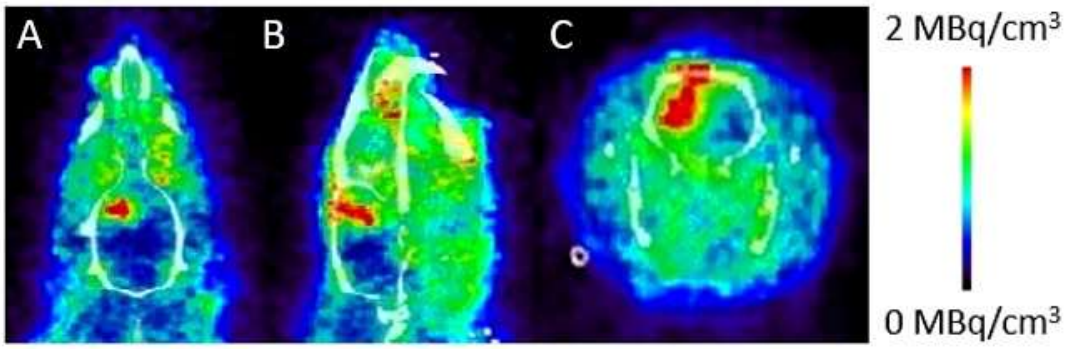
31. Nedergaard MK, Michaelsen SR, Urup T, Broholm H, El Ali H, Poulsen HS et al. 18F-FET microPET and microMRI for anti-VEGF and anti-PlGF response assessment in an orthotopic murine model of human glioblastoma. PLoS One. 2015;10(2):e0115315.

32. Nayak L, de Groot J, Wefel JS, Cloughesy TF, Lieberman F, Chang SM. Phase I trial of aflibercept (VEGF trap) with radiation therapy and concomitant and adjuvant temozolomide in patients with high-grade gliomas. J Neurooncol. 2017;132(1):181-188.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# 11. ANEXOS

**Anexo 6.1:** Para poder comprobar si el Aflibercept no penetraba la BHE del cerebro y no llegaba al tumor, se realizó un estudio adicional para comprobar si, en estadios más avanzados de la enfermedad, y asegurándonos de la correcta ruptura de membrana, el mencionado antiVEGF podía penetrar en el interior del tumor. Con esto se ha podido observar la penetración del Aflibercept en el cerebro del roedor, fortaleciendo la premisa de que el Aflibercept no permanece el tiempo suficiente en sangre como para poder introducirse en el interior tumoral en estadios iniciales.




Anexo 6.1. Representación de los diferentes fotogramas (A-Coronal, B-Sagital, C-Axial) de un sujeto con glioma de una evolución de 18 días administrado con $^{89}$Zr-Aflibercept a día 15 desde la administración de la línea celular.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

# CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN GENERAL

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

# DISCUSIÓN GENERAL

El glioma es un problema de salud que se expande a nivel mundial, ya no solo como una afectación de carácter primario sino, también, como una afectación derivada de las metástasis de los diferentes tumores corporales. El estilo de vida, la predisposición genética y estar sometido a radiaciones ionizantes, principalmente ligadas a exploraciones sanitarias, aumentan el riesgo de desarrollar esta patología. La cirugía, la quimioterapia y la radioterapia son los tratamientos más utilizados en estas circunstancias siendo, las recidivas, excesivamente comunes. Aún con los grandes avances conseguidos, el desconocimiento sobre una correcta terapia que haga frente a esta afección ha supuesto una problemática para los pacientes, los cuales, en la mayoría de los casos, solo pueden aspirar a una reducción de la sintomatología y un aumento de los meses de su esperanza de vida. Del mismo modo, la selección de la terapia dependerá directamente del estado funcional del paciente, aunque existen otros factores que pueden repercutir de igual modo en su funcionamiento.

En los últimos años, la ambición por la búsqueda de nuevas terapias que puedan ser útiles ha generado controversia. La aparición de los anticuerpos monoclonales dilucidaba una luz al final del túnel que permitía aportar esperanza en este campo. Los estudios son muy preliminares y no se han conseguido grandes avances en el campo, de igual modo, los resultados si son esperanzadores. En este aspecto, la Medicina Nuclear, y en particular la imagen PET, ha supuesto un gran aporte, no solo para la investigación, sino también para el tratamiento y seguimiento de este tipo de patologías. Con su gran característica de obtener imágenes *in vivo*, la imagen PET permite tener un seguimiento de la evolución del tumor de una forma no invasiva permitiendo aplicar terapias con anticuerpos monoclonales radiomarcados y observar su biodistribución. Sin embargo, el uso de la PET en el ámbito preclínico es complejo, y presenta limitaciones y dificultades importantes que deben ser abordadas. En la presente tesis doctoral se han propuesto diferentes trabajos que pretenden avanzar hacia nuevos protocolos de imagen preclínica PET que permitan desarrollar una herramienta eficaz para la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas en modelos de tumores cerebrales.

La principal limitación de estos estudios de imagen preclínica PET es la necesidad de la estimación de la concentración de radiofármaco en sangre. La estrategia planteada en esta tesis permite realizar una estimación de la concentración de radiofármaco en sangre en tiempo real, y va a suponer un antes y un después en la aplicación de las terapias, ya que permite obtener valores en tiempo real que pueden implicar un cambio terapéutico con los datos obtenidos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La generación de un protocolo de cirugía extracorpórea representa una nueva dinámica para obtener los parámetros mencionados con una gran eficacia, demostrando un nuevo impulso a los métodos de derivación arterial con respecto al método estandarizado hasta la fecha. Con todo esto, se ha primado abordar cuestiones que repercuten en las mediciones longitudinales hallando dificultades en su solución, como

en la implementación de catéteres permanentes. Aún así, se encontraron soluciones que pueden tener un enfoque útil para poder paliar la problemática mencionada. Por otro lado, la inestabilidad hemodinámica es otro de las problemáticas a las que se tienen que enfrentar los investigadores, ya que el mínimo margen de sangrado que presentan para llevar a cabo sus experimentos podría en riesgo el bienestar animal, al igual que la preocupación para poder desarrollar una reproducibilidad de los estudios. En este apartado, se ha conseguido un éxito muy elevado de cirugías, lo que hace pensar en la gran utilidad que puede llegar a tener la intervención de los roedores, consiguiendo cauterizar dichos vasos y que el animal pueda continuar viviendo sin ningún efecto colateral. Así mismo, se ha evaluado por primera vez la reproducibilidad longitudinal a través de una derivación arterio-venosa doble, indicando que se pueden generar con gran precisión parámetros cinéticos sin sesgo a largo plazo, mostrando al mismo tiempo que IDIF también puede generarse sin sesgo pero con mayores incertidumbres intra-animal. Por lo tanto, este trabajo pretende dar respuestas a dichas afectaciones y aportar una solución concisa y práctica a la derivación arterial obteniendo resultados útiles para futuras investigaciones en medicina.

En segundo lugar, los niveles de glucosa en sangre han supuesto una problemática ampliamente conocida en el campo, por lo que era necesaria la estandarización y creación de nuevos modelos cuantitativos, esencialmente en estudios preclínicos que implican altos o bajos niveles de glucosa en sangre. La metodología propuesta en esta tesis permite la cuantificación del metabolismo cerebral mediante PET con FDG en modelos animales con un amplio rango de niveles de glucemia. Los métodos propuestos hasta la fecha únicamente permitían la estimación del metabolismo cerebral en animales con niveles de glucemia dentro de los rangos normales.

Los niveles de glucosa en sangre afectan directamente a la captación de ciertos radiofármacos como la anteriormente mencionada FDG, los cuales compiten con esta, impidiendo la correcta obtención de imágenes para el estudio de diversas afectaciones corporales. Es por eso por lo que la recreación de modelos de ayuno, hiperglucemia e hipoglucemia fueron necesarios para poder llevar a cabo la implementación de un método de estimación del metabolismo cerebral en un amplio rango de niveles de glucemia. En este ámbito es conocido que el SUV cambia con el nivel de glucemia, siendo este un gran complemento diagnóstico de los pacientes con diversas afectaciones, como podría ser el caso de los déficits cognitivos o los tumores cerebrales. La gran problemática viene acompañada del ayuno prolongado, lo que conduce a una pérdida de peso, viéndose afectados tratamientos y el bienestar de los roedores. También es interesante hacer mención al efecto de la anestesia en el incremento de los niveles de glucosa, en lo que podemos constatar que provoca un ligero aumento de los niveles en sangre, siendo menor su efecto sobre la liberación de insulina. Con todo esto, se ha llegado a determinar que el metabolismo cerebral aumenta entre los roedores con hiperglucemia y los controles, representando un aporte válido para demostrar que la metodología del estudio cerebral debe tener unos estándares establecidos en la exploración de los sujetos con índices

extremos de glucemia o muy superiores a los normales, como pueden ser los sujetos diabéticos.

Por último, el desarrollo de nuevos tratamientos para tumores cerebrales necesitaba avanzar hacia técnicas que permitan conocer la biodistribucción y farmacocinética de los nuevos anticuerpos que se están empleando. En esta tesis se ha puesto en marcha una metodología de radiomarcaje de anticuerpos monoclonales que ha permitido comparar la biodistribucción de dos tratamientos antiVEGF a lo largo de la evolución del tumor.

El $^{89}$Zr abre un mundo de posibilidades para poder determinar, a largo plazo, la actuación de diferentes mAbs, siendo fundamental su uso en el ámbito preclínico. El futuro de la medicina está íntimamente relacionado con la medicina personalizada, siendo el uso de los antiVEGF una posible opción terapéutica para el tratamiento de afectaciones como los gliomas. En este aspecto, las terapias en la actualidad aún tienen un enfoque de tercera línea de intervención, siendo las intervenciones, la radioterapia y la quimioterapia las opciones más utilizadas hasta la fecha. Con los datos obtenidos en este trabajo, se ha podido observar como, dependiendo del enfoque que se le quiera dar a la terapia, el uso de Bevacizumab o de Aflibercept pueden cambiar, ya que su tiempo en circulación varía, siendo más acertado el uso de uno u otro dependiendo de la evolución de la neoplasia. Aún así, otras investigaciones no demostraron beneficio cuando ambos se usaban como monoterapia, pero si se pudieron medir interacciones sinérgicas en combinación con otras terapias como las anteriormente mencionadas. Por supuesto existen limitaciones, las cuales están relacionadas con la necesidad de un mayor análisis de datos, como la inducción del tumor o la de implementar un estudio de ensayo. Aún así, ambos antiVEGF consiguieron penetrar en el tumor, en estadios distintos, pudiendo obtener un seguimiento amplio desde la inducción en el caso del Bevacizumab, gracias al estudio de sus biodistribuciones. Todo esto aporta un ápice de esperanza en la búsqueda de la terapia idónea para los tumores de carácter cerebral y como estos podrán mejorar la calidad de vida de los pacientes, al igual que su esperanza de vida.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

# CAPÍTULO VIII: CONCLUSIONES GENERALES

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

## CONCLUSIONES GENERALES

La presente tesis doctoral ha conducido al **desarrollo y optimización diferentes protocolos de PET cerebral preclínico que permiten una evaluación eficaz de nuevos radiofármacos en modelos animales de tumores cerebrales**.

Las conclusiones que se derivan de cada uno de los trabajos realizados son las siguientes:

- Se ha implementado un nuevo método de muestreo de la actividad en sangre arterial para estudios dinámicos de PET cerebral que ha demostrado ser una estrategia útil para monitorizar, en tiempo real y de una forma precisa y eficiente, la generación de AIF con alta tasa de muestreo y sin pérdida de volumen sanguíneo.
- Se ha aplicado dicho método de muestreo de la actividad en sangre arterial para estudios dinámicos de PET cerebral longitudinales, mostrando una alta repetibilidad inter-animal e intra-animal que permitió la generación de AIF con una alta reproducibilidad de las constantes cinéticas derivadas del análisis farmacocinético de la imagen PET.
- Se ha caracterizado en profundidad la influencia de los niveles de glucosa en sangre sobre la estimación del metabolismo cerebral mediante PET con FDG, lo que ha permitido implementar un nuevo método de cuantificación de PET cerebral válido para un amplio rango de niveles de glucosa en sangre.
- El uso de anticuerpos como el Bevacizumab y Aflibercept marcados con $^{89}Zr$ son un mecanismo válido para la implementación del InmunoPET en el tratamiento y seguimiento de los glioblastomas de alto grado. En este caso, ambos antiVEGF consiguen marcar el glioma una vez la barrera hematoencefálica se rompe por el crecimiento del tumor pero, a su vez, el Bevacizumab es una propuesta con mayor futuro terapéutico, ya que en los primeros estadios de la afectación ya es capaz de alcanzar el tumor.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

# LISTA DE PUBLICACIONES

**PUBLICACIONES INCLUIDAS EN LA PRESENTE TESIS DOCTORAL:**

- **CAPÍTULOS III y IV**: Rey-Bretal D, Moscoso A, Gómez-Lado N, Fernández-Ferreiro A, Silva-Rodríguez J, Ruibal Á et al. Feasibility of Longitudinal Brain PET with Real-Time Arterial Input Function in Rats. Mol Imaging Biol. 2021;23(3):350-360. (Factor de Impacto: 3.488; Posición: Q2). Artículo reproducido con permiso de SPRINGER NATURE.

- **CAPÍTULO V**: Rey-Bretal D, García-Varela L, Gómez-Lado N, Moscoso A, Piñeiro-Fiel M, Fernández-Ferreiro A et al. Quantitative brain FDG PET in rats beyond normal blood glucose levels. (PENDIENTE DE PUBLICACIÓN).

- **CAPÍTULO VI**: Rey-Bretal D, García-Varela L, Gómez-Lado N, Moscoso A, Ruibal Á, Aguiar P. Experimental PET/CT study of Bevacizumab and Aflibercept radiolabeled with $^{89}$Zr in Glioblastoma Rat Model. (PENDIENTE DE PUBLICACIÓN).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE EL PERÍODO DE TESIS DOCTORAL:**

- Seoane-Viaño I, Gómez-Lado N, Lázare-Iglesias H, Rey-Bretal D, Lamela-Gómez I, Otero-Espinar FJ et al. Evaluation of the therapeutic activity of melatonin and resveratrol in Inflammatory Bowel Disease: A longitudinal PET/CT study in an animal model. Int J Pharm. 2019;572:118713.

- Moscoso A, Rey-Bretal D, Silva-Rodríguez J, Aldrey JM, Cortés J, Pías-Peleteiro J et al. White matter hyperintensities are associated with subthreshold amyloid accumulation. Neuroimage. 2020;218:116944.

- Piñeiro-Fiel M, Moscoso A, Lado-Cacheiro L, Pombo-Pasín M, Rey-Bretal D, Gómez-Lado N et al. Is FDG-PET texture analysis related to intratumor biological heterogeneity in lung cancer? Eur Radiol. 2021;31(6):4156-4165.

- Castro-Balado A, Mondelo-García C, Barbosa-Pereira L, Varela-Rey I, Novo-Veleiro I, Vázquez-Agra N et al. Development and Characterization of Inhaled Ethanol as a Novel Pharmacological Strategy Currently Evaluated in a Phase II Clinical Trial for Early-Stage SARS-CoV-2 Infection. Pharmaceutics. 2021;13(3):342.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La patología cerebral abarca una gran diversidad de afectaciones entre las que se encuentran las neoplasias. En España, las neoplasias primarias del sistema nervioso central son la segunda causa de mortalidad pediátrica después de la leucemia. Con esta premisa, en la presente tesis doctoral se ha puesto en marcha un sistema de protocolización preclínica de cirugías extracorpóreas para estudiar la viabilidad de las derivaciones arterio-venosas dobles. Al mismo tiempo, se cuantificó el metabolismo cerebral con distintos niveles de glucosa para determinar el amplio rango del nivel de glucosa dependiendo de las condiciones. Finalmente, se indujeron modelos de glioblastoma mediante la inyección de células tumorales en la región frontal del cerebro con el objetivo de determinar si distintos antiVEGF serían terapias eficaces.