



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

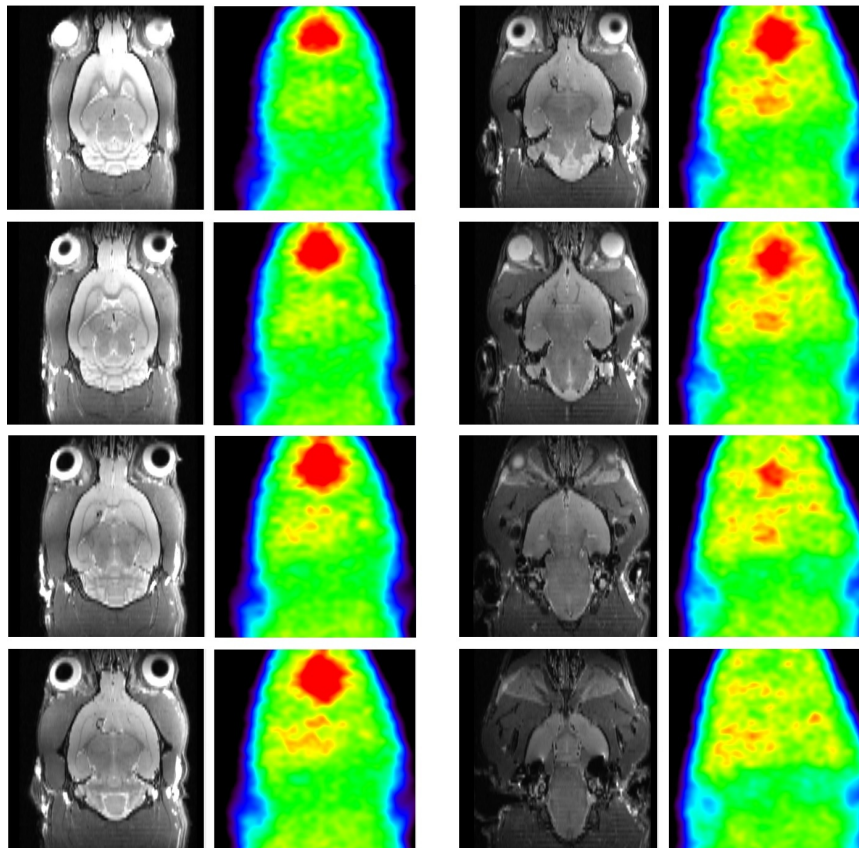
Máster en Neurociencia

Universidad de A Coruña

Valoración del tejido hipóxico mediante ^{18}F -FMISO PET en modelos de ratas con accidente cerebrovascular

Valoración do tecido hipóxico mediante ^{18}F -FMISO PET en modelos de ratas con accidente cerebrovascular

Evaluation of hypoxic tissue using ^{18}F -FMISO PET in a rat model with cerebral stroke



Noemí Gómez Lado

Trabajo de Fin de Máster

Curso 2015-2016

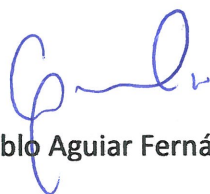
Dirigido por el Dr. Pablo Aguiar Fernández y el Prof. Álvaro Ruibal Morell

Don Pablo Aguiar Fernández, Doctor en Física e Investigador Plan I2C de la Xunta de Galicia, adscrito al Grupo de Imagen Molecular y Física Médica (GI 2133) de la USC y Don Alvaro Ruibal Morell, Catedrático de Radiología y Medicina Física de la Facultad de Medicina y Odontología de la USC y Jefe del Servicio de Medicina Nuclear del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela

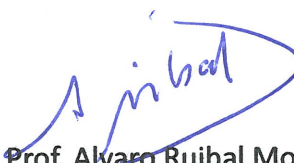
CERTIFICAN

Que el Trabajo de Fin de Máster, titulado “ *Valoración del tejido hipóxico mediante 18F-MISO PET en modelos de ratas con accidente cerebrovascular*” y cuya autor es *Doña Noemí Gómez Lado*, ha sido realizado bajo nuestra Tutela y Dirección, reuniendo las condiciones necesarias para ser expuesto y defendido ante al Tribunal correspondiente que ha de evaluarla.

Santiago de Compostela a 5 de julio del 2016



Fdo. Dr. Pablo Aguiar Fernández



Fdo. Prof. Alvaro Ruibal Morell

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Tomografía por emisión de positrones (PET).....	1
1.1.1 Radioisótopos emisores de positrones.....	2
1.1.2 Sistemas de producción de isótopos emisores de positrones	2
1.1.3 Aplicaciones clínicas del PET con FDG en neurología	3
1.1.4 ¹⁸ F-Fluoromisonidazol	4
1.2 Ictus o enfermedad cerebrovascular.....	5
1.2.1 Factores de riesgo.....	5
1.2.2 Tipos de ictus	7
1.3 Ictus hemorrágico.....	7
1.3.1 Hemorragia intracerebral.....	9
1.3.2 Modelos animales de hemorragia intracerebral	10
1.4 Justificación e impacto socio sanitario.....	11
2. Objetivos	13
3. Material y métodos	14
3.1 Especie utilizada: <i>Rattus norvegicus</i> (Sprague-Dawley)	14
3.2 Equipamiento PET: microPET/TAC Albira Bruker	14
3.3 Estudios previos para la elaboración del protocolo FMISO PET	15
3.3.1 Modelo de hemorragia mediante inyección de colagenasa VII	15
3.3.2 Modelo de hemorragia mediante inyección de sangre autóloga	18
3.4 Estudio longitudinal FMISO PET en modelos de inyección de colagenasa.....	19

3.5 Cuantificación de imágenes FMISO PET	22
3.5.1 Cuantificación ratio zona hemorrágica/sana	22
3.5.2 Cuantificación asimetría entre hemisferios	22
3.6 Análisis estadístico.....	23
4. Resultados	24
4.1 Nuevo protocolo para estudios FMISO PET en hemorragia.....	24
4.1.1 Modelo de inyección de colagenasa VII (experimento I)	24
4.1.2 Modelo de sangre autóloga (experimento II)	25
4.2 Estudio de la captación de FMISO en ratas hemorrágicas.....	25
4.2.1 Fusión FMISO PET/RM	25
4.2.2 Cuantificación de captación de FMISO	28
4.2.2.1 Cuantificación ratio zona hemorrágica/sana	28
4.2.2.2 Cuantificación de asimetría entre hemisferios	28
5. Discusión	29
6. Conclusiones	31
7. Agradecimientos	32
8. Bibliografía	34

1. Introducción

1.1 Tomografía por emisión de positrones (PET)

La tomografía por emisión de positrones (en inglés, PET) es una técnica de imagen molecular que permite obtener imágenes de procesos biológicos *in vivo* mediante el uso de moléculas o compuestos marcados con radioisótopos (radiofármacos) (Ruiz, 2007). De esta forma, el PET es una técnica que permite detectar y cuantificar la distribución de un radionúclido emisor de positrones y, por tanto, de una molécula en el interior del organismo (Martí, 1993b). Dichos radionúclidos se desintegran emitiendo positrones, con un período de semidesintegración corto (del orden de unos pocos minutos hasta varias horas), los cuales sufren posteriormente un proceso de aniquilación. Como consecuencia, se forman dos fotones que son emitidos simultáneamente en la misma dirección y en sentidos opuestos. La reconstrucción tomográfica de las imágenes PET se basa en la captación de dicha simultaneidad en la emisión por medio de técnicas de coincidencia, las cuales se conocen como colimación electrónica. El dispositivo de detección que se emplea en esta técnica se denomina tomógrafo PET y se encarga de registrar la radiación del radionúclido que ha sido ligado a una molécula de interés mediante una síntesis química. Un tomógrafo PET está diseñado para detectar los fotones procedentes de la reacción de aniquilación de los positrones con los electrones de la materia. De esta forma, la técnica PET nos permite conocer la distribución fisiológica o patológica de una molécula o un compuesto en un determinado organismo (Ruiz, 2007).

La utilización de las técnicas de reconstrucción tomográfica permite la obtención de imágenes representativas de la distribución tridimensional del radiofármaco en el interior del organismo a partir de la medida de proyecciones. La resolución alcanzada por los modernos sistemas PET es del orden de unos 5 mm. Además, en el PET es posible cuantificar en términos absolutos; es decir, determinar la concentración del radiofármaco dentro del organismo. La gran utilidad del PET radica en que ciertos procesos biológicos, como pueden ser las enfermedades oncológicas o neurológicas, son sensibles a esta técnica en estadios asintomáticos de la enfermedad, cuando todavía no existe evidencia de cambios anatómicos por Tomografía Axial Computerizada (TAC) o Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Sin embargo, la resolución anatómica del PET es muy limitada y hace esencial la realización de estudios morfológicos de alta resolución como el TAC o la RMN para determinar la localización exacta de una lesión. Actualmente, esta desventaja se ha podido reducir mediante la aparición de equipos híbridos PET/TAC (Townsend & Cherry, 2001).

1.1.1 Radioisótopos emisores de positrones

Un átomo está formado por un núcleo, en el cual se encuentran los protones (Z) y los neutrones (N), y una corteza donde los electrones están distribuidos en órbitas concretas. El átomo es estable cuando la relación entre neutrones y protones (N/Z) se mantiene dentro de unos determinados límites (Martí, 1993b). Se denominan isótopos radiactivos o radisótopos a los nucleidos inestables; es decir, en los que la relación de neutrones a protones no se encuentra dentro de los límites de estabilidad. Estos radioisótopos sufren transformaciones espontáneas que tienen lugar durante un determinado tiempo (característico de cada radisótopo) y se transforman en nucleidos estables (Stein, 1973). Dentro de los isótopos radiactivos, éstos pueden ser naturales, es decir, que se encuentran en la naturaleza, o artificiales, los cuales se producen artificialmente mediante cualquier proceso nuclear que perturbe la relación entre el número de protones y el de neutrones en los isótopos estables. Los núcleos emisores de positrones están caracterizados por un período de semidesintegración ultracorto, que oscila entre los 1.2 minutos del ^{82}Rb y las casi 2 horas del ^{18}F , lo que determina la proximidad entre el centro productor de isótopos (ciclotrón o generador) y del tomógrafo (Martí, 1993a). Para una determinada dosis se consiguen altas actividades específicas (actividad por unidad de masa), traducándose en la imagen en un mayor número de sucesos (más cuentas por unidad de tiempo). Durante el proceso de aniquilación el positrón, prácticamente en reposo, se combina (aniquila) con un electrón orbital, convirtiéndose la masa del electrón y del positrón en energía. La energía que aparece en la aniquilación es en forma de dos fotones de 511 keV cada uno, los cuales se emiten simultáneamente y en sentidos opuestos, pudiendo salir del organismo y ser detectados en el exterior. Los radionúclidos emisores de positrones que más se emplean en el PET son isótopos de elementos comunes en el organismo (C, O, N y F) y, por ello, son apropiados para el marcaje de moléculas y llevar a cabo estudios *in vivo*. Los emisores de positrones se diferencian de los componentes biológicos estables en que por ser radioactivos es posible detectarlos desde el exterior. Sin embargo, el período de semidesintegración suele ser muy corto. Por ello, el emisor de positrones más empleado es el ^{18}F al presentar un período de semidesintegración de alrededor de unos 108 minutos.

1.1.2 Sistemas de producción de isótopos emisores de positrones

En Medicina Nuclear se utilizan radionúclidos de origen artificial que se obtienen bombardeando núcleos de átomos estables con partículas subatómicas (neutrones, protones, etc.) causando reacciones nucleares y convirtiendo núcleos estables en inestables (radiactivos).

Los métodos o dispositivos usados para producir radionúclidos son los reactores nucleares, los aceleradores de partículas (lineales, ciclotrones...), el fenómeno de fotodesintegración y los denominados generadores. Los radionúclidos de interés se pueden clasificar en dos grupos (Martí, 1993a): aquellos producidos directamente por el bombardeo de átomos estables (isótopos de nitrógeno, carbono, oxígeno, flúor o boro) con protones o deuterones (cuyo núcleo está constituido por un protón y un neutrón) mediante el empleo de un ciclotrón; y aquellos producidos en un generador, en el cual se emplea una pareja de radionúclidos padre-hijo que permite la separación y extracción del hijo mediante la desintegración del radionúclido padre. El ciclotrón es un acelerador cíclico, en el cual una partícula cargada puede recibir una serie de aceleraciones pasando muchas veces a través de una diferencia de potencial relativamente pequeña, la trayectoria de la partícula se mantiene circular al aplicar un campo magnético adecuado (Martí, 1993a). El ciclotrón está formado esencialmente por un cilindro hueco y corto, en el cual se ha hecho el vacío y está dividido en dos secciones que están separadas por una rendija (Stein, 1973). Las dos secciones se encuentran alojadas en el interior de un cilindro metálico y están situadas entre los polos de un electroimán. Las partículas, procedentes de una fuente de iones, se introducen entre las dos secciones que están conectadas a un generador de corriente alterna de alta frecuencia. Si suponemos que el ión es positivo y una de las secciones tiene carga negativa, el ión será atraído por ella, penetrando en la misma. A causa del campo magnético, perpendicular a la base del cilindro, el ión describirá un semicírculo. Si durante el tiempo en que la partícula permanece en dicha sección se invierte la fase de la tensión aplicada, el ión será acelerado en dirección hacia la otra sección, en cuyo interior describirá un semicírculo de mayor diámetro que el anterior, por haber aumentado la velocidad. Cuando las partículas se aproximan a la periferia del cilindro, pueden extraerse a través de una ventana por medio de un campo eléctrico auxiliar y utilizarse para bombardear una sustancia.

1.1.3 Aplicaciones clínicas del PET con FDG en neurología

La Fluorodeoxiglucosa (^{18}F -FDG o FDG) es un trazador que puede entrar fácilmente en las células por medio de transportadores de glucosa (Sánchez & Fernández, 2012). Tras su entrada en la célula, dicho trazador sufre sólo el primer paso de la glucólisis, es decir, se fosforila debido a la acción de la enzima hexoquinasa y luego se acumula en la célula al no poder seguir siendo metabolizado. La FDG es un marcador de metabolismo glicídico celular, por lo que se suele emplear en el estudio de la patología tumoral y en el del metabolismo cerebral de la glucosa. De esta forma, este trazador permite obtener información funcional y metabólica del cerebro (Planas, 2014) estudiando *in vivo* la tasa de utilización de glucosa a través de la

acumulación de radioactividad en el cerebro. Los estudios PET con FDG se suelen llevar a cabo para la detección de múltiples demencias (Shea *et al.*, 2015) y para la localización del foco de la epilepsia (Sarikaya, 2015). Además de los usos extendidos del PET con FDG en deterioro cognitivo y en epilepsia, en pacientes con isquemia cerebral se ha descrito que en el núcleo isquémico el consumo de glucosa cae, mientras que en la zona de penumbra el consumo de glucosa aumenta (Planas, 2014). Dicho aumento viene dado por una mayor demanda metabólica, aunque posteriormente se produce una caída temprana del consumo de glucosa.

1.1.4 ^{18}F -Fluoromisonizadol

El Fluoromisonidazol (^{18}F -FMISO o FMISO) es un trazador usado para la detección de tejidos hipóxicos *in vivo* mediante el empleo del PET (Lee & Scott, 2007; Lopci *et al.*, 2014), obteniendo como resultado una imagen que muestra regiones con una reducida concentración de oxígeno (Rajendran & Krohn, 2005). Se trata de un compuesto lipofílico capaz de penetrar en las células viables mediante difusión pasiva, donde es reducida por la enzima nitrorreductasa (NTR) que transfiere un electrón al grupo nitro del nitroimidazol. En condiciones de hipoxia, en las que la presión parcial de oxígeno es inferior a 10 mmHg ($p\text{O}_2 < 10 \text{ mmHg}$), no se produce la reoxidación del compuesto, por lo que éste sufre la transferencia de un segundo electrón resultando un metabolito intermedio reactivo capaz de unirse a las proteínas intracelulares y al ARN, lo que provoca su atrapamiento celular (ver Figura 1). Sin embargo, este proceso es reversible, de manera que cuando las células se encuentran bien oxigenadas, este trazador no se reduce y puede fluir libremente de nuevo en el medio extracelular. Además, hay que tener en cuenta que como la FMISO sólo se acumula en las células hipóxicas con enzimas nitrorreductasas funcionales, el trazador se acumula en células viables pero no en células necróticas muertas (Lee & Scott, 2007).

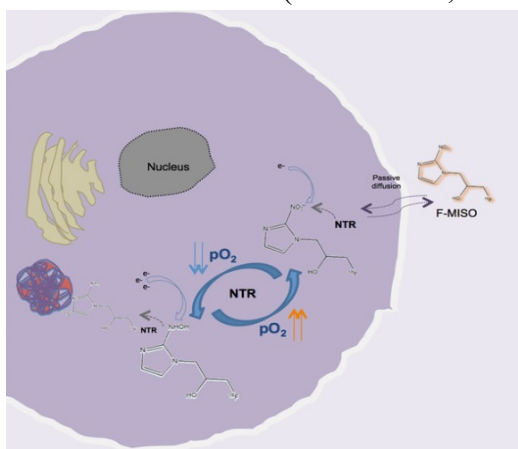


Figura 1. Mecanismo celular de captación y retención de FMISO bajo hipoxia. Lopci *et al.* (2014).

Los procesos mencionados anteriormente son relativamente lentos debido a la retención selectiva de FMISO en el tejido hipóxico que requiere un período de captación de entre 2 y 4 horas después de la inyección intravenosa (Lopci *et al.*, 2014). Además, a pesar de este período de absorción, la acumulación del trazador suele ser baja (excepto en el lumen intestinal (Padhani *et al.*, 2007)). El trazador FMISO es capaz de difundir libremente por la barrera hematoencefálica, por lo que puede ser capturado en el cerebro (Lee & Scott, 2007). Finalmente, el FMISO es metabolizado en el hígado y se excreta por el riñón y la vejiga. Hay que tener en cuenta que en el caso de hemorragias intracerebrales no se ha observado captación de FMISO en los tejidos adyacentes a la zona de la lesión (Hirano *et al.*, 1999).

1.2 Ictus o enfermedad cerebrovascular

La enfermedad cerebrovascular aguda o ictus incluye a todas aquellas enfermedades que afectan al cerebro y que están causadas por un trastorno de la circulación cerebral (Álvarez & Masjuan, 2013). En la actualidad, el ictus constituye uno de los problemas sociosanitarios más importantes en el mundo occidental. Esto es debido a su elevada incidencia (120000 casos cada año en España), su elevada mortalidad (10-15% en el primer año) y las secuelas que produce (Álvarez & Masjuan, 2013). Así, los ictus son la principal causa de incapacidad en las personas adultas, la primera causa de muerte en las mujeres españolas y la segunda causa a nivel general.

1.2.1 Factores de riesgo

Los ictus pueden ocurrir a cualquier edad (siendo más frecuentes en las personas mayores) y pueden ser producidos por múltiples causas, que suelen ser diferentes según la edad del paciente (Álvarez & Masjuan, 2013). En los casos de pacientes mayores de 55 años las causas más frecuentes de ictus son la hipertensión arterial, la diabetes mellitus, la hipercolesterolemia, el tabaco, la obesidad y las enfermedades del corazón. Por otro lado, los ictus sufridos por pacientes de menos de 55 años (como mínimo, 1 de cada 5 ictus) guardan relación con malformaciones congénitas arteriales, enfermedades hereditarias y enfermedades raras como la disección carotídea.

Los factores de riesgo cerebrovascular se clasifican en dos grupos: modificables y no modificables. Dentro de los factores de riesgo no modificables cabe destacar la edad, el sexo, la raza, los factores genéticos u hereditarios, la localización geográfica y la estación o clima. Por

otro lado, en el grupo de los factores de riesgo modificables cabe destacar la hipertensión arterial, el tabaquismo u la exposición al tabaco, el alcoholismo, la fibrilación auricular, la diabetes mellitus, la dieta pobre u inadecuada, la inactividad física y la obesidad. La hipertensión arterial es el factor de riesgo más importante para sufrir un ictus y así los pacientes hipertensos tienen 4 veces más posibilidades de sufrir un ictus que aquellos con presión arterial normal. Por otro lado, las personas que fuman tienen el doble de riesgo de sufrir un ictus que las no fumadoras. Este riesgo es dependiente de la cantidad fumada, tanto en fumadores activos como pasivos. El riesgo disminuye drásticamente a los 2 años de dejar de fumar. Además, la ingesta elevada y mantenida de alcohol (alcoholismo) y también la intoxicación etílica aguda son factores de riesgo del ictus. El consumo ligero-moderado tiene un efecto protector del ictus isquémico. Este consumo moderado es equivalente a dos bebidas alcohólicas al día en varones (cerveza o vino tinto) o una en las mujeres.

Hay enfermedades del corazón (cardiopatías) que aumentan el riesgo de padecer un ictus isquémico, tales como la enfermedad coronaria, la hipertrofia del ventrículo izquierdo o la insuficiencia cardíaca congestiva. Otras cardiopatías aumentan el riesgo de ictus embólicos. La fibrilación auricular es la arritmia más frecuente y las personas que padecen esta enfermedad tienen un riesgo del 4 al 12% cada año de sufrir un ictus. Es la causa principal de ictus cardioembólicos y representa como mínimo un 15% de todos los ictus. Los ictus producidos por fibrilación auricular son los que conllevan una mayor intensidad del déficit neurológico y una mayor mortalidad precoz.

Entre otros factores de riesgo cabe citar que la diabetes mellitus incrementa el riesgo de ictus isquémico entre 1.8 y 3 veces. Además, las personas diabéticas presentan ictus más graves y con un peor pronóstico. Por otro lado, los niveles elevados de colesterol en la sangre favorecen la generación de placas de ateroma en las arterias cerebrales. Su relación no es tan intensa con el ictus como con el infarto de miocardio, pero se sabe que los fármacos que disminuyen el colesterol son eficaces en la prevención del ictus.

Entre los hábitos de vida, es importante recordar que una parte importante de la población hace una vida sedentaria y tiene sobrepeso. Además, el consumo de drogas (especialmente de heroína y cocaína) favorece la aparición de ictus tanto isquémicos como hemorrágicos, ya que aumentan la presión arterial y producen alteraciones a nivel de la pared arterial y también del corazón. No obstante, son más frecuentes los ictus relacionados con el consumo de tabaco y el alcohol que con las drogas.

Finalmente, existen otros factores de riesgo modificables en los que la relación no es tan clara como los factores de riesgo citados anteriormente. Así, el riesgo de ictus en la población con migraña es más del doble. Dicho riesgo es 3 veces mayor en mujeres de menos de 45 años y 8 veces mayor en las que toman anticonceptivos orales. Otros factores de riesgo potencialmente modificables son las apneas del sueño, la hipercoagulabilidad y el estrés.

1.2.2 Tipos de ictus

Según la naturaleza de la lesión cerebral distinguimos dos grandes tipos de ictus: ictus isquémico o infarto cerebral (está causado por una obstrucción de una arteria que irriga a una parte de nuestro cerebro) e ictus hemorrágico o hemorragia cerebral (se produce cuando una arteria de nuestro cuerpo se rompe, lo que hace que la sangre salga fuera del vaso y se localice en el interior del cerebro, dañándolo).

El ictus isquémico es mucho más frecuente que el hemorrágico, representando un 85% de todos los ictus (Álvarez & Masjuan, 2013). Dependiendo de lo que duren los síntomas se puede hablar de ataque isquémico transitorio, cuando desaparecen por completo en menos de 24 horas, o de infarto cerebral, cuando duran más de 24 horas o dejan una lesión cerebral definitiva. Esta lesión se corresponde con la zona del cerebro que queda muerta tras haberse quedado sin riego cuando una arteria queda obstruida por un trombo. Los ictus isquémicos pueden estar provocados por una trombosis o una embolia. La trombosis cerebral ocurre cuando el trombo que obstruye la arteria cerebral se produce en una arteria del cerebro o del cuello por las que llega la sangre desde el corazón. Habitualmente guardan relación con el acúmulo de grasa en estas arterias (placas de ateroma) que van estrechándose progresivamente. En otras ocasiones las arterias cerebrales que se obstruyen son de un tamaño muy pequeño y tienen relación con años de evolución de hipertensión arterial o diabetes mellitus. En este caso los ictus isquémicos son de menor tamaño pero pueden también producir secuelas importantes. Por otro lado, en el caso de la embolia cerebral existe una oclusión de una arteria de nuestro cerebro, pero en este caso el trombo (denominado émbolo) proviene del corazón.

1.3 Ictus hemorrágico

El ictus hemorrágico u hemorragia cerebral puede dividirse en dos tipos dependiendo de la zona del cerebro en donde se localiza la sangre (ver Figura 2): hemorragia intracerebral (cuando la sangre se localiza dentro del encéfalo) y hemorragia subaracnoidea (cuando la

sangre se localiza en el espacio subaracnoideo; es decir, en el espacio que se encuentra entre el hueso del cráneo y el cerebro y que contiene líquido cefalorraquídeo).

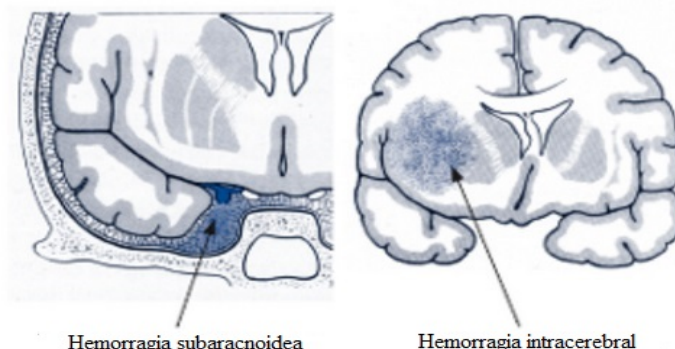


Figura 2. Tipos de ictus hemorrágicos. Imagen tomada y modificada de Álvarez & Masjuan (2013).

Las hemorragias intracraneales u ictus hemorrágicos son mucho menos frecuentes que los ictus isquémicos, ya que sólo representan del 10 al 15% del total del ictus (Álvarez & Masjuan, 2013). Se producen cuando una arteria del interior del cráneo se rompe y deja salir sangre al exterior, formándose un acúmulo de sangre o hematoma que daña el tejido cerebral afectado. Una característica común a todas ellas es su extrema gravedad. Dependiendo de la zona donde se rompa la arteria se distinguen tres tipos de hemorragias: hematoma intraparenquimatoso u hemorragia intracerebral, hemorragia subaracnoidea y hematoma subdural.

La hemorragia intracerebral se caracteriza porque el hematoma se localiza dentro del cerebro. La lesión cerebral se produce porque el hematoma lo lesiona directamente. Los síntomas dependerán de la zona del cerebro afectada.

La hemorragia subaracnoidea se caracteriza porque la rotura de la arteria se produce en la base del cráneo y la sangre se extiende por el espacio que rodea todo nuestro cerebro. El síntoma fundamental es el dolor de cabeza que se inicia de modo brusco. La causa principal es la rotura de un aneurisma cerebral.

El hematoma subdural se produce cuando el hematoma se localiza entre el hueso del cráneo y una de las capas de la meninge. Los síntomas que produce son consecuencia de la compresión de ese hematoma sobre el cerebro. La causa más frecuente son traumatismos craneales que pueden ser leves y que generalmente ocurren en personas ancianas. Los vasos subdurales son muy susceptibles a los traumatismos ya que el desplazamiento del cerebro (flotando en el líquido cefalorraquídeo dentro del cráneo) puede romper los vasos que discurren por el espacio subdural (Coca *et al.*, 2007). Dependiendo de la cantidad de sangre acumulada puede tratarse de pequeños coágulos a lo largo de la superficie cerebral o de hematomas de gran tamaño.

1.3.1 Hemorragia intracerebral

La hipertensión arterial es la causa principal de la hemorragia intracerebral en personas mayores de 45 años y uno de los factores precipitantes de las hemorragias intracerebrales de otras causas. Las cifras de presión arterial elevadas de modo crónico dan lugar a que las paredes de las pequeñas arterias intracraneales se vayan endureciendo e incluso presenten pequeñas dilataciones microscópicas. Estas pequeñas dilataciones pueden romperse en un momento dado y desembocar en una hemorragia. Este tipo de hematomas se producen con mayor frecuencia en las zonas profundas del cerebro como los ganglios basales, el tronco y el cerebelo.

La segunda causa más frecuente es una enfermedad llamada angiopatía amiloide cerebral, que afecta exclusivamente a las arterias del cerebro y es típica de personas mayores. Se caracteriza por el depósito de una proteína amiloide en la pared de las arterias intracraneales. La pared de los vasos se vuelve más frágil debido a dicha causa, facilitando la rotura de las arterias. A diferencia de las hemorragias hipertensivas, éstas se localizan en la parte más superficial del cerebro. Desgraciadamente, este tipo de hemorragias tienden a repetirse con el paso de los meses y no existe tratamiento para evitarlas. Esta enfermedad suele estar asociada a la enfermedad de Alzheimer.

En tercer lugar por orden de frecuencia lo ocupan las hemorragias secundarias a la toma de anticoagulantes. Las hemorragias producidas por Sintrom aparecen más frecuentemente cuando sus niveles de eficacia son excesivos; es decir, cuando la sangre está más líquida de lo que debería. Una de las mayores ventajas de los nuevos anticoagulantes orales (dabigatrán, rivaroxabán y apixabán) es que su riesgo de sangrado intracraneal es la mitad de 1 constatado con el Sintrom. Otras causas menos frecuentes de hemorragia intracerebral son el consumo de drogas, las enfermedades de la sangre caracterizadas por tener la coagulación alterada y favorecer la aparición de hemorragias (como pueden ser la hemofilia u algunas leucemias), las enfermedades del hígado graves (como la cirrosis), y la rotura de malformaciones vasculares.

Hay que tener en cuenta que también pueden producirse lesiones en el parénquima cerebral que ocasionen una hemorragia. Las lesiones directas del parénquima cerebral pueden ser debidas a un traumatismo con formación de hematomas (contusión) o bien por la penetración de un objeto (laceración) (Coca *et al.*, 2007).

1.3.2 Modelos animales de hemorragia intracerebral

El uso de modelos experimentales es imprescindible para estudiar cómo se producen u evolucionan las enfermedades y, sobre todo, para estudiar el efecto de posibles fármacos u otras terapias que puedan ser aplicados en humanos (Rosell, 2014). El parecido anatómico y fisiológico entre el cerebro humano y el de algunos vertebrados hace que en estos últimos se hayan desarrollado multitud de modelos *in vivo* de hemorragia cerebral. Concretamente, han sido los modelos en roedores (ratas y ratones) los más utilizados por su menor coste, mejor manejo y mayor aceptación ética. Los inconvenientes de utilizar estas especies son las diferencias anatómicas y funcionales con el cerebro humano (los roedores poseen cerebros sin circunvoluciones), así como el reducido tamaño y volumen de muestras biológicas que se pueden obtener de ellos.

La mayor parte de los estudios experimentales utilizan modelos con machos ya que los estrógenos tienen un efecto protector durante el período fértil de las hembras, y este hecho introduce una mayor variabilidad en el modelo. En general, se utilizan individuos jóvenes, pero con un tamaño mínimo que permita el abordaje quirúrgico con comodidad y el desarrollo del modelo. En cualquier caso, es importante llevar a cabo el estudio con individuos de edades similares (Rosell, 2014).

La hemorragia intracerebral sigue siendo el ictus con peor pronóstico y con menos opciones terapéuticas. La mortalidad en la fase aguda, así como la morbilidad asociada a la hemorragia intracerebral son muy elevadas (Kirkman *et al.*, 2011; Manaenko *et al.*, 2011). El enfoque quirúrgico no ha sido satisfactorio y el tratamiento neuroprotector o con fármacos procoagulantes no ha demostrado eficacia. Actualmente, la mejor alternativa terapéutica es ofrecer al paciente el mejor cuidado neurológico en la fase aguda de la enfermedad. Por todo ello, urge la necesidad de incrementar el número y calidad de estudios preclínicos en esta patología utilizando modelos animales que intentan mimetizar el cuadro fisiopatológico de la hemorragia intracerebral en condiciones controladas.

Actualmente, existen principalmente dos modelos animales de hemorragia intracerebral. Por un lado, el modelo de inyección de sangre autóloga, que es útil principalmente para el estudio del efecto masa y el efecto tóxico de la sangre en el parénquima cerebral. Por otro lado, el modelo de inyección de colagenasa que permite inducir una lesión vascular que deriva en un sangrado intraparenquimal que conduce a la formación de un hematoma (Rosenberg *et al.*,

1990). Ambos modelos son ampliamente utilizados, variando el modelo elegido en función del estudio a realizar.

El modelo de inyección de sangre autóloga fue uno de los primeros modelos de hemorragia intracerebral desarrollados (Kirkman *et al.*, 2011). En este modelo, la sangre se toma de un vaso sanguíneo superficial y a continuación se inyecta estereotáxicamente en el cerebro, normalmente en el cuerpo estriado. Este sencillo modelo es clínicamente relevante ya que refleja directamente la rápida acumulación de sangre intraparenquimatosas observada en el entorno clínico y permite el control del volumen del hematoma.

El modelo de inyección de colagenasa bacteriana en los ganglios basales de la rata provoca la ruptura de la lámina basal de los vasos sanguíneos. En dicho modelo, el sangrado comienza alrededor de 10 minutos después de la inyección, pero el desarrollo del hematoma se produce lentamente entre 4 y 24 horas más tarde. Una ventaja de este sencillo y reproducible modelo es que la hemorragia se produce a partir de los vasos *in situ* y que puede imitar la expansión del hematoma (Kirkman *et al.*, 2011). Además, el modelo de inyección de colagenasa bacteriana es más simple que la inyección de sangre autóloga. Finalmente, la inyección de colagenasa causa lesiones graves con secuelas neurológicas permanentes sin recuperación espontánea, similar a lo observado en el contexto clínico (Manaenko *et al.*, 2011).

1.4 Justificación e impacto socio-sanitario

El ictus es una enfermedad que presenta un impacto sociosanitario enorme (Álvarez & Masjuan, 2013). Se ha calculado que cada 5 segundos una persona sufre en el mundo un ictus. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) los ictus representan la tercera causa de muerte en el mundo occidental, la primera causa de discapacidad física en las personas adultas y la segunda de demencia detrás de la enfermedad de Alzheimer, además de ser la primera causa de epilepsia en el anciano y una causa frecuente de depresión.

Cada año 15 millones de personas en el mundo sufren un ictus. De éstas, 5 millones mueren y otros 5 millones quedarán con una discapacidad permanente. El ictus es el responsable de una de cada 10 muertes, pero representa la causa más importante de morbilidad y discapacidad a largo plazo. En España, se produce una muerte por ictus cada 15 minutos. A pesar de que nuestro país se encuentra entre aquellos que tienen una mortalidad más baja tanto para hombres como para mujeres en comparación con países del Norte de Europa como Holanda, Suiza,

Irlanda, Islandia y los países nórdicos, el ictus continúa siendo la segunda causa de muerte en la población española y la primera causa de muerte en la mujer.

Los ictus ocurren más frecuentemente en personas mayores de 65 años. Sin embargo, pueden ocurrir a cualquier edad. Así, en los últimos años, se ha detectado un aumento del número de ictus que ocurren en pacientes menores de 55 años. Aproximadamente un 10% de los ictus ocurren en personas jóvenes. Este aumento del ictus en jóvenes se está produciendo por un mal control de los factores de riesgo vascular asociado a unos malos hábitos de vida.

2. Objetivos

Los objetivos de este Trabajo de Fin de Máster (TFM) fueron los siguientes:

- Desarrollar una nueva aplicación de la técnica FMISO PET para evaluar la presencia de tejido cerebral hipóxico en modelos de ratas con hemorragia intracerebral generada mediante la inyección de sangre autóloga o bien mediante la inyección de colagenasa VII.
- Utilizar dicha técnica para localizar la ventana temporal post-hemorragia óptima para la correcta detección de la presencia de tejido hipóxico.
- Estudiar longitudinalmente la captación de FMISO cerebral post-hemorragia en el modelo de hemorragia intracerebral mediante inyección de colagenasa VII y compararlo con un grupo control.

3. Material y métodos

3.1 Especie utilizada: *Rattus norvegicus* (Sprague-Dawley)

En los laboratorios, se cría la variedad albina (rata blanca) de *Rattus norvegicus* para experimentación fisiológica e inmunológica (Purroy & Varela, 2003). Esta especie es el punto de partida de todas las ratas criadas para estudios científicos y como animal de compañía, que pueden ser de color blanco y negro o todo blanco (Clutton, 2002). A continuación se presentan las principales cepas no consanguíneas de *Rattus norvegicus* (Pérez *et al.*, 1999), de las cuales vamos a emplear la primera de ellas en nuestro estudio:

Sprague-Dawley (Figura 3a). Es una rata albina, de cabeza fina y cola larga (la cola y el cuerpo presentan la misma longitud), de tamaño mediano, crecimiento rápido, prolífica, dócil y fácil de manipular.

Wistar (Figura 3b). Es una rata también albina, de cabeza gruesa, con una cola más corta que el cuerpo, de orejas largas, tamaño medio, buen crecimiento, camadas reducidas, dóciles y fáciles de manipular.

Long-Evans (Figura 3c). Rata de cuerpo blanco con la cabeza, el cuello y los hombros negros. Presenta un tamaño más reducido que las anteriores y es más difícil de manipular.



Figura 3. Principales cepas de *Rattus norvegicus*: a) Sprague-Dawley; b) Wistar y c) Long-Evans. Imágenes tomadas de <http://www.janvier-labs.com/home.html>.

3.2 Equipamiento PET: microPET/TAC Albira Bruker

Para realizar los estudios PET/TAC se emplea el escáner microPET/CT Albira Bruker (ver Figura 4). Este equipo dispone de un detector PET con tres anillos de cristal centelleador continuo que cubre un campo de visión de 148 mm en axial y 80 mm en transaxial. El equipo permite generar imágenes PET con una resolución espacial de 1.2 mm en todo el campo y una sensibilidad del 10%. También dispone de un sistema TAC sobre el mismo eje, con un tubo de

rayos X de 50 kVp y un detector digital flat panel de 2400x2400 píxeles que permite obtener imágenes de 90 μm en un campo de visión de 70x70 mm. Como es lógico, el equipo genera estudios PET/TAC directamente fusionados, lo que supone una excelente ventaja para disponer de información anatómica y funcional en la misma imagen.



Figura 4. Equipamiento PET en el laboratorio de la Unidad de Imagen Experimental (UNIME) del Servicio de Medicina Nuclear del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

3.3 Estudios previos para la elaboración del protocolo FMISO PET

La idea de los estudios previos es localizar la ventana temporal post-hemorragia óptima para la correcta detección de la presencia de tejido hipóxico, realizando estudios de imagen sobre los dos modelos de hemorragia intracerebral bajo estudio. Debido a la aplicación original de este trazador FMISO en casos de hemorragia cerebral, desconocemos completamente cuál es el momento post-hemorragia en el que se puede producir un fenómeno de hipoxia asociado a la expansión de la hemorragia.

3.3.1 Modelo de hemorragia mediante inyección de colagenasa VII (experimento I)

a) *Inducción de la hemorragia intracerebral.* Se lleva a cabo un primer estudio empleando dos ratas de la cepa Sprague-Dawley, a las cuales se les induce una hemorragia intracerebral con el objetivo de detectar una zona hipóxica mediante el trazador FMISO. En nuestro caso, la hemorragia se lleva a cabo mediante la inyección de colagenasa VII, una enzima que se encarga de degradar el colágeno presente en la lámina basal de los vasos, lo que provoca que

éstos se debiliten y se rompan desencadenando una hemorragia (Rosenberg *et al.*, 1990). Este modelo presenta la ventaja de que permite la inducción de una lesión vascular y da lugar a un sangrado primario que conduce a una expansión del hematoma sostenida en el tiempo (Kirkman *et al.*, 2011). La colagenasa VII empleada se obtiene de *Clostridium histolyticum*.

Las ratas empleadas en este estudio son del sexo masculino y presentan un rango de peso determinado (entre 300 y 350 g). Los animales son condicionados a las instalaciones durante al menos 5 días antes de la cirugía. Esta adecuación es necesaria para evitar el estrés que induce un cambio de hábitat. Además, teniendo en cuenta el ciclo circadiano de *Rattus norvegicus*, los ejemplares se mantienen en oscuridad durante la noche (condiciones en las que se encuentran más activas) mientras que durante el día se mantienen en condiciones de luminosidad. Las ratas son anestesiadas con sevoflurano al 6% (durante la intervención se baja la concentración de anestesia al 4%) y a continuación se pesan antes de la intervención. A continuación, dichas ratas se colocan en el aparato estereotáxico (Rosenberg *et al.*, 1990), intentando que los animales no pierdan calor corporal mediante el empleo de un soporte térmico (la cola se mantiene cerca del cuerpo para que no pierda calor). Se limpia la superficie cefálica con betadine y se corta la piel a lo largo de la línea media antero-posterior. Se desgarran el tejido conjuntivo que une la piel al cráneo y se eliminan los restos que rodean al hueso, quedando éste expuesto. Una vez que la superficie craneal se encuentra totalmente limpia, se seca hasta que deja de supurar. Una vez hecho el corte, es necesario inyectar la colagenasa VII en el sitio de interés, en nuestro caso, en el cuerpo estriado derecho (Kirkman *et al.*, 2011; Leonardo *et al.*, 2012). En primer lugar, es necesario colocar una jeringa vacía en el inyector acoplado al brazo estereotáxico para localizar el punto de apertura en relación al punto Bregma. A continuación, se retira el brazo para abrir un trépano en el cráneo de la rata con ayuda de una broca especial sin sobrecalentar la zona. Una vez hecho el trépano, se coloca de nuevo el brazo estereotáxico y la jeringa Hamilton cargada con exceso de colagenasa VII. Es necesario desechar siempre una pequeña cantidad de enzima para asegurar que la solución rellena completamente toda la jeringa y que no hay burbujas. Una vez colocada la jeringa cargada en el brazo estereotáxico, se lleva a cabo la inyección de 1 μl de colagenasa VII en el cuerpo estriado derecho, teniendo en cuenta que se debe descender a una profundidad 0.5 mm mayor a la coordenada deseada para asegurar la formación de un espacio en el parénquima en el que depositar el volumen de enzima. Finalmente, se retrocede a la profundidad de inyección (5.5 profundidad). La inserción de la aguja en el tejido debe hacerse con cuidado en 10 min y luego se realiza la inyección de la colagenasa VII a una tasa de 0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Rosenberg *et al.*, 1990). Al terminar la inyección, se

deja la aguja en el lugar de administración durante 10 min para permitir la difusión del volumen de enzima y evitar su arrastre al retirar la aguja. Transcurridos los 10 min de reposo, se retira la aguja lentamente tardando en el proceso otros 10 min. Al finalizar la inyección se sella el trépano con cera ósea y se cierra el corte con sutura de 4 ceros. Una vez finalizada la cirugía, se realiza un estudio de RMN para confirmar que se ha producido la hemorragia.

b) Estudios FMISO PET. En la Figura 5 se muestra un esquema general del experimento que se plantea. Transcurrida una hora desde la intervención, la rata se sube a la unidad de imagen experimental con el objetivo de obtener las imágenes PET. En el laboratorio, la rata es introducida en una cámara conectada al isoflurano para anestésicarla. Mientras la rata se queda dormida, es necesario preparar la dosis de FMISO que se va a inyectar y medir su actividad en el activímetro. Una vez que la rata se encuentra dormida, le colocamos una boquilla conectada al isoflurano y le inyectamos el trazador en la cola (1h post-cirugía), siendo necesario medir la actividad del trazador que queda en la punta de la jeringa para conocer la cantidad que hemos inyectado (la actividad del mismo ronda los 300-500 μCi). Tras la inyección, dejamos a la rata en una jaula con disponibilidad de agua y comida tras una columna de plomo durante 2 horas. Una vez transcurrido dicho tiempo, volvemos a introducir a la rata en la cámara de gas para anestésicarla y, una vez dormida, la colocamos en la cama del microPET (3h post-cirugía). Los colmillos se introducen en un soporte para mantener sujeta la cabeza, luego se coloca la boquilla, se tapan los ojos con una gasa húmeda de suero, se coloca la tapa de la cama y finalmente se sujeta la cola con esparadrapo a la superficie de la misma. Una vez finalizada la colocación de la rata en el microPET, ésta se introduce en su interior y el proceso de captura de las imágenes dura aproximadamente 30 min, siendo necesario llevar a cabo la reconstrucción de las imágenes PET una vez finalizado. El estudio vuelve a realizarse a las 5 horas después de la cirugía empleando la misma dosis inyectada previamente. Posteriormente, se inyecta de nuevo el trazador FMISO y se realiza un PET a las 7 horas post-cirugía. Transcurridos 3 días desde la operación, vuelve a realizarse el estudio PET con FMISO para estudiar la evolución de la hemorragia cerebral y se reconstruyen las imágenes obtenidas. Paralelamente, se realizan estudios con el trazador FDG a los 5 y 6 días de la cirugía. En este caso, las ratas deben encontrarse en ayunas y durante el proceso se espera sólo 60 min entre la inyección del trazador y la introducción del animal en el microPET ya que su metabolismo y captación es mayor comparado con el trazador FMISO. Una vez obtenidas todas las imágenes, se lleva a cabo una reconstrucción de las mismas para poder compararlas y planificar el próximo estudio.

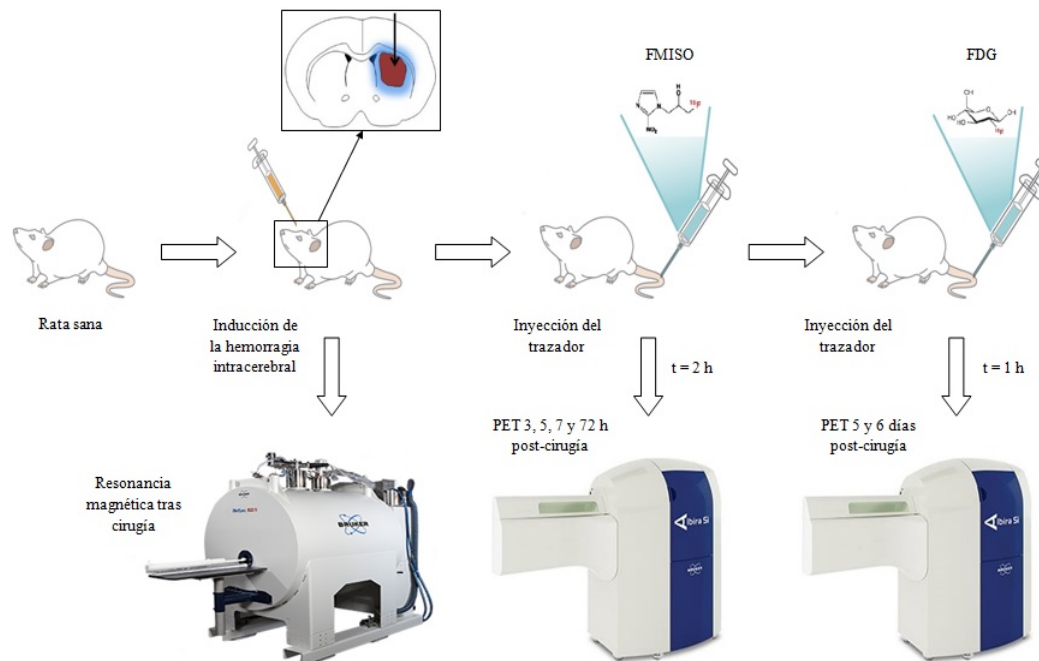


Figura 5. Esquema del estudio FMISO/FDG PET en un modelo animal de hemorragia intracerebral por inyección de colagenasa VII. Imágenes tomadas y modificadas de James & Gambhir (2012), Leonardo *et al.* (2012), Lee & Scott (2007) y de la página web oficial de Bruker Corporation (<https://www.bruker.com/>).

3.3.2 Modelo de hemorragia mediante inyección de sangre autóloga (experimento II)

a) *Inducción de la hemorragia intracerebral.* Una vez realizado el experimento anterior llevamos a cabo un estudio similar con dos ratas pero en otro modelo de hemorragia que se basa en la inyección de sangre autóloga. La cirugía es exactamente igual que en el caso anterior, pero ahora cogemos sangre de la cola e inyectamos 50-100 μL estereotáxicamente en el cuerpo estriado derecho a una tasa de 5-10 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Miller *et al.*, 1999; Leonardo *et al.*, 2012). Una vez terminada la cirugía, se realiza una resonancia magnética con el objetivo de asegurarnos de que existe hemorragia en nuestra zona de interés.

b) *Estudios FMISO PET.* En la Figura 6 se muestra un esquema de este segundo experimento. Transcurridas dos horas aproximadamente desde la intervención, la rata se sube a la unidad de imagen experimental con el objetivo de obtener las imágenes PET. En el laboratorio, la rata es introducida en una cámara conectada a isoflurano para anestésicarla. Mientras la rata se queda dormida, es necesario preparar la dosis de FMISO y medir su actividad en el activímetro. Una vez que la rata se encuentra dormida, le colocamos una boquilla conectada al isoflurano y le inyectamos el trazador en la cola (la actividad del mismo ronda los 150-200 μCi). Tras la inyección, dejamos a la rata en una jaula con disponibilidad de agua y comida tras una columna de plomo durante 2 horas. Una vez transcurrido dicho tiempo, colocamos a la rata en la cama

del microPET asegurándonos de que está bien sujeta a la boquilla y la introducimos en el mismo (4h post-cirugía). El proceso de adquisición de las imágenes dura aproximadamente 30 min y una vez finalizado se lleva a cabo la reconstrucción de las mismas. El estudio PET vuelve a realizarse a las 8 h tras la cirugía, siendo necesario volver a inyectar el trazador FMISO. Paralelamente se realiza un estudio a los dos y siete días después de la cirugía con el trazador FDG. En este caso el proceso es similar al utilizado con FMISO, pero el tiempo que pasa entre la inyección del trazador y el PET es de 60 min. Finalmente, se realizan resonancias magnéticas para llevar a cabo un seguimiento de la hemorragia intracerebral.

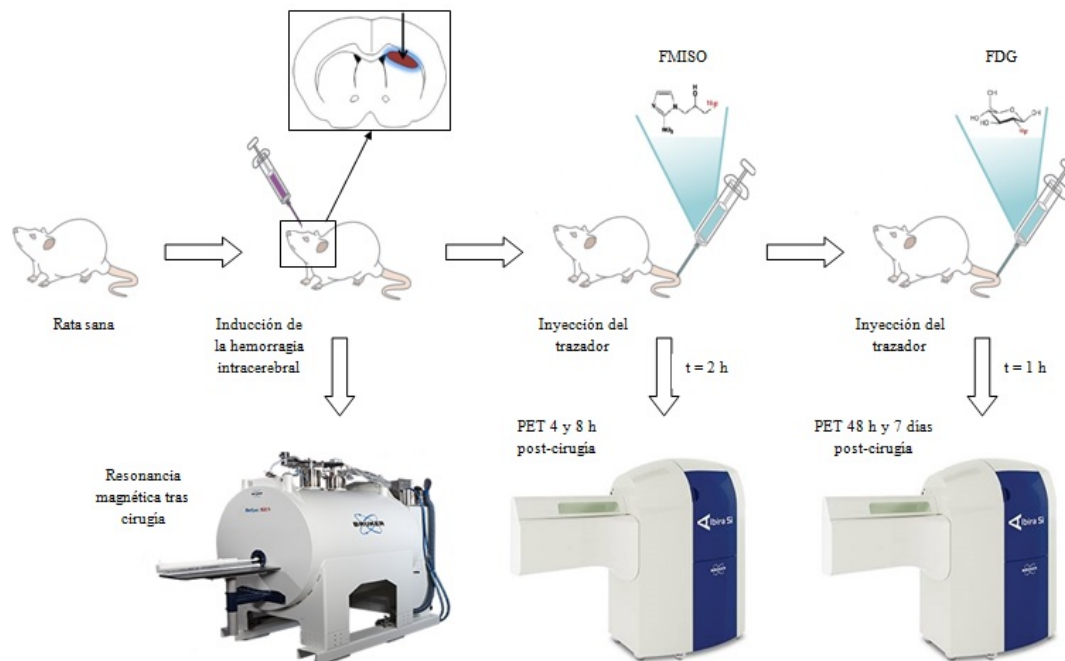


Figura 6. Esquema del estudio FMISO/FDG PET en un modelo animal de hemorragia intracerebral por inyección de sangre autóloga. Imágenes tomadas y modificadas de James & Gambhir (2012), Leonardo *et al.* (2012), Lee & Scott (2007) y de la página web oficial de Bruker Corporation (<https://www.bruker.com/>).

3.4 Estudio longitudinal de FMISO PET en ratas con hemorragia intracerebral mediante inyección de colagenasa VII

Una vez realizadas las pruebas previas para elaborar un protocolo, nos centramos en el modelo de inyección de colagenasa VII (que es el más realista) con el objetivo de valorar la presencia de la hipoxia asociada a la presencia de una zona hemorrágica. Los resultados previos permiten centrar nuestro estudio en una ventana temporal adecuada a dicha detección.

La metodología de este estudio es la misma que se empleó en el modelo de hemorragia cerebral mediante inyección de colagenasa VII y el esquema general del experimento se

muestra en la Figura 7. De esta forma, se induce una hemorragia intracerebral en el cuerpo estriado derecho de tres ratas mediante la inyección de la enzima colagenasa VII que, como indicamos anteriormente, se encarga de degradar el colágeno de los vasos sanguíneos provocando la ruptura de los mismos. Una vez que se induce la hemorragia, se realiza una resonancia magnética para confirmar la existencia de la misma en el animal. A continuación, los animales se trasladan a la Unidad de Imagen Experimental y se inyecta el trazador isotópico FMISO en la cola 2 horas antes de realizar el estudio. A continuación, las ratas permanecen durante dicho tiempo en reposo detrás de una columna de plomo para que el trazador sea captado específicamente. Una vez transcurrido dicho tiempo, los animales se introducen en el microPET. El proceso de adquisición de las imágenes dura aproximadamente 30 min y una vez finalizado se lleva a cabo la adquisición de las imágenes. El escaneado de los animales se llevó a cabo a las 20, 26, 44 y 50 horas post-cirugía para conocer la captación de FMISO por parte de las células cerebrales y poder detectar posibles zonas hipóxicas. Paralelamente se van realizando resonancias magnéticas periódicas con el objetivo de realizar un seguimiento de la hemorragia intracerebral. Una vez finalizado el estudio, las ratas son sacrificadas.

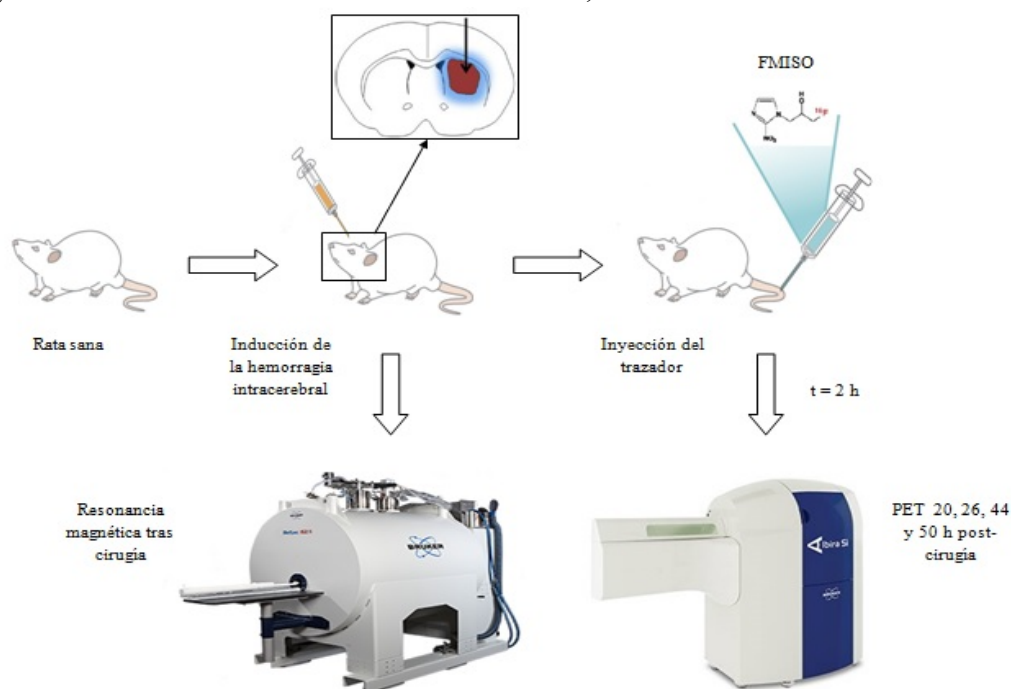


Figura 7. Esquema del estudio FMISO PET en un modelo animal de hemorragia intracerebral por inyección de colagenasa VII. Imágenes tomadas y modificadas de James & Gambhir (2012), Leonardo *et al.* (2012), Lee & Scott (2007) y de la página web oficial de Bruker Corporation (<https://www.bruker.com/>).

En este estudio se realizó una prueba control para poder comparar los resultados obtenidos (ver Figura 8). En este caso, seleccionamos tres ratas del sexo masculino y de un peso similar a las anteriores para llevar a cabo el estudio. Las ratas sanas fueron trasladadas directamente a la Unidad de Imagen Experimental desde el animalario del Laboratorio de Investigación en

Neurociencias Clínicas (LINC), en el cual se mantuvieron en las mismas condiciones que el resto. Una vez en el laboratorio, se inyecta el trazador FMISO en la cola de los animales y luego es necesario esperar 2 horas para que se distribuya por todo el cuerpo y sea captado específicamente por las células hipóxicas. Una vez transcurrido dicho tiempo, las ratas son introducidas en el microPET. El proceso de adquisición de las imágenes dura aproximadamente 30 min y una vez finalizado se lleva a cabo la adquisición de las imágenes cerebrales. Finalmente, los animales son sacrificados una vez que se ha llevado a cabo el estudio.

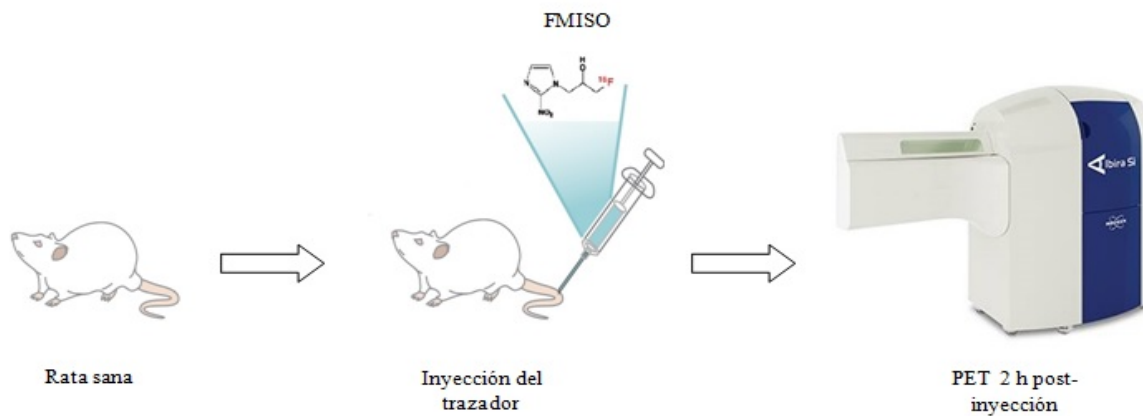


Figura 8. Esquema del estudio FMISO PET en ratas sanas. Imágenes tomadas y modificadas de James & Gambhir (2012), Leonardo *et al.* (2012), Lee & Scott (2007) y de la página web oficial de Bruker Corporation (<https://www.bruker.com/>).

En la Tabla 1 se muestra un cuadro resumen con todos los experimentos llevados a cabo en este trabajo. Como se puede ver, nuestro trabajo experimental involucra un total de 10 animales, 27 estudios FMISO PET, 8 estudios FDG PET y 13 RMNs.

Tabla 1. Esquema de los protocolos llevados a cabo.

Experimento	Modelo	Animales patológicos	Animales sanos	^{18}F -FMISO PET/TAC	^{18}F -FDG PET	RMN
Preliminar I	Colagenasa VII	2	-	1, 3, 5 y 70h	5d y 6d	Tras cirugía
Preliminar II	Sangre autóloga	2	-	4 y 8h	48h y 7d	Tras cirugía
Final	Colagenasa VII	3	-	18, 24, 40 y 48h	-	Tras cirugía y 7d
	Controles	-	3	2h	-	7d

3.5 Cuantificación de imágenes FMISO PET

Una vez realizados los ensayos, se lleva a cabo una reconstrucción de las imágenes PET y se analizan posteriormente con el programa Amide (<http://amide.sourceforge.net/>).

3.5.1 Cuantificación ratio zona hemorrágica/sana

Una vez realizado el nuevo estudio con el modelo animal de hemorragia cerebral por inyección de colagenasa VII, reconstruimos las imágenes PET/TAC obtenidas y las analizamos en el programa Amide. En este estudio se llevan a cabo diferentes análisis cuantitativos para conocer la captación media del trazador FMISO en los cerebros de las ratas tanto hemorrágicas (grupo patológico) como sanas (grupo control). En un primer análisis de las imágenes, establecemos unas ROIs (regiones de interés) manualmente, una localizada en la zona de la lesión y la otra en el límite entre el cerebro y el cerebelo (esta última actúa como zona de referencia) (ver Figura 9a). Se emplearon ROIs con geometría esférica, que se situaron sobre la zona de máxima captación de trazador, excepto en aquellos casos en los que la zona hipóxica era demasiado difusa, y fue necesario realizar una delimitación más irregular. Una vez dibujadas las ROIs calculamos la captación media del trazador en cada una de ellas. Este paso se lleva a cabo en cada una de las ratas y se calcula el valor del Ratio, que es la proporción entre el valor medio de captación de FMISO en la zona hemorrágica y en la zona sana. Finalmente se realiza la media geométrica del Ratio de cada uno de los grupos para poder comparar los datos obtenidos y se representa dicho parámetro en una gráfica con respecto al momento en el que se llevó a cabo la inyección del trazador FMISO.

3.5.2 Cuantificación asimetría entre hemisferios

En un segundo análisis, se establecieron unas nuevas ROIs y se volvieron a calcular los Ratios correspondientes. En este caso se establecieron unas ROIs que correspondiesen con el hemisferio cerebral derecho (hemorrágico) y con el hemisferio cerebral izquierdo (sano) (ver Figura 9b). Una vez dibujadas las nuevas ROIs, obtenemos el valor de captación media del trazador en cada una de las mismas de forma automática empleando el programa Amide y luego calculamos el Ratio, es decir, la proporción entre el valor medio de captación de FMISO en el hemisferio cerebral derecho (hemorrágico) y el del hemisferio cerebral izquierdo (sano). Finalmente, se calcula la media geométrica del Ratio de todos los grupos y se realiza una gráfica en la que se representa dicho parámetro con respecto al momento en el que se llevó a cabo la inyección del trazador FMISO.

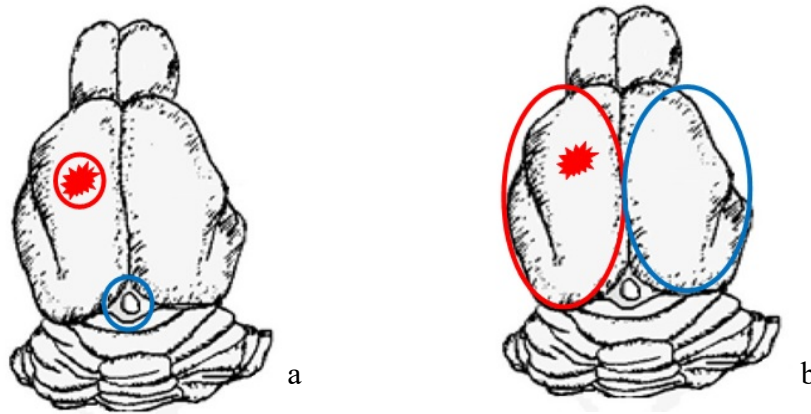


Figura 9. Esquema de la cuantificación de las imágenes FMISO PET: a) cuantificación ratio zona hemorrágica/sana y b) cuantificación de la asimetría entre hemisferios. En los esquemas se muestra la localización de las ROIs (en rojo, la zona hemorrágica y en azul, la zona de referencia). Imágenes tomadas y modificadas de <https://instruct.uwo.ca/anatomy/530/ratpix.pdf>.

3.6 Análisis estadístico

Llevamos a cabo un análisis estadístico con las medias geométricas de los Ratios que hemos obtenido para cada grupo. En dicho análisis, nuestras hipótesis son las siguientes:

$H_0 \rightarrow$ el Ratio de las ratas hemorrágicas y las sanas es similar

$H_1 \rightarrow$ el Ratio de las ratas hemorrágicas y las sanas es diferente

Para poder llevar a cabo dicho análisis, realizamos un t-Student para muestras con varianzas diferentes. El cálculo se ha realizado para muestras independientes porque el estudio no se ha llevado a cabo con las mismas ratas (para ser datos apareados, el estudio PET se tendría que haber realizado con las mismas ratas antes y después de la cirugía). Finalmente, tenemos en cuenta los p-valor de una cola porque este dato ya nos indica si debemos aceptar H_0 (p-valor > 0.05) o H_1 (p-valor < 0.05), empleándose el p-valor de dos colas en caso de que quisiésemos saber cómo es dicha diferencia.

4. Resultados

4.1 Nuevo protocolo para estudios FMISO PET en hemorragia

4.1.1 Modelo de inyección de colagenasa VII (experimento I)

En estos primeros ensayos, en los cuales se inyectó FMISO 1 hora post-cirugía, se puede apreciar una captación local en el PET realizado 5 horas post-cirugía (ver Figura 10b), que no se apreciaba en el PET realizado 3 horas post-cirugía (ver Figura 10a). En estudios con administración de FMISO en horas posteriores dicha acumulación local desaparece y se aprecia una cierta asimetría interhemisférica (ver Figura 10c y d). Por otro lado, los estudios FDG PET muestran una reducción en la captación del trazador por parte del hemisferio cerebral derecho, concretamente en la zona hemorrágica (ver Figura 10e y f). Este hecho puede deberse a la presencia de células muertas que ya no captan glucosa para realizar sus funciones metabólicas.

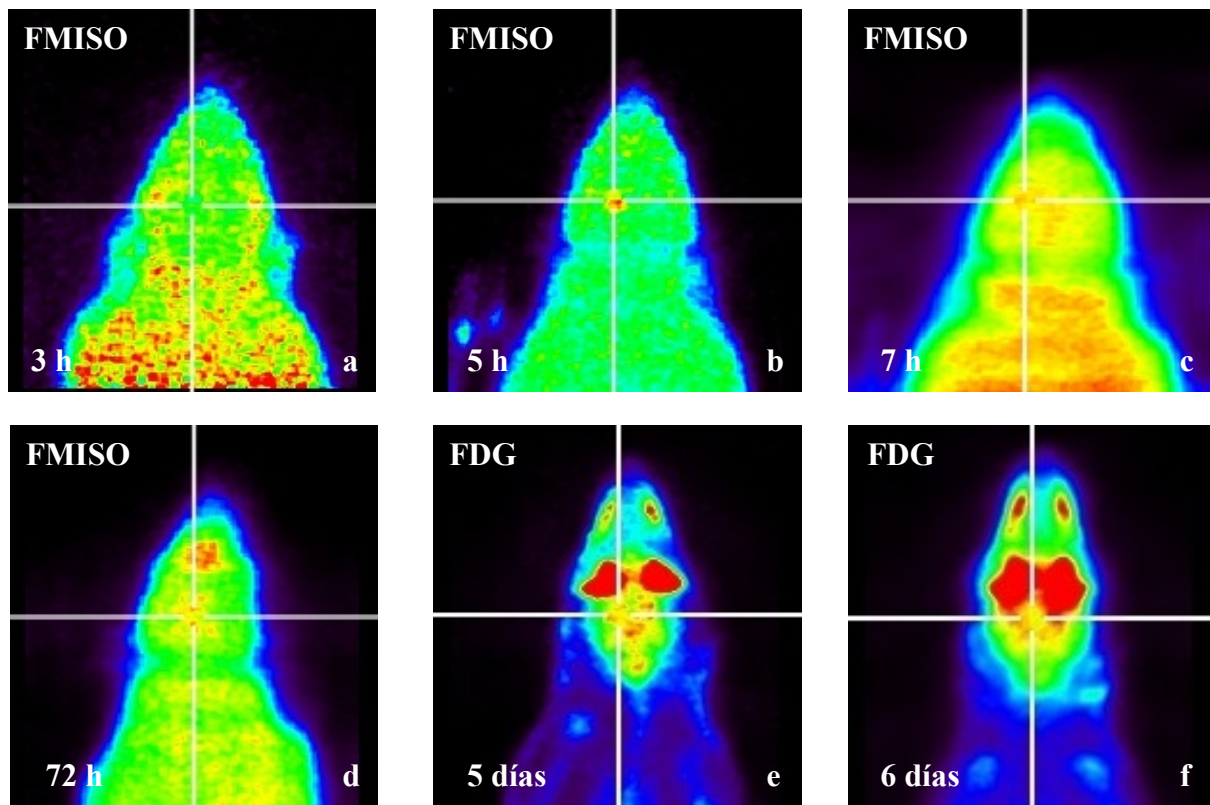


Figura 10. Resultados del modelo de inyección de colagenasa VII: a) imagen FMISO PET a las tres; b) cinco; c) siete, y d) 72 horas post-cirugía; e) imagen FDG PET a los 5 y f) 6 días post-cirugía. Hay que tener en cuenta que Amide intercambia el eje de coordenadas, por lo que la hemorragia aparece representada en el lado izquierdo de la imagen PET.

4.1.2 Modelo de sangre autóloga (experimento II)

En esta prueba no se observó ninguna captación local de FMISO, sino que se detectó una captación homogénea del mismo en todo el cerebro de los animales (ver Figura 11a y b). Además, hay que tener en cuenta que estos últimos resultados no variaron con el paso del tiempo. En este modelo no aparece una captación asimétrica de FMISO tal y como aparecía en el caso anterior. Con respecto al estudio FDG PET se observa un comportamiento cerebral normal a pesar de la presencia de la hemorragia (ver Figura 11c y d).

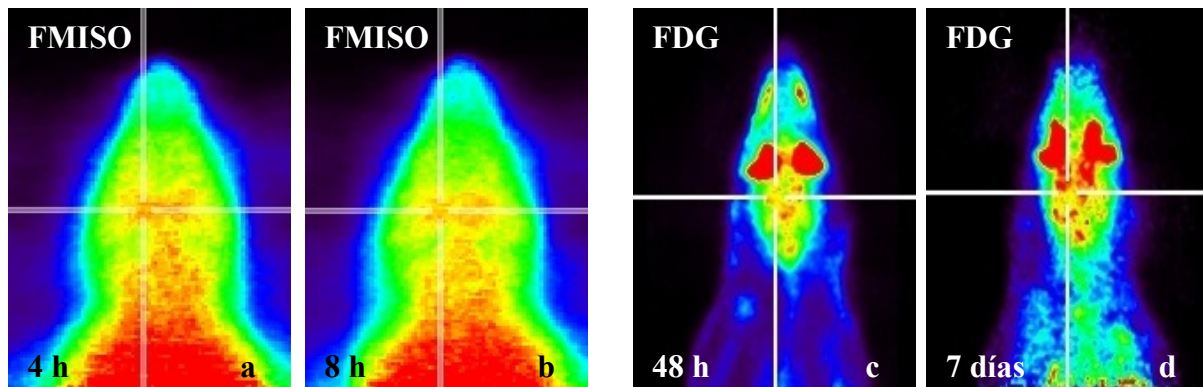


Figura 11. Resultados del modelo de inyección de sangre autóloga: a) imagen FMISO PET a las 4 horas y b) 8 horas post-cirugía; c) imagen FDG PET transcurridas 48 horas y d) 7 días desde la cirugía.

Los resultados de los estudios preliminares de FMISO PET muestran que el modelo de inyección de colagenasa es más adecuado que el de sangre autóloga. Además, debido a la confirmación de presencia del trazador en sangre coagulada sobre las 5 horas post-cirugía, debemos definir un protocolo para visualizar el fenómeno de hipoxia más allá de 12 horas.

4.2 Estudio de la captación de FMISO en ratas hemorrágicas

4.2.1 Fusión FMISO PET/RM

Las imágenes de fusión FMISO PET/RM permitieron confirmar que existe una alta captación de FMISO en el epitelio olfativo (tanto en las ratas sanas como en las hemorrágicas) y en la zona hemorrágica (sólo en el caso de las ratas en las que se les indujo la hemorragia intracerebral). En la Figura 12 aparece representado un mismo corte coronal en las tres ratas sanas (fila superior) y en las ratas hemorrágicas a las 18 horas de la cirugía (fila inferior). Se aprecia con claridad una alta captación de FMISO en el epitelio olfativo, que no está asociada con la presencia de la hemorragia, y una alta captación de FMISO en la zona hemorrágica, especialmente en dos de los tres animales patológicos. Dicha captación no se aprecia en

ninguno de los controles. En las ratas hemorrágicas también se aprecia una captación del trazador en regiones extracerebrales ligeramente superior a las ratas sanas.

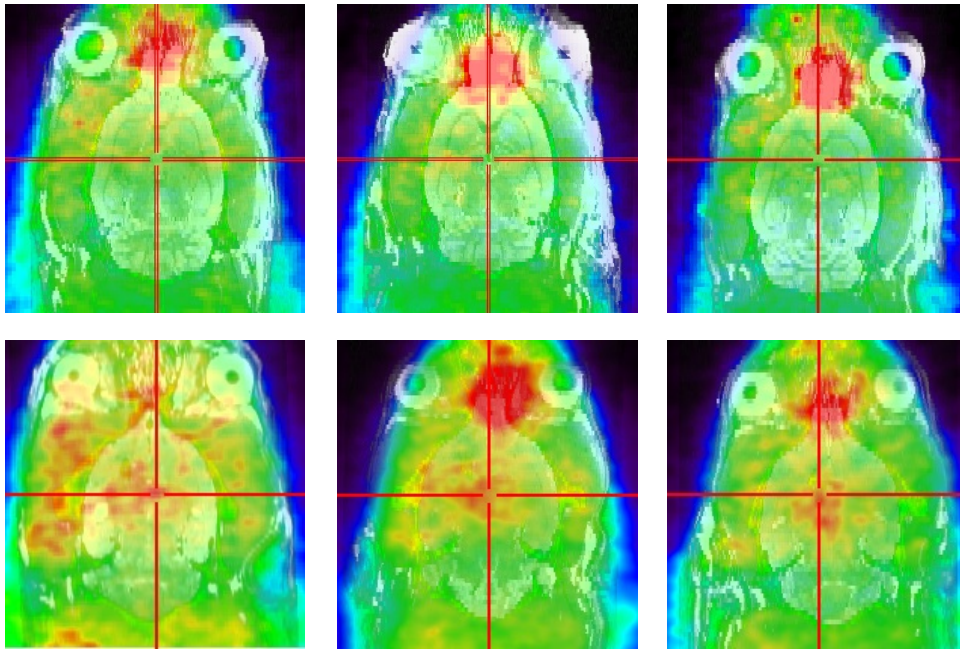


Figura 12. Imágenes PET/RM de las ratas sanas (fila superior) y de las ratas hemorrágicas una vez transcurridas 18 horas desde la cirugía (fila inferior), las cuales se han centrado en la zona hemorrágica.

Las imágenes FMISO PET fusionadas con las imágenes obtenidas de la RMN se emplearon para estudiar el progreso de la hemorragia intracerebral con el paso del tiempo. Los resultados fueron similares en las tres ratas y se comprueba la falta de captación de FMISO en el cuerpo estriado derecho en las ratas sanas con respecto a las hemorrágicas. La Figura 13 muestra el caso de una rata a las 18 horas, 24 horas, 40 horas y 48 horas después de la cirugía. En la imagen de los cortes coronales se aprecia con claridad la presencia de acumulación de FMISO en la zona hemorrágica, especialmente a las 18 horas y 24 horas, y posteriormente disminuye a las 40 horas y prácticamente desaparece a las 48 horas.

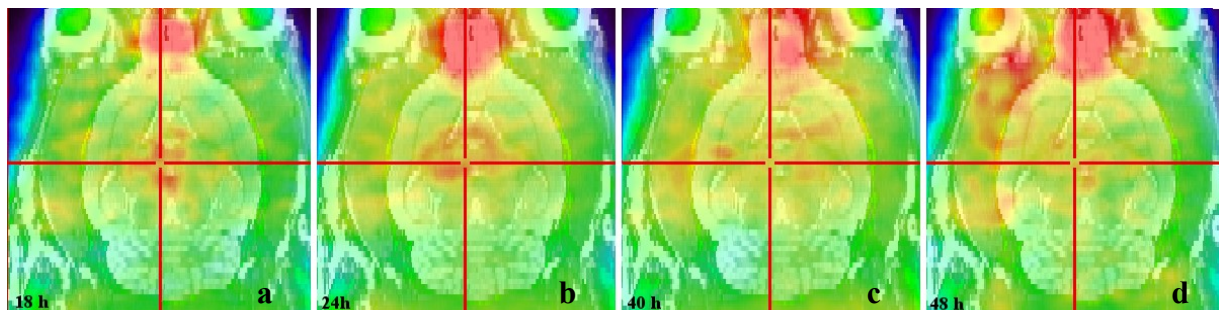


Figura 13. Imágenes PET fusionadas con la resonancia magnética de una rata hemorrágica a las a) 18 horas; b) 24 horas; c) 40 horas y e) 48 horas post-cirugía. Todas las imágenes se encuentran en el mismo corte y están centradas en el cuerpo estriado derecho.

Es necesario destacar que la fusión que se presenta aquí se realizó con resonancias magnéticas hechas una semana después de la cirugía, cuando el volumen de la hemorragia intracerebral ya es muy pequeño, por lo que no se puede apreciar con claridad. Para poder localizar la zona hipóxica respecto a lo que queda de la hemorragia hemos generado la Figura 14, en la cual aparecen representados los cortes coronales de las resonancias magnéticas y de las imágenes FMISO PET de una misma rata hemorrágica. La fusión de estas imágenes nos permitió identificar las zonas con mayor captación del trazador FMISO, que corresponden con el bulbo olfatorio y con el cuerpo estriado derecho (foco de la hemorragia intracerebral).

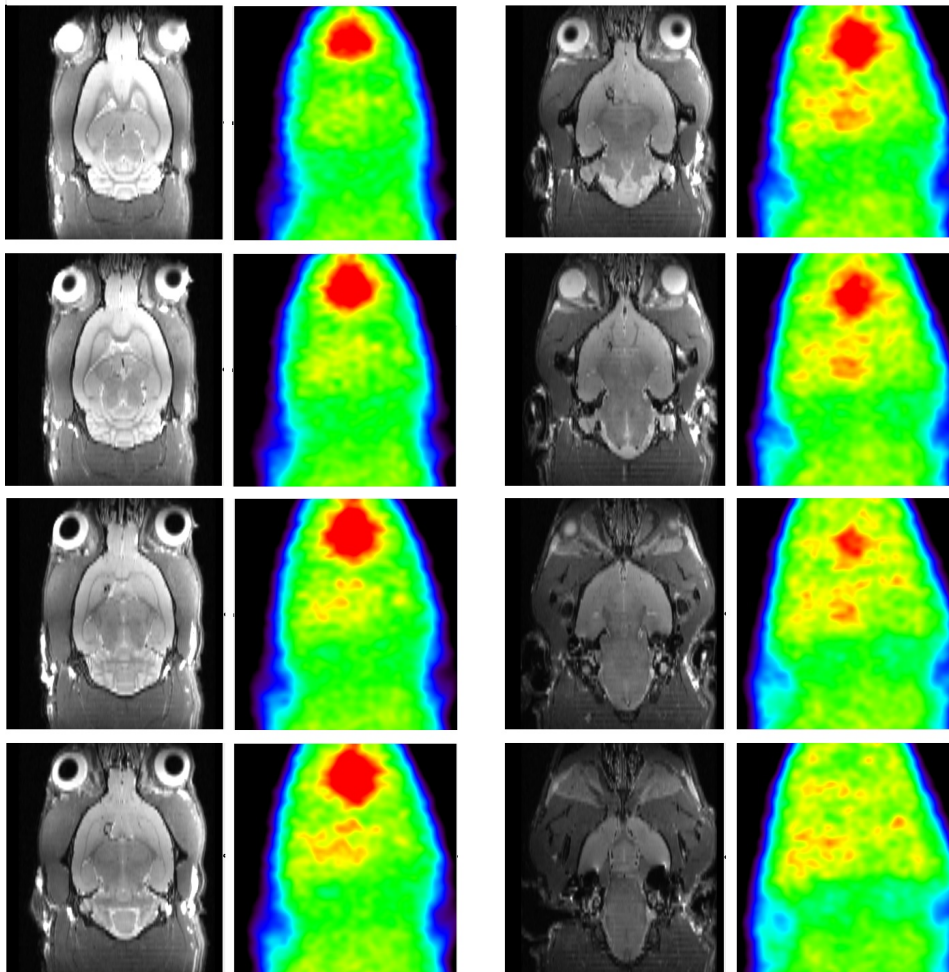


Figura 14. Cortes coronales cerebrales de una rata hemorrágica. A la izquierda aparece representada la RMN del corte correspondiente, mientras que a la derecha se muestra la imagen FMISO PET al mismo nivel coronal.

4.2.2 Cuantificación de captación de FMISO

4.2.2.1 Cuantificación ratio zona hemorrágica/sana

En este primer análisis se observa una ratio de FMISO zona hemorrágica/sana mayor en las tres ratas patológicas, especialmente a las 18 y 24 horas post-cirugía (ver Figura 15a). A partir de las 18 horas esta ratio de captación disminuye hasta alcanzar valores similares a los controles a las 48 horas.

4.2.2.2 Cuantificación de asimetría entre hemisferios

En este análisis se puede observar que el efecto de la hemorragia intracerebral es local, ya que no afecta al comportamiento general del hemisferio. Este hecho se aprecia fácilmente al comparar los Ratios entre los grupos de estudio, ya que los valores son muy similares y no se aprecian diferencias significativas (ver Figura 15b).

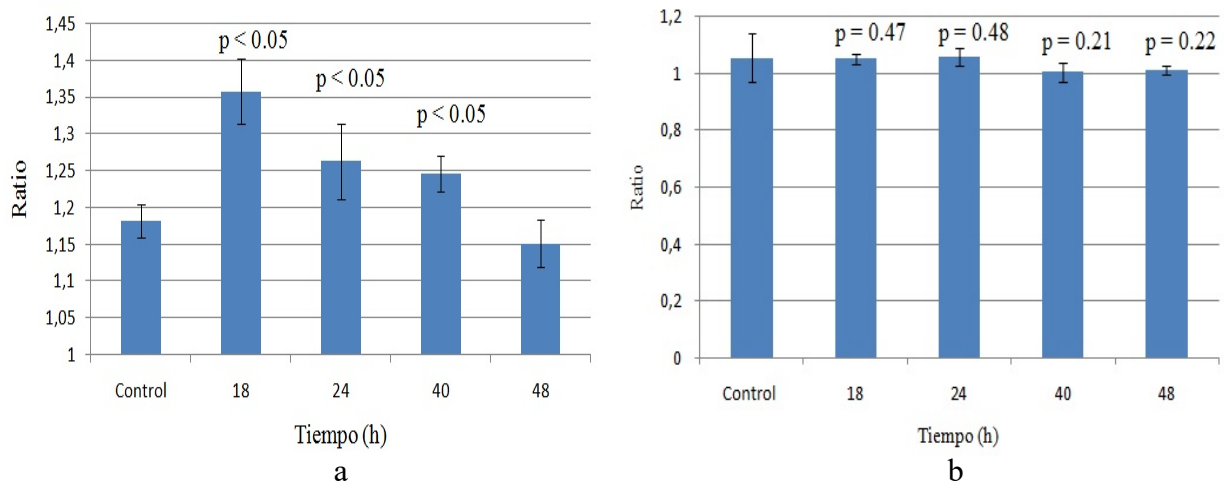


Figura 15. Resultados de la cuantificación de la captación de FMISO: a) cuantificación ratio zona hemorrágica/sana y b) cuantificación de la asimetría entre los hemisferios. En dichos gráficos aparecen representados los valores de los Ratios frente al momento en el que se llevó a cabo la inyección del trazador isotópico FMISO.

5. Discusión

Los estudios PET más comunes se realizan mediante la administración del radiofármaco ^{18}F -fluorodesoxiglucosa (^{18}F -FDG), que es una molécula análoga de la glucosa que permite obtener estudios metabólicos. Además de los estudios PET con FDG se han propuesto investigaciones con otros radiofármacos que se están incorporando a la rutina clínica (Lopci *et al.*, 2014). En particular, un trazador derivado del nitroimidazol, que se denomina ^{18}F -fluoromisonidazol (^{18}F -FMISO) se emplea para valorar la presencia de tejido hipóxico (Lee & Scott, 2007). Hasta el momento, la mayoría de las aplicaciones de este trazador se han centrado en oncología, donde las células hipóxicas presentes en algunos tumores desarrollan una resistencia importante a la quimio y radioterapia y es útil localizar aquellas regiones hipóxicas del tumor para planificar el tratamiento radioterapéutico de una forma más efectiva (Padhani *et al.*, 2007; Zschaeck *et al.*, 2016). En el campo de la neuroimagen los usos del trazador FMISO han sido más limitados y únicamente se han realizado algunas pruebas en modelos animales con accidentes cerebrovasculares de tipo isquémico (Takasawa *et al.*, 2011; Schirrmacher *et al.*, 2016). Algunos de los estudios realizados proponen que el trazador FMISO es un buen marcador de tejido hipóxico viable (Takasawa *et al.*, 2007; Saita *et al.*, 2004), mientras que otros presentan resultados poco concluyentes (Williamson *et al.*, 2013).

En este sentido, nuestra aplicación es completamente original, pues no se han descrito estudios PET con FMISO en modelos animales de hemorragia intracerebral. Nuestros resultados muestran que en ratas hemorrágicas existe una captación local de FMISO que coincide con la región de la hemorragia revelada por las imágenes RMN. El trazador isotópico presenta una buena localización espacial en el caso de la hemorragia cerebral, de manera que a las 18 horas post-cirugía podemos observar en las imágenes PET una captación local que se va expandiendo en las tres dimensiones, haciéndose más difusa hasta desaparecer sobre las 48 horas. Con respecto al análisis cuantitativo que hemos llevado a cabo, podemos comprobar que el Ratio (proporción entre el valor medio de captación de FMISO en la región hemorrágica con respecto a la zona de referencia) es significativo a las 18, 24 y 40 horas post-cirugía en las ratas hemorrágicas con respecto a las ratas sanas. Dichos valores demuestran una alta captación de FMISO en la zona hemorrágica, lo que puede asociarse a la presencia de una isquemia local debido a la acción de la hemorragia intracerebral. Por otro lado, el análisis cuantitativo que hemos realizado en los hemisferios cerebrales, el Ratio adquiere unos valores similares en todos los casos, por lo que se puede deducir que la acción de la hemorragia no es global y no afecta al comportamiento de los hemisferios cerebrales.

Únicamente hemos localizado un estudio previo centrado en hemorragia intracerebral (Hirano *et al.*, 1999) en el que no se pudo observar tejido hipóxico empleando el trazador FMISO a pesar de haberse realizado en horas similares con respecto al nuestro. En dicha investigación no se llevó a cabo un estudio longitudinal, sino que únicamente se realizó un escáner PET en cada uno de los seis pacientes, por lo que varía el tamaño de la hemorragia para cada uno de los casos. En nuestro caso hicimos un estudio longitudinal con tres ratas hemorrágicas y otras tres sanas, pudiendo obtener datos coherentes a lo largo del tiempo. Otro factor a tener en cuenta es que se cree que la ventana temporal en la que se detecta tejido hipóxico puede ser diferente en ratas y en humanos (Saita *et al.*, 2004). De esta forma, es posible que Hirano *et al.* (1999) no hayan obtenido unos resultados satisfactorios debido al diseño del experimento.

Respecto al comportamiento del trazador en zonas extracerebrales, nuestros resultados son coherentes con los de otros investigadores, en los cuales se ha visto una captación de FMISO en tejidos extracerebrales, concretamente en el músculo temporal (Takasawa *et al.*, 2007), tal y como podemos apreciar en nuestras ratas, tanto hemorrágicas como sanas. Consideramos que se puede deber a una captación no específica, que no representaría una región hipóxica. Además de esto, podemos destacar una alta captación de FMISO en el bulbo olfatorio en ambos grupos. En estudios recientes se ha visto que dicha estructura es susceptible a condiciones de hipoxia (Hoffmann *et al.*, 2016). También podemos observar que la captación de FMISO es superior en la región frontal que en la occipital del cerebro. Este hecho coincide con los hallados por otros autores (Takasawa *et al.*, 2007). Finalmente, es necesario destacar que en todos los animales, incluidas las ratas sanas, existe una captación basal de FMISO no específica, debido a que el trazador sale y entra en todas las células quedando atrapado únicamente en las células hipóxicas. Esto nos lleva a una última consideración sobre el uso del trazador FMISO en el estudio de las enfermedades cerebrovasculares. Se trata de la necesidad de un periodo de captación lo más largo posible tras la administración del trazador (Rojas *et al.*, 2011). En nuestro caso hemos realizado el estudio PET dos horas después de la administración del radiofármaco, tal y como se recomienda en estudios previos (Saita *et al.*, 2004). Sin embargo, existen estudios que indican que es necesario esperar más tiempo, llegando a tiempos de captación de 3 o 4 horas (Padhani *et al.*, 2007; Lopci *et al.*, 2014). En futuros estudios proponemos aumentar el número de individuos y también esperar 3 horas entre la inyección de FMISO y el PET con el objetivo de obtener imágenes más “limpias”, es decir, con menor captación inespecífica del trazador.

6. Conclusiones

Nuestros resultados nos inducen a las siguientes conclusiones:

1. Se ha desarrollado un nuevo protocolo para realizar estudios FMISO PET en modelos experimentales de hemorragia cerebral en ratas.
2. Los estudios de FMISO PET en los dos modelos de rata con hemorragia intracerebral permitieron localizar una ventana temporal post-hemorragia con una alta captación del radiofármaco alrededor de las 18 y 24 horas post-cirugía, disminuyendo posteriormente hasta desaparecer a las 48 horas.
3. Mediante la técnica FMISO PET hemos evidenciado por primera vez la existencia de una región hipóxica asociada a la hemorragia cerebral, fenómeno no descrito previamente y que puede tener interés en la clínica diaria.

7. Agradecimientos

Este trabajo no se habría podido realizar sin la colaboración de cada una de las personas que me han brindado su ayuda, sus conocimientos y su apoyo. Quiero agradecerles a todos ellos todo lo que han hecho por mí durante todos estos meses para que este trabajo saliera adelante de la mejor manera posible.

En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mis tutores del Trabajo de Fin de Máster. Al Dr. Pablo Aguiar Fernández que, además de transmitirme tu vocación investigadora, me orientaste y ayudaste en todos los aspectos de este proyecto durante estos meses. Quiero agradecerte la confianza que me has demostrado, así como la dedicación y la atención que me has ofrecido. Al Prof. Álvaro Ruibal Morell, por haber hecho fácil lo difícil. Ha sido un privilegio poder contar con tu guía y tu ayuda. Habeis sido capaces de ganar mi admiración durante el período de tiempo que ha durado esta pequeña aventura.

En segundo lugar, me gustaría darles las gracias a mis compañeros de la Unidad de Imagen Experimental por todo el apoyo que he recibido de vuestra parte. A Lara García Varela por enseñarme a manejarme con seguridad en el laboratorio. A Juan Pardo Montero por todos los consejos que me has dado y por haberme acompañado y apoyado durante todo el proyecto de investigación. A Alexis Moscoso Rial por haberme ayudado con el análisis de las imágenes y por hacer más divertidas las tardes en el microPET. A Jesús Silva Rodríguez por ayudarme con el manejo de los programas de imagen y ofrecerme tu ayuda cuando lo necesitaba. Y, por último (aunque no por ello menos importante), a Anxo Fernández Ferreiro por la ayuda y los ánimos que me has dado durante todo el proceso.

En tercer lugar, quería agradecer la profesionalidad de todas las personas que trabajan en el Servicio de Medicina Nuclear. Quiero destacar especialmente la ayuda que me ha dado Michel Herranz Carnero por haberme apoyado siempre en este proyecto y por todos los consejos que me has dado. A Inés Domínguez Prado por haber resuelto las dudas que me surgían y por animarme a seguir investigando. A Santiago Medín y a María Sánchez Martínez por haber producido FMISO siempre que lo necesitábamos.

En cuarto lugar, quería agradecer sinceramente el trabajo que han realizado los científicos del Laboratorio de Investigación en Neurociencias Clínicas. A Francisco Campos Pérez y Tomás Sobrino Moreiras por haberse implicado en este estudio y ayudarnos con la interpretación de las imágenes. A Clara Correa Paz y Esteban López Arias por haber realizado las operaciones y

por el apoyo técnico que nos brindasteis. A Ramón Iglesias Rey y Juan Manuel Doval García por haber resuelto todas mis curiosidades y hacer un hueco en vuestro ajetreado horario para poder realizar las resonancias magnéticas. Muchas gracias a todos por vuestro incalculable esfuerzo y apoyo.

En quinto lugar, quiero darle las gracias a mi director del Trabajo de Fin de Máster, Javier Pereira Loureiro, por haberme ayudado con los trámites administrativos, y por la paciencia y el apoyo que me demostraste al hacerlo.

Y, por último, gracias a las Universidades de A Coruña, Santiago de Compostela y Vigo por permitirme realizar este proyecto en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Ha sido una experiencia que nunca olvidaré.

8. Bibliografía

- Álvarez, J. & Masjuan, J. (2013). *Comprender el ictus (infarto y hemorragia cerebral)*. Barcelona: Editorial Amat.
- Clutton, J. (2002). *Mamíferos*. Barcelona: Ediciones Omega.
- Coca, S.; Sáez, M. A.; Salas, I. & López, C. (2007) Anatomía patológica de los traumatismos craneoencefálicos. En Jesús Vaquero Crespo & Gregorio Rodríguez Boto (Eds.), *Daño cerebral postraumático* (pp 37-52). Madrid: Editorial Mapfre.
- Hirano, T.; Read, S. J.; Abbott, D. F.; Sachinidis, J. I.; Tochon-Danguy, H. J.; Ewan, G. F.; Bladin, C. F.; Scott, A. M.; McKay, W. J. & Donnan, G. A. (1999) No evidence of hypoxic tissue on ^{18}F -Fluoromisonidazole PET after intracerebral hemorrhage. *Neurology* 53 (9): 2179-2182.
- Hoffmann, A.; Kunze, R.; Helluy, X.; Milford, D.; Heiland, S.; Bendszus, M.; Pharm, M. & Marti, H. H. (2016) High-field MRI reveals a drastic increase of hypoxia-induced microhemorrhages upon tissue reoxygenation in the mouse brain with strong predominance in the olfactory bulb. *PLoS ONE* 11 (2): 1-15. DOI: 10.1371/journal.pone.0148441.
- James, M. L. & Gambhir, S. S. (2012) A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications. *Physiological Reviews* 92: 897-965. DOI: 10.1152/physrev.00049.2010.
- Kirkman, M. A.; Allan, S. M. & Parry-Jones, A. R. (2011) Experimental intracerebral hemorrhage: avoiding pitfalls in translational research. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 31 (11): 2135-2151.
- Lee, S. T. & Scott, A. M. (2007) Hypoxia positron emission tomography imaging with ^{18}F -Fluoromisonidazole. *Elsevier* 37 (6): 451-461. DOI: 10.1053/j.semnuclmed.2007.07.001.
- Leonardo, C. C.; Robbins, S. & Doré, S. (2012) Translating basic science research to clinical application: models and strategies for intracerebral hemorrhage. *Frontiers in Neurology* 3 (85): 1-14. DOI: 10.3389/fneur.2012.00085.
- Lopci, E.; Grassi, I.; Chiti, A.; Nanni, C.; Cicoria, G.; Toschi, L.; Fonti, C.; Lodi, F.; Mattioli, S. & Fanti, S. (2014) PET radiopharmaceuticals for imaging of tumor hypoxia: a review of the evidence. *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 4 (4): 365-384.
- Manaenko, A.; Chen, H.; Zhang, J. H. & Tang, J. (2011) Comparison of different preclinical models of intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochirurgica Supplement* 111: 9-14. DOI: 10.1007/978-3-7091-0693-8_2.
- Martí, J. M. (1993a) Sistemas de producción de isótopos emisores de positrones. En José Ángel Richter Echevarría & Josep María Martí Climent (Eds.), *PET tomografía molecular: fundamentos y aplicaciones* (pp. 41-58). Madrid: Ediciones Eseeve.

- Martí, J. M. (1993b) Tomógrafo de emisores de positrones. En José Ángel Richter Echevarría & Josep María Martí Climent (Eds.), *PET tomografía molecular: fundamentos y aplicaciones* (pp. 15-40). Madrid: Ediciones Eseeve.
- Miller, J. H.; Wardlaw, J. M. & Lammie, G. A. (1999) Intracerebral haemorrhage and cerebral amyloid angiopathy: CT features with pathological correlation. *Clinical Radiology* 54 (7): 422-429. DOI: 10.1016/s0009-9260(99)90825-5.
- Padhani, A. R.; Krohn, K. A.; Lewis, J. S. & Alber, M. (2007) Imaging oxygenation of human tumours. *European Radiology* 17: 861-872. DOI: 10.1007/s00330-006-0431-y.
- Pérez, C. C.; Díez, M. I. & García, P. (1999). *Introducción a la experimentación y protección animal*. Universidad de León: Secretariado de Publicaciones.
- Planas, A. M. (2014). Visualización del flujo cerebral y del parénquima cerebral isquémico. En Joan Montaner (Eds.), *Fisiopatología de la isquemia cerebral* (pp. 191-202). Barcelona: Marge Books.
- Purroy, F. J. & Varela, J. M. (2003). *Guía de los mamíferos de España: Península, Baleares y Canarias*. Barcelona: Lynx Edicions.
- Rajendran, J. G. & Krohn, K. A. (2005) Imaging hypoxia and angiogenesis in tumors. *Radiologic Clinics of North America* 43: 169-187. DOI: 10.1016/j.rcl.2004.08.004.
- Rojas, S.; Herance, J. R.; Abad, S.; Jiménez, X.; Pareto, D.; Ruiz, A.; Torrent, E.; Figueiras, F. P.; Popota, F.; Fernández-Soriano, F. J.; Planas, A. M. & Gispert, J. D. (2011) Evaluation of hypoxic tissue dynamics with ¹⁸F-FMISO PET in a rat model of permanent cerebral ischemia. *Molecular Imaging and Biology* 13: 558-564. DOI: 10.1007/s11307-010-0371-4.
- Rosell, A. (2014). Modelos *in vivo* e *in vitro* de isquemia cerebral. En Joan Montaner (Eds.), *Fisiopatología de la isquemia cerebral* (pp. 33-52). Barcelona: Marge Books.
- Rosenberg, G. A.; Mun-Bryce, S.; Wesley, M. & Kornfeld, M. (1990) Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke* 21 (5): 801-807.
- Ruiz, J. A. (2007). Tomografía por emisión de positrones (PET): evolución y futuro. *Radiobiología* 7 (1): 148-156.
- Saita, K.; Chen, M.; Spratt, N. J.; Porritt, M. J.; Liberatore, G. T.; Read, S. J.; Levi, C. R.; Donnan, G. A.; Ackermann, U.; Tochon-Danguy, H. J.; Sachinidis, J. I. & Howells, D. W. (2004) Imaging the ischemic penumbra with ¹⁸F-fluoromisonidazole in a rat model of ischemic stroke. *Stroke* 35: 975-980. DOI: 10.1161/01.STR.0000121647.0194.ba.
- Sánchez, I. P. & Fernández, G. Q. (2012) Radiofármacos para estudios PET. En Ángel Soriano Castrejón, Josep Martín Comín & Ana María García Vicente (Eds.), *Medicina nuclear en la práctica clínica* (pp 83-98). Madrid: Aula Médica.
- Sarikaya, I. (2015) PET studies in epilepsy. *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 5 (5): 416-430. DOI: 2160-8407/ajnm0010102.
- Schirrmacher, R.; Dea, M.; Heiss, W. D.; Kostikov, A.; Funck, T.; Quessy, S.; Bedell, B.; Dancause, N. & Thiel, A. (2016) Which aspects of stroke do animal models

- capture? A multitracer micro-PET study of focal ischemia with endothelin-1. *Cerebrovascular Diseases* 41: 139-147. DOI: 10.1159/000442997.
- Shea, Y. F.; Ha, J.; Lee, S. C. & Chu, L. W. (2016) Impact of ^{18}F FDG PET and ^{11}C -PIB PET brain imaging on the diagnosis of Alzheimer's disease and other dementias in a regional memory clinic in Hong Kong. *Hong Kong Medical Journal* 22: 1-7. DOI: 10.12809/hkmj154707.
 - Stein, J. (1973). *Isótopos radiactivos*. Madrid: Alhambra.
 - Takasawa, M.; Beech, J. S.; Fryer, T. D.; Hong, Y. T.; Hughes, J. L.; Igase, K.; Jones, P. S.; Smith, R.; Aigbirhio, F. I.; Menon, D. K.; Clark, J. C. & Baron, J. C. (2007) Imaging of brain hypoxia in permanent and temporary middle cerebral artery occlusion in the rat using ^{18}F -fluoromisonidazole and positron emission tomography: a pilot study. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 27: 679-689. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600405.
 - Takasawa, M.; Beech, J. S.; Fryer, T. D.; Jones, P.S.; Ahmed, T.; Smith, R.; Aigbirhio, F. I. & Baron, J. C. (2011) Single-subject statistical mapping of acute brain hypoxia in the rat following middle cerebral artery occlusion: a microPET study. *Elsevier* 229: 251-258. DOI: 10.1016/j.expneurol.2011.02.005.
 - Townsend, D. W. & Cherry, S. R. (2001) Combining anatomy and function: the path to true image fusion. *European Radiology* 11 (10): 1968-1974. DOI: 10.1007/s003300101007.
 - Williamson, D. J.; Ejaz, S.; Sitnikov, S.; Fryer, T. D.; Sawiak, S. J.; Burke, P.; Baron, J. C. & Aigbirhio, F. I. (2013) A comparison of four PET tracers for brain hypoxia mapping in a rodent model of stroke. *Elsevier* 40 (3): 338-344. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2012.11.012.
 - Zschaek, S.; Steinbach, J. & Troost, E. G. (2016) FMISO as a biomarker for clinical radiation oncology. *Recent Results in Cancer Research* 198: 189-201. DOI: 10.1007/978-3-662-49651-0_10.