



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**BIOMARCADORES DE IMAGEN DE RAYOS X REALZADA POR CONTRASTE
Y BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS DE ANGIOGÉNESIS TUMORAL
EN UN MODELO SUBCUTÁNEO DE GLIOMA**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
LÍZBETH ROSSANA AYALA DOMÍNGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA ESTER BRANDAN SIQUÉS
INSTITUTO DE FÍSICA

COMITÉ TUTOR:
DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DRA. CARMEN YOLANDA ACEVES VELASCO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

CIUDAD DE MÉXICO, ABRIL DE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Instituto de Investigaciones Biomédicas, Instituto de Neurobiología e Instituto de Física por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado en el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo. Asimismo, agradezco a la UNAM por el apoyo recibido del proyecto PAPIIT IN-103219 y al Instituto de Física, por el apoyo recibido de los Programas de Investigación del Instituto de Física (PIIF 2020), el cual fue esencial para continuar con mis actividades durante los últimos meses del 2020.

Al Instituto Nacional de Cancerología (INCan), porque con la interacción con sus médicos, investigadores y estudiantes aprendí no solo las bases de la labor científica rigurosa y de calidad en oncología, sino también a considerar el lado humano y social de la aplicación del conocimiento generado, siempre en pro de los pacientes. Agradezco también el apoyo recibido por parte del INCan para el proyecto Ref.(018/051/IBI) (CEI/1294/18).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgarme apoyos económicos que me permitieron continuar mis estudios de posgrado (beca para estudios de posgrado (221487) y apoyo para ayudante de investigador SNI Emérito), y para adquirir material y equipo necesarios para la realización del proyecto (proyecto de Investigación Básica SEP-CONACyT (CB-251497) y PRONAI-7-Virus y Cáncer (Ref. 303044)).

A mi directora de tesis, Dra. María Ester Brandan Siqués, gracias por la guía, los consejos y enseñanzas a lo largo de estos años, su ejemplo ha sido monumental en mi formación y también a nivel personal. Gracias por enseñarme las bases del trabajo científico riguroso, por su amistad y por las pláticas que son como perlas de sabiduría.

A mi Comité Tutor: Dra. Marcela Lizano Soberón y Dra. Carmen Yolanda Aceves Velasco. Dra. Marcela, muchas gracias por recibirme en su laboratorio, donde aprendí a forjarme un pensamiento crítico, a optimizar recursos y a trabajar en equipo. Dra. Carmen, gracias por su infinita generosidad y apoyo brindados para la realización de este proyecto, por los consejos y por hacer los viajes a Juriquilla siempre memorables. A ambas, gracias por su amabilidad, generosidad y por su enorme calidad humana.

A los sinodales: Dra. María Ester Brandan Siqués, Dra. María del Carmen Clapp Jiménez-Labora, Dr. Miguel Ángel Ávila Rodríguez, Dr. Gabriel Isaac Corkidi Blanco y Dr. Alfonso Dueñas González, por el tiempo dedicado a la revisión de la tesis y sus comentarios para mejorarla.

A los colaboradores del proyecto en el INCan, Dr. Enrique Pérez Cárdenas, Dr. Alejandro Avilés Salas y Dr. Luis Alberto Medina Vázquez, gracias por sus consejos, disposición, tiempo, apoyo y materiales brindados a lo largo de todos estos años, los cuales permitieron la conclusión exitosa de este proyecto. Dr. Enrique, gracias por la ayuda con el modelo de glioma y por compartir su conocimiento sobre el manejo cuidadoso de los animales de laboratorio. Dr. Alejandro, gracias por su disponibilidad para la evaluación de las laminillas y por las lecciones de patología. Dr. Luis Alberto, gracias por las facilidades para el uso del micro-CT y por los consejos metodológicos a lo largo del proyecto.

Agradezco de manera especial la colaboración del Ing. Emilio Giménez, de Bruker, por habilitarnos características adicionales para el manejo del equipo micro-CT y por sus valiosos consejos y sugerencias que permitieron la adquisición de imágenes para el estudio dinámico.

Al personal y estudiantes de la Unidad de Investigación Biomédica Básica (UIBC) INCan-IIB UNAM, que fueron parte esencial para la adquisición de las imágenes para este proyecto: Q.F.B. Josefina García, M. en C. Itzel Torres, M. en C. Sirio Bolaños y Dra. Irene Vergara. De manera especial, agradezco la colaboración de los estudiantes asociados al Instituto de Física (IF) por su apoyo durante los primeros años de este proyecto para la optimización de las técnicas de imagen: I.F.I. Leopoldo Corona, M. en C. Francisco Berumen, M. en C. Jorge Castillo; así como a los miembros del grupo de Dosimetría y Física Médica del Instituto de física por su apoyo para la realización de experimentos y la dosimetría: M. en C. Eduardo López, M. en C. Iván Domingo Muñoz y M. en C. César Ruiz.

A la Dra. Adriana Contreras y Biól. Ana Clara Ramos de la UIBC INCan-IIB UNAM por enseñarme la técnica de inmunohistoquímica (IHQ), gracias por la paciencia para enseñarme desde lo más básico (por ejemplo, a usar una micropipeta de manera correcta) hasta la importancia de la metodología y evaluación rigurosas de la técnica. A la Dra. Alma Chávez, por facilitarme reactivos para la IHQ. Agradezco también a la Q.F.B. María de Lourdes Peña y Q.F.B. Guadalupe Moncada, de la Unidad de Inmunohistoquímica del Departamento de Patología del INCan, por sus enseñanzas y ayuda para estandarizar el protocolo de IHQ en nuestro laboratorio.

A mis amigos de los diferentes laboratorios de la UIBC INCan-IIB, gracias por todo su cariño y apoyo. En particular, gracias a mis amigos del Lab 2 y 3 por el aprendizaje continuo en los seminarios, por las críticas para mejorar el proyecto y por hacerme una “física más bióloga”, por la convivencia dentro y fuera del laboratorio. Gracias por hacer más amena la vida del posgrado, gracias por los consejos y la amistad; les guardaré un cariño especial siempre. A mis amigos en Mérida, Ciudad de México y otras partes del mundo, gracias por su amistad y apoyo a lo largo del tiempo y la distancia.

A Alberto, gracias por el amor, comprensión y apoyo a lo largo de estos años, por hacer de lo difícil y complicado algo más llevadero y posible, por compartir los sueños y, sobre todo, por compartir los esfuerzos para alcanzarlos. A Gael y Sofi, gracias por la paciencia y por hacer los días siempre brillantes a pesar de las tormentas. A mi familia en San Pablo, gracias infinitas por todo su apoyo y amor. A mi familia en Yucatán, gracias por estar siempre presentes a pesar de la distancia, siempre cercanos a nuestras alegrías y preocupaciones. Este es un logro familiar en muchos sentidos, porque sin su ayuda nunca hubiera sido posible, los amo.

A todas las personas involucradas en el desarrollo de este trabajo, les doy gracias de todo corazón. No fue un camino sencillo, se superaron muchos retos técnicos y personales, pero les agradezco el que hayan estado ahí, gracias por todo el apoyo y cariño.

CONTENIDO

Resumen.....	4
Abstract.....	5
Lista de Abreviaturas	6
Índice de Tablas	8
Índice de Figuras.....	9
1 Antecedentes.....	13
1.1 Angiogénesis tumoral	13
1.1.1 Regulación de la angiogénesis.....	13
1.1.2 Cuantificación de la angiogénesis tumoral e implicaciones clínicas.....	16
1.2 Imagen cuantitativa y biomarcadores de imagen en cáncer.....	18
1.2.1 La imagen médica en el estudio de la angiogénesis tumoral.....	21
1.2.2 Imagen cuantitativa de rayos X realizada por contraste	22
1.2.3 Calidad de imagen y dosis de radiación.....	26
1.3 Biomarcadores de imagen de rayos X realizada por contraste y su relación con la angiogénesis tumoral	27
1.3.1 Antecedentes en pacientes	30
1.3.2 Antecedentes en modelos animales	31
2 Planteamiento del problema.....	34
2.1 Hipótesis	34
2.2 Objetivo general.....	34
2.3 Objetivos específicos	34
3 Optimización de los protocolos de adquisición de imágenes	35
3.1 Introducción	35
3.2 Métodos	36
3.2.1 Equipo de imagen	36
3.2.2 Maniquís	38
3.2.3 Protocolos de imagen de rayos X realizada por contraste	38
3.2.4 Reducción de artefactos: estabilidad del detector y auto-calibración.....	39
3.2.5 Desempeño del equipo de imagen	40
3.2.6 Linealidad del número CT	40
3.2.7 Calidad de imagen	40

3.2.8 Dosimetría.....	41
3.2.9 Elección de los protocolos óptimos	43
3.2.10 Análisis estadístico	44
3.3 Resultados y Discusión de la optimización de los protocolos de imagen	44
3.3.1 Exactitud, uniformidad y ruido del número CT del agua	44
3.3.2 Linealidad del número CT	45
3.3.3 Calidad de imagen	46
3.3.4 Dosis absorbida en agua	50
3.3.5 Elección de los protocolos óptimos	52
3.4 Conclusiones de la optimización de los protocolos de imagen	53
4 Estandarización de la cuantificación de los biomarcadores de imagen	55
4.1 Introducción	55
4.2 Métodos	56
4.2.1 Modelo subcutáneo de glioma con células C6.....	56
4.2.2 Parámetros clínicos relativos a la adquisición de las imágenes.....	56
4.2.3 Registro de imágenes	58
4.2.4 Parametrización de imágenes en concentración de yodo.....	58
4.2.5 Cuantificación de los biomarcadores en imágenes SE y DE	59
4.2.6 Cuantificación de los biomarcadores en imágenes DCE	59
4.2.7 Evaluación del desempeño técnico de la concentración de yodo como biomarcador de imagen	60
4.2.8 Análisis estadístico	61
4.3 Resultados y Discusión de la estandarización de la cuantificación de los BI.....	61
4.3.1 Tiempo óptimo para la adquisición de las imágenes del modelo animal	61
4.3.2 Estandarización de la administración del medio de contraste clínico	62
4.3.3 Determinación de la dosis de medio de contraste preclínico.....	63
4.3.4 Registro y resta de las imágenes	64
4.3.5 Parametrización de las imágenes en concentración de yodo	66
4.3.6 Factor de ponderación para la resta DE	67
4.3.7 Análisis de imágenes DCE con el método de Patlak	68
4.3.8 Desempeño técnico de la concentración de yodo como biomarcador de imagen	70
4.4 Conclusiones de la estandarización de la cuantificación de los BI.....	73
5 Asociación entre biomarcadores histológicos y de imagen	75

5.1 Introducción	75
5.2 Métodos	75
5.2.1 Adquisición de las imágenes del modelo animal de glioma	75
5.2.2 Cuantificación de los biomarcadores en imágenes SE, DE y DCE	76
5.2.3 Caracterización histológica de los tumores	76
5.2.4 Análisis estadístico	77
5.3 Resultados de este capítulo y Discusión	77
5.3.1 Evaluación cualitativa de las imágenes SE, DE y DCE	77
5.3.2 Evaluación cuantitativa de las imágenes SE, DE y DCE	80
5.3.3 Caracterización histológica de los tumores del modelo animal.....	84
5.3.4 Evaluación de la asociación entre BH y BI	86
5.4 Conclusiones de este capítulo	90
6 Conclusiones generales y Perspectivas.....	91
Referencias.....	92
Anexo: Artículos publicados	101

RESUMEN

La cuantificación de la angiogénesis tumoral en pacientes proporciona información pronóstica y predictiva útil en el manejo clínico del cáncer. Sin embargo, su cuantificación histológica presenta limitaciones tales como la heterogeneidad espacial y temporal de los tumores, aunado a que la toma de la muestra es un procedimiento invasivo. Como alternativa para superar estas limitaciones se ha propuesto el uso de biomarcadores cuantificados en imágenes de rayos X realizadas por el uso de medios de contraste.

La asociación entre los biomarcadores de imagen (BI) y los biomarcadores histológicos (BH) de angiogénesis se considera variable, debido probablemente a la falta de estandarización en la cuantificación de los BI. El objetivo de este trabajo fue estandarizar esta cuantificación de manera sistemática y rigurosa y evaluar la asociación entre los BI y los BH de angiogénesis en un modelo subcutáneo de glioma.

Se optimizaron tres protocolos de imagen de rayos X realizada por contraste: estático de una energía (SE), estático de energía dual (DE), y dinámico de una energía (DCE). Se estandarizó la cuantificación del realce, concentración de yodo (C_I) y volumen de sangre relativo (rBV) en imágenes SE y DE, y rBV y la constante de transferencia de volumen (K^{trans}) en imágenes DCE. Se evaluaron el sesgo y precisión de C_I cuantificada con los tres protocolos de imagen y se observó que el protocolo SE mostró un menor sesgo y mayor precisión. En el modelo animal, se encontró que el realce, C_I , y rBV permitieron distinguir las regiones tumorales al compararlas con el músculo en imágenes SE y DE. Para el protocolo DCE, ni rBV ni K^{trans} permitieron distinguir entre las regiones tumorales y el músculo de manera significativa. Se encontró concordancia en el rBV evaluado en músculo con los diferentes protocolos, y en realce y C_I en músculo evaluado con los protocolos SE y DE. Se encontraron correlaciones significativas y positivas (r Pearson > 0.7 , $p < 0.05$) entre un conjunto de BI y BH para el protocolo SE: realce y C_I en la periferia tumoral se asociaron con la densidad de microvasos (MVD) y el porcentaje de necrosis (PN); realce y C_I en el tumor completo, con la MVD; y rBV en la periferia tumoral, con la MVD. No se encontraron correlaciones significativas entre los BI y el índice de proliferación celular, ni tampoco entre los BH y los BI cuantificados en imágenes DE y DCE.

En conclusión, en este trabajo se identificó un conjunto de BI para el protocolo SE que podría considerarse como descriptor de la angiogénesis tumoral y necrosis en el modelo animal evaluado. La falta de asociación entre los BH y los BI en imágenes DE y DCE podría deberse a su mayor sesgo y menor precisión, o a las limitaciones en el diseño experimental.

ABSTRACT

The quantification of tumor angiogenesis in patients provides useful prognostic and predictive information in the clinical management of cancer. However, its histological quantification has limitations such as the spatial and temporal heterogeneity of the tumors, besides the fact that taking the sample is an invasive procedure. As an alternative to overcome these drawbacks, the use of biomarkers quantified in contrast-enhanced X-ray images has been proposed.

The association between imaging biomarkers (IBs) and histological biomarkers (HBs) of angiogenesis is considered as variable, probably due to the lack of standardization in the quantification of IBs. The objective of this work was to standardize this quantification and to evaluate the association between IBs and HBs of angiogenesis in a subcutaneous glioma model.

Three contrast-enhanced X-ray imaging protocols were optimized: a static single-energy (SE) protocol, a static dual-energy (DE) protocol, and a dynamic contrast-enhanced (DCE) protocol using a single-energy spectrum. The quantification of enhancement, iodine concentration (C_I) and relative blood volume (rBV) was standardized in SE and DE images, and rBV and the volume transfer constant (K^{trans}) in DCE images. The bias and precision of C_I were evaluated for the three imaging protocols; it was observed that the SE protocol showed lower bias and higher precision. In the animal model, enhancement, C_I , and rBV enabled to distinguish the tumor regions from muscle in SE and DE images. For the DCE protocol, neither rBV nor K^{trans} allowed to significantly distinguish between tumor regions and muscle. An agreement was found in the rBV evaluated in muscle with the different protocols, and in enhancement and C_I in muscle evaluated with the SE and DE protocols. Significant and positive correlations (Pearson $r > 0.7$, $p < 0.05$) were found between a set of IBs and HBs for the SE protocol: enhancement and C_I in the tumor periphery were associated with the microvessel density (MVD) and the percentage of necrosis (PN); enhancement and C_I in the complete tumor, with MVD; and rBV in the tumor periphery, with MVD. No significant correlations were found between the IBs and the cell proliferation index, nor between the HBs and the IBs quantified in DE and DCE images.

In conclusion, we identified a set of IBs for the SE protocol that could be considered as a descriptor of tumor angiogenesis and necrosis in the evaluated animal model. The lack of association between the HBs and the IBs in DE and DCE images could be due to their higher bias and lower precision, or to the limitations in the experimental design.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIF:** función de entrada arterial (*arterial input function*).
- ANOVA:** análisis de varianza.
- BF:** flujo sanguíneo (*blood flow*).
- BI:** biomarcador de imagen.
- BMDC:** células derivadas de médula ósea (*bone marrow derived cells*).
- BV:** volumen sanguíneo (*blood volume*).
- CCC:** coeficiente de correlación de concordancia (*concordance correlation coefficient*).
- CE:** realizada por contraste (*contrast-enhanced*).
- CT:** tomografía computarizada (*computed tomography*).
- CE CT:** tomografía computarizada realizada por contraste (*contrast-enhanced computed tomography*).
- micro-CT:** micro-tomografía computarizada.
- CEDM:** mamografía digital realizada por contraste (*contrast-enhanced digital mammography*).
- MRI:** resonancia magnética (*magnetic resonance imaging*).
- US:** ultrasonido.
- CNR:** razón contraste a ruido (*contrast to noise ratio*).
- DCE:** imagen dinámica realizada por contraste (*dynamic contrast-enhanced*).
- DE:** energía dual (*dual energy*).
- DPI:** días post-inyección.
- EC:** célula endotelial (*endothelial cell*).
- ECM:** matriz extracelular (*extracellular matrix*).
- EPC:** células progenitoras endoteliales (*endothelial progenitor cells*).
- FBP:** retroproyección filtrada (*filtered backprojection*).
- FDK:** algoritmo Feldkam-Davis-Kress.
- FOM:** factor de mérito (*figure of merit*).
- GBM:** glioblastoma.
- H&E:** hematoxilina y eosina.
- HE:** alta energía (*high energy*).
- HGP:** patrón de crecimiento histológico (*histological growth pattern*).
- HIF-1 α :** factor inducible por hipoxia 1 α .

HLTR: razón de la señal TL de los picos de alta y baja temperatura (*high- to low-temperature ratio*)

HPF: campo de gran aumento (*high power field*).

HU: unidades Hounsfield.

HVL: capa hemirreductora (*half-value layer*).

ICC: coeficiente de correlación intraclases (*intraclass correlation coefficient*).

IP: índice de proliferación.

LE: baja energía (*low energy*).

LOA: límites de acuerdo (*limits of agreement*).

mAs: producto corriente-tiempo de exposición (carga).

MVD: densidad de microvasos (*microvessel density*).

PET: tomografía por emisión de positrones (*positron emission tomography*).

PN: porcentaje de necrosis.

PS: producto área-permeabilidad (*permeability-surface area product*).

QIBA: *Quantitative Imaging Biomarkers Alliance*.

rBV: volumen de sangre relativo (*relative blood volume*).

RC: coeficiente de repetibilidad (*repeatability coefficient*).

RDC: coeficiente de reproducibilidad (*reproducibility coefficient*).

SE: una energía (*single-energy*).

SIRT: técnica de reconstrucción iterativa simultánea (*simultaneous iterative reconstruction technique*).

SMC: células de músculo liso (*smooth muscle cells*).

STL: señal termoluminiscente.

SUV: valor de captación estandarizado (*standardized uptake value*).

TL: termoluminiscente.

TLD: dosímetro termoluminiscente (*thermoluminescent dosimeter*).

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor*).

VEGFR: receptor del VEGF.

VCI: vena cava inferior.

VI: ventrículo izquierdo.

VOI: volumen de interés (*volume of interest*).

wCV: coeficiente de variación intra-sujeto (*within-subject coefficient of variation*).

wSD: desviación estándar intra-sujeto (*within-subject standard deviation*).

ÍNDICE DE TABLAS

1.1	Estudios de validación de biomarcadores de imagen (BI) (34).....	19
1.2	Asociación entre biomarcadores de imagen (BI) y biomarcadores histológicos (BH) de la angiogénesis en pacientes con diferentes tipos de cáncer.....	30
1.3	Asociación entre biomarcadores de imagen (BI) y biomarcadores histológicos (BH) de la angiogénesis en modelos animales de cáncer usando imagen de rayos X realizada por contraste.....	32
3.1	Características generales del equipo de imagen micro-CT Albira ARS.....	36
3.2	Características generales de los haces de rayos X generados por el equipo de imagen micro-CT Albira ARS.....	37
3.3	Combinaciones de las calidades de haz (Q) a emplear para evaluar la calidad de imagen en los protocolos SE, DE y DCE.....	41
3.4	Protocolos dosimétricos establecidos en el Laboratorio de dosimetría del Instituto de Física, UNAM, para la medición de la señal termoluminiscente (TL) obtenida con los dosímetros TLD-100 y TLD-300 (102,108,109).....	42
3.5	Evaluación de la exactitud del número CT del agua, su uniformidad y ruido en imágenes del maniquí de agua reconstruidas con dos algoritmos (FBP y SIRT 2D).....	44
3.6	Calidades de haz con mayor razón contraste-ruido (CNR) para los protocolos SE y DE (para el algoritmo de reconstrucción SIRT 2D), y para el protocolo DCE.....	50
3.7	Resultados de la dosimetría con TLD-100 para la estimación del factor de calibración (F_Q) de señal termoluminiscente (STL) a kerma en aire (K_{aire}), y de la dosimetría con TLD-300 para la estimación de la energía efectiva del haz (E_{ef}).....	51
3.8	Estimación de la dosis absorbida en agua (D_{agua}) en el centro del maniquí de acrílico y en el isocentro del equipo micro-CT en función de mAs para las calidades de haz con mayor CNR. Los valores de D_{agua} corresponden a una única imagen bidimensional (proyección)..	51
3.9	Estimación de la dosis absorbida en agua (D_{agua}) en el centro del maniquí de acrílico y en el isocentro del equipo micro-CT para una única imagen tridimensional (320 mAs, 400 proyecciones) y una única imagen bidimensional (0.8 mAs, 1 proyección).....	51
3.10	Calidad de imagen (CNR) y dosis absorbida en agua (D_{agua}) para los mejores protocolos SE, DE y DCE. El factor de mérito (FOM) considera el impacto de ambos para estudios completos.....	53
4.1	Procedimientos y parámetros optimizados y estandarizados para la adquisición de imágenes de rayos X realizadas por contraste con los protocolos SE, DE y DCE.....	64
4.2	Funciones de calibración para transformar el realce en las imágenes SE, DE y DCE en valores de concentración de yodo (C_1): $C_1 = m \cdot \text{Realce} + b$, con $m =$ pendiente, $b =$ ordenada.....	67
4.3	Cuantificación del realce, C_1 y rBV en músculo con los protocolos SE y DE.....	68
4.4	Procedimientos y métodos de análisis para la cuantificación de los BI en imágenes de rayos X realizadas por contraste con los protocolos SE, DE y DCE.....	69
4.5	Medidas de repetibilidad para C_1 cuantificada con los protocolos SE, DE y DCE.....	71
4.6	Límite inferior (-) y límite superior (+) del intervalo de confianza (IC) del 95% para la C_1 cuantificada en estudios transversales con los protocolos SE, DE y DCE.....	72
5.1	Parámetros de imagen cuantitativos en el músculo y las regiones tumorales del modelo animal con imágenes SE, DE y DCE.....	84
5.2	Caracterización histológica del modelo subcutáneo de glioma con células C6.	85
5.3	Correlaciones significativas encontradas entre BH y BI cuantificados en imágenes SE para las regiones tumorales.	86

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1	(a) Esquema de la jerarquía de los vasos sanguíneos, modificado de Herbert y Stainier (2). Los vasos están formados por células endoteliales (EC), pericitos y células de músculo liso (SMC). Micrografías de la superficie luminal de (b) un vaso sanguíneo sano y (c) un vaso sanguíneo angiogénico, tomadas de Baluk <i>et al.</i> (4).....	13
1.2	Procesos involucrados en regulación de la angiogénesis fisiológica. (a) Las células endoteliales (EC) se encuentran inicialmente quiescentes. (b) Se seleccionan células de punta a partir de un estímulo angiogénico, ocasionado por factores de crecimiento como el factor de crecimiento del endotelio vascular-A (VEGF-A), se remodelan las uniones entre EC, se degrada la matriz extracelular (ECM) y se separan los pericitos. (c) Las células de punta desarrollan filopodios para migrar hacia el estímulo angiogénico, se forma el lumen del brote y se unen los brotes de vasos angiogénicos cercanos (anastomosis). (d) Se reestablecen las uniones entre EC, se reclutan pericitos y se deposita la ECM, llevando a la estabilidad estructural del nuevo vaso sanguíneo y al establecimiento del flujo sanguíneo. Si esto no ocurre, se da la regresión del vaso. Figura modificada de Herbert y Stainier (2).....	15
1.3	Esquema del estudio de la angiogénesis tumoral mediante técnicas de imagen realizada por contraste. Izquierda: el uso de medios de contraste permite evaluar características morfológicas, moleculares y funcionales del transporte del medio de contraste relacionadas con la densidad de microvasos, expresión de marcadores de angiogénesis, permeabilidad y flujo sanguíneo. Derecha: el peso molecular del medio de contraste usado determina las características cinéticas de su difusión desde el espacio intravascular hacia el espacio extravascular-intersticial, así como su tiempo de residencia en cada uno de estos espacios. Modificado de García-Figueiras <i>et al.</i> (38).....	21
1.4	Esquema de la formación de una imagen micro-CT.....	23
1.5	Coefficiente másico de atenuación de materiales relevantes en la formación de imágenes DE. Se observan cambios notables en la atenuación alrededor de las energías del borde-K (33.1 keV) para el yodo. Datos tomados de Hubbell y Seltzer (42).....	25
1.6	(a) Clasificación convencional de las curvas tiempo-realce: Tipo 1 se refiere a un realce continuo, Tipo 2 representa un realce temprano seguido por una meseta, y Tipo 3 muestra un patrón de lavado o <i>wash out</i> . (b) Diagrama de los parámetros semi-cuantitativos que pueden obtenerse de las curvas tiempo-realce.....	27
1.7	Esquema de los modelos matemáticos más usados en el análisis cinético del tránsito del medio de contraste desde el espacio intravascular hacia el espacio extravascular-intersticial. BF, flujo sanguíneo; PS, producto área-permeabilidad; K^{trans} , constante de transferencia de volumen.....	29
1.8	Comparación de la imagen CT, micro-CT e histología de un cerebro de rata con un glioma desarrollado a partir de la inoculación de células U87MG, modificado de Kirschner <i>et al.</i> (80). Se aprecia la diferencia en la resolución espacial de las imágenes CT y micro-CT.....	32
3.1	Esquema del contenido de este capítulo.....	35
3.2	Simulación de los espectros de rayos X disponibles en el equipo micro-CT Albira ARS. Las etiquetas señalan el kilovoltaje y el filtro adicional.....	37
3.3	Imágenes micro-CT de los maniqués usados para evaluar el desempeño del equipo micro-CT y la calidad de imagen. Izquierda: vista transversal del maniqué de agua mostrando los volúmenes de interés (cuadrados amarillos) en el centro y la periferia del maniqué. Centro: vista coronal de las resinas yodadas. Derecha: vista coronal del maniqué yodado. Se observan cortes circulares de los viales con diferentes concentraciones de yodo, rodeados de agua.....	38

3.4	Gráficas de la atenuación (en HU) medida en imágenes de las resinas yodadas en función de la concentración de yodo (C_1 , en mg de yodo/ml). Se evaluaron diferentes calidades de haz (Q_1 - Q_8) y dos algoritmos de reconstrucción: (a) FBP y (b) SIRT 2D.....	45
3.5	Ejemplos de imágenes restadas (a) SE, (b) DE y (c) DCE usando el maniquí yodado. Las imágenes basal (I_{basal}) y con medio de contraste (I_{MC}) se adquirieron con la calidad de haz Q_5 . La imagen de alta energía (HE) se adquirió con la calidad Q_5 y la de baja energía (LE), con Q_1 ; se usó $\alpha = 0.85$. Las imágenes en (a) y (b) se adquirieron con 0.8 mA, 400 proyecciones y se reconstruyeron con FBP; las imágenes en (c) se adquirieron con Q_5 y 0.8 mA. Escala de las imágenes I_{basal} , I_{MC} , HE y LE: -1000 a 1000 HU; SE y DE: -500 a 800 HU; I_{basal} e I_{MC} en (c): 0 a 6000 unidades arbitrarias; DCE: 500 a 800 unidades arbitrarias.....	47
3.6	Evaluación de la calidad de imagen mediante la razón contraste-ruido (CNR) en imágenes tridimensionales originales reconstruidas con (a) FBP y (b) SIRT 2D, SE reconstruidas con (c) FBP y (d) SIRT 2D, DE reconstruidas con (e) FBP y (f) SIRT 2D, e imágenes bidimensionales (g) originales y (h) DCE. Las imágenes corresponden al maniquí yodado, y fueron adquiridas con las calidades de haz definidas en la Tabla 3.3....	49
3.7	Dosis en agua (D_{agua}) para imágenes adquiridas con diferente número de proyecciones, antes y después del mantenimiento al equipo micro-CT en noviembre de 2017. * $p < 0.05$, evaluado con ANOVA bidireccional, seguido por prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.....	52
4.1	Esquema del contenido de este capítulo. BI, biomarcador de imagen; C_1 , concentración de yodo.....	55
4.2	Curvas de crecimiento tumoral para el grupo piloto del modelo subcutáneo de glioma con células C6. Se inyectaron 3×10^6 células en dos flancos contralaterales de cuatro ratas Wistar macho y se midió el volumen tumoral a partir de los 5 días post-inyección.....	61
4.3	(a) Preparación del animal para la cirugía de cateterización previa a la adquisición de imágenes SE y DCE. (b) Inserción del catéter heparinizado en la vena yugular externa derecha del animal. (c) Después de la cirugía, se colocó al animal en la camilla para iniciar el estudio de imagen. (d) La bomba de infusión se colocó sobre el riel de la camilla. (e) Vista del equipo PET/SPECT/CT Albira ARS usado para la adquisición de las imágenes de rayos X realizadas por contraste en este trabajo. Se indican la posición de la camilla y la zona de irradiación.....	62
4.4	Evaluación del realce en función del tiempo post-inyección del medio de contraste preclínico Fenestra VC para cuatro dosis de yodo diferentes. El realce se cuantificó en: (a) bazo, (b) músculo, (c) aorta abdominal, (d) hígado, (e) riñón y (f) periferia tumoral.....	64
4.5	Evaluación cualitativa del desempeño del algoritmo afín para el registro de las imágenes basal (I_{basal}) y con medio de contraste (I_{MC}) previo a la resta DCE. Panel superior: imágenes adquiridas al inicio del estudio ($t = 0$ s). Panel inferior: imágenes adquiridas durante la infusión continua del medio de contraste. Las flechas amarillas indican la vena yugular derecha.....	65
4.6	Proyecciones de máxima intensidad (MIP) de las imágenes tridimensionales adquiridas con el protocolo SE: (a) imagen basal, (b) imagen adquirida durante la infusión continua del medio de contraste clínico, y (c) imagen restada SE. Proyecciones MIP de las imágenes tridimensionales adquiridas con el protocolo DE: (d) LE y (e) HE adquiridas 12 min post-inyección del medio de contraste preclínico, y (f) imagen restada DE. Las estrellas indican la ubicación de los tumores; las flechas señalan al catéter (amarilla), riñón (naranja), hígado (verde) y bazo (azul).....	66
4.7	Imágenes bidimensionales del tórax del animal adquiridas con el protocolo DCE para tres tiempos de adquisición: basales, en el panel superior; durante la administración continua del medio de contraste clínico (CM), en el panel medio; e imágenes restadas DCE, en el panel inferior.....	66

4.8	Funciones de calibración entre C_1 y el realce para imágenes restadas (a) SE, (b) DE con $\alpha = 0.42$ (agua), (c) DE con $\alpha = 0.55$ (resina con 0 mg I/ml), (d) DE con $\alpha = 0.67$ (músculo), y (e) DCE. Se indican los valores medidos (círculos), las líneas de regresión (línea sólida) y los intervalos de confianza del 95% para la regresión (líneas punteadas)....	67
4.9	Valor en músculo de tres BI (realce, rBV, C_1) cuantificados en imágenes SE y DE (con tres valores del factor de ponderación, α). * $p < 0.05$ indica una diferencia significativa con los valores SE, evaluado con ANOVA bilateral, seguido de prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.....	68
4.10	Implementación del análisis gráfico de Patlak para la cuantificación del rBV y K^{trans} en imágenes DCE. (a) Curvas tiempo- C_1 para el ventrículo izquierdo (AIF) y el músculo. (b) Se usaron los datos 30-80 s para realizar el análisis gráfico.....	69
4.11	Evaluación de la relación entre los valores medidos y los valores nominales de C_1 en imágenes de las resinas yodadas: (a) comparación de los tres protocolos, (b) SE, (c) DE, (d) DCE.....	70
4.12	Evaluación de (a) sesgo y (b) repetibilidad (desviación estándar intra-sujeto, wSD) de C_1 de para los protocolos SE, DE y DCE.....	71
4.13	(a) Intervalos de confianza (IC) del 95% para C_1 cuantificada con los protocolos SE, DE y DCE. (b) Reproducibilidad de C_1 cuantificada con dos protocolos de imagen; RDC, coeficiente de reproducibilidad.....	72
4.14	Evaluación de la utilidad de los IC 95% para estimar C_1 a partir de los protocolos (a) SE, (b) DE y (c) DCE.....	73
5.1	Esquema del contenido de este capítulo.....	75
5.2	Controles negativos y positivos para la evaluación de los anticuerpos anti-PCNA (panel superior, magnificación 100 \times) y anti-CD34 (panel inferior, magnificación 400 \times) con la técnica de inmunohistoquímica. Los controles negativos fueron sin anticuerpo, los positivos corresponden a amígdala (anti-PCNA) y tumor vascular (anti-CD34); se muestran casos correspondientes a un tumor con 95% de proliferación celular (anti-PCNA) y 18.3 vasos/HPF (anti-CD34).....	77
5.3	Evaluación cualitativa de imágenes SE del modelo animal de glioma. Se muestran vistas coronal, transversal y sagital para una imagen basal, una imagen con medio de contraste (CE) y la imagen parametrizada en valores de C_1 . La aorta abdominal y el tumor se indican con una flecha y un rectángulo, respectivamente, en las vistas coronal y transversal. En las vistas sagitales únicamente se muestran los tumores.....	78
5.4	Evaluación cualitativa de imágenes DE del modelo animal de glioma. Se muestran vistas coronal, transversal y sagital para una imagen de baja energía (LE), una imagen de alta energía (HE) y la imagen parametrizada en valores de C_1 . La aorta abdominal y el tumor se indican con una flecha y un rectángulo, respectivamente, en las vistas coronal y transversal. En las vistas sagitales únicamente se muestran los tumores.....	79
5.5	Evaluación cualitativa de imágenes DCE del modelo animal de glioma. Se muestran imágenes bidimensionales para una imagen basal (sin medio de contraste), imagen con contraste (CE) y la imagen parametrizada en valores C_1 , para tres tiempos de adquisición (0, 30 y 80 s). Se observa la presencia del catéter utilizado para la administración del medio de contraste en las imágenes CE y C_1	80
5.6	Atenuación en imágenes asociadas al protocolo (a, b) SE y (c, d) DE, en aorta, vena cava inferior (VCI), riñón, hígado, bazo, músculo y regiones tumorales: tumor completo (tumor), tumor central (centro) y periferia tumoral (periferia). Se indica $p < 0.05$, evaluado con ANOVA bidireccional y la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples: (+) basal vs. CE o LE vs. HE; (#) aorta (o músculo) vs. volúmenes de interés (VOI) en imágenes basales y LE; (*) aorta (o músculo) vs. VOI en imágenes CE y HE.....	81

- 5.7 BI cuantificados en diferentes VOI en imágenes SE, DE y DCE del modelo animal: (a, b) realce cuantificado en imágenes SE y DE; (c, d) C_I , en imágenes SE y DE; (e) rBV, en SE, DE y DCE; (f) K^{trans} , en DCE. Se indica $p < 0.05$, evaluado con ANOVA bidireccional y la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples: (+) SE vs. DE, SE vs. DCE o DE vs. DCE, para todos los VOI; (#) aorta (o músculo) vs. (VOI) en imágenes SE; (*) aorta (o músculo) vs. VOI en imágenes DE..... 82
- 5.8 Caracterización histológica del modelo subcutáneo de glioma con células C6. (a) Se observaron tumores altamente celulares con pleomorfismo y zonas de necrosis coagulativa revestidas por células neoplásicas en palizada en secciones de tejido de los tumores (hematoxilina y eosina (H&E), 100×). (b) Forma compleja de hiperplasia microvascular con patrones de crecimiento peri-endotelial (H&E, 100×). Se observó un mayor número de microvasos (en tinciones con anti-CD34) cerca de áreas necróticas en secciones de tejido de tumores, mostradas con aumentos de (c) 100× y (d) 400×..... 85
- 5.9 Tinción inmunohistoquímica representativa de PCNA de tumores con (a) índice de proliferación (IP) del 50% (400×) y (b) IP del 95% (400×). Tinción inmunohistoquímica representativa de CD34 de tumores con (c) densidad de microvasos (MVD) = 4.4 vasos/HPF (100×) y (d) MVD = 18.3 vasos/HPF (100×)..... 86
- 5.10 Evaluación de la correlación entre porcentaje de necrosis (PN) y los BI cuantificados en imágenes SE, DE y DCE: (a) realce (SE), (b) C_I (SE), (c) realce (DE), (d) C_I (DE), (e) rBV (SE), (f) rBV (DCE) y (g) K^{trans} (DCE). Se destacan en negritas los valores de $p < 0.05$ 87
- 5.11 Evaluación de la correlación entre índice de proliferación (IP) y los BI cuantificados en imágenes SE, DE y DCE: (a) rBV (SE), (b) rBV (DE), (c) rBV (DCE) y (d) K^{trans} (DCE)..... 88
- 5.12 Evaluación de la correlación entre densidad de microvasos (MVD) y los BI cuantificados en imágenes SE, DE y DCE: (a) realce, (b) C_I y (c) rBV en periferia tumoral (SE); (d) realce, (e) C_I y (f) rBV en tumor completo (SE); (g) rBV (DE), (h) rBV (DCE) y (i) K^{trans} (DCE). Se destacan en negritas los valores de $p < 0.05$ 89

1 ANTECEDENTES

1.1 Angiogénesis tumoral

Las células cancerosas, al igual que las células sanas, requieren de un lecho vascular y linfático que les provea de oxígeno y nutrientes y que les permita eliminar desechos (1). A nivel sistémico, las venas y arterias transportan oxígeno y dióxido de carbono, respectivamente, mientras que los vasos capilares permiten el intercambio de estos compuestos a nivel celular. Los vasos sanguíneos están formados por células endoteliales (EC, por sus siglas en inglés) en su pared interna, y están recubiertos por células de músculo liso (SMC, por sus siglas en inglés) y pericitos, como se ilustra en la Figura 1.1 (a). Los pericitos y SMC contribuyen al transporte de sustancias en las venas y arterias al regular su constricción, además de que proveen estabilidad estructural y madurez a los vasos sanguíneos (2).

La angiogénesis es un mecanismo de vascularización tumoral mediante el cual se generan vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos sanguíneos ya existentes cercanos a un tumor y es una característica esencial para el desarrollo del cáncer (1,3). En condiciones normales, los vasos sanguíneos tienen una estructura organizada, con vasos estables y maduros, como la mostrada en la Figura 1.1 (b). Los vasos angiogénicos se caracterizan por estructuras tortuosas y con alta permeabilidad, esta última debido a las fenestraciones ocasionadas por la pérdida de uniones entre las EC y a la ausencia o menor cantidad de pericitos y SMC en la pared exterior del vaso (4), como se muestra en la Figura 1.1 (c).

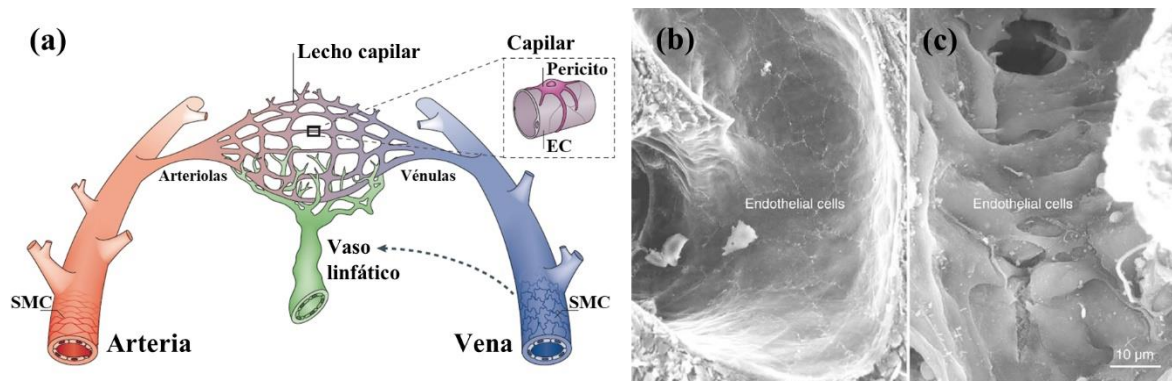


Figura 1.1 (a) Esquema de la jerarquía de los vasos sanguíneos, modificado de Herbert y Stainier (2). Los vasos están formados por células endoteliales (EC), pericitos y células de músculo liso (SMC). Micrografías de la superficie luminal de (b) un vaso sanguíneo sano y (c) un vaso sanguíneo angiogénico, tomadas de Baluk *et al.* (4).

1.1.1 Regulación de la angiogénesis

En los adultos, la angiogénesis es un proceso fisiológico altamente regulado que ocurre en situaciones específicas, por ejemplo, durante la reparación de heridas (5). El proceso angiogénico fisiológico se esquematiza en la Figura 1.2; inicia con la proliferación de las EC a partir de un aumento en la cantidad de estímulos pro-angiogénicos comparada con una

menor cantidad de estímulos anti-angiogénicos, lo cual se denomina *switch* angiogénico. Si predominan los factores anti-angiogénicos, el *switch* angiogénico no se activa y las ECs permanecen quiescentes (5). El proceso angiogénico culmina con la estabilización y maduración de los nuevos vasos formados, el establecimiento de un flujo sanguíneo estable y el regreso de las EC a la quiescencia. En contraste, en la angiogénesis tumoral no se alcanza la etapa de estabilización y maduración, dando lugar a las estructuras irregulares y fenestradas mostradas en la Figura 1.1 (c).

Se han identificado una gran variedad de factores pro- y anti-angiogénicos, los cuales pueden ser secretados por las células tumorales o por otras células presentes en el microambiente tumoral, o liberados por la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) (2,6–8). Entre ellos se encuentran factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular, citocinas, enzimas proteolíticas, fragmentos de proteínas que en su forma completa no son reguladores angiogénicos, y RNAs no codificantes. Para una descripción detallada de la regulación del proceso angiogénico se sugiere consultar las referencias (6–8). A continuación, se describirán los mecanismos más relevantes en la regulación de la angiogénesis.

Los vasos sanguíneos se encuentran originalmente quiescentes, como se muestra en la Figura 1.2 (a). En un vaso quiescente, las EC forman una monocapa de células conectadas mediante uniones mediadas por VE-caderina que promueven la estabilidad del vaso al inhibir la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR-2) (6). Esta inhibición es importante, ya que una de las funciones de VEGFR-2 es promover la proliferación de las EC al ser activado por alguno de sus ligandos, los factores de crecimiento del endotelio vascular A, C, y D (VEGF-A, -C, y -D). El eje VEGF-A/VEGFR-2 es el principal regulador y promotor de la angiogénesis tumoral. Existen otro tipo de señales que ayudan a mantener la quiescencia de los vasos, como la señalización autocrina de NOTCH y angiopoyetina-1 (ANG-1). ANG-1 se une al receptor TIE2 y estimula el depósito de la membrana basal y la unión de los pericitos, mientras que NOTCH libera su dominio intracelular NICD al ser activado por Delta-like 4 (Dll-4), inhibiendo la expresión de VEGFR-2. Por otro lado, el contacto entre EC y pericitos es estabilizado por N-caderina. Los pericitos secretan ANG-1 y participan en la formación de la membrana basal al igual que las EC.

La formación de un brote angiogénico inicia con la activación de las células de punta y la formación del tallo a partir de un estímulo pro-angiogénico que llega a un vaso originalmente quiescente (6,7), como se muestra en la Figura 1.2 (b). El estímulo pro-angiogénico puede estar mediado por VEGFs, o por otros factores pro-angiogénicos como la angiopoyetina-2 (ANG-2) o la metaloproteinasa de la matriz 2 (MMP-2). El VEGF-A aumenta la permeabilidad de la capa de EC al promover la endocitosis de VE-caderina. ANG-2 compite con ANG-1 por el receptor TIE2 y causa la separación de los pericitos de la pared del vaso. MMP-2 degrada la membrana basal, lo cual promueve la liberación de moléculas pro-angiogénicas almacenadas en la ECM. El lumen del vaso se establece mediante la localización de CD34 y podocalixina en la superficie apical de las EC, induciendo una repulsión electrostática entre ellas (2). Las células de la punta desarrollan extensiones del citoplasma llamados filipodios, los cuales detectan las señales pro-angiogénicas como efrinas, semaforinas e integrinas que les permiten desplazarse sobre la membrana basal.

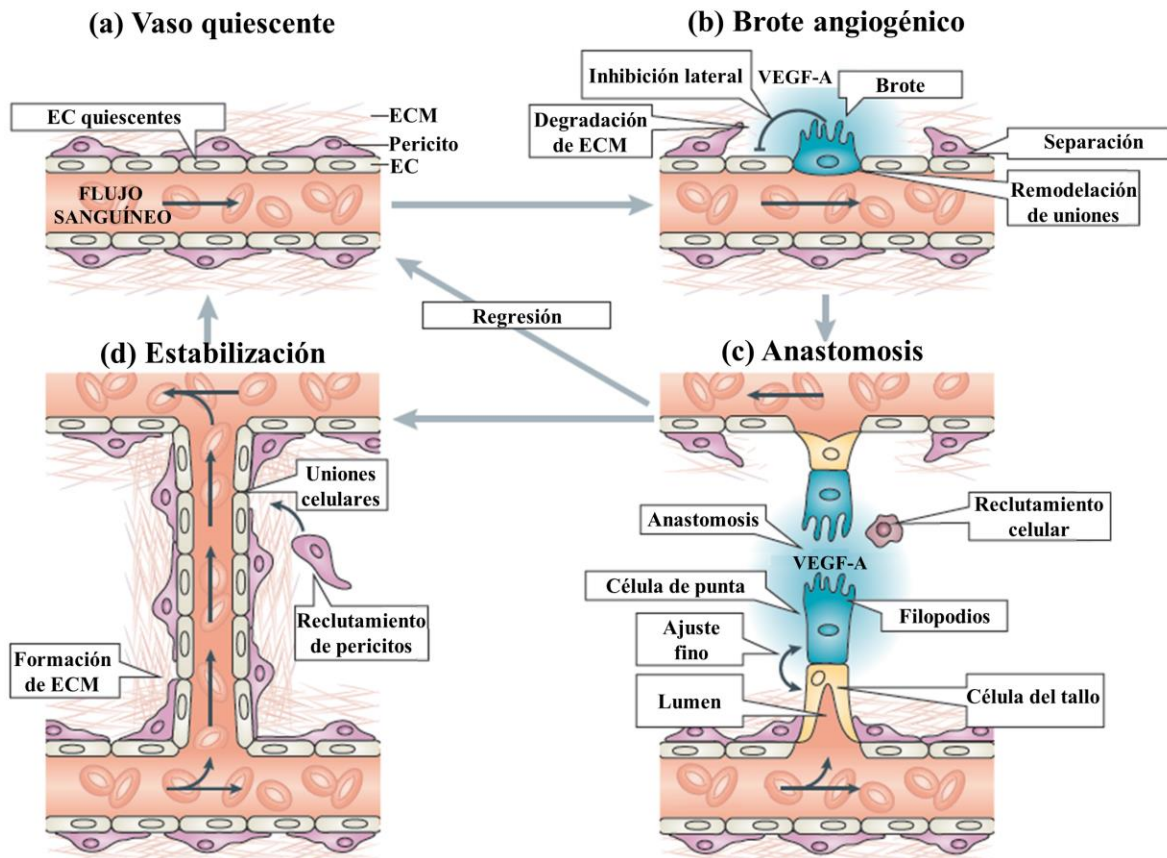


Figura 1.2 Procesos involucrados en regulación de la angiogénesis fisiológica. (a) Las células endoteliales (EC) se encuentran inicialmente quiescentes. (b) Se seleccionan células de punta a partir de un estímulo angiogénico, ocasionado por factores de crecimiento como el factor de crecimiento del endotelio vascular-A (VEGF-A), se remodelan las uniones entre EC, se degrada la matriz extracelular (ECM) y se separan los pericitos. (c) Las células de punta desarrollan filopodios para migrar hacia el estímulo angiogénico, se forma el lumen del brote y se unen los brotes de vasos angiogénicos cercanos (anastomosis). (d) Se reestablecen las uniones entre EC, se reclutan pericitos y se deposita la ECM, llevando a la estabilidad estructural del nuevo vaso sanguíneo y al establecimiento del flujo sanguíneo. Si esto no ocurre, se da la regresión del vaso. Figura modificada de Herbert y Stainier (2).

Posteriormente ocurre la anastomosis, la cual consiste en la unión de dos brotes angiogénicos cercanos, como se muestra en la Figura 1.2 (c). Una vez que las EC de dos brotes se unen, se inicia el flujo sanguíneo (6). Como paso final del proceso angiogénico y para que el flujo se mantenga y el nuevo vaso sea funcional, debe estabilizarse y madurar, como se muestra en la Figura 1.2 (d). En la angiogénesis fisiológica, la estabilización y maduración del vaso se logran mediante el reclutamiento de pericitos y SMC. Las EC liberan factor de crecimiento derivado de plaquetas B (PDGF-B) o ANG1, los cuales quimioatraen a los pericitos. Otras quimiocinas secretadas para el reclutamiento de pericitos son el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), efrina-B2 y NOTCH (6). Las uniones entre EC y entre EC-ECM se reponen al liberar inhibidores tisulares de las MMPs (TIMPs). Si no se puede establecer el flujo, el vaso sufre regresión. En la angiogénesis tumoral no ocurre la estabilización debido a la presencia sostenida de factores pro-angiogénicos en el microambiente tumoral, en respuesta a la hipoxia o la inflamación (7).

La hipoxia, definida como un nivel bajo en la concentración de oxígeno, se ha identificado como uno de los principales factores que promueven la angiogénesis tumoral (6–8). Durante el crecimiento del tumor, la concentración de oxígeno es mayor para las células más externas y más cercanas a los vasos capilares que para las células en las zonas más internas del tumor o más alejadas de los vasos capilares. La concentración de oxígeno varía de acuerdo al tipo de tejido evaluado, el tamaño del tumor, y la zona específica del tumor donde se realiza la medición; en tumores es de 1-2%, en promedio, y es más baja que la concentración en el tejido sano (9). En condiciones hipóxicas, el factor inducible de hipoxia-1 α (HIF-1 α) inicia una respuesta al promover la transcripción de VEGF-A, promoviendo la angiogénesis tumoral con el objetivo de aumentar el nivel de oxígeno. HIF-1 α también está implicado en la regulación de la expresión de ANG-2 y MMPs, así como en el reclutamiento de células precursoras endoteliales (EPCs).

Las quimiocinas promueven la angiogénesis al reclutar células del sistema inmune (como los macrófagos), EPC y células derivadas de la médula ósea (BMDC), o mediante la activación directa de sus receptores. La quimiocina conocida como factor derivado de células estromales-1 α (SDF-1 α) es secretada por las células tumorales y fibroblastos presentes en el microambiente tumoral; su expresión aumenta en condiciones hipóxicas. CXCR4, el receptor de SDF-1 α , se encuentra sobre-expresado en las células de punta del brote angiogénico. SDF-1 α participa en el reclutamiento de macrófagos, los cuales promueven la inflamación (mediante la liberación de citocinas) y la angiogénesis (mediante la liberación de MMPs) (6,10). SDF-1 α también participa en el reclutamiento de pericitos al aumentar su expresión mediada por PDGF-B. Adicionalmente, se han identificado RNAs no codificantes en la regulación epigenética de la angiogénesis, como los microRNAs (miRNAs). Los miRNAs son fragmentos pequeños de RNA no codificante que inducen la degradación del RNA mensajero o bloquean su traducción y son secretados por las EC en respuesta a la hipoxia o a altos niveles de VEGF-A (6).

1.1.2 Cuantificación de la angiogénesis tumoral e implicaciones clínicas

En los inicios del estudio de la angiogénesis se seguía la hipótesis de Folkman para su cuantificación (11): el reflejo de la angiogénesis en tumores está dado por el número y la estructura de los vasos sanguíneos asociados al tumor, la expresión de moléculas endógenas pro- y anti-angiogénicas y la expresión de receptores específicos. El número de vasos sanguíneos promedio en una cierta área de tejido teñido para identificar marcadores de EC (anti-CD31, anti-CD34, o anti-CD105, por ejemplo) se conoce como densidad de microvasos (MVD, por sus siglas en inglés) y es actualmente el biomarcador subrogado estándar para la cuantificación de la angiogénesis en la clínica (12–14). El nivel de expresión de reguladores de la angiogénesis tumoral tales como VEGF-A, VEGFR-2, -3, ANG-1,2, HIF-1 α , TGF- β , integrina α v β 3 y MMP-2, -9, entre otros, también se ha usado como marcador histológico subrogado de la angiogénesis ya que se ha observado una correlación entre la expresión de estos marcadores y la MVD (13). Los protocolos de tinción para la evaluación histológica de los marcadores subrogados de la angiogénesis son robustos y estandarizados. Sin embargo, la evaluación histológica presenta limitaciones tales como la variabilidad entre observadores, y la heterogeneidad espacial y temporal del estatus de la angiogénesis tumoral (14).

A pesar de las limitaciones mencionadas, se ha demostrado el valor pronóstico y predictivo de la MVD y el nivel de expresión de VEGF-A en algunos tipos de cáncer (15–

21). Una alta MVD se ha asociado con un mayor riesgo de metástasis y recurrencia, así como un decremento en la sobrevida en cáncer de mama y cerebro (15–17). Un alto nivel de expresión de VEGF-A se ha asociado con una menor sobrevida libre de enfermedad en cáncer de mama (18), y con una menor sobrevida global en cáncer de mama, pulmón y colon (18–20). Algunos estudios han evaluado el valor predictivo de la MVD y el VEGF-A; en cáncer de pulmón se observó que una alta MVD se asoció con un decremento en el volumen tumoral después de un tratamiento de quimioterapia combinado con terapia anti-angiogénica (21), mientras que una alta MVD se asoció con una mayor sobrevida libre de enfermedad en pacientes de cáncer de ovario luego de un tratamiento similar (22); por otro lado, un alto nivel de VEGF-A se asoció con un aumento en la recurrencia y un decremento en la sobrevida después de terapia adyuvante convencional en cáncer de mama (18).

La identificación de la angiogénesis durante el desarrollo tumoral tiene implicaciones clínicas. Existe evidencia tanto de estudios en pacientes como en modelo animales de que el *switch* angiogénico ocurre durante la etapa premaligna del desarrollo del cáncer, y que precede el desarrollo invasivo en todos los precursores estudiados de cáncer sólido (23,24). Las lesiones premalignas se caracterizan por desórdenes de proliferación, pérdida de uniformidad celular y de organización de la arquitectura. A pesar de la constante investigación, aún se desconocen los factores que favorecen la reversibilidad de estas lesiones o su progresión a cáncer *in situ* o cáncer invasivo. Sin embargo, se reconoce que la angiogénesis tumoral es esencial para el crecimiento de la masa tumoral, además de que favorece la diseminación y colonización de células tumorales metastásicas (10,25). Por lo tanto, la caracterización del estatus angiogénico de un tumor, junto con la información pronóstica y predictiva que proporciona, podría ayudar en la toma de decisiones sobre el manejo y tratamiento de pacientes con cáncer.

Las terapias anti-angiogénicas han explorado varias estrategias para el control de la angiogénesis tumoral, inhibiendo sus mecanismos de regulación a distintos niveles (8). La estrategia más explorada ha sido la inhibición de la vía VEGF-A/VEGFR-2,3, bloqueando o inhibiendo al ligando o a los receptores mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos, receptores solubles, moléculas inhibitoras de la fosforilación del receptor, o mediante la inhibición directa de las vías de señalización intracelular. Otro de los objetivos de la terapia anti-angiogénica es la normalización de la vasculatura tumoral, la cual se logra al estabilizarse las señales pro- y anti-angiogénicas para favorecer el reclutamiento de pericitos y el restablecimiento de las uniones entre EC, con el fin de restablecer el flujo sanguíneo a un nivel suficiente para permitir una mejor entrega de la quimioterapia o la inmunoterapia sistémicas. Actualmente se han aprobado 11 fármacos anti-angiogénicos para su uso en pacientes; a pesar de que la mayoría provee una mejor sobrevida libre de enfermedad en ciertos tipos de cáncer, ninguno de ellos ha mejorado la sobrevida global en los ensayos clínicos (26). Estos hallazgos sugieren que existe una respuesta temporal (no sostenida) en el control de la angiogénesis, de modo que no se tiene un impacto real en la mejoría de los pacientes. Esta resistencia, escape o evasión al tratamiento angiogénico podría deberse a la alta complejidad de los mecanismos de regulación de la angiogénesis tumoral, a un microambiente favorable para el mantenimiento de las señales pro-angiogénicas, o a los mecanismos alternativos de vascularización tumoral que han sido descritos en los últimos años (6,27).

El reto actual en la cuantificación de la angiogénesis y la efectividad de las terapias anti-angiogénicas se basa en la identificación de los mecanismos alternativos de vascularización tumoral, i.e., la vasculogénesis, la cooptación de vasos cercanos, el mimetismo vascular de

las células tumorales, y la diferenciación de células troncales tumorales a EC (28). Se han propuesto marcadores histológicos subrogados de la angiogénesis que toman en cuenta estos mecanismos alternativos de vascularización tumoral, uno de ellos es el patrón de crecimiento histológico (HGP, por sus siglas en inglés), el cual se ha usado para describir los diferentes perfiles de vascularización tumoral en hígado, pulmón, y cerebro (14,29,30). La ventaja de este marcador sobre la MVD es que permite distinguir entre un tumor angiogénico y un tumor no angiogénico (el cual se provee de oxígeno y nutrientes mediante los mecanismos alternativos mencionados). La desventaja de este marcador histológico es que se requieren muestras amplias de tejido que permitan evaluar las características morfológicas de la interfaz entre el tumor y el tejido normal adyacente, lo cual no siempre es posible de obtener en la clínica. Adicionalmente, se ha observado que el HGP es dinámico, ya que puede cambiar durante el desarrollo tumoral y después de aplicarse un tratamiento.

Una alternativa actual que permitiría superar las limitaciones inherentes a la evaluación histológica del HGP y la MVD es el estudio por imagen médica. La imagen médica emplea procedimientos mínimamente invasivos para obtener imágenes de las cuales es posible extraer información anatómica y funcional del estatus angiogénico tumoral, con la ventaja adicional de que se puede obtener información tridimensional y a lo largo del tiempo (14,29,31,32). En la siguiente sección se ampliará el tema del uso de la imagen cuantitativa en la evaluación clínica y preclínica de la angiogénesis tumoral.

1.2 Imagen cuantitativa y biomarcadores de imagen en cáncer

La imagen médica es un componente esencial en las diferentes etapas del manejo clínico del cáncer, desde el tamizaje, el diagnóstico y la estadificación, tratamiento y vigilancia, hasta el seguimiento (33). El uso de biomarcadores de imagen (BI), adicionales a los biomarcadores moleculares, genómicos o histológicos, se ha extendido tanto a la práctica clínica como a la investigación oncológica (34).

Un biomarcador se define como “una característica que es medida como un indicador de un proceso biológico normal, de un proceso patológico o es una respuesta a una exposición o intervención, incluyendo intervenciones terapéuticas” (34). Los BI son parámetros que se cuantifican en una o más modalidades de imagen, y pueden ser variables numéricas (cuantitativas) o categóricas (cualitativas). Una de sus características más enriquecedoras es que con una misma imagen pueden evaluarse diferentes BI. Algunos BI tienen una aplicación rutinaria en la clínica, como la clasificación BI-RADS para el cáncer de mama que se obtiene de imágenes mamográficas, mientras que otros se encuentran en vías de evaluación en ensayos clínicos (34).

Para que un BI pueda usarse de manera rutinaria en la clínica debe pasar varias etapas de validación: técnica, biológica, clínica, y una evaluación de costo-beneficio (34). En la Tabla 1.1 se presentan de manera general los requerimientos a evaluar en cada tipo de validación. Estas validaciones requieren de estudios preclínicos y clínicos que usualmente involucran la participación de varias instituciones de salud, y su objetivo es verificar que el BI es un parámetro confiable, reproducible y de utilidad clínica. El impacto de los BI en la medicina actual es importante, ya que proporcionan información útil para definir las estrategias de manejo y tratamiento de un paciente de acuerdo a su estatus patológico único, lo cual es la definición de la medicina personalizada o de precisión.

Tabla 1.1 Estudios de validación de biomarcadores de imagen (BI) (34).

Tipo de validación	Requerimientos a evaluar
Técnica	<ul style="list-style-type: none"> • Relación entre el valor medido y el valor verdadero: deben ser idénticos o linealmente dependientes. • Sesgo: diferencia sistemática entre el valor medido y el valor verdadero. • Precisión o variabilidad: <ul style="list-style-type: none"> ○ Repetibilidad: Se realizan varias mediciones del BI manteniendo las mismas condiciones de adquisición de la imagen y cuantificación. ○ Reproducibilidad: Se realizan varias mediciones del BI variando las condiciones de adquisición o cuantificación, en el mismo o diferentes sujetos de estudio. • Disponibilidad: La obtención del BI debe ser realizable, segura y bien tolerada por la población objetivo.
Biológica	Relación entre el BI y algún aspecto de la biología tumoral.
Clínica	Relación entre el BI y alguna variable de la evolución de la enfermedad, así como evaluación del valor que aporta en la guía de la toma de decisiones.
Costo-Beneficio	El valor agregado de evaluar un BI debe ser mayor que el costo de realizar los estudios de imagen correspondientes.

Los BI cuantitativos se obtienen a partir de imágenes cuantitativas. La imagen cuantitativa incluye el desarrollo, estandarización, y optimización de los protocolos de adquisición de imágenes (anatómica, funcional o molecular), el análisis de datos, los métodos de visualización de las imágenes y el reporte de resultados (35). La estandarización de estos procesos permite que los BI cuantificados en diferentes centros, por diferente personal y con diferentes sistemas de imagen sean comparables. Para asegurar la reproducibilidad de los BI, es necesario identificar, cuantificar y minimizar las fuentes de variabilidad en cada uno de los procesos mencionados (36). Actualmente, existen grupos de investigación dedicados al desarrollo de métodos y guías que lleven a la estandarización de estos procesos, tanto para BI que se obtienen mediante modalidades tradicionales de imagen como para las recientes aplicaciones de la radiómica y la inteligencia artificial a la medicina (34–37).

A continuación, se describen brevemente los lineamientos de la evaluación del desempeño técnico de BI propuestos por la Alianza de Biomarcadores Cuantitativos de Imagen (QIBA, por sus siglas en inglés). QIBA es una iniciativa de la Sociedad de Radiólogos de Norteamérica (RSNA, por sus siglas en inglés) para establecer consensos que permitan definir, cuantificar y comparar las condiciones en las cuales un BI puede ser usado con confianza (35,36). Dichas condiciones corresponden a los parámetros para la validación técnica de los BI, definidos en la

Tabla 1.1: la relación entre el valor medido y el valor verdadero, el sesgo y la variabilidad o precisión (repetibilidad y reproducibilidad) del valor medido.

Idealmente, el valor medido de un BI debe ser idéntico al valor verdadero (36). Es posible que en etapas iniciales del desarrollo de un BI no se cumpla esta condición, debido principalmente a imperfecciones en la calibración o en los valores de referencia, sin embargo, se espera una relación lineal entre ellos. Para evaluar esta relación se adquieren imágenes (2 o más réplicas) de un sujeto de estudio que permita cuantificar el valor verdadero del BI a evaluar. El valor verdadero se puede cuantificar en un maniquí físico o digital validado, o puede provenir de un valor de referencia o *gold standard* que podría ser otro biomarcador previamente validado. Las réplicas pueden ser de sujetos de estudio

similares o del mismo sujeto de estudio en diferente posición y se sugiere realizar mediciones repetidas del BI en cada imagen réplica (36). Una vez realizadas las mediciones del BI, se grafican los valores promedio del BI medido vs. los valores nominales del BI y se ajusta un polinomio de 2° orden para evaluar el coeficiente del término de 2° orden. Si este coeficiente es diferente de cero de manera estadísticamente significativa (mayor que 0.5, por ejemplo), se rechaza la relación lineal y se reporta una curvatura. Si no, se ajusta un polinomio de primer orden y si la pendiente está entre 0.95 y 1.05 y $R^2 > 0.9$, se determina que la relación entre el valor medido del BI y el valor nominal es lineal y con sesgo constante. Si la pendiente se encuentra fuera de este rango, se reporta una relación proporcional con un sesgo no constante.

El sesgo se define como la diferencia entre el valor medido de un BI y el valor verdadero o de referencia (36). Para que un BI pueda ser usado como predictor del cambio o diferencia de una característica biológica, debe realmente predecir la medición de dicha característica y representar su valor verdadero, i.e., el sesgo debe ser cero. El sesgo se evalúa de manera visual en gráficas de sesgo vs. valor verdadero y en la gráfica de la relación entre el valor medido del BI y su valor verdadero. En esta última, se identifica un sesgo igual a cero si la recta ajustada tiene pendiente igual a uno, un sesgo constante si la recta ajustada es paralela a una recta con pendiente igual a uno (el sesgo promedio será igual a la ordenada al origen), y un sesgo no constante si existe proporcionalidad y la pendiente es significativamente diferente de uno. Si el sesgo es constante, se reporta el sesgo promedio para el rango del BI evaluado. Si no es constante pero depende del valor verdadero, se reporta un promedio ponderado de acuerdo con su varianza (36).

La repetibilidad y la reproducibilidad son medidas de la precisión o variabilidad de un BI. La primera se refiere a la variabilidad del BI cuando se repite una medición bajo las mismas condiciones experimentales y en el mismo sujeto de estudio o similares. La segunda, a la variabilidad asociada con su uso en condiciones clínicas con factores externos que pueden no ser estrictamente controlados, por ejemplo, el uso de diferentes equipos de imagen, operadores, algoritmos de reconstrucción o análisis, tipos de pacientes y hospitales (36).

La repetibilidad de un BI está relacionada con la variabilidad de las diferentes repeticiones realizadas en un mismo sujeto de estudio (paciente o maniquí), es decir, con la varianza intrasujeto σ_w^2 (*within-subject*). La varianza intersujeto σ_b^2 (*between-subject*), por otro lado, está relacionada con la variabilidad biológica de los sujetos de estudio, la cual no está relacionada con el desempeño técnico del BI (36). Existen diferentes maneras de estimar la repetibilidad; generalmente se evalúa en pruebas de tipo *test-retest* en pacientes o maniquís (dos réplicas), con un lapso de tiempo corto entre pruebas, y se evalúan la desviación estándar intrasujeto (wSD), la σ_w^2 , el coeficiente de variación intrasujeto (wCV), el coeficiente de correlación intraclases (ICC), el coeficiente de repetibilidad (RC) y los límites de acuerdo (LOA), definidos en (36). Adicionalmente, se puede evaluar de manera visual a partir de una gráfica de wSD vs. valor verdadero.

La reproducibilidad de un BI está relacionada con la variabilidad de las diferentes repeticiones realizadas en un mismo sujeto de estudio (o similares) bajo diferentes condiciones. Se puede estimar mediante el coeficiente de reproducibilidad (RDC) o el coeficiente de correlación de concordancia (CCC), definidos en (36). Adicionalmente, se puede evaluar de manera visual mediante gráficas de dispersión que comparen la correlación entre las dos condiciones de medición o mediante gráficas de Bland-Altman, si

es que los datos son pareados; para datos no pareados se recomiendan gráficas de cajas. El análisis de la reproducibilidad puede ser simplemente descriptivo, o se pueden diseñar pruebas de hipótesis para contrastar las diferentes condiciones de medición y/o algoritmos del cálculo de un BI y probar su equivalencia o superioridad.

La evaluación del desempeño técnico de un BI es esencial para conocer los límites en los cuales su medición será confiable. Una vez identificados, es necesario evaluar su desempeño para describir el proceso biológico al cual se relaciona, así como su utilidad clínica.

1.2.1 La imagen médica en el estudio de la angiogénesis tumoral

Se han empleado diversas modalidades de imagen médica para el estudio de la angiogénesis (38,39). Cada modalidad proporciona diferente tipo de información que se relaciona con las características morfológicas, funcionales o moleculares del estatus angiogénico del tumor, como se muestra en la Figura 1.3 (a). La mayoría de las modalidades usadas emplean técnicas de imagen basadas en el uso de medios de contraste o radiofármacos, aprovechando la aumentada permeabilidad de los vasos angiogénicos, como se muestra en la Figura 1.3 (b), y son conocidas como imagen realizada por contraste (CE, por sus siglas en inglés), en el primer caso, e imagen molecular, en el segundo.

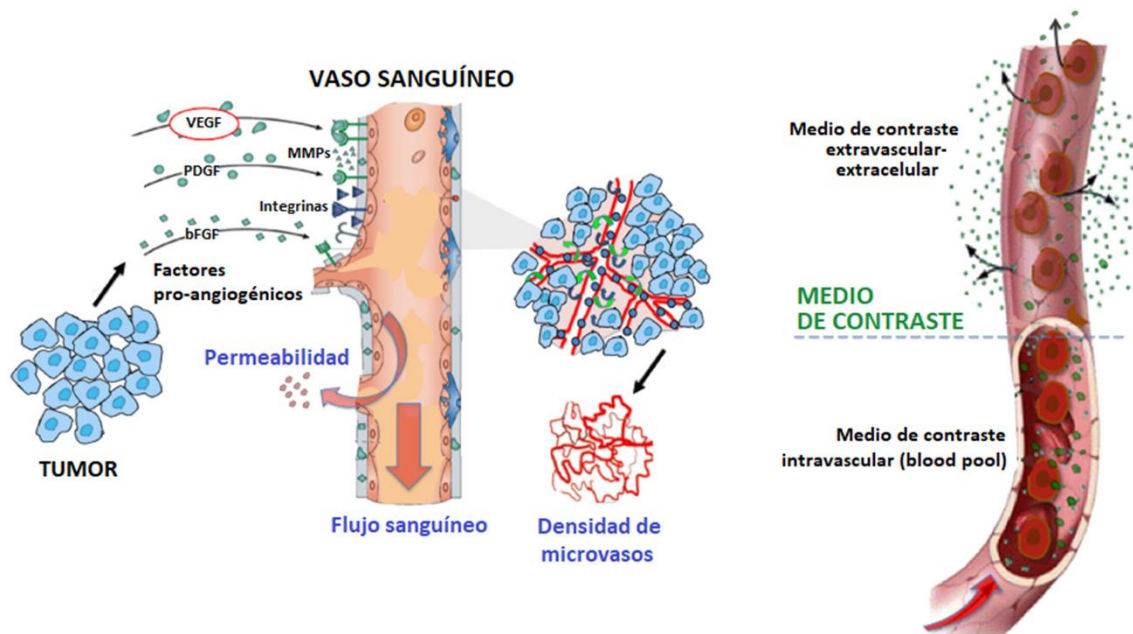


Figura 1.3 Esquema del estudio de la angiogénesis tumoral mediante técnicas de imagen realizada por contraste. Izquierda: el uso de medios de contraste permite evaluar características morfológicas, moleculares y funcionales del transporte del medio de contraste relacionadas con la densidad de microvasos, expresión de marcadores de angiogénesis, permeabilidad y flujo sanguíneo. Derecha: el peso molecular del medio de contraste usado determina las características cinéticas de su difusión desde el espacio intravascular hacia el espacio extravascular-intersticial, así como su tiempo de residencia en cada uno de estos espacios. Modificado de García-Figueiras *et al.* (38).

Entre las modalidades de imagen clínica que usan técnicas CE se incluyen el ultrasonido (US), la mamografía digital (CEDM), la resonancia magnética (MRI), y la tomografía

computarizada (CT); mientras que la imagen molecular incluye la imagen de tomografía por emisión de positrones (PET) con diferentes radiofármacos, u otras técnicas de imagen que emplean medios de contraste dirigidos o marcados. La información morfológica obtenida mediante la imagen CE o molecular se refiere a parámetros de la arquitectura vascular y podría estar relacionada con la MVD; la información funcional está relacionada con los parámetros cinéticos del transporte del medio de contraste o el radiofármaco a través de la vasculatura tumoral (permeabilidad y flujo sanguíneo); mientras que la información molecular podría reflejar el nivel de expresión de ciertos factores pro- y anti-angiogénicos.

Además de proporcionar información morfológica y funcional sobre el estatus angiogénico de un tumor, las técnicas de imagen CE y molecular presentan algunas ventajas respecto al método tradicional de la cuantificación de la angiogénesis. La cuantificación histológica de la MVD provee información sobre la distribución de los vasos sanguíneos únicamente en el plano del corte del tejido y no en el volumen total del tumor, además de que se evalúa en un único punto temporal. En contraste, las técnicas de imagen CE y molecular son capaces de proporcionar información sobre la heterogeneidad espacial y temporal de un tumor, ya que permiten obtener imágenes tridimensionales a lo largo del desarrollo tumoral. Adicionalmente, si se estandarizan y optimizan los protocolos de adquisición y análisis de datos, los parámetros cuantificados en las imágenes podrían usarse como BI (34).

1.2.2 Imagen cuantitativa de rayos X realizada por contraste

La imagen de rayos X realizada por contraste es una de las técnicas de imagen más prometedoras en el panorama de la imagen cuantitativa, ya sea en su modalidad plana o bidimensional (como en radiografía convencional o en mamografía) o tridimensional (como en CT). Esto es debido principalmente a la relación lineal que existe entre la concentración del medio de contraste y la atenuación de los rayos X medida en las imágenes (39). Específicamente, la imagen de tomografía realizada por contraste (CE CT) proporciona información morfológica y funcional, con una alta resolución espacial, es independiente del usuario, y es menos costosa y se encuentra más disponible en la clínica que MRI y PET (39).

La imagen de micro-tomografía computarizada realizada por contraste (CE micro-CT) es el equivalente a la imagen CE CT en el escenario preclínico. Un escáner micro-CT está basado en los mismos principios físicos que un escáner CT, pero está especialmente diseñado para otorgar imágenes con resolución espacial microscópica, aptas para estudios de imagen en animales pequeños como ratones y ratas. Del mismo modo que en los CT clínicos, la imagen micro-CT es una representación tridimensional de un objeto, es decir, es un conjunto formado por rebanadas o cortes, cada uno compuesto por vóxeles cuyo valor de intensidad es proporcional a la atenuación lineal de los tejidos en cada vóxel. Las unidades de atenuación en imágenes CT o micro-CT se llaman unidades Hounsfield (HU, por sus siglas en inglés).

En la Figura 1.4 se muestra un esquema de la formación de la imagen micro-CT. Los rayos X provenientes del tubo atraviesan al sujeto de estudio, colocado en una camilla bajo anestesia, y llegan al detector. El detector se encuentra diametralmente opuesto al tubo de rayos X y genera una imagen bidimensional del sujeto llamada proyección. Posteriormente, el tubo y el detector rotan un cierto ángulo, de manera concéntrica, y el proceso se repite

generando una segunda proyección. Se adquieren varias proyecciones en una rotación completa de 360° y, finalmente, el conjunto de proyecciones es procesado matemáticamente para obtener una imagen tridimensional del objeto, en un proceso que se denomina reconstrucción.

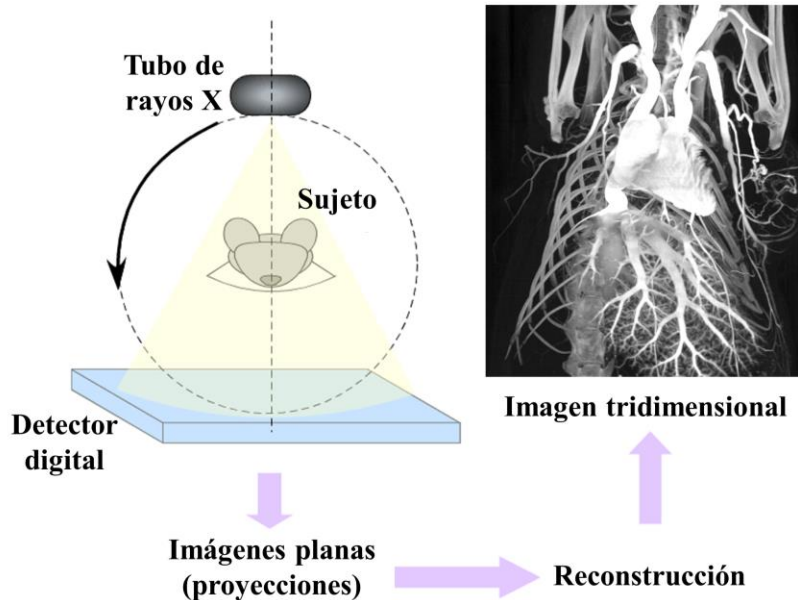


Figura 1.4 Esquema de la formación de una imagen micro-CT, modificado de Ayala y Brandan (40).

Los medios de contraste que se emplean comúnmente en la clínica están basados en yodo (40). Existen otros medios de contraste usados en estudios preclínicos, por ejemplo, los liposomas yodados, las nanoemulsiones, las nanopartículas de oro, dendrímeros yodados, entre otros. La característica principal de todos ellos es que requieren un material altamente atenuador de los rayos X, es decir, un material con alto número atómico (Z). Las características de la biodistribución y farmacocinética de los medios de contraste dependen de su tamaño de partícula (diámetro hidrodinámico *in vivo*), peso molecular y de la química de su superficie. Estas características también determinan el tipo de técnica de imagen a emplear.

Para la imagen dinámica generalmente se usan medios de contraste clínicos de un bajo peso molecular, lo cual permite que el medio de contraste se difunda de manera pasiva desde el espacio intravascular hacia el espacio extravascular-intersticial, como se muestra en la Figura 1.3 (b), para después ser eliminado rápidamente del organismo mediante la vía renal. Para estudios longitudinales (es decir, aquellos en los cuales se adquieren imágenes del mismo sujeto de estudio a lo largo del tiempo, i.e., de manera diaria, semanal, mensual, etc.) o de larga duración pueden usarse medios de contraste de alto peso molecular, también llamados de tipo *blood pool*, como se muestra en la Figura 1.3 (b), los cuales tienen un tiempo de residencia en el torrente sanguíneo mucho mayor que el de los medios de contraste clínico y se eliminan por medio del bazo y el hígado. Este tipo de medios de contraste se difunden de manera mucho más lenta hacia el espacio extravascular-intersticial y se ha observado que tienden a permanecer un mayor tiempo en este espacio en tejido tumoral comparado con su tiempo de residencia en los tejidos sanos, a lo cual se ha denominado efecto EPR: *enhanced permeability and retention effect*. Una desventaja de los

medios de contraste de tipo *blood pool* es que son mucho más caros que los medios de contraste clínicos y de manera comercial solamente se encuentran disponibles aquellos basados en nanopartículas de oro y nanoemulsiones yodadas. Los medios de contraste basados en liposomas o dendrímeros yodados no se encuentran disponibles comercialmente. Por lo tanto, una alternativa al uso de los medios de contraste de alto peso molecular que se ha explorado es la infusión continua de un medio de contraste clínico (40).

La combinación de parámetros radiológicos y clínicos del equipo de rayos X con los que se adquiere una imagen definen un protocolo de adquisición, por ejemplo: el kilovoltaje y corriente empleados en el tubo de rayos X, el uso de filtros adicionales para modificar la energía efectiva del haz generado, el número de proyecciones, la dosis de medio de contraste, si la imagen es estática o dinámica, por mencionar algunos. Los protocolos más usados en imagen CE CT o CE micro-CT son el estático de una energía (SE, por sus siglas en inglés), el estático de energía dual (DE, por sus siglas en inglés), y el dinámico de una energía (DCE, por sus siglas en inglés).

El protocolo de imagen estática SE consiste en adquirir imágenes usando un valor definido de kilovoltaje del tubo de rayos X, el cual define un espectro de energía de los rayos X emitidos por el tubo. La imagen se puede adquirir después de la inyección del medio de contraste, o durante su inyección continua o en bolo. Se pueden adquirir imágenes basales, es decir, previas a la inyección del medio de contraste, las cuales pueden usarse para cuantificar el realce como la diferencia de HU entre la imagen con contraste y la imagen basal (40). Este abordaje requiere alinear las imágenes y después realizar su resta o sustracción. La alineación de las imágenes, también llamada registro, consiste en un procedimiento matemático mediante el cual las imágenes se alinean, rotándolas o desplazándolas, para que las diferentes estructuras en la imagen queden en la misma posición. El realce obtenido mediante la resta de imágenes SE es una medida cuantitativa de imagen. Otras medidas cuantitativas que pueden obtenerse de las imágenes SE son el diámetro y volumen tumoral. Si se usa un medio de contraste con un largo tiempo de residencia en la sangre, como los de tipo *blood pool*, se pueden adquirir imágenes SE en estudios longitudinales. La cuantificación del realce en estas imágenes podría usarse para describir la cinética de la acumulación del medio de contraste en un tejido (40).

El protocolo de imagen DE consiste en adquirir imágenes usando dos kilovoltajes, los cuales definirán dos espectros de energía de los rayos X. Esta técnica se basa en las diferentes propiedades de atenuación que distinguen a los materiales y dependen tanto de la composición del material, como de la energía de los rayos X (41). Las energías alta y baja que se eligen para formar una imagen DE están, idealmente, alrededor del borde de atenuación-K del material usado como medio de contraste. El borde-K varía para cada material y define una energía a la cual se da un cambio abrupto en las propiedades de atenuación en ese material. Para ilustrar esto, en la Figura 1.5 se muestran las propiedades de atenuación (definidas por el coeficiente másico de atenuación) en función de la energía, para diferentes materiales: agua, hueso, calcio y yodo.

El borde-K del yodo está definido en la energía de 33.1 keV (42). Los rayos X con energías mayores tienen más probabilidad de ser atenuados (i.e., ser absorbidos y depositar su energía) en este material, mientras que aquellos con menor energía tienen menor probabilidad de ser atenuados. En la imagen formada, esto se traduce en un mayor o menor contraste del material, respectivamente. Mientras mayor sea la probabilidad de atenuación,

mayor contraste tendrá un material respecto del fondo que lo rodea, es decir, se verá más blanco en la imagen.

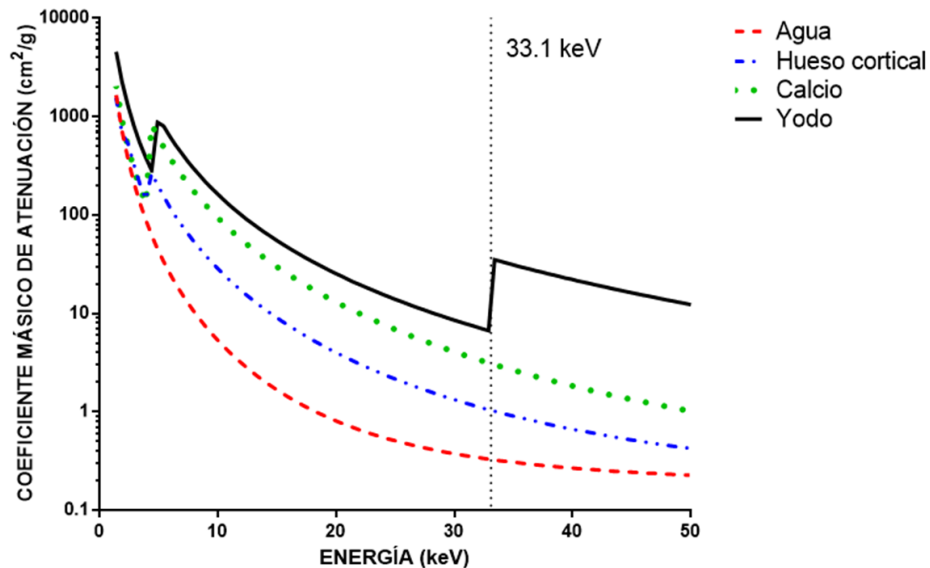


Figura 1.5 Coeficiente másico de atenuación de materiales relevantes en la formación de imágenes DE. Se observan cambios notables en la atenuación alrededor de las energías del borde-K (33.1 keV) para el yodo. Datos tomados de Hubbell y Seltzer (42).

Existen diferentes métodos matemáticos para obtener las imágenes DE: imagen monocromática virtual, imágenes promedio ponderadas, y mapas de descomposición de materiales base (43). Los mapas de descomposición de materiales base se obtienen al resolver ecuaciones basadas en la atenuación de los materiales presentes en las imágenes de alta y baja energía (HE y LE, por sus siglas en inglés, respectivamente). Las imágenes virtuales monocromáticas se crean a partir de mapas de distribución y concentración. Las imágenes ponderadas se producen mediante la combinación ponderada de los datos de las imágenes HE y LE, por ejemplo:

$$DE = HE - \alpha LE, \quad (1.1)$$

donde el factor de ponderación α se elige para reducir el contraste para un material en específico en la imagen DE (44), y eliminarlo o desaparecerlo de la imagen combinada.

El protocolo de imagen DCE tiene aplicaciones clínicas en angiografía y perfusión. La angiografía describe el realce del medio de contraste en los vasos grandes, mientras que la perfusión se refiere al tránsito de la sangre a nivel de los vasos capilares (45). En estos estudios, generalmente se inyecta el medio de contraste en bolo mientras se adquieren las imágenes a lo largo del tiempo. Otro enfoque consiste en adquirir las imágenes durante la administración continua del medio de contraste. En el primer caso, se tienen datos del primer paso o *first pass* del medio de contraste hacia los tejidos, mientras que en el segundo se mantiene un estado de iso-equilibrio o *steady-state*. Esta diferencia en la administración del medio de contraste es importante porque de ella depende el modelo matemático que se usará para describir el tránsito del medio de contraste por los diferentes tejidos, y que permitirá obtener parámetros vasculares cuantitativos relacionados con el flujo sanguíneo o la permeabilidad (40).

1.2.3 Calidad de imagen y dosis de radiación

La calidad de imagen y la dosis de radiación en la adquisición de las imágenes SE, DE y DCE son aspectos fundamentales a vigilar. Una imagen médica debe ser de alta calidad para cumplir con su propósito de servir al diagnóstico clínico. Para esto, la resolución espacial de la imagen debe ser lo suficientemente pequeña (en unidades de longitud) para permitir distinguir características o cambios finos que puedan indicar alguna patología. El ruido, definido como la varianza en la intensidad de la imagen, debe ser bajo para no afectar la visualización de las estructuras anatómicas. Adicionalmente, la imagen debe tener un alto contraste, el cual es fácilmente manipulable en imágenes digitales, pero está fuertemente ligado a la modalidad de imagen usada. Para cuantificar la calidad de imagen se emplean métricas como la razón contraste a ruido (CNR, por sus siglas en inglés), la cual relaciona el contraste en una imagen y lo compara con el ruido de modo que a mayor CNR, mayor y mejor calidad de imagen (46). La calidad de imagen en CT y micro-CT, en general, está fuertemente relacionada con las características del sistema de imagen, así como con la dosis de radiación.

La dosis absorbida de radiación es la energía impartida a los órganos o tejidos del cuerpo después de que interactúan con algún tipo de radiación ionizante (47), como los rayos X usados para obtener las imágenes CT y micro-CT. La cuantificación de la dosis absorbida debida a la adquisición de estas imágenes es importante para determinar el posible efecto biológico que podría presentar la materia viva como resultado de la irradiación. Los efectos biológicos inducidos por la radiación varían desde aquellos que causan incomodidades hasta aquellos que podrían representar daños severos. De manera general, el desarrollo de estos efectos depende del tipo de tejido y de la dosis de radiación que recibe. De este modo, la cuantificación de la dosis absorbida podría ayudar a evitar un daño a los pacientes o a los sujetos de estudio (en investigación preclínica) y limitar los efectos adversos sobre el desarrollo tumoral que pudieran introducir errores en la investigación (48).

La dosis absorbida se puede medir de manera directa o indirecta usando un dosímetro. Los dosímetros termoluminiscentes (TLD, por sus siglas en inglés) son ampliamente usados para determinar la dosis absorbida y se basan en el proceso físico de la termoluminiscencia. Este proceso se caracteriza por la emisión de luz (fluorescencia) que presentan ciertos materiales cuando son calentados, después de haber sido expuestos a radiación ionizante (47). La respuesta termoluminiscente (TL) se determina a partir del análisis de las curvas de brillo de los TLD, las cuales se obtienen siguiendo un protocolo dosimétrico estricto. La dosis absorbida se obtiene a partir de una curva de calibración que relaciona la respuesta TL con la dosis. Existen diferentes tipos de TLD dependiendo de su composición, por ejemplo, los TLD-100 son cristales de fluoruro de litio dopado con magnesio y titanio (LiF:Mg,Ti) y los TLD-300 son cristales de fluoruro de calcio dopado con tulio (CaF₂:Tm).

En general, un aumento en la intensidad de rayos X en el detector mejorará la calidad de la imagen, pero resultará en un aumento en la energía depositada en el sujeto de estudio (es decir, aumentará la dosis absorbida); además, podría afectar las propiedades y funcionamiento del detector de imagen. Por lo tanto, es indispensable optimizar los parámetros de adquisición de imágenes SE, DE y DCE para llegar a un balance entre la calidad de la imagen y la dosis. A esta optimización es necesario agregar la estandarización de los métodos de reconstrucción y análisis de las imágenes si lo que se busca es obtener

imágenes SE, DE y DCE cuantitativas que permitan estimar BI confiables y robustos (49,50).

1.3 Biomarcadores de imagen de rayos X realizada por contraste y su relación con la angiogénesis tumoral

Diversas técnicas de imagen de rayos X realizada por contraste, como la mamografía y CT, se han empleado en el estudio de la angiogénesis tumoral. Los BI que se obtienen de estas imágenes, y que están relacionados con el tránsito del medio de contraste desde el espacio intravascular hacia el espacio extravascular-intersticial, pueden ser de naturaleza cualitativa, semi-cuantitativa o cuantitativa (40).

Los BI cualitativos se basan en observaciones de los cambios en la intensidad de la imagen, ya sea en un punto temporal o en una curva de tiempo-intensidad, tiempo-realce o tiempo-concentración de yodo en estudios longitudinales o dinámicos. También pueden proporcionar información descriptiva de la estructura de los vasos, su distribución en un tumor, el comportamiento o tendencia de la curva, entre otros. En la Figura 1.6 (a) se muestra una clasificación de la tendencia de las curvas tiempo-realce, de manera similar a la interpretación de los patrones temporales en MRI (51). Este tipo de BI se puede obtener de imágenes SE, DE o DCE, y son útiles en estudios de pruebas de conceptos; sin embargo, su desventaja es que no proveen información sobre los procesos fisiológicos o patológicos involucrados en el tránsito del medio de contraste a través de la vasculatura tumoral.

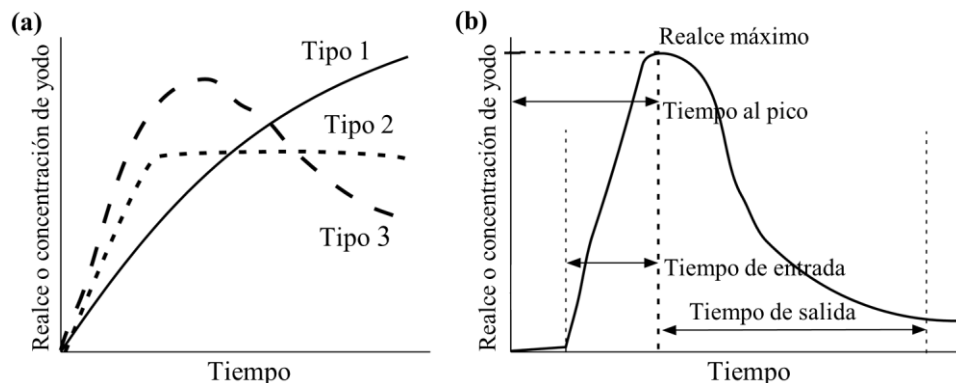


Figura 1.6 (a) Clasificación convencional de las curvas tiempo-realce: Tipo 1 se refiere a un realce continuo, Tipo 2 representa un realce temprano seguido por una meseta, y Tipo 3 muestra un patrón de lavado o *wash out*. (b) Diagrama de los parámetros semi-cuantitativos que pueden obtenerse de las curvas tiempo-realce. Figura modificada de Ayala y Brandan (40).

Los BI semi-cuantitativos se basan en el análisis gráfico de las curvas tiempo-realce, de modo que solamente pueden cuantificarse en imágenes DCE o en imágenes SE o DE adquiridas en estudios longitudinales (51). El realce se refiere al valor obtenido de la diferencia o resta entre la imagen con medio de contraste y la imagen basal (sin medio de contraste), y puede medirse en unidades de intensidad en imágenes de rayos X convencionales o mamografía, o en HU en las imágenes CT. A su vez, si se usa una función de calibración adecuada, el realce puede transformarse en unidades de concentración de yodo. Los parámetros semi-cuantitativos incluyen el área bajo la curva, realce máximo o pico, tiempo al máximo o pico, tiempo de entrada, tiempo de salida, entre otros, y se ilustran en la Figura 1.6 (b). Estos parámetros no son de uso muy común en imagen CE de

rayos X, pero pueden servir de entrada para el análisis cinético de los parámetros cuantitativos. La desventaja de estos BI es que dependen fuertemente de la manera de administrar el medio de contraste, su dosis, el gasto cardiaco del sujeto, entre otros (40).

Los BI cuantitativos pueden ser medidas puntuales obtenidas de imágenes SE o DE, o parámetros obtenidos del análisis cinético de las curvas tiempo-realce durante las diferentes fases del transporte del medio de contraste en imágenes DCE o imágenes SE y DE adquiridas en estudios longitudinales. Después de la inyección, el medio de contraste se distribuye rápidamente por el sistema cardiovascular. Inicialmente estará confinado al espacio intravascular y eventualmente llegará a los tejidos por medio del intercambio capilar, inundando el espacio extravascular-intersticial. Después de un tiempo de residencia, el medio de contraste será excretado por medio de los riñones, o por el hígado o bazo, dependiendo de sus características físicas y químicas (40). Los BI cuantitativos incluyen: el realce, el volumen de sangre relativo, y los parámetros que se obtienen del modelado cinético, como el flujo sanguíneo, el producto área-permeabilidad y las fracciones volumétricas, entre otros.

El realce es el parámetro cuantitativo más sencillo que se puede ser obtener de las imágenes de rayos X realzada por contraste (40), y se obtiene de la resta de la imagen basal (I_{basal}) a la imagen con contraste (I_{MC}), como se muestra a continuación:

$$\text{realce} = I_{\text{MC}} - I_{\text{basal}}. \quad (1.2)$$

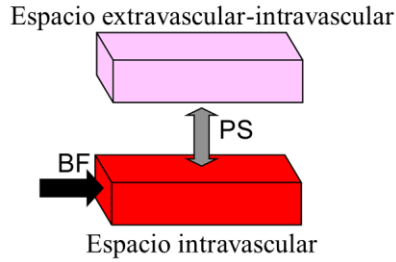
El volumen de sangre relativo (rBV) representa el porcentaje del volumen tumoral que corresponde a su vasculatura (40), y puede obtenerse a partir de imágenes de realce o de imágenes parametrizadas a unidades de concentración de yodo (C_i). Adicionalmente, el rBV toma en cuenta el realce o C_i de una entrada arterial de referencia (AIF), como la aorta, el ventrículo izquierdo o alguna arteria cercana al tumor:

$$\text{rBV} = 100 \frac{E_{\text{tumor}}}{E_{\text{AIF}}} \% = 100 \frac{C_{i,\text{tumor}}}{C_{i,\text{AIF}}} \%. \quad (1.3)$$

Existen varios modelos matemáticos que se han usado para cuantificar los parámetros cinéticos que describen el tránsito del medio de contraste en los tejidos. Cada modelo hace diferentes consideraciones sobre los compartimentos matemáticos que componen al sistema, así como de las condiciones de transporte entre ellos, lo cual define los diferentes parámetros cinéticos que cada modelo puede estimar. Los modelos más usados en el análisis cinético de imágenes DCE son el modelo de dos compartimentos y el modelo de Patlak (40), y se ilustran en la Figura 1.7. Ambos consideran dos compartimentos, el primero es el espacio intravascular (con concentración de C_i y volumen V_i), el cual está regido por el flujo sanguíneo (BF, en unidades de ml/min), y el segundo, el extravascular-intersticial (con concentración de C_e y volumen V_e).

En el modelo general de dos compartimentos, mostrado en la Figura 1.7 (a), se considera un transporte bidireccional gobernado por el producto área-permeabilidad (PS, en unidades de l/min) que está relacionado con el área del endotelio capilar y su permeabilidad (52). En el modelo de Patlak se asume un transporte unidireccional del medio de contraste, es decir, una transferencia irreversible en un estado de iso-equilibrio en donde no gobierna PS, sino K^{trans} , como se muestra en la Figura 1.7 (b) (53). K^{trans} es la constante de transferencia de volumen, y se define como la tasa a la cual el medio de contraste viaja del espacio intravascular al extravascular; está íntimamente relacionada con el flujo sanguíneo y la fracción de extracción, la cual se refiere a la fracción de partículas del medio de contraste que son extraídas hacia el tejido o tumor (51).

(a) Modelo de 2 compartimentos



(b) Modelo de Patlak

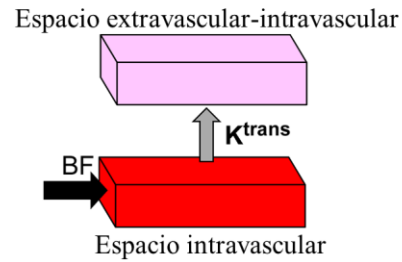


Figura 1.7 Esquema de los modelos matemáticos más usados en el análisis cinético del tránsito del medio de contraste desde el espacio intravascular hacia el espacio extravascular-intersticial. BF, flujo sanguíneo; PS, producto área-permeabilidad; K^{trans} , constante de transferencia de volumen. Figura modificada de Ayala y Brandan (40).

Para cuantificar los parámetros vasculares por medio del análisis cinético, el sistema se describe a partir de ecuaciones diferenciales gobernadas por las leyes de conservación de masa. En el modelo de Patlak, la concentración total de medio de contraste a un tiempo t en el tejido $C_t(t)$ se describe como la suma ponderada de las concentraciones en los dos compartimentos del sistema, es decir:

$$C_t(t) = f_e C_e(t) + f_i C_a(t), \quad (1.4)$$

donde $C_a(t)$ es la curva tiempo-realce o tiempo-concentración medida en una entrada arterial, i.e., la AIF; $C_e(t)$ es la curva tiempo-realce o tiempo-concentración correspondiente al espacio extravascular-intersticial; f_e y f_i son la fracción de volumen extravascular e intravascular, respectivamente, con $f_i = V_i/V_t$ y $f_e = V_e/V_t$, V_t es el volumen del tejido, V_i es el volumen en el espacio intravascular y V_e es el volumen en el espacio extravascular (51).

La ley de conservación de masas para este modelo, asumiendo un flujo unidireccional, es:

$$f_e \frac{dC_e(t)}{dt} = K^{\text{trans}} C_a(t). \quad (1.5)$$

Integrando la ecuación 1.5 a un tiempo T , tenemos:

$$f_e C_e(t) = K^{\text{trans}} \int_0^T C_a(t) dt, \quad (1.6)$$

sustituyendo la ecuación 1.6 en la ecuación 1.4 y dividiendo por $C_a(t)$, tenemos:

$$\frac{C_t(t)}{C_a(t)} = K^{\text{trans}} \frac{\int_0^T C_a(t) dt}{C_a(t)} + f_i. \quad (1.7)$$

Como se puede observar, la ecuación 1.7 tiene la forma de la ecuación de una recta, donde la pendiente es igual a K^{trans} y la ordenada al origen es igual a $f_i = rBV$. De este modo, un ajuste lineal a las variables $X = \int_0^T C_a(t) dt / C_a(t)$ e $Y = C_t(t) / C_a(t)$ permite la cuantificación de rBV y K^{trans} . Sin embargo, este ajuste sólo debe realizarse en la zona lineal de la gráfica de Patlak (X vs. Y), en la cual se cumple la condición de unidireccionalidad o irreversibilidad del flujo (53,54). Es importante tener en cuenta que esta condición solamente se cumple durante un cierto período de tiempo después de una inyección en bolo de un medio de contraste. En cambio, la fase lineal se mantiene durante la administración continua de un medio de contraste, i.e., mediante su infusión.

1.3.1 Antecedentes en pacientes

En la Tabla 1.2 se muestran algunos estudios realizados en pacientes que reflejan el grado de variabilidad entre los resultados encontrados al evaluar la asociación entre BI y biomarcadores histológicos (BH) de angiogénesis para varios tipos de cáncer y modalidades de imagen. En estudios de CEDM se han evaluado principalmente BI semi-cuantitativos y no se ha encontrado una correlación estadísticamente significativa entre BI y BH de angiogénesis evaluados (55,56). En estudios CT, ya sea SE, DE o DCE, se han evaluado en su mayoría BI cuantitativos, sin embargo, no se ha encontrado una asociación con BH de angiogénesis para todos los tipos de cáncer evaluados, además de que en cada estudio se han evaluado diferentes BI (57–61). En otras modalidades de imagen como MRI o PET, se han encontrado resultados contradictorios, incluso cuando se evalúa el mismo tipo de cáncer (61–64). Una de las posibles explicaciones a esta variabilidad es la diferencia en los protocolos de adquisición de las imágenes o en el análisis de los datos en cada estudio. En DCE CT y DCE MRI, por ejemplo, la concentración del medio de contraste y la dosis son factores fundamentales para la estandarización de los protocolos de imagen (65). De igual modo, se ha observado que la duración del estudio de imagen para el análisis DCE tiene un impacto sobre la exactitud de los parámetros cinéticos evaluados, al igual que el modelo cinético seleccionado para su análisis (66–68).

Tabla 1.2 Asociación entre biomarcadores de imagen (BI) y biomarcadores histológicos (BH) de la angiogénesis en pacientes con diferentes tipos de cáncer.

Tipo de cáncer	Técnica de imagen	BI	BH	Asociación significativa entre BI y BH	Ref.
Mama	CEDM	Realce, tipo de curva	MVD (CD34)	No	(55)
Mama	CEDM	Tipo de curva	MVD (CD34)	No	(56)
Pulmón	SE CT	Realce	VEGF-A	Sí	(57)
Pulmón	DE CT	C _I	MVD (CD105), necrosis	Sí	(58)
Colon	DCE CT	BF, BV, TTP	MVD (CD105)	No	(59)
GBM	DCE CT	BV, PS	MVD (CD34), VEGFR-2	Sí (BV-MVD)	(60)
GBM	DCE CT	PS	MVD (CD105)	Sí	(61)
GBM	DCE MRI	K ^{trans}	MVD (CD105)	Sí	(61)
GBM	DCE MRI	K ^{trans}	VEGF-A, MVD (CD34)	Sí (K ^{trans} - VEGF-A)	(62)
Mama	PET	SUV	MVD (CD105)	Sí	(63)
Mama	PET	SUV	MVD (CD105)	No	(64)

GBM, glioblastoma; CEDM, mamografía digital realizada por contraste; SE CT, tomografía computarizada de una energía; DE CT, tomografía computarizada de energía dual o espectral; DCE CT, tomografía computarizada dinámica o de perfusión, DCE MRI, imagen dinámica de resonancia magnética realizada por contraste; PET, tomografía por emisión de positrones; C_I, concentración de yodo; BF, flujo sanguíneo; BV, volumen de sangre; TTP, tiempo al pico; PS, producto área-permeabilidad; K^{trans}, constante de transferencia de volumen; SUV, valor estandarizado de captación; MVD, densidad de microvasos; VEGF-A, factor de crecimiento del endotelio vascular-A.

1.3.2 Antecedentes en modelos animales

En la Tabla 1.3 se muestran estudios de la asociación entre BI y BH de la angiogénesis realizados en modelos animales de varios tipos de cáncer, usando técnicas de imagen de rayos X realizada por contraste. En un estudio longitudinal de imágenes planas de rayos X, adquiridas con un mastógrafo, se encontró una asociación entre la velocidad del realce y el nivel de expresión de VEGFR-2 para un modelo animal de cáncer de mama (69). En imágenes 3D de rayos X se han evaluado BI cuantitativos usando equipos micro-CT diseñados específicamente para animales pequeños y técnicas SE y DE estáticas (70,71), y equipos CT clínicos para evaluar técnicas estáticas SE y DE (72–74) o dinámicas DCE (75–79). La ventaja que ofrecen los equipos CT clínicos versus los equipos micro-CT es su alta resolución temporal, además de que se encuentran más disponibles en los hospitales que los micro-CT. Sin embargo, la gran desventaja es que los CT clínicos proveen imágenes con resolución espacial del orden de 0.6 mm, comparados con la imagen micro-CT que provee imágenes con mejor resolución espacial (del orden de 0.1 mm) (80), como se muestra en la Figura 1.8. Esto podría tener un impacto en la exactitud de la cuantificación de los BI, principalmente en los estudios DCE en los que se obtiene la AIF a partir de volúmenes de interés (VOI) colocados en una arteria, debido tanto al tamaño del VOI como al efecto parcial de volumen (81).

Con respecto a la asociación entre los BI cuantitativos evaluados en la imagen dinámica DCE y los BH de angiogénesis, los resultados no son concluyentes. En algunos estudios se observó una correlación significativa entre ellos (76,78,79), mientras que en otros encontraron una dependencia entre esta asociación y parámetros relacionados con el cálculo de los BI, como la ubicación de los VOIs en las diferentes regiones tumorales, el uso de un VOI en tumor completo o su cuantificación solamente en regiones con alta captación de medio de contraste conocidas como *hot spots* (75,77). Con respecto a la asociación entre los BI cuantitativos evaluados en la imagen estática SE y DE y los BH de angiogénesis, se han encontrado correlaciones significativas. Destaca el mayor uso de equipos micro-CT en estos estudios, comparado con su uso para técnicas DCE, ya que para este tipo de protocolos no se requiere una alta resolución temporal (70,71). También destaca el uso de equipos modernos y especializados para la obtención de imágenes con la técnica DE (73,74), y el limitado uso de la técnica SE (69,72).

Los protocolos DCE han sido los más usados para el estudio de la angiogénesis tumoral, tanto en pacientes como en modelos animales, como se aprecia en la

Tabla 1.2 y Tabla 1.3. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, requieren de una optimización y estandarización, tanto de la adquisición de las imágenes como de los parámetros cinéticos usados para su análisis, de modo que los BI obtenidos sean reproducibles y de utilidad en la clínica (50,65,68). Los protocolos de imagen estática DE y SE son menos dependientes de la resolución temporal del equipo que los DCE, pero de igual modo requieren ser optimizados y estandarizados (50). Adicionalmente, la implementación de los protocolos DE y DCE requiere de equipos modernos, ya sea de CT clínicos o micro-CT, que sean capaces de adquirir las imágenes con suficiente resolución espacial y temporal. Otra diferencia importante entre los diferentes protocolos de imagen es la dosis de radiación impartida, ya que se ha visto que es más alta en estudios DCE (82,83).

Tabla 1.3 Asociación entre biomarcadores de imagen (BI) y biomarcadores histológicos (BH) de la angiogénesis en modelos animales de cáncer usando imagen de rayos X realizada por contraste.

Tipo de cáncer (línea celular o agente etiológico)	Técnica de imagen	BI	BH	Asociación significativa entre BI y BH	Ref.
Mama (MAT B III)	CEDM	K^{realce}	VEGFR-R	Sí	(69)
Ovario (MLS), Pulmón (A549)	DE micro-CT	rBV	MVD (CD31)	Sí	(70)
Pulmón (adenovirus)	DE micro-CT	rBV	MVD (CD31)	Sí	(71)
Cérvix (ME180)	SE CT	C_I	MVD (CD31)	Sí	(72)
GBM (C6)	DE CT	A, k, C_I	MVD (CD105)	Sí	(73)
GBM (C6)	DE CT	A, k, C_I	VEGF-A, HIF-1 α	Sí	(74)
Mama (FN13762)	DCE CT	BF, BV, MTT, PS	MVD (CD31)	No (en hot spots)	(75)
GBM (C6)	DCE CT	BF, BV, MTT, PS, TTP	MVD (CD105)	Sí (BF, BV)	(76)
GBM (C6)	DCE CT	BF, BV, MTT, PS	MVD (CD34)	Sí (BF, BV en centro; BF, BV, PS en periferia)	(77)
GBM (C6)	DCE CT	PS/BV	Vasos (α -SMA)	Sí	(78)
GBM (C6)	DCE CT	BF, BV, PS	Necrosis, hipoxia	Sí (BF, BV-hipoxia; BV-necrosis)	(79)

GBM, glioblastoma; CEDM, mamografía digital realizada por contraste; SE micro-CT, micro-tomografía computarizada de una energía; DE micro-CT, micro-CT de energía dual o espectral; DE CT, tomografía computarizada de energía dual o espectral; DCE micro-CT, micro-CT dinámico; DCE CT, CT dinámico; K^{realce} , constante de la tasa de realce; rBV, volumen de sangre relativo; A, atenuación; k, pendiente de la curva espectral; C_I , concentración de yodo; BF, flujo sanguíneo; BV, volumen de sangre; MTT, tiempo de tránsito promedio; PS, producto área-permeabilidad; TTP, tiempo al pico; VEGF-A, factor de crecimiento vascular endotelial-A; VEGFR-2, receptor 2 del VEGF-A; MVD, densidad de microvasos; HIF-1 α , factor inducible de hipoxia-1 α .

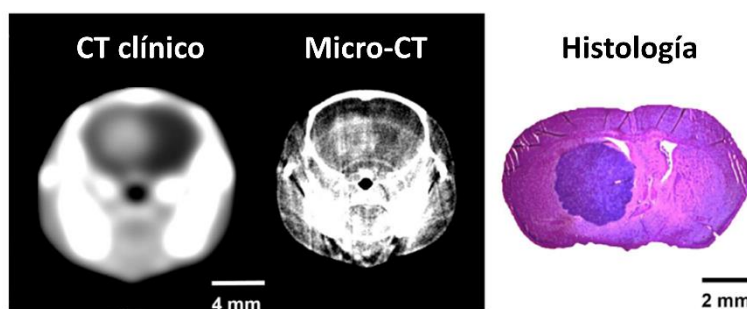


Figura 1.8 Comparación de la imagen CT, micro-CT e histología de un cerebro de rata con un glioma desarrollado a partir de la inoculación de células U87MG, modificado de Kirschner *et al.* (80). Se aprecia la diferencia en la resolución espacial de las imágenes CT y micro-CT.

En resumen, se ha observado una gran variabilidad en la asociación entre BI y BH de angiogénesis tanto en estudios con pacientes como con modelos animales. La causa de esta variabilidad podría estar relacionada con la falta de estandarización de la adquisición de las imágenes entre los diferentes protocolos y la cuantificación de BI en los diferentes estudios. Esta variabilidad compromete la reproducibilidad de los BI de imagen de rayos X realizada por contraste y su aplicación en la clínica. Por otro lado, algunos estudios han comparado los diferentes BI obtenidos con protocolos SE, DE y DCE en pacientes (82,84,85) y en un modelo animal de glioma (83), y encontraron asociaciones entre los BI evaluados con los diferentes protocolos pero no se evaluaron los límites de exactitud (sesgo) y precisión de los BI. Adicionalmente, en esos estudios no se evaluó la asociación entre BI y BH de angiogénesis. Esta comparación es necesaria debido a las ventajas y desventajas técnicas y clínicas en la adquisición de cada protocolo de imagen, así como en la cuantificación de los diferentes BI.

Un modelo animal apropiado para un estudio que contemple tales evaluaciones es el modelo animal de glioma con células C6, ya que se ha descrito el desarrollo de su microvasculatura mediante MRI e histología (86,87), además de que se ha empleado en estudios de la angiogénesis tumoral (73,74,76–79). Adicionalmente, el modelo animal de glioma con células C6 es el modelo de xenoinjerto más semejante al glioblastoma (GBM) humano a nivel de expresión genética e histología (88–91). Con respecto al uso de modelos de glioma con células C6 ortotópicos versus subcutáneos, se ha demostrado que ambos presentan características histológicas, morfología de microvasos y permeabilidad similares (92–94). En este trabajo se usó el modelo subcutáneo debido a que permite una mayor facilidad que el modelo ortotópico para la inoculación de las células tumorales, la evaluación del volumen tumoral y la resección del tumor para el análisis histológico.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La identificación y cuantificación de la angiogénesis en pacientes proporciona información pronóstica y predictiva útil en el manejo clínico del cáncer. La imagen cuantitativa de rayos X realizada por contraste se ha propuesto como una manera de superar las limitaciones inherentes a la cuantificación histológica de la angiogénesis, por medio del uso de biomarcadores de imagen (BI).

La asociación entre los BI de rayos X realizada por contraste y los biomarcadores histológicos (BH) de la angiogénesis es altamente variable, probablemente debido a la falta de estandarización entre los diferentes protocolos de imagen. Para dilucidar el potencial uso de estos BI como descriptores de la angiogénesis tumoral, se requieren estudios sistemáticos que involucren tanto la optimización y estandarización de su cuantificación, así como la evaluación de su asociación con los BH de angiogénesis.

2.1 Hipótesis

Los biomarcadores de imagen cuantitativa de rayos X realizada por contraste obtenidos con protocolos estandarizados y optimizados están asociados con los biomarcadores histológicos de angiogénesis en el modelo subcutáneo de glioma con células C6.

2.2 Objetivo general

Obtener biomarcadores de imagen cuantitativa de rayos X realizada por contraste mediante protocolos optimizados y estandarizados y evaluar su correlación con los biomarcadores histológicos de angiogénesis en el modelo subcutáneo de glioma con células C6.

2.3 Objetivos específicos

- i. Optimizar tres protocolos de adquisición de imágenes de rayos X realizada por contraste: protocolo estático de una energía (SE), protocolo estático de energía dual (DE), y protocolo dinámico de una energía (DCE).
- ii. Estandarizar la cuantificación de biomarcadores de imagen SE, DE y DCE.
- iii. Cuantificar los biomarcadores de imagen SE, DE, y DCE del modelo subcutáneo de glioma con células C6.
- iv. Cuantificar los biomarcadores histológicos de angiogénesis del modelo subcutáneo de glioma con células C6.
- v. Evaluar la correlación entre los biomarcadores histológicos de angiogénesis y los biomarcadores de imagen del modelo subcutáneo de glioma con células C6.

3 OPTIMIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE ADQUISICIÓN DE IMÁGENES

3.1 Introducción

En este capítulo se presenta el desarrollo del primer objetivo específico de este trabajo, el cual consistió en optimizar tres protocolos de adquisición de imagen de rayos X realizada por el uso de medio de contraste: protocolo estático de una energía (SE), protocolo estático de energía dual (DE), y protocolo dinámico de una energía (DCE). La optimización consistió en definir los parámetros radiológicos de adquisición que permitieron obtener imágenes con alta calidad diagnóstica y con la menor dosis impartida a los sujetos de estudio. La Figura 3.1 muestra un esquema del contenido de este capítulo. Se evaluó el desempeño del equipo de imagen micro-CT en términos de las características del número CT del agua (exactitud, uniformidad y ruido), y de la relación de linealidad entre el número CT y la concentración de yodo (C_1). Una vez que se verificó el buen funcionamiento del equipo, se evaluó la calidad de imagen para varias combinaciones de los parámetros radiológicos disponibles en el equipo: kilovoltaje, filtro adicional y corriente. Se midió la razón contraste a ruido (CNR, por sus siglas en inglés) en imágenes SE, DE y DCE de maniquís yodados, la cual es una métrica clásica de la calidad de imagen y se obtiene del cociente entre el contraste de un objeto (respecto del fondo de la imagen) y el ruido. Para cada protocolo SE, DE y DCE se eligieron las combinaciones que mostraron los tres valores más altos de CNR y se estimó la dosis de radiación impartida por cada combinación, usando dosimetría termoluminiscente. Finalmente, se eligieron las combinaciones óptimas para cada protocolo usando un factor de mérito que permitió identificar las combinaciones con la mayor calidad de imagen y menor dosis.

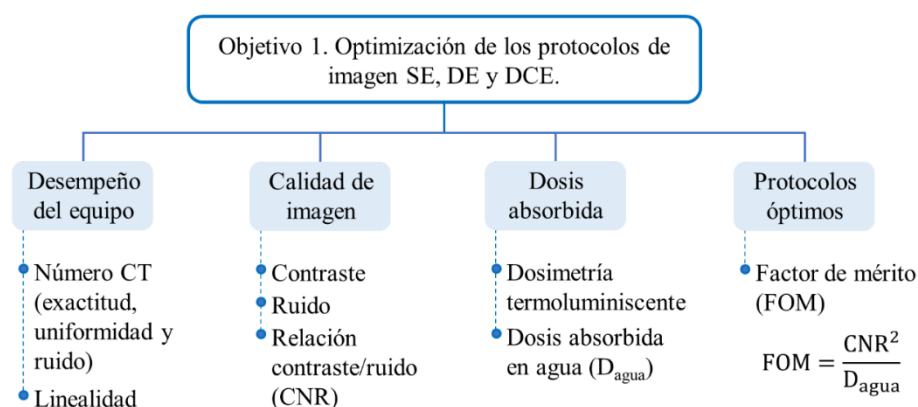


Figura 3.1 Esquema del contenido de este capítulo.

3.2 Métodos

3.2.1 Equipo de imagen

Se usó el módulo de imagen micro-CT del equipo trimodal PET/SPECT/CT Albira ARS (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) para animales pequeños, del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), México. El tubo de rayos X del equipo es un Apogee 500 (Oxford Instruments) de tipo haz de cono (*cone beam*), con un ánodo de tungsteno y un filtro adicional de aluminio (Al) de 0.5 mm de espesor. El detector es de panel plano, Hamamatsu C7942CA-22, con 2400×2400 píxeles de 50 μm de lado. En la Tabla 3.1 se muestran las características generales de este equipo para la adquisición de proyecciones (imágenes bidimensionales) o imágenes tomográficas (tridimensionales).

Tabla 3.1 Características generales del equipo de imagen micro-CT Albira ARS.

Parámetro	Valores disponibles
Kilovoltaje (kV)	30, 35, 40, 45
Corriente (mA)	0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8
Número de proyecciones	120, 180, 250, 400, 600, 1000
Algoritmo de reconstrucción	Retroproyección filtrada (FBP)
Opciones para la reconstrucción (tamaño de matriz y de vóxel cúbico)	High: 560×560×516, 0.125 mm Medium: 280×280×256, 0.250 mm Low: 140×140×128, 0.500 mm
Algoritmo alternativo de reconstrucción	SIRT 2D: 750×750×657, 0.100 mm SIRT 3D: 780×780×650, 0.100 mm

La combinación de los diferentes valores de kilovoltaje y corriente, así como el tiempo de exposición y el uso de filtros adicionales, define los espectros generados por el equipo, específicamente el número y energía (en kiloelectronvolts, keV) de los rayos X generados. Se puede caracterizar un espectro de rayos X por medio de la energía efectiva (E_{ef}) o la capa hemirreductura en mm de Al (HVL, por sus siglas en inglés), las cuales definen la calidad de haz (46). En la Tabla 3.2 se muestran las diferentes calidades de haz disponibles en el micro-CT Albira que se evaluaron en este trabajo; se indican la E_{ef} y la HVL que se estimaron a partir de la simulación de los espectros para un tubo de rayos X similar (95), atenuados por los diferentes materiales en el camino del haz (aire, aluminio, y en algunos casos, un filtro de molibdeno o cobre) (42). En la Tabla 3.2 no se incluyeron los valores disponibles de la corriente, ya que ésta tiene efecto únicamente sobre la fluencia (número de fotones por unidad de área) y no sobre la calidad del haz. La dosis impartida depende linealmente del producto corriente-tiempo de irradiación (mAs). En la Figura 3.2 se muestran los espectros de la Tabla 3.2; se graficó la fluencia normalizada por el producto mAs en función de la energía de los rayos X. De este modo, tomando en cuenta las ocho calidades de haz y las 6 corrientes disponibles, se tienen 48 combinaciones de parámetros radiológicos que podrían usarse para obtener imágenes SE, DE y DCE, cada una con características de calidad y dosis definidas.

El número de proyecciones con que se adquieren las imágenes se puede modificar para cada combinación de parámetros radiológicos, como se indica en la Tabla 3.1, y también tendrá un impacto sobre la calidad de imagen y la dosis. El algoritmo de reconstrucción que usa el equipo Albira es el más común para reconstrucción de imágenes micro-CT y tiene

tres opciones de resolución (tamaño de matriz y de vóxel), como se muestra en la Tabla 3.1. El algoritmo de reconstrucción tiene impacto sobre la calidad de imagen, pero no sobre la dosis ya que se trata de un método de post-procesamiento después de que se adquirieron las imágenes.

Tabla 3.2 Características generales de los haces de rayos X generados por el equipo de imagen micro-CT Albira ARS.

Calidad de haz	kV	Filtro adicional	E_{ef} (keV)	HVL (mm Al)
Q ₁	30	-	16.3	0.415
Q ₂	30	0.025 mm Mo	16.8	0.453
Q ₃	35	-	17.2	0.485
Q ₄	40	-	18.1	0.555
Q ₅	45	-	18.7	0.618
Q ₆	45	0.025 mm Mo	19.4	0.684
Q ₇	30	0.025 mm Cu	19.6	0.708
Q ₈	45	0.025 mm Cu	23.2	1.132

Mo, molibdeno; Cu, cobre; kV, kilovoltaje; E_{ef} , energía efectiva; HVL, capa hemirreductora; Al, aluminio.

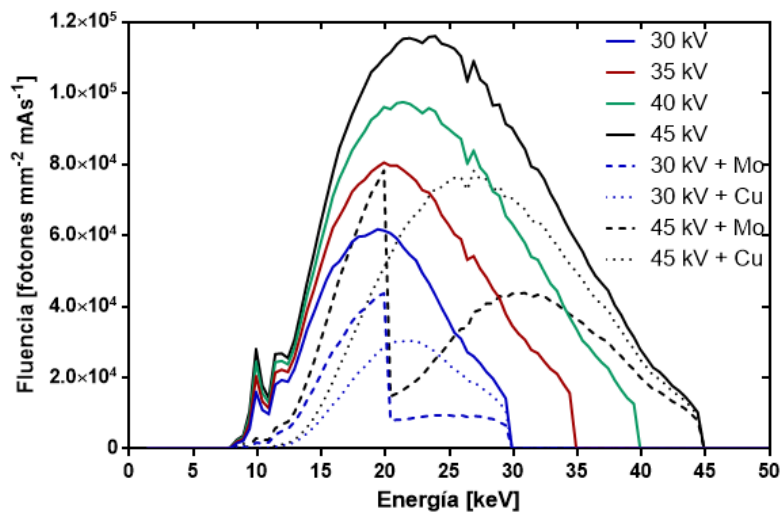


Figura 3.2 Simulación de los espectros de rayos X disponibles en el equipo micro-CT Albira ARS. Las etiquetas señalan el kilovoltaje y el filtro adicional.

Como parte de este trabajo, se desarrollaron tres métodos alternativos de reconstrucción de las imágenes usando el algoritmo iterativo simultáneo SIRT (2D y 3D, como se indica en la Tabla 3.1) y el algoritmo de Feldkamp (FDK), implementados en Matlab R2018b (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) con el *toolbox* ASTRA. Se evaluó y comparó el efecto de estos algoritmos sobre la calidad de imagen, incluyendo en la comparación al algoritmo de retroproyección filtrada (FBP) del equipo, basado en el algoritmo FDK. El algoritmo con mejor desempeño fue SIRT 2D; los resultados de esta evaluación se reportaron en la tesis de Maestría en Ciencias (Física Médica) de Jorge Patricio Castillo López (96,97). El algoritmo SIRT 2D se usó en la reconstrucción de las imágenes micro-CT en este trabajo, y en algunos casos se incluyeron imágenes reconstruidas con el algoritmo FBP (modalidad *high*, definida en la Tabla 3.1) a modo de comparación.

Después de reconstruir las imágenes micro-CT, se calibraron en unidades Hounsfield (HU), las cuales están relacionadas con la atenuación de los rayos X en los diferentes materiales. Se usó la siguiente expresión para la calibración en HU (46):

$$HU = 1000 \left(\frac{I - I_{\text{agua}}}{I_{\text{agua}}} \right), \quad (3.1)$$

donde I_{agua} representa el valor promedio de la intensidad (número CT) medida en un maniquí de agua, e I es la imagen a calibrar en HU. Existe cierta dependencia entre el valor de las HU y la E_{ef} del espectro de rayos X con la cual se adquieren las imágenes, ya que la energía determina la atenuación de los rayos X en los diferentes materiales, al igual que la composición del material (46). Esto se discute con más detalle en la sección 3.2.6, ya que esta dependencia tiene un efecto sobre la linealidad de las HU (98).

3.2.2 Maniquís

Para la evaluación de la calidad de imagen y desempeño del equipo micro-CT se usaron un maniquí de agua, resinas yodadas, y un maniquí yodado hecho en el laboratorio, como se muestra en la Figura 3.3. El maniquí de agua es comúnmente usado para el control de calidad en el equipo micro-CT, consiste en un cilindro de acrílico con capacidad para almacenar 11 ml de agua. Las resinas yodadas son maniquís validados en términos de la concentración de yodo, y son en prismas rectangulares hechos de resinas epóxicas con diferentes concentraciones de yodo: 0, 0.5, 1.0 y 3.0 mg I/ml (99). El maniquí de yodo construido en el laboratorio consistió en viales con diferentes concentraciones de yodo (0, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 y 7.0 mg I/ml), para las cuales se mezclaron un medio de contraste clínico (Omnipaque 300, GE Healthcare, Wauwatosa, WI, 470 USA) y agua destilada. Los viales se cerraron y sellaron para evitar la evaporación del agua, y se sujetó su parte superior a una esponja para mantenerlos fijos y flotando en un contenedor lleno de agua destilada.

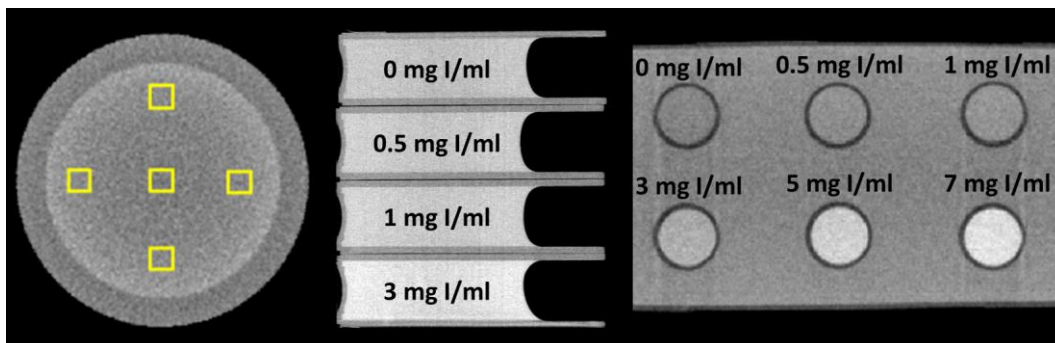


Figura 3.3 Imágenes micro-CT de los maniquís usados para evaluar el desempeño del equipo micro-CT y la calidad de imagen. Izquierda: vista transversal del maniquí de agua mostrando los volúmenes de interés (cuadrados amarillos) en el centro y la periferia del maniquí. Centro: vista coronal de las resinas yodadas. Derecha: vista coronal del maniquí yodado. Se observan cortes circulares de los viales con diferentes concentraciones de yodo, rodeados de agua.

3.2.3 Protocolos de imagen de rayos X realizada por contraste

El protocolo estático de una energía SE consiste en adquirir dos imágenes micro-CT (tridimensionales): una basal (sin medio de contraste) y una con medio de contraste, ambas

con los mismos parámetros radiológicos y de reconstrucción. Posteriormente, las imágenes se registran (100) y se restan de acuerdo con la ecuación 1.2.

El protocolo estático de energía dual DE consiste en adquirir dos imágenes micro-CT (tridimensionales) de los objetos con medio de contraste usando dos calidades de haz: una con alta energía (HE) y otra con baja energía (LE). Las imágenes se registran y se restan de acuerdo con la ecuación 1.1. El valor del factor de ponderación α se determina de acuerdo con el tejido o material que se quiera eliminar de las imágenes (44).

El protocolo dinámico de una energía DCE consiste en adquirir dos series de imágenes planas a lo largo del tiempo: la primera serie de imágenes se adquiere sin medio de contraste (basales) y la segunda, con medio de contraste. Posteriormente, las imágenes se registran y se restan una a una de acuerdo con la ecuación 1.2. Dado que en esta etapa se realizaron experimentos con maniquís, solamente se tomó una imagen en vez de una serie.

3.2.4 Reducción de artefactos: estabilidad del detector y auto-calibración

La adquisición de una imagen micro-CT con el equipo Albira puede durar desde 2 hasta 20 minutos, dependiendo del número de proyecciones que se adquieran. Durante este tiempo de adquisición, o a lo largo del día, podrían ocurrir variaciones en la sensibilidad de los detectores de imagen entre las diferentes proyecciones, dando lugar a artefactos de tipo anillo en las imágenes tomográficas reconstruidas (101). Adicionalmente, si estas variaciones ocurren entre imágenes adquiridas en estudios longitudinales tendrían un efecto negativo en la exactitud de los BI. Una estrategia para minimizar estas variaciones es permitir que el detector de imagen llegue a una temperatura estable (101). Para determinar la variación de la intensidad del valor de píxel en las proyecciones con la temperatura del detector y el tiempo de adquisición se adquirieron imágenes planas consecutivas de una placa de acrílico usando la calidad Q_5 de la Tabla 3.2 y 0.8 mA, y se varió el tiempo de encendido del equipo en aire acondicionado (18 °C) previo al inicio de adquisición de las imágenes. Se determinó que el sistema alcanza la estabilidad después de un período de 3 h en aire acondicionado (18 °C). Este resultado se reportó en la tesis de Maestría en Ciencias (Física Médica) de Francisco Berumen Murillo (102,103).

El endurecimiento del haz (es decir, el aumento de la energía efectiva del haz de rayos X) y la radiación dispersa también pueden tener un impacto negativo en la exactitud de los BI y ocasionar artefactos en la imagen (101,104). Para reducir esto, el equipo Albira incluye un filtro de aluminio de 0.5 mm para eliminar los fotones de baja energía e incorpora una auto-calibración automática para corregir por el endurecimiento del haz (105). El sistema realiza la auto-calibración cuando se adquiere la primera imagen para cada protocolo. Se adquieren una imagen plana (sin objeto entre el tubo de rayos X y el detector de imagen) y una imagen de ruido electrónico (imagen con el tubo de rayos X apagado), y se corrige cada proyección de acuerdo con una expresión determinada por los fabricantes del equipo. Una vez adquiridas estas imágenes, se usan para calibrar imágenes adquiridas posteriormente con el mismo protocolo de imagen. Sin embargo, para evitar artefactos por cambios en la sensibilidad del detector, como se mencionó arriba, es recomendable borrar los archivos de calibración antes de adquirir cualquier imagen. Para evaluar el buen desempeño de la auto-calibración en las proyecciones, se adquirieron imágenes de placas de acrílico de diferente grosor y se cuantificó la variación espacial de la intensidad de píxel, usando la calidad Q_5 y 0.8 mA. Se encontraron no-uniformidades en las imágenes de las placas de acrílico, presumiblemente uniformes, y se corrigió esta no-

uniformidad agregando una placa de acrílico de 0.5 cm de grosor durante la calibración. Esto permitió mejorar la uniformidad de las proyecciones sin incrementar el ruido de manera significativa, lo cual es de suma importancia para el protocolo DCE que emplea proyecciones. Estos resultados se reportaron en la tesis de Maestría de Francisco Berumen (102,103).

3.2.5 Desempeño del equipo de imagen

Se evaluaron la exactitud, uniformidad y ruido del número CT del agua para tener una referencia del desempeño del equipo micro-CT. Se adquirieron imágenes del maniquí de agua y se midió el número CT y su desviación estándar en volúmenes de interés (VOI) cúbicos de 3 mm de lado que se colocaron en el centro o periferia del maniquí (4 posiciones de la periferia).

En cuanto a su exactitud, el número CT del agua en el VOI central debe ser cercano a 0 (su valor por definición, de acuerdo con la ecuación 3.1) (106). Para que el número CT del agua se considere uniforme, el promedio de la diferencia entre los valores centrales y periféricos debe ser menor que la desviación estándar del VOI central (107). El ruido del número CT del agua se define como el promedio de la desviación estándar de todos los VOI (107). Se compararon la exactitud, uniformidad y ruido del número CT del agua en imágenes reconstruidas con los algoritmos FBP y SIRT 2D. La adquisición de las imágenes se realizó con la calidad de haz Q₅, 0.8 mA de corriente y 400 proyecciones.

3.2.6 Linealidad del número CT

Una de las ventajas de la imagen de rayos X realizada por contraste respecto de otras modalidades de imagen es que la intensidad de la señal en la imagen está directamente relacionada con las propiedades de atenuación de los rayos X de los tejidos (38). De este modo, la imagen de rayos X realizada por contraste provee una interpretación más directa de los BI en términos de su significado fisiológico. Sin embargo, también es conocido que esta linealidad entre las propiedades de atenuación de los tejidos y la intensidad de la señal en HU depende de la calidad de haz evaluada (98). Para calidades de haz blando (bajas E_{ef} y HVL), la linealidad se mantiene en el rango de tejido suave (-1000 HU a 1000 HU) pero se pierde para tejidos más atenuadores debido al efecto de endurecimiento del haz en estos tejidos (98).

Para verificar la linealidad entre la intensidad de la señal de HU y la concentración de yodo (C_I) para las calidades de haz evaluadas en este estudio, se adquirieron imágenes de las resinas yodadas usando las calidades de haz descritas en la Tabla 3.2, con 0.8 mA y 400 proyecciones. Se evaluó el valor promedio y desviación estándar de las HU en un VOI cúbico de 3 mm de lado, colocado en el centro de las resinas. Se graficó el valor promedio de HU en función de la C_I para cada calidad de haz y se evaluó la relación entre estos parámetros por medio de una regresión lineal. Esta evaluación se realizó para imágenes reconstruidas con FBP y SIRT 2D.

3.2.7 Calidad de imagen

Se obtuvieron imágenes SE, DE, y DCE del maniquí yodado hecho en el laboratorio siguiendo los protocolos descritos en la sección 3.2.3; para el protocolo DE se usó un factor de ponderación α que permitió eliminar el agua alrededor de los viales. La calidad de

imagen se evaluó con la razón contraste a ruido (CNR) en las imágenes restadas de acuerdo con la siguiente expresión (46):

$$CNR = \frac{\text{contraste}}{\text{ruido}} = \frac{HU_{\text{objeto}} - HU_{\text{agua}}}{\sigma_{\text{agua}}}, \quad (3.2)$$

donde HU_{objeto} representa el valor de HU promedio medido en el centro de los viales del maniquí yodado, HU_{agua} representa el valor promedio medido en el centro del maniquí y que corresponde a agua, y σ_{agua} es la desviación estándar de las mediciones de HU_{agua} . Se graficó CNR en función de C_I para cada combinación evaluada y se seleccionaron las 3 combinaciones con mayor CNR correspondientes a cada protocolo, para finalmente evaluar la dosis impartida por cada uno y posteriormente seleccionar el protocolo óptimo.

En la Tabla 3.3 se muestran las combinaciones evaluadas para cada protocolo de imagen. Estas combinaciones se seleccionaron a partir de estimaciones realizadas de la diferencia entre los coeficientes de atenuación del agua y el yodo, usando los espectros de la Figura 3.1 y los datos de la Figura 1.5 para las calidades de haz definidas en la Tabla 3.2. Los resultados de estas estimaciones se reportaron en la tesis de Maestría de Francisco Berumen (102). Las estimaciones permitieron reducir el número de combinaciones a evaluar, seleccionando aquellas con la mayor fluencia y mayor diferencia en atenuación.

Tabla 3.3 Combinaciones de las calidades de haz (Q) a emplear para evaluar la calidad de imagen en los protocolos SE, DE y DCE.

Protocolos SE y DCE SE = $I_{MC} - I_{\text{basal}}$, DCE = $I_{MC} - I_{\text{basal}}$	Protocolo DE DE = HE - αLE
Q ₁ (30 kV)	HE: Q ₈ (45 kV + 0.025 mm Cu), LE: Q ₁ (30 kV)
Q ₃ (35 kV)	HE: Q ₆ (45 kV + 0.025 mm Mo), LE: Q ₁ (30 kV)
Q ₄ (40 kV)	HE: Q ₇ (30 kV + 0.025 mm Cu), LE: Q ₅ (45 kV)
Q ₅ (45 kV)	HE: Q ₅ (45 kV), LE: Q ₂ (30 kV + 0.025 mm Mo)
Q ₆ (45 kV + 0.025 mm Mo)	HE: Q ₅ (45 kV), LE: Q ₁ (30 kV)

I_{MC} , imagen con medio de contraste; I_{basal} , imagen sin medio de contraste; HE, imagen de alta energía; LE; imagen de baja energía.

3.2.8 Dosimetría

Se estimó la dosis de radiación asociada a los protocolos de imagen con las mayores CNR mediante dosimetría termoluminiscente (TL). Se emplearon dos tipos de dosímetros TL (TLD-100 y TLD-300), los cuales se irradiaron en el equipo micro-CT del INCan y luego se obtuvo la señal TL que, finalmente, fue convertida a dosis absorbida en agua (D_{agua}).

Para la obtención de la señal TL se usaron métodos previamente establecidos en el Laboratorio de dosimetría del Instituto de Física, UNAM, y que se resumen en la Tabla 3.4 y se describen brevemente a continuación (102,108,109). Los dosímetros se sometieron a un tratamiento térmico antes de su irradiación en el micro-CT para borrar las respuestas TL anteriores y eliminar ruido térmico y dosis ambiental. Se irradiaron en dos condiciones: en aire (los dosímetros se colocaron sobre una cinta adhesiva y estuvieron rodeados de aire) y al interior de un maniquí de acrílico (los dosímetros se colocaron entre dos placas de acrílico de 1 cm de espesor). Se irradiaron 3 dosímetros por exposición, se usaron las calidades de haz y mAs descritas en la Tabla 3.4. Posteriormente, los dosímetros se leyeron uno por uno para obtener las curvas de brillo (respuesta TL en función de la temperatura) e

identificar sus diferentes picos. La señal TL para el TLD-100 se definió como STL_{100} , dada por:

$$STL_{100}^{\text{aire o maniquí}} = \text{IntP4} + \text{IntP5}, \quad (3.3)$$

donde IntP4 e IntP5 se refieren a la integral de los picos 4 y 5 de la curva de brillo del TLD-100. Para el TLD-300 se determinó la razón de la señal TL de los picos de alta y baja temperatura (HLTR, por sus siglas en inglés), definida como:

$$HLTR = \frac{\text{IntP5} + \text{IntP6} + \text{IntP7}}{\text{IntP3a} + \text{IntP3}}, \quad (3.4)$$

donde IntP5, IntP6, IntP7, IntP3a e IntP3 son las integrales de los picos 5, 6, 7, 3a y 3, respectivamente, de la curva de brillo del TLD-300.

Tabla 3.4 Protocolos dosimétricos establecidos en el Laboratorio de dosimetría del Instituto de Física, UNAM, para la medición de la señal termoluminiscente (TL) obtenida con los dosímetros TLD-100 y TLD-300 (102,108,109).

Método	TLD-100	TLD-300
Tratamiento térmico	Horneado a alta temperatura (400 °C) durante 1 h, enfriado rápido (20 min) a temperatura ambiente (18°C), horneado de baja temperatura (100°C) durante 2 h, enfriado rápido (20 min) a temperatura ambiente (18°C).	Horneado a alta temperatura (400 °C) durante 1 h, enfriado rápido (20 min) a temperatura ambiente (18°C).
Condiciones de irradiación	Los dosímetros se irradiaron 24 h después del tratamiento térmico, en aire o al interior del maniquí de acrílico. Calidades y mAs evaluadas: Q ₁ , Q ₃ , Q ₄ , Q ₅ , Q ₆ , Q ₇ , y 0.4, 0.6 y 0.8 mAs.	
Lectura de los dosímetros	Los dosímetros se leyeron 24-48 h después de la irradiación con un lector Harshaw 3500, con tasa de calentamiento de 8°C/s, una temperatura máxima de 400 °C, y resolución de 200 canales.	
Análisis de la curva de brillo	Deconvolución en 6 picos con el programa CGCD (Harshaw).	Deconvolución en 7 picos con el programa GlowFit.
Señal TL a cuantificar	$STL_{100}^{\text{aire o maniquí}}$ (ecuación 3.3)	HLTR (ecuación 3.4)

STL, señal TL del dosímetro TLD-100; HLTR, razón de la señal TL de los picos de alta y baja temperatura del dosímetro TLD-300.

Usando la dosimetría TL, se determinó D_{agua} al interior de un maniquí de acrílico de 2 cm de grosor, el cual se usó para simular la atenuación que se tendría al interior de un sujeto de estudio (rata). El primer paso consistió en determinar el factor de calibración (F_Q) entre la señal TL y el kerma en aire (K_{aire}) usando los dosímetros TLD-100. K_{aire} es una cantidad dosimétrica relacionada con D_{agua} y es proporcional al mAs (47). Se irradiaron los dosímetros TLD-100 en aire usando el protocolo dosimétrico descrito en la Tabla 3.4 y se obtuvo STL_{100} . Se midió K_{aire} para cada irradiación con una cámara de ionización, se graficó STL_{100} en función de K_{aire} para cada calidad de haz y se ajustó la ecuación:

$$STL_{100}^{\text{aire}} = \beta K_{\text{aire}}, \quad (3.5)$$

la constante de proporcionalidad β se denomina “sensibilidad al kerma”, y está relacionada con el factor de calibración de la señal TL en K_{aire} , denominado F_Q :

$$F_Q = 1/\beta. \quad (3.6)$$

El segundo paso consistió en determinar E_{ef} para las calidades de haz indicadas en la Tabla 3.4 usando los dosímetros TLD-300. Se irradiaron los dosímetros en aire y se usó el protocolo dosimétrico definido en la Tabla 3.4 para obtener la HLTR para cada calidad de haz. E_{ef} se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$E_{ef} = \frac{b(a-HLTR)}{HLTR-a-1}, \quad (3.7)$$

donde $a = -0.302 \pm 0.009$ y $b = -3.75 \pm 0.09$ fueron determinados en la referencia (108) para haces de bajas energías.

El tercer paso consistió en obtener la curva de calibración entre la señal TL del TLD-100 y K_{aire} , en función de E_{ef} obtenida con el TLD-300. Se ajustó la siguiente ecuación a la gráfica de F_Q vs. E_{ef} :

$$F_Q = F_Q^0 + A \exp(-E_{ef}/B), \quad (3.8)$$

donde F_Q^0 , A y B son constantes por determinar. Una vez determinadas estas constantes, la ecuación 3.8 servirá para determinar el F_Q para cualquier calidad de haz a partir de su E_{ef} y de este modo, se podrá determinar K_{aire} a partir de STL_{100} con las ecuaciones 3.6 y 3.5.

Se determinó D_{agua} al interior del maniquí de acrílico para las calidades de haz con mayor CNR (definidas por los resultados de la sección 3.2.7) a partir de la siguiente ecuación, considerando la existencia de equilibrio de partícula cargada (47):

$$D_{agua} = K_{aire} \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_{agua,E_{ef}} / \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_{aire,E_{ef}}, \quad (3.9)$$

$\left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_{agua,E_{ef}}$ y $\left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_{aire,E_{ef}}$ son los coeficientes másicos de absorción de energía del agua y del aire, respectivamente, que dependen de E_{ef} y se obtuvieron de la referencia (42). Se midió E_{ef} para las calidades de haz con mayor CNR usando los dosímetros TLD-300 irradiados dentro del maniquí de acrílico y se usó para estimar los coeficientes másicos de absorción y para calcular F_Q . K_{aire} se estimó a partir de F_Q y las ecuaciones 3.5 y 3.6, considerando una STL_{100} obtenida al irradiar los dosímetros TLD-100 dentro del maniquí de acrílico usando esas mismas calidades de haz.

Por último, D_{agua} al interior del maniquí de acrílico se reportó en función de mAs para cada calidad de haz. Dado que todas las mediciones con los TLD y la cámara de ionización se realizaron a 26 cm de la salida del tubo de rayos X (3 cm por debajo del isocentro), D_{agua} se corrigió por el inverso del cuadrado de la distancia para reportar su valor en el isocentro del equipo (102). Es necesario indicar que para la estimación de E_{ef} se eligió el método dosimétrico con TLD-300 en vez del método tradicional de la medición de la HVL usando la cámara de ionización, debido a que el espacio disponible en el equipo micro-CT no permitió tener una geometría de haz angosto, la cual es esencial para la determinación correcta de la E_{ef} mediante la HVL (47,102).

3.2.9 Elección de los protocolos óptimos

Una vez que se estimaron CNR y D_{agua} para las combinaciones candidatas, se determinó el protocolo óptimo de acuerdo con el siguiente factor de mérito (FOM):

$$FOM = CNR^2 / D_{agua}, \quad (3.10)$$

el cual combina las características deseables en la imagen médica: alta calidad de imagen y la menor dosis de radiación. El FOM se definió de esta manera para que la calidad de imagen y la dosis sean comparables, ya que se espera que CNR sea proporcional a la raíz cuadrada de D_{agua} en las imágenes micro-CT (110).

3.2.10 Análisis estadístico

Los datos en las tablas se expresaron como promedio \pm desviación estándar. Se utilizó GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE. UU.) para realizar los análisis estadísticos y regresiones lineales. Las comparaciones se evaluaron con análisis de varianza (ANOVA) bidireccional, seguida por la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples, o con la prueba t de Student bilateral. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

3.3 Resultados y Discusión de la optimización de los protocolos de imagen

3.3.1 Exactitud, uniformidad y ruido del número CT del agua

La Tabla 3.5 muestra la evaluación del efecto del algoritmo de reconstrucción sobre la exactitud, uniformidad y ruido del número CT del agua en imágenes del maniquí de agua adquiridas con la calidad de haz Q_5 (45 kV), 0.8 mA y 400 proyecciones, evaluadas en volúmenes de interés (VOI) cúbicos de 3 mm de lado. Se observó que el número CT del agua en el VOI del centro del maniquí fue similar para los dos métodos de reconstrucción. La uniformidad, indicada por el promedio de la diferencia del número CT entre la periferia y el centro del maniquí, también fue similar para los dos algoritmos de reconstrucción. Con respecto del ruido, se obtuvieron imágenes más ruidosas con el algoritmo iterativo que con el método usual de FBP para la calidad de haz evaluada.

Tabla 3.5 Evaluación de la exactitud del número CT del agua, su uniformidad y ruido en imágenes del maniquí de agua reconstruidas con dos algoritmos (FBP y SIRT 2D).

Parámetro	FBP	SIRT 2D
No. CT del agua: centro (HU)	2.8 ± 18.9	-1.9 ± 39.1
No. CT del agua: periferia 1 (HU)	21.7 ± 17.1	16.5 ± 38.3
No. CT del agua: periferia 2 (HU)	23.3 ± 18.5	15.0 ± 38.3
No. CT del agua: periferia 3 (HU)	22.0 ± 17.2	18.5 ± 38.9
No. CT del agua: periferia 4 (HU)	17.8 ± 17.9	15.8 ± 38.2
Promedio de la diferencia del No. CT en periferia y centro (HU)	18.4 ± 2.3	18.3 ± 1.5
Ruido (HU)	17.9 ± 0.8	38.6 ± 0.4

Se evaluaron VOI cúbicos de 3 mm de lado y se reportan promedio \pm desviación estándar.

Los valores promedio del número CT del agua en el centro de la imagen fueron menores que los valores en periferia, lo cual indicó la presencia de un efecto copa que podría tener un impacto negativo no deseado en la cuantificación de los BI si la diferencia es muy grande. Sin embargo, esta diferencia fue similar a una desviación estándar del valor del centro para FBP (17.8 HU vs. 18.9 HU), y fue menor que una desviación estándar del valor del centro para SIRT 2D (18.3 HU vs. 39.1 HU), lo cual sugirió que no es necesario

implementar correcciones adicionales por este efecto (107). Los valores promedio del ruido en las imágenes micro-CT fueron mayores que los valores usuales para equipos CT clínicos, lo cual es esperado dado el menor tamaño de vóxel en los equipos preclínicos (106,107). La evaluación rutinaria de estos parámetros es necesaria si se buscan resultados cuantitativos robustos ya que aseguran el buen funcionamiento del equipo y permiten detectar fallas en caso de que se encuentren valores fuera de los rangos esperados.

3.3.2 Linealidad del número CT

La Figura 3.4 muestra las gráficas de atenuación (en HU) en función de la concentración de yodo (C_I en mg I/ml). La atenuación se evaluó en imágenes de las resinas yodadas reconstruidas con dos algoritmos (FBP y SIRT 2D). R^2 fue mayor que 0.98 para FBP, y varió de 0.94 a 0.99 para SIRT 2D, lo cual indicó que existe una relación lineal entre la intensidad de la señal en la imagen (atenuación) y la C_I para las calidades de haz evaluadas en este estudio. Esta relación lineal implica que, al aumentar la C_I , también aumenta la atenuación de los rayos X, es decir, se absorben más rayos X a C_I altas y se obtienen valores altos de HU en las imágenes. La relevancia de este resultado es alta, ya que esta relación lineal permitirá cuantificar la C_I directamente de las imágenes una vez que se determinen las funciones de calibración apropiadas para cada calidad de haz. Este resultado era esperado ya que se sabe que la intensidad de la señal en imágenes de rayos X está directamente relacionada con las propiedades de atenuación de los tejidos (38). Esta linealidad encontrada en las imágenes de rayos X es una ventaja respecto de otros tipos de imagen, como por ejemplo de las imágenes de resonancia magnética, en las cuales la relación entre C_I y la señal en la imagen no es lineal, dificultando así la interpretación fisiológica de esta señal (38).

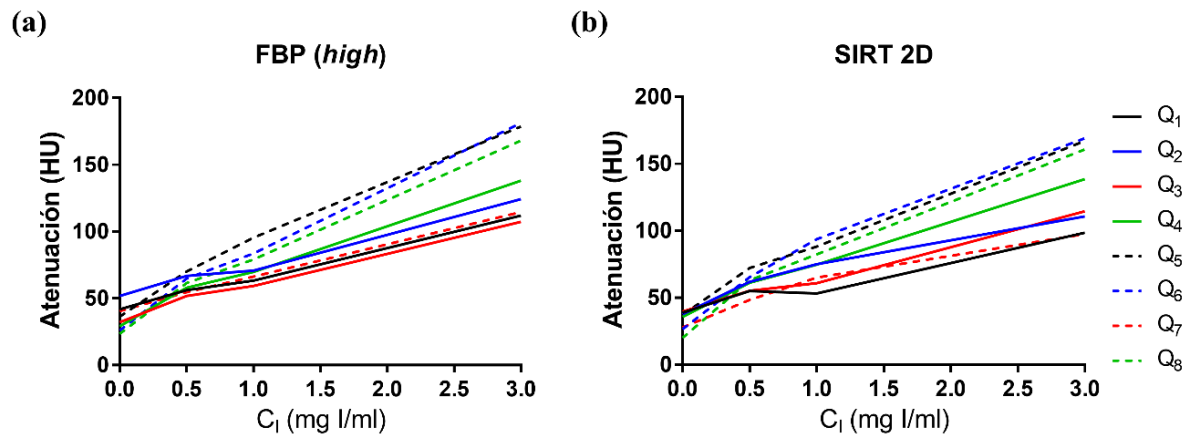


Figura 3.4 Gráficas de la atenuación (en HU) medida en imágenes de las resinas yodadas en función de la concentración de yodo (C_I , en mg de yodo/ml). Se evaluaron diferentes calidades de haz (Q_1 - Q_8) y dos algoritmos de reconstrucción: (a) FBP y (b) SIRT 2D.

3.3.3 Calidad de imagen

La Figura 3.5 muestra ejemplos de imágenes SE, DE y DCE del maniquí yodado hecho en el laboratorio. Para obtener la imagen SE se adquirió primero una imagen basal (I_{basal}), en la cual los viales del maniquí contenían únicamente agua destilada (sin medio de contraste). Posteriormente, se adquirió una imagen en la cual los viales ya tenían diferentes C_I (0, 0.5, 1, 3, 5 y 7 mg I/ml) y se realizó la resta de acuerdo con la ecuación 1.2. De este modo, la imagen obtenida está en términos del realce (definido en la ecuación 1.2). Ambas imágenes, I_{basal} e I_{MC} , se obtuvieron con la misma calidad de haz (para las calidades definidas en la Tabla 3.3) y se reconstruyeron con FBP y SIRT 2D; el ejemplo mostrado en la Figura 3.5 (a) corresponde a Q_5 y FBP. Puede observarse en la Figura 3.5 (a) que la resta enfatiza o aumenta el contraste entre los viales con diferentes C_I y el fondo de la imagen (agua), además de que los bordes del maniquí desaparecen de la imagen.

Para obtener la imagen DE se adquirieron dos imágenes del maniquí cuando los viales ya tenían las diferentes C_I ; cada imagen se adquirió con diferentes calidades de haz (de acuerdo a las combinaciones definidas en la Tabla 3.3), correspondientes a una alta y baja energía (HE y LE, respectivamente). Se usó la ecuación 1.1 para obtener las imágenes DE y se consideró el factor de ponderación α correspondiente para eliminar el material del fondo en la imagen que, en este caso, fue agua. La manera de obtener el factor de ponderación es por medio de la ecuación 1.1, sustituyendo los valores de HE y LE del material a eliminar, haciendo $DE = 0$ y despejando α . El ejemplo mostrado en la Figura 3.5 (b) corresponde a $HE = Q_5$, $LE = Q_1$, $\alpha = 0.85$, y FBP. La imagen DE es similar a la imagen SE, aunque con menor contraste.

Para obtener las imágenes DCE se usó la proyección a 0° de las imágenes crudas (RAW) adquiridas con el protocolo SE, tanto para I_{basal} como para I_{MC} . En la Figura 3.5 (c) se muestra un ejemplo de la imagen DCE para Q_5 ; se puede observar que las imágenes planas DCE presentan una mayor complejidad que las imágenes tridimensionales SE y DE, ya que aparecen en ellas elementos adicionales como la camilla sobre la cual se colocó el maniquí, mientras que en las imágenes reconstruidas SE y DE se pueden analizar cortes coronales, sagitales o transversales que excluyan estos elementos.

En la Figura 3.5 se pudo observar a simple vista que el contraste entre los viales con diferentes C_I y el fondo del maniquí (agua) aumentó en las imágenes SE, DE y DCE, comparadas con las imágenes originales previas a la resta, a pesar de que se nota la presencia de ruido en las imágenes restadas. Adicionalmente, el gran aporte de la resta de imágenes es la eliminación de las estructuras o componentes del fondo, lo cual podría mejorar la utilidad diagnóstica de estas imágenes.

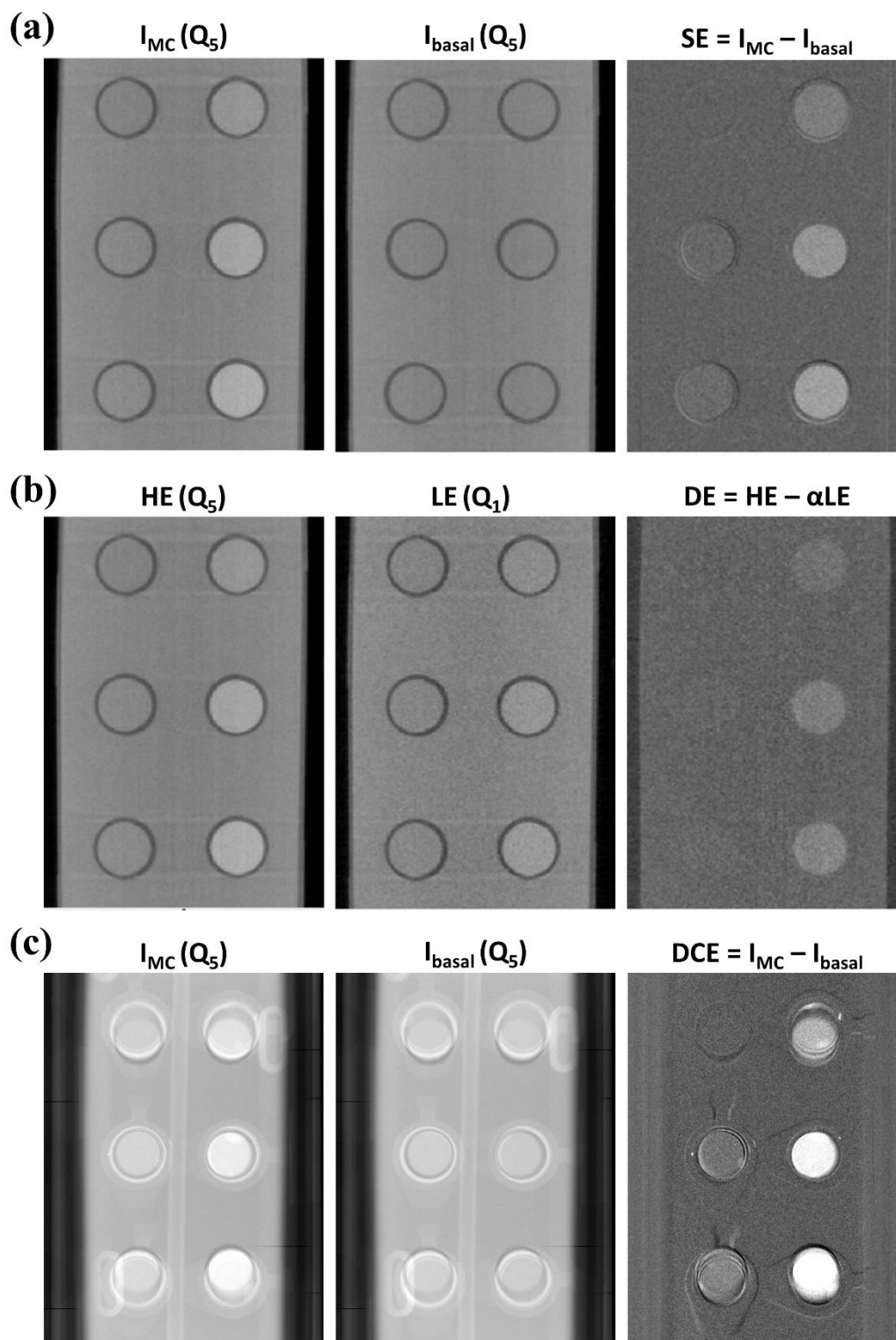


Figura 3.5 Ejemplos de imágenes restadas (a) SE, (b) DE y (c) DCE usando el maniquí yodado. Las imágenes basal (I_{basal}) y con medio de contraste (I_{MC}) se adquirieron con la calidad de haz Q_5 . La imagen de alta energía (HE) se adquirió con la calidad Q_5 y la de baja energía (LE), con Q_1 ; se usó $\alpha = 0.85$. Las imágenes en (a) y (b) se adquirieron con 0.8 mA, 400 proyecciones y se reconstruyeron con FBP; las imágenes en (c) se adquirieron con Q_5 y 0.8 mA. Escala de las imágenes I_{basal} , I_{MC} , HE y LE: -1000 a 1000 HU; SE y DE: -500 a 800 HU; I_{basal} e I_{MC} en (c): 0 a 6000 unidades arbitrarias; DCE: 500 a 800 unidades arbitrarias.

En la Figura 3.6 se muestra la evaluación cuantitativa de la calidad de imagen (CNR) de las imágenes tridimensionales originales, SE y DE del maniquí yodado, reconstruidas con FBP y SIRT 2D, y adquiridas con las calidades de haz definidas en la Tabla 3.3; también se muestra esta evaluación para las imágenes bidimensionales originales y DCE. Se observó que CNR de las imágenes tridimensionales originales fue mayor, en general, que CNR en las imágenes SE, para las calidades de haz evaluadas y los dos algoritmos de reconstrucción (FBP y SIRT 2D), como se muestra en la Figura 3.6 (a)-(d). Sin embargo, esta diferencia fue estadísticamente significativa sólo para una calidad de haz en cada tipo de reconstrucción: Q_3 en FBP ($p = 0.0492$), y Q_6 en SIRT 2D ($p = 0.0448$). Esta disminución de la calidad de imagen en las imágenes SE se debe a que la mayor desventaja de la resta es la amplificación del ruido. Un alto contenido de ruido en las imágenes CT o micro-CT podría limitar el desempeño de algoritmos basados en la detección de bordes, como los algoritmos de segmentación, y también podría afectar la exactitud de la cuantificación de los BI (111,112). Debido a esto, una estrategia que se podría explorar para la disminución del ruido en las imágenes restadas es el uso de filtros que, a su vez, permitan conservar las características de resolución espacial en las imágenes (113). A pesar del aumento del ruido, las imágenes SE del maniquí yodado permitieron distinguir cualitativamente las diferentes C_1 , principalmente debido al aumento del contraste y a la eliminación de las estructuras del fondo, como se observó en la Figura 3.5.

Las imágenes DE no se pueden comparar directamente con las imágenes originales, sin embargo, se puede apreciar que presentan un menor CNR, en general, que las imágenes SE, como se observa en la Figura 3.6 (c)-(f). Esto probablemente se debe a que la obtención de imágenes DE involucra el uso de calidades de haz con menor número de rayos X (i.e., fluencia) debido al uso de filtros adicionales (ver Tabla 3.3), lo cual contribuye al aumento del ruido en las imágenes (46), aunado a la amplificación del ruido inherente a la resta de las imágenes. Adicionalmente, la elección del parámetro de ponderación α para la resta tiene un efecto sobre CNR, por lo cual es un parámetro que requiere de optimización y que depende principalmente de las características del sujeto o animal de estudio y del tejido que se quiera eliminar o borrar de la imagen DE.

Con respecto a las imágenes bidimensionales originales, se observó que tienen un mayor CNR que las imágenes tridimensionales originales (FBP y SIRT 2D), como se observa en la Figura 3.6 (a), (b) y (g). Sin embargo, estas diferencias sólo fueron significativas para imágenes SIRT 2D adquiridas con las calidades de haz Q_1 ($p = 0.0480$), Q_3 ($p = 0.0380$) y Q_4 ($p = 0.0451$). Las diferencias se deben al ruido introducido por el algoritmo de reconstrucción de las imágenes tridimensionales. Por otro lado, al comparar CNR en las imágenes bidimensionales originales y DCE en la Figura 3.6 (g) y (h), se observó un comportamiento similar a lo observado para las imágenes SE (es decir, CNR mayor en las imágenes originales que en las DCE) para las calidades Q_3 ($p = 0.0263$) y Q_4 ($p = 0.0456$). Para las calidades de haz Q_1 , Q_5 y Q_6 se encontró un comportamiento inverso (CNR mayor en las imágenes DCE que en las originales), sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Como se observa en la Figura 3.6 (c) y (d), las tres combinaciones con mayor CNR en las imágenes SE fueron aquellas que usaron las calidades Q_5 (45 kV), Q_4 (40 kV) y Q_6 (45 kV + 0.025 mm Mo) para la adquisición de las imágenes I_{basal} e I_{MC} . Por lo tanto, estas combinaciones son las candidatas para evaluar la dosis impartida por cada una y elegir el protocolo óptimo para SE.

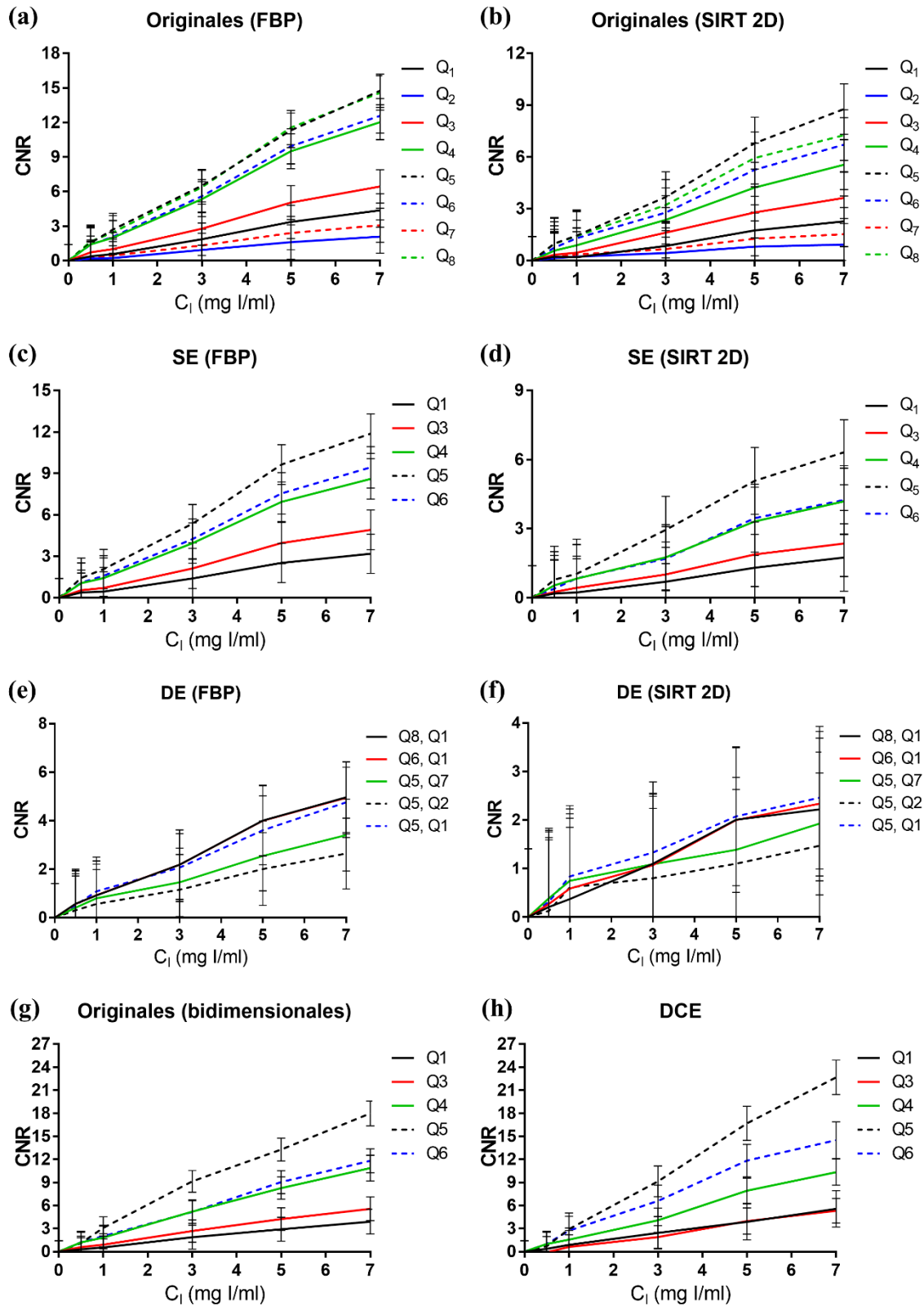


Figura 3.6 Evaluación de la calidad de imagen mediante la razón contraste-ruido (CNR) en imágenes tridimensionales originales reconstruidas con (a) FBP y (b) SIRT 2D, SE reconstruidas con (c) FBP y (d) SIRT 2D, DE reconstruidas con (e) FBP y (f) SIRT 2D, e imágenes bidimensionales (g) originales y (h) DCE. Las imágenes corresponden al maniquí yodado, y fueron adquiridas con las calidades de haz definidas en la Tabla 3.3.

Las tres combinaciones con mayor calidad de imagen para el protocolo DE y candidatas para evaluar la dosis impartida fueron Q₈-Q₁, Q₆-Q₁ y Q₅-Q₁, como se observa en la Figura 3.6 (e) y (f). La evaluación de la CNR para el protocolo DCE se muestra en la Figura 3.6 (h). Se obtuvieron las mismas combinaciones con la mejor CNR que para el protocolo SE, lo cual es un reflejo de la linealidad de la señal. La Tabla 3.6 indica las tres calidades de haz con mayor CNR para los protocolos SE y DE (para el algoritmo de reconstrucción SIRT 2D), y para el protocolo DCE.

Tabla 3.6 Calidades de haz con mayor razón contraste-ruido (CNR) para los protocolos SE y DE (para el algoritmo de reconstrucción SIRT 2D), y para el protocolo DCE.

Protocolo de imagen	Calidad de haz con mayor CNR	CNR @ 7 mg I/ml
SE	Q ₅ (45 kV)	6.32 ± 1.41
	Q ₄ (40 kV)	4.19 ± 1.44
	Q ₆ (45 kV + 0.025 mm Mo)	4.25 ± 1.48
DE	Q ₆ (45 kV + 0.025 mm Mo) – Q ₁ (30 kV)	2.34 ± 1.49
	Q ₈ (45 kV + 0.025 mm Cu) – Q ₁ (30 kV)	2.22 ± 1.47
	Q ₅ (45 kV) – Q ₁ (30 kV)	2.46 ± 1.47
DCE	Q ₅ (45 kV)	22.67 ± 2.24
	Q ₄ (40 kV)	10.34 ± 1.70
	Q ₆ (45 kV + 0.025 mm Mo)	14.50 ± 2.39

3.3.4 Dosis absorbida en agua

La Tabla 3.7 muestra los resultados de F_Q y E_{ef} medidos en aire para las calidades de haz definidas en la Tabla 3.4, y que se determinaron con dosímetros TLD-100 y TLD-300, respectivamente. Se graficó F_Q vs. E_{ef} y se determinaron las constantes de la ecuación 3.8, la cual representa la curva de calibración entre la señal TL del TLD-100 y K_{aire}; el valor obtenido de estas constantes fue: F_Q⁰ = 3.11E-09 ± 2.27E-11, A = 41958 ± 1.90E+06 y B = 0.558 ± 0.771.

La Tabla 3.8 muestra los valores de las magnitudes físicas requeridas para la estimación de D_{agua} para una única imagen bidimensional, las cuales se obtuvieron a partir de dosimetría TL. Los dosímetros (TLD-100 y TLD-300) se colocaron dentro del maniquí de acrílico y se irradiaron con las calidades de haz de la Tabla 3.6 (con mayor CNR para los protocolos SE, DE y DCE). E_{ef} se determinó a partir de la respuesta TL obtenida con los TLD-300 (ecuación 3.7) y se usó para determinar el cociente de los coeficientes másicos de atenuación de agua y aire (ecuación 3.9) y para determinar F_Q (ecuación 3.8). K_{aire} (en función de mAs y dentro del maniquí de acrílico) se estimó a partir de F_Q y la señal TL obtenida con los TLD-100 (ecuación 3.5 y 3.6). D_{agua} (en función de mAs y en el centro del maniquí de acrílico) se estimó para las calidades de haz mencionadas (ecuación 3.9) y luego se corrigió por el inverso del cuadrado de la distancia para estimar D_{agua} en el isocentro del equipo.

La Tabla 3.9 muestra los valores de D_{agua} considerando la adquisición de imágenes tridimensionales y bidimensionales (proyecciones). Para las imágenes tridimensionales se estimó la carga igual a 320 mAs, considerando 0.8 mA y 400 s de irradiación (1 proyección/s). Para las imágenes bidimensionales se estimó la carga igual a 0.8 mAs, correspondiente a 0.8 mA y 1 s de irradiación, lo cual equivale a D_{agua}/proyección. En la

Tabla 3.9 se observa que las calidades de haz filtradas con Mo y Cu proporcionan dosis menores, esto debido a que los filtros atenúan a los rayos X de baja energía que, de no ser eliminados, contribuirían a la dosis sin contribuir a la formación de la imagen.

Tabla 3.7 Resultados de la dosimetría con TLD-100 para la estimación del factor de calibración (F_Q) de señal termoluminiscente (STL) a kerma en aire (K_{aire}), y de la dosimetría con TLD-300 para la estimación de la energía efectiva del haz (E_{ef}).

Calidad de haz	F_Q (Gy/STL en aire)	E_{ef} en aire (keV)
Q₁ (30 kV)	3.82E-09 ± 5.12E-11	17.6 ± 1.3
Q₃ (35 kV)	3.49E-09 ± 2.17E-11	18.4 ± 1.5
Q₄ (40 kV)	3.25E-09 ± 9.25E-12	18.5 ± 1.4
Q₅ (45 kV)	3.18E-09 ± 3.38E-11	19.1 ± 1.5
Q₆ (45 kV + 0.025 mm Mo)	3.06E-09 ± 3.75E-11	20.2 ± 2.8
Q₈ (45 kV + 0.025 mm Cu)	3.13E-09 ± 2.65E-11	21.9 ± 2.3

Tabla 3.8 Estimación de la dosis absorbida en agua (D_{agua}) en el centro del maniquí de acrílico y en el isocentro del equipo micro-CT en función de mAs para las calidades de haz con mayor CNR. Los valores de D_{agua} corresponden a una única imagen bidimensional (proyección).

Calidad de haz	$K_{\text{aire}}/\text{mAs}$ en el maniquí (mGy/mAs)	E_{ef} en el maniquí (keV)	$\frac{\left(\frac{\mu_{\text{en}}}{\rho}\right)_{\text{agua}, E_{\text{ef}}}}{\left(\frac{\mu_{\text{en}}}{\rho}\right)_{\text{aire}, E_{\text{ef}}}}$	$D_{\text{agua}}/\text{mAs}$ en el maniquí en isocentro (Gy/mAs)
Q₁ (30 kV)	0.52 ± 0.14	20.0 ± 2.2	1.0258	0.46 ± 0.12
Q₄ (40 kV)	1.14 ± 0.67	19.5 ± 1.6	1.0263	1.02 ± 0.59
Q₅ (45 kV)	1.33 ± 0.24	20.2 ± 1.6	1.0255	1.18 ± 0.21
Q₆ (45 kV + 0.025 mm Mo)	0.74 ± 0.05	27.4 ± 3.0	1.0187	0.65 ± 0.04
Q₈ (45 kV + 0.025 mm Cu)	0.61 ± 0.04	23.1 ± 2.7	1.0225	0.54 ± 0.03

K_{aire} , kerma en aire; E_{ef} , energía efectiva; $\frac{\mu_{\text{en}}}{\rho}$, coeficiente másico de atenuación.

Tabla 3.9 Estimación de la dosis absorbida en agua (D_{agua}) en el centro del maniquí de acrílico y en el isocentro del equipo micro-CT para una única imagen tridimensional (320 mAs, 400 proyecciones) y una única imagen bidimensional (0.8 mAs, 1 proyección).

Calidad de haz	Imagen tridimensional D_{agua} (mGy)	Imagen bidimensional (proyección) D_{agua} (mGy)
Q₁ (30 kV)	147 ± 38	0.37 ± 0.10
Q₄ (40 kV)	326 ± 189	0.82 ± 0.47
Q₅ (45 kV)	378 ± 67	0.94 ± 0.17
Q₆ (45 kV + 0.025 mm Mo)	208 ± 13	0.52 ± 0.03
Q₈ (45 kV + 0.025 mm Cu)	173 ± 10	0.43 ± 0.02

Durante la evaluación del desempeño del equipo se observó que el tubo de rayos X tardó entre 2.5 y 5 s para alcanzar la corriente programada, y permaneció encendido un total de 100 s para adquirir una imagen plana independiente (no una proyección como parte de una imagen tridimensional) (102). Este tiempo fue constante para todas las calidades de haz. Dado que el detector solamente requiere 0.5 s para adquirir una imagen, se determinó que el tubo de rayos X permaneció innecesariamente encendido 95 s después de haber adquirido la imagen, impartiendo una dosis mayor que la requerida para la formación de la imagen. Se informó de esta anomalía al ingeniero encargado del mantenimiento del equipo por parte del fabricante y en el mantenimiento de noviembre de 2017 hizo los ajustes necesarios al software de adquisición para reducir el tiempo de irradiación a 0.5 s para imágenes planas independientes. Como parte de las mejoras, se redujo el tiempo de adquisición de las proyecciones para imágenes 3D. Originalmente el equipo tardaba 1.5 s para adquirir una proyección, y después del ajuste tardaba 1 s por proyección. Esto implicó una importante reducción en D_{agua} , como se muestra en la Figura 3.7, en la cual se compara la dosis antes y después del mantenimiento de 2017 para adquisiciones con diferente número de proyecciones. El caso mostrado corresponde a 45 kV y 0.8 mA. La reducción de D_{agua} fue significativa para los protocolos con 1000, 600 y 400 proyecciones.

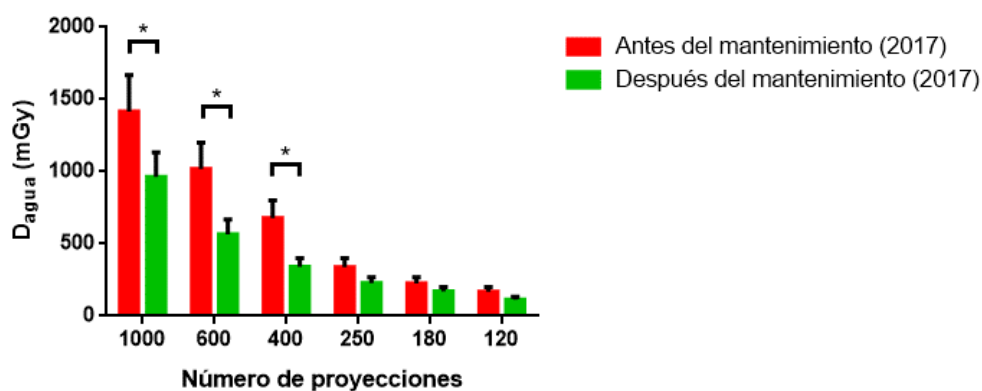


Figura 3.7 Dosis en agua (D_{agua}) para imágenes adquiridas con diferente número de proyecciones, antes y después del mantenimiento al equipo micro-CT en noviembre de 2017. * $p < 0.05$, evaluado con ANOVA bidireccional, seguido por prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.

3.3.5 Elección de los protocolos óptimos

En la Tabla 3.10 se muestran los valores obtenidos de CNR (para $C_1 = 7$ mg I/ml y el algoritmo de reconstrucción SIRT 2D), D_{agua} (medida al interior del maniquí de acrílico y en isocentro) y FOM para las combinaciones con mayor CNR identificadas en la sección 3.3.3 (Tabla 3.6) para los protocolos SE, DE y DCE. Los valores de D_{agua} reportados en la Tabla 3.9 corresponden a una única imagen, mientras que D_{agua} reportada en la Tabla 3.10 corresponde a la dosis total para un estudio completo que resulta de adquirir dos imágenes en el caso de los protocolos SE (I_{basal} e I_{MC}) y DE (HE y LE), y dos series de 180 imágenes/c.u. (1 proyección/s), en el caso del protocolo DCE, debido a que el tiempo de adquisición estándar para estudios en animales con este protocolo es de aproximadamente 3 min (114). De acuerdo con los resultados de la FOM, los protocolos óptimos para adquirir las imágenes de rayos X realizadas por contraste son Q_5 (45 kV) para el protocolo SE, la combinación Q_6 - Q_1 para DE (correspondiente a HE: 45 kV + 0.025 mm Mo, LE: 30 kV) y Q_5 (45 kV) para el protocolo DCE, y están indicados en la Tabla 3.10 con el símbolo *.

Tabla 3.10 Calidad de imagen (CNR) y dosis absorbida en agua (D_{agua}) para los mejores protocolos SE, DE y DCE. El factor de mérito (FOM) considera el impacto de ambos para estudios completos.

Calidades de haz	CNR @ 7 mg I/ml	D_{agua} (mGy)	FOM = $\text{CNR}^2/D_{\text{agua}}$
SE: Q ₄	4.19 ± 1.44	653 ± 267	0.027 ± 0.022
SE: Q ₅ *	6.32 ± 1.41	755 ± 95	0.053 ± 0.024*
SE: Q ₆	4.25 ± 1.48	416 ± 18	0.043 ± 0.030
DE: Q ₅ , Q ₁	2.46 ± 1.47	525 ± 77	0.012 ± 0.014
DE: Q ₆ , Q ₁ *	2.34 ± 1.49	355 ± 40	0.015 ± 0.020*
DE: Q ₈ , Q ₁	2.22 ± 1.47	320 ± 40	0.015 ± 0.021
DCE: Q ₄	10.34 ± 1.70	294 ± 120	0.364 ± 0.191
DCE: Q ₅ *	22.67 ± 2.24	340 ± 43	1.512 ± 0.354*
DCE: Q ₆	14.50 ± 2.39	187 ± 8	1.124 ± 0.373

Los protocolos óptimos se indican con *.

Los valores de D_{agua} para una única imagen obtenidos en este trabajo (Tabla 3.9) son similares a los valores reportados para imágenes micro-CT (alrededor de 300 mGy) (115). Los valores de D_{agua} para estudios completos SE, DE y DCE obtenidos en este trabajo (Tabla 3.10) se encuentran dentro de los rangos reportados para estudios longitudinales en los que se adquieren varias imágenes, o para estudios dinámicos de perfusión, en los cuales la dosis máxima ha sido de 1 Gy (48). Es importante señalar que D_{agua} estimada para los protocolos SE, DE y DCE se encuentra por debajo de la dosis letal $LD_{50/30}$ para ratones, estimada de 5.0 a 7.6 Gy, y que representa la dosis a cuerpo completo necesaria para matar al 50% de la población expuesta dentro de los 30 días posteriores a la exposición (116). Debe notarse también que la dosis de radiación impartida por estos protocolos puede reducirse si se reduce el tiempo total de irradiación (como se hizo evidente en los resultados mostrados en la Figura 3.7), el número de proyecciones para la adquisición de las imágenes (se consideraron 400 proyecciones en los datos de la Tabla 3.10), o la corriente (se consideró una corriente de 0.8 mA).

3.4 Conclusiones de la optimización de los protocolos de imagen

Se observó un desempeño adecuado del equipo micro-CT en términos de la exactitud, uniformidad y ruido del número CT del agua. Se obtuvieron valores estándares de estos parámetros que podrán usarse como control de calidad para evaluar el buen funcionamiento del equipo a lo largo del tiempo.

Se comprobó la relación lineal entre la intensidad en las imágenes y la concentración de yodo, lo cual permitirá establecer relaciones directas entre los parámetros medidos en la imagen y parámetros fisiológicos de interés en el estudio de la angiogénesis.

Se mostró de manera cualitativa la habilidad de las imágenes SE, DE y DCE para resaltar las diferentes concentraciones de yodo en un maniquí y distinguirlas del fondo de la imagen. La evaluación cuantitativa de la calidad de imagen permitió identificar las calidades de haz con las que se obtuvieron imágenes con mayor contraste y menor ruido para los tres protocolos.

El uso combinado de dosímetros TLD-100 y TLD-300 permitió estimar la dosis absorbida en agua usando un método novedoso y adecuado para la geometría y poca disponibilidad de espacio en el equipo micro-CT, basado en la medición de la energía

efectiva del haz con TLD-300. Con este método se obtuvo una curva de calibración que será útil para estimar la dosis absorbida en agua para cualquier calidad de haz disponible en el equipo micro-CT.

La dosis absorbida en agua estimada para los protocolos SE, DE y DCE se encontró dentro de los rangos reportados para estudios de imagen similares en animales, sin embargo, es posible disminuirla si se disminuye el tiempo, el número de proyecciones o la corriente usados para la adquisición de las imágenes. Un ejemplo de esta optimización fue la reducción significativa de la dosis que se logró al disminuir el tiempo de adquisición, después de que se realizó el mantenimiento al equipo en respuesta a una anomalía observada durante la evaluación de su desempeño.

Se determinaron los parámetros radiológicos para la adquisición de las imágenes con los protocolos SE, DE y DCE que permitieron obtener la mejor calidad de imagen y la menor dosis absorbida.

4 ESTANDARIZACIÓN DE LA CUANTIFICACIÓN DE LOS BIOMARCADORES DE IMAGEN

4.1 Introducción

En este capítulo se presenta la realización del segundo objetivo específico de este trabajo, el cual consistió en estandarizar la cuantificación de biomarcadores de imagen (BI) SE, DE y DCE, como se muestra en el esquema de la Figura 4.1. Se usó un grupo piloto del modelo subcutáneo de glioma con células C6 para definir los parámetros relativos a la adquisición de las imágenes, los cuales tienen un impacto directo en la cuantificación de los BI y fueron: el tiempo al cual se adquirieron las imágenes después de que se implantaron las células en los animales, y el método de administración del medio de contraste radiológico y la dosis de yodo administrada. Con las imágenes adquiridas del grupo piloto de animales, se evaluaron aspectos del procesamiento de imágenes relevantes para la cuantificación de los BI: se evaluó de manera cualitativa el desempeño de un algoritmo de registro de imágenes que se implementó con el objetivo de alinear los tejidos antes de realizar la resta; se definieron las funciones de calibración que relacionaron el realce del contraste medido en las imágenes restadas y la concentración de yodo (C_1); y se definieron aspectos importantes para la cuantificación de los BI para los protocolos DE (factor de ponderación α para la resta) y DCE (método de Patlak para la cuantificación de los BI). Por último, se evaluó el desempeño técnico de C_1 como un BI mediante la cuantificación de la incertidumbre asociada a su medición, en términos del sesgo y precisión (repetibilidad y reproducibilidad).

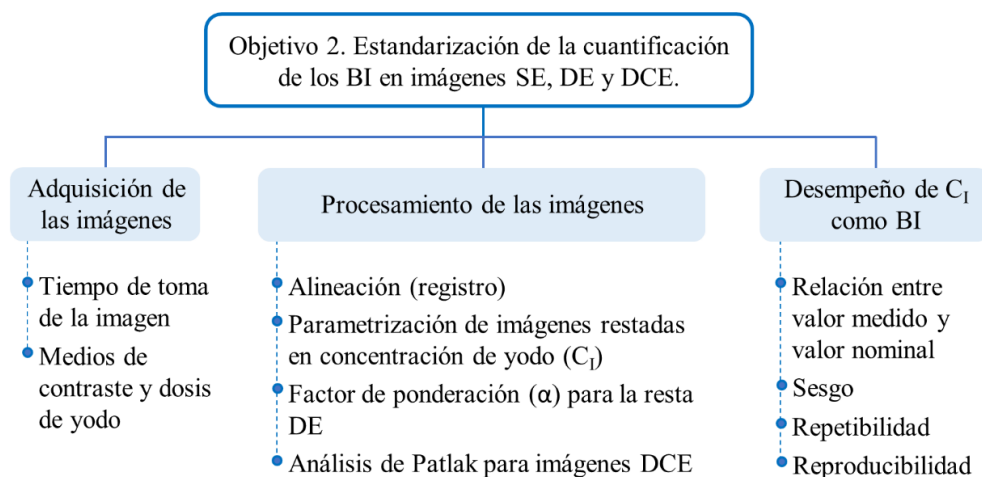


Figura 4.1 Esquema del contenido de este capítulo. BI, biomarcador de imagen; C_1 , concentración de yodo.

4.2 Métodos

4.2.1 Modelo subcutáneo de glioma con células C6

Las células C6 (ATCC, Manasa, VA, USA) fueron proporcionadas por el Dr. Enrique Pérez Cárdenas, del Instituto Nacional de Cancerología. Se cultivaron en medio RPMI 1640 (GIBCO, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), suplementado con suero fetal bovino al 10%, a 37 °C con 5% de CO₂. Las células (3×10^6) se inyectaron de manera subcutánea en dos sitios contralaterales del dorso de ratas Wistar macho. Se usaron cuatro ratas en un primer grupo de animales (n = 8 tumores, grupo piloto), se cuantificó el volumen tumoral a partir de 5 días post-inyección (DPI) de las células C6 y se obtuvieron curvas de crecimiento. Se midieron el diámetro mayor (D) y menor (d) de los tumores con un vernier digital y se determinó el volumen con la relación: $V = \pi Dd^2/6$. Los animales se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos y se alimentaron *ad libitum* con alimento y agua esterilizados. Todos los experimentos realizados con animales fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética e Investigación, así como por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), del Instituto Nacional de Cancerología, Ref. (018/051/IBI) (CEI/1294/18). Se realizaron esfuerzos por minimizar el sufrimiento animal y reducir el número de animales usados en los experimentos.

4.2.2 Parámetros clínicos relativos a la adquisición de las imágenes

El primer parámetro a definir es el tiempo óptimo para la adquisición de las imágenes SE, DE y DCE del modelo animal usado, el cual está directamente relacionado con el volumen tumoral. El volumen tumoral es un indicador indirecto del desarrollo de la microvasculatura en este modelo animal, ya que se ha demostrado que la fase de crecimiento tumoral exponencial corresponde con la fase de vascularización angiogénica (también llamada fase de mantenimiento), mientras que la fase de adaptación (*lag*) de las células tumorales corresponde con una fase no angiogénica (fase de establecimiento), caracterizada por el crecimiento de las células tumorales a lo largo de los vasos existentes (117,118). A medida que disminuye el tamaño tumoral se observa también un desarrollo no homogéneo de su microvasculatura (fase de regresión). Por lo tanto, al definir el tiempo de adquisición de las imágenes a partir del tiempo al cual se observa el volumen máximo, nos aseguramos de evaluar a los tumores en la fase angiogénica de su desarrollo. Se caracterizó el tiempo de crecimiento y volumen tumoral del grupo piloto del modelo animal de glioma con células C6 (n = 8 tumores). Según la experiencia previa con este modelo animal en el laboratorio, se recomendó usar 3×10^6 células esperando que los tumores se desarrollaran en un lapso de una semana y crecieran durante un mes, aproximadamente, antes de que la respuesta aloinmune de los animales huéspedes causara su regresión (94). Se determinó el tiempo óptimo para la adquisición de las imágenes a partir de las curvas de crecimiento tumoral, y se eligió el tiempo en el que la mayoría de los tumores del grupo piloto mostraron el máximo volumen.

Los parámetros que restan por definir para la adquisición de las imágenes SE, DE y DCE están relacionados con los medios de contraste radiológicos a usar, la manera en que se administran y las dosis de yodo usadas en animales. Para los estudios SE y DCE se usó un medio de contraste clínico (Omnipaque 300, con concentración de yodo de 300 mg I/ml, GE Healthcare, Wauwatosa, WI, USA). Se definió usar este medio de contraste radiológico ya que es ampliamente utilizado para pacientes, está disponible de manera comercial y es

de bajo costo comparado con otros medios de contraste de uso preclínico. El Omnipaque 300 está basado en iohexol, un componente monomérico triyodado, no iónico, de baja osmolaridad y de bajo peso molecular que se elimina muy rápidamente por vía renal. En los estudios con pacientes se administra generalmente en bolo, es decir, se inyecta el volumen total en un tiempo corto. Sin embargo, en los estudios con equipos micro-CT con tiempos largos de adquisición de imágenes, como es nuestro caso, es complicado técnicamente usar la inyección en bolo. Por este motivo, para los protocolos SE y DCE se optó por administrar el medio de contraste clínico mediante infusión continua a través de un catéter colocado en la vena yugular externa derecha de los animales (119) y usando una bomba de infusión (KDS100, KD Scientific Inc., Holliston, MA, USA). La estandarización de este procedimiento se presenta en la sección 4.3.2.

Para el protocolo SE se definió una dosis de yodo de 2.4 mg I/g de peso corporal, de acuerdo con reportes de estudios de imagen similares en ratas usando este medio de contraste (40,76). Para una rata de 250 g, esta dosis correspondió a un volumen de inyección de 2 ml, tomando en cuenta la concentración del medio de contraste clínico usado. Este volumen de inyección está por debajo del límite de volumen inyectado mediante infusión continua vía intravenosa en ratas (4 ml para una rata de 250 g) (120). Antes de cada estudio de imagen se pesó a los animales para calcular el volumen de inyección requerido para lograr la dosis establecida y así también definir la velocidad de infusión para un estudio de 6.7 min de duración, correspondientes a la adquisición de 400 proyecciones.

Para el protocolo DCE se definió una dosis de yodo de 1.2 mg I/g de peso corporal, de acuerdo con reportes de estudios de imagen similares en ratas usando este medio de contraste (40,76), y considerando la menor duración del tiempo de estudio comparado con el estudio SE. Para una rata de 250 g, esta dosis correspondió a un volumen de inyección de 1 ml. El mayor reto para implementar el estudio DCE en el equipo micro-CT fue el largo tiempo de adquisición de las imágenes, por lo cual se optó por usar las proyecciones de un estudio programado con el mayor número de ellas (1000 proyecciones). Se adquirieron las primeras 180 proyecciones, correspondientes a 3 min de estudio, con una resolución temporal alta (1 imagen/s). La duración del estudio (3 min) se definió a partir de reportes en estudios similares en ratas (114). Para la adquisición de cada proyección el tubo de rayos X giró 0.36° , por lo tanto, las 180 proyecciones adquiridas cubrieron un ángulo de 64.8° . Esto quiere decir que entre las imágenes se tuvo un desplazamiento angular que ocasionó el enmascaramiento de los tejidos, dificultando su identificación. Para mejorar la visualización de estas estructuras se eligió emplear la infusión continua del medio de contraste, a pesar de que la alta resolución temporal de la adquisición permitía realizar la inyección en bolo. La infusión continua permitió un aumento constante de la C_I en los tejidos comparada con el alto pico que se alcanzaría con la inyección en bolo, pero que sería de muy corta duración (121).

Para los estudios DE se optó por un medio de contraste preclínico de tipo *blood pool*, es decir, con un tiempo largo de residencia en el torrente sanguíneo. Se eligió este medio de contraste en lugar de la infusión continua del medio de contraste clínico debido a que ambas imágenes (HE y LE) del protocolo DE deben adquirirse en presencia del medio de contraste radiológico para obtener el mayor realce posible. La infusión continua en dos imágenes de larga duración implicaría un alto volumen de inyección a los animales (del orden de 4 ml en una rata de 250 g, por ejemplo), lo cual está en el límite del volumen de inyección permitido en ratas para infusión continua vía intravenosa, y podría ser

contraproducente para el bienestar del animal, así como alterar sus parámetros hemodinámicos normales (120,122,123).

El medio de contraste preclínico que se usó para la adquisición de las imágenes DE fue Fenestra VC (MediLumine Inc., Montreal, QC, Canada), una emulsión yodada con una concentración de yodo de 50 mg I/ml y un tiempo de residencia en sangre de 6 h, de acuerdo con el fabricante. Los volúmenes de inyección recomendados por el fabricante son de 7.5 a 15 ml/kg para ratas, lo cual equivale a un rango de 1.8 a 3.75 ml para una rata de 250 g. Estos volúmenes de inyección son altos debido a la baja concentración de yodo en este medio de contraste, comparada con la del medio de contraste clínico. Se evaluaron cuatro dosis de yodo con Fenestra VC para el protocolo DE, una para cada animal del grupo piloto del modelo de glioma: 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 mg I/g de peso corporal; la dosis más alta correspondió a un volumen de inyección de 2 ml para una rata de 250 g, justo por encima del límite inferior sugerido por el fabricante. Se adquirieron imágenes HE antes y después de la inyección lenta (durante 4 min) de Fenestra VC en la vena de la cola de los animales durante 4 horas post-inyección. Se cuantificó el realce (ecuación 1.2) en función del tiempo para varios órganos de interés, incluyendo los tumores, usando el software libre Amide (124). A partir de esos resultados se definieron la dosis de Fenestra VC y el tiempo de adquisición de las imágenes HE y LE (posterior a la inyección de este medio de contraste) con las cuales se obtuvo el mayor realce en el tumor.

4.2.3 Registro de imágenes

Los protocolos SE, DE y DCE involucran la adquisición de dos imágenes (o dos series de imágenes) para su resta. La resta de dos imágenes de un mismo objeto requiere que éste se encuentre en la misma ubicación espacial en la imagen, es decir, el objeto debe permanecer inmóvil. Sin embargo, durante la adquisición de las imágenes de los animales los órganos cambian de posición, ya sea por movimientos naturales como la respiración o por modificaciones en su posicionamiento entre una imagen y otra; por lo tanto, es necesario implementar algoritmos de registro o alineación que reduzcan la incertidumbre en el cálculo de los BI. En este trabajo se usó un algoritmo de registro de imágenes desarrollado y validado por Evangelidis y Psarakis (100), basado en la transformación afín (*affine*). La transformación afín realiza transformaciones lineales (rotaciones y traslaciones) para alinear los puntos de una imagen de origen (*source*) que corresponden a un mismo objeto en la imagen de destino (*target*). El código para realizar el registro de imágenes está basado en Matlab (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) y fue proporcionado por el Dr. Jorge Márquez Flores del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT), UNAM.

Para evaluar de manera cualitativa el desempeño del algoritmo de registro afín, se adquirieron imágenes SE, DE y DCE de los animales del grupo piloto del modelo de glioma (un animal por protocolo de imagen), usando los parámetros de administración del medio de contraste estandarizados en la sección 4.2.2. Como imágenes destino se usaron las imágenes I_{MC} en los protocolos SE y DCE y las imágenes HE en el protocolo DE, y las imágenes de origen fueron I_{basal} y LE, respectivamente.

4.2.4 Parametrización de imágenes en concentración de yodo

Se adquirieron imágenes de las resinas yodadas (descritas en la sección 3.2.2) con los protocolos SE, DE y DCE. Las imágenes se reconstruyeron con el algoritmo SIRT 2D, se

obtuvieron las imágenes restadas de estas resinas y se realizó un análisis de regresión lineal para obtener las funciones de calibración entre el realce en las imágenes restadas y la C_I . En el caso del protocolo DE, se evaluaron tres valores del factor de ponderación α correspondientes al agua, la resina con 0 mg I/ml, y el músculo de los animales, para lo cual se evaluó el realce en músculo en las imágenes HE y LE adquiridas en la sección 4.2.3.

4.2.5 Cuantificación de los biomarcadores en imágenes SE y DE

Los BI que se cuantificaron en imágenes restadas SE y DE fueron el realce, C_I y rBV. El realce se obtuvo a partir de la resta de imágenes con las ecuaciones 1.1 y 1.2 para DE y SE, respectivamente, y sus unidades son HU. Las imágenes restadas SE y DE se convirtieron en C_I (en unidades de mg I/ml) usando las funciones de calibración definidas de acuerdo con la sección anterior. Se empleó la ecuación 1.3 para cuantificar rBV, tomando como AIF la aorta abdominal, ya que es una arteria con un diámetro grande y cercana a la zona donde se implantaron las células tumorales a los animales.

El único factor que queda pendiente por definir en la cuantificación de los BI para estas imágenes es el factor de ponderación α para la resta DE. Para definirlo se cuantificaron los tres BI (realce, C_I y rBV) en músculo, tanto en imágenes SE en un animal (2 tumores) como en imágenes DE en otro animal (2 tumores), pero usando los tres valores de α mencionados en la sección anterior, es decir, correspondientes a agua, a la resina con 0 mg I/ml, y al músculo de los animales. Se compararon los BI al usar los diferentes α y se eligió el que proporcionó los valores más cercanos a los obtenidos con la imagen SE, dentro de un intervalo de confianza. Se usó el software Amide para el análisis de las imágenes SE y DE (124).

4.2.6 Cuantificación de los biomarcadores en imágenes DCE

La cuantificación de los BI en imágenes DCE se realizó mediante el análisis gráfico de Patlak, descrito en la sección 1.3 y definido por la ecuación 1.7, el cual permite cuantificar el rBV y la constante de transferencia de volumen K^{trans} . Para realizar este análisis se escribió un código en Matlab R2018b (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) que se validó con datos publicados en un reporte que proporciona todos los pasos para su implementación (54). Después de que se verificó el correcto funcionamiento de este código para el cálculo de rBV y K^{trans} , se definió el tiempo de integración en el intervalo de 30 a 80 s de acuerdo a lo recomendado para estudios dinámicos de rayos X en ratas (125), se cuantificaron estos biomarcadores en músculo en un animal del grupo piloto del modelo de glioma, y se comparó el rBV medido con este análisis y el rBV medido con SE en la sección anterior. Se obtuvieron dos series de 180 imágenes de acuerdo con el protocolo DCE establecido, se realizó la resta de imágenes y se convirtieron a C_I con la función de calibración. Posteriormente, se analizaron las imágenes en ImageJ (126) para cuantificar la C_I en músculo y ventrículo izquierdo, y se graficó la C_I en función del tiempo (1 imagen/s) para obtener las curvas tiempo- C_I . El ventrículo izquierdo se usó como AIF en este caso ya que fue más fácilmente identificable en las imágenes planas restadas que la aorta. Finalmente, se analizaron estas curvas con el algoritmo de Patlak implementado en Matlab y se comparó rBV en músculo cuantificado con este análisis y el obtenido con el protocolo SE.

4.2.7 Evaluación del desempeño técnico de la concentración de yodo como biomarcador de imagen

La evaluación del desempeño (o validación técnica) de un BI implica evaluar la relación entre su valor medido y su valor nominal, sesgo, linealidad, repetibilidad y reproducibilidad asociada con su cuantificación (35,36), como se presentó en la sección 1.2. El objetivo de esta evaluación es determinar la habilidad del BI para representar a un valor verdadero o estándar de referencia sin sesgo y con la mayor precisión. En esta sección se describen los métodos que se usaron para evaluar el desempeño de la C_I en imágenes SE, DE y DCE de las resinas yodadas, las cuales son maniquís validados (99); actualmente, no se cuenta con maniquís validados para rBV ni K^{trans} , por lo cual no es posible validar estos BI aún. Se adquirieron imágenes de las resinas con los tres protocolos de imagen, las imágenes de los protocolos SE y DE se reconstruyeron con SIRT 2D, se obtuvieron las imágenes restadas, se calibraron en valores de C_I y se cuantificó C_I por triplicado para cada resina (3 repeticiones/valor nominal de C_I). Se adquirieron 2 veces las imágenes para tener 2 réplicas/protocolo (diseño experimental tipo *test-retest*).

La relación entre el valor medido y nominal de C_I se evaluó mediante una gráfica del promedio del valor medido en ambas réplicas vs. valor nominal. Se ajustaron polinomios de 2° y 1° orden a los datos, y se aceptó la linealidad cuando el coeficiente del término de 2° orden del polinomio ajustado de 2° orden fue pequeño ($\beta_2 < 0.5$), y el coeficiente del término de 1° orden del polinomio ajustado de 1° orden fue cercano a uno ($0.95 < \beta_1 < 1.05$) y $R^2 > 0.9$. Se evaluó también el sesgo a partir del valor de la ordenada al origen y se estimó si fue constante (si la recta ajustada era paralela a la recta unidad) o no.

El sesgo de C_I se obtuvo de la diferencia entre el valor medido y el valor nominal. Se graficó el sesgo en función de del valor nominal de C_I y se determinó el sesgo promedio para cada protocolo de imagen, si este fue constante.

La variabilidad o precisión de C_I cuantificada en cada protocolo se estimó a partir de métricas de repetibilidad y reproducibilidad. La repetibilidad se evaluó a partir de la desviación estándar intra-sujeto (wSD = desviación estándar de las dos réplicas para cada valor nominal de C_I), el coeficiente de variación intra-sujeto ($wCV = wSD/\text{promedio}$) y el coeficiente de repetibilidad ($RC = 2.77wSD$) (36). No se evaluó el ICC debido a que solamente se contó con un sujeto experimental (un maniquí validado de C_I).

Se estimaron intervalos de confianza (IC) del 95% para la C_I a partir de $Y(1 \pm 1.96wCV)$, donde Y es el promedio del valor medido de C_I , lo cual permitió establecer un perfil de variabilidad estilo QIBA para los valores nominales evaluados de C_I . El objetivo de este perfil es conocer los límites de precisión para mediciones futuras de C_I con cada protocolo (estudios de tipo transversal). Para mediciones de C_I en estudios de tipo longitudinal (imágenes adquiridas a lo largo del tiempo), el parámetro RC define los límites de acuerdo ($LOA = [-RC, +RC]$) entre los cuales se encuentra la diferencia mínima detectable entre dos mediciones de C_I consecutivas con un 95% de confianza (36,37), i.e., los LOA sirven para estimar cuando un cambio en mediciones longitudinales de C_I corresponden a un verdadero cambio biológico y no a un error experimental en la medición de C_I .

La reproducibilidad de C_I medida con los diferentes protocolos de imagen (considerando los otros factores constantes: equipo, operador, analista de las imágenes) se evaluó con la correlación de Pearson para cada combinación Protocolo 1 vs. Protocolo 2. Otra métrica

para estimar la reproducibilidad es el coeficiente de reproducibilidad (RDC). El RDC se estima de manera similar al RC ($RDC = 2.77 \times wSD$), sin embargo, la wSD en este caso se estima cuando C_I de la réplica 1 se cuantifica con el Protocolo 1, y C_I de la réplica 2, con el Protocolo 2.

Finalmente, se evaluó la validez del perfil de variabilidad de C_I obtenido con las resinas yodadas. Para esto, las imágenes restadas SE, DE y DCE del maniquí yodado hecho en el laboratorio (obtenidas en la sección 3.3.3) se calibraron en valores de C_I y se evaluó si los valores medidos en este maniquí estaban dentro de los IC 95% esperados.

4.2.8 Análisis estadístico

Se utilizó GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE. UU.) para realizar los análisis estadísticos, evaluar ajustes lineales y polinomiales y correlación de Pearson. Las comparaciones se evaluaron con ANOVA bidireccional, seguida por la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

4.3 Resultados y Discusión de la estandarización de la cuantificación de los BI

4.3.1 Tiempo óptimo para la adquisición de las imágenes del modelo animal

La Figura 4.2 muestra las curvas de crecimiento tumoral para el grupo piloto. El comportamiento observado de estas curvas fue característico del número de células inoculadas (3×10^6); para cantidades mayores de células (6×10^6 , por ejemplo) se podría observar una meseta en estas curvas (127). Se observó que tanto el volumen tumoral como el tiempo de desarrollo del tumor dependen del huésped a pesar de que en todos los casos se inyectó la misma concentración de células. Se observó también que alrededor de los 14 DPI se obtuvo el máximo volumen para 5 de los 8 tumores evaluados y un volumen similar para los otros 3 tumores (volumen promedio \pm desviación estándar = $951.0 \pm 290.7 \text{ mm}^3$), de modo que se eligió este tiempo para la adquisición de las imágenes en estudios posteriores con el modelo para evaluar la asociación entre BI y BH de angiogénesis.

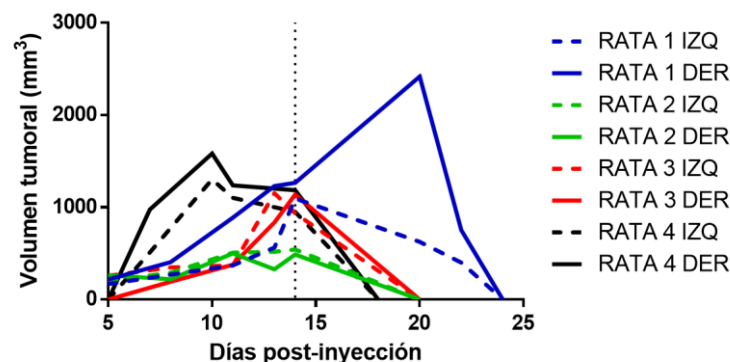


Figura 4.2 Curvas de crecimiento tumoral para el grupo piloto del modelo subcutáneo de glioma con células C6. Se inyectaron 3×10^6 células en dos flancos contralaterales de cuatro ratas Wistar macho y se midió el volumen tumoral a partir de los 5 días post-inyección.

4.3.2 Estandarización de la administración del medio de contraste clínico

A continuación, se describe brevemente el procedimiento que se estandarizó para la infusión continua del medio de contraste clínico para los estudios SE y DCE, el cual se basó en la cateterización de la vena yugular externa derecha de los animales descrita en la referencia (119). Se usó un catéter compuesto por 10 cm de tubo PE10 de grado médico (Scientific Commodities Inc., Catálogo: BB31695-PE/1), acoplado a un tubo PE50 de 90 cm de largo (Scientific Commodities Inc., Catálogo: BB31695-PE/3). Esta longitud fue la mínima requerida debido a la longitud de la camilla del equipo de imagen.

Durante la cirugía, se mantuvo al animal bajo anestesia con isoflurano (3-4% en 100% de oxígeno). Una vez anestesiado, se rasuró y limpió el área anterior del cuello y se le colocó en posición supina sobre la mesa de cirugía (encima de una placa térmica cubierta con papel absorbente), fijando sus patas a la mesa, como se puede ver en la Figura 4.3 (a). Se realizó una pequeña incisión sobre la piel con el bisturí, 2 cm a la derecha de la línea media del cuello y a la altura de la clavícula. Con una pinza hemostática, se disectó el músculo hasta encontrar la vena yugular. Se expuso la vena usando una pinza y se retiró la capa de tejido conjuntivo que la cubría. Se colocaron dos ataduras de hilo de seda sueltas alrededor de la vena, una en el extremo craneal y otra en el caudal. Con una tijera para microcirugía se hizo un corte en la parte central de la longitud expuesta de la vena y se introdujo el catéter con ayuda de pinzas. Una vez que el catéter se colocó dentro de la vena (1.5 cm, aproximadamente), se aseguraron ambas ataduras para fijarlo. Se cerró la incisión con los puntos necesarios y se fijó el catéter al hombro del animal con cinta adhesiva.

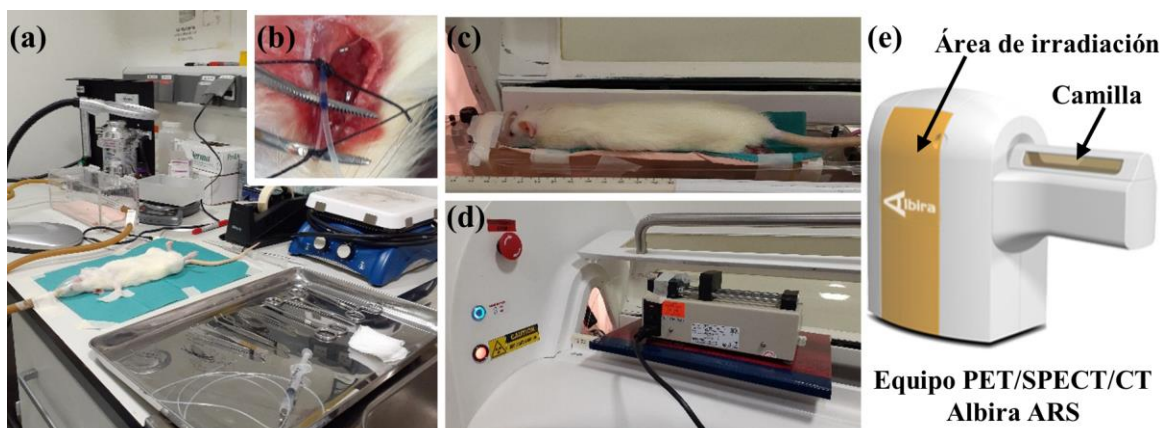


Figura 4.3 (a) Preparación del animal para la cirugía de cateterización previa a la adquisición de imágenes SE y DCE. (b) Inserción del catéter heparinizado en la vena yugular externa derecha del animal. (c) Después de la cirugía, se colocó al animal en la camilla para iniciar el estudio de imagen. (d) La bomba de infusión se colocó sobre el riel de la camilla. (e) Vista del equipo PET/SPECT/CT Albira ARS usado para la adquisición de las imágenes de rayos X realizadas por contraste en este trabajo. Se indican la posición de la camilla y la zona de irradiación.

En la Figura 4.3 (a) se muestra la preparación del animal para la cirugía y en la Figura 4.3 (b), la inserción del catéter heparinizado en la vena yugular externa derecha. Las marcas azules en el catéter corresponden a las longitudes de 1 cm y 1.5 cm y sirvieron de guía para insertar la longitud correcta del catéter y no dañar al animal. En la Figura 4.3 (c) se muestra al animal colocado sobre la camilla del equipo de imagen, posterior a la cirugía de cateterización y listo para iniciar la adquisición de las imágenes. En la Figura 4.3 (d) se

aprecia que la camilla junto con el animal ha avanzado a la posición de irradiación dentro del equipo blindado (a la izquierda de la entrada triangular) y en su lugar ha quedado colocada la bomba de infusión. La bomba de infusión ya contiene la jeringa con la dosis de yodo adecuada para este animal y ya se programó la velocidad de infusión adecuada para la duración del estudio. La adquisición de las imágenes I_{basal} (sin medio de contraste) e I_{MC} (durante la infusión continua del medio de contraste) se programó de manera consecutiva en el equipo, con solo 20-25 segundos de diferencia entre ellas. Es decir, es en este lapso de 20 s entre imágenes cuando se debe manipular la bomba de infusión para iniciar la infusión continua del medio de contraste. Por esta razón fue necesario que la longitud del catéter fuera larga (1 m, aproximadamente), para permitir la operación de la bomba de infusión desde fuera del área de irradiación del equipo, lo cual es sumamente importante desde el punto de vista de la seguridad radiológica para evitar la exposición y dosis de radiación innecesarias a los operadores del equipo. La Figura 4.3 (e) muestra una vista del equipo, en la cual se aprecia la camilla (con la ventana cerrada) y se indica la ubicación del área de irradiación dentro de la carcasa blindada del equipo.

4.3.3 Determinación de la dosis de medio de contraste preclínico

Para determinar la dosis de yodo con el medio de contraste Fenestra VC para el protocolo DE, se evaluaron cuatro dosis de yodo en el grupo piloto de animales y se adquirieron imágenes HE antes y después de la inyección del medio de contraste. En la Figura 4.4 se muestra la evaluación del realce en varios VOI, entre ellos bazo, hígado, músculo, riñón, aorta abdominal y la periferia tumoral. Se observó un alto realce en hígado y bazo, con realces mayores para las dosis de 0.3 y 0.4 mg I/g de peso. En músculo y riñón prácticamente no se observaron cambios, considerando la desviación estándar mostrada en las gráficas. En aorta y periferia tumoral se observó un alto realce a los 10 min post-inyección, y en la periferia tumoral este realce se mantuvo durante el tiempo evaluado. De acuerdo con estos resultados, se seleccionó la dosis de 0.4 mg I/g de peso corporal para el protocolo DE. Esta dosis equivale a la dosis mínima de este medio de contraste para ratas recomendada por el fabricante; el volumen de inyección correspondiente se encuentra por debajo del límite para la infusión continua de sustancias vía intravenosa en ratas, lo cual favorece el bienestar de los animales y evita la perturbación de sus parámetros hemodinámicos (122,123).

En la Tabla 4.1 se resumen los procedimientos y parámetros necesarios para la adquisición de imágenes de rayos X realizadas por contraste con los protocolos SE, DE y DCE. Estos procedimientos y parámetros fueron el resultado tanto de la optimización de los parámetros radiológicos que se presentó en el Capítulo 3, como de la estandarización que se presentó en esta sección. Las dos imágenes requeridas en cada protocolo se programaron de manera consecutiva para facilitar la alineación de las estructuras entre una imagen y otra, tomando en cuenta que se realizó la resta entre ellas. Esto permitió un lapso de 20-25 s entre el fin de la adquisición de la primera imagen y el inicio de la segunda. Para los protocolos SE y DCE, en ese lapso debe iniciarse la operación de la bomba de infusión; mientras que en el protocolo DE, en ese lapso debe retirarse el filtro de molibdeno que se colocó a la salida del tubo de rayos X al inicio (como preparación previa a la adquisición de la primera imagen). Como se puede apreciar en la Tabla 4.1, se requiere de una adecuada coordinación y organización para que la adquisición de las imágenes con estos protocolos sea exitosa.

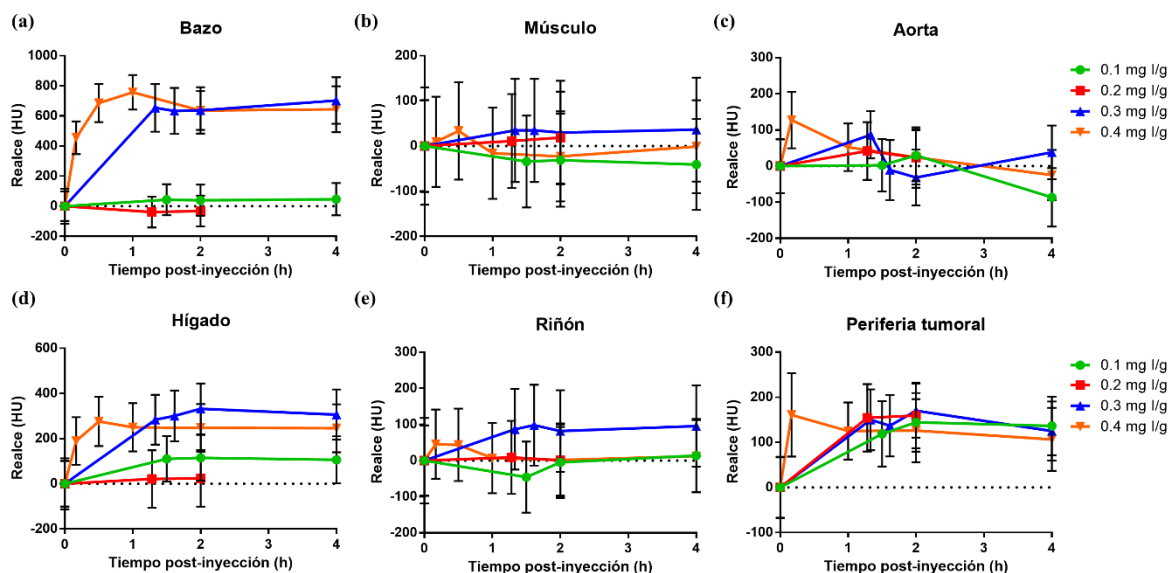


Figura 4.4 Evaluación del realce en función del tiempo post-inyección del medio de contraste preclínico Fenestra VC para cuatro dosis de yodo diferentes. El realce se cuantificó en: (a) bazo, (b) músculo, (c) aorta abdominal, (d) hígado, (e) riñón y (f) periferia tumoral.

Tabla 4.1 Procedimientos y parámetros optimizados y estandarizados para la adquisición de imágenes de rayos X realizadas por contraste con los protocolos SE, DE y DCE.

Procedimiento	SE	DE	DCE
Previo a la imagen 1	Cateterizar la vena yugular externa derecha del animal. Programar la inyección en la bomba de infusión.	Inyectar el medio de contraste 10 min antes: 0.4 mg I/g, Fenestra VC. Colocar el filtro de Mo a la salida del tubo de rayos X.	Cateterizar la vena yugular externa derecha del animal. Programar la inyección en la bomba de infusión.
Imagen 1	Basal: 45 kV, 0.8 mA, 400 proyecciones	HE: 45 kV + 0.025 mm Mo, 0.8 mA, 250 proyecciones	Basal: serie de 180 imágenes, 45 kV, 0.8 mA, 1000 proyecciones
Lapso de 20 s previo a la imagen 2	Iniciar infusión continua: 2.4 mg I/g, Omnipaque 300	Remover el filtro de Mo antes de que inicie la siguiente adquisición	Iniciar infusión continua: 1.2 mg I/ml, Omnipaque 300
Imagen 2	MC: 45 kV, 0.8 mA, 400 proyecciones	LE: 30 kV, 0.8 mA, 250 proyecciones	MC: serie de 180 imágenes, 45 kV, 0.8 mA, 1000 proyecciones.
Finalización del estudio	Apagar bomba de infusión. Removerla del riel de la camilla.		Apagar bomba de infusión. Removerla del riel de la camilla.

4.3.4 Registro y resta de las imágenes

La evaluación cualitativa del desempeño del algoritmo de registro en imágenes SE, DE y DCE del grupo piloto del modelo animal, adquiridas con los protocolos optimizados y estandarizados de la Tabla 4.1, se muestra en Figura 4.5, Figura 4.6 y Figura 4.7. Se observó que el registro tuvo un mayor impacto en las imágenes DCE que en las SE y DE ya

que las primeras son imágenes bidimensionales (con muchas estructuras superpuestas) y se adquieren con una alta resolución temporal (1 imagen/s), de modo que la respiración y el latido cardiaco pueden ocasionar artefactos en las imágenes restadas si no se realiza el registro.

En la Figura 4.5 se muestran los resultados de esta evaluación para dos tiempos de adquisición de las imágenes DCE: al inicio del estudio e inicio de la inyección del medio de contraste ($t = 0$ s), y durante la inyección continua del medio de contraste ($t = 15$ s). Se observó que se eliminaron varias estructuras óseas en las imágenes DCE restadas y registradas, lo cual mostró el buen desempeño del algoritmo de registro usado. Las flechas amarillas en la Figura 4.5 indican la vena yugular derecha donde se realizó la infusión continua del medio de contraste y que se ilumina de blanco en las imágenes restadas, indicando la acumulación del medio de contraste.

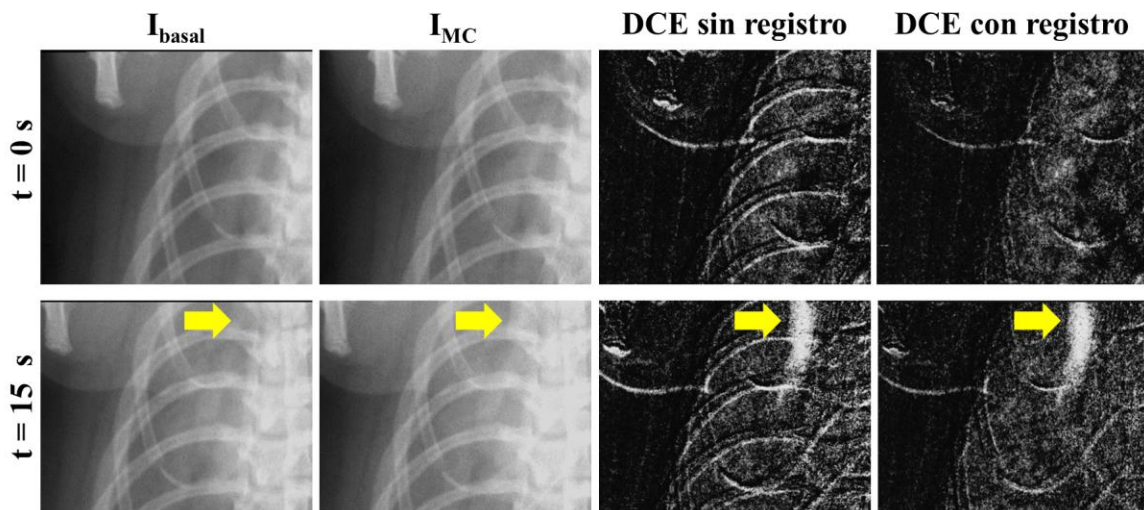


Figura 4.5 Evaluación cualitativa del desempeño del algoritmo afín para el registro de las imágenes basal (I_{basal}) y con medio de contraste (I_{MC}) previo a la resta DCE. Panel superior: imágenes adquiridas al inicio del estudio ($t = 0$ s). Panel inferior: imágenes adquiridas durante la infusión continua del medio de contraste. Las flechas amarillas indican la vena yugular derecha.

Las imágenes registradas y restadas SE, DE y DCE se muestran en la Figura 4.6 y Figura 4.7. En estas imágenes se aprecia que los medios de contraste usados permiten realzar algunos órganos, como los riñones, el corazón, el bazo e hígado. Adicionalmente, se observa el buen desempeño del algoritmo de registro ya que permitió eliminar la mayoría de las estructuras óseas en la imagen SE y DCE. En el caso de la imagen DE, la eliminación de las estructuras depende fuertemente del valor del factor de ponderación α considerado para la resta.

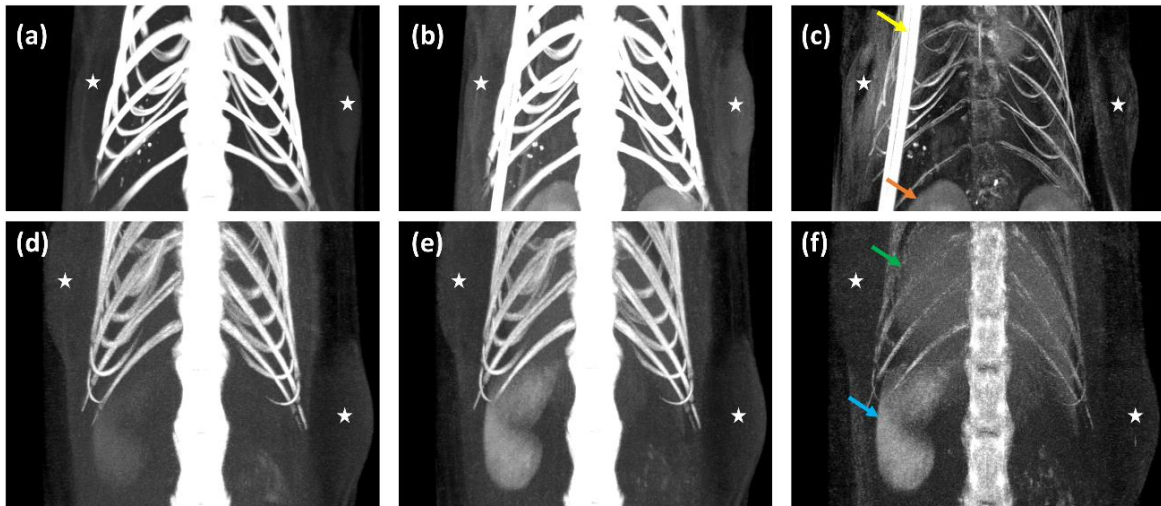


Figura 4.6 Proyecciones de máxima intensidad (MIP) de las imágenes tridimensionales adquiridas con el protocolo SE: (a) imagen basal, (b) imagen adquirida durante la infusión continua del medio de contraste clínico, y (c) imagen restada SE. Proyecciones MIP de las imágenes tridimensionales adquiridas con el protocolo DE: (d) LE y (e) HE adquiridas 12 min post-inyección del medio de contraste preclínico, y (f) imagen restada DE. Las estrellas indican la ubicación de los tumores; las flechas señalan al catéter (amarilla), riñón (naranja), hígado (verde) y bazo (azul).

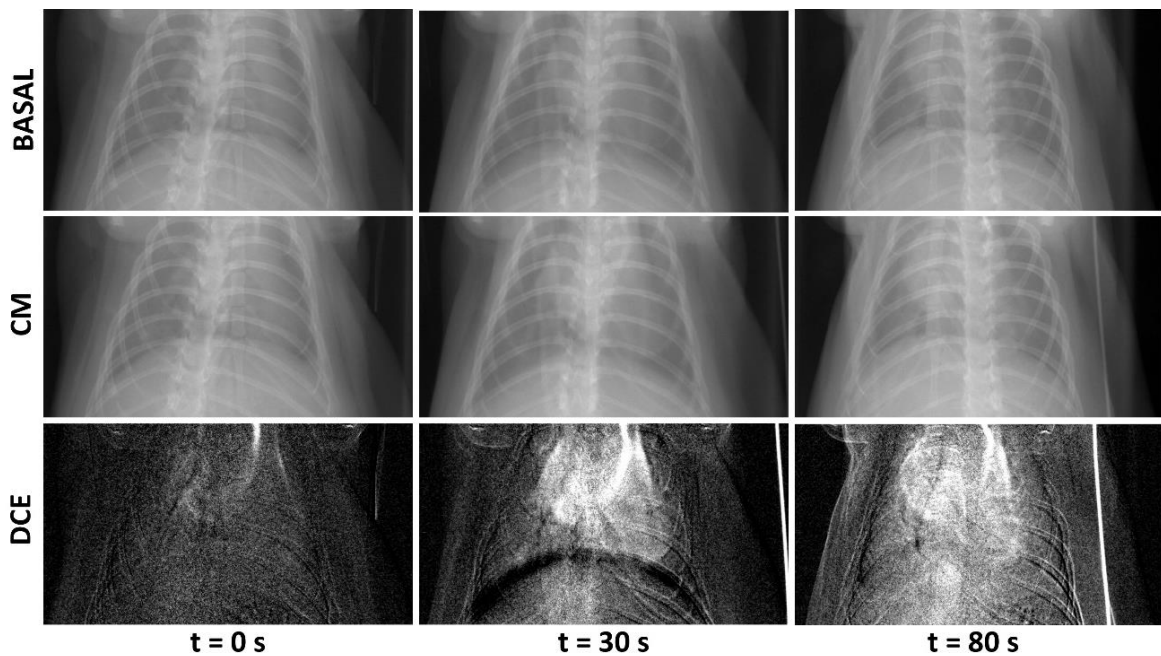


Figura 4.7 Imágenes bidimensionales del tórax del animal adquiridas con el protocolo DCE para tres tiempos de adquisición: basales, en el panel superior; durante la administración continua del medio de contraste clínico (CM), en el panel medio; e imágenes restadas DCE, en el panel inferior.

4.3.5 Parametrización de las imágenes en concentración de yodo

Se obtuvieron relaciones lineales entre C_I y el realce en las imágenes SE, DE y DCE, como se muestra en la Tabla 4.2 y en la Figura 4.8. En todos los casos se obtuvieron relaciones lineales con $R^2 > 0.97$. El factor de ponderación para la resta DE fue: $\alpha = 0.42$

(agua), $\alpha = 0.55$ (resina con 0 mg I/ml), y $\alpha = 0.67$ (músculo). Con estas funciones será posible transformar el realce en las imágenes SE, DE y DCE en valores de C_I .

Tabla 4.2 Funciones de calibración para transformar el realce en las imágenes SE, DE y DCE en valores de concentración de yodo (C_I): $C_I = m \cdot \text{Realce} + b$, con m = pendiente, b = ordenada.

Protocolo de imagen	m (mg I/ml HU ⁻¹)	b (mg I/ml)	R^2
SE	0.0230 ± 0.0014	-0.0953 ± 0.1037	0.9923
DE ($\alpha = 0.42$)	0.0320 ± 0.0034	0.4692 ± 0.1411	0.9771
DE ($\alpha = 0.55$)	0.0310 ± 0.0021	0.1281 ± 0.1036	0.9907
DE ($\alpha = 0.67$)	0.0382 ± 0.0035	-1.2230 ± 0.2418	0.9831
DCE	0.0107 ± 0.0003	0.2357 ± 0.0427	0.9983

Los valores en la tabla se indican como promedio \pm desviación estándar.

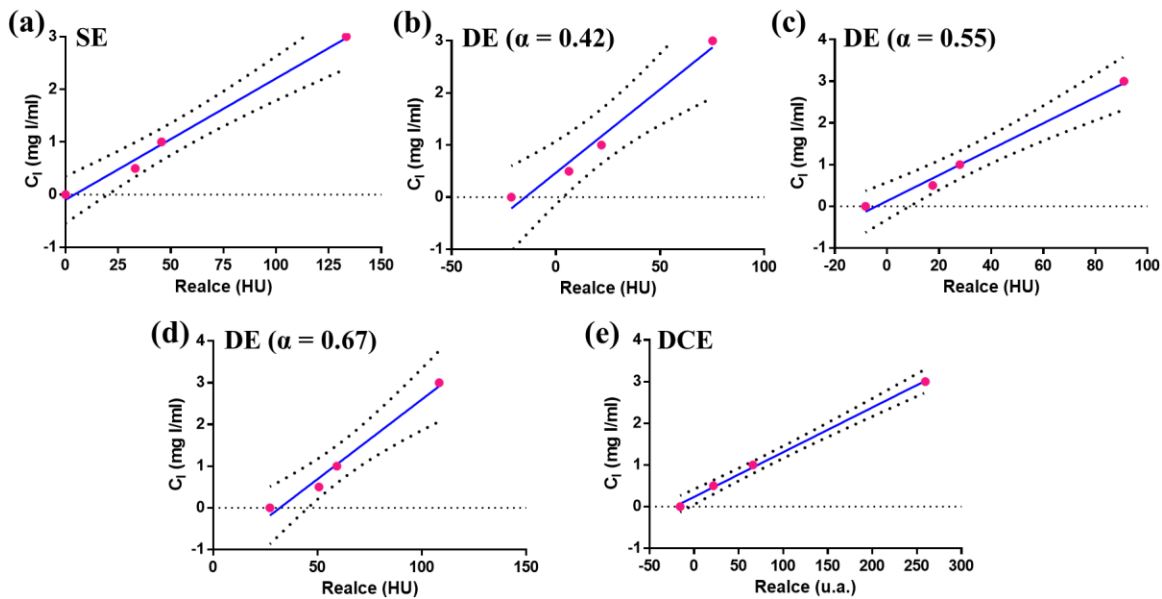


Figura 4.8 Funciones de calibración entre C_I y el realce para imágenes restadas (a) SE, (b) DE con $\alpha = 0.42$ (agua), (c) DE con $\alpha = 0.55$ (resina con 0 mg I/ml), (d) DE con $\alpha = 0.67$ (músculo), y (e) DCE. Se indican los valores medidos (círculos), las líneas de regresión (línea sólida) y los intervalos de confianza del 95% para la regresión (líneas punteadas).

4.3.6 Factor de ponderación para la resta DE

Se usaron tres factores de ponderación $\alpha = 0.42$ (agua), $\alpha = 0.55$ (resina con 0 mg I/ml), y $\alpha = 0.67$ (músculo) para obtener imágenes DE de un animal del grupo piloto. En las imágenes DE se cuantificó el realce en músculo. Posteriormente, las imágenes se convirtieron en valores de C_I usando las funciones de calibración de la Tabla 4.2, y se cuantificó C_I en músculo y la parte abdominal de la aorta; se calculó el rBV en músculo con estos datos, usando la ecuación 1.3. Los valores promedio de esta cuantificación se muestran en la Tabla 4.3 para los tres factores de ponderación evaluados. Se obtuvo la imagen SE para otro animal del grupo y se cuantificaron el realce, C_I y rBV del músculo, siguiendo el mismo procedimiento que para DE; los valores promedio se muestran en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3 Cuantificación del realce, C_I y rBV en músculo con los protocolos SE y DE.

BI	DE ($\alpha = 0.42$)	DE ($\alpha = 0.55$)	DE ($\alpha = 0.67$)	SE
Realce (HU)	53.2 ± 21.1*	21.5 ± 11.8	-7.7 ± 3.3*	35.0 ± 21.2
C_I (mg I/ml)	2.2 ± 0.7	0.7 ± 0.3	-1.5 ± 0.1	0.7 ± 0.4
rBV (%)	44.1 ± 13.7*	10.7 ± 9.1	-38.5 ± 3.3*	11.1 ± 3.3

Los valores en la tabla se indican como promedio ± desviación estándar. * $p < 0.05$ indica una diferencia significativa con los valores SE, evaluado con ANOVA bilateral y seguido de prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.

La Figura 4.9 muestra los BI cuantificados en músculo con las imágenes DE y SE, indicados en la Tabla 4.3. Los valores obtenidos de la imagen SE se usaron de referencia para seleccionar el valor de α que proporcionó valores similares de los tres BI. Como se observa en la Figura 4.9, tanto para el realce como para rBV el factor $\alpha = 0.55$ proporcionó valores más cercanos a los de la imagen SE. Para la C_I no se observó una diferencia significativa entre los 3 valores de α y los valores SE. Por lo tanto, se seleccionó el valor de $\alpha = 0.55$ para realizar las restas DE en este modelo animal.

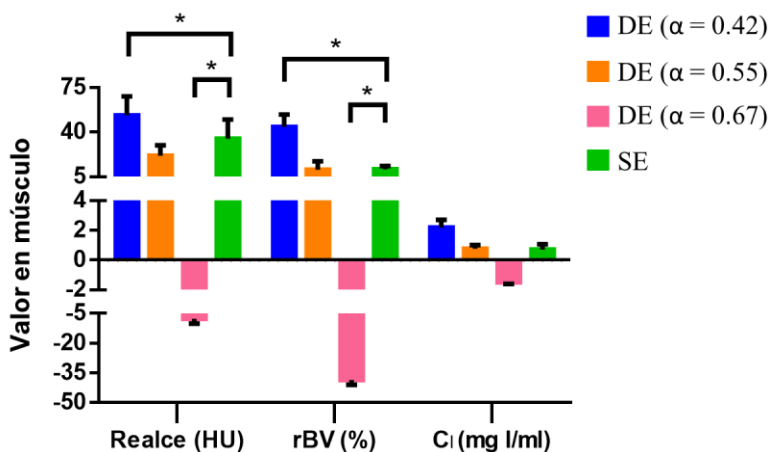


Figura 4.9 Valor en músculo de tres BI (realce, rBV, C_I) cuantificados en imágenes SE y DE (con tres valores del factor de ponderación, α). * $p < 0.05$ indica una diferencia significativa con los valores SE, evaluado con ANOVA bilateral, seguido de prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.

4.3.7 Análisis de imágenes DCE con el método de Patlak

En la Figura 4.10 (a) se muestran las curvas tiempo- C_I para el ventrículo izquierdo (VI, definido como la AIF en este análisis) y el músculo, obtenidas de imágenes DCE parametrizadas en valores de C_I de un animal del grupo piloto del modelo de glioma. En la Figura 4.10 (b) se muestra el análisis de Patlak de las curvas tiempo- C_I del VI y músculo, en donde $X = \int_0^T C_a(t)dt/C_a(t)$ y $Y = C_t(t)/C_a(t)$, como se define en la ecuación 1.7. Se graficaron X vs. Y y se realizó un análisis de regresión lineal a los datos correspondientes al intervalo 30-80 s. Los datos del intervalo 0-30 s no se añadieron al análisis de regresión debido a que no satisfacen la suposición teórica del intercambio unidireccional del análisis de Patlak (i.e., un compartimento irreversible), ya que representan el primer paso del medio de contraste del espacio intravascular al espacio extravascular (antes de alcanzar el equilibrio) (53,54).

Se obtuvo un coeficiente de regresión $r^2 = 0.7649$; la pendiente de la recta ajustada es igual a la constante de transferencia de volumen: $K^{\text{trans}} = 0.0021 \text{ s}^{-1}$, y la ordenada al origen, al volumen de sangre relativo: $r\text{BV} = 6.96\%$. Este valor de $r\text{BV}$ para el músculo cuantificado en imágenes DCE es similar a los valores reportados en la Tabla 4.3 obtenidos a partir de imágenes SE, lo cual sugiere que el análisis de Patlak es adecuado para la cuantificación de los BI con el protocolo DCE. En la Tabla 4.4 se presenta un resumen de los procedimientos y métodos de análisis estandarizados en este capítulo para la cuantificación de los BI en imágenes SE, DE y DCE.

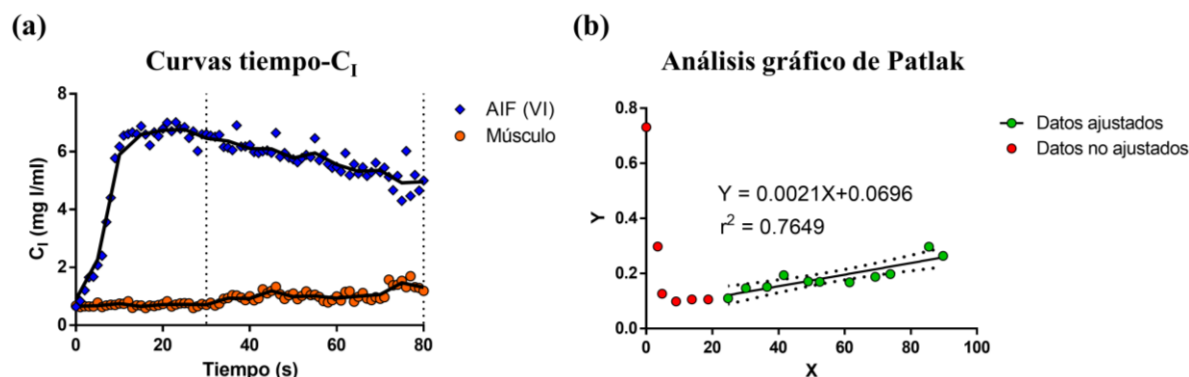


Figura 4.10 Implementación del análisis gráfico de Patlak para la cuantificación del $r\text{BV}$ y K^{trans} en imágenes DCE. (a) Curvas tiempo- C_1 para el ventrículo izquierdo (AIF) y el músculo. (b) Se usaron los datos 30-80 s para realizar el análisis gráfico.

Tabla 4.4 Procedimientos y métodos de análisis para la cuantificación de los BI en imágenes de rayos X realizadas por contraste con los protocolos SE, DE y DCE.

Procedimiento	SE	DE	DCE
Preparación de las imágenes	Reconstrucción (SIRT 2D) y calibración a HU	Reconstrucción (SIRT 2D) y calibración a HU	Extracción de las proyecciones (180 imágenes por serie)
Registro afín de las imágenes	Origen: imagen basal (I_{basal}) Destino: imagen con medio de contraste (I_{MC})	Origen: imagen de baja energía (LE) Destino: imagen de alta energía (HE)	Origen: imagen basal (I_{basal}) Destino: imagen con medio de contraste (I_{MC})
Resta (imagen de realce)	$SE = I_{\text{basal}} - I_{\text{MC}}$	$DE = HE - \alpha LE$ ($\alpha = 0.55$)	$DCE(t) = I_{\text{basal}}(t) - I_{\text{MC}}(t)$
Calibración en valores de C_1	$C_1 = 0.023SE - 0.0953$	$C_1 = 0.0319SE + 0.1281$ (para $\alpha = 0.55$)	$C_1(t) = 0.0107DCE(t) + 0.2357$
Cuantificación de $r\text{BV}$ y K^{trans} en diferentes VOI	$r\text{BV} = 100 \frac{C_{1,\text{VOI}}}{C_{1,\text{AIF}}} \%$ AIF = aorta abdominal	$r\text{BV} = 100 \frac{C_{1,\text{VOI}}}{C_{1,\text{AIF}}} \%$ AIF = aorta abdominal	$Y = K^{\text{trans}}X + r\text{BV}$ Patlak: $X = \int_{T_1}^{T_2} C_{\text{AIF}}(t) dt / C_{\text{AIF}}(t)$ $Y = C_{\text{VOI}}(t) / C_{\text{AIF}}(t)$ AIF = ventrículo izquierdo, $T_1 = 30 \text{ s}$, $T_2 = 80 \text{ s}$.

4.3.8 Desempeño técnico de la concentración de yodo como biomarcador de imagen

Se cuantificó por triplicado la C_I en dos réplicas de imágenes SE, DE y DCE de las resinas yodadas, y el promedio de cada triplicado (valor medido promedio) se analizó como función de los valores nominales de C_I . Los resultados de estas mediciones se muestran en la Figura 4.11 (a); se encontró que la C_I medida por los diferentes protocolos de imagen fue similar a su respectivo valor nominal. Se evaluó la relación entre C_I medida y C_I nominal para cada protocolo de imagen, como se observa en la Figura 4.11 (b)-(d). Se encontraron relaciones lineales para cada protocolo, ya que se obtuvieron $\beta_2 < 0.5$ (coeficiente del término de 2° orden del polinomio ajustado de grado 2), pendiente $\beta_1 = 0.99$ (coeficiente del término de 1er orden del polinomio ajustado de grado 1) y $R^2 > 0.9$, en todos los casos. Se identificó también la presencia de un sesgo constante; el menor fue para el protocolo SE (0.08 mg I/ml) y el mayor, para el protocolo DE (0.16 mg I/ml).

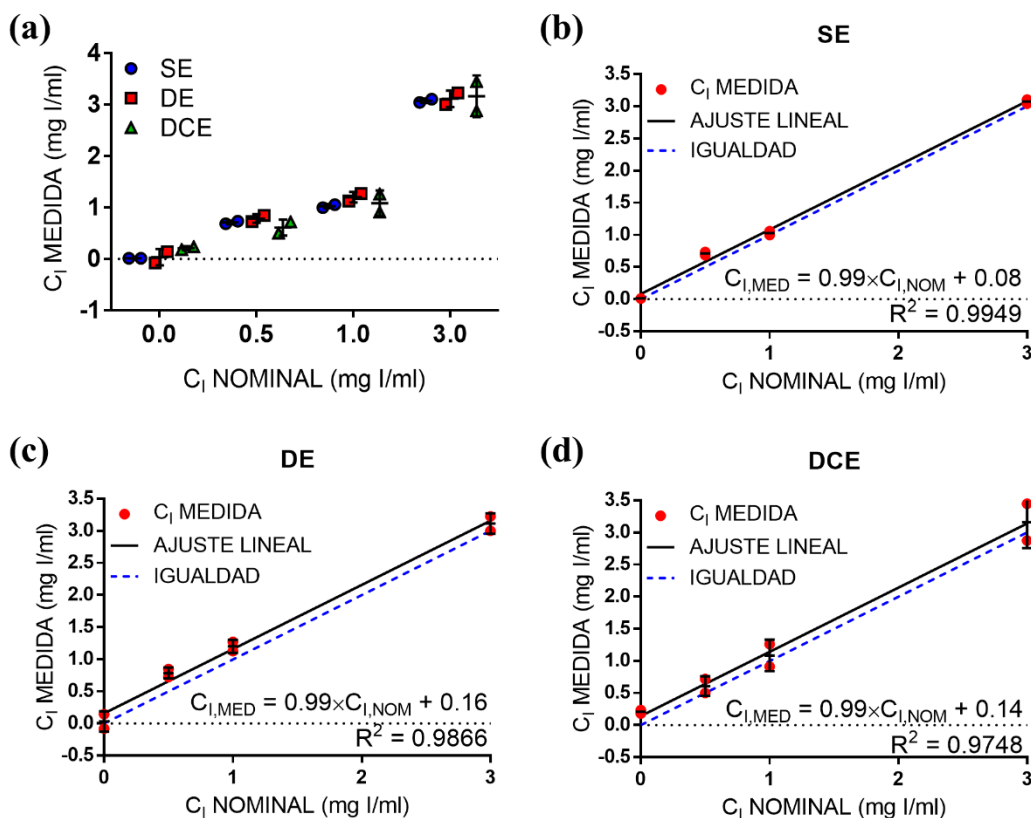


Figura 4.11 Evaluación de la relación entre los valores medidos y los valores nominales de C_I en imágenes de las resinas yodadas: (a) comparación de los tres protocolos, (b) SE, (c) DE, (d) DCE.

En la Figura 4.12 (a) se muestra la evaluación del sesgo para cada protocolo de imagen y valor nominal de C_I . El sesgo fue similar para los tres protocolos de imagen; se comprobó que el sesgo promedio fue similar al encontrado en las relaciones de linealidad de la Figura 4.11: 0.08, 0.16 y 0.14 mg I/ml para SE, DE y DCE, respectivamente. Estos resultados indicaron que los valores cuantificados de C_I se sobreestiman con respecto de los valores nominales y de manera similar para cada protocolo de imagen, sin embargo, esta sobreestimación es relativamente pequeña, i.e., el sesgo% para $C_I = 3$ mg I/ml, definido

como el sesgo dividido por el valor nominal (37), es 2.5%, 3.8% y 5.4% para los protocolos SE, DE y DCE, respectivamente.

La variabilidad (precisión) se estimó mediante medidas de repetibilidad y reproducibilidad. Las medidas para la evaluación de la repetibilidad se muestran en la Tabla 4.5; en la Figura 4.12 (b) se muestra la gráfica para la wSD. Se encontró que la wSD fue menor para la C_I cuantificada con el protocolo SE, seguida por el protocolo DE y DCE. La wCV y el RC también fueron menores para el protocolo SE. La consecuencia de estos resultados es que, al efectuarse dos medidas consecutivas de la C_I , bajo las mismas condiciones experimentales y en sujetos de estudio similares, el protocolo SE permite una mayor precisión que el protocolo DE y DCE. Para el protocolo DCE, la variabilidad parece depender del valor nominal de C_I .

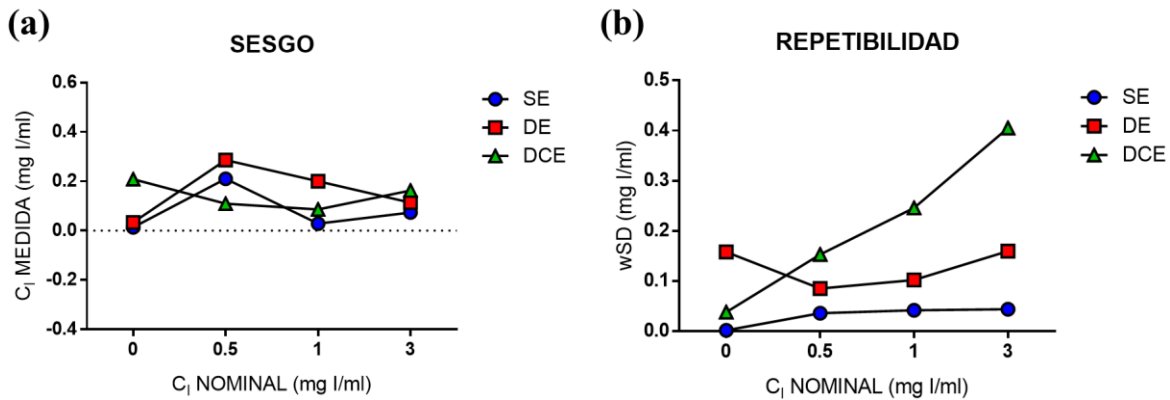


Figura 4.12 Evaluación de (a) sesgo y (b) repetibilidad (desviación estándar intra-sujeto, wSD) de C_I para los protocolos SE, DE y DCE.

Tabla 4.5 Medidas de repetibilidad para C_I cuantificada con los protocolos SE, DE y DCE.

Medida de repetibilidad	wSD (mg I/ml)			wCV			RC (mg I/ml)		
	SE	DE	DCE	SE	DE	DCE	SE	DE	DCE
C_I nominal (mg I/ml)									
0	0.001	0.158	0.037	0.12	4.68	0.18	0.004	0.437	0.105
0.5	0.035	0.085	0.153	0.05	0.10	0.25	0.099	0.235	0.424
1.0	0.041	0.102	0.245	0.04	0.08	0.22	0.115	0.282	0.681
3.0	0.043	0.159	0.405	0.01	0.05	0.12	0.121	0.442	1.122

wSD, desviación estándar intra-sujeto; wCV, coeficiente de variación intra-sujeto; RC, coeficiente de repetibilidad.

En la Tabla 4.6 y en la Figura 4.13 (a) se muestran el límite inferior (-) y superior (+) del intervalo de confianza (IC) del 95% para la C_I cuantificada en estudios de tipo transversal, obtenidos con la expresión $Y(1 \pm 1.96wCV)$. Los LOA representan la diferencia mínima detectable entre dos mediciones consecutivas de C_I (37), es decir, son útiles para estudios de tipo longitudinal; se obtienen con $LOA = [-RC, +RC]$, y RC se indica en la Tabla 4.5. Los IC mostrados en la Figura 4.13 (a) reflejan la menor variabilidad observada para el protocolo SE, mientras que la mayor variabilidad se observó para el protocolo DCE. La definición de estos límites es de utilidad para futuros estudios en los cuales se busque

esclarecer la relevancia clínica de la C_I como un BI bajo condiciones experimentales similares a las usadas en este trabajo.

La evaluación de la reproducibilidad se muestra en la Figura 4.13 (b), en la cual se evaluó el coeficiente de correlación de Pearson al comparar la C_I cuantificada mediante los tres protocolos de imagen estandarizados. Se encontró una correlación fuerte y estadísticamente significativa (r de Pearson > 0.99 , $p < 0.05$, $R^2 > 0.8$) para las tres combinaciones evaluadas: SE vs. DE, SE vs. DCE y DE vs. DCE. Este resultado implica que existe una asociación entre la C_I cuantificada con los diferentes protocolos de imagen. Sin embargo, la cuantificación de la C_I con cada protocolo no es estrictamente equivalente ya que los tres presentan diferentes niveles de sesgo y variabilidad. Para evaluar el acuerdo entre estos protocolos es necesario tomar en cuenta el RDC, el cual se muestra en la Figura 4.13 (b) y representa la diferencia mínima entre dos mediciones repetidas de la C_I realizadas con diferentes protocolos (37). Puede observarse que la diferencia mínima detectable entre protocolos de imagen varía de 0.31 a 0.55 mg I/ml, sin embargo, en nuestro estudio no se tiene como objetivo la combinación de los diferentes protocolos para la evaluación de la C_I .

Tabla 4.6 Límite inferior (-) y límite superior (+) del intervalo de confianza (IC) del 95% para la C_I cuantificada en estudios transversales con los protocolos SE, DE y DCE.

Protocolo	SE		DE		DCE	
	IC 95% (-)	IC 95% (+)	IC 95% (-)	IC 95% (+)	IC 95% (-)	IC 95% (+)
C_I nominal (mg I/ml)						
0	0.010	0.017	-0.276	0.343	0.134	0.283
0.5	0.640	0.781	0.619	0.953	0.309	0.909
1.0	0.946	1.110	1.000	1.400	0.604	1.568
3.0	2.987	3.160	2.800	3.426	2.368	3.957

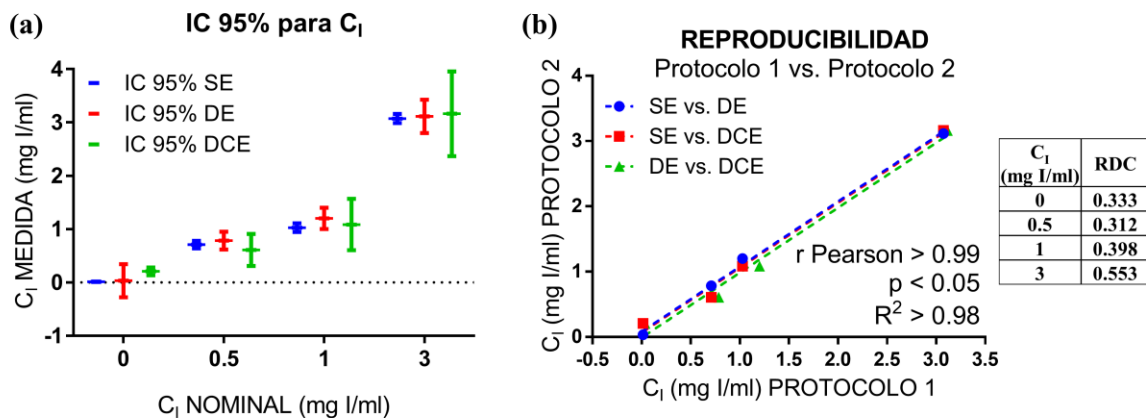


Figura 4.13 (a) Intervalos de confianza (IC) del 95% para C_I cuantificada con los protocolos SE, DE y DCE. (b) Reproducibilidad de C_I cuantificada con dos protocolos de imagen; RDC, coeficiente de reproducibilidad.

Se evaluó la utilidad de los IC 95% definidos en la Tabla 4.6 y mostrados en la Figura 4.13 (a) para la estimación de la C_I en estudios transversales con los protocolos SE, DE y DCE, para lo cual se calibraron en valores de C_I las imágenes restadas del maniquí yodado hecho en el laboratorio (mostradas en la Figura 3.5), usando las funciones de calibración

definidas en la Tabla 4.4. El resultado de esta evaluación (una réplica y tres repeticiones/valor nominal de C_I) se muestra en la Figura 4.14. Se observó que la mayoría de las mediciones de C_I estuvieron dentro de los IC estimados para cada protocolo de imagen. Las excepciones que se observaron para $C_I = 0$ mg I/ml pueden descartarse, ya que generalmente los valores negativos de C_I se toman como iguales a cero.

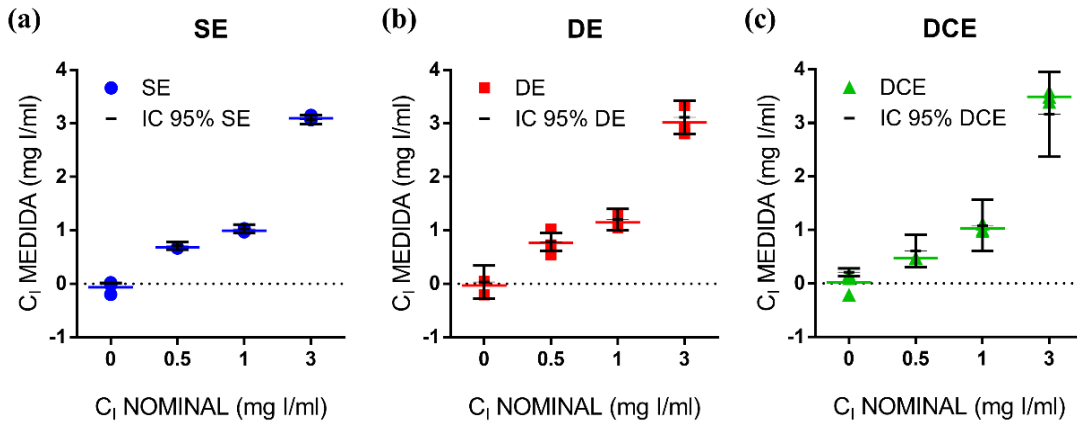


Figura 4.14 Evaluación de la utilidad de los IC 95% para estimar C_I a partir de los protocolos (a) SE, (b) DE y (c) DCE.

Debe hacerse notar que la evaluación del desempeño (o validación técnica) de los BI aún es un área en desarrollo en el ámbito clínico actual, ya que se cuenta con perfiles de sesgo y precisión solamente para algunos de los BI usados rutinariamente en la clínica (34). Esta área ha permanecido inexplorada en el ámbito de la imagen preclínica con rayos X. Hasta donde sabemos, solamente existe un único reporte al respecto, en el cual se evaluó el efecto de un algoritmo de registro de imágenes sobre el sesgo y precisión de un BI (volumen tumoral) cuantificado en imágenes micro-CT de un modelo animal de cáncer de pulmón (128). En este sentido, la validación técnica rigurosa de C_I para los protocolos SE, DE y DCE realizada en este trabajo provee información útil para la evaluación de este BI en el ámbito preclínico, y sienta las bases para futuras validaciones de BI cuantitativos.

4.4 Conclusiones de la estandarización de la cuantificación de los BI

En este capítulo se determinaron y estandarizaron aspectos y procesos clave para la cuantificación de los BI en imágenes SE, DE y DCE del modelo subcutáneo de glioma con células C6. Se determinó el tiempo óptimo para la adquisición de las imágenes, de acuerdo con las características de las curvas de crecimiento de este modelo animal. Se definieron aspectos técnicos y clínicos de la administración del medio de contraste a los animales, como la cateterización de la vena yugular externa derecha para la infusión continua y las dosis de yodo adecuadas.

Con respecto de la cuantificación de los BI, se implementó el uso de un algoritmo validado para el registro de las imágenes antes de restarlas, se obtuvieron las funciones de calibración para transformar las imágenes SE, DE y DCE en valores de C_I , se determinó el factor de ponderación adecuado para la resta DE y se implementó el método de análisis gráfico de Patlak para el análisis de las imágenes DCE.

Se evaluó el desempeño (validación técnica) de C_1 como BI en imágenes SE, DE y DCE, en términos de la relación entre su valor medido y nominal, sesgo, repetibilidad y reproducibilidad. Se encontraron sesgos constantes y positivos, los cuales implicaron una ligera sobreestimación de C_1 con respecto de los valores verdaderos. La precisión de C_1 fue mejor cuando se cuantificó con el protocolo SE que con los protocolos DE y DCE. Se encontraron los límites de su repetibilidad para mediciones consecutivas (bajo las mismas condiciones experimentales y en sujetos de estudio similares) para estudios transversales y longitudinales, así como los límites de su reproducibilidad para mediciones consecutivas usando diferentes protocolos de imagen.

Las estandarizaciones y evaluaciones realizadas en este capítulo permitirán la comparación de los valores de C_1 cuantificados con los protocolos SE, DE y DCE en imágenes del modelo subcutáneo de glioma, dentro de los límites de sesgo y variabilidad identificados para cada protocolo.

5 ASOCIACIÓN ENTRE BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS Y DE IMAGEN

5.1 Introducción

En este capítulo se presenta la realización de los últimos tres objetivos específicos de este trabajo, como se muestra en el esquema de la Figura 5.1. Se cuantificaron los BI (atenuación, realce, C_1 , rBV y K^{trans}) en las diferentes regiones tumorales y órganos de interés del modelo subcutáneo de glioma con células C6, usando los protocolos de imagen SE, DE y DCE optimizados y los métodos de cuantificación estandarizados en los capítulos 3 y 4, respectivamente. Se evaluó de manera cualitativa y cuantitativa la capacidad de estas imágenes de mejorar la visualización de las regiones tumorales al compararlas con el músculo. Se cuantificaron los BH relevantes para el manejo clínico del glioblastoma: porcentaje de necrosis (PN) e índice de proliferación (IP); y el biomarcador surrogado de la angiogénesis: la densidad de microvasos (MVD). Finalmente, se evaluó la asociación entre los BI y BH para este modelo animal.

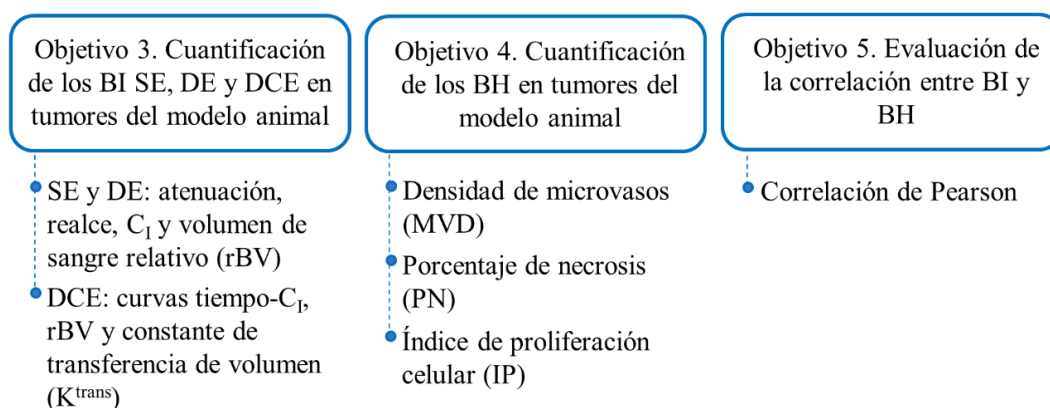


Figura 5.1 Esquema del contenido de este capítulo.

5.2 Métodos

5.2.1 Adquisición de las imágenes del modelo animal de glioma

Se empleó el modelo subcutáneo de glioma con células C6 descrito en la sección 4.2.1, se usaron ratas Wistar macho con un peso promedio de 263 ± 21 g. Las imágenes de los animales se adquirieron a los 14 ± 3 días post-implantación de las células C6, usando el módulo micro-CT del equipo trimodal Albira ARS descrito en la sección 3.2.1 y los

protocolos SE, DE y DCE optimizados y estandarizados que se resumieron en la Tabla 4.1. Para el protocolo SE se usaron 4 animales (n = 8 tumores), 3 animales para el protocolo DE (n = 6 tumores) y 2 animales para el protocolo DCE (n = 4 tumores).

5.2.2 Cuantificación de los biomarcadores en imágenes SE, DE y DCE

Se cuantificaron los BI en imágenes del modelo animal adquiridas con los protocolos SE, DE y DCE, de acuerdo a los métodos definidos en la Tabla 4.4: atenuación, realce, C_I y rBV en imágenes SE y DE, y rBV y K^{trans} en imágenes DCE. Los métodos definidos en la Tabla 4.4 se describen brevemente a continuación.

La atenuación, en HU, se evaluó en imágenes basal y con medio de contraste (MC) para el protocolo SE, y en imágenes LE y HE para el protocolo DE. Las imágenes de realce SE y DE se obtuvieron mediante la resta, después del registro, y luego se convirtieron en valores de C_I , a partir de las cuales se calculó el rBV. Se usó el software Amide (124) para dibujar VOI elipsoidales en las imágenes SE y DE para la cuantificación de los BI en la aorta abdominal, vena cava inferior (VCI), riñón, hígado, bazo, músculo paraespinal y en las regiones tumorales: tumor completo (tumor), tumor central (centro) y periferia tumoral (periferia). El tumor central se definió como un elipsoide con la mitad de las dimensiones lineales del tumor completo. Los BI en la periferia se obtuvieron de promediar cuatro VOI que se colocaron dentro del volumen tumoral pero fuera del tumor central. Todos los VOI se colocaron en la misma posición para cada animal, y se utilizó el mismo tamaño de VOI para un órgano o tejido dado entre todos los animales.

Las imágenes basal y MC obtenidas con el protocolo DCE se registraron y restaron, y la imagen restada se convirtió en valores de C_I usando la función de calibración. Se usó el software ImageJ (126) para cuantificar C_I en VOI dibujadas en el ventrículo izquierdo (VI), músculo y tumor completo, con lo cual se obtuvieron las curvas tiempo- C_I . El análisis de las curvas tiempo- C_I con el método de Patlak se realizó en Matlab R2018b (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA).

5.2.3 Caracterización histológica de los tumores

Los tumores se extirparon inmediatamente después de la adquisición de las imágenes, se colocaron en formol al 10% y se procesaron para su embebido en parafina. Se cortaron secciones tumorales consecutivas de 4 μ m de espesor y se montaron en portaobjetos cargados positivamente. Se realizó la inmunohistoquímica para evaluar el porcentaje de necrosis (PN) en laminillas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). El índice de proliferación (IP) se evaluó con un anticuerpo primario anti-PCNA (sc-56, dilución 1: 500; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EE. UU.). La densidad de microvasos (MVD) se evaluó con un anticuerpo primario anti-CD34 (ab81289, dilución 1:500; Abcam, Cambridge, Reino Unido). La tinción positiva se detectó con el sistema de detección DAB HRP Brown (Bio SB, Santa Barbara, CA, EE. UU.). Los controles negativos correspondieron a la incubación sin anticuerpos primarios; los controles positivos para anti-PCNA y anti-CD34 fueron amígdala humana y tumor vascular, respectivamente. La Figura 5.2 muestra los controles usados para los anticuerpos anti-PCNA y anti-CD34. PN se evaluó como el porcentaje de tejido necrótico contenido en el tumor. IP se estimó como el porcentaje de células positivas a anti-PCNA en el tumor viable. MVD se cuantificó como el valor medio del recuento de vasos en 10 campos de gran aumento (HPF) (12). Se utilizó un

microscopio óptico Nikon ECLIPSE E200 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EE. UU.), con un ocular de 10× y lentes de objetivo de 10× y 40×.

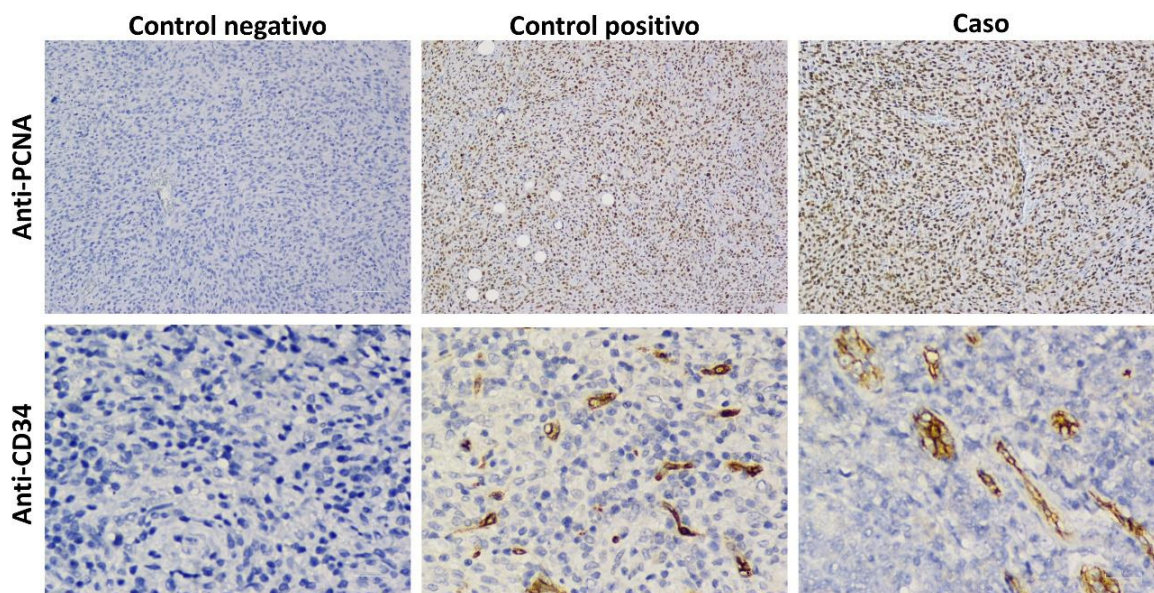


Figura 5.2 Controles negativos y positivos para la evaluación de los anticuerpos anti-PCNA (panel superior, magnificación 100×) y anti-CD34 (panel inferior, magnificación 400×) con la técnica de inmunohistoquímica. Los controles negativos fueron sin anticuerpo, los positivos corresponden a amígdala (anti-PCNA) y tumor vascular (anti-CD34); se muestran casos correspondientes a un tumor con 95% de proliferación celular (anti-PCNA) y 18.3 vasos/HPF (anti-CD34).

5.2.4 Análisis estadístico

Los datos en las gráficas se expresaron como promedio \pm desviación estándar, y los datos de las tablas se expresaron como promedio \pm error estándar de la media. Se utilizó GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE. UU.) para realizar los análisis estadísticos. La atenuación, realce, C_1 y rBV se compararon entre los diferentes protocolos con ANOVA bidireccional y la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los valores de K^{trans} se compararon con una prueba t de Student bilateral. Los parámetros histológicos entre los grupos para cada protocolo de imágenes se compararon con ANOVA de una vía y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se estimó el coeficiente de correlación de Pearson para evaluar la asociación de los BH con los BI. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

5.3 Resultados de este capítulo y Discusión

5.3.1 Evaluación cualitativa de las imágenes SE, DE y DCE

Se muestran diferentes vistas de las imágenes SE, DE y DCE del modelo subcutáneo de glioma con células C6 en Figura 5.3, Figura 5.4 y Figura 5.5, respectivamente. Las imágenes asociadas al protocolo SE mostradas en la Figura 5.3 son: basales (sin medio de contraste), CE (con medio de contraste) y C_1 . Las imágenes asociadas al protocolo DE mostradas en la Figura 5.4 son: de baja energía (LE), alta energía (HE) y C_1 . Las imágenes asociadas al protocolo DCE mostradas en la Figura 5.5 son: basales, CE y C_1 , para tres

tiempos de adquisición. La aorta abdominal, los vasos hepáticos, los riñones y el tumor mostraron un gran realce en las imágenes SE con medio de contraste y esto se observó más marcadamente en las imágenes C_I SE. Las imágenes de la camilla y el hueso se eliminaron de las imágenes C_I SE, demostrando el buen desempeño del algoritmo de registro afín. En las imágenes C_I DE, se observó realce en el tumor, aorta abdominal, bazo e hígado. En las imágenes C_I DCE se muestra una sección del tumor; se observó que el realce del tumor aumentó con el tiempo y que la eliminación del hueso fue más eficaz para la imagen adquirida en $t = 0$ s.

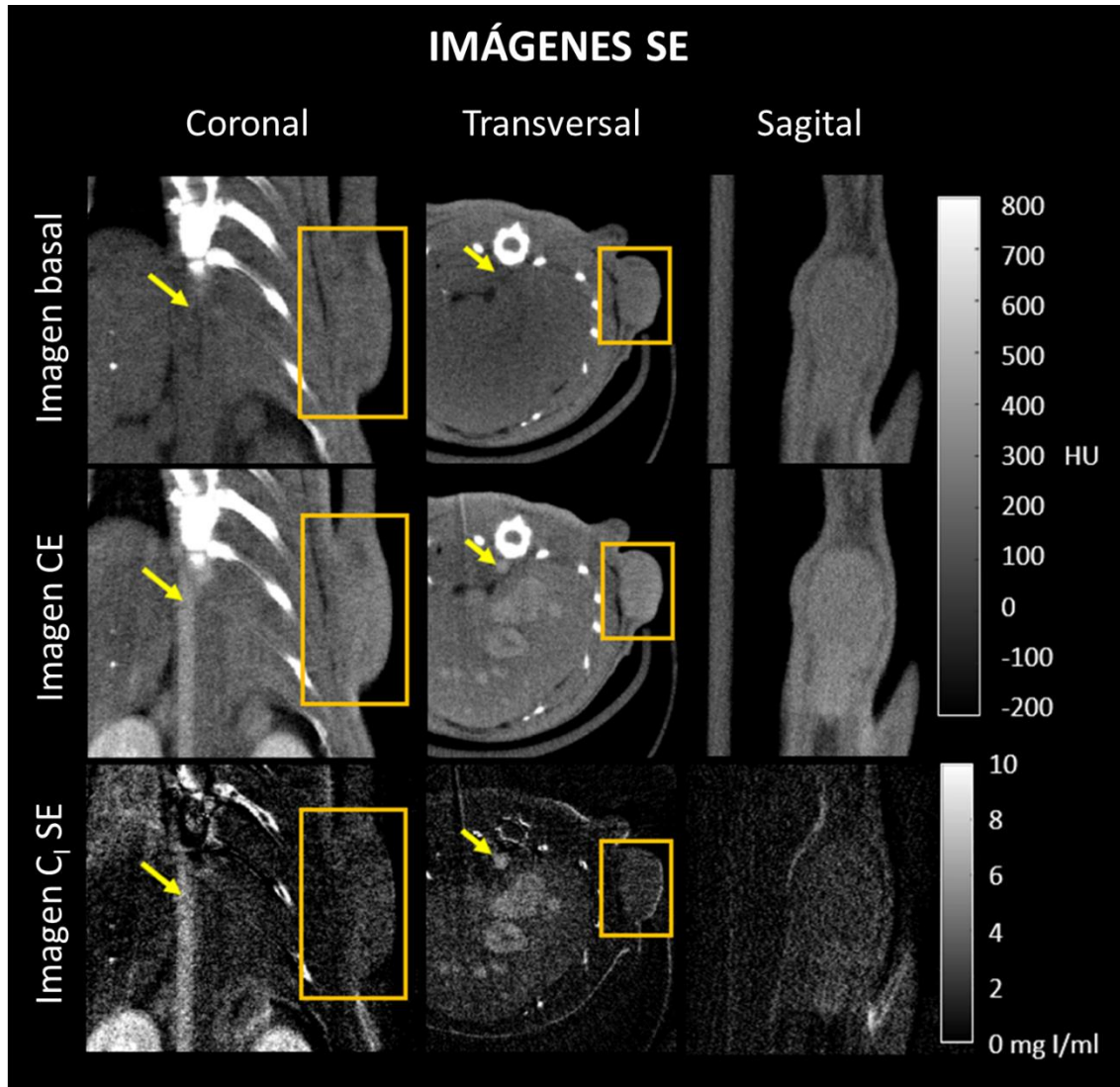


Figura 5.3 Evaluación cualitativa de imágenes SE del modelo animal de glioma. Se muestran vistas coronal, transversal y sagital para una imagen basal, una imagen con medio de contraste (CE) y la imagen parametrizada en valores de C_I . La aorta abdominal y el tumor se indican con una flecha y un rectángulo, respectivamente, en las vistas coronal y transversal. En las vistas sagitales únicamente se muestran los tumores.

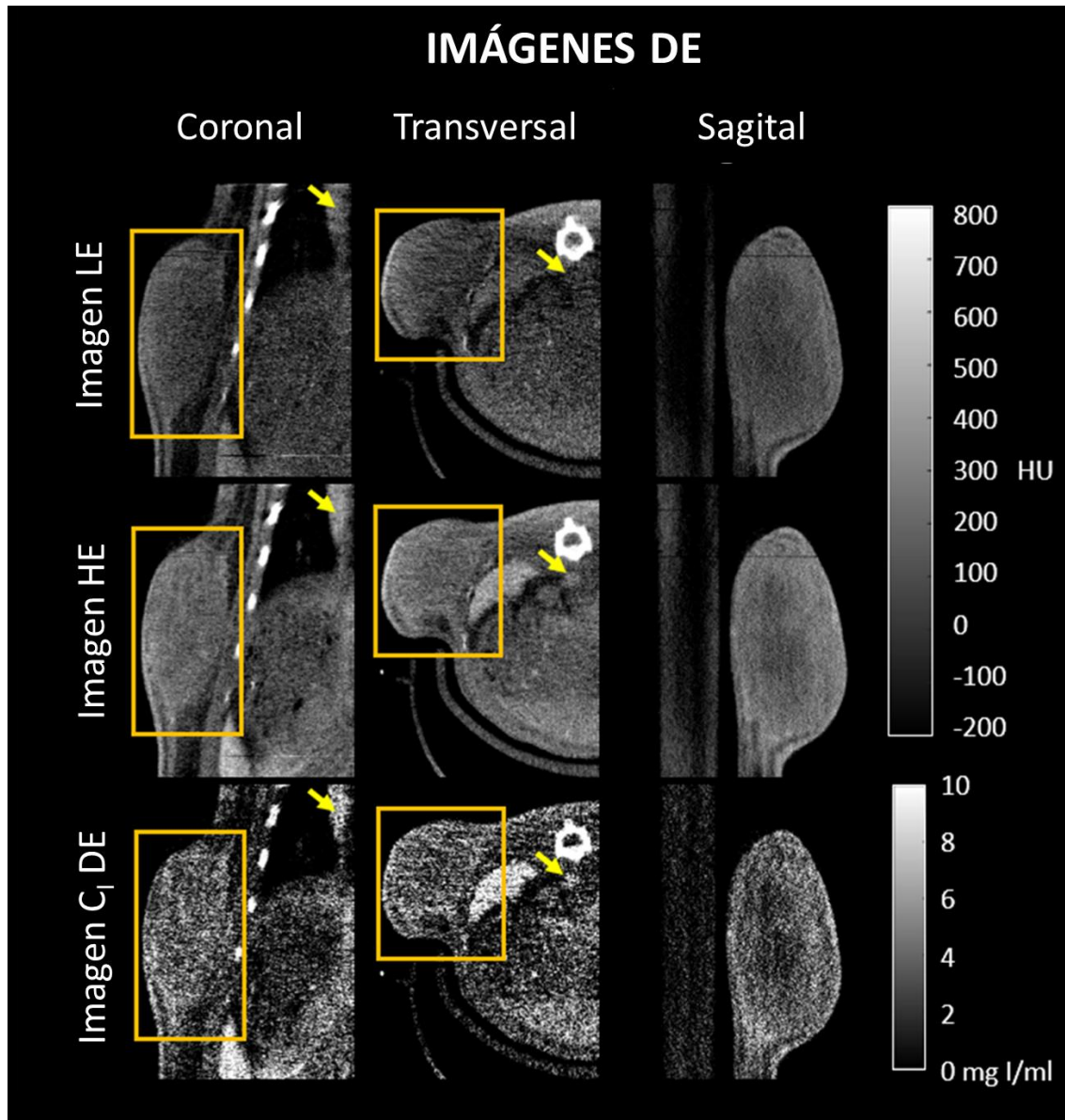


Figura 5.4 Evaluación cualitativa de imágenes DE del modelo animal de glioma. Se muestran vistas coronal, transversal y sagital para una imagen de baja energía (LE), una imagen de alta energía (HE) y la imagen parametrizada en valores de C_1 . La aorta abdominal y el tumor se indican con una flecha y un rectángulo, respectivamente, en las vistas coronal y transversal. En las vistas sagitales únicamente se muestran los tumores.

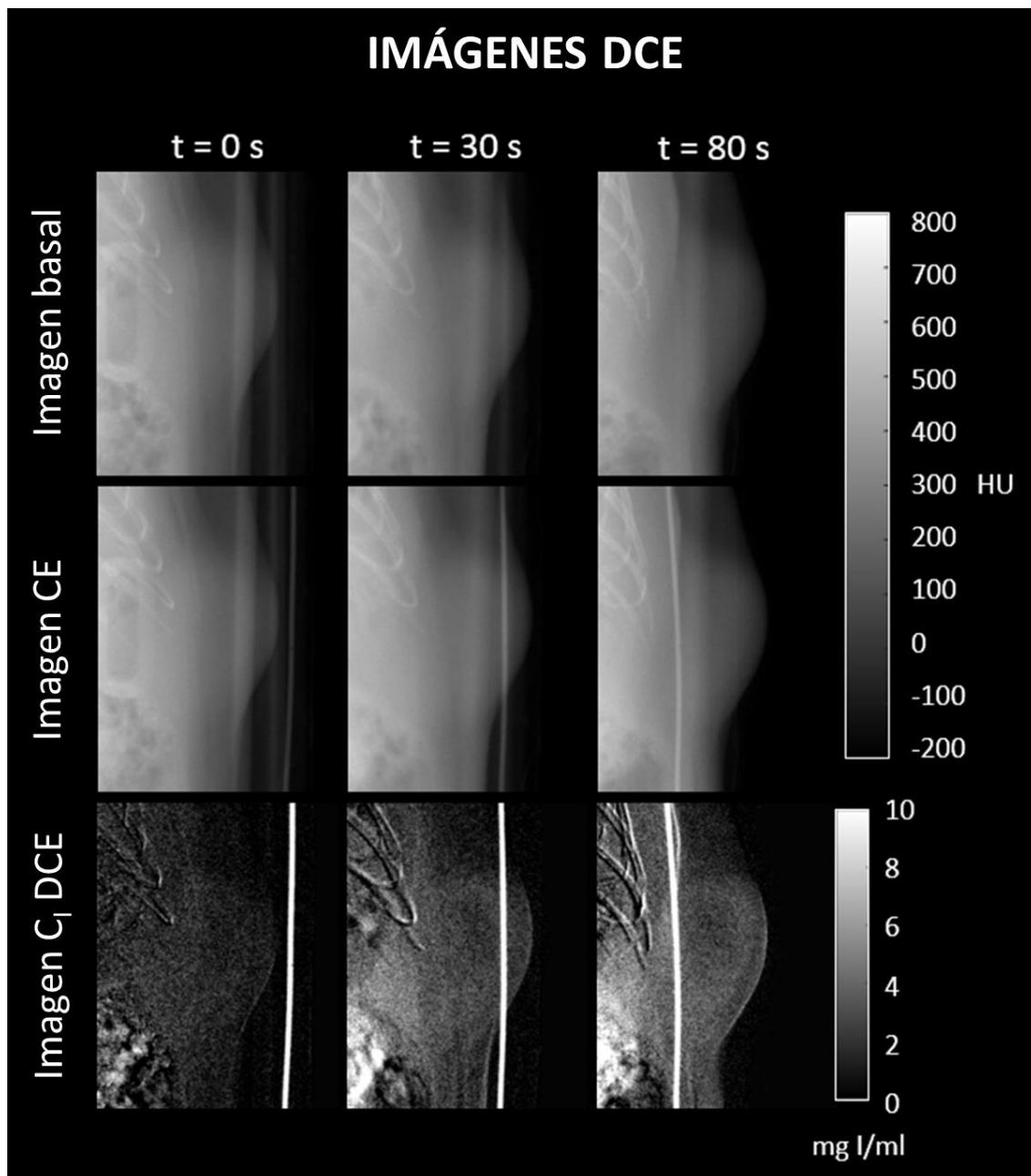


Figura 5.5 Evaluación cualitativa de imágenes DCE del modelo animal de glioma. Se muestran imágenes bidimensionales para una imagen basal (sin medio de contraste), imagen con contraste (CE) y la imagen parametrizada en valores C_1 , para tres tiempos de adquisición (0, 30 y 80 s). Se observa la presencia del catéter utilizado para la administración del medio de contraste en las imágenes CE y C_1 .

5.3.2 Evaluación cuantitativa de las imágenes SE, DE y DCE

La atenuación, en HU, se evaluó en imágenes basales y CE para el protocolo SE, y en imágenes LE y HE para el protocolo DE, para varios VOI, i.e., aorta abdominal, VCI, corteza renal, hígado, bazo, músculo paraespinal y regiones tumorales (tumor completo (tumor), tumor central (centro) y periferia tumoral (periferia)) como se muestra en la Figura 5.6. Las diferencias significativas de los valores de atenuación entre las imágenes basales y CE o entre las imágenes LE y DE se indican con (+) en la Figura 5.6. Para las imágenes

relacionadas con el protocolo SE, Figura 5.6 (a) y (b), la atenuación fue mayor en las imágenes CE para todos los VOI, excepto bazo. Para las imágenes del protocolo DE, Figura 5.6 (c) y (d), la atenuación entre las imágenes LE y HE fue estadísticamente diferente en aorta, VCI, hígado, bazo y músculo. En general, estas diferencias se relacionaron con la captación diferencial de los medios de contraste utilizados en cada protocolo de imagen.

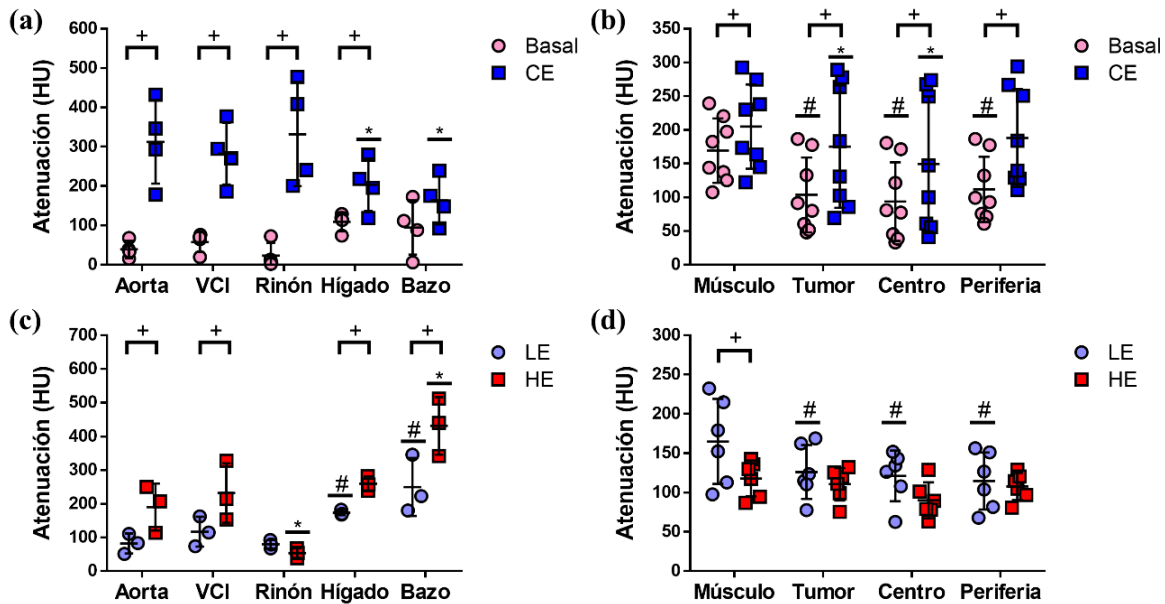


Figura 5.6 Atenuación en imágenes asociadas al protocolo (a, b) SE y (c, d) DE, en aorta, vena cava inferior (VCI), riñón, hígado, bazo, músculo y regiones tumorales: tumor completo (tumor), tumor central (centro) y periferia tumoral (periferia). Se indica $p < 0.05$, evaluado con ANOVA bidireccional y la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples: (+) basal vs. CE o LE vs. HE; (#) aorta (o músculo) vs. volúmenes de interés (VOI) en imágenes basales y LE; (*) aorta (o músculo) vs. VOI en imágenes CE y HE.

La atenuación en la aorta se comparó con la atenuación en VCI, riñón, hígado y bazo para las imágenes basales, CE, LE y HE. Se encontraron diferencias significativas con la atenuación en aorta solamente en el hígado, el bazo y el riñón en las imágenes de CE, LE y HE, y se indican mediante (*) o (#) en la Figura 5.6 (a) y (c). La atenuación promedio fue significativamente mayor en la aorta que en el hígado y el bazo en las imágenes CE, significativamente más baja en la aorta que en el hígado y el bazo en las imágenes LE, y menor en la aorta que en el bazo en las imágenes HE. La atenuación promedio también fue significativamente mayor en la aorta que en el riñón en las imágenes HE. Estas diferencias eran esperadas, ya que se sabe que el medio de contraste clínico utilizado con el protocolo SE se elimina a través de los riñones, mientras que el medio de contraste preclínico usado en el protocolo DE se elimina a través del hígado y el bazo (40).

Se encontraron diferencias significativas entre la atenuación en el músculo y las regiones tumorales en las imágenes basales, CE y LE y están indicadas por (*) o (#) en la Figura 5.6 (b) y (d). Estas diferencias sugirieron que las regiones tumorales se pueden distinguir del músculo a partir de las imágenes basales, CE y LE; sin embargo, cabe señalar que el músculo mostró valores medios de atenuación similares o superiores a las regiones tumorales, lo que podría impedir su visualización directamente a partir de estas imágenes.

Los valores de realce y C_1 se cuantificaron en los mismos VOI que la atenuación y se muestran en la Figura 5.7 (a)-(d). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas de los valores promedio de realce y C_1 entre las imágenes SE y DE solamente en riñón y bazo, como lo indica (+); estas diferencias están relacionadas con las diferentes vías de eliminación de los medios de contraste usados. Los valores promedio de realce y C_1 en aorta, VCI, hígado, músculo y las regiones tumorales no fueron significativamente diferentes entre las imágenes SE y DE, lo que reflejó la concordancia de estos BI cuantificados en imágenes adquiridas con los diferentes protocolos. Esto refleja los resultados de la reproducibilidad de C_1 encontrados en la sección 4.3.8, que mostraron una alta correlación en los valores de este BI cuantificado en imágenes SE, DE y DCE.

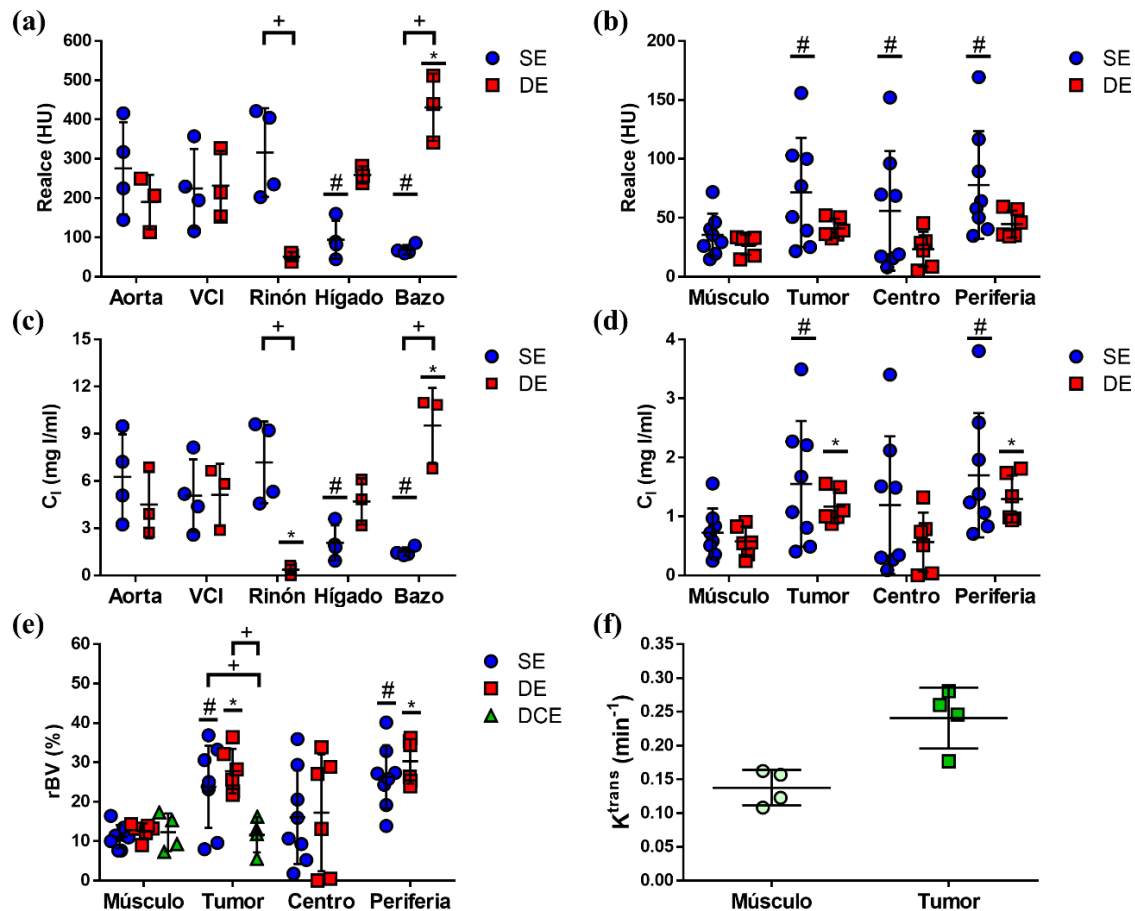


Figura 5.7 BI cuantificados en diferentes VOI en imágenes SE, DE y DCE del modelo animal: (a, b) realce cuantificado en imágenes SE y DE; (c, d) C_1 , en imágenes SE y DE; (e) rBV, en SE, DE y DCE; (f) K^{trans} , en DCE. Se indica $p < 0.05$, evaluado con ANOVA bidireccional y la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples: (+) SE vs. DE, SE vs. DCE o DE vs. DCE, para todos los VOI; (#) aorta (o músculo) vs. (VOI) en imágenes SE; (*) aorta (o músculo) vs. (VOI) en imágenes DE.

Se comparó el valor promedio de realce y C_1 en la aorta con VCI, riñón, hígado y bazo en imágenes SE y DE, mostrados en la Figura 5.7 (a) y (c). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en estos valores entre aorta e hígado y bazo en las imágenes SE, como lo indica (#), y entre aorta y bazo en las imágenes DE, como lo indica (*). C_1 en aorta también fue significativamente diferente de C_1 en el riñón en las imágenes DE. Se

podieron observar marcadas diferencias en los valores de realce y C_1 en la aorta entre los diferentes animales tanto para los protocolos SE como DE, lo que refleja la variabilidad biológica en este tipo de estudios. Por eso podría ser importante introducir un parámetro cuantitativo como el rBV que tenga en cuenta esta variabilidad.

La comparación de los valores promedio de realce y C_1 entre músculo y las regiones tumorales mostró algunas diferencias entre las imágenes SE y DE. Para el realce, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estos VOI solamente en imágenes SE, como lo indica (#) en la Figura 5.7 (b). Para C_1 se observaron diferencias significativas en imágenes SE y DE, como se indica mediante (#) y (*) en la Figura 5.7 (d). Esto sugirió que C_1 podría ser un parámetro más sensible que el realce para distinguir entre el músculo y las regiones tumorales con ambos protocolos de imagen. Estos resultados indicaron que las imágenes cuantitativas de realce y C_1 adquiridas con los protocolos SE y DE podrían permitir una mejor visualización de las regiones tumorales que las imágenes de atenuación. Esto se infirió cualitativamente de la Figura 5.3 y Figura 5.4, en la que los tumores y otras estructuras realizadas por el medio de contraste se visualizaron más claramente en las imágenes de C_1 que en las de CE, LE o HE.

La Figura 5.7 (e) y (f) muestra los resultados de la cuantificación de rBV y K^{trans} para los protocolos SE, DE y DCE. La aorta abdominal se utilizó como AIF para cuantificar rBV a partir de las imágenes de C_1 SE y DE, mientras que el VI se utilizó como AIF para cuantificar rBV y K^{trans} a partir del análisis cinético de las curvas de tiempo- C_1 obtenidas de las imágenes DCE. Se observó una concordancia entre los valores de rBV cuantificados con los tres protocolos de imagen en músculo, centro y periferia tumoral en la Figura 5.7 (e). En tumor completo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en rBV entre DCE y los otros protocolos, como se indica por (+) en la Figura 5.7 (e). Estas diferencias podrían deberse a las dificultades inherentes a la evaluación del tumor completo en imágenes DCE.

En general, las concordancias encontradas en este trabajo entre los BI cuantificados usando los diferentes protocolos están en acuerdo con lo reportado previamente en algunos estudios en los que han comparado los BI cuantitativos obtenidos con protocolos SE, DE y DCE para dilucidar su similitud (84) y su potencial para proporcionar información diagnóstica (85) o para evaluar la respuesta al tratamiento (83). Kang et al. (84) evaluaron pacientes con cáncer colorrectal y encontraron correlaciones significativas entre C_1 cuantificada en imágenes DE y el volumen sanguíneo (BV) y el producto permeabilidad-superficie (PS) cuantificado en imágenes DCE. Knobloch et al. (83) evaluaron un modelo subcutáneo de glioma con células GS9L y encontraron correlaciones significativas entre los BI en imágenes SE (atenuación), DE (C_1) y DCE CT (flujo sanguíneo (BF) y PS). La concordancia en la cuantificación de los BI con los diferentes protocolos de imagen encontrada en este trabajo (realce y C_1 en aorta, VCI, hígado, músculo y las regiones tumorales, cuantificados en imágenes SE y DE; rBV en músculo, y centro y periferia tumoral, cuantificados en imágenes SE, DE y DCE) sugirió que si se observa un cambio en estos BI, es más probable que esté relacionado con un proceso biológico que con una diferencia en su cuantificación, lo cual es una preocupación importante en imagen cuantitativa.

Se comparó rBV en músculo y las regiones tumorales en la Figura 5.7 (e). Se encontró una diferencia estadísticamente significativa del rVB entre músculo y tumor completo y periferia tumoral para los protocolos SE y DE, como lo indican (#) y (*) en la Figura 5.7

(e), respectivamente, que fue similar al resultado para C_I mostrado en Figura 5.7 (d). Para el centro del tumor, esta diferencia con el músculo no fue significativa, principalmente debido al amplio rango de valores de rBV y C_I encontrados en esta región tumoral. La diferencia en los valores promedio de K^{trans} entre el músculo y el tumor completo en la Figura 5.7 (f) no fue estadísticamente significativa.

La Tabla 5.1 resume los resultados de realce, C_I , rBV y K^{trans} evaluados en el músculo y las regiones tumorales del modelo subcutáneo de glioma con células C6 y obtenidos con los protocolos de imágenes explorados en este trabajo; las diferencias significativas con el músculo se indican con (*). Estos resultados sugirieron que C_I y rBV, cuantificados en imágenes SE y DE, permiten un mejor discernimiento entre el músculo y las regiones tumorales, tanto cualitativa como cuantitativamente, que la atenuación, el realce, o los parámetros cinéticos cuantificados con imágenes DCE.

Tabla 5.1 Parámetros de imagen cuantitativos en el músculo y las regiones tumorales del modelo animal con imágenes SE, DE y DCE.

Protocolos de imagen	BI	Músculo	Tumor completo	Centro del tumor	Periferia tumoral
SE (n = 8)	Realce (HU)	35.5 ± 6.3	71.6 ± 16.3 *	55.8 ± 17.9 *	77.9 ± 16.1 *
	C_I (mg I/mL)	0.72 ± 0.14	1.55 ± 0.37 *	1.19 ± 0.41	1.69 ± 0.37 *
	rBV (%)	11.1 ± 1.0	23.8 ± 3.6 *	16.1 ± 4.2	26.3 ± 2.8 *
DE (n = 6)	Realce (HU)	27.2 ± 3.4	41.1 ± 3.3	23.4 ± 6.0	44.7 ± 4.6
	C_I (mg I/mL)	0.57 ± 0.10	1.17 ± 0.11 *	0.56 ± 0.20	1.29 ± 0.16 *
	rBV (%)	12.6 ± 0.7	27.7 ± 2.3 *	17.2 ± 6.0	30.2 ± 2.2 *
DCE (n = 4)	rBV (%)	12.2 ± 2.3	11.6 ± 2.2		
	K^{trans} (min ⁻¹)	0.13 ± 0.01	0.24 ± 0.02		

C_I , concentración de yodo; rBV, volumen sanguíneo relativo; K^{trans} , constante de transferencia de volumen. Los valores se expresan como media ± error estándar de la media; * $p < 0.05$, en comparación con el músculo.

5.3.3 Caracterización histológica de los tumores del modelo animal

El modelo de glioma con células C6 presenta características histológicas similares a las del GBM humano, caracterizado por presentar áreas necróticas rodeadas por células tumorales, creando una especie de palizada (89–91). Se ha demostrado que estas células inducen la angiogénesis mediante la sobreexpresión del VEGF-A (129). Por lo tanto, generalmente se encuentra una MVD aumentada alrededor de las áreas necróticas. Se ha observado que las células en la periferia del tumor también sobreexpresan VEGF-A, produciendo una alta MVD en esta región tumoral (90).

Estas características histológicas del GBM humano se identificaron en secciones de tejido teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) y se muestran en la Figura 5.8 (a) y (b). La Figura 5.8 (a) muestra tumores altamente celulares con pleomorfismo y zonas de necrosis coagulativa revestidas por células neoplásicas en palizada, y la Figura 5.8 (b) muestra una forma compleja de hiperplasia microvascular con patrones de crecimiento peri-endotelial. Otro rasgo característico del modelo se muestra en la Figura 5.8 (c) y (d), en la que las secciones de tejido de los tumores teñidas con un anticuerpo anti-CD34, utilizado para identificar microvasos y cuantificar la MVD, muestran un aumento del número de microvasos en la periferia de las áreas necróticas.

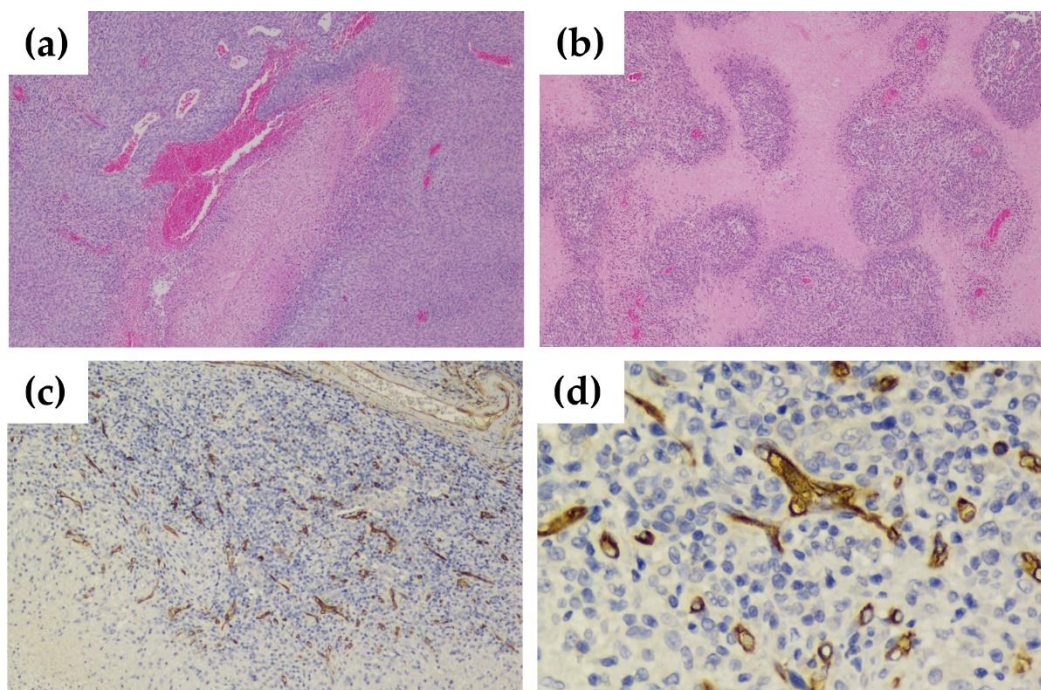


Figura 5.8 Caracterización histológica del modelo subcutáneo de glioma con células C6. (a) Se observaron tumores altamente celulares con pleomorfismo y zonas de necrosis coagulativa revestidas por células neoplásicas en palizada en secciones de tejido de los tumores (hematoxilina y eosina (H&E), 100×). (b) Forma compleja de hiperplasia microvascular con patrones de crecimiento peri-endotelial (H&E, 100×). Se observó un mayor número de microvasos (en tinciones con anti-CD34) cerca de áreas necróticas en secciones de tejido de tumores, mostradas con aumentos de (c) 100× y (d) 400×.

Se determinaron PN, IP y MVD para los tumores del modelo animal. La Tabla 5.2 resume los hallazgos histológicos del modelo; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada protocolo de imagen para estos BH. La Figura 5.9 (a) y (b) muestra una tinción inmunohistoquímica representativa de PCNA de tumores con 50% y 95% de IP, respectivamente. La Figura 5.9 (c) y (d) muestra una tinción inmunohistoquímica representativa de CD34 de tumores con 4.4 vasos/HPF y 18.3 vasos/HPF, respectivamente.

Tabla 5.2 Caracterización histológica del modelo subcutáneo de glioma con células C6.

Protocolo de imagen	PN (%)	IP (%)	MVD (vasos/HPF)
SE (n = 8)	38.1 ± 10.5	68.7 ± 8.4	6.9 ± 1.9
DE (n = 6)	28.3 ± 7.6	70.8 ± 8.2	3.5 ± 1.0
DCE (n = 4)	26.2 ± 9.4	78.7 ± 6.5	3.9 ± 1.5

Los valores se expresan como promedio ± error estándar de la media.

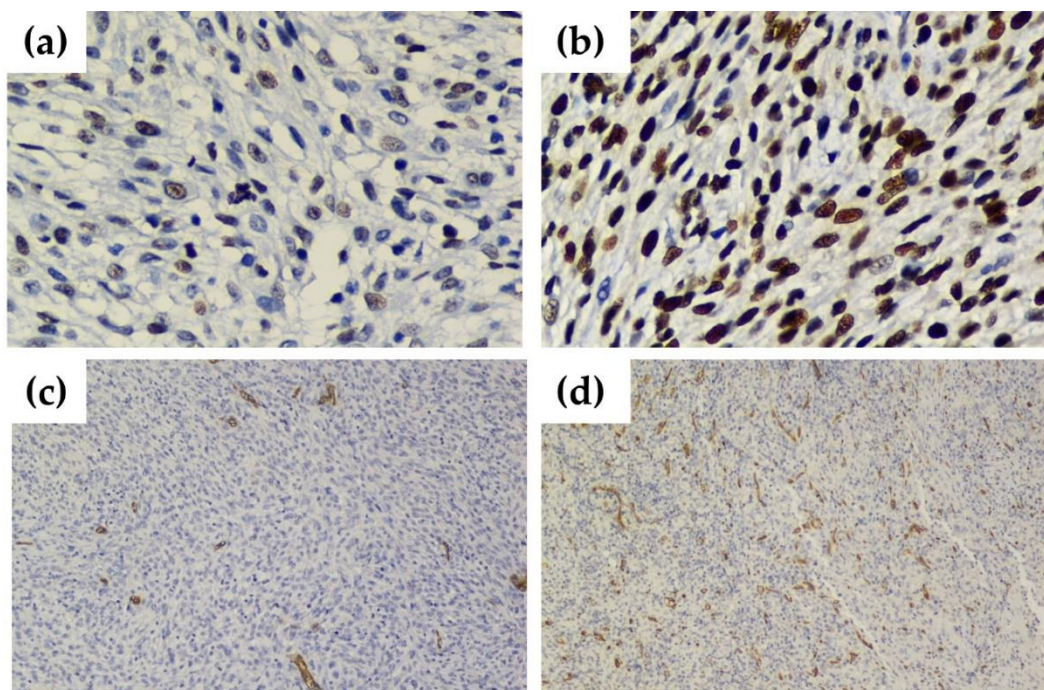


Figura 5.9 Tinción inmunohistoquímica representativa de PCNA de tumores con (a) índice de proliferación (IP) del 50% (400×) y (b) IP del 95% (400×). Tinción inmunohistoquímica representativa de CD34 de tumores con (c) densidad de microvasos (MVD) = 4.4 vasos/HPF (100×) y (d) MVD = 18.3 vasos/HPF (100×).

5.3.4 Evaluación de la asociación entre BH y BI

Se evaluó la asociación entre BH (PN, IP y MVD) y BI (realce, C_I , rBV y K^{trans}) para las tres regiones tumorales y para cada protocolo de imagen con el coeficiente de correlación de Pearson. Se encontraron correlaciones positivas significativas ($p < 0.05$) para los pares de parámetros indicados en la Tabla 5.3. No se encontraron asociaciones significativas para los parámetros de imagen cuantificados en imágenes DE o DCE. Para las imágenes SE, el realce y C_I en la periferia del tumor se asociaron con MVD y necrosis, realce y C_I en el tumor completo con MVD, y rBV en la periferia del tumor con MVD. La evaluación de la correlación entre PN, IP y MVD y algunos BI seleccionados se muestra en Figura 5.10, Figura 5.11 y Figura 5.12, respectivamente. En estas figuras se indicaron con negritas los valores de $p < 0.05$.

Tabla 5.3 Correlaciones significativas encontradas entre BH y BI cuantificados en imágenes SE para las regiones tumorales.

BH	BI	Región tumoral	R de Pearson	Valor p
PN	Realce	Periferia	0.7079	0.0494
PN	C_I	Periferia	0.7085	0.0492
MVD	Realce	Periferia	0.8565	0.0066
MVD	C_I	Periferia	0.8561	0.0067
MVD	rBV	Periferia	0.7681	0.0260
MVD	Realce	Tumor completo	0.7758	0.0236
MVD	C_I	Tumor completo	0.7756	0.0237

PN, porcentaje de necrosis; MVD, densidad de microvasos; C_I , concentración de yodo; rBV, volumen de sangre relativo.

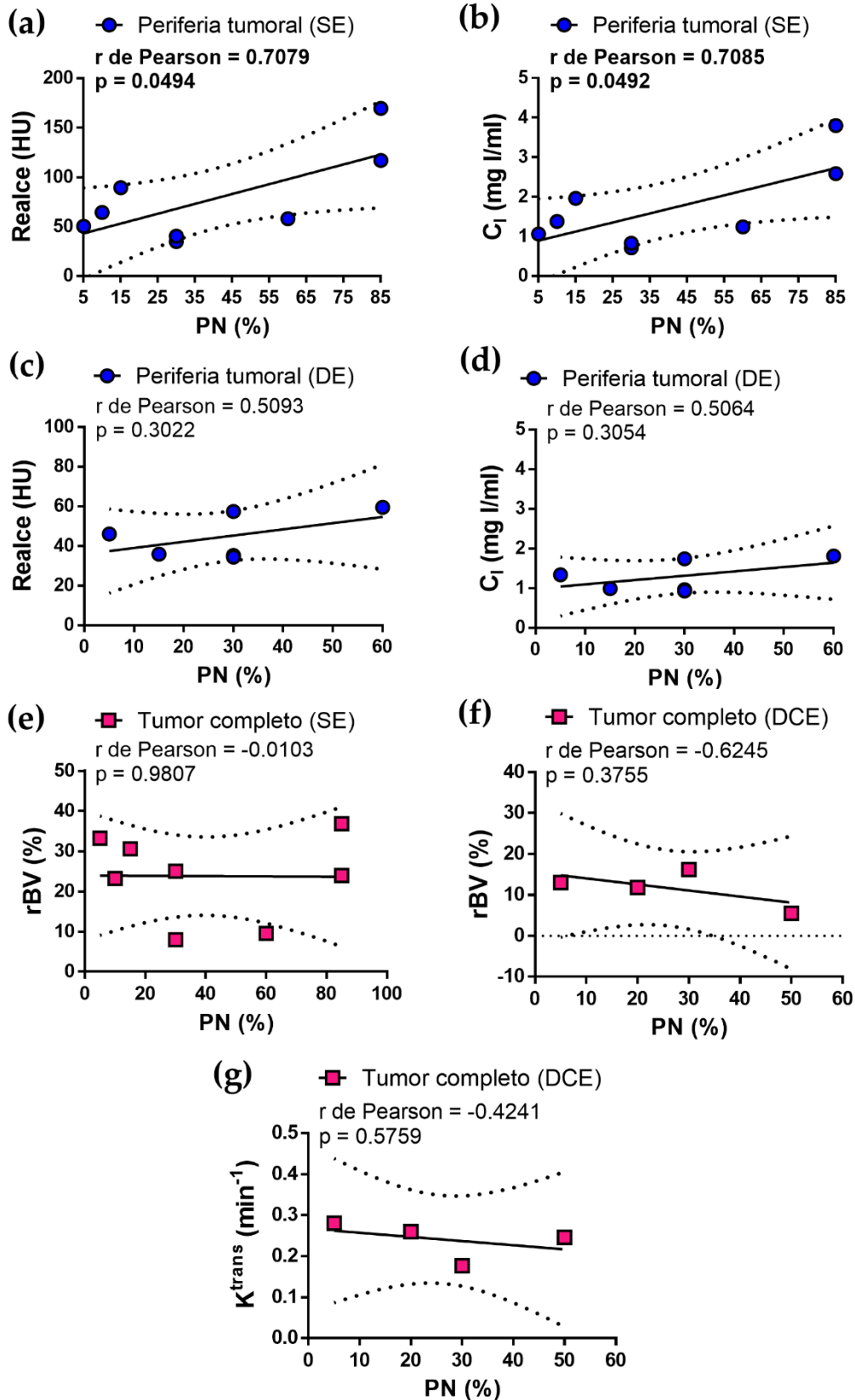


Figura 5.10 Evaluación de la correlación entre porcentaje de necrosis (PN) y los BI cuantificados en imágenes SE, DE y DCE: (a) realce (SE), (b) C_1 (SE), (c) realce (DE), (d) C_1 (DE), (e) rBV (SE), (f) rBV (DCE) y (g) K^{trans} (DCE). Se destacan en negritas los valores de $p < 0.05$.

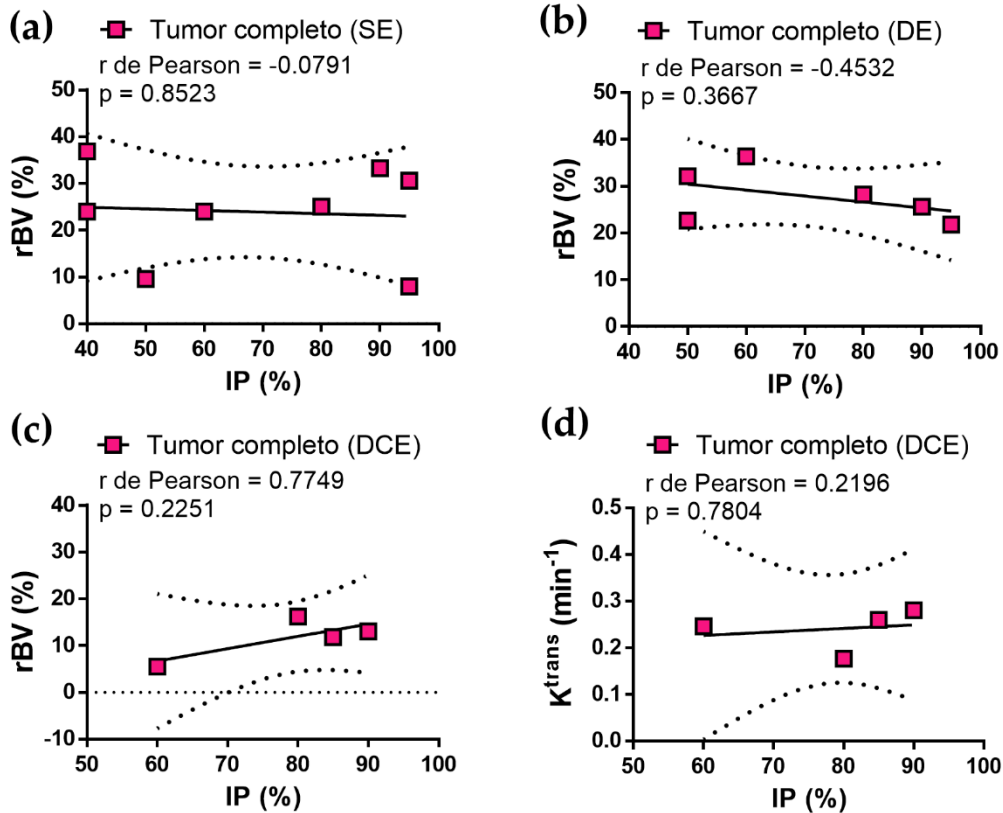


Figura 5.11 Evaluación de la correlación entre índice de proliferación (IP) y los BI cuantificados en imágenes SE, DE y DCE: (a) rBV (SE), (b) rBV (DE), (c) rBV (DCE) y (d) K^{trans} (DCE).

A pesar de que algunos estudios han evaluado la concordancia entre los BI obtenidos de imágenes SE, DE y DCE (83–85), hasta donde sabemos, su asociación con BH de angiogénesis no se ha evaluado a la luz de estas comparaciones. Adicionalmente, solo unos pocos estudios han evaluado la correlación de los BH de angiogénesis y los BI del modelo de glioma con células C6, y se han usado solamente los protocolos DE y DCE.

En este trabajo se encontró una correlación positiva significativa entre PN y realce y entre PN y C_1 en la periferia del tumor en las imágenes SE, contraria a la correlación negativa encontrada por Qi et al. (79) entre PN y BV y PN y BF, cuantificadas con el protocolo DCE en un modelo ortotópico de glioma con células C6 y usando un equipo CT. Suponemos que esta discrepancia está relacionada con el uso de un equipo CT para la cuantificación de los BI con el protocolo DCE en vez de usar un equipo micro-CT especialmente diseñado para animales pequeños, ya que esto podría tener un impacto negativo en la exactitud de la cuantificación de la AIF debido al efecto parcial de volumen (81). Sin embargo, se requieren más estudios para demostrar esto.

Liu et al. (130) encontraron correlaciones significativas entre IP (obtenido con anti-Ki67) y C_1 cuantificados en un modelo ortotópico de glioma con células C6, usando un protocolo DE y un equipo CT, y sugirieron que las áreas con IP alto aumentaban el flujo sanguíneo local y la permeabilidad. En nuestro estudio, no encontramos correlaciones significativas entre IP (obtenido con anti-PCNA) y alguno de los parámetros de imagen para las regiones tumorales evaluadas con los protocolos SE, DE y DCE, probablemente porque el tumor viable exhibía un rango limitado de valores de IP.

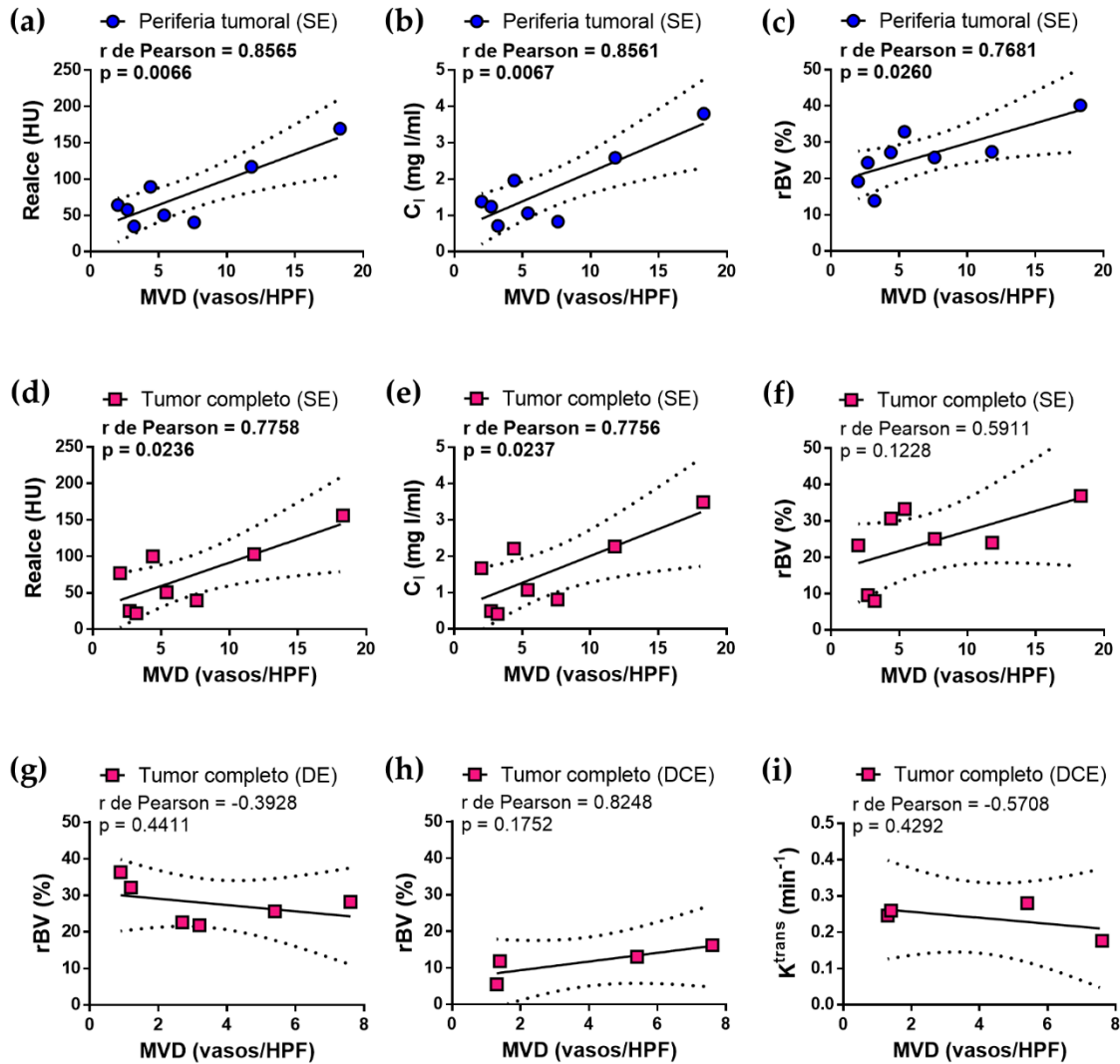


Figura 5.12 Evaluación de la correlación entre densidad de microvasos (MVD) y los BI cuantificados en imágenes SE, DE y DCE: (a) realce, (b) C_1 y (c) rBV en periferia tumoral (SE); (d) realce, (e) C_1 y (f) rBV en tumor completo (SE); (g) rBV (DE), (h) rBV (DCE) y (i) K^{trans} (DCE). Se destacan en negritas los valores de $p < 0.05$.

MVD se ha asociado con BI cuantificados en imágenes DE y DCE del modelo de glioma C6 (73,76,77). Huang et al. (73) encontraron una correlación significativa entre MVD (anti-CD105) y C_1 cuantificados en imágenes DE obtenidas con un equipo CT. Guan et al. (77) cuantificaron BF y BV en imágenes DCE obtenidas con un equipo CT y encontraron correlaciones significativas con MVD (anti-CD34). Lu et al. (76) encontraron una correlación significativa entre MVD (anti-CD105) y BF y BV cuantificados con DCE usando un equipo CT. En este trabajo, encontramos que MVD (anti-CD34) se asoció con el realce y C_1 cuantificados en el tumor completo, y también con el realce, C_1 y rBV cuantificados en la periferia tumoral en las imágenes SE. Sin embargo, no encontramos asociaciones significativas de los BI cuantificados en imágenes DE y DCE y MVD, lo que podría estar relacionado con las limitaciones enfrentadas en nuestro estudio.

La primera limitación fue el tamaño pequeño de la muestra para cada protocolo de imagen, lo que limitó el poder estadístico del estudio y, por lo tanto, podría dificultar la

extrapolación de nuestros resultados. En segundo lugar, existieron limitaciones técnicas en la implementación de los protocolos DE y DCE. Para el protocolo DE, el equipo micro-CT disponía de un rango de kilovoltaje reducido (voltaje de operación del tubo de rayos X de 30 a 45 kV), que no era óptimo para seleccionar calidades de radiación con E_{ef} alrededor del borde-K del yodo y, por lo tanto, el contraste obtenido en imágenes DE quedó limitado. Otra limitación en el protocolo DE fue la baja concentración de yodo del medio de contraste preclínico (50 mg I/ml) en comparación con la concentración de yodo del medio de contraste clínico utilizado en los protocolos SE y DCE (300 mg I/ml), lo que podría explicar los valores similares de atenuación y realce observados entre el músculo y las regiones tumorales en las imágenes DE.

La principal limitación para implementar protocolos DCE en nuestro equipo micro-CT fue la resolución temporal, ya que una imagen completa requiere una adquisición de al menos 2 min. Por lo tanto, utilizamos proyecciones (separadas 1 s una de la otra) para lograr una alta resolución temporal que nos permitiera obtener imágenes de la rápida biodistribución del medio de contraste clínico en los animales. El uso de las proyecciones ocasionó que se dificultara la cuantificación de C_1 en el volumen tumoral completo debido a la superposición de los tejidos en las imágenes. Para subsanar esto, se utilizó la infusión continua del medio de contraste clínico en vez de una inyección en bolo, ya que la primera da lugar al incremento constante de C_1 en los tejidos. En contraste, la inyección en bolo proporciona un C_1 más alto, pero decae rápidamente después de la inyección (121).

5.4 Conclusiones de este capítulo

Se cuantificaron de manera sistemática los BI en las diferentes regiones tumorales y órganos de interés del modelo subcutáneo de glioma con células C6, usando los protocolos SE, DE y DCE optimizados y estandarizados. De manera cualitativa, se encontró que las imágenes de rayos X realizadas por el uso de medios de contraste radiológico mejoraron la visualización de las regiones tumorales. Esto se corroboró cuantitativamente para las imágenes SE y DE ya que C_1 y rBV fueron significativamente diferentes entre el músculo y las regiones tumorales. Se observó concordancia entre los BI cuantificados con los diferentes protocolos de imagen, ya que se encontraron valores similares para realce y C_1 entre imágenes SE y DE en estructuras vasculares, músculo y regiones tumorales. Además, se observaron valores similares para rBV en el músculo entre las imágenes SE, DE y DCE.

Se corroboró que los tumores evaluados presentaron características histológicas comunes al GBM humano, como el crecimiento de las células neoplásicas en palizada y el aumentado número de microvasos en la periferia de las zonas necróticas. Se cuantificaron los BH en los tumores: PN, IP y MVD, y se evaluó su asociación con los BI para cada protocolo. Se encontró un conjunto de correlaciones significativas para el protocolo SE: realce y C_1 en la periferia del tumor se asociaron con MVD y necrosis; realce y C_1 en el tumor completo con MVD; y rBV en la periferia del tumor, con MVD. No se encontraron correlaciones significativas entre los BH y los BI para los protocolos DE y DCE, probablemente debido a las limitaciones técnicas ya descritas.

6 CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se presentó la evaluación sistemática de biomarcadores a partir de imágenes cuantitativas de rayos X realizadas por el uso de medios de contraste radiológico del modelo subcutáneo de glioma con células C6. Los protocolos de adquisición de las imágenes, así como los métodos de cuantificación de los BI, fueron optimizados y estandarizados de manera rigurosa siguiendo las guías actuales en imagen cuantitativa. Se corroboró que las imágenes SE, DE y DCE mejoraron la visualización de los tumores, tanto cualitativa como cuantitativamente. Los BI evaluados en este estudio demostraron concordancia entre los diferentes protocolos, a pesar de la amplia variabilidad inter- e intra-sujeto observada. Adicionalmente, se encontraron asociaciones significativas entre BH y BI cuantificados en las imágenes SE.

A pesar de las limitaciones encontradas, este trabajo proporcionó evidencia del uso potencial de los BI cuantificados en imágenes SE como descriptores de la angiogénesis y necrosis en el modelo animal evaluado. Entre las perspectivas de este trabajo está evaluar la habilidad del conjunto identificado de BI para distinguir lesiones benignas de lesiones malignas en un modelo animal de cáncer de glándula mamaria inducido químicamente. Existe también interés en incorporar métodos de filtrado para la reducción de ruido en las imágenes, ya que esto podría ayudar a mejorar el desempeño técnico de los BI. Los estudios futuros de este trabajo podrían explorar el potencial de los BI cuantificados en imágenes SE para proporcionar información pronóstica y predictiva mediante la evaluación de la respuesta al tratamiento en cáncer. Adicionalmente, los BI estandarizados con el protocolo SE se podrían emplear para el estudio por imagen *in vivo* de los mecanismos de vascularización tumoral alternativos a la angiogénesis, como la cooptación de vasos cercanos al tumor (*vessel co-option*) y el mimetismo vasculogénico (*vasculogenic mimicry*).

REFERENCIAS

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* (2011) **144**:646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
2. Herbert SP, Stainier DYR. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2011) **12**:551–564. doi:10.1038/nrm3176
3. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* (1974) **19**:331–358. doi:10.1016/S0065-230X(08)60058-5
4. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* (2005) **15**:102–111. doi:10.1016/j.gde.2004.12.005
5. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* (1996) **86**:353–364. doi:10.1016/S0092-8674(00)80108-7
6. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* (2011) **473**:298–307. doi:10.1038/nature10144
7. Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: Molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med* (2011) **17**:1359–1370. doi:10.1038/nm.2537
8. Zuazo-Gaztelu I, Casanovas O. Unraveling the role of angiogenesis in cancer ecosystems. *Front Oncol* (2018) **8**: doi:10.3389/fonc.2018.00248
9. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia* (2015) **3**:83. doi:10.2147/hp.s93413
10. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* (2017) **168**:670–691. doi:10.1016/j.cell.2016.11.037
11. Folkman J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N Engl J Med* (1971) **285**:1182–1186. doi:10.1056/nejm197111182852108
12. Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat* (1995) **36**:169–180. doi:10.1007/BF00666038
13. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, Beliën JAM, De Waal RMW, Van Marck E, Magnani E, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer* (2002) **38**:1564–1579. doi:10.1016/S0959-8049(02)00094-1
14. Nowak-Sliwinska P, Alitalo K, Allen E, Anisimov A, Aplin AC, Auerbach R, Augustin HG, Bates DO, van Beijnum JR, Bender RHF, et al. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis* (2018) **21**:425–532. doi:10.1007/s10456-018-9613-x
15. Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* (1995) **147**:9–19. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1869874/> [Accessed November 16, 2020]
16. Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. Microvessel Density as a Prognostic Factor in Women with Breast Cancer: A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. *Cancer Res* (2004) **64**:2941–2955. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-1957

17. Leon SP, Folkerth RD, Black PML. Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. *Cancer* (1996) **77**:362–372. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19960115)77:2<362::AID-CNCR20>3.0.CO;2-Z
18. Gasparini G. Prognostic Value of Vascular Endothelial Growth Factor in Breast Cancer. *Oncologist* (2000) **5**:37–44. doi:10.1634/theoncologist.5-suppl_1-37
19. Zhan P, Wang J, Lv XJ, Wang Q, Qiu LX, Lin XQ, Yu LK, Song Y. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: A systematic review with meta-analysis. *J Thorac Oncol* (2009) **4**:1094–1103. doi:10.1097/JTO.0b013e3181a97e31
20. Ishigami SI, Arii S, Furutani M, Niwano M, Harada T, Mizumoto M, Mori A, Onodera H, Imamura M. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer* (1998) **78**:1379–1384. doi:10.1038/bjc.1998.688
21. Zhao YY, Xue C, Jiang W, Zhao HY, Huang Y, Feenstra K, Resau JH, Qian CN, Zhang L. Predictive value of intratumoral microvascular density in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving chemotherapy plus bevacizumab. *J Thorac Oncol* (2012) **7**:71–75. doi:10.1097/JTO.0b013e31823085f4
22. Bais C, Mueller B, Brady MF, Mannel RS, Burger RA, Wei W, Marien KM, Kockx MM, Husain A, Birrer MJ. Tumor Microvessel Density as a Potential Predictive Marker for Bevacizumab Benefit: GOG-0218 Biomarker Analyses. *J Natl Cancer Inst* (2017) **109**: doi:10.1093/jnci/djx066
23. Menakuru SR, Brown NJ, Staton CA, Reed MWR. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Br J Cancer* (2008) **99**:1961–1966. doi:10.1038/sj.bjc.6604733
24. Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Cancer* (2009) **45**:1924–1934. doi:10.1016/j.ejca.2009.04.007
25. Ribatti D, Vacca A, Dammacco F. The Role of the Vascular Phase in Solid Tumor Growth: A Historical Review. *Neoplasia* (1999) **1**:293–302. doi:10.1038/sj.neo.7900038
26. Pasquier J, Ghiabi P, Chouchane L, Razzouk K, Rafii S, Rafii A. Angiocrine endothelium: From physiology to cancer. *J Transl Med* (2020) **18**: doi:10.1186/s12967-020-02244-9
27. van Beijnum JR, Nowak-Sliwinska P, Huijbers EJM, Thijssen VL, Griffioen AW. The great escape; the hallmarks of resistance to antiangiogenic therapy. *Pharmacol Rev* (2015) **67**:441–61. doi:10.1124/pr.114.010215
28. Döme B, Hendrix MJC, Paku S, Tóvári J, Tímár J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol* (2007) **170**:1–15. doi:10.2353/ajpath.2007.060302
29. Donnem T, Reynolds AR, Kuczyński EA, Gatter K, Vermeulen PB, Kerbel RS, Harris AL, Pezzella F. Non-angiogenic tumours and their influence on cancer biology. *Nat Rev Cancer* (2018) **18**:323–336. doi:10.1038/nrc.2018.14
30. Van Dam PJ, Van Der Stok EP, Teuwen LA, Van Den Eynden GG, Illemann M, Frentzas S, Majeed AW, Eefsen RL, Coebergh Van Den Braak RRJ, Lazaris A, et al. International consensus guidelines for scoring the histopathological growth patterns of liver metastasis. *Br J Cancer* (2017) **117**:1427–1441. doi:10.1038/bjc.2017.334
31. Latacz E, van Dam PJ, Vanhove C, Llado L, Descamps B, Ruiz N, Joye I, Grünhagen D, Van Laere S, Dirix P, et al. Can medical imaging identify the histopathological growth patterns of liver metastases? *Semin Cancer Biol* (2020) doi:10.1016/j.semcancer.2020.07.002

32. Oliveira RC, Alexandrino H, Cipriano MA, Tralhão JG. Liver metastases and histological growth patterns: Biological behavior and potential clinical implications—another path to individualized medicine? *J Oncol* (2019) **2019**: doi:10.1155/2019/6280347
33. Fass L. Imaging and cancer: A review. *Mol Oncol* (2008) **2**:115–152. doi:10.1016/j.molonc.2008.04.001
34. O'Connor JPB, Aboagye EO, Adams JE, Aerts HJWL, Barrington SF, Beer AJ, Boellaard R, Bohndiek SE, Brady M, Brown G, et al. Imaging biomarker roadmap for cancer studies. *Nat Rev Clin Oncol* (2017) **14**:169–186. doi:10.1038/nrclinonc.2016.162
35. Kessler LG, Barnhart HX, Buckler AJ, Choudhury KR, Kondratovich M V., Toledano A, Guimaraes AR, Filice R, Zhang Z, Sullivan DC. The emerging science of quantitative imaging biomarkers terminology and definitions for scientific studies and regulatory submissions. *Stat Methods Med Res* (2015) **24**:9–26. doi:10.1177/0962280214537333
36. Raunig DL, McShane LM, Pennello G, Gatsonis C, Carson PL, Voyvodic JT, Wahl RL, Kurland BF, Schwarz AJ, Gönen M, et al. Quantitative imaging biomarkers: A review of statistical methods for technical performance assessment. *Stat Methods Med Res* (2015) **24**:27–67. doi:10.1177/0962280214537344
37. Hagiwara A, Fujita S, Ohno Y, Aoki S. Variability and Standardization of Quantitative Imaging: Monoparametric to Multiparametric Quantification, Radiomics, and Artificial Intelligence. *Invest Radiol* (2020) **55**:601–616. doi:10.1097/RLI.0000000000000666
38. García-Figueiras R, Padhani AR, Beer AJ, Baleato-González S, Vilanova JC, Luna A, Oleaga L, Gómez-Caamaño A, Koh DM. Imaging of Tumor Angiogenesis for Radiologists-Part 1: Biological and Technical Basis. *Curr Probl Diagn Radiol* (2015) **44**:407–424. doi:10.1067/j.cpradiol.2015.02.010
39. Ehling J, Lammers T, Kiessling F. Non-invasive imaging for studying anti-angiogenic therapy effects. *Thromb Haemost* (2013) **109**:375–390. doi:10.1160/TH12-10-0721
40. Ayala-Domínguez L, Brandan ME. Quantification of tumor angiogenesis with contrast-enhanced x-ray imaging in preclinical studies: A review. *Biomed Phys Eng Express* (2018) **4**:062001. doi:10.1088/2057-1976/aadc2d
41. Forghani R, De Man B, Gupta R. Dual-Energy Computed Tomography: Physical Principles, Approaches to Scanning, Usage, and Implementation: Part 1. *Neuroimaging Clin N Am* (2017) **27**:371–384. doi:10.1016/j.nic.2017.03.002
42. Hubbell JH, Seltzer SM. Tables of X-Ray Mass Attenuation Coefficients and Mass Energy-Absorption Coefficients 1 keV to 20 MeV for Elements Z = 1 to 92 and 48 Additional Substances of Dosimetric Interest. Available at: <https://www.nist.gov/publications/tables-x-ray-mass-attenuation-coefficients-and-mass-energy-absorption-coefficients-1-0> [Accessed November 16, 2020]
43. Forghani R, De Man B, Gupta R. Dual-Energy Computed Tomography: Physical Principles, Approaches to Scanning, Usage, and Implementation: Part 2. *Neuroimaging Clin N Am* (2017) **27**:385–400. doi:10.1016/j.nic.2017.03.003
44. Rosado-Méndez I, Palma BA, Brandan ME. Analytical optimization of digital subtraction mammography with contrast medium using a commercial unit. *Med Phys* (2008) **35**:5544–5557. doi:10.1118/1.3003063
45. Konstas AA, Goldmakher G V., Lee TY, Lev MH. Theoretic basis and technical

- implementations of CT perfusion in acute ischemic stroke, part 1: Theoretic basis. *Am J Neuroradiol* (2009) **30**:662–668. doi:10.3174/ajnr.A1487
46. Bushberg JT, Seibert JA, Leithold EMJ, Boone JM. *The Essential Physics of Medical Imaging*. Third edit. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins (2012).
 47. Attix FH. *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*. Wiley (1986). doi:10.1002/9783527617135
 48. Meganck JA, Liu B. Dosimetry in Micro-computed Tomography: a Review of the Measurement Methods, Impacts, and Characterization of the Quantum GX Imaging System. *Mol Imaging Biol* (2017) **19**:499–511. doi:10.1007/s11307-016-1026-x
 49. Troy KL, Edwards WB. Practical considerations for obtaining high quality quantitative computed tomography data of the skeletal system. *Bone* (2018) **110**:58–65. doi:10.1016/j.bone.2018.01.013
 50. Alkadhi H, Euler A. The Future of Computed Tomography: Personalized, Functional, and Precise. *Invest Radiol* (2020) **55**:545–555. doi:10.1097/RLI.0000000000000668
 51. Barnes SL, Whisenant JG, Loveless ME, Yankeelov TE. Practical Dynamic Contrast Enhanced MRI in Small Animal Models of Cancer: Data Acquisition, Data Analysis, and Interpretation. *Pharmaceutics* (2012) **4**:442–478. doi:10.3390/pharmaceutics4030442
 52. Turco S, Wijkstra H, Mischi M. Mathematical models of contrast transport kinetics for cancer diagnostic imaging: A review. *IEEE Rev Biomed Eng* (2016) **9**:121–147. doi:10.1109/RBME.2016.2583541
 53. Patlak CS, Blasberg RG. Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data. Generalizations. *J Cereb Blood Flow Metab* (1985) **5**:584–590. doi:10.1038/jcbfm.1985.87
 54. Dankbaar JW, Hom J, Schneider T, Cheng SC, Lau BC, Van Der Schaaf I, Virmani S, Pohlman S, Dillon WP, Wintermark M. Dynamic perfusion CT assessment of the blood-brain barrier permeability: First pass versus delayed acquisition. *Am J Neuroradiol* (2008) **29**:1671–1676. doi:10.3174/ajnr.A1203
 55. Dromain C, Balleyguier C, Muller S, Mathieu MC, Rochard F, Opolon P, Sigal R. Evaluation of tumor angiogenesis of breast carcinoma using contrast-enhanced digital mammography. *AJR Am J Roentgenol* (2006) **187**: doi:10.2214/AJR.05.1944
 56. Brandan ME, Cruz-Bastida JP, Rosado-Méndez IM, Villaseñor-Navarro Y, Pérez-Ponce H, Galván HA, Trujillo-Zamudio FE, Sánchez-Suárez P, Benítez-Bribiesca L. Clinical study of contrast-enhanced digital mammography and the evaluation of blood and lymphatic microvessel density. *Br J Radiol* (2016) **89**: doi:10.1259/bjr.20160232
 57. Jiang M, Lu HY, Shan XH, Xu W, Geng XD, Lu C, Chen JH. CT quantitative analysis study for angiogenesis, and degree of ischemic necrosis and glucose metabolite in non-small cell lung cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* (2018) **22**:4146–4155. doi:10.26355/eurrev_201807_15407
 58. Li Q, Li X, Li XY, Huo JW, Lv FJ, Luo TY. Spectral CT in lung cancer: Usefulness of iodine concentration for evaluation of tumor angiogenesis and prognosis. *Am J Roentgenol* (2020) **215**:595–602. doi:10.2214/AJR.19.22688
 59. Sun H, Xu Y, Yang Q, Wang W. Assessment of Tumor Grade and Angiogenesis in Colorectal Cancer: Whole-volume Perfusion CT. *Acad Radiol* (2014) **21**:750–757. doi:10.1016/j.acra.2014.02.011

60. Jain R, Gutierrez J, Narang J, Scarpace L, Schultz LR, Lemke N, Patel SC, Mikkelsen T, Rock JP. In vivo correlation of tumor blood volume and permeability with histologic and molecular angiogenic markers in gliomas. *Am J Neuroradiol* (2011) **32**:388–394. doi:10.3174/ajnr.A2280
61. Jia ZZ, Shi W, Shi JL, Shen DD, Gu HM, Zhou XJ. Comparison between perfusion computed tomography and dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in assessing glioblastoma microvasculature. *Eur J Radiol* (2017) **87**:120–124. doi:10.1016/j.ejrad.2016.12.016
62. Di N, Yao C, Cheng W, Ren Y, Qu J, Wang B, Yao Z. Correlation of dynamic contrast-enhanced MRI derived volume transfer constant with histological angiogenic markers in high-grade gliomas. *J Med Imaging Radiat Oncol* (2018) **62**:464–470. doi:10.1111/1754-9485.12701
63. Groves AM, Shastry M, Rodriguez-Justo M, Malhotra A, Endozo R, Davidson T, Kelleher T, Miles KA, Ell PJ, Keshtgar MR. 18F-FDG PET and biomarkers for tumour angiogenesis in early breast cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2011) **38**:46–52. doi:10.1007/s00259-010-1590-2
64. Cochet A, Pigeonnat S, Khoury B, Vrigneaud JM, Touzery C, Berriolo-Riedinger A, Dygai-Cochet I, Toubeau M, Humbert O, Coudert B, et al. Evaluation of breast tumor blood flow with dynamic first-pass 18F-FDG PET/CT: Comparison with angiogenesis markers and prognostic factors. *J Nucl Med* (2012) **53**:512–520. doi:10.2967/jnumed.111.096834
65. Heiland S, Erb G, Ziegler S, Krix M. Where contrast agent concentration really matters—a comparison of CT and MRI. *Invest Radiol* (2010) **45**:529–537. doi:10.1097/RLI.0b013e3181ea703d
66. Ng CS, Wei W, Bankson JA, Ravoori MK, Han L, Brammer DW, Klumpp S, Waterton JC, Jackson EF. Dependence of DCE-MRI biomarker values on analysis algorithm. *PLoS One* (2015) **10**: doi:10.1371/journal.pone.0130168
67. Bae J, Zhang J, Wadghiri YZ, Minhas AS, Poptani H, Ge Y, Kim SG. Measurement of blood-brain barrier permeability using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging with reduced scan time. *Magn Reson Med* (2018) **80**:1686–1696. doi:10.1002/mrm.27145
68. Niu T, Yang P, Sun X, Mao T, Xu L, Yue N, Kuang Y, Shi L, Nie K. Variations of quantitative perfusion measurement on dynamic contrast enhanced CT for colorectal cancer: Implication of standardized image protocol. *Phys Med Biol* (2018) **63**: doi:10.1088/1361-6560/aacb99
69. Karathanasis E, Chan L, Karumbaiah L, McNeeley K, D’Orsi CJ, Annapragada A V., Sechopoulos I, Bellamkonda R V. Tumor vascular permeability to a nanoprobe correlates to tumor-specific expression levels of angiogenic markers. *PLoS One* (2009) **4**: doi:10.1371/journal.pone.0005843
70. Ehling J, Theek B, Gremse F, Baetke S, Möckel D, Maynard J, Ricketts SA, Grüll H, Neeman M, Knuechel R, et al. Micro-CT imaging of tumor angiogenesis: Quantitative measures describing micromorphology and vascularization. *Am J Pathol* (2014) **184**:431–441. doi:10.1016/j.ajpath.2013.10.014
71. Ashton JR, Clark DP, Moding EJ, Ghaghada K, Kirsch DG, West JL, Badea CT. Dual-energy micro-CT functional imaging of primary lung cancer in mice using gold and iodine nanoparticle contrast agents: A validation study. *PLoS One* (2014) **9**: doi:10.1371/journal.pone.0088129
72. Ekdawi SN, Stewart JMP, Dunne M, Stapleton S, Mitsakakis N, Dou YN, Jaffray

- DA, Allen C. Spatial and temporal mapping of heterogeneity in liposome uptake and microvascular distribution in an orthotopic tumor xenograft model. *J Control Release* (2015) **207**:101–111. doi:10.1016/j.jconrel.2015.04.006
73. Huang X, Liang X, Zhang Q, Wang D, Liu J, Zhang L, Zhou J. Quantifying the angiogenesis of C6 glioma in rats based on CT quantitative parameters. *Acta radiol* (2019) **60**:985–993. doi:10.1177/0284185118808073
 74. Han L, Huang X, Liu X, Deng Y, Ke X, Zhou Q, Zhou J. Evaluation of the anti-angiogenic effect of bevacizumab on rat C6 glioma by spectral computed tomography. *Acta radiol* (2020) doi:10.1177/0284185120916200
 75. Chang MP, Jin MG, Hyun JL, Kim MA, Kim HC, Kwang GK, Chang HL, Im JG. FN13762 murine breast cancer: Region-by-region correlation of first-pass perfusion CT indexes with histologic vascular parameters. *Radiology* (2009) **251**:721–730. doi:10.1148/radiol.2513081215
 76. Lu N, Di Y, Feng XY, Qiang JW, Zhang JW, Wang YG, Liu Y. CT perfusion with acetazolamide challenge in C6 gliomas and angiogenesis. *PLoS One* (2015) **10**: doi:10.1371/journal.pone.0121631
 77. Guan LM, Qi XX, Xia B, Li ZH, Zhao Y, Xu K. Early changes measured by CT perfusion imaging in tumor microcirculation following radiosurgery in rat C6 brain gliomas: Laboratory investigation. *J Neurosurg* (2011) **114**:1672–1680. doi:10.3171/2011.1.JNS101513
 78. Yeung TPC, Kurdi M, Wang Y, Al-Khazraji B, Morrison L, Hoffman L, Jackson D, Crukley C, Lee TY, Bauman G, et al. CT perfusion imaging as an early biomarker of differential response to stereotactic radiosurgery in C6 rat gliomas. *PLoS One* (2014) **9**: doi:10.1371/journal.pone.0109781
 79. Qi Q, Yeung TPC, Lee TY, Bauman G, Crukley C, Morrison L, Hoffman L, Yartsev S. Evaluation of CT perfusion biomarkers of tumor hypoxia. *PLoS One* (2016) **11**: doi:10.1371/journal.pone.0153569
 80. Kirschner S, Mürle B, Felix M, Arns A, Groden C, Wenz F, Hug A, Glatting G, Kramer M, Giordano FA, et al. Imaging of orthotopic glioblastoma xenografts in mice using a clinical CT scanner: Comparison with micro-CT and histology. *PLoS One* (2016) **11**: doi:10.1371/journal.pone.0165994
 81. Driscoll B, Keller H, Coolens C. Development of a dynamic flow imaging phantom for dynamic contrast-enhanced CT. *Med Phys* (2011) **38**:4866–4880. doi:10.1118/1.3615058
 82. Gordic S, Puipe GD, Krauss B, Klotz E, Desbiolles L, Lesurtel M, Müllhaupt B, Pfammatter T, Alkadhi H. Correlation between Dual-Energy and perfusion CT in patients with hepatocellular carcinoma. *Radiology* (2016) **280**:78–87. doi:10.1148/radiol.2015151560
 83. Knobloch G, Jost G, Huppertz A, Hamm B, Pietsch H. Dual-energy computed tomography for the assessment of early treatment effects of regorafenib in a preclinical tumor model: Comparison with dynamic contrast-enhanced CT and conventional contrast-enhanced single-energy CT. *Eur Radiol* (2014) **24**:1896–1905. doi:10.1007/s00330-014-3193-y
 84. Kang HJ, Kim SH, Bae JS, Jeon SK, Han JK. Can quantitative iodine parameters on DECT replace perfusion CT parameters in colorectal cancers? *Eur Radiol* (2018) **28**:4775–4782. doi:10.1007/s00330-018-5502-3
 85. Yu C, Li T, Zhang R, Yang X, Yang Z, Xin L, Zhao Z. Dual-energy CT perfusion imaging for differentiating WHO subtypes of thymic epithelial tumors. *Sci Rep*

- (2020) **10**: doi:10.1038/s41598-020-62466-1
86. Hou W, Xue Y, Tang W, Pan H, Xu M, Li X, Bi S, Shen Y, Qian Y, Yu Y. Evaluation of Tumor Hypoxia in C6 Glioma Rat Model With Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Acad Radiol* (2019) **26**:e224–e232. doi:10.1016/j.acra.2018.09.011
 87. Xuesong D, Wei X, Heng L, Xiao C, Shunan W, Yu G, Weiguo Z. Evaluation of neovascularization patterns in an orthotopic rat glioma model with dynamic contrast-enhanced MRI. *Acta radiol* (2017) **58**:1138–1146. doi:10.1177/0284185116681038
 88. Barth RF, 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**:299–312. doi:10.1007/s11060-009-9875-7
 89. Wippold FJ, Lubner M, Perrin RJ, Lämmle M, Perry A. Neuropathology for the neuroradiologist: Antoni A and Antoni B tissue patterns. *Am J Neuroradiol* (2007) **28**:1633–1638. doi:10.3174/ajnr.A0682
 90. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: Dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* (1999) **18**:5356–5362. doi:10.1038/sj.onc.1203035
 91. Giakoumettis D, Kritis A, Foroglou N. C6 cell line: The gold standard in glioma research. *Hippokratia* (2018) **22**:105–112. Available at: /pmc/articles/PMC6801124/?report=abstract [Accessed November 23, 2020]
 92. Coomber BL, Stewart PA, Hayakawa EM, Farrell CL, Del Maestro RF. A quantitative assessment of microvessel ultrastructure in C6 astrocytoma spheroids transplanted to brain and to muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* (1988) **47**:29–40. doi:10.1097/00005072-198801000-00004
 93. Lenting K, Verhaak R, ter Laan M, Wesseling P, Leenders W. Glioma: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* (2017) **133**:263–282. doi:10.1007/s00401-017-1671-4
 94. Watanabe K, Sakamoto M, Somiya M, Amin MR, Kamitani H, Watanabe T. Feasibility and limitations of the rat model by C6 gliomas implanted at the subcutaneous region. *Neurol Res* (2002) **24**:485–490. doi:10.1179/016164102101200221
 95. Moya UE, Brandan ME, Martínez-Dávalos A, Ruiz-Trejo C, Rodríguez-Villafuerte M. Parameterization of X-ray spectra appropriate for microCT scanners. *Nucl Instruments Methods Phys Res Sect A Accel Spectrometers, Detect Assoc Equip* (2010) **613**:152–155. doi:10.1016/j.nima.2009.10.150
 96. Castillo López JP. Optimización de resta por energía-dual de imágenes tomográficas preclínicas con medio de contraste, Tesis de Maestría en Ciencias (Física Médica), Universidad Nacional Autónoma de México, 2016.
 97. Castillo JP, Corona-Nieblas L, Berumen F, Ayala-Domínguez L, Medina LA, Brandan M-E. Optimization of dual-energy subtraction for preclinical studies using a commercial MicroCT unit. in *AIP Conference Proceedings* doi:10.1063/1.4954125
 98. Cassol F, Dupont M, Kronland-Martinet C, Ouamara H, Dawiec A, Boursier Y, Bonissent A, Clémens JC, Portal L, Debarbieux F, et al. Characterization of the imaging performance of a micro-CT system based on the photon counting XPAD3/Si hybrid pixel detectors. *Biomed Phys Eng Express* (2016) **2**:025003. doi:10.1088/2057-1976/2/2/025003
 99. Hill ML, Mainprize JG, Mawdsley GE, Yaffe MJ. A solid iodinated phantom material for use in tomographic x-ray imaging. *Med Phys* (2009) **36**:4409–4420.

- doi:10.1118/1.3213516
100. Evangelidis G, Psarakis E. Parametric image alignment using enhanced correlation coefficient maximization. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* (2008) **30**: doi:10.1109/TPAMI.2008.113
 101. Namati E, Thiesse J, Sieren JC, Ross A, Hoffman EA, McLennan G. Longitudinal assessment of lung cancer progression in the mouse using in vivo micro-CT imaging. *Med Phys* (2010) **37**:4793–4805. doi:10.1118/1.3476454
 102. Berumen Murillo F. Caracterización de un micro-tomógrafo de rayos-X para estudios preclínicos usando resta de imágenes con medio de contraste, Tesis de Maestría en Ciencias (Física Médica), Universidad Nacional Autónoma de México, 2016.
 103. Berumen F, Ayala-Domínguez L, Medina L-A, Brandan M-E. A method to optimize the image acquisition protocol of a MicroCT unit for preclinical studies using contrast-enhanced digital subtraction. in *AIP Conference Proceedings* doi:10.1063/1.4954123
 104. Holdsworth DW, Drangova M, Fenster A. A high-resolution XRII-based quantitative volume CT scanner. *Med Phys* (1993) **20**:449–462. doi:10.1118/1.597038
 105. Sánchez F, Orero A, Soriano A, Correcher C, Conde P, González A, Hernández L, Moliner L, Rodríguez-Alvarez MJ, Vidal LF, et al. ALBIRA: A small animal PETSPECTCT imaging system. *Med Phys* (2013) **40**: doi:10.1118/1.4800798
 106. Pahn G, Skornitzke S, Schlemmer HP, Kauczor HU, Stiller W. Toward standardized quantitative image quality (IQ) assessment in computed tomography (CT): A comprehensive framework for automated and comparative IQ analysis based on ICRU Report 87. *Phys Medica* (2016) **32**:104–115. doi:10.1016/j.ejmp.2015.09.017
 107. Du LY, Umoh J, Nikolov HN, Pollmann SI, Lee TY, Holdsworth DW. A quality assurance phantom for the performance evaluation of volumetric micro-CT systems. *Phys Med Biol* (2007) **52**:7087–7108. doi:10.1088/0031-9155/52/23/021
 108. Muñoz Molina ID. Distribución espacial de dosis y evolución espectral al interior de la mama durante estudios mamográficos determinados con dosímetros TLD-300, Tesis de Maestría en Ciencias (Física Médica), Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.
 109. López Pineda E. Maniquí para la evaluación de dosis glandular promedio por medio de dosimetría termoluminiscente, Tesis de Maestría en Ciencias (Física Médica), Universidad Nacional Autónoma de México, 2012.
 110. Lee SC, Kim HK, Chun IK, Cho MH, Lee SY, Cho MH. A flat-panel detector based micro-CT system: Performance evaluation for small-animal imaging. *Phys Med Biol* (2003) **48**:4173–4185. doi:10.1088/0031-9155/48/24/014
 111. Cruz-Bastida JP, Zhang R, Gomez-Cardona D, Hayes J, Li K, Chen GH. Impact of noise reduction schemes on quantitative accuracy of CT numbers. *Med Phys* (2019) **46**:3013–3024. doi:10.1002/mp.13549
 112. Tao S, Rajendran K, Zhou W, Fletcher JG, McCollough CH, Leng S. Improving iodine contrast to noise ratio using virtual monoenergetic imaging and prior-knowledge-aware iterative denoising (mono-PKAID). *Phys Med Biol* (2019) **64**: doi:10.1088/1361-6560/ab17fa
 113. Davidoiu V, Hadjilucas L, Teh I, Smith NP, Eschneider J, Lee J. Evaluation of noise removal algorithms for imaging and reconstruction of vascular networks using micro-CT. *Biomed Phys Eng Express* (2016) **2**:45015. doi:10.1088/2057-1976/2/4/045015

114. Eisa F, Brauweiler R, Hupfer M, Nowak T, Lotz L, Hoffmann I, Wachter D, Dittrich R, Beckmann MW, Jost G, et al. Dynamic contrast-enhanced micro-CT on mice with mammary carcinoma for the assessment of antiangiogenic therapy response. *Eur Radiol* (2012) **22**:900–907. doi:10.1007/s00330-011-2318-9
115. Boone JM, Velazquez O, Cherry SR. Small-animal X-ray dose from micro-CT. in *Molecular Imaging* (Mol Imaging), 149–158. doi:10.1162/1535350042380326
116. Ford NL, Thornton MM, Holdsworth DW. Fundamental image quality limits for microcomputed tomography in small animals. *Med Phys* (2003) **30**:2869–2877. doi:10.1118/1.1617353
117. Vajkoczy P, Schilling L, Ullrich A, Schmiedek P, Menger MD. Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: An intravital multifuorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* (1998) **18**:510–520. doi:10.1097/00004647-199805000-00006
118. Vajkoczy P, Menger MD. Vascular microenvironment in gliomas. *J Neurooncol* (2000) **50**:99–108. doi:10.1023/A:1006474832189
119. Feng J, Fitz Y, Li Y, Fernandez M, Puch IC, Wang D, Pazniokas S, Bucher B, Cui X, Solomon SB. Catheterization of the carotid artery and jugular vein to perform hemodynamic measures, infusions and blood sampling in a conscious rat model. *J Vis Exp* (2015) 51881. doi:10.3791/51881
120. Hau J, Van Hoosier GL eds. *Handbook of Laboratory Animal Science. Volume 1, Essential Principles and Practices*. 2nd Editio. CRC PRESS (2002).
121. Burgener FA, Hamlin DJ. Contrast enhancement in abdominal CT: Bolus vs. infusion. *Am J Roentgenol* (1981) **137**:351–358. doi:10.2214/ajr.137.2.351
122. Nolan TE, Klein HJ. Methods in vascular infusion biotechnology in research with rodents. *ILAR J* (2002) **43**:175–182. doi:10.1093/ilar.43.3.175
123. Hallouard F, Anton N, Choquet P, Constantinesco A, Vandamme T. Iodinated blood pool contrast media for preclinical X-ray imaging applications - A review. *Biomaterials* (2010) **31**:6249–6268. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.04.066
124. AMIDE: Amide's a Medical Imaging Data Examiner. Available at: <http://amide.sourceforge.net/> [Accessed October 13, 2020]
125. Balvay D, Troprès I, Billet R, Joubert A, Péoc'H M, Cuenod C, Le Due G. Mapping the zonal organization of tumor perfusion and permeability in a rat glioma model by using dynamic contrast-enhanced synchrotron radiation CT. *Radiology* (2009) **250**:692–702. doi:10.1148/radiol.2501071929
126. ImageJ Software. Available at: <https://imagej.nih.gov/ij/> [Accessed October 13, 2020]
127. Pérez-Cárdenas E. Comunicación personal. (2016)
128. Blocker SJ, Holbrook MD, Mowery YM, Sullivan DC, Badea CT. The impact of respiratory gating on improving volume measurement of murine lung tumors in micro-CT imaging. *PLoS One* (2020) **15**: doi:10.1371/journal.pone.0225019
129. Brat DJ, Van Meir EG. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab Invest* (2004) **84**:397–405. doi:10.1038/labinvest.3700070
130. Liu J, Zhou J, Li J, Zhang L, Zhang P, Liu B. Evaluation of rat C6 malignant glioma using spectral computed tomography. *Exp Ther Med* (2017) **14**:1037–1044. doi:10.3892/etm.2017.4613

ANEXO: ARTÍCULOS PUBLICADOS

Lista de artículos revisados por pares y publicados en revistas internacionales, anexados en esta tesis:





1. **Ayala-Domínguez L**, Pérez-Cárdenas E, Avilés-Salas A, Medina LA, Lizano M, Brandan ME. Quantitative Imaging Parameters of Contrast-Enhanced Micro-Computed Tomography Correlate with Angiogenesis and Necrosis in a Subcutaneous C6 Glioma Model. *Cancers* (2020) **12**:3417. doi: 10.3390/cancers12113417
2. **Ayala-Domínguez L**, Brandan ME. Quantification of tumor angiogenesis with contrast-enhanced x-ray imaging in preclinical studies: a review. *Biomed Phys Eng Express* (2018) **4**:062001. doi: 10.1088/2057-1976/aadc2d
3. **Ayala-Domínguez L**, Olmedo-Nieva L, Muñoz-Bello J O, Contreras-Paredes A, Manzo-Merino J, Martínez-Ramírez I, Lizano M. Mechanisms of vasculogenic mimicry in ovarian cancer. *Front Oncol* (2019) **9**: 998. doi: 10.3389/fonc.2019.00998

Lista de artículos publicados en actas de congreso, revisados y editados por los comités organizadores:

1. **Ayala Domínguez L**, Morales Oliver R, Medina LA, Brandan ME. Design of a bilateral filter for noise reduction in contrast-enhanced micro-computed tomography, in XVI Mexican Symposium on Medical Physics, *AIP Conference Proceedings* (2021), enviado.
2. **Ayala Domínguez L**, Pérez-Cárdenas E, Medina LA, Lizano M, Brandan ME. Contrast-enhanced microCT imaging in a tumor angiogenesis murine model, in XV Mexican Symposium on Medical Physics, *AIP Conference Proceedings* (2019) **2090**:030002. doi: 10.1063/1.5095897
3. Castillo JP, Corona-Nieblas L, Berumen F, **Ayala-Domínguez L**, Medina LA, Brandan ME. Optimization of dual-energy subtraction for preclinical studies using a commercial MicroCT unit, in XIV Mexican Symposium on Medical Physics, *AIP Conference Proceedings* (2016) **1747**: 080005. doi: 10.1063/1.4954125
4. Berumen F, **Ayala-Domínguez L**, Medina LA, Brandan ME. A method to optimize the image acquisition protocol of a MicroCT unit for preclinical studies using contrast-enhanced digital subtraction, in XIV Mexican Symposium on Medical Physics, *AIP Conference Proceedings* (2016) **1747**: 080003. doi: 10.1063/1.4954123

Article

Quantitative Imaging Parameters of Contrast-Enhanced Micro-Computed Tomography Correlate with Angiogenesis and Necrosis in a Subcutaneous C6 Glioma Model

Lízbeth Ayala-Domínguez ^{1,2} , Enrique Pérez-Cárdenas ³ , Alejandro Avilés-Salas ⁴,
Luis Alberto Medina ^{2,5} , Marcela Lizano ^{2,6,*} and María-Ester Brandan ^{5,*} 

- ¹ Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico; ayalaliz@gmail.com
 - ² Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer INCan/UNAM, Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México 14080, Mexico; medina@fisica.unam.mx
 - ³ Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México 14080, Mexico; epc_incan@yahoo.com.mx
 - ⁴ Departamento de Patología, Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México 14080, Mexico; aaviless@incan.edu.mx
 - ⁵ Departamento de Física Experimental, Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico
 - ⁶ Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico
- * Correspondence: lizano@unam.mx (M.L.); brandan@fisica.unam.mx (M.-E.B.)

Received: 13 October 2020; Accepted: 16 November 2020; Published: 18 November 2020



Simple Summary: Contrast-enhanced (CE) X-ray imaging techniques have been used to assess angiogenesis in patients and animal models of cancer in order to overcome the limitations of histological quantification of angiogenesis, such as spatial and temporal heterogeneity of tumors. Some studies have compared the quantitative imaging parameters obtained with static and dynamic CE X-ray imaging techniques, but their association with histological biomarkers of angiogenesis has never been directly compared. This study aimed to provide such a comparison in a suitable animal model for the study of angiogenesis, namely, the subcutaneous C6 glioma model. We found an agreement among the quantitative imaging parameters obtained with these techniques, and we also found an association between a set of them with angiogenesis and necrosis descriptors. This set of quantitative imaging parameters demonstrated a high potential to describe angiogenesis and could be used to assess treatment response in further studies with this animal model.

Abstract: The aim of this work was to systematically obtain quantitative imaging parameters with static and dynamic contrast-enhanced (CE) X-ray imaging techniques and to evaluate their correlation with histological biomarkers of angiogenesis in a subcutaneous C6 glioma model. Enhancement (E), iodine concentration (C_I), and relative blood volume (rBV) were quantified from single- and dual-energy (SE and DE, respectively) micro-computed tomography (micro-CT) images, while rBV and volume transfer constant (K^{trans}) were quantified from dynamic contrast-enhanced (DCE) planar images. C_I and rBV allowed a better discernment of tumor regions from muscle than E in SE and DE images, while no significant differences were found for rBV and K^{trans} in DCE images. An agreement was found in rBV for muscle quantified with the different imaging protocols, and in C_I and E quantified with SE and DE protocols. Significant strong correlations (Pearson $r > 0.7$, $p < 0.05$) were found between a set of imaging parameters in SE images and histological biomarkers: E and C_I in tumor periphery were associated with microvessel density (MVD) and necrosis, E and C_I in the complete tumor with MVD, and rBV in the tumor periphery with MVD. In conclusion,

quantitative imaging parameters obtained in SE micro-CT images could be used to characterize angiogenesis and necrosis in the subcutaneous C6 glioma model.

Keywords: angiogenesis; necrosis; C6 cells; quantitative imaging; micro-CT; contrast-enhanced imaging; relative blood volume; enhancement; iodine concentration

1. Introduction

Angiogenesis is a mechanism of tumor vascularization characterized by the formation of new blood vessels from the pre-existing vasculature [1]. Microvessel density (MVD) is a surrogate biomarker of angiogenesis, it is quantified by histology and provides useful prognostic and predictive information for the management of cancer patients [2,3]. The main limitation of histological quantification of MVD is related to the temporal and spatial heterogeneity of tumors. In order to overcome this limitation, contrast-enhanced (CE) imaging techniques have been proposed to evaluate the angiogenic status of tumors in vivo, taking advantage of the immature and leaky nature of angiogenic vessels [4].

Several imaging modalities have been used to evaluate tumor vasculature in the clinical setting and to assess the potential of the imaging parameters to provide diagnostic, prognostic, and predictive information, such as computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI), among others [4–6]. Dynamic contrast-enhanced MRI (DCE-MRI), dynamic susceptibility contrast-enhanced MRI (DSC-MRI), and perfusion CT are the most widely used techniques, and each one of them has advantages and disadvantages related to technical, biological, and clinical factors [4]. The relationship between the concentration of the contrast agent and the signal intensity in DCE-MRI and DCS-MRI is not linear and depends on the original tissue signal and on the parameters of the sequence used for image acquisition. On the contrary, signal intensity in contrast-enhanced (CE) X-ray imaging in general, including perfusion CT, is directly related to the attenuation properties of the tissues. Therefore, CE X-ray imaging techniques could provide a more direct interpretation of the imaging parameters in terms of their physiological meaning [4].

CE X-ray imaging techniques have been used to assess the association of quantitative imaging parameters with histological biomarkers of angiogenesis in preclinical studies with animals [7]. Dynamic contrast-enhanced (DCE) imaging with clinical CT scanners, i.e., perfusion CT, has been the most used CE X-ray imaging technique to study angiogenesis in animal models of cancer [8–11]. Static single- and dual-energy techniques (SE and DE, respectively) have been used with micro-CT or clinical CT scanners [12–15], or with planar imaging systems, such as in mammography [16]. Results from DCE studies are not consistent, since some have found a significant correlation between imaging and histological parameters of angiogenesis, while others have made evident that this association depends on how these parameters are quantified [8,9,13]. Another possible explanation of this variability in DCE studies could be related to the inadequate spatial resolution of clinical CT scanners for small animals imaging, which could affect the quantification of the arterial input function (AIF) required for kinetic analysis [17]. Static SE and DE techniques are less dependent on the spatial and temporal resolution of the scanners, but only a few preclinical studies are available with these protocols.

A few studies in cancer patients and one study in an animal model of glioma have addressed the comparison of quantitative imaging parameters obtained with SE, DE, and DCE techniques [6,18,19]; however, their potential to characterize tumor angiogenesis has never been directly compared. The aim of this work was to systematically quantify imaging parameters with standardized and optimized SE, DE, and DCE techniques, and to evaluate their correlation with histological biomarkers of angiogenesis in a subcutaneous C6 glioma model. This animal model is well suited for in vivo studies of angiogenesis, since its microvasculature has been previously described by imaging and histology [20–23]. Quantitative imaging parameters were obtained from SE and DE micro-CT images:

enhancement (E), iodine concentration (C_I), and relative blood volume (rBV). Volume transfer constant (K^{trans}) and rBV were quantified using a DCE protocol based on planar projections, in a similar fashion as digital subtraction angiography. The correlation of these quantitative imaging parameters and percent necrosis (PN), proliferation index (PI), and MVD was evaluated.

2. Results

2.1. Qualitative Evaluation of CE X-ray Images of the Subcutaneous C6 Glioma Model

Figure 1 shows different views of SE, DE, and DCE images of C6 glioma xenografts implanted in both flanks of Wistar rats. The left upper panel in Figure 1 shows baseline (pre-contrast), CE, and C_I SE micro-CT images; the right upper panel shows different views of low-energy (LE), high-energy (HE), and C_I DE micro-CT images; and the bottom panel shows baseline, CE, and C_I DCE planar images. CE SE and CE DCE images were obtained during continuous infusion of a clinical contrast agent; LE and HE images were obtained after the injection of a blood pool contrast agent. E SE and E DCE images were obtained after subtraction of the baseline image from the CE image, while E DE images were obtained after the weighted subtraction of the LE image from the HE image. E images are not shown since they are similar to C_I images under adequate windowing. C_I images (in mg of iodine per mL) were obtained after applying proper calibration functions to E images.

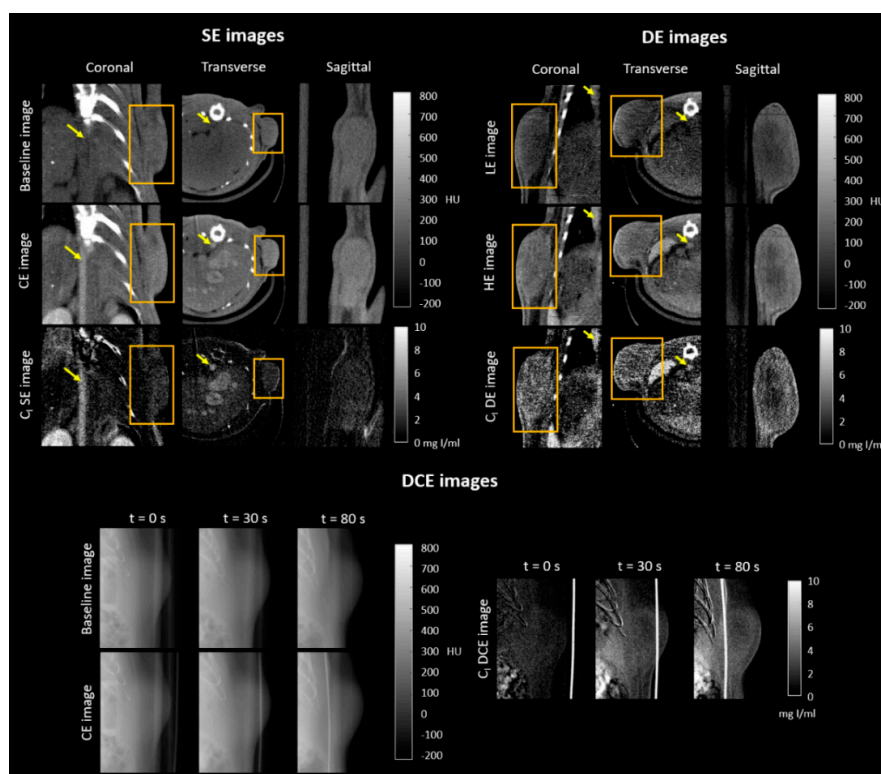


Figure 1. Qualitative evaluation of single-energy (SE) and dual-energy (DE) micro-computed tomography (micro-CT) images and dynamic contrast-enhanced (DCE) planar images of the subcutaneous C6 glioma model. Left upper panel: coronal, transverse, and sagittal views are shown for a baseline image, a contrast-enhanced (CE) image, and the iodine concentration (C_I) SE subtracted image. Right upper panel: coronal, transverse, and sagittal views are shown for a low-energy (LE) image, a high-energy (HE) image, and the C_I DE subtracted image. Abdominal aorta and tumor are indicated by an arrow and square, respectively, in the coronal and transverse views. Only the tumors were depicted in the sagittal views. Bottom panel: Three acquisition times are shown for a baseline planar image, a CE planar image, and the C_I DCE subtracted image. The presence of the catheter used for the administration of the contrast agent was observed in the images.

The abdominal aorta, liver vessels, kidneys, and tumor were visibly enhanced in the CE SE images in Figure 1 and were more clearly depicted in C_1 SE images. Images of the bed and bone were eliminated from the C_1 subtracted SE images, since image registration was performed before digital subtraction. In the C_1 DE images, enhancement was observed in the tumor, abdominal aorta, spleen, and liver, as shown in Figure 1; bone removal was not observed in C_1 DE images since the weighting factor for subtraction was chosen to eliminate tissue content, not bone [24]. A tumor section is shown in C_1 DCE images in Figure 1; it was observed that tumor enhancement increased with time and that bone removal was more effective for the image acquired at $t = 0$ s.

2.2. Quantitative Evaluation of CE X-ray Images of the Subcutaneous C6 Glioma Model

Attenuation, in Hounsfield units (HU), was evaluated in baseline and CE micro-CT images for the SE protocol, and in LE and HE micro-CT images for the DE protocol, for several volumes of interest (VOIs), namely, abdominal aorta, inferior vena cava (IVC), kidney cortex, liver, spleen, paraspinal muscle, and tumor regions (complete tumor (tumor), central tumor (core), and peripheral tumor (periphery)) as shown in Figure 2. Four animals ($n = 8$ tumors) were imaged with the SE protocol, and three animals ($n = 6$ tumors) with the DE protocol. Significant differences of attenuation values between baseline and CE images or between LE and DE images are indicated by (+) in Figure 2. Attenuation was higher in CE images for all VOIs, except spleen, while aorta, IVC, liver, spleen, and muscle showed significant differences between LE and DE images. Overall, these differences were related to the differential uptake of the contrast agents used with each imaging protocol.

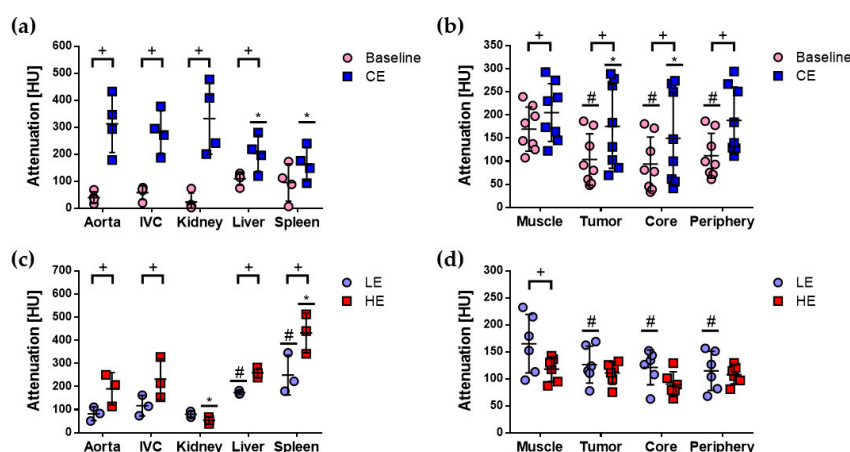


Figure 2. Quantitative evaluation of attenuation in SE and DE micro-CT images of the subcutaneous C6 glioma model. Mean and standard deviation are shown in scatter plots to compare attenuation values for baseline and CE images acquired with the SE protocol for (a) aorta, inferior vena cava (IVC), kidney, liver, and spleen and (b) muscle and tumor regions: complete tumor (tumor), central tumor (core), and peripheral tumor (periphery). Mean and standard deviation are shown in scatter plots to compare attenuation values for LE and DE images acquired with the DE protocol for (c) aorta, IVC, kidney, liver, and spleen and (d) muscle and tumor regions. Statistically significant differences ($p < 0.05$) were obtained with two-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparisons test and are indicated for each comparison: (+) baseline vs. CE or LE vs. HE; (#) aorta (or muscle) vs. volumes of interest (VOIs) in baseline and LE images; (*) aorta (or muscle) vs. VOIs in CE and HE images.

The attenuation in the aorta was compared to the attenuation in IVC, kidney, liver, and spleen for baseline, CE, LE, and HE images. All mean values were similar in baseline images; significant differences were found in liver, spleen, and kidney in CE, LE, and HE images, and are indicated by (*) or (#) in Figure 2a,c. Explicitly, mean attenuation was significantly higher in the aorta than in liver and spleen in CE images, significantly lower in the aorta than in liver and spleen in LE images, and lower in the aorta than in spleen in HE images. Mean attenuation was also significantly higher in the aorta than in

kidney in HE images. These differences were expected since it is known that the clinical contrast agent used with the SE protocol is cleared via the kidneys, while the blood pool contrast agent used with the DE protocol is cleared via the liver and spleen [7].

Significant differences were found between the attenuation in muscle and the tumor regions in baseline, CE, and LE images and are indicated by (*) or (#) in Figure 2b,d. These differences suggested that tumor regions can be distinguished from muscle from baseline, CE, and LE images; however, it must be noted that muscle showed similar or higher mean attenuation values than the tumor regions, which could prevent their visualization directly from these images.

E and C_1 values were quantified in the same VOIs as attenuation and are shown in Figure 3. Statistically significant differences of E and C_1 mean values between SE and DE images were found for kidney and spleen, as indicated by (+), and were related to the differences in their elimination pathways. E and C_1 mean values for the other VOIs were not significantly different among SE and DE images, which reflected the consistency of the different imaging protocols to quantify similar imaging parameters in the same animal model.

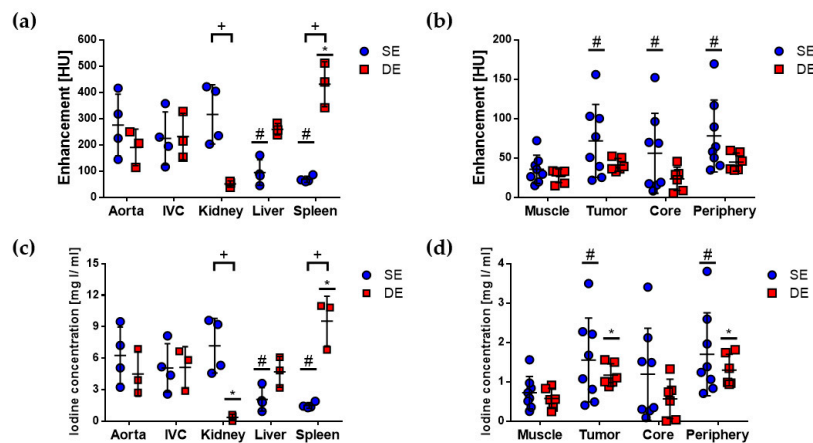


Figure 3. Quantitative evaluation of enhancement (E) and C_1 in SE and DE micro-CT images of the subcutaneous C6 glioma model. Mean and standard deviation are shown in scatter plots to compare E in (a) aorta, IVC, kidney, liver, and spleen and (b) muscle and tumor regions: complete tumor (tumor), central tumor (core), and peripheral tumor (periphery), quantified in SE and DE subtracted images. Mean and standard deviation are shown in scatter dot plots to compare C_1 in (c) aorta, IVC, kidney, liver, and spleen and (d) muscle and tumor regions, quantified in SE and DE subtracted images. Statistically significant differences ($p < 0.05$) were evaluated with two-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparisons test and are indicated for each comparison: (+) SE vs. DE, for all VOIs; (#) aorta (or muscle) vs. VOIs in SE images; (*) aorta (or muscle) vs. VOIs in DE images.

E and C_1 mean values were significantly different between the aorta and liver and spleen in SE images, as indicated by (#), and between the aorta and spleen in DE images, as indicated by (*), in Figure 3a,c. C_1 in the aorta was also significantly different from C_1 in the kidney in DE images. It can be observed that there were marked differences in E and C_1 values in the aorta among the different animals for both SE and DE protocols, which reflected the biological variability in this kind of studies. That is why it could be important to introduce a quantitative parameter such as rBV that takes this variability into account.

The comparison of E and C_1 mean values between muscle and tumor regions yielded some differences between SE and DE images, particularly, significant differences between E in muscle and the tumor regions were only observed in SE images, as indicated by (#) in Figure 3b, while significant differences between C_1 in muscle and the tumor regions were observed in both SE and DE images, as indicated by (#) and (*) in Figure 3d. This suggested that C_1 could be a more sensitive parameter than E for distinguishing between muscle and the tumor regions with both imaging protocols. These

results indicated that quantitative E and C_1 images acquired with SE and DE protocols could allow better visualization of the tumor regions than attenuation images. This was inferred qualitatively from Figure 1, in which tumors and other enhanced structures were more clearly depicted in C_1 images than in CE, LE, or HE images.

Two animals ($n = 4$ tumors) were imaged with the DCE protocol. DCE planar images (one per second) were analyzed in the time interval 0–80 s during the continuous infusion of the contrast agent and were used to obtain time– C_1 curves of the left ventricle (LV), muscle, and tumor. Figure 4 shows representative time– C_1 curves for one animal; a constant C_1 was reached after the initial slope in the time– C_1 curve of the LV, while a constant C_1 increase was observed for tumor and muscle. Patlak analysis of the tumor data is shown in Figure 4b and it is described in Materials and Methods.

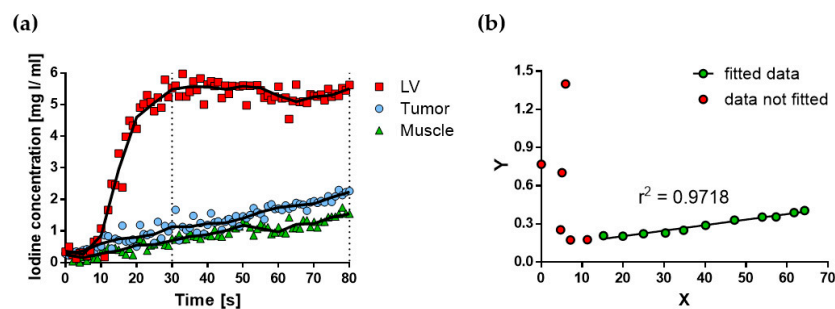


Figure 4. Quantitative evaluation of the DCE planar images of the subcutaneous C6 glioma model. (a) Time– C_1 curves of the left ventricle (LV), tumor, and muscle, during the continuous infusion of a clinical contrast agent. Original data are shown (symbols), as well as smoothed data (solid lines). (b) Patlak analysis of the tumor data. Volume transfer constant (K^{trans}) and relative blood volume (rBV) were quantified as the slope and the intercept, respectively, of the fitted line to data in the time interval of 30–80 s (green circles).

2.3. Quantification of rBV and K^{trans}

The abdominal aorta was used as the AIF to quantify rBV from the C_1 SE and C_1 DE micro-CT images, while the LV was used as the AIF to quantify rBV and K^{trans} from kinetic analysis of time– C_1 curves from DCE planar images. Figure 5 shows the results of the quantification of rBV and K^{trans} for these imaging protocols. The differences of rBV among the three imaging protocols were not statistically significant in muscle, central tumor, and peripheral tumor. In complete tumor, statistically significant differences were found in the rBV between DCE and the other protocols, as indicated by (+) in Figure 5a. These differences could be due to the inherent difficulties in evaluating the actual complete tumor in C_1 DCE planar images.

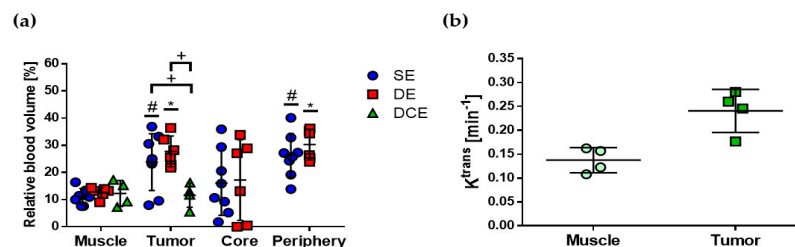


Figure 5. Quantitative imaging parameters from SE, DE, and DCE images of the subcutaneous C6 glioma model. (a) Mean and standard deviation are indicated in the scatter plot of rBV, which was quantified from SE ($n = 8$), DE ($n = 6$), and DCE ($n = 4$) images. (b) Mean and standard deviation are indicated in the scatter plot of K^{trans} , which was quantified from DCE images ($n = 4$). Statistically significant differences ($p < 0.05$) were evaluated with two-way ANOVA and t -test for rBV and K^{trans} , respectively, and are indicated for each comparison: (+) SE vs. DE, SE vs. DCE, DE vs. DCE; (#) muscle vs. VOIs in SE images; (*) muscle vs. VOIs in DE images.

A statistically significant difference was found between the mean rBV value in muscle and complete and peripheral tumor for SE and DE protocols, as indicated by (#) and (*) in Figure 5a, respectively, which was similar to the result for C_1 shown in Figure 3d. For the central tumor, this difference with muscle was not significant, mainly due to the wide range in rBV and C_1 values found in this tumor region. The difference in mean K^{trans} values between muscle and tumor was not statistically significant. Table 1 summarizes the results for E, C_1 , rBV, and K^{trans} evaluated in muscle and the tumor regions of the subcutaneous C6 glioma model and obtained with the CE X-ray imaging protocols explored in this work; significant differences with muscle are also indicated with (*). Together, these results suggested that C_1 and rBV, quantified in SE and DE micro-CT images, allow better discernment between muscle and the tumor regions, both qualitatively and quantitatively, than attenuation, E, or the kinetic parameters quantified with DCE planar images.

Table 1. Quantitative imaging parameters in muscle and the tumor regions of the subcutaneous C6 glioma model obtained with single-energy (SE), dual-energy (DE), and dynamic contrast-enhanced (DCE) images.

Imaging Protocol	Imaging Parameter	Muscle	Tumor	Core	Periphery
SE ($n = 8$)	E (HU)	35.5 ± 6.3	71.6 ± 16.3 *	55.8 ± 17.9 *	77.9 ± 16.1 *
	C_1 (mg I/mL)	0.72 ± 0.14	1.55 ± 0.37 *	1.19 ± 0.41	1.69 ± 0.37 *
	rBV (%)	11.1 ± 1.0	23.8 ± 3.6 *	16.1 ± 4.2	26.3 ± 2.8 *
DE ($n = 6$)	E (HU)	27.2 ± 3.4	41.1 ± 3.3	23.4 ± 6.0	44.7 ± 4.6
	C_1 (mg I/mL)	0.57 ± 0.10	1.17 ± 0.11 *	0.56 ± 0.20	1.29 ± 0.16 *
	rBV (%)	12.6 ± 0.7	27.7 ± 2.3 *	17.2 ± 6.0	30.2 ± 2.2 *
DCE ($n = 4$)	rBV (%)	12.2 ± 2.3	11.6 ± 2.2		
	K^{trans} (min ⁻¹)	0.13 ± 0.01	0.24 ± 0.02		

E, enhancement; C_1 , iodine concentration; rBV, relative blood volume; K^{trans} , volume transfer constant. Values are expressed as mean ± standard error of the mean; * $p < 0.05$, compared to muscle.

2.4. Histological Validation of Quantitative Imaging Parameters

General histological features of the C6 glioma model were identified in tissue sections of tumors stained with hematoxylin and eosin (H&E) and are shown in Figure 6a,b. Figure 6a shows highly cellular tumors with pleomorphism and zones of coagulative necrosis lined by palisading neoplastic cells, and Figure 6b shows a complex form of microvascular hyperplasia with peri-endothelial growth patterns. Another characteristic feature of the C6 glioma model is shown in Figure 6c,d, in which tissue sections of tumors stained with an anti-CD34 antibody, used to identify microvessels and quantify MVD, show increased MVD at the periphery of necrotic areas.

Tumor characterization of the subcutaneous C6 glioma model was performed by evaluating PN, PI and MVD. Images e and f from Figure 6 show representative immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from tumors with 50% and 95% PI, respectively. Images g and h from Figure 6 show representative immunohistochemical staining of CD34 from tumors with 4.4 vessels/high-power field (HPF) and 18.3 vessels/HPF, respectively. Table 2 summarizes the histological findings of the subcutaneous C6 glioma model for each imaging protocol; no statistically significant differences were found among the groups for each imaging protocol for these histological biomarkers. Additional images of tumors with the minimum and maximum values of PN, PI, and MVD for the SE, DE, and DCE imaging protocols are provided in Supplementary Materials Figures S1–S3, respectively.

Pearson correlation coefficient was calculated for pairs of histological biomarkers (PN, PI, and MVD) and quantitative imaging parameters (E, C_1 , rBV, and K^{trans}) for the three tumor regions and for each imaging protocol to evaluate their association. Significant correlations ($p < 0.05$) were found for the pairs of parameters shown in Figure 7. No significant associations were found for imaging parameters quantified in DE or DCE images. For SE images, E and C_1 in tumor periphery were

associated with MVD and necrosis, E and C_I in the complete tumor with MVD, and rBV in the tumor periphery with MVD.

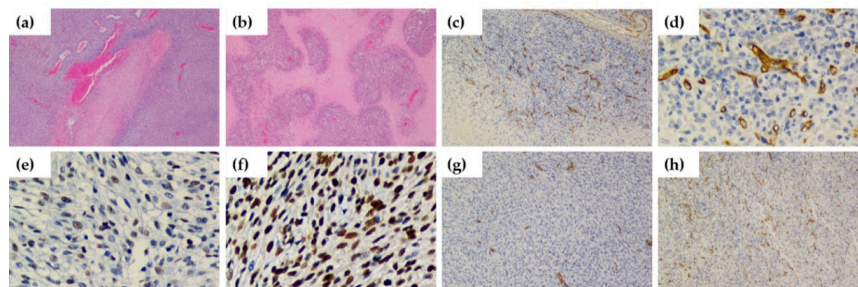


Figure 6. Histological characterization of the subcutaneous C6 glioma model. (a) Highly cellular tumors with pleomorphism and zones of coagulative necrosis lined by palisading neoplastic cells were observed in tissue sections of the tumors (hematoxylin and eosin (H&E), 100×). (b) Complex form of microvascular hyperplasia with peri-endothelial growth patterns (H&E, 100×). An increased number of microvessels were observed near necrotic areas in tissue sections of tumors, shown with magnifications of (c) 100× and (d) 400×. Representative immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from tumors with (e) 50% proliferation index (PI) (400×) and (f) 95% PI (400×). Representative immunohistochemical staining of CD34 from tumors with (g) microvessel density (MVD) = 4.4 vessels/high-power field (HPF) (100×) and (h) MVD = 18.3 vessels/HPF (100×).

Table 2. Histological characterization of subcutaneous C6 glioma tumors that were imaged with single-energy (SE), dual-energy (DE), and dynamic contrast-enhanced (DCE) protocols.

Imaging Protocol	Percent Necrosis (%)	Proliferation Index (%)	MVD (Vessels/HPF)
SE ($n = 8$)	38.1 ± 10.5	68.7 ± 8.4	6.9 ± 1.9
DE ($n = 6$)	28.3 ± 7.6	70.8 ± 8.2	3.5 ± 1.0
DCE ($n = 4$)	26.2 ± 9.4	78.7 ± 6.5	3.9 ± 1.5

MVD, microvessel density; HPF, high-power field. Values are expressed as mean ± standard error of the mean.

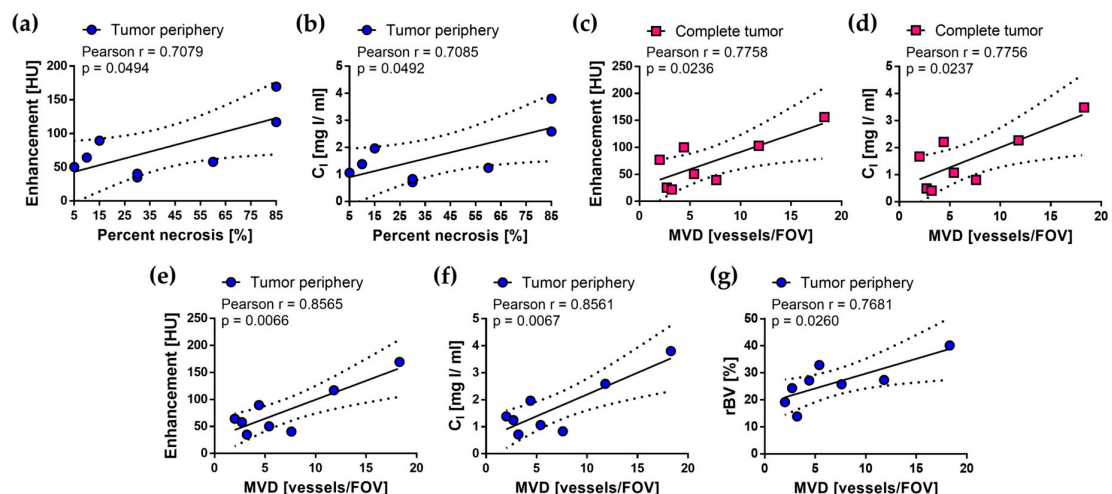


Figure 7. Histological validation of the quantitative imaging parameters from SE images of the subcutaneous C6 glioma model. Strong and significant correlations were found for seven sets of imaging and histological parameters: percent necrosis and (a) enhancement and (b) C_I at tumor periphery; MVD and (c) enhancement and (d) C_I in complete tumor; MVD and (e) enhancement, (f) C_I , and (g) rBV at tumor periphery. Pearson r and p -value for each correlation are indicated in the graphs, as well as 95% confidence intervals (dotted lines).

3. Discussion

The aim of this work was to systematically quantify radiological imaging parameters with SE, DE, and DCE techniques, and to evaluate their correlation with histological biomarkers of angiogenesis in a subcutaneous C6 glioma model. In order to obtain reliable quantitative imaging parameters, we used SE, DE, and DCE imaging protocols that were previously standardized and optimized [25–27]. Our results showed that CE X-ray imaging improved the visualization of the tumor regions. This was corroborated quantitatively for SE and DE images since C_I and rBV were significantly different between muscle and the tumor regions. A consistency of the quantitative imaging parameters was observed among the different techniques since similar values were found for E and C_I between SE and DE images in vascular structures, muscle, and tumor regions. Additionally, similar values were observed for rBV in muscle among SE, DE, and DCE images. Finally, we evaluated the association between the histological biomarkers of angiogenesis and the imaging parameters quantified in SE, DE, and DCE images and found a set of significant correlations for SE images.

The C6 glioma model resembles the histological features of human glioblastoma (GBM) [21,28,29], which presents necrotic areas surrounded by tumor cells, creating pseudopalisades [21]. Interestingly, it has been shown that these cells induce angiogenesis by the overexpression of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) [20], which is the master regulator of angiogenesis [30]. Therefore, an increased MVD is generally found around necrotic areas. It has been observed that cells at the tumor periphery also overexpress VEGF-A, yielding a high MVD in this tumor region [28]. The histological features of the C6 glioma model were observed in tissue sections of the tumors evaluated in this work. Moreover, the differences between central and peripheral tumor were also observed in the CE and C_I images, and in the E, C_I , and rBV values.

The use of subcutaneous versus orthotopic C6 glioma models has been widely debated and it has been demonstrated that both models have similar histological features, and microvessel morphology and permeability [31–33]. Among the advantages of the subcutaneous model versus the orthotopic model are the easier implantation of the cells, tumor volume assessment, and tumor resection. One disadvantage is the reduced time before tumor regression, which is governed by an alloimmune response against the implanted cells and could be an important limitation for survival studies [32]. Another disadvantage of the subcutaneous model is the lack of the blood–brain barrier (BBB) [33], which could yield different results among models in drug delivery studies, including CE imaging, depending on the chemical nature and molecular weight of the evaluated drugs.

Previous studies of the orthotopic C6 glioma model have used DE [14,15] or DCE imaging techniques [9–11], and general findings among them are in agreement with our observations in the subcutaneous C6 glioma model. Both animal models allowed to obtain CE X-ray images that improved lesion detection and reflected the heterogeneity in E, C_I , or rBV values quantified in the different tumor regions, despite the presence of the BBB in the orthotopic model, which could be explained by the similarities in microvessel morphology and permeability between these two animal models [31].

Other studies have evaluated the quantitative imaging parameters with DCE [8], SE [13,16], and DE [12] imaging using different cell lines to generate subcutaneous tumors, and their general findings are also in agreement with our observations in the subcutaneous C6 glioma model. This observation is in accordance with Holash et al. [28], who demonstrated the consistency of vascular growth patterns between the orthotopic C6 glioma model and other animal models, as well as one human cancer. In another study, Ehling et al. [12] compared the quantitative imaging parameters of tumors obtained with several cell lines (four) with multiple angiogenic phenotypes, and only one imaging protocol. Interestingly, the rBV quantified for each of the four animal models was significantly associated with MVD (quantified with CD31), and this association was also significant when all the tumors were evaluated together [12]. These findings suggest that the quantitative imaging parameters obtained with CE X-ray imaging are capable of describing the angiogenic status of the animal model evaluated, regardless of the origin of the cell line or its angiogenic phenotype. In this manner, the subcutaneous C6 glioma model was expected to be equally useful as the orthotopic

model or other cell lines to biologically validate the quantitative imaging parameters evaluated in this work. However, care must be taken when comparing different studies since the absolute value of the quantitative imaging parameters is highly dependent on the angiogenic phenotype of the evaluated cell line [12,28].

A few studies have compared the quantitative imaging parameters obtained with SE, DE, and DCE imaging protocols in order to elucidate their similarity [19] and their potential to provide diagnostic information [6] or to assess treatment response [18]. In this work, we compared the imaging parameters obtained with SE, DE, and DCE protocols and found a consistency among them, which is in agreement with previous findings in patients [6,19] and one animal model of cancer [18]. Kang et al. [19] evaluated patients with colorectal cancer and found significant correlations between C_1 quantified in DE images and blood volume (BV) and permeability surface area product (PS) quantified in DCE images. Knobloch et al. [18] evaluated an animal model in which GS9L glioma cells were implanted in the foreleg of the animals and found significant correlations among imaging parameters in SE (attenuation), DE (C_1), and DCE CT (blood flow (BF) and PS) images. The consistency among the imaging parameters found in our work suggested that if a change is observed in the quantitative parameters, it would be more likely related to a biological process than to a difference in its quantification, which is a major concern in quantitative imaging and it can be achieved by optimizing and standardizing the processes involved in image acquisition and analysis [34,35].

Despite the fact that the imaging parameters obtained from SE, DE, and DCE images have been compared in the studies mentioned above, to our knowledge, their association with histological biomarkers of angiogenesis has not been evaluated in the light of these comparisons. Moreover, only a few DE and DCE studies have evaluated the correlation of angiogenesis biomarkers and quantitative imaging parameters of the C6 glioma model. In this work, we evaluated the association of the imaging parameters with PN, PI, and MVD since they are relevant histological biomarkers in the clinical management of GBM [36,37].

We found significant positive correlations between PN and E and C_1 at the tumor periphery in the SE images. These results are in apparent contradiction with Qi et al. [11], since they found a significant negative correlation between PN and BV and BF, quantified from DCE CT images of the C6 glioma model. We hypothesize that this discrepancy is related to the differences in the kinetic models used to quantify the imaging parameters. However, further studies are required in order to demonstrate this assumption. On the other hand, DCE-MRI has been widely used to differentiate necrosis induced by tumor progression and necrosis induced after radiation treatment in GBM animal models [38]. However, the association of PN with the MRI imaging parameters has not been widely investigated in GBM animal models. Zoula et al. [39] found a significant positive correlation between PN and the intensity of the lipid signal in proton magnetic resonance spectroscopy in an orthotopic C6 glioma model. In another study, Bradley et al. [40] also found a significant positive correlation between PN and K^{trans} (adjusted by fit failures) in the Hras5 animal model. Both results are in agreement with our findings for the SE imaging protocol, but they are not directly comparable due to the different nature of the signals used to form the images.

Liu et al. [14] found significant correlations between PI (obtained with anti-Ki67) and C_1 quantified with a DE CT protocol, and suggested that areas with high PI increased the local blood flow and permeability. In studies with patients, a significant positive correlation has been found between several DCE-MRI imaging parameters and PI [41]. However, there is a lack of studies for the evaluation of tumor cell proliferation with MRI imaging in GBM animal models. Hou et al. [23] found a significant positive correlation between K^{trans} and PI (obtained with anti-PCNA) evaluated with DCE-MRI in an orthotopic C6 glioma model. In our study, we did not find significant correlations between PI (obtained with anti-PCNA) and any of the imaging parameters for the tumor regions evaluated with SE, DE, and DCE imaging protocols, probably because the viable tumor exhibited a limited range of PI values.

MVD has been associated with imaging parameters from DE and DCE images of the C6 glioma model [9,10,15]. Huang et al. [15] found a significant correlation between MVD (anti-CD105) and C_1 quantified from DE CT images. Guan et al. [9] quantified BF and BV from DCE CT images and found significant correlations with MVD (anti-CD34). Lu et al. [10] also used a DCE CT technique and found a significant correlation between MVD (anti-CD105) and BF and BV. We found that MVD (anti-CD34) was associated with E and C_1 quantified in the complete tumor, and also with E, C_1 , and rBV quantified in the tumor periphery of SE micro-CT images. However, we found no significant associations of the DE and DCE imaging parameters and MVD, which could be related to the limitations found in our study. Several DCE-MRI studies have evaluated the association of the quantitative kinetic parameters and MVD in the orthotopic C6 glioma model. Hou et al. [23] found a significant positive correlation between K^{trans} and MVD (anti-CD34), which is in agreement with our findings with the SE imaging protocol. Recently, DCE-MRI has also been used to evaluate the different growth patterns described in GBM [22].

The first limitation in our study was the small sample size for each imaging protocol, which limited the statistical power of the study and thus it might be difficult to extrapolate our results. Second, there were technical limitations in the implementation of DE and DCE imaging protocols. For the DE protocol, only a reduced kilovoltage range was available in our scanner (X-ray tube voltage 30–45 kV), which was not optimal for selecting radiation qualities with effective energies around the K-edge of iodine, and thus the contrast obtained in DE images was limited. Another limitation in the DE imaging protocol was the reduced iodine concentration of the blood pool contrast agent that we used (50 mg I/mL) compared with the iodine concentration of the clinical contrast agent used in SE and DCE protocols (300 mg I/mL), which could explain the similar attenuation and enhancement values observed between muscle and the tumor regions in DE images.

The major limitation to implement DCE protocols in our scanner was the temporal resolution, since a complete micro-CT image requires at least a 2-min acquisition. Therefore, we used planar projections in order to achieve a high temporal resolution that allowed us to image the fast kinetics of the distribution of the clinical contrast agent within the animals; however, the superimposition of the tissues in the planar images made difficult the quantification of C_1 in the entire tumor volume. The most common administration technique of the contrast agent in clinical perfusion studies is bolus injection. However, we used continuous infusion instead of bolus injection to improve the visualization of the enhanced tissues in the DCE planar images, since a constant increment of C_1 in the tissues can be achieved with continuous infusion compared with a higher, but rapidly decaying, C_1 achieved with the bolus injection [42]. The kinetic parameters quantified from the Patlak analysis of the delayed phase of time- C_1 curves, either after bolus injection or during continuous infusion of the contrast agent, are expected to be similar, since the C_1 quantified in the tissues is independent of the administration technique in the delayed times of image acquisition [42].

Another limitation in our study was related to the radiation dose inherent to X-ray imaging. The absorbed dose could cause a damage to the animals if it is not properly quantified and optimized; moreover, it can also bias the study by affecting the development of the tumor under evaluation [7]. In order to limit the effects of the dose delivered in our studies, we previously optimized the radiological parameters for image acquisition that provided the highest image quality and the lowest radiation dose to the animals [25]. The radiation dose to water measured at the isocenter for the CE X-ray imaging protocols used in our study ranged from 213 mGy to 680 mGy and it was below the lethal dose $LD_{50/30}$ for mice (5.0–7.6 Gy) [43].

Despite these limitations, the present study provided useful insight on the study of angiogenesis with CE X-ray imaging, particularly in the subcutaneous C6 glioma model. Future studies could explore the potential of C_1 and rBV in SE images to provide prognostic and predictive information by assessing treatment response, as well as to provide diagnostic information such as to distinguish between benign and malignant tumors in suitable animal models of cancer.

4. Materials and Methods

4.1. Subcutaneous C6 Glioma Animal Model

C6 glioma cells (ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured in RPMI 1640 medium (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum, at 37 °C with 5% CO₂. Tumors were induced in immunocompetent male Wistar rats (average body weight ± standard deviation = 263 ± 21 g) by subcutaneous inoculation of 3 × 10⁶ C6 cells suspended in 200 µL of phosphate buffered saline (PBS), into their left and right flanks. Animals were kept in a pathogen-free environment and fed with autoclaved food and water ad libitum. Prior to imaging, each animal was anesthetized with isoflurane (3% in 100% oxygen), and then the right external jugular vein was catheterized for contrast agent administration with a heparinized PE10 polyethylene tube (Scientific Commodities Inc., Lake Havasu City, AZ, USA) and a syringe pump (KDS100, KD Scientific Inc., Holliston, MA, USA). CE X-ray images of the animals were acquired 14 ± 3 days post-inoculation of the C6 cells (mean ± standard deviation). All experimental procedures with the animals were reviewed and approved by the Ethics Committee and the Institutional Committee for Animal Welfare of the National Institute of Cancerology, Mexico, where all the experiments were carried out (approval number: (018/051/IBI) (CEI/1294/18)). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in the experiments.

4.2. Albira ARS Micro-CT Scanner

The micro-CT scanner of the trimodal PET/SPECT/CT Albira ARS preclinical system (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) was used for image acquisition. Tomographic images were reconstructed into a 750 × 750 × 657 matrix (100 µm voxel size) with the simultaneous iterative reconstruction technique (SIRT 2D) implemented in-house with the ASTRA toolbox in Matlab R2018b (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA), running on a Dell Precision Workstation M4800 with Intel Core i7-4810MQ CPU and NVIDIA Quadro K1100M GPU. A calibration to HU was performed on each reconstructed micro-CT image using the attenuation value for water for each imaging protocol.

4.3. Imaging Protocols

SE, DE, and DCE acquisition protocols were previously optimized and standardized for small animal imaging with the Albira ARS micro-CT scanner [25–27]. The radiological parameters for image acquisition (X-ray tube voltage (kV), current (mA), additional filter, and number of projections) were chosen as the ones which provided the highest contrast-to-noise ratio and the lowest radiation dose; and the reconstruction algorithm was chosen in terms of quantitative image quality metrics. Optimal iodine dose, injection volume, and time for image acquisition after the injection of the contrast agents were also standardized.

4.3.1. SE Protocol

SE micro-CT images were acquired with 45 kV, 0.8 mA, and 400 projections. A baseline (pre-contrast) image of the animal was acquired; then, a second CE image was acquired during continuous infusion of a clinical contrast agent (Omnipaque 300, GE Healthcare, Wauwatosa, WI, USA; average dose = 2.4 mg of iodine/g of body weight (b.w.), infusion rate = 0.5 mL/min). Total radiation dose to water measured at the isocenter was 680 mGy for this protocol.

4.3.2. DE Protocol

LE micro-CT images were acquired with 30 kV, 0.8 mA, and 250 projections, while HE micro-CT images were acquired with 45 kV, additional molybdenum filter (25 µm thick, 99.9% purity), 0.8 mA, and 250 projections. HE image was acquired approximately 12 min after the administration of a blood pool contrast agent (Fenestra VC, MediLumine Inc., Montreal, QC, Canada; average dose = 0.4 mg of

iodine/g b.w.); then, LE image was acquired immediately after the molybdenum filter was removed. For this protocol, dose to water at the isocenter was 213 mGy.

4.3.3. DCE Protocol

The first 180 projections of a micro-CT image with 45 kV, 0.8 mA, and 1000 projections over 360° (one projection per second) were acquired as part of the DCE protocol. This method was chosen because it provided better temporal resolution than acquiring planar images directly (all at 0°) or a complete micro-CT image, which required large acquisition times due to the technical configuration of the scanner. Baseline projections were acquired first and then, CE projections were acquired during the continuous infusion of a clinical contrast agent (Omnipaque 300, GE Healthcare, Wauwatosa, WI, USA; average dose = 1.2 mg of iodine/g b.w., infusion rate = 0.5 mL/min). Total radiation dose to water at the isocenter for the DCE protocol was 340 mGy.

4.4. Image Analysis

4.4.1. Image Subtraction

SE and DCE images were obtained after subtraction of the baseline image from the CE image, while DE images were obtained after weighted subtraction of HE and LE images: $DE = HE - \alpha LE$, where $\alpha = 0.55$ was the weighting factor chosen to eliminate most of the unenhanced tissue content in the DE image [24]. Baseline images were registered to CE images (and LE images to HE images) with affine transformation before subtraction [44]. Proper calibration functions were obtained with iodinated phantoms [45] and applied to subtracted SE, DE, and DCE images in order to obtain C_I images.

4.4.2. Quantification of Imaging Parameters in SE and DE Micro-CT Images

Attenuation, in HU, was evaluated in baseline and CE micro-CT images for the SE protocol, and in LE and HE micro-CT images for the DE protocol. Amide software [46] was used to draw ellipsoidal VOIs in abdominal aorta, inferior vena cava, kidney, liver, spleen, paraspinal muscle, and tumor regions, i.e., complete tumor (tumor), central tumor (core), and peripheral tumor (periphery). Table S1 indicates the average size of the VOIs used to quantify the imaging parameters in SE and DE micro-CT images. The central tumor was defined as an ellipsoid with half the dimensions of the complete tumor. The imaging parameters in the peripheral tumor were averaged from four VOIs that were drawn in the tumor volume outside the central tumor. All VOIs were placed in the same position for each animal, and the same size of the VOI was used for a given organ or tissue among all animals. E and C_I values were quantified in E and C_I images, respectively; and the same VOIs used to quantify attenuation were used to quantify E and C_I for a given animal. The C_I quantified in the abdominal aorta was used to obtain the rBV values: $rBV = 100 \times (C_I/C_{I,aorta})$.

4.4.3. Quantification of Imaging Parameters in DCE Planar Images

Patlak analysis was used to quantify rBV and K^{trans} from time- C_I curves. This method considers a two-compartmental model in which the contrast agent transits from the intravascular space to the extravascular-interstitial space, as dictated by K^{trans} , and then accumulates in the extravascular-interstitial space, described by rBV, considering that no back flux exists, i.e., the second compartment is irreversible [47]. This theoretical assumption can only be achieved under two experimental conditions: a time after bolus injection of the contrast agent, or during its continuous infusion. The latter condition was used in this work.

Time- C_I curves were obtained for three VOIs (left ventricle, triceps muscle, and complete tumor) from the C_I DCE images with ImageJ software [48]. To quantify the kinetic parameters, the following expression was obtained from the time- C_I curves (1) [47]:

$$\frac{C_{I,tissue}(t)}{C_{I,AIF}(t)} = K^{trans} \frac{\int_{T_1}^{T_2} C_{I,AIF}(t) dt}{C_{I,AIF}(t)} + rBV, \quad (1)$$

in which $C_{I,tissue}(t)$ and $C_{I,AIF}(t)$ represent the time- C_I curves of tissue (muscle or tumor) and AIF (LV), respectively. It can be noted that Equation (1) has the form of a linear equation, in which the kinetic parameters K^{trans} and rBV represent the slope and intercept, respectively. Therefore, an estimation of the kinetic parameters can be obtained after a linear regression analysis of Equation (1) in the time interval T_1 - T_2 , in which the condition of the irreversible compartment is met. Only data from the time interval 30–80 s were considered for linear regression analysis of Equation (1), as illustrated in Figure 4.

4.5. Histological Analysis

Tumors were excised, processed, and embedded in paraffin. Consecutive tumor sections of 4 μ m thickness were cut and mounted on positively charged slides. Immunohistochemistry was performed to evaluate PN; PI was evaluated with an anti-PCNA primary antibody (sc-56, dilution 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA); and MVD was evaluated with an anti-CD34 primary antibody (ab81289, dilution 1:500; Abcam, Cambridge, UK). Positive staining was detected with the DAB HRP Brown detection system (Bio SB, Santa Barbara, CA, USA). Negative controls corresponded to incubation without primary antibodies; human tonsil and vascular tumor were used as positive controls for anti-PCNA and anti-CD34, respectively. PN was evaluated as the percentage of necrotic tissue contained in the tumor, PI was estimated as the percentage of positive cells to anti-PCNA in the viable tumor, and MVD was quantified as the mean value of the vessel count in 10 high-power fields of hot spots [49]. A Nikon ECLIPSE E200 optical microscope (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) with a 10 \times eyepiece and 10 \times and 40 \times objective lens was used.

4.6. Statistical Analysis

Data in the scatter plots were expressed as mean \pm standard deviation, and data in the tables were expressed as mean \pm standard error of the mean. GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) was used to perform all statistical analyzes. Attenuation, E , C_I , and rBV were compared among protocols with two-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's multiple comparisons test. K^{trans} values were compared with a two-sided t -test. Histological parameters among the groups for each imaging protocol were compared with one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. Pearson correlation coefficient was estimated to evaluate the association of the histological biomarkers to the quantitative imaging parameters. A p -value less than 0.05 was considered as statistically significant.

5. Conclusions

In this study, we systematically quantified radiological imaging parameters with SE, DE, and DCE protocols in the subcutaneous C6 glioma model. We corroborated that CE X-ray imaging improved lesion detection, both qualitatively and quantitatively. The quantitative imaging parameters evaluated in this study demonstrated consistency among the different imaging protocols, despite their wide inter- and intra-tumor variability. Moreover, significant associations were found among the imaging parameters quantified in SE images and the histological biomarkers of angiogenesis: E and C_I in tumor periphery were associated with MVD and necrosis, E and C_I in the complete tumor with MVD, and rBV in the tumor periphery with MVD. In this manner, this work provided evidence of the potential use of the imaging parameters quantified in SE micro-CT images as descriptors of angiogenesis and necrosis in the C6 glioma model.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/11/3417/s1>, Figure S1: Representative histological samples of the subcutaneous C6 glioma model evaluated with the SE imaging protocol, Figure S2: Representative histological samples of the subcutaneous C6 glioma model evaluated with the DE imaging protocol, Figure S3: Representative histological samples of the subcutaneous C6 glioma model evaluated with the DCE imaging protocol, Table S1: Average VOI size and estimated number of pixels used for the quantification of imaging parameters for several tissues/organs in SE and DE micro-CT images.

Author Contributions: Conceptualization, L.A.-D., M.L., M.-E.B.; methodology, L.A.-D., E.P.-C., L.A.M., M.-E.B.; software, L.A.-D.; validation, L.A.-D.; investigation, L.A.-D., E.P.-C., A.A.-S.; data curation, L.A.-D.; formal analysis, L.A.-D., M.-E.B.; visualization, L.A.-D.; writing—original draft preparation, L.A.-D.; writing—review and editing, L.A.-D., E.P.-C., A.A.-S., L.A.M., M.L., M.-E.B.; supervision, M.L., M.-E.B.; project administration, M.-E.B.; resources, E.P.-C., A.A.-S., L.A.M., M.L., M.-E.B.; funding acquisition, M.L., M.-E.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially supported by CONACyT grant PRONAI-7-Virus y Cáncer (Ref. 303044), CONACyT grant CB-251497, PAPIIT-UNAM IN103219, and Instituto Nacional de Cancerología, Ref. (018/051/IBI) (CEI/1294/18).

Acknowledgments: L.A.-D. is a student of the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and recipient of a scholarship from CONACyT (221487) and from Instituto de Física, UNAM, (PIIF grant). L.A.-D. also acknowledges Francisco Berumen, Jorge Castillo, Itzel Torres, and Josefina García, for their valuable technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Hanahan, D.; Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **1996**, *86*, 353–364. [[CrossRef](#)]
- Weidner, N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am. J. Pathol.* **1995**, *147*, 9–19. [[PubMed](#)]
- Bais, C.; Mueller, B.; Brady, M.F.; Mannel, R.S.; Burger, R.A.; Wei, W.; Marien, K.M.; Kockx, M.M.; Husain, A.; Birrer, M.J.; et al. Tumor Microvessel Density as a Potential Predictive Marker for Bevacizumab Benefit: GOG-0218 Biomarker Analyses. *J. Natl. Cancer Inst.* **2017**, *109*, dx066. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- García-Figueiras, R.; Padhani, A.R.; Beer, A.J.; Baleato-González, S.; Vilanova, J.C.; Luna, A.; Oleaga, L.; Gómez-Caamaño, A.; Koh, D.M. Imaging of Tumor Angiogenesis for Radiologists—Part 1: Biological and Technical Basis. *Curr. Probl. Diagn. Radiol.* **2015**, *44*, 407–424. [[CrossRef](#)]
- Ulyte, A.; Katsaros, V.K.; Liouta, E.; Stranjalis, G.; Boskos, C.; Papanikolaou, N.; Usinskiene, J.; Bisdas, S. Prognostic value of preoperative dynamic contrast-enhanced MRI perfusion parameters for high-grade glioma patients. *Neuroradiology* **2016**, *58*, 1197–1208. [[CrossRef](#)]
- Yu, C.; Li, T.; Zhang, R.; Yang, X.; Yang, Z.; Xin, L.; Zhao, Z. Dual-energy CT perfusion imaging for differentiating WHO subtypes of thymic epithelial tumors. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 5511. [[CrossRef](#)]
- Ayala-Domínguez, L.; Brandan, M.E. Quantification of tumor angiogenesis with contrast-enhanced x-ray imaging in preclinical studies: A review. *Biomed. Phys. Eng. Express* **2018**, *4*, 062001. [[CrossRef](#)]
- Park, C.M.; Goo, J.M.; Lee, H.J.; Kim, M.A.; Kim, H.C.; Kim, K.G.; Lee, C.H.; Im, J.G. FN13762 murine breast cancer: Region-by-region correlation of first-pass perfusion CT indexes with histologic vascular parameters. *Radiology* **2009**, *251*, 721–730. [[CrossRef](#)]
- Guan, L.M.; Qi, X.X.; Xia, B.; Li, Z.H.; Zhao, Y.; Xu, K. Early changes measured by CT perfusion imaging in tumor microcirculation following radiosurgery in rat C6 brain gliomas. *J. Neurosurg.* **2011**, *114*, 1672–1680. [[CrossRef](#)]
- Lu, N.; Di, Y.; Feng, X.Y.; Qiang, J.W.; Zhang, J.W.; Wang, Y.G.; Liu, Y. CT perfusion with acetazolamide challenge in C6 gliomas and angiogenesis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0121631. [[CrossRef](#)]
- Qi, Q.; Yeung, T.P.; Lee, T.Y.; Bauman, G.; Cruckley, C.; Morrison, L.; Hoffman, L.; Yartsev, S. Evaluation of CT Perfusion Biomarkers of Tumor Hypoxia. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0153569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ehling, J.; Theek, B.; Gremse, F.; Baetke, S.; Möckel, D.; Maynard, J.; Ricketts, S.A.; Grill, H.; Neeman, M.; Knuechel, R.; et al. Micro-CT imaging of tumor angiogenesis: Quantitative measures describing micromorphology and vascularization. *Am. J. Pathol.* **2014**, *184*, 431–441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ekdawi, S.N.; Stewart, J.M.; Dunne, M.; Stapleton, S.; Mitsakakis, N.; Dou, Y.N.; Jaffray, D.A.; Allen, C. Spatial and temporal mapping of heterogeneity in liposome uptake and microvascular distribution in an orthotopic tumor xenograft model. *J. Control Release* **2015**, *207*, 101–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Liu, J.; Zhou, J.; Li, J.; Zhang, L.; Zhang, P.; Liu, B. Evaluation of rat C6 malignant glioma using spectral computed tomography. *Exp. Ther. Med.* **2017**, *14*, 1037–1044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Huang, X.; Liang, X.; Zhang, Q.; Wang, D.; Liu, J.; Zhang, L.; Zhou, J. Quantifying the angiogenesis of C6 glioma in rats based on CT quantitative parameters. *Acta Radiol.* **2019**, *60*, 985–993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Karathanasis, E.; Chan, L.; Karumbaiah, L.; McNeeley, K.; D’Orsi, C.J.; Annapragada, A.V.; Sechopoulos, I.; Ballamkonda, R.V. Tumor vascular permeability to a nanoprobe correlates to tumor-specific expression levels of angiogenic markers. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5843. [[CrossRef](#)]
17. Driscoll, B.; Keller, H.; Coolens, C. Development of a dynamic flow imaging phantom for dynamic contrast-enhanced CT. *Med. Phys.* **2011**, *38*, 4866–4880. [[CrossRef](#)]
18. Knobloch, G.; Jost, G.; Huppertz, A.; Hamm, B.; Pietsch, H. Dual-energy computed tomography for the assessment of early treatment effects of regorafenib in a preclinical tumor model: Comparison with dynamic contrast-enhanced CT and conventional contrast-enhanced single-energy CT. *Eur. Radiol.* **2014**, *24*, 1896–1905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Kang, H.J.; Kim, S.H.; Bae, J.S.; Jeon, S.K.; Han, J.K. Can quantitative iodine parameters on DECT replace perfusion CT parameters in colorectal cancers? *Eur. Radiol.* **2018**, *28*, 4775–4782. [[CrossRef](#)]
20. Brat, D.J.; Van Meir, E.G. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab. Invest.* **2004**, *84*, 397–405. [[CrossRef](#)]
21. Wippold, F.J., 2nd; Lämmler, M.; Anatelli, F.; Lennerz, J.; Perry, A. Neuropathology for the neuroradiologist: Palisades and pseudopalisades. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **2006**, *27*, 2037–2041.
22. Xuesong, D.; Wei, X.; Heng, L.; Xiao, C.; Shunan, W.; Yu, G.; Weiguo, Z. Evaluation of neovascularization patterns in an orthotopic rat glioma model with dynamic contrast-enhanced MRI. *Acta Radiol.* **2017**, *58*, 1138–1146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Hou, W.; Xue, Y.; Tang, W.; Pan, H.; Xu, M.; Li, X.; Bi, S.; Shen, Y.; Qian, Y.; Yu, Y. Evaluation of Tumor Hypoxia in C6 Glioma Rat Model With Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Acad Radiol.* **2019**, *26*, e224–e232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Rosado-Méndez, I.; Palma, B.A.; Brandan, M.E. Analytical optimization of digital subtraction mammography with contrast medium using a commercial unit. *Med. Phys.* **2008**, *35*, 5544–5557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Berumen, F.; Ayala-Domínguez, L.; Medina, L.A.; Brandan, M.E. A method to optimize the image acquisition protocol of a MicroCT unit for preclinical studies using contrast-enhanced digital subtraction. In *AIP Conference Proceedings*; AIP Publishing LLC: New York, NY, USA, 2016; Volume 1747, p. 080003.
26. Castillo, J.P.; Corona-Nieblas, L.; Berumen, F.; Ayala-Domínguez, L.; Medina, L.A.; Brandan, M.E. Optimization of dual-energy subtraction for preclinical studies using a commercial MicroCT unit. In *AIP Conference Proceedings*; AIP Publishing LLC: New York, NY, USA, 2016; Volume 1747, p. 080005.
27. Ayala-Domínguez, L.; Pérez-Cárdenas, E.; Medina, L.A.; Lizano, M.; Brandan, M.E. Contrast-enhanced microCT imaging in a tumor angiogenesis murine model. In *AIP Conference Proceedings*; AIP Publishing LLC: New York, NY, USA, 2019; Volume 2090, p. 030002.
28. Holash, J.; Wiegand, S.J.; Yancopoulos, G.D. New model of tumor angiogenesis: Dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* **1999**, *18*, 5356–5362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Giakoumettis, D.; Kritis, A.; Foroglou, N. C6 cell line: The gold standard in glioma research. *Hippokratia* **2018**, *22*, 105–112.
30. Carmeliet, P.; Jain, R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **2011**, *473*, 298–307. [[CrossRef](#)]
31. Coomber, B.L.; Stewart, P.A.; Hayakawa, E.M.; Farrell, C.L.; Del Maestro, R.F. A quantitative assessment of microvessel ultrastructure in C6 astrocytoma spheroids transplanted to brain and to muscle. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1988**, *47*, 29–40. [[CrossRef](#)]
32. Watanabe, K.; Sakamoto, M.; Somiya, M.; Amin, M.R.; Kamitani, H.; Watanabe, T. Feasibility and limitations of the rat model by C6 gliomas implanted at the subcutaneous region. *Neurol. Res.* **2002**, *24*, 485–490. [[CrossRef](#)]
33. Lenting, K.; Verhaak, R.; Ter Laan, M.; Wesseling, P.; Leenders, W. Glioma: Experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* **2017**, *133*, 263–282. [[CrossRef](#)]
34. Hagiwara, A.; Fujita, S.; Ohno, Y.; Aoki, S. Variability and Standardization of Quantitative Imaging: Monoparametric to Multiparametric Quantification, Radiomics, and Artificial Intelligence. *Investig. Radiol.* **2020**, *55*, 601–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Alkadhi, H.; Euler, A. The Future of Computed Tomography: Personalized, Functional, and Precise. *Investig. Radiol.* **2020**, *55*, 545–555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Tan, A.C.; Ashley, D.M.; López, G.Y.; Malinzak, M.; Friedman, H.S.; Khasraw, M. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA Cancer J. Clin.* **2020**, *70*, 299–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Sharma, S.; Sharma, M.C.; Sarkar, C. Morphology of angiogenesis in human cancer: A conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology* **2005**, *46*, 481–489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Bolcaen, J.; Descamps, B.; Acou, M.; Deblaere, K.; den Broecke, C.V.; Boterberg, T.; Vanhove, C.; Goethals, I. In Vivo DCE-MRI for the Discrimination between Glioblastoma and Radiation Necrosis in Rats. *Mol. Imaging Biol.* **2017**, *19*, 857–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Zoula, S.; Hérigault, G.; Ziegler, A.; Farion, R.; Décorps, M.; Rémy, C. Correlation between the occurrence of 1H-MRS lipid signal, necrosis and lipid droplets during C6 rat glioma development. *NMR Biomed.* **2003**, *16*, 199–212. [[CrossRef](#)]
40. Bradley, D.P.; Tessier, J.J.; Ashton, S.E.; Waterton, J.C.; Wilson, Z.; Worthington, P.L.; Ryan, A.J. Correlation of MRI biomarkers with tumor necrosis in Hras5 tumor xenograft in athymic rats. *Neoplasia* **2007**, *9*, 382–391. [[CrossRef](#)]
41. Jiang, J.S.; Hua, Y.; Zhou, X.J.; Shen, D.D.; Shi, J.L.; Ge, M.; Geng, Q.N.; Jia, Z.Z. Quantitative Assessment of Tumor Cell Proliferation in Brain Gliomas with Dynamic Contrast-Enhanced MRI. *Acad. Radiol.* **2019**, *26*, 1215–1221. [[CrossRef](#)]
42. Burgener, F.A.; Hamlin, D.J. Contrast enhancement in abdominal CT: Bolus vs. infusion. *AJR Am J Roentgenol.* **1981**, *137*, 351–358. [[CrossRef](#)]
43. Ford, N.L.; Thornton, M.M.; Holdsworth, D.W. Fundamental image quality limits for microcomputed tomography in small animals. *Med. Phys.* **2003**, *30*, 2869–2877. [[CrossRef](#)]
44. Evangelidis, G.D.; Psarakis, E.Z. Parametric image alignment using enhanced correlation coefficient maximization. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **2008**, *30*, 1858–1865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hill, M.L.; Mainprize, J.G.; Mawdsley, G.E.; Yaffe, M.J. A solid iodinated phantom material for use in tomographic x-ray imaging. *Med. Phys.* **2009**, *36*, 4409–4420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Amide Software. Available online: <http://amide.sourceforge.net/> (accessed on 13 October 2020).
47. Patlak, C.S.; Blasberg, R.G. Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data. Generalizations. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1985**, *5*, 584–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. ImageJ Software. Available online: <https://imagej.nih.gov/ij/> (accessed on 13 October 2020).
49. Weidner, N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* **1995**, *36*, 169–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

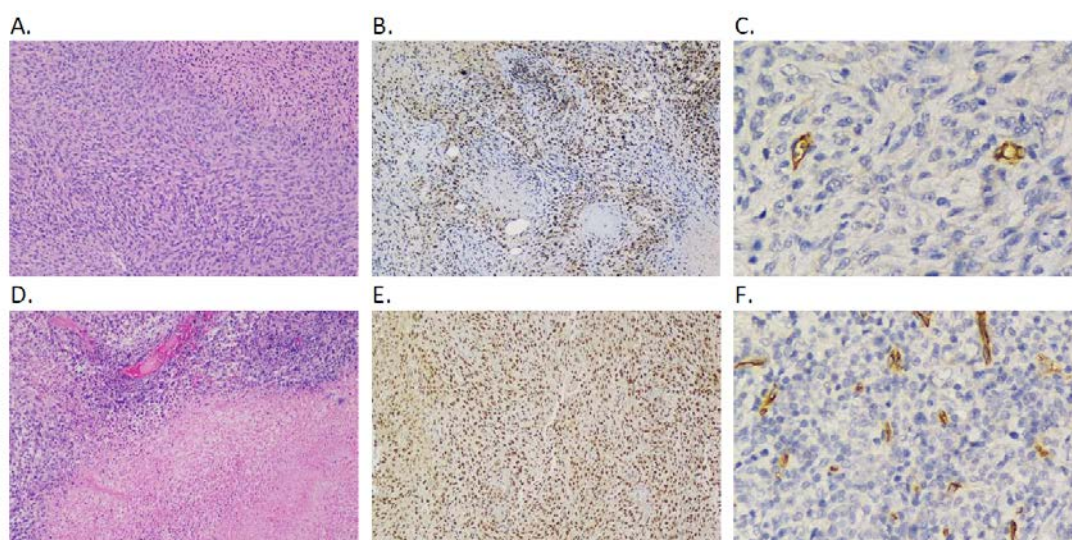


© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Materials: Quantitative Imaging Parameters of Contrast-Enhanced Micro-Computed Tomography Correlate with Angiogenesis and Necrosis in a Subcutaneous C6 Glioma Model

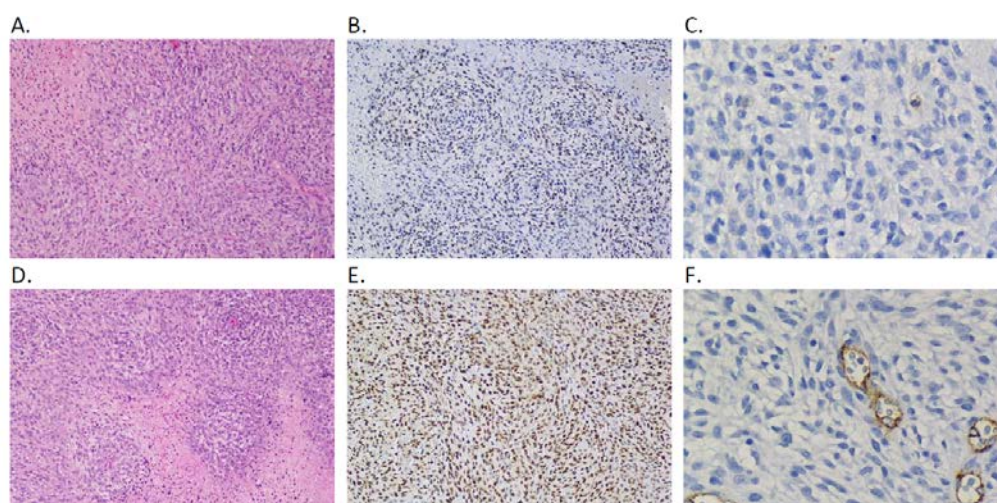
Lízbeth Ayala-Domínguez, Enrique Pérez-Cárdenas, Alejandro Avilés-Salas, Luis Alberto Medina, Marcela Lizano and María-Ester Brandan

Figure S1. Representative histological samples of the subcutaneous C6 glioma model evaluated with the SE imaging protocol.



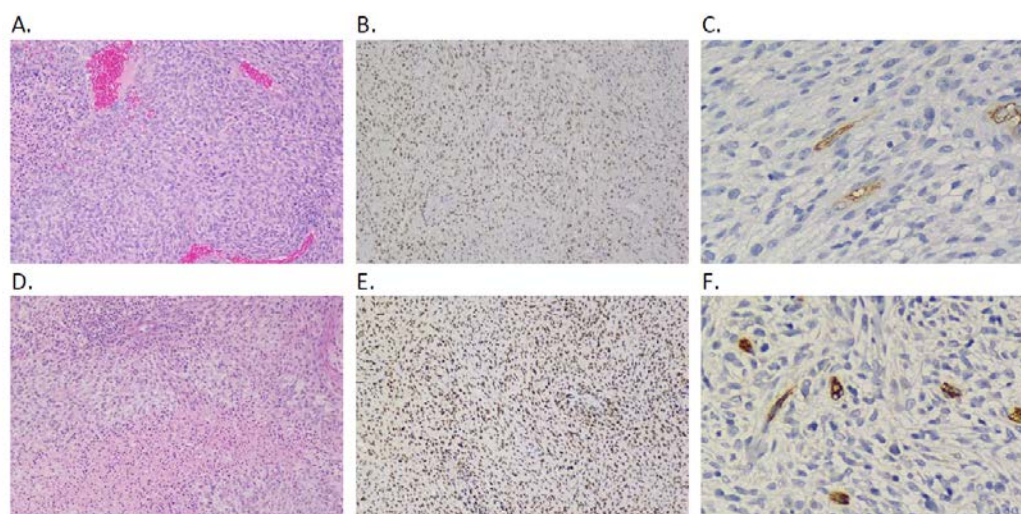
For this group, the lowest percent necrosis (PN) was (A) 5% and the highest was (B) 85%; the lowest proliferation index (PI) was (C) 40%, and the highest was (D) 95%; the lowest microvessel density (MVD) was (E) 2.0 vessels/high-power field (HPF), and the highest was (F) 18.3 vessels/HPF. MVD images are shown at 400× magnification, all other images are shown at 100× magnification.

Figure S2. Representative histological samples of the subcutaneous C6 glioma model evaluated with the DE imaging protocol.



For this group, the lowest PN was (A) 15% and the highest was (B) 60%; the lowest PI was (C) 50%, and the highest was (D) 95%; the lowest MVD was (E) 0.9 vessels/field of view (FOV), and the highest was (F) 7.6 vessels/HPF. MVD images are shown at 400× magnification, all other images are shown at 100× magnification.

Figure S3. Representative histological samples of the subcutaneous C6 glioma model evaluated with the DCE imaging protocol.



For this group, the lowest PN was (A) 5% and the highest was (B) 50%; the lowest PI was (C) 60%, and the highest was (D) 90%; the lowest MVD was (E) 1.3 vessels/field of view (FOV), and the highest was (F) 6.3 vessels/HPF. MVD images are shown at 400 \times magnification, all other images are shown at 100 \times magnification.

Table S1. Average VOI size and estimated number of pixels used for the quantification of imaging parameters for several tissue/organs in SE and DE micro-CT images.

Tissue/Organ	SE Imaging Protocol		DE Imaging Protocol	
	Volume (mm ³)	Estimated Number of Voxels	Volume (mm ³)	Estimated Number of Voxels
Abdominal aorta	0.5 \pm 0.0	713.3 \pm 6.1	0.5 \pm 0.0	719.0 \pm 4.2
IVC	1.8 \pm 0.0	2191.0 \pm 2.8	1.8 \pm 0.0	2196.5 \pm 26.2
Kidney	0.5 \pm 0.0	717.5 \pm 3.5	0.5 \pm 0.0	721.0 \pm 2.8
Liver	1.8 \pm 0.0	2188.0 \pm 2.8	1.8 \pm 0.0	2185 \pm 4.9
Spleen	0.5 \pm 0.0	716.3 \pm 5.5	0.5 \pm 0.0	721.0 \pm 4.2
Muscle	0.5 \pm 0.0	718.8 \pm 6.1	0.5 \pm 0.0	723.5 \pm 4.9
Complete tumor	334.2 \pm 126.8	349,180.5 \pm 130,381.6	694.3 \pm 94.8	718,005.3 \pm 96,071.6
Central tumor	41.8 \pm 15.8	45,570.3 \pm 16,752.2	86.8 \pm 11.9	92,762.5 \pm 12,123.8
Peripheral tumor	2.0 \pm 1.1	2400.3 \pm 1308.5	1.8 \pm 1.6	2135.9 \pm 1834.0

Values are expressed as mean \pm standard deviation.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Biomedical Physics & Engineering Express



TOPICAL REVIEW

Quantification of tumor angiogenesis with contrast-enhanced x-ray imaging in preclinical studies: a review

RECEIVED
27 April 2018

REVISED
17 August 2018

ACCEPTED FOR PUBLICATION
22 August 2018

PUBLISHED
7 September 2018

L Ayala-Domínguez and M E Brandan

Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, 04511 Mexico City, Mexico

E-mail: ayalaliz@gmail.com

Keywords: preclinical, micro-CT imaging, contrast-enhanced, contrast medium, angiogenesis

Abstract

Tissue contrast is a major challenge in the application of computed tomography (CT) and micro-computed tomography (micro-CT) techniques for imaging cancer. Contrast medium is used in order to enhance contrast of certain organs of interest, as well as tumors. Several types of contrast media have been used to assess tumor vasculature, perfusion and angiogenesis in preclinical studies. In general, low molecular weight contrast media have been used to characterize the first pass vascular dynamics of tumors with fast CT systems, while blood pool agents have been preferred to explore the delayed vascular dynamics with micro-CT systems. Together, these approaches provide qualitative, semi-quantitative, and quantitative information of the vascular architecture and vascular functionality of tumors in the preclinical scenario. Herein, we present an overview of contrast media, imaging techniques, image analysis methods, and quantitative parameters that have been used to evaluate tumor angiogenesis *in vivo* in recent preclinical studies. Preclinical applications on lesion detection and characterization, evaluation of vascular parameters as prognostic and predictive biomarkers, and evaluation of treatment response are also reviewed. These applications have demonstrated the potential of contrast-enhanced x-ray imaging to provide, in a noninvasive manner, a landscape of the spatial and temporal heterogeneity of the angiogenic process underlying tumor development.

1. Introduction

Tumor cells require a vascular network to obtain nutrients and oxygen, and to eliminate waste materials. When a tumor reaches a certain size, the inner cells become hypoxic and a signaling cascade between tumor cells and endothelial cells activates to induce angiogenesis, which culminates in the formation of new blood vessels from the pre-existing ones [1, 2]. Angiogenesis can be physiologically normal or pathological. In the latter there is an excessive signaling of growth factors and a lack of signals to coordinate blood vessels spatial and temporal growth, remodeling, maturation, and stabilization, yielding tortuous vascular networks with immature, dilated, and fenestrated vessels [3–5]. Microvessel density (MVD) is the gold standard for angiogenesis quantification, it refers to the mean count of microvessels in a number of zones in the most vascularized areas in a microscope field of a tissue sample stained with anti-CD31, anti-CD34 or anti-CD105 biomarkers [2, 6, 7]. A drawback of MVD

quantification is that it does not take into account the spatial and temporal heterogeneity of solid tumors. It has been observed that the angiogenic switch (i.e. the onset of angiogenesis) appears in early stages of cancer development in the pre-malignant stage of several cancer types [8–10]. These evidences have motivated the exploration of *in vivo* imaging techniques capable of capturing tumor heterogeneity in a noninvasive manner in the study of tumor angiogenesis in the different stages of cancer development [11].

Quantitative evaluation of vascular parameters of tumors is possible with contrast-enhanced x-ray imaging such as computed tomography (CT). In the pre-clinical scenario, micro-computed tomography (micro-CT) systems are commercially available for imaging small animals. The main disadvantages of CT and micro-CT are its low sensitivity and limited soft tissue contrast. A radiological contrast medium containing an element with high atomic number (Z), such as iodine, can be used to increase tissue contrast. Several types of contrast media have been used to assess tumor

vasculature, perfusion, and angiogenesis in preclinical studies [12, 13]. Each contrast medium has different pharmacokinetics and biodistribution, defined by its size and molecular weight, and these determine the type of imaging technique to be used, and therefore the quantitative vascular parameters to be obtained.

Herein, we present an overview of the contrast media, imaging techniques, image analysis methods, and quantitative parameters that have been explored in recent preclinical studies. Our aim is to provide a framework of the several essential factors to take into account for imaging and quantifying tumor angiogenesis in preclinical studies *in vivo* with contrast-enhanced x-ray imaging.

2. Contrast media

Radiopaque contrast media are used in x-ray imaging to increase soft-tissue contrast. The particle size and molecular weight of contrast media molecules influence their biodistribution and excretion pathway [14, 15]. After intravenous administration, the contrast media molecules interact with serum proteins and an adsorption process occurs. The strength of the interaction and the nature of the adsorbed proteins are given by the surface chemistry of the contrast media molecules [16]. The adsorbed proteins form a protein corona that increases the *in vivo* hydrodynamic diameter of the contrast medium molecules, compared to their *in vitro* hydrodynamic diameter [15, 17]. Molecules with *in vivo* hydrodynamic diameter <6 nm are excreted by the kidneys, while larger molecules accumulate in the spleen and the liver [14].

According to their molecular weight (MW), two main categories of contrast media are recognized: low molecular weight (LMW, such as clinical iodinated contrast media), with MW < 1 kDa, and macromolecular or blood pool (such as iodinated liposomes, lipid nano-emulsions, and coated nanoparticles), with MW > 30 kDa [18]. In the 1–30 kDa range, the classification of contrast media is contradictory.

Normal mature vessels are composed by a layer of tightly joined endothelial cells, covered with a basement membrane, and surrounded by pericytes and smooth muscle cells that are essential for normal barrier function. In angiogenic tumor vessels the junctions between endothelial cells are lost, and pericytes and smooth muscle cells are loosely adhered. This results in gaps in the vessel wall which in turn causes leakiness, high interstitial pressure within tumors, and alters blood flow [5]. Figure 1 shows the transit of LMW and blood pool contrast media from the intravascular to the extravascular space of an angiogenic vessel. LMW contrast media rapidly diffuse from the bloodstream into the interstitial compartment between tumor cells, producing tumor enhancement in the image. This extravasation is not selective since it can occur in normal vessels as well if particle size is

small. Conversely, blood pool contrast media slowly diffuse from the bloodstream into the interstitial compartment due to their MW and size. Extravasated particles with diameter >100 nm remain close to the blood vessel since they are trapped in the extracellular matrix between cells [14]. It has been observed that blood pool contrast media with residence time of at least 6 h accumulates and retains in the tumor due to the enhanced permeability and retention (EPR) effect [19–21]. Their disadvantage is the lower concentration of the high Z material within the tumor.

2.1. Low molecular weight contrast media

In the preclinical study of tumor angiogenesis with x-ray imaging, clinical low molecular weight (LMW) contrast media based in iohexol, iopamidol, or iopromide (nonionic, monomeric, low osmolar, tri-iodinated agents) have been used [22–29], as shown in table 1. These iodinated contrast media are water soluble, have fast renal clearance and acute renal toxicity. Since they are rapidly eliminated, they are preferably used in imaging systems with scan durations of the order of sub-seconds, which are not available in most micro-CT systems. Most studies with these contrast media have been performed with clinical CTs using a bolus injection and dynamic 3D imaging techniques [22, 23, 25, 27, 28]. A few studies have been performed with 2D micro-digital subtraction angiography (micro-DSA) [24] or 3D imaging with micro-CT systems [26, 29].

2.2. Blood pool contrast media

To increase residence time of contrast media in the bloodstream, two main approaches are followed. First, particle diameter must be kept above 100 nm in order to reduce renal clearance through glomerular filtration [13]. Increased diameter and residence time in the bloodstream promotes the EPR effect for macromolecules (MW > 40 kDa), yielding a higher retention in the interstitial compartment, as well as a slower clearance in tumors and inflammation sites [19–21]. Second, particle surface must be controlled or modified in order to avoid recognition by the immune system [13–15]. Iodinated liposomes, lipid nano-emulsions, and nanoparticles have been used as blood pool contrast media in the preclinical study of tumor angiogenesis, as summarized in table 2. They all have a long residence time in the blood pool, allowing imaging with micro-CT systems which have long scan durations. Their metabolization is via the reticulo-endothelial system (RES), therefore they accumulate in the liver and spleen [30].

Liposomes have been used as carriers of clinical iodinated contrast medium since they are well characterized and innocuous. Iodinated liposomes that have been used in the preclinical study of tumor angiogenesis are home-made, particle diameter is close to 100 nm, and iodine concentration depends on preparation methods [31–37, 44]. Although they

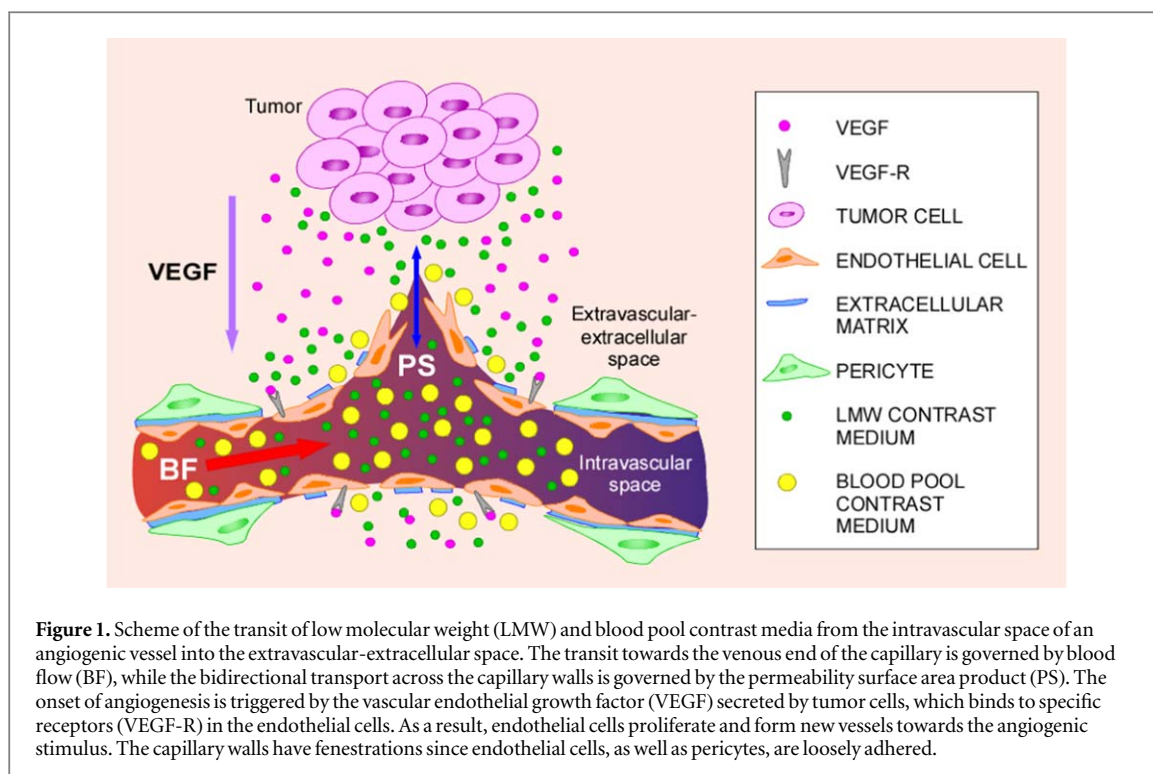


Table 1. Iodinated low molecular weight contrast media and administration methods used in selected preclinical studies of tumor angiogenesis with contrast-enhanced x-ray imaging.

Contrast medium	Concentration [mg/ml]	Subject	Dose [mg I or Au/g of b.w.]	Injected volume [ml]	Injection rate [ml s^{-1}]	Imaging system	References
Isovue 300	300	Mice	—	0.2	0.008	CT	[23]
Ultravist 300	300	Mice	0.5	0.05	0.025	Micro-CT	[26]
Accupaque 300	300	Mice	0.15	—	—	Micro-CT	[29]
Isovue 300	300	Rats	0.75	0.7–1.0	0.13	CT	[22]
Omnipaque 300	300	Rats	2.0–2.4	2	1	CT	[25]
Iohexol	—	Rats	—	1	0.2	CT	[28]
Isovue 370	370	Rats	0.3	0.15	0.5	Micro-DSA	[24]
Ultravist 300	300	Rabbits	0.3–0.45	—	1.0	CT	[27]

CT = computed tomography, micro-CT = micro-computed tomography, micro-DSA = micro-digital subtraction angiography, I = iodine, Au = gold, b. w. = body weight.

accumulate in liver and spleen, an earlier accumulation in kidney after injection could be observed due to non-encapsulated iodine [30].

Lipid nano-emulsions are formed by an oily phase composed of iodinated triglycerides, in the form of droplets, suspended in an aqueous medium [13]. Commercial and home-made lipid nano-emulsions have been evaluated in spleen, liver, and cardiac imaging in rodents [45–47], as well as in preclinical tumor imaging [24, 38–40, 48] with micro-CT systems. Fenestra VC, a commercially available lipid nano-emulsion, has been used with similar doses for rats and mice using different concentrations: 130 mg I/ml [24] and 50 mg I/ml [39], respectively. The currently commercially available formulation of Fenestra VC (MediLumine Inc., Montreal, Canada) has a concentration of 50 mg I/ml, which means that larger volumes of this contrast medium have to be delivered to rats in order to achieve similar iodine doses. If the injected volume

is relatively large compared to the total blood volume of the animal (1.7 ml for mice, 13.5 ml for rats [49]), modifications of the cardiac output, pulmonary function, and animal stress might occur [30].

Iodinated and metallic nanoparticles (Nps) have been used as contrast agents in the preclinical study of tumor angiogenesis with x-ray imaging [33, 35, 41–43]. Poly(iohexol) Nps were tested for *in vivo* micro-CT imaging in tumor-bearing mice, and showed a prolonged tumor retention, a slower renal clearance compared to clinical LMW contrast media, and a longer circulation time [41]. Gold nanoparticles (AuNps) are widely used as contrast agents due to the flexibility of their surface chemistry which allows active targeted imaging by means of coating or binding the AuNps with molecules for specific ligand-receptor interactions [14, 50, 51]. An advantage of targeted contrast media is that imaging is highly selective, but their disadvantage is that they only can be used under

Table 2. Blood pool contrast media and administration methods used in selected preclinical studies of tumor angiogenesis with contrast-enhanced x-ray imaging.

Contrast medium	Concentration [mg/ml]	Subject	Dose [mg I or Au/g of b.w.]	Injected volume [ml]	Imaging system	References
ILip	110	Mice	2.2	—	Micro-CT	[31]
ILip	70	Mice	0.7	—	Micro-CT	[32]
ILip	110	Mice	1.8	0.4	Micro-CT	[33]
ILip	110	Mice	1.8	0.4	Micro-CT	[34]
ILip	135	Mice	1.6	0.3	Micro-CT	[35]
ILip	65	Rats	0.001	0.003	Micro-CT	[36]
ILip	165	Rats	0.5	—	Mammography system	[37]
Fenestra VC	50	Mice	0.8	1.0	Micro-CT	[38]
Fenestra VC	50	Mice	0.8	0.4	Micro-CT	[39]
Fenestra VC	130	Rats	0.9	1.25	Micro-CT	[24]
Lipid nano-emulsion	130	Mice	0.7	0.1	Micro-CT	[40]
AuroVist AuNp	200	Mice	0.8	0.1	Micro-CT	[33]
AuNp	77	Mice	1.0	0.32	Micro-CT	[35]
Poly(iohexol)Nps	—	Mice	0.05	0.2	Micro-CT	[41]
Anti-HER2-AuNp	—	Mice	0.3–1.1	0.2	Micro-CT	[42]
Anti-EGFR-AuNp	25	Mice	—	0.2	CT	[43]

ILip = iodinated liposomes, Nps = nanoparticles, AuNp = gold nanoparticles, HER2 = human epidermal growth factor receptor 2, EGFR = epidermal growth factor receptor. CT = computed tomography, micro-CT = micro-computed tomography, I = iodine, Au = gold, b. w. = body weight.

specific biological conditions. The major challenge of targeted AuNps is the sensitivity limit, i.e. the total amount of the high Z material that must be delivered, and accumulated in the tumor, in order to produce sufficient contrast-to-noise ratio (CNR) in the image. This depends on the existence and degree of the receptor overexpression, nanoparticle size, and cellular labeling efficiency [14]. AuNps accumulate in the kidneys, liver, or spleen depending on their size, shape, surface charge, and coating agents [14].

3. X-ray imaging techniques

The selection of an imaging systems is made, in first instance, based on its availability and/or cost. The technical characteristics of the system are also important, since they have an impact on image quality and dose, as well as on the imaging techniques available. To mention some of these characteristics: kilo-voltage peak (kVp) range, anode/filter combination, and current of the x-ray tube, spatial resolution of the detector, scan duration times, and the possibility to perform specific tasks such as dynamic scans [52]. Although micro-CT systems were specially developed to obtain high-resolution 3D attenuation images of small animals, as shown in figure 2, clinical CT systems have also been used in the preclinical study of tumor angiogenesis.

Once a system has been selected, the imaging technique must be defined. Contrast-enhanced x-ray imaging with CT and micro-CT systems allow the use of several imaging techniques that can be classified in various categories [53]. For a clear description,

techniques can be categorized first in static and dynamic acquisitions, and then other subcategories can be considered.

3.1. Static imaging techniques

These include conventional 3D attenuation CT or micro-CT imaging, and 2D (planar) imaging, acquired with one energy spectrum (single energy approach) or two energy spectra (dual energy approach). Besides, studies with these imaging techniques can be cross-sectional or longitudinal. Blood pool contrast media, together with micro-CT systems, have been used in most preclinical studies of tumor angiogenesis with these techniques as detailed in table 3, since long duration scan times require contrast media with longer residence time in the bloodstream.

3.1.1. Single energy approaches

In cross-sectional studies with this imaging technique a single energy image is acquired immediately after injection or several hours post-injection of contrast medium, depending on its biodistribution [24, 29, 39, 42, 43, 48]. These studies allow to obtain qualitative and quantitative vascular information, such as the description of the vascular architecture, tumor volume, vessel diameter, and tumor and tissue enhancement in Hounsfield units (HU).

In longitudinal studies, a pre-contrast image is acquired before the contrast medium is injected. Then, a series of 3D or 2D post-contrast images is acquired at adequate time intervals depending on the biodistribution of the contrast medium [31, 32, 36, 37, 38, 41]. The aim of this technique is to evaluate changes in

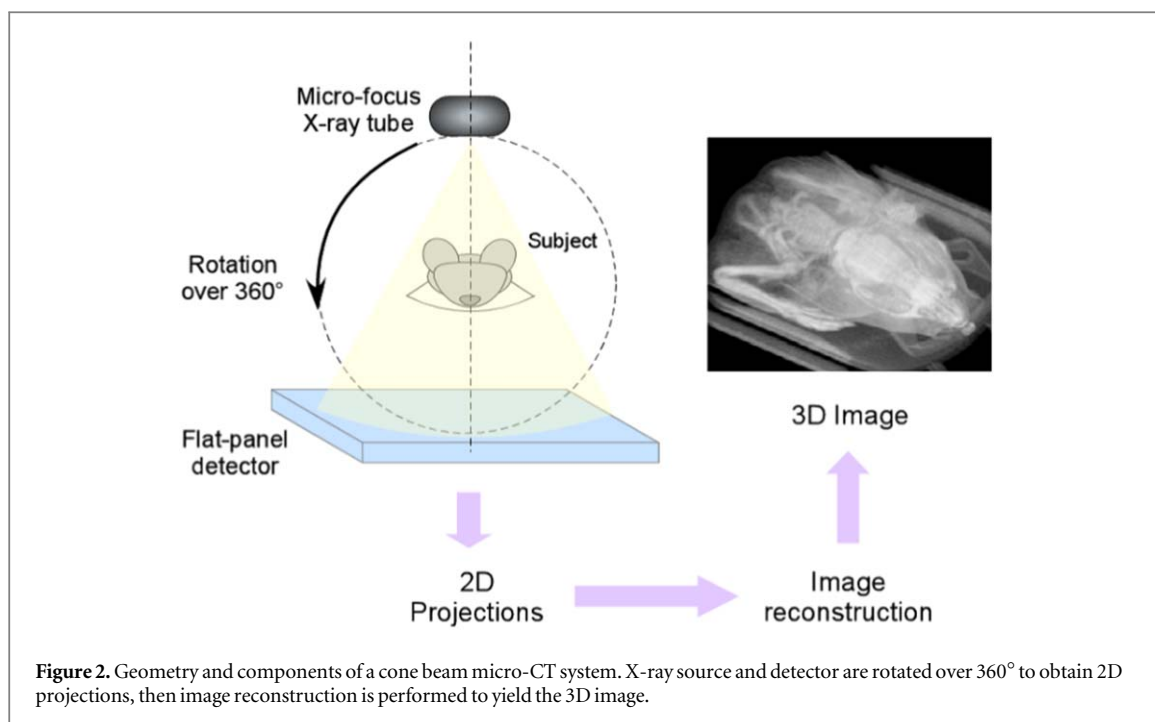


Table 3. Static imaging techniques and measurements performed in selected preclinical studies of tumor angiogenesis with contrast-enhanced x-ray imaging.

Imaging technique	Imaging system	kVp	mAs	Contrast medium	Measurements and observations	References
SE CS	Micro-CT	50	0.1	Accupaque 300	TV, VA	[29]
SE CS	Micro-CT	80	1.53	Fenestra VC	E, VA	[24]
SE CS	Micro-CT	80	0.04	Fenestra VC	E, VA	[39]
SE CS	Micro-CT	45	—	Anti-HER2-AuNp	E, VA	[42]
SE CS	CT	80	500	Anti-EGFR-AuNp	E, VA	[43]
SE Long	Micro-CT	80	50 mA	ILip	E, penetration length	[32]
SE Long	Micro-CT	70	0.425	ILip	TV, E, VA	[31]
SE Long	Micro-CT	40	5	ILip	TV, E, VA	[36]
SE Long	Mammography system	49	63	ILip	TV, E, Enhancement rate constant	[37]
SE Long	Micro-CT	80	0.5 mA	Poly(iohexol) Nps	E, VA	[41]
SE Long	Micro-CT	80	50 mA	Fenestra VC	Tumor burden, E	[38]
DE CS	Micro-CT	LE = 40	LE = 1 mA	Lipid nano-emulsion	TV, rBV, VA	[40]
DE Long	Micro-CT	HE = 65 LE = 40	HE = 0.5 mA LE = 4	AuroVist AuNp + ILip	TV, rBV, C _{ex}	[33]
DE Long	Micro-CT	HE = 80 LE = 40	HE = 1.6 LE = 4	AuNp + ILip	E, TV, rBV, C _{ex}	[35]
DE Long	Micro-CT	HE = 80 LE = 40	HE = 1.6 LE = 4	ILip	TV, rBV, C _{ex}	[34]

SE = single energy, DE = dual energy, CS = cross-sectional, Long = longitudinal, LE = low energy, HE = high energy. TV = tumor volume, VA = vascular architecture, E = tumor enhancement, rBV = relative blood volume, C_{ex} = extravasated concentrations. ILip = iodinated liposomes, Nps = nanoparticles, AuNps = gold nanoparticles, HER2 = human epidermal growth factor receptor 2, EGFR = epidermal growth factor receptor. CT = computed tomography, micro-CT = micro-computed tomography.

attenuation over time, generally by means of image subtraction. Image subtraction improves visualization of the accumulated contrast medium by eliminating the anatomical background. This technique is also called single energy temporal (SET). Volumes of interest (VOIs) can be drawn in tumors, aorta, left ventricle,

liver, spleen, kidneys, muscle, and other tissues. The enhancement in these VOIs can be quantified as the change in attenuation values between pre- and post-contrast images [54]. With these measurements, the accumulation of contrast medium can be described over time. Time-enhancement curves can be plotted for each

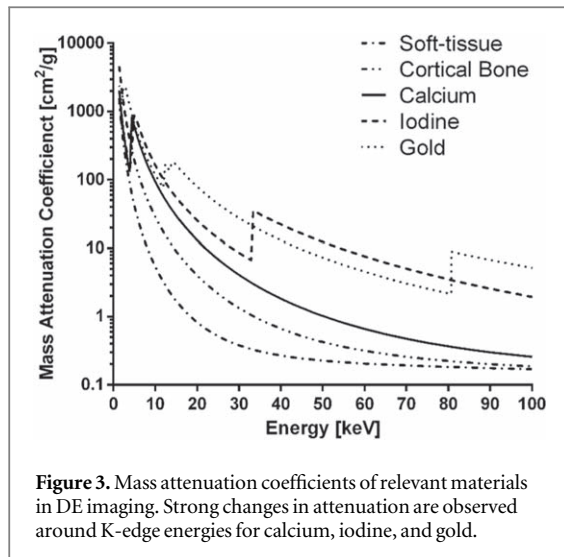


Figure 3. Mass attenuation coefficients of relevant materials in DE imaging. Strong changes in attenuation are observed around K-edge energies for calcium, iodine, and gold.

VOI and kinetic analysis can be performed in order to quantify vascular parameters. Structural measurements such as vessel diameter, vessel cross-section, and length can be obtained as well.

3.1.2. Dual energy approaches

Dual energy (DE) techniques rely on the different tissue attenuation depending on the energy of the x-ray photons [55, 56]. This means that high Z materials, such as iodine or gold, could be separated in a CT or micro-CT image if it is acquired with the adequate 'low' and 'high' energies. For example, it can be seen in figure 3 that the mass attenuation coefficient decreases with x-ray energy for soft-tissue, calcium, cortical bone, iodine, and gold. However, for iodine ($Z = 53$) a change in attenuation is observed at 33.2 keV, corresponding to the K-edge energy. To obtain the maximum difference in attenuation values for iodine alone, the desired low-energy could be slightly lower than 33.2 keV and the high-energy could be slightly higher than 33.2 keV. Calcium ($Z = 20$) and gold ($Z = 79$) are other high Z elements that are candidates for DE imaging. In their cases, the optimal low- and high- energies must take into account their K-edge energies, 4.0 keV and 80.7 keV, respectively [57].

Different methods have been explored in the reconstruction of DE CT and micro-CT images. These include virtual monochromatic imaging (VMI), weighted average images (WA), and basis material decomposition (BMD) maps [58]. VMI is a pre-reconstruction BMD method in which high- and low-energy RAW data are combined to yield an image as if it was generated by a monochromatic beam. The projections are decomposed into the density integrals of two basis materials (usually water and iodine), and then the density images for each material are obtained by standard reconstruction algorithms. The monochromatic image at a given energy E is given by equation (1) [59]:

$$\mu(E) = m_1\mu_1(E) + m_2\mu_2(E), \quad (1)$$

where μ , μ_1 , and μ_2 are the linear attenuation coefficients of the object, and the first and second basis materials, respectively; m_1 and m_2 are the density values of the imaged object represented by the first and second basis materials, respectively.

In the study of tumor angiogenesis with small animals, BMD and WA techniques have been used [33–35, 40, 60]. Both are post-reconstruction methods, unlike VMI. BMD maps represent the fraction volume, or concentrations, of two or three basis materials. The fraction volumes are obtained by solving equations based on the different attenuation of the basis materials in the low- and high-energy reconstructed images. The three material BMD is represented by equation (2):

$$\begin{bmatrix} \mu(E_{LE}) \\ \mu(E_{HE}) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mu_1(E_{LE}) & \mu_2(E_{LE}) & \mu_3(E_{LE}) \\ \mu_1(E_{HE}) & \mu_2(E_{HE}) & \mu_3(E_{HE}) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} f_1 \\ f_2 \\ f_3 \end{bmatrix}, \quad (2)$$

where the linear attenuation coefficient in a voxel at high- ($\mu(E_{HE})$) and low-energy ($\mu(E_{LE})$) is given by a linear combination of the linear attenuation coefficients of the three basis materials (μ_1, μ_2, μ_3) multiplied by their volume fraction (f_1, f_2, f_3) [61]. A calibration with a suitable phantom provides (μ_1, μ_2, μ_3), while $\mu(E_{LE})$ and $\mu(E_{HE})$ are obtained from the reconstructed images. An additional constraint that must be considered is the volume conservation: $f_1 + f_2 + f_3 = 1$. Virtual enhanced images can be created with concentration maps, but a necessary condition for this method is that materials must have sufficient differences in their attenuation properties in order to be distinguishable.

WA images are produced by means of a weighted combination of the low- and high-energy reconstructed images. In this case, the weighting factors can be linear or non-linear, depending on the clinical or preclinical application. A WA approach is exemplified by equation (3), subtracted image (I_{DE}) is obtained by means of a linear combination of low- and high-energy images (I_{LE} , and I_{HE} respectively):

$$I_{DE} = I_{LE} - \alpha I_{HE}, \quad (3)$$

where the weighting factor α is chosen to reduce the contrast between two specific materials in the DE image. This method is generally used with dual source systems, or with sequential acquisitions.

3.2. Dynamic imaging techniques

Dynamic CT imaging techniques are widely used in cardiovascular applications, such as angiography and perfusion. Angiography describes contrast medium enhancement mainly in arterial beds. Perfusion refers to the transit of blood at a capillary level [62]. To assess these processes, a bolus of LMW iodinated contrast medium is injected while single energy dynamic images are acquired in a small volume of interest in a

given time, in a SET fashion. Most studies of vascular parameters in small animals have used CT or micro-CT systems with slip ring technology and cine scanning protocols, obtaining volumetric images. Other studies have used an angiography technique with a home-made system in which planar images are acquired. Table 4 shows the details of selected dynamic preclinical studies of tumor angiogenesis with contrast-enhanced x-ray imaging.

3.2.1. Volumetric approaches

CT and micro-CT systems with slip ring technology allow perfusion and cine scanning protocols. These protocols involve scouting scans to locate the slice or slices of interest in the volume to be imaged, and then a continuous scan is performed only on the selected slices, this means that the bed is stationary [63]. Some CT systems acquire 1 image per second in cine scan protocols, and images can be retrospectively reconstructed from the RAW data at reduced time intervals in order to attain a higher temporal resolution. Contrast medium injection can be initiated simultaneously with, or a short time after, the start of image acquisition. Another method involves the acquisition of a basal pre-contrast image to quantify contrast-enhancement. Once the enhancement (i.e., change in attenuation) has been measured, time-enhancement curves can be obtained for each voxel, and after kinetic analysis, parametric maps of the several perfusion parameters can be obtained.

In small animals, 1 image/s is a commonly used time resolution for cine scan protocols, given the available technology. In humans, the disadvantage of acquiring images in so short periods of time is that in some cases the level of attenuation is very low since a small amount of iodine has reached the tissue. To avoid this, new imaging protocols have been used in which standard acquisitions times are longer. However, this also increases scanning time. To reduce it, several image phases can be acquired. For example, first-pass images can be acquired at very high temporal resolution (1 image/second, during 40 s), followed by a second phase of medium temporal resolution (1 image/3 s, during 35–45 s), and a third phase of low temporal resolution (1 image/10–15 s, during 2 min) [63]. In preclinical studies of tumor angiogenesis with dynamic imaging, several protocols have been followed: one phase [27, 28], two phases [22, 25], and three phases [23] with CT systems, and one phase with micro-CT systems [26]. As shown in table 4, the temporal resolution used for first-pass dynamic studies in small animals ranges from 140 ms to 2 s, while the delayed phase is imaged with temporal resolutions from 7.5 s to 30 s.

3.2.2. Planar approaches

Perfusion can also be evaluated with digital subtraction angiography (DSA), in which images ($I_{mDSA}(t)$) are obtained by logarithmic subtraction of pre- and

post-contrast 2D images [24]:

$$I_{mDSA}(t) = \ln(I_{CM}(t)) - \ln(\bar{I}_{mask}). \quad (4)$$

where $I_{CM}(t)$ represents a series of images acquired at several time points after contrast medium administration, and \bar{I}_{mask} is a pre-contrast mask (average of baseline images). Time-enhancement curves can be obtained from $I_{mDSA}(t)$ and perfusion parameters can be quantified by kinetic analysis.

It must be noted that this imaging approach is similar to the SET technique used in contrast-enhanced digital mammography (CEDM) [64]. A similar planar approach can be done by using 2D projections obtained with a micro-CT system, although in this case a regular subtraction must be performed since images are already proportional to the attenuation of tissues [65].

3.3. Considerations on image quality and radiation dose

Spatial resolution, contrast, and noise are image quality descriptors in x-ray imaging [66]. Spatial resolution is the smallest distance at which two objects can be resolved in an image. It depends on characteristics of the scanner, such as focal spot size of the x-ray tube and detector element size, as well as on the reconstruction kernel [66]. Contrast is defined as the difference of voxel values between two structures of interest and is directly related to the linear attenuation coefficients of the materials that constitute the imaged object in a CT image. Noise refers to voxel values variations in a given region. Contrast and noise can be represented by the contrast-to-noise ratio (CNR). High spatial resolution, high contrast, and low noise are desired in order to obtain useful, and accurate clinical or preclinical information of the imaged subject.

Image quality is closely related to radiation dose. Radiation dose refers to the deposited energy in a given volume of the imaged object, and it is determined by the material composition of the object and by the energy of the x-ray photons that reach to it. High spatial resolution could be achieved by reducing detector element size, but this requires to increase the x-ray fluence in order to maintain a given CNR, which increases radiation dose. Consequently, radiation dose imposes an inferior limit in the detector size. Low x-ray energies could be used to increase contrast, but this increases radiation dose since photoelectric effect is dominant for photon energies below 25 keV [67]. It is also known that if photon fluence increases, noise decreases but radiation dose increases [68].

A measurement of radiation dose in an imaging study with small animals is needed in order to plan the number of scans each animal can receive during a given experiment. Radiation dose may cause damage to the animals and may also affect the natural development of a tumor model. Measurements of the entrance dose in micro-CT studies with rodents have been

Table 4. Dynamic imaging techniques and image analysis methods used in selected preclinical studies of tumor angiogenesis with contrast-enhanced x-ray imaging.

Imaging technique ^a	Imaging system	Temporal resolution (total scan time)	kVp	mAs	Analysis method	Input vessel	Vascular parameters	References
2D, 1 phase	Micro-DSA	140 ms (4 s)	80	2.25	Gamma variate function fit	Not required	MTT, RF	[24]
3D, 1 phase	CT	0.5 s ^b (60 s)	80	120	Johnson-Wilson	Left femoral artery	BF, BV, PS, MTT	[27]
3D, 1 phase	CT	1 s (60 s)	120	100	2 compartment	Basilar artery	BF, BV, PS, MTT	[28]
3D, 1 phase	Micro-CT	7.5 s ^b (180 s)	65	4.5	Patlak	Not stated	AUC, rBV, K ^{trans}	[26]
3D, 2 phases	CT	1.4 s (32 s), 15 s (165 s)	80	120	Johnson-Wilson	Carotid artery	BF, BV, PS, rBF, rBV	[22]
3D, 2 phases	CT	2 s (90 s), 30 s (120 s)	80	50	Johnson-Wilson	Middle cerebral artery	BF, BV	[25]
3D, 3 phases	CT	1 s (100 s), 2 s (100 s), 10 s (480 s)	80	80	2 compartment	Left ventricle	BF, PS, f _e , f _i .	[23]

^a A phase refers to a scan time with a given temporal resolution, as detailed in the third column.

^b Retrospectively reconstructed. 2D = planar, 3D = volumetric. BF = blood flow, BV = blood volume, PS = permeability surface area product, MTT = mean transit time, rBV = relative blood volume, rBF = relative blood flow, f_e = fractional extracellular volume, f_i = fractional intravascular volume, AUC = area under the curve, K^{trans} = volume transfer constant, RF = relative flow. CT = computed tomography, micro-CT = micro-computed tomography, micro-DSA = micro-digital subtraction angiography.

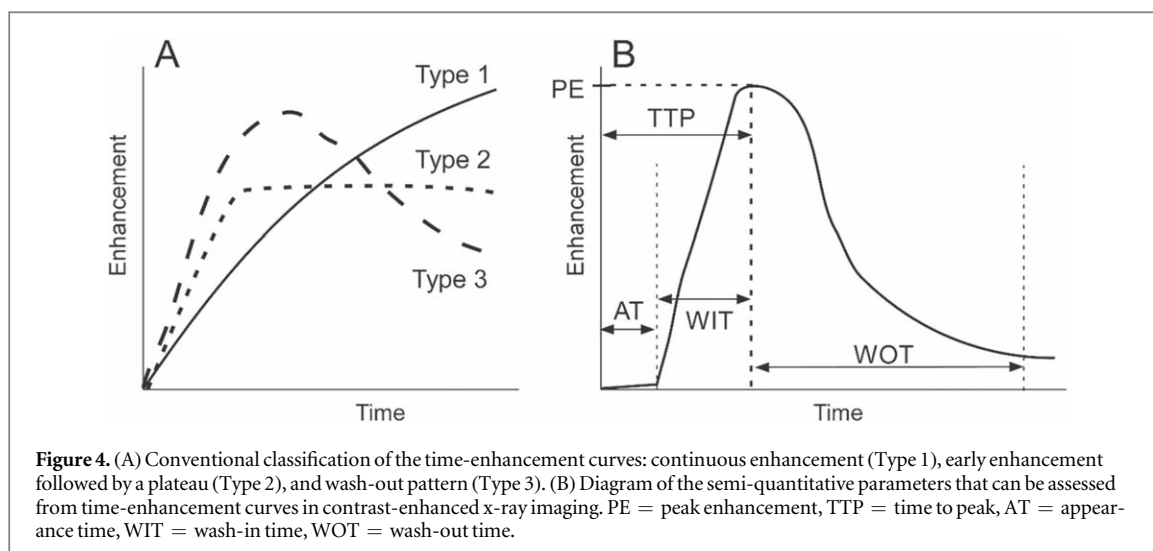


Figure 4. (A) Conventional classification of the time-enhancement curves: continuous enhancement (Type 1), early enhancement followed by a plateau (Type 2), and wash-out pattern (Type 3). (B) Diagram of the semi-quantitative parameters that can be assessed from time-enhancement curves in contrast-enhanced x-ray imaging. PE = peak enhancement, TTP = time to peak, AT = appearance time, WIT = wash-in time, WOT = wash-out time.

made with thermo-luminescent dosimeters (TLDs) *ex vivo*, with TLD-100 [69]. A novel TLD approach involves the calibration of TLD-100 response as a function of the effective beam energy determined by TLD-300 [65, 70]. Radiation doses from micro-CT imaging in mice, estimated from the air-kerma measured at the isocenter of the system, range from 100–300 mGy and are below the lethal dose $LD_{50/30}$ for mice (5.0–7.6 Gy) [71, 72].

4. Image analysis and quantification of vascular features

Prior image quantification and in order to obtain measurements that can be comparable among time points and individuals, details on image acquisition, reconstruction, and analysis must be observed and standardized, such as: choosing the proper combination of tube voltage and mAs to maximize CNR and minimize radiation dose [62], performing self-calibration of the imaging system to provide spatial uniformity [73], minimizing metal and motion artifacts [74, 75], verifying signal linearity and measurement precision [65, 76], performing a correct subject alignment, image registration, and VOI segmentation [60, 77]. Then, the assessment of vascular features can be performed with qualitative, semi-quantitative, and quantitative methods of analysis.

4.1. Qualitative analysis

Qualitative methods are based on the observation of changes of signal enhancement in a voxel or in a VOI, in a single time acquisition (cross-sectional study) or in a time-enhancement curve in longitudinal or dynamic studies. These observations can provide descriptive information of the structural architecture of the vessels, the concentration of contrast medium in the core or periphery of a tumor, the microvessel

distribution within a tumor, and the behavior or trend of a time-enhancement curve [24, 31, 32, 36, 37, 40]. Figure 4(A) presents a classification of the time-enhancement curves, in a similar manner to the interpretation of the temporal patterns in magnetic resonance imaging (MRI). The correlation between the temporal patterns of time-enhancement curves and microvessel density, or other histological parameters, can be evaluated in order to describe tumor angiogenesis. Qualitative parameters are useful in proof-of-principle studies in which the first verification would be the actual observation of an enhancement following contrast medium injection, however, their disadvantage is that they do not provide information about the physiological or pathological processes involved in the transit of contrast medium into the bloodstream, tissues, and tumor.

4.2. Semi-quantitative analysis

Semi-quantitative methods are based on the extraction of parameters directly from the time-enhancement curves, similar to MRI [78]. A time-enhancement curve in x-ray imaging may be in terms of attenuation (HU), changes in attenuation (Δ HU), iodine concentration (mg I/cm^3 , mg I/ml), or iodine mass thickness (mg I/cm^2). Semi-quantitative parameters include the area under the curve (AUC), peak enhancement (PE), time to peak (TTP), appearance time (AT), wash-in time (WIT), wash-in rate (WIR), wash-out time (WOT), wash-out rate (WOR), and mean transit time (MTT). Another parameter called enhancement is defined as the change in signal intensity from baseline, divided by the baseline value. Some of these parameters are described in figure 4(B).

Semi-quantitative parameters are not commonly used in the preclinical study of tumor angiogenesis with contrast-enhanced x-ray imaging. However, some of them are used as input parameters in quantitative analysis since they may relate to some

physiological quantities [79]. The advantage of these parameters is that they can be easily obtained from time-enhancement curves; their disadvantage is that the shape of the curve may be influenced by contrast medium dose, injection rate and volume, and cardiac output, among others.

4.3. Quantitative analysis

After the injection, contrast medium will be distributed into the vascular system and then it will reach the tissues. After its arrival, contrast medium will pass from the intravascular space to the extravascular-extracellular space in all tissues, except the brain, retina and testis, across the capillary basement membrane [80, 81]. There is no significant uptake of the contrast medium into the intracellular space. After some residence time in the extracellular space, the contrast medium will return to the intravascular space, and it will be excreted by the kidneys (in the case of LMW contrast media), or by the liver and spleen (in the case of blood pool contrast media).

The arrival of the contrast medium to a tissue is known as the first pass, and it is governed by blood flow. The delayed or late phase in which the contrast medium passes to the extracellular space depends on the blood volume within the tissue, and on the permeability of the capillaries to the contrast medium. Quantitative parameters related to the transit of contrast media into the different spaces can be derived by single measurements or by kinetic analysis of the time-enhancement curves during the first pass and the delayed phase.

4.3.1. Single measurements: approximations to perfusion

Signal enhancement is the simplest parameter that can be quantified in contrast-enhanced x-ray imaging. It is given by the mean attenuation value in a VOI in Hounsfield units (\overline{HU}_{postMC}), if only post-contrast images are acquired. If a pre-contrast image is acquired (\overline{HU}_{preMC}), the enhancement is quantified as the change in attenuation values (ΔHU): $\Delta HU = \overline{HU}_{postMC} - \overline{HU}_{preMC}$. ΔHU is a simple approximation to perfusion, and it is called tumor perfusion score [54].

The enhancing fraction (E_F) represents the fraction of a tumor volume (composed by N voxels) above a certain signal threshold [54], which could be selected as the detectability threshold (T , also called sensitivity limit) of the imaging system for a given contrast medium:

$$\delta_n = \begin{cases} 0, & \Delta HU \leq T \\ 1, & \Delta HU > T \end{cases} \quad (5)$$

$$E_F = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \delta_n \quad (6)$$

The relative blood volume (rBV) is the percentage of a tumor (ΔHU_{tumor}) composed of vasculature [40], and it is compared to the enhancement value in blood

measured in a large reference blood vessel, such as the aorta (ΔHU_{aorta}):

$$rBV = 100 \frac{\Delta HU_{tumor}}{\Delta HU_{aorta}}. \quad (7)$$

A similar measurement is the fractional blood volume (FBV), or plasma volume fraction (PVF), that compares the concentration of iodine in tumors (CI_{tumor}) to the concentration measured in a large vessel (CI_{aorta}) [32, 33]: $FBV = CI_{tumor}/CI_{aorta}$.

4.3.2. Kinetic analysis: perfusion and permeability

A common approach to describe transport phenomena in biomedicine is to decompose the physiological system into mathematical compartments that follow the mass conservation laws, and are described by differential equations. The vascular parameters can be quantified by solving the differential equations that describe the system.

In the kinetic analysis of the distribution of contrast media from the intravascular space to the extracellular space, the following vascular parameters are essential [79, 82]:

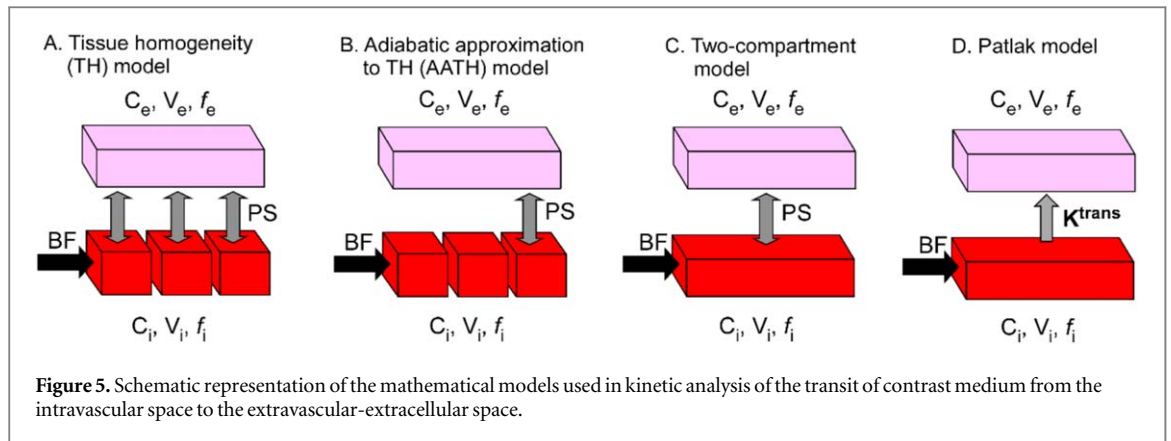
- Blood flow, BF (ml/min), which refers to the flow rate of blood through the vasculature.
- Permeability surface area product, PS (min^{-1}), i.e., the product of permeability and total surface area of capillary endothelium in a unit volume of tissue.
- The volume of each compartment (ml), and their fraction compared to the tissue volume (V_t): intravascular volume (V_i), fractional intravascular volume ($f_i = V_i/V_t$), extracellular volume (V_e), fractional extracellular volume ($f_e = V_e/V_t$).
- Other vascular parameters that can be derived from BF, PS, and the volumes are [79]:
- Perfusion, P (ml/min/ml), is defined as the blood flow per unit volume of tissue.
- Extraction fraction (E) is the fraction of contrast medium particles that are extracted into the tissue. According to the Renkin-Crone relationship, E is given by:

$$E = 1 - e^{-PS/BF}. \quad (8)$$

- Volume transfer constant, K^{trans} (min^{-1}), defined as the rate at which the contrast medium travels from the intravascular to the extracellular space. It is given by the product of BF and E:

$$K^{trans} = BF \cdot E = BF(1 - e^{-PS/BF}). \quad (9)$$

The most commonly used kinetic models in contrast-enhanced x-ray imaging with small animals are the Johnson-Wilson distributed parameter model, two-compartment model, and Patlak model [22–25, 27, 28]. The difference among them arise from the



level of complexity (given by the way in which the compartments are represented), the assumptions they make to be valid, and the parameters that they can estimate. The analysis may be done on selected VOIs in the images, or in a pixel-wise manner. VOI analysis of the whole tumor provides a global view of perfusion, it is least susceptible to observer error and experience, but it does not reflect tumor heterogeneity that could be highlighted in the parametric maps with pixel-wise analysis.

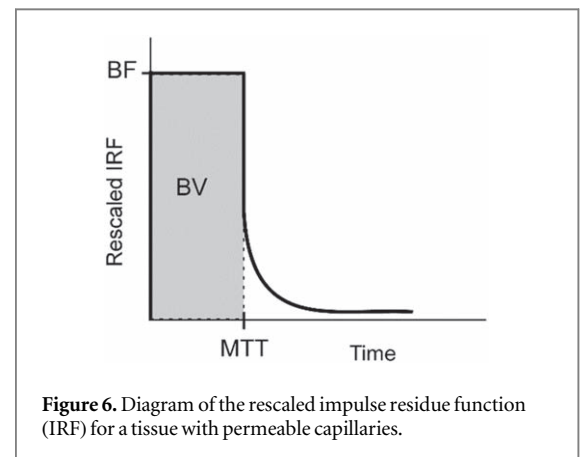
4.3.2.1. Johnson-Wilson distributed parameter model

Johnson and Wilson proposed a model in which the diffusion of the contrast medium molecules from the intravascular space to the extravascular-extracellular space is governed by a concentration gradient in the intravascular space [83]. Their model is known as the tissue homogeneity (TH) model since they consider the extravascular space as a well-mixed compartment [79], as shown in figure 5(A). The limitation of this model is that its solution only exists in the Laplace space [79, 84].

St Lawrence and Lee proposed an adiabatic approximation (AATH) to TH model to provide an analytical solution in the time domain [85]. This model is described in figure 5(B), the intravascular compartment is presented as a plug-flow system (with concentration C_i and volume V_i), while the extravascular or tissue compartment (with concentration C_t and volume V_e) is considered a well-mixed compartment. The AATH model further assumes that the dynamics in the extravascular space are slower compared to that in the intravascular space and then the extravascular state can be considered to be at a steady state. Also, it assumes that the transport of contrast medium occurs only at the venous end of the capillaries. These assumptions give place to the next expression for the tissue time-enhancement curve $C_t(t)$:

$$C_t(t) = BF \cdot C_a(t) * R_t(t), \quad (10)$$

where BF is the blood flow, $C_a(t)$ is the time-enhancement curve measured at an input vessel that supplies blood to the tissue (also called arterial input function, AIF), $R_t(t)$ is the impulse residue function (IRF), and



the symbol $*$ denotes the mathematical operation of convolution [84, 86]. The IRF represents the mass of contrast medium remaining in a tissue over time when recirculation is not considered [27, 82], it can be determined by deconvolution of equation (10) [85]:

$$R_t(t) = \begin{cases} 1 & 0 \leq t < T_c \\ Ee^{-\frac{BF \cdot E}{V_e}(t-T_c)} & t \geq T_c \end{cases}, \quad (11)$$

where $T_c = V_i/BF$ is the transit time across the capillary, E is the extraction fraction, and V_e is the volume of the extravascular space (also denoted as blood volume, BV).

The IRF can be rescaled by BF : $R_t^s(t) = BF \cdot R_t(t)$, as shown in figure 6. The rescaled IRF has two phases [85, 86]. In the ‘vascular phase’, a fraction of the contrast medium is extracted from the intravascular space into the extravascular space and retained there prior to any venous outflow. This phase is characterized by a peak of height equal to BF , a width equal to MTT , and an area under the curve equal to BV (for the time interval $[0, T_c]$). The ‘parenchymal phase’ is related to the clearance of the contrast medium from the extravascular space, returning to the intravascular space. It starts at $BF \cdot E$ and decays monoexponentially with time, according to equation (11).

Once E , BF , MTT , and BV are derived from the $R_t^s(t)$, other vascular parameters can be quantified. Since BF and E are known, K^{trans} can be directly obtained with equation (9). From the Renkin-Crone

relationship (equation (8)), PS can be estimated with the following equation: $PS = BF \ln(E - 1)$. From the central volume principle, we have: $BF = V_i / MTT$, and then [87]: $V_i = BF \cdot MTT$.

4.3.2.2. Two-compartment model

Compartmental analysis considers the internal structure of the system, which is described by mathematical compartments that interact and represent the kinetic states of the contrast medium distribution. The general two-compartment model is described in figure 5(C) and it is a further simplification of the AATH model [79]. It consists of one intravascular compartment (with concentration $C_i(t)$ and volume V_i) and one extracellular compartment (with concentration $C_e(t)$ and volume V_e), both considered as well-mixed compartments. The law of mass conservation for this model is given by the following equations:

$$f_i \frac{dC_i(t)}{dt} = BF(C_a(t) - C_i(t)) - PS(C_i(t) - C_e(t)), \quad (12)$$

$$f_e \frac{dC_e(t)}{dt} = PS(C_i(t) - C_e(t)), \quad (13)$$

where $C_a(t)$ is the AIF, BF is the blood flow, PS is the permeability surface area product, and f_i and f_e are the fractional intravascular and extracellular volumes, respectively. An analytical solution of the IRF for this model is given by [79]:

$$R_t(t) = Ae^{-\alpha t} + (1 - A)e^{-\beta t}, \quad (14)$$

where A, α , and β are related to BF, PS, f_i , and f_e by the following relationships:

$$\frac{BF}{f_i} = A(\alpha - \beta) + \beta \quad (15)$$

$$\frac{PS}{f_e} = \alpha + \beta - \frac{\alpha\beta}{A(\alpha - \beta) + \beta}, \quad (16)$$

$$\frac{PS}{f_i} = \frac{\alpha\beta}{A(\alpha - \beta) + \beta}. \quad (17)$$

Another approach to solve equations (12) and (13) is to fit a gamma-variate function to the time-enhancement curves, for example:

$$C(t) = PE(e/\alpha\beta)^\alpha (t - AT)^\alpha e^{-(t-AT)/\beta}, \quad (18)$$

where AT = appearance time, PE = peak enhancement, and α and β are fitting parameters that can be obtained by the method of moments or by least squares curve-fitting [88]. According to the fitting parameters from equation (18), MTT and relative flow RF can be obtained as follows [24, 88]: $MTT = AT + \beta(\alpha + 1)$, $RF = 1/MTT$.

4.3.2.3. Patlak model

Patlak model also considers two compartments (intravascular, and extracellular), but assumes a unidirectional transport of contrast medium (i.e. an irreversible transference of the contrast medium in the steady-state phase: K^{trans} instead of PS) and

well-mixed compartments [79, 89], as shown in figure 5(D). In general, the total concentration of contrast medium at time t in a voxel of tissue $C_t(t)$ can be described as a weighted sum of the concentrations in the extracellular and intravascular compartments [79]:

$$C_t(t) = f_e C_e(t) + f_i C_i(t). \quad (19)$$

The law of mass conservation for this model is a modification of equation (13), assuming the unidirectional flow:

$$f_e \frac{dC_e(t)}{dt} = K^{trans} C_a(t). \quad (20)$$

Integrating equation (20) to a time t yields:

$$f_e C_e(t) = K^{trans} \int_0^t C_a(t) dt, \quad (21)$$

Substituting equation (21) into equation (19) and dividing by $C_a(t)$ yields:

$$\frac{C_t(t)}{C_a(t)} = K^{trans} \frac{\int_0^t C_a(t) dt}{C_a(t)} + f_i. \quad (22)$$

As it can be observed, equation (22) is in the form of a linear equation: $y = mx + b$, where $m = K^{trans}$ and $b = f_i = rBV$. In this way, a linear fit of the involved quantities will give the relative blood volume rBV and the volume transfer constant K^{trans} .

5. Preclinical applications in cancer

Medical imaging is involved in all stages of cancer management, which include screening, diagnosis, staging, treatment, monitoring, and follow-up [90]. The onset of tumor angiogenesis involves morphological and functional changes that can be evaluated with contrast-enhanced x-ray imaging. Applications of this imaging technique in preclinical studies include lesion detection and characterization to improve diagnosis, evaluation of vascular parameters as prognostic and predictive biomarkers, and evaluation of treatment response.

5.1. Lesion detection and characterization

To detect a lesion in an image, it must be distinguished from the surrounding healthy tissue [78]. Contrast-enhanced x-ray imaging increases lesion conspicuity due to the contrast medium uptake within the tumors. Several preclinical studies with this imaging technique have quantified the enhancement in tumors compared to healthy tissues, moreover, this technique allows the visualization and characterization of the 3D vascular architecture of the tumor. Samei *et al* observed an enhancement of 326 ± 151 HU in a tumor, compared to muscle, using iodinated liposomes in a breast tumor rat model [36]. Areas of high and low enhancement were observed in the tumor periphery and core, respectively. Ghaghada *et al* used the same contrast

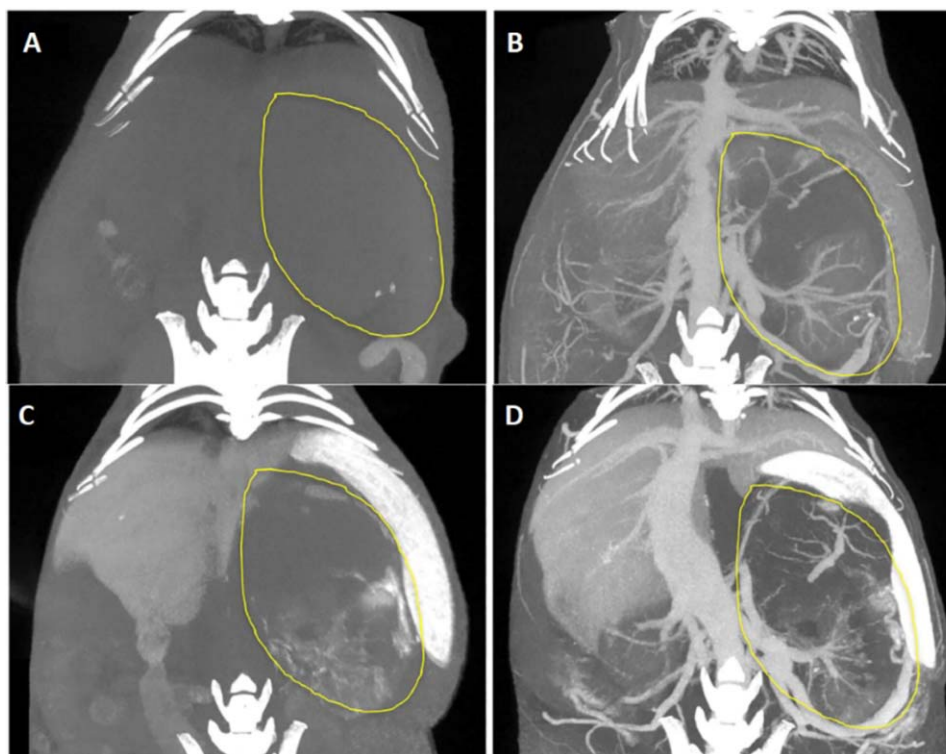


Figure 7. Longitudinal contrast-enhanced x-ray imaging studies with iodinated liposomes. (A) Pre-contrast image of an orthotopic renal capsule mouse model of neuroblastoma. Tumor is outlined by the yellow line. (B) Abdominal and renal vasculature were visible immediately after contrast medium injection. (C) Contrast medium accumulation within the tumor was observed 5 days post-injection, as well as liver and spleen enhancement. (D) Vasculature and intratumoral accumulation were observed after a second injection of contrast medium. Reproduced from [31].

medium in an orthotopic renal capsule mouse model of neuroblastoma [31]. In an early imaging phase (just after the injection of the contrast medium) images showed the abdominal and renal vasculature, while in a delayed phase (5 days post-contrast medium injection), intratumoral accumulation was observed, as shown in figure 7. Morphological characteristics of the tumor vasculature were identified, as well as different intratumoral accumulation patterns. Reuveni *et al* observed a 5-fold enhancement in a tumor using a targeted AuNp contrast medium, compared to a non-targeted AuNp contrast medium, in a head and neck squamous cell carcinoma mouse model [43]. Although these observations were qualitative, and the correlation with benignity or malignancy was not evaluated, they provide key insights on the morphological behavior of the tumor vasculature.

Following detection, the lesion can be characterized by its vascular parameters quantified with static or dynamic contrast-enhanced x-ray imaging, as summarized in tables 3 and 4. Table 5 shows some specific vascular parameters for three widely used small animal cancer models, obtained with dynamic contrast-enhanced x-ray imaging.

5.2. Prognostic and predictive biomarkers

Microvessel density (MVD) is a surrogate biomarker of tumor angiogenesis, and it has prognostic value for

several solid tumors. An increased MVD is associated with an increase in metastasis and recurrence, and a decrease in patient survival [81, 91–93]. Fewer studies have evaluated the predictive value of MVD, but in patients with lung cancer and high MVD of undifferentiated endothelial cells a decrease in tumor volume was observed after treatment with a chemotherapy regimen plus bevacizumab [94].

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a mitogen for endothelial cells, it promotes angiogenesis and enhances vascular permeability. The level of VEGF expression has prognostic value in breast cancer, lung cancer, and colorectal cancer. A high VEGF level is associated with worse relapse-free survival, and overall survival in breast cancer [95], and with a decrease in patient survival in lung cancer and colorectal cancer [96, 97]. It also provides predictive information, breast cancer patients with high levels of VEGF may have increased recurrence or decreased survival after conventional adjuvant therapy [95].

Some preclinical studies have assessed the prognostic or predictive value of vascular parameters obtained with contrast-enhanced x-ray imaging, by comparison with MVD or level of VEGF expression. Ekdawi *et al* used an iodinated liposome contrast medium in mice bearing orthotopic cervical ME180 tumors to evaluate PVF [32]. A temporal trend of contrast medium accumulation in the tumor periphery but not in the tumor core was observed. A positive

Table 5. Vascular parameters quantified in selected preclinical dynamic studies of tumor angiogenesis with contrast-enhanced x-ray imaging.

Parameters	Reference [23]	Reference [28]	Reference [25] ^c	Reference [27]
Cell line	MCF-7	C6	C6	VX2
Analysis method	2 compartment	2 compartment	Johnson-Wilson	Johnson-Wilson
BF [ml/min/100g]	16.5 ± 5.4	630.21 ± 157.90 ^a (rim) 635.38 ± 158.32 (core)	63.1 ± 2.1 (10 d) 80.1 ± 11.3 ^a (14 d) 95.0 ± 2.5 ^a (18 d)	37.2 ± 21.0 ^b (rim) 6.96 ± 2.96 (core)
PS [ml/min/100 g]	4.3 ± 0.5	21.01 ± 8.10 ^a (rim) 39.76 ± 11.39 ^a (core)		40.4 ± 22.1 ^b (rim) 3.36 ± 2.19 (core)
BV [ml/1000 g]		191.7 ± 51.3 ^a (rim) 197.0 ± 63.2 ^a (core)	382 ± 8 (10 d) 457 ± 19 ^a (14 d) 508 ± 17 ^a (18 d)	20.8 ± 12.2 ^b (rim) 3.54 ± 2.05 (core)
MTT [s]		1.85 ± 0.24 ^a (rim) 1.88 ± 0.23 ^b (core)		4.95 ± 1.81 ^b (rim) 9.29 ± 0.77 (core)
f _i [ml/ml]	0.102 ± 0.016			
f _e [ml/ml]	0.165 ± 0.027 ^b			

^a $p < 0.01$ versus their respective control tissue (not shown).

^b $p < 0.05$ versus their respective control tissue (not shown).

^c Parameters were quantified three times: 10 days, 14 days, and 18 days post-injection of C6 cells. BF = blood flow, PS = permeability surface area product, BV = blood volume, MTT = mean transit time, f_e = fractional extracellular volume, f_i = fractional intravascular volume.

correlation between PVF and MVD was found, and areas with high MVD showed a high contrast medium accumulation for images acquired after 2 h post-injection.

Karathanasis *et al* used a mammography system to characterize the dynamics of an iodinated liposome contrast medium in a breast cancer rat model, as shown in figure 8 [37]. It was observed that the high VEGF expression in specific tumors resulted in more leakage in vessels, and in a high intratumoral accumulation of contrast medium.

Ehling *et al* evaluated four different mouse xenograft models with different angiogenic phenotype and VEGF expression levels using a lipid nano-emulsion and *in vivo* and *ex vivo* micro-CT imaging [40]: epidermoid carcinoma, anaplastic lung carcinoma, ovarian carcinoma, and non-small cell lung carcinoma. Relative blood volume (rBV) was calculated from dual energy images after contrast medium injection for each tumor model, and from tissue samples that were immunostained with anti-CD31, an angiogenesis biomarker. A highly significant correlation was found between rBV values and level of anti-CD31 expression.

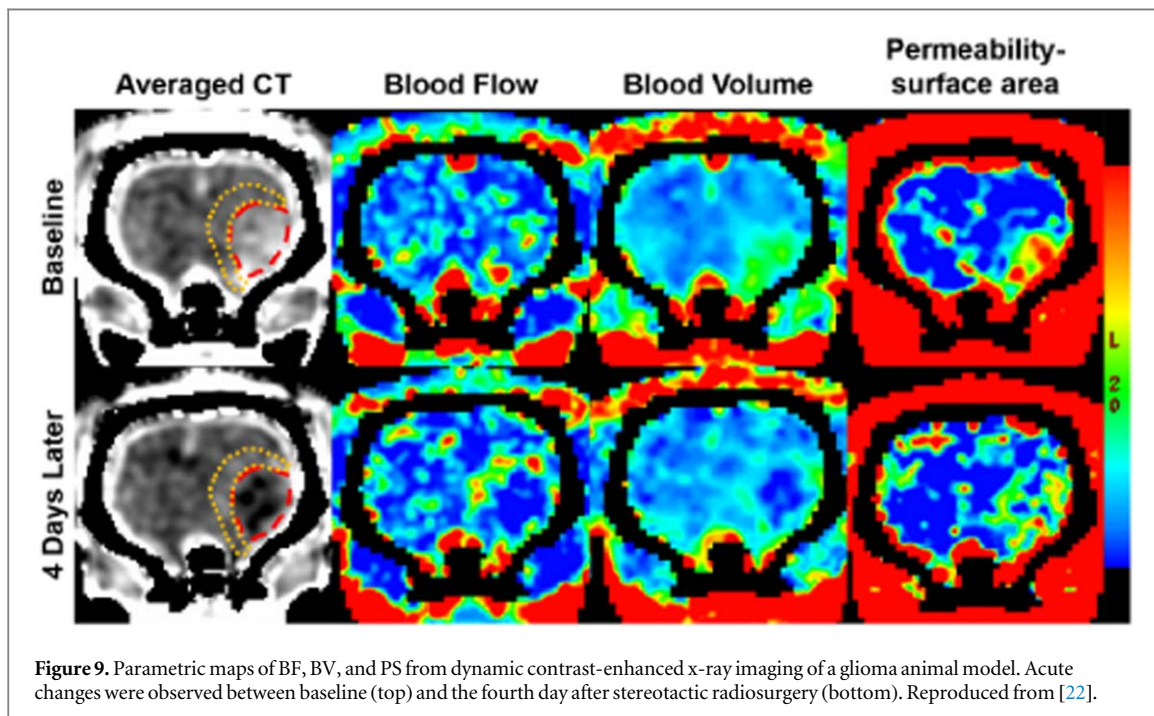
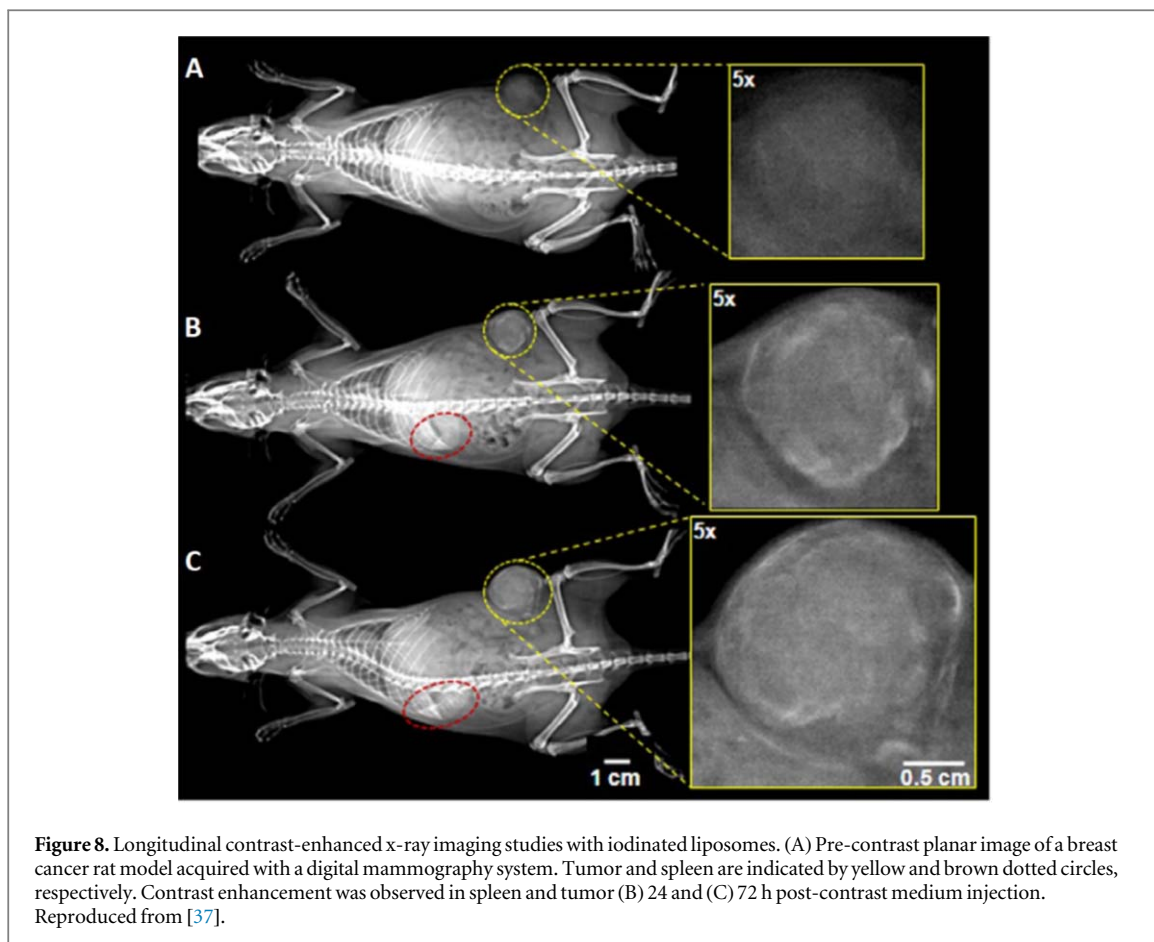
Cao *et al* evaluated a breast cancer model with two different angiogenic phenotypes, VEGF₁₆₅ transfected (MCF-7^{VEGF}) and wild type MCF-7 (MCF-7^{neo}) breast cancer xenografts [23]. A perfusion imaging protocol was used with a LMW contrast medium, and two compartment analysis was performed in order to obtain parametric maps of BF, PS, f_i and f_e. The parametric maps were able to describe qualitatively the intratumoral heterogeneity. Quantitative analysis showed that MCF-7^{VEGF} tumor had significant higher mean values (the whole tumor) for BF, PS, f_i, and f_e compared to muscle and MCF-7^{neo} tumor; no significant difference was found between MCF-7^{neo} and muscle,

except for f_e. Regions with high blood vessel density in the histological samples were found to match a hot spot on the physiological f_i map. The regions of the map with no significant enhancement corresponded to a necrotic region in the histological samples.

5.3. Treatment response

Tumor size has been the traditional measure to evaluate treatment response, and to classify it as complete response, partial response, stable disease, and progressive disease. The same classification is used by the response criteria in solid tumors (RECIST), but a one dimensional measurement is considered (the longest diameter of a lesion). RECIST is the most used criteria in clinical trials, and CT and magnetic resonance imaging (MRI) are suggested as the best and more reproducible methods for measuring target lesion for evaluation of treatment response [98, 99]. Another classification relies on patient survival time, and measures disease-free, progression-free (PFS), and overall survival (OS) time. However, these criteria present limitations in early stages of cancer treatment, since functional changes are prior to changes in tumor size (especially in anti-angiogenic therapies, which are cytostatic rather than cytotoxic) [79]. In this context, the vascular parameters quantified with contrast-enhanced x-ray imaging can be used to evaluate treatment response.

Perfusion CT has been used to monitor acute and late changes in tumor microcirculation following treatment with stereotactic radiosurgery in a rat glioma model [22, 28]. After a treatment with stereotactic radiosurgery (12 Gy delivered by helical tomotherapy), Yeung *et al* [22] observed acute changes including a decrease of tumor volume (TV), relative blood flow (rBF), and relative blood volume (rBV)



while tumor periphery showed an increase of rBF, rBV, and PS compared to baseline values, as shown in figure 9. In the responders group (animals with survival > 15 days after radiosurgery), late changes included lower rBF, rBV, and PS compared to the control group (no treatment) and non-responders. It was

observed that rBV and PS (on day 7 after radiosurgery) correlated with overall survival and showed a better predictive performance than TV.

Semi-quantitative and quantitative vascular parameters obtained with contrast-enhanced x-ray imaging have been used to evaluate anti-angiogenic

treatment response with Afinitor (Novartis AG, Basel, Switzerland) in a breast cancer mouse model [26]. Total TV, and central and peripheral volumes were measured by segmentation from the contrast-enhanced images. For all tumor regions, AUC was significantly lower in the treatment group than in the control group (no treatment). K^{trans} and rBV in the tumor periphery were significantly higher in the treatment group than in the control group. Total TV was significantly smaller in the treatment group compared to the control group.

6. Discussion

The use of blood pool and LMW contrast media in the study of tumor angiogenesis with either static or dynamic contrast-enhanced x-ray imaging is dictated by their different pharmacokinetics. LMW contrast media have been mainly used in dynamic studies with fast micro-CT or CT systems to quantify blood flow, permeability, and other vascular parameters by means of kinetic analysis. Blood pool contrast media, on the other hand, have been mainly used in static studies with micro-CT systems to describe tumor vasculature, as well as to quantify rBV and the extravasated concentration. Therefore, each type of contrast medium reveals different aspects about tumor vasculature. Although the information obtained with blood pool contrast media might seem limited, it is the most directly attainable due to the long scan durations of micro-CT systems available in most laboratories.

An important feature of the particles that constitute blood pool contrast media is their uptake by macrophages. Although it is known that macrophages from the RES (mainly in liver and spleen) rapidly uptake these particles, little is known of their uptake by tumor associated macrophages (TAM), that are recruited or infiltrated in the tumor microenvironment, and how this could impact on the quantification of rBV or other permeability parameters, such as the extravasated concentration of the contrast medium. To reduce or avoid the recognition of these particles by the immune system, new methods are being explored such as using polymer coated nanoparticles [13].

Contrast-enhanced MRI (CE-MRI) is the most used modality to evaluate vascular parameters and angiogenesis using noninvasive imaging techniques in preclinical applications [99]. However, this imaging modality has inherent limitations such as the non-linear relationship between the signal intensity and the concentration of the contrast medium [82]. This is not a limitation in x-ray imaging with CT and micro-CT systems, in which signal intensity is directly related to the attenuation properties of tissues.

In preclinical imaging, a voxel size of 100 μm is necessary to resolve a tissue basic functional unit, defined by Ritman as ‘the smallest accumulation of diverse cells that behave like the organ in which they

are found’ [53], such as glomeruli in the kidney. However, spatial resolution and voxel size are not the same, since generally voxels are smaller than the actual spatial resolution of a system. Spatial resolution is similar in CE-MRI and CT imaging, but it is not uniform in CE-MRI due to the anisotropic voxel size in the images, in contrast with the isotropic voxel size in modern CT and micro-CT scanner images.

Scan duration is defined as the time needed to acquire all the data to obtain one image, while temporal resolution is defined as the time between two consecutive images in order to accurately describe a dynamic process. High temporal resolution is inherent in preclinical studies of tumor angiogenesis due to the physiology of small animals; scan durations of the order of a second or less are needed in preclinical imaging. Longer scan durations are required to acquire an image with CE-MRI than with CT imaging, which in turn increases the probability of motion artifacts.

Another limitation in CE-MRI is the analytical model used to obtain the quantitative vascular parameters. Kety and Tofts models are commonly used in CE-MRI, in which K^{trans} is generally obtained. K^{trans} represents a mixed description of perfusion and permeability, which makes difficult to interpret its meaning. In contrast, perfusion and permeability can be independently assessed by quantitative analysis of contrast-enhanced x-ray images.

Contrast-enhanced x-ray imaging provides useful qualitative, semi-quantitative and quantitative information about the vascular architecture and vascular functionality of tumors in the preclinical scenario, providing an exciting landscape for the description of the temporal and spatial heterogeneity of tumors in a noninvasive manner. Single measurements such as tumor perfusion score, enhancing fraction, relative blood volume, and fractional blood volume only require a single measurement of the enhancement in a tissue or tumor. The advantage of these parameters is that pre-contrast images and information of the arterial distribution of contrast media are not necessary. Their disadvantage is precisely the lack of information about the functional parameters of contrast medium distribution within the tissue or tumor. On the other hand, functional parameters can be obtained with the AATH model or with two-compartment analysis. The disadvantage of AATH model is that deconvolution usually does not have a unique solution [82]. These models require the first pass information of the contrast medium, depicted by the AIF, and this confines its applications to studies with CT or micro-CT systems with high temporal resolution and short scan durations. The size of the input vessel is also a concern to prevent partial volume effects [84, 87, 100]. An option for slower acquisitions is Patlak analysis. It assumes that the back flux of contrast medium from the extravascular to the intravascular compartment can be neglected for a given time and allows to evaluate the presence and duration of the steady state unidirectional influx. This model is limited, since it provides only two

quantitative parameters, but it is a suitable option to AATH and two-compartment models.

Some aspects about LMW contrast medium administration have an impact on the magnitude and form of the time-enhancement curve and, therefore, on the vascular parameters that can be obtained with dynamic imaging. Relevant aspects are the injection volume, injection rate, and injection duration [101]. Injection volume is defined by the animal model to be used and by the high Z material concentration of the contrast medium. Injection rate and duration depend generally on the time resolution of the scanner and scan duration and are also influenced by the animal model. When scan duration is long, as in most micro-CT systems, slow injection rates or continuous injections are preferred in order to prolong contrast enhancement. For fast scanners, faster injection rates are preferred in order to achieve higher levels of arterial enhancement in short times without increasing injection volume or contrast medium concentration. In the practice, it is suggested to determine an optimal injection duration for each type of subject and examination, either empirically or through pharmacokinetic modeling.

Contrast-enhanced x-ray imaging increases lesion conspicuity, providing key insights of the morphological and structural aspects of vasculature by means of qualitative observations. There is increasing evidence of the positive correlations between the semi-quantitative and quantitative vascular parameters obtained with this imaging technique and the MVD, or the level of expression of angiogenesis biomarkers such as VEGF. These results highlight the predictive and prognostic value of the vascular parameters obtained with contrast-enhanced x-ray imaging. The quantification of tumor angiogenesis through this imaging method in the preclinical stage has also showed a clear relevance in the assessment of the therapeutic outcome following anti-angiogenic treatment or stereotactic radiosurgery.

Opportunities to explore the fundamental biological basis of the angiogenic switch in the premalignant stage, the impact of tumor microenvironment on tumor development, or the evaluation of vasculature normalization are ahead of contrast-enhanced x-ray imaging [102]. A boost is expected in this area with the development of new and improved contrast media, as well as with multimodality imaging and new methodologies for image analysis. These improvements will help to unveil the potential of contrast-enhanced x-ray imaging in the several fields of cancer diagnostics and treatment.

7. Conclusions

Radiopaque contrast media is used to increase the signal intensity in x-ray imaging in the preclinical study of cancer. In general, low molecular weight

contrast media have been used to characterize the first pass vascular dynamics of tumors with fast CT systems, while blood pool agents have been preferred to explore the delayed vascular dynamics with micro-CT systems. Together, these approaches provide qualitative, semi-quantitative and quantitative information of the angiogenic process underlying tumor development.

In order to accurately obtain the vascular parameters related to contrast media transport, an adequate imaging protocol must be designed and implemented. The several aspects to be considered were outlined in this review, among them: the characteristics of the contrast medium available, the imaging techniques and the selection of the radiological parameters for image acquisition to balance image quality and radiation dose, and the adequate analytic model to evaluate the vascular parameters.

Applications of these parameters in the preclinical scenario have demonstrated the potential of contrast-enhanced x-ray imaging for lesion detection and characterization, prognosis and predictive biomarkers, and assessment of the therapeutic outcome following an anti-angiogenic treatment or stereotactic radiosurgery. Further technological developments are expected to increase the use of this imaging technique in preclinical studies of tumor angiogenesis.

Acknowledgments

This investigation was partially supported by CONACyT CB-251497 and PAPIIT-UNAM IN107916. Lizbeth Ayala-Domínguez is a 'Doctorado en Ciencias Biomédicas' student at the Universidad Nacional Autónoma de México, and recipient of a scholarship from CONACyT (221487).

ORCID iDs

L Ayala-Domínguez  <https://orcid.org/0000-0002-4969-4168>

M E Brandan  <https://orcid.org/0000-0002-1165-3440>

References

- [1] Hanahan D and Weinberg RA 2011 Hallmarks of cancer: the next generation *Cell* **144** 646–73
- [2] Folkman J 1971 Tumor angiogenesis: therapeutic implications *N. Engl. J. Med.* **285** 1182–6
- [3] Hoff P M and Machado K K 2012 Role of angiogenesis in the pathogenesis of cancer *Cancer Treat Rev* **38** 825–33
- [4] Chung A S, Lee J and Ferrara N 2010 Targeting tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis *Nature Rev Cancer* **10** 505–14
- [5] Baluk P, Hashizume H and McDonald C M 2005 Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer *Curr Opin Genet Dev* **15** 102–11
- [6] Weidner N 1995 Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors *Breast Cancer Res Treat* **36** 169–80

- [7] Vermeulen P B *et al* 2002 Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours *Eur J Cancer* **38** 1564–79
- [8] Hanahan D and Folkman J 1996 Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis *Cell* **86** 353–64
- [9] Folkman J, Watson K, Ingber D and Hanahan D 1989 Induction of angiogenesis during the transitions from hyperplasia to neoplasia *Nature* **339** 58–61
- [10] Raica M, Cimpean A M and Ribatti D 2009 Angiogenesis in pre-malignant conditions *Eur J Cancer* **45** 1924–34
- [11] Bowden D J and Barrett T 2011 Angiogenesis imaging in neoplasia *J Clin Imaging Sci* **1** 1–38
- [12] Clark D P and Badea C T 2014 Micro-CT of rodents: state-of-the-art and future perspectives *Phys. Medica* **30** 619–34
- [13] Li X, Anton N, Zuber G and Vandamme T 2014 Contrast agents for preclinical targeted x-ray imaging *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **76** 116–33
- [14] Albanese A, Tang P S and Chan W C W 2012 The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **14** 1–16
- [15] Zarschler K *et al* 2016 Ultrasmall inorganic nanoparticles: state-of-the-art and perspectives for biomedical applications *Nanomedicine* **12** 1663–701
- [16] Lynch I and Dawson K A 2008 Protein-nanoparticle interactions *Nano Today* **3** 40–7
- [17] Monopoli M P, Åberg C, Salvati A and Dawson K A 2012 Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials *Nat. Nanotechnol.* **7** 779–86
- [18] Barret T, Kobayashi H, Brechbiel M and Choyke P L 2006 Macromolecular MRI contrast agents for imaging tumor angiogenesis *Eur J Radiol* **60** 353–66
- [19] Maeda H, Fang J, Inutsuka T and Kitamoto Y 2003 Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications *Int Immunopharmacol* **3** 319–28
- [20] Maeda H, Nakamura H and Fang J 2013 The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging *in vivo Adv. Drug. Deliv. Rev.* **65** 71–9
- [21] Maeda H 2015 Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **91** 3–6
- [22] Yeung T P C *et al* 2014 CT perfusion imaging as an early biomarker of differential response to stereotactic radiosurgery in C6 rat gliomas *PLoS ONE* **9** e109781
- [23] Cao M *et al* 2009 Developing DCE-CT to quantify intra-tumor heterogeneity in breast tumors with differing angiogenic phenotype *IEEE Trans. Med. Imaging* **28** 861–71
- [24] Badea C T *et al* 2006 Tumor imaging in small animals with combined micro-CT/micro-DSA system using iodinated conventional and blood pool contrast agents *Contrast Med Mol Imaging* **1** 153–64
- [25] Lu N *et al* 2015 CT perfusion with acetazolamide challenge in C6 gliomas and angiogenesis *PLoS ONE* **10** e0121631
- [26] Eisa F *et al* 2012 Dynamic contrast-enhanced micro-CT on mice with mammary carcinoma for the assessment of antiangiogenic therapy response *Eur Radiol* **22** 900–7
- [27] Purdie T G, Henderson E and Lee T Y 2001 Functional CT imaging of angiogenesis in rabbit VX2 soft-tissue tumour *Phys. Med. Biol.* **46** 3161–75
- [28] Guan L *et al* 2011 Early changes measured by CT perfusion imaging in tumor microcirculation following radiosurgery in rat C6 brain gliomas *J Neurosurg* **114** 1672–80
- [29] Linxweiler J *et al* 2017 Experimental imaging in orthotopic renal cell carcinoma xenograft models: comparative evaluation of high-resolution 3D ultrasonography, *in-vivo* micro-CT and 9.4T MRI *Sci. Rep.* **7** 14249
- [30] Hallouard F *et al* 2010 Iodinated blood pool contrast media for preclinical x-ray imaging applications – a review *Biomaterials* **31** 6249–68
- [31] Ghaghada K B *et al* 2016 Heterogeneous uptake of nanoparticles in mouse models of pediatric high-risk neuroblastoma *PLoS ONE* **11** e0165877
- [32] Ekdawi S N *et al* 2015 Spatial and temporal mapping of heterogeneity in liposome uptake and microvascular distribution in an orthotopic tumor xenograft model *J. Control. Release* **207** 101–11
- [33] Clark D P *et al* 2013 *In vivo* characterization of tumor vasculature using iodine and gold nanoparticles and dual energy micro-CT *Phys. Med. Biol.* **58** 1683–704
- [34] Moding E J *et al* 2013 Dual-energy microcomputed tomography imaging of radiation-induced vascular changes in primary mouse sarcomas *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **85** 1353–9
- [35] Ashton J R *et al* 2014 Dual-energy micro-CT functional imaging of primary lung cancer in mice using gold and iodine nanoparticle contrast agents: a validation study *PLoS ONE* **9** e88129
- [36] Samei E *et al* 2009 Micro-CT imaging of breast tumors in rodents using a liposomal, nanoparticle contrast agent *Int J Nanomedicine* **4** 277–82
- [37] Karathanasis E *et al* 2009 Tumor vascular permeability to a nanoprobe correlates to tumor-specific expression levels of angiogenic markers *PLoS ONE* **4** e5843
- [38] Graham K C *et al* 2008 Contrast-enhanced microcomputed tomography using intraperitoneal contrast injection for the assessment of tumor-burden in liver metastasis models *Invest Radiol* **43** 488–95
- [39] Kindlmann G L *et al* 2005 Practical vessel imaging by computed tomography in live transgenic mouse models for human tumors *Mol Imaging* **4** 417–24
- [40] Ehling J *et al* 2014 MicroCT imaging of tumor angiogenesis: quantitative measures describing micromorphology and vascularization *Am J Pathol* **184** 431–41
- [41] Yin Q *et al* 2013 Poly(iohexol) nanoparticles as contrast agents for *in vivo* x-ray computed tomography imaging *J. Am. Chem. Soc.* **135** 13620–3
- [42] Hainfeld J F *et al* 2011 Micro-CT enables microlocalisation and quantification of Her2-targeted gold nanoparticles within tumour regions *Br. J. Radiol.* **84** 526–33
- [43] Reuveni T *et al* 2011 Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer: an *in vivo* study *Int J Nanomedicine* **6** 2859–64
- [44] Mukundan S *et al* 2006 A liposomal nanoscale contrast agent for preclinical CT in mice *Am. J. Roentgenol.* **186** 300–7
- [45] Mannheim J G *et al* 2016 Comparison of small animal CT contrast agents *Contrast Media Mol Imaging* **11** 272–84
- [46] Suckow C E and Stout D B 2008 MicroCT liver contrast agent enhancement over time, dose, and mouse strain *Mol Imaging Biol* **10** 114–20
- [47] Badea C T, Fubara B, Hedlund L W and Johnson G A 2005 4D micro-CT of the mouse heart *Mol Imaging* **4** 110–6
- [48] Adhikarla V and Jeraj R 2012 An imaging-based stochastic model for simulation of tumour vasculature *Phys. Med. Biol.* **57** 6103–24
- [49] Davies B and Morris T 1993 Physiological parameters in laboratory animals and humans *Pharm. Res.* **10** 1093–5
- [50] Jakhmola A, Anton N and Vandamme T F 2012 Inorganic nanoparticles based contrast agents for x-ray computed tomography *Adv. Healthcare Mater.* **1** 413–31
- [51] Ashton J R, West J L and Badea C T 2015 *in vivo* small animal micro-CT using nanoparticle contrast agents *Front Pharmacol* **6** 256
- [52] Goldman L W 2007 Principles of CT and CT technology *J. Nucl. Med. Technol.* **35** 115–28
- [53] Ritman E L 2011 Current status of developments and applications of micro-CT *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **13** 531–52
- [54] Michalsky M H and Chen X 2011 Molecular imaging in cancer treatment *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **38** 358–77
- [55] Forghani R, De Man B and Gupta R 2017 Dual energy computed tomography. physical principles, approaches to scanning, usage, and implementation: I *Neuroimag Clin N Am* **27** 371–84

- [56] Yeh B M *et al* 2017 Opportunities for new CT contrast agents to maximize the diagnostic potential of emerging spectral CT technologies *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **113** 201–22
- [57] Hubbell J H and Seltzer S M 2004 *Tables of X-Ray Mass Attenuation Coefficients and Mass Energy-Absorption Coefficients (version 1.4)* (Gaithersburg, MD: National Institute of Standards and Technology) (<https://doi.org/10.18434/T4D01F>)
- [58] Forghani R, De Man B and Gupta R 2017 Dual energy computed tomography. Physical principles, approaches to scanning, usage, and implementation: II *Neuroimag Clin N Am* **27** 385–400
- [59] Wu X *et al* 2009 Monochromatic CT image representation via fast switching dual kVp *Proc. SPIE* **7258** 725845
- [60] Castillo J P *et al* 2016 Optimization of dual-energy subtraction for preclinical studies using a commercial Micro CT unit *AIP Conf. Proc.* vol 1747p080005
- [61] Vinegar H J and Wellington S L 1987 Tomographic imaging of three phase flow experiments *Rev. Sci. Instrum.* **58** 96–107
- [62] Konstas A A, Goldmakher G V, Lee T Y and Lev M H 2009 Theoretic basis and technical implementations of CT perfusion in acute ischemic stroke: I. Theoretic basis *Am J Neuroradiol* **30** 662–8
- [63] Konstas A A, Goldmakher G V, Lee T Y and Lev M H 2009 Theoretic basis and technical implementations of CT perfusion in acute ischemic stroke: II. Technical implementations *Am J Neuroradiol* **30** 885–92
- [64] Brandan M E *et al* 2016 Clinical study of contrast-enhanced digital mammography and the evaluation of blood and lymphatic microvessel density *Br. J. Radiol.* **89** 20160232
- [65] Berumen F, Ayala-Domínguez L, Medina L A and Brandan M E 2016 Characterization of a microCT for preclinical studies using contrast-enhanced digital subtraction images *AIP Conf. Proc.* vol 1747p080003
- [66] Verdun F R *et al* 2015 Image quality in CT: from physical measurements to model observers *Phys. Medica* **31** 823–43
- [67] Badae C T *et al* 2008 *In vivo* small-animal imaging using micro-CT and digital subtraction angiography *Phys. Med. Biol.* **53** R319–50
- [68] Sisniega A, Vaquero J J and Desco M 2013 Design and assessment principles of semiconductor flat-panel detector-based x-ray micro-CT systems for small-animal imaging *Medical Imaging: Technology and Applications* ed T Farncombe and K Iniewski (Florida–US: CRC Press) pp 109–45
- [69] Obenaus A and Smith A 2004 Radiation dose in rodent tissues during micro-CT imaging *J. Xray. Sci. Technol.* **12** 241–9
- [70] Muñoz I D, Avila O, Gamboa-deBuen I and Brandan M E 2015 Evolution of the CaF₂:Tm (TLD-300) glow curve as an indicator of beam quality for low-energy photon beams *Phys. Med. Biol.* **60** 2135–44
- [71] Boone J M, Velazquez O and Cherry S 2004 Small-animal x-ray dose from micro-CT *Mol Imaging* **3** 149–58
- [72] Ford N L, Thornton M M and Holdsworth D W 2003 Fundamental image quality limits for microcomputed tomography in small animals *Med. Phys.* **30** 2869–77
- [73] Patel V *et al* 2009 Self-calibration of a cone-beam micro-CT system *Med. Phys.* **36** 48–58
- [74] Troy K L and Edwards W B 2018 Practical considerations for obtaining high quality quantitative computed tomography data of the skeletal system *Bone* **110** 58–65
- [75] Bartling S H, Kuntz J and Semmler W 2010 Gating in small-animal cardio-thoracic CT *Methods* **50** 42–9
- [76] Hill M L, Mainprize J G, Mawdsley G E and Yaffe M J 2009 A solid iodinated phantom material for use in tomographic x-ray imaging *Med. Phys.* **36** 4409–20
- [77] Zagorchev L *et al* 2010 Micro computed tomography for vascular exploration *J. Angiogenes Res* **2** 7 -
- [78] Barnes S L, Whisenant J G, Loveless M E and Yankeelov T E 2012 Practical dynamic contrast enhanced MRI in small animal models of cancer: data acquisition, data analysis, and interpretation *Pharmaceutics* **4** 442–78
- [79] Turco S, Wijkstra H and Mischi M 2016 Mathematical models of contrast transport kinetics for cancer diagnostic imaging: a review *IEEE Rev Biomed Eng* **9** 121–47
- [80] Westerland O and Goh V 2014 Perfusion CT: principles, technical aspects and applications in oncology *Functional Imaging in Oncology* ed A Luna *et al* (Berlin, Heidelberg: Springer) (https://doi.org/10.1007/978-3-642-40412-2_15)
- [81] Miles K A 1999 Tumour angiogenesis and its relation to contrast enhancement on computed tomography: a review *Eur J Radiol* **30** 198–205
- [82] Brix G, Griebel J, Kiessling F and Wenz F 2010 Tracer kinetic modelling of tumour angiogenesis based on dynamic contrast-enhanced CT and MRI measurements *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **37** S30–51
- [83] Johnson J A and Wilson T A 1966 A model for capillary exchange *Am. J. Physiol.* **210** 1299–303
- [84] Lee T Y, Purdie T G and Stewart E 2003 CT imaging of angiogenesis *Q J Nucl Med* **41** 171–87
- [85] St Lawrence K S and Lee T Y 1998 An adiabatic approximation to the tissue homogeneity model for water exchange in the brain I. theoretical derivation *J Cereb Blood Flow Metab* **18** 1365–77
- [86] Yeung T P C *et al* 2015 Dynamic perfusion CT in brain tumors *Eur J Radiol* **84** 2386–92
- [87] Cenic A *et al* 1999 Dynamic CT measurement of cerebral blood flow: a validation study *Am J Neuroradiol* **20** 63–73
- [88] Thompson H K, Starmer C F, Whalen R E and McIntosh H D 1964 Indicator transit time considered as a gamma variate *Circ. Res.* **14** 502–15
- [89] Patlak C S and Blasberg R G 1985 Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data generalizations *J Cereb Blood Flow Metab* **5** 584–90
- [90] Fass L 2008 Imaging and cancer: a review *Mol Oncol* **2** 115–52
- [91] Weidner N 1995 Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer *Am J Pathol* **147** 9–19
- [92] Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M and Perret G Y 2004 Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis *Cancer Res* **64** 2941–55
- [93] Leon S P, Folkert R D and Black P M 1996 Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors *Cancer* **77** 362–72
- [94] Zhao Y Y *et al* 2012 Predictive value of intratumoral microvascular density in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving chemotherapy plus bevacizumab *J Thorac Oncol* **7** 71–5
- [95] Gasparini G 2000 Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer *Oncologist* **5** 37–44
- [96] Zhan P *et al* 2009 Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: a systematic review with meta-analysis *J Thorac Oncol* **4** 1094–103
- [97] Ishigami S I *et al* 1998 Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer *Br J Cancer* **78** 1379–84
- [98] Therasse P *et al* 2000 New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors *J Natl Cancer Inst* **92** 205–16
- [99] Marcus C *et al* 2009 Imaging techniques to evaluate the response to treatment in oncology: current standards and perspectives *Critical Rev Oncol Hematol* **72** 217–38
- [100] St Lawrence K S and Lee T Y 1998 An adiabatic approximation to the tissue homogeneity model for water exchange in the brain: II. Experimental validation *J Cereb Blood Flow Metab* **18** 1378–85
- [101] Bae K T 2003 Technical aspects of contrast delivery in advanced CT *Appl Radiol* **32** 12–9
- [102] García-Figueiras R *et al* 2015 Imaging of tumor angiogenesis for radiologists: II. Clinical utility *Curr Probl Diagn Radiol* **44** 425–36



Mechanisms of Vasculogenic Mimicry in Ovarian Cancer

Lízbeth Ayala-Domínguez^{1,2}, Leslie Olmedo-Nieva^{2,3}, J. Omar Muñoz-Bello², Adriana Contreras-Paredes², Joaquín Manzo-Merino⁴, Imelda Martínez-Ramírez² and Marcela Lizano^{2,5*}

¹ Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ² Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología-Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ³ Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ⁴ Cátedras CONACyT-Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico, ⁵ Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Laurence A. Marchat,
National Polytechnic Institute, Mexico

Reviewed by:

Kwok-Ming Yao,
The University of Hong Kong,
Hong Kong
Maja Cemazar,
Institute of Oncology
Ljubljana, Slovenia

*Correspondence:

Marcela Lizano
lizano@unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Cellular Oncology,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 22 June 2019

Accepted: 17 September 2019

Published: 27 September 2019

Citation:

Ayala-Domínguez L, Olmedo-Nieva L, Muñoz-Bello JO, Contreras-Paredes A, Manzo-Merino J, Martínez-Ramírez I and Lizano M (2019) Mechanisms of Vasculogenic Mimicry in Ovarian Cancer. *Front. Oncol.* 9:998. doi: 10.3389/fonc.2019.00998

Solid tumors carry out the formation of new vessels providing blood supply for growth, tumor maintenance, and metastasis. Several processes take place during tumor vascularization. In angiogenesis, new vessels are derived from endothelial cells of pre-existing vessels; while in vasculogenesis, new vessels are formed *de novo* from endothelial progenitor cells, creating an abnormal, immature, and disorganized vascular network. Moreover, highly aggressive tumor cells form structures similar to vessels, providing a pathway for perfusion; this process is named vasculogenic mimicry (VM), where vessel-like channels mimic the function of vessels and transport plasma and blood cells. VM is developed by numerous types of aggressive tumors, including ovarian carcinoma which is the second most common cause of death among gynecological cancers. VM has been associated with poor patient outcome and survival in ovarian cancer, although the involved mechanisms are still under investigation. Several signaling molecules have an important role in VM in ovarian cancer, by regulating the expression of genes related to vascular, embryogenic, and hypoxic signaling pathways. In this review, we provide an overview of the current knowledge of the signaling molecules involved in the promotion and regulation of VM in ovarian cancer. The clinical implications and the potential benefit of identification and targeting of VM related molecules for ovarian cancer treatment are also discussed.

Keywords: vasculogenic mimicry, ovarian cancer, signaling molecules, angiogenesis, anti-angiogenic therapy

INTRODUCTION

Ovarian cancer is the second most common and lethal gynecological cancer (1). Among ovarian cancer types, the epithelial ovarian cancer accounts for almost 90% of such malignancy (2), which is usually diagnosed in advanced aggressive stages due to its asymptomatic nature. Extensive tumor invasion, peritoneal metastases, and treatment failure are frequent in advanced epithelial ovarian cancer (3).

The normal physiology of the ovary is characterized by increased permeability of blood vessels during follicular development, ovulation, and subsequent formation of the corpus luteum, with cyclic changes in the formation, differentiation, and regression of ovarian vasculature (4).

These vascular processes are deregulated in ovarian cancer, which is characterized by intense neovascularization (5, 6). Neovasculature in ovarian cancer is formed not only from endothelial cells but also from endothelial progenitor cells and/or cells from the tumor itself, allowing the supply of blood and nutrients to the tumor with great efficiency (7).

The versatility of the vascularization processes in ovarian cancer could partially explain its aggressive nature and the limited efficacy of anti-angiogenic therapies (8). An alternative vascularization process, vasculogenic mimicry (VM), has been shown to increase after anti-angiogenic treatment with bevacizumab, in preclinical models of ovarian cancer (9). This finding suggests that VM could be a strategy for escaping anti-angiogenic treatment, highlighting the importance to study the mechanisms involved in vascular remodeling.

In this review, we provide an overview of the current knowledge of the mechanisms and signaling molecules involved in the promotion and regulation of VM in ovarian cancer, its clinical implications and the potential benefit of therapeutic approaches based on the identification and targeting of VM related molecules.

TUMOR VASCULARIZATION PROCESSES IN OVARIAN CANCER

The study of the vascularization processes in solid tumors has gained importance due to its implication in growth and metastasis, as well as its possible implication for anti-angiogenic treatment resistance (10). The most studied tumor vascularization process is angiogenesis, although tumor tissue has the capacity to generate its own vasculature from alternative mechanisms such as vasculogenesis, vessel co-option, and VM (11–13).

Angiogenesis

Angiogenesis is a highly regulated process aimed to produce new blood vessels with a key role in development and postnatal life; it is also involved in invasion, growth, and metastasis of solid tumors (14, 15). The onset of angiogenesis occurs in response to hypoxia or ischemia where pro-angiogenic signals overcome anti-angiogenic signals. The vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) is the master regulator of angiogenesis, both in physiological and pathological conditions (16). During angiogenesis activation, a complex signaling cascade begins, leading to the proliferation of endothelial cells (ECs) that assemble new vascular networks from the pre-existing vessels, increasing permeability and leakage, and restoring the supply of oxygen and nutrients toward the tumor mass (15, 17).

Angiogenesis is essential for the growth of ovarian cancer cells and their spreading to the peritoneum. VEGF-A has been associated with peritoneal ECs proliferation, migration, and formation of tube-like structures (18). The inhibition of VEGF-A does not revert these processes, suggesting that another pro-angiogenic factors secreted by surrounding ovarian cancer cells or their microenvironment could be involved in the angiogenic activation of peritoneal ECs during metastasis (18, 19). A high

level of pro-angiogenic signals has been associated with the formation of ascites, a frequent feature of advanced ovarian cancer (20, 21).

Vasculogenesis

Vasculogenesis, a *de novo* vessel formation process, is distinguished by the *in situ* differentiation of ECs from myeloid cells or endothelial progenitor cells (EPCs). This process takes place at the beginning of vascular development and during post-natal life (11, 22). Myeloid cells and EPCs are recruited by pro-angiogenic or pro-inflammatory factors to the tumor vascular bed, where they differentiate into ECs and give place to neovasculature (23–25). Vasculogenesis has a modest impact on tumor vascularization when the angiogenesis pathway is active, however, it is recognized as an important rescue process when this pathway is blocked (10, 26). For instance, when angiogenesis is inhibited after anti-angiogenic treatment or radiotherapy, myeloid cells, and EPCs are recruited by the stroma-derived factor 1 (SDF-1) in response to an increased level of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) (10, 26).

Vasculogenesis has an important role in ovarian cancer. It has been related to treatment resistance as a consequence of the overexpression of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) after radiotherapy (27). Furthermore, CD34+ EPCs from peripheral blood incorporate into vasculogenic active sites (25) as well as CD11b+ and CD11c+ myeloid cells, recruited by SDF-1 and β -defensins, that contribute to vasculogenesis (28). β -defensins chemoattract CD11c+ dendritic cell precursors and then VEGF-A induces endothelial-like specialization mediated by VEGF receptor 2 (VEGFR-2); interestingly, recruitment of CD11c+ cells has also been found in ascites (28).

Vessel Co-option

Vessel co-option is a process that differs from angiogenesis; instead of inducing the proliferation of ECs, tumor cells grow by adhering to nearby blood vessels (15). Different patterns of vessel co-option have been described in brain, lung, and liver cancers (12). In glioblastoma, CDC42+ CD44+ tumor cells migrate toward a blood vessel in response to a bradykinin gradient created by ECs; when these cells reach the vessel, they fuse with the pericytes or adhere to the basement membrane (12). Vessel co-option has been observed in a mouse model of ovarian cancer (29), where endostatin inhibited vessel co-option by blocking the attachment of ovarian cancer cells to peritoneal vessels through integrins $\alpha_5\beta_1$.

It has been proposed that after the tumor grows by vessel co-option, co-opted vessels regress, and the tumor enters into an avascular phase followed by the induction of peritumoral angiogenesis (30). Vessel co-option facilitates the metastasis of tumor cells since it increases their motility and migration. There is evidence that tumors can switch between angiogenic and non-angiogenic growth during progression and that they can contain angiogenic and non-angiogenic areas (12). The association between vessel co-option and resistance to anti-angiogenic treatment is not clear, since vessel co-option could be one cause of the resistance to anti-angiogenic treatment or it

could be a consequence of the aggressive nature of cancer cells in response to anti-angiogenic treatment (10, 31).

Vasculogenic Mimicry

VM is a process by which tumor cells form capillary-like structures, mimicking the embryonic vascular network pattern, without inducing the proliferation of ECs (15). This process increases blood perfusion, allows tumor cells to obtain oxygen and nutrients, and promotes cancer progression (13, 32). It has been proposed that VM is carried out through cancer stem cell (CSC) trans-differentiation into endothelial-like cells (13, 33). Moreover, tumor cells involved in VM resemble mesenchymal cells derived from epithelial to mesenchymal transition (EMT), which is characterized by a down-regulation of epithelial markers (cytokeratin, for example), a loss of cell polarity (E-cadherin, occludin), and the upregulation of mesenchymal markers (vimentin, N-cadherin, fibronectin) (34, 35). Furthermore, these VM cells have an endothelial phenotype. VM has been associated with unfavorable outcome in patients with malignant tumors (36) and has an important participation in tumor invasion and metastasis (37).

Cell-lined vasculature compatible with VM has been observed in ~30–37% of ovarian cancers (38, 39). The presence of such cell-lined vasculature was associated with a higher histological grade and more aggressive tumors. An increased number of VM channels were found in poorly differentiated ovarian cancer cells (40). The presence of VM, combined with the expression of CD133, was positively associated with poor prognosis in patients with ovarian cancer (41). In a preclinical model of ovarian cancer, an accelerated metastasis was observed together with hypoxia and VM after anti-angiogenic treatment with bevacizumab (an anti-VEGF-A monoclonal antibody) (9). All these findings highlight the importance of identifying the underlying mechanisms and the signaling molecules involved in VM to evaluate their prognostic or predictive value, as well as their use as potential targets for developing more effective therapies (42).

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL DESCRIPTION OF VM

In 1999, Maniotis et al. performed *in vitro* and *in vivo* assays in melanoma and found two VM types: a tubular type, and a patterned matrix type (13). The tubular type consists of hollow cords formed by tumor cells that give place to a tubular network. These tubular structures are also connected to other channels that contain red blood cells. Further studies showed that in some cases, a mixture of tumor cells and ECs form those tubular structures (43). The patterned matrix type consists of a network of loops formed by matrix layers that surround clusters of tumor cells. These layers are not uniformly spaced; therefore, the transport of fluid is not uniform around the cell cluster. However, this patterned matrix could provide a greater surface area for diffusion than that provided by a tubular structure (44). The reorganization of tumor cells into cords or clusters, as well as the formation of matrix layers involve mechanisms such as cell-cell

adhesion, migration, and extracellular matrix remodeling, where several signaling molecules have been associated with VM.

VM structures have been identified in tissue samples as positive for periodic acid-Schiff (PAS) and negative for EC markers such as CD31 or CD34 (42). PAS+ regions are rich in components of the extracellular matrix, like laminin. Recently, it has been shown that PAS+ regions could also represent non-functional structures unrelated to VM in *in vitro* studies (45). Moreover, the different vascular structures aimed to conduct fluids within the tumor share several features. Thus, in order to identify the structures that truly correspond to VM as well as to distinguish them from similar structures from the other vascularization processes, it is necessary to assess their architectural and functional features, in addition to their composition. Recently, Valdivia et al. (46) described the architectural and functional features required for differentiating VM from other vascular structures in tumors (46). Whilst blood and lymph vessels are formed by a single line of ECs surrounded by a continuous and non-continuous basement membrane, respectively, VM structures are formed by cancer cells resting on an inner glycoprotein rich matrix (46). The authors propose that, in addition to the traditional architectural features to identify a VM structure (PAS+ and without EC markers), the presence of red blood cells within the lumen of the structure is an indicator of VM functionality (46).

Early studies in breast cancer and melanoma have shown that tubular and patterned matrix VM structures are capable of conducting plasma and red blood cells *in vitro* and *in vivo* (44). Maniotis et al. (47) showed that VM structures formed by aggressive melanoma cells *in vitro* conducted a tracer by direct microinjection and passive diffusion (47); moreover, the matrix pattern also contained red blood cells. Shirakawa et al. (48) used two breast cancer mice models to evaluate tumor blood flow with micro-magnetic resonance angiography imaging (48). They found that aggressive tumor cells formed VM structures in the center of the tumor, while non-aggressive cells showed necrotic cores. Angiogenic vessels were present in tumor periphery in both types of tumors and blood flow was higher in VM structures than in necrotic cores. Clarijs et al. (49) used a tracer to study perfusion in a melanoma mouse model (49). Tracer distribution suggested that blood vessels could be in contact with VM structures, allowing the perfusion of the latter, mediated by at least three mechanisms: the anastomosis of VM structures to blood vessels (50), an increased leakage from blood vessels (47, 51), and through anticoagulant control exerted by aggressive tumor cells (50).

MECHANISMS AND SIGNALING MOLECULES INVOLVED IN VM IN OVARIAN CANCER

Several mechanisms are involved in VM, including those related to the capacity of aggressive tumor cells to resemble features of the ECs such as cell adhesion (52), migration (53), extracellular

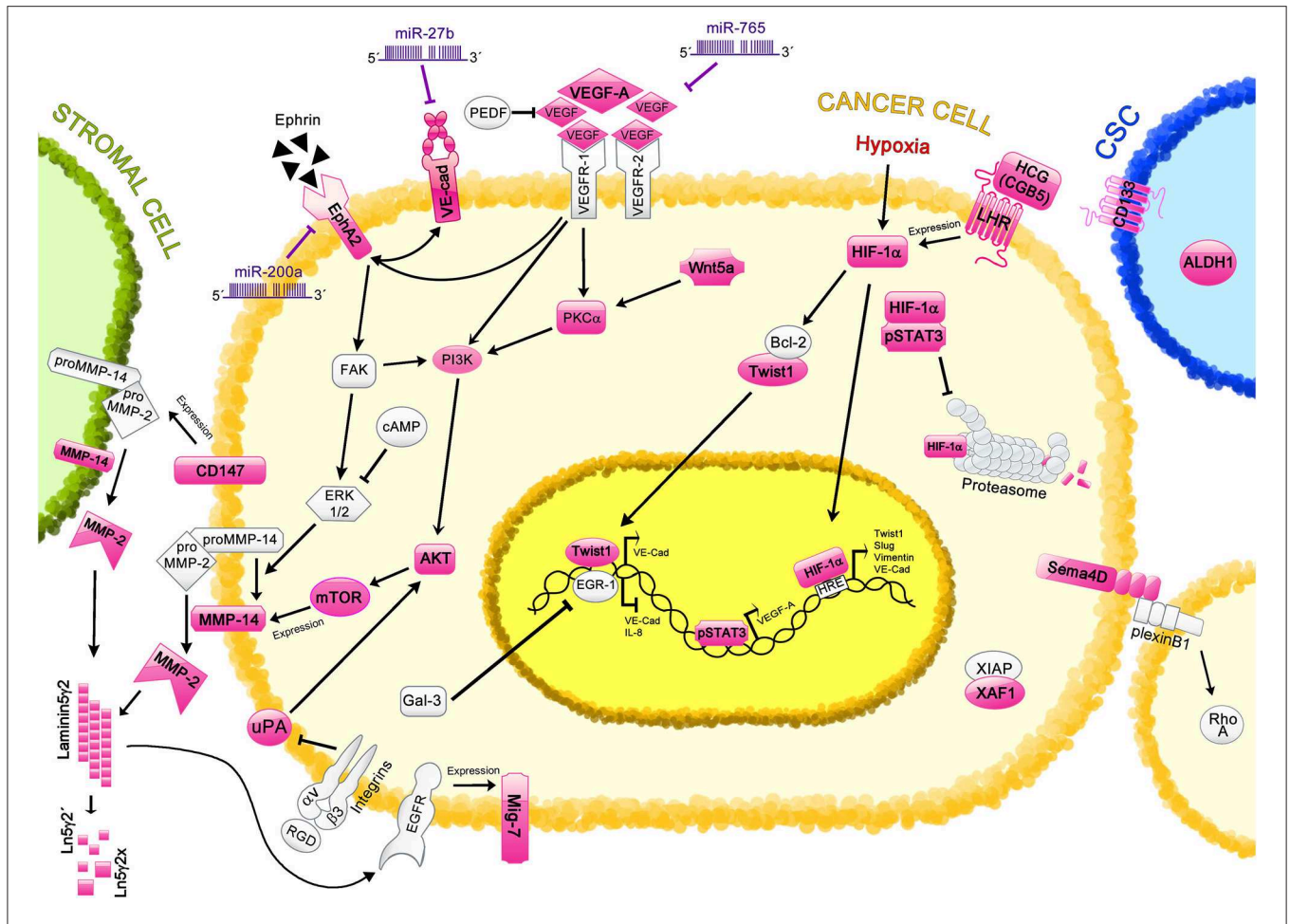


FIGURE 1 | Regulation of Vasculogenic Mimicry by cell signaling molecules in ovarian cancer. Different proteins and signaling pathways involved in VM are shown; those characterized in ovarian cancer VM are highlighted in pink. Cancer cells are depicted in yellow; stromal cell, in green; and cancer stem cell (CSC), in blue. The VE-cadherin/EphA2/MMP-14/MMP-2/Ln5γ2 axis is the main mechanism involved in the induction of VM. This axis is regulated by miR-27b and miR-200a. Other proteins such as VEGF-A (regulated by miR-765 and pSTAT3), CD147, uPA, and Twist1 also regulate this axis through different pathways. Hypoxic-related protein HIF-1α induces the expression of Twist1, VE-Cadherin (VE-Cad), Slug and Vimentin, which are involved in VM induction; moreover, proteins such as pSTAT3, HCG, and LHR regulate the levels of HIF-1α. CSC markers, including ALDH and CD133 are found in ovarian tissues with VM structures. Different cell signaling pathways are also involved in VM, such as Wnt5a, and RTKs pathways, which strongly correlate with VM formation. Additional molecules that have been proposed in VM regulation in ovarian cancer are Sema4, XAF1, and Mig-7, however the precise mechanisms remain unclear.

matrix remodeling (54), perfusion (50), and maturation of blood vessels (55). Moreover, CSCs promote VM by deregulating pathways involved in embryonic development, such as the transforming growth factor β (TGF-β) (56–58), Wnt (59), Notch (60, 61), Nodal (62–64), and the Hippo pathways (65–67), among others. EMT also plays an important role in VM, and encompasses the pathways previously mentioned as well as transcription factors such as Twist1/2 (68), Snail/Slug (69), and ZEB1/2 (34). Moreover, signaling molecules related to hypoxia (70), inflammation (71–75), and metabolism (76–79) also have an impact on VM. The novel findings regarding these mechanisms and their signaling molecules in the regulation of VM in ovarian cancer are presented in this section and are summarized in **Figure 1**. Additional proteins and signaling pathways identified in other cancer types are shown in **Table 1**.

Vascular endothelial (VE)-cadherin, one of the main participants in cell-cell adhesion in endothelial cells, is strongly

associated with VM formation (80). This protein recruits the EC-related kinase Ephrin-A2 receptor (EphA2) to the cell membrane (52), increasing the phosphorylation of the focal adhesion kinase (FAK). Consequently, the activation of extracellular regulatory kinases 1 and 2 (ERK1/2) signaling pathway is promoted, allowing the activation of MMP-14 (81). Then, MMP-14 converts proMMP-2 into active MMP-2. These MMPs degrade extracellular matrix components and facilitate invasion, metastasis, and VM (82). Particularly, MMP-2 and MMP-14 induce the Laminin5γ2 (Ln5γ2) cleavage (53, 83). Although the precise mechanism has not been clearly described, it is known that MMP-2 cleaves Ln5γ2 into two pro-metastatic fragments (Ln5γ2' and Ln5γ2x) (53). Together, these results indicate that the VE-cadherin/EphA2/MMP-2/Ln5γ2 axis is the main regulator of VM.

Interestingly, high expression of VE-cadherin and EphA2 has been found in clinical samples from ovarian cancer patients

TABLE 1 | Signaling molecules and mechanisms that regulate VM in several types of cancer.

Signaling molecules	Function in VM	Cancer type	References
TF/TFPI-1,-2	Enhances perfusion in VM structures by the anticoagulant activity of TFPI-1. TFPI-2 contributes to the activation of MMP-2.	Melanoma	(50)
PDGF-B/PDGFR-β	PDGF-B recruits pericytes to support the maturation and stabilization of vascular networks.	Melanoma	(55)
TGF-β	Induces EMT and upregulates the expression of MMP-14 and MMP-2	Melanoma Breast cancer	(56–58)
Nodal	Maintains the transdifferentiated phenotype, increases the expression of VE-cadherin, and promotes EMT	Melanoma Breast cancer	(62–64)
Notch	Promotes CSCs renewal and upregulates the expression of MMP-2 through the activation of the VEGF/VEGFR-1 pathway	Melanoma	(60, 61)
Hippo (YAP/Sox2/Oct4)	Promotes CSCs renewal	Lung cancer	(65–67)
HIF1α/Bcl2/Twist1	Induces EMT	Hepatocellular	(68)
ZEB1/2	Induces EMT and upregulates the expression of VE-cadherin, VEGFR-1, and MMPs	Hepatocellular	(34)
HIF1α/Bcl2	Upregulates the expression of VE-cadherin	Melanoma	(70)
IL-8/CXCR1, 2	Upregulates the expression of MMP-2	Melanoma Glioblastoma Breast cancer	(71–74)
Gal-3	Upregulates the expression of VE-cadherin and IL-8 by preventing the binding of the transcriptional repressor EGR-1	Melanoma	(75)
cAMP	Inhibits VM by activating Epac/Rap1 or by inactivating PI3K pathway through ERK1/2 inhibition	Melanoma	(76)
DDAH/NO	Induces VM by unknown mechanism	Breast cancer	(77)
COX2/EP3	Increases the activity of MMP-2	Breast cancer	(78, 79)

VM, vasculogenic mimicry; EMT, epithelial to mesenchymal transition; CSC, cancer stem cell.

that exhibit a highly invasive phenotype (84, 85). Additionally, other studies demonstrated that MMP-2 and MMP-14 are also overexpressed in ovarian cancer samples, which is associated with poor clinical outcome (38, 86). It is worth to mention that those findings strongly correlated with the presence of VM structures, suggesting that these molecules are important players in this process.

The Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) cell signaling pathway regulates MMPs expression in VM (87). This pathway is activated through FAK phosphorylation (88), impacting in the expression of MMP-14. Moreover, the PI3K pathway is frequently activated in ovarian cancer, probably impacting VM (89).

Another regulator of VM is the urokinase plasminogen activator (uPA), which is required to induce the degradation of the extracellular matrix, impacting in tumor angiogenesis. The overexpression of uPA positively correlates with VM formation in ovarian cancer tissues (54). In addition, it was demonstrated that in SKOV-3 and OVCAR-3 ovarian cancer cells, the ablation of uPA expression results in a decrement of complete VM structures formation and such mechanism involves the participation of AKT/mTOR/MMP-2/Laminin5γ2 signal pathways (54).

VEGF-A also upregulates the expression MMPs. It has been shown that in melanoma, VEGF-A induces VM formation by activating the PI3K/protein kinase C α (PKCα) pathway

via VEGFR-1 signaling (90). However, in glioblastoma, VM is induced by the VEGFR-2 signaling (91). In an *in vitro* model of ovarian cancer using SKOV-3 and OVCAR-3 cells, VEGF-A promoted migration, invasion, and VM by up-regulating MMPs via EphA2 (92). This suggests that VEGF-A interacts with the VE-cadherin/EphA2/MMP-2/Ln5γ2 axis in the regulation of VM in ovarian cancer.

The plasma membrane glycoprotein CD147 plays an important role during tumor progression, invasion and metastasis, regulating metalloproteinases expression in peritumoral stromal cells. Invasion capability was evaluated in two different cell lines derived from ovarian cancer with different invasion activity: CABA I and SKOV3 (93). A correlation of CD147 expression with tumor invasiveness, protease activity (MMP-2 and MMP-9), and vascular channels formation was observed. Interestingly, when high invasive cell line was treated with small interfering RNA against CD147, a suppression of non-EC-lined channels was observed. In addition, when CD147 was overexpressed in a low invasive cell line, those cells exhibited an increase of tumor invasion and vascular channel formation. These data suggest that CD147 plays an important role in VM induction in ovarian tumors and CD147 could be an attractive target for therapeutic intervention (93).

Furthermore, Ln5γ2 activates the endothelial growth factor receptor (EGFR) which promotes the expression of the

migration-inducing protein 7 (Mig-7), stimulating invasion and VM (94). A study carried out in ovarian cancer samples revealed an association of VM with VE-cadherin and Mig-7 expression (84). It was observed that ovarian tumors without VM frequently expressed low levels of VE-cadherin compared to those with VM. Meanwhile, Mig-7 expression was increased in tumor samples compared to normal tissues, positively correlating with VM and VE-cadherin expression (84).

Some elements involved in apoptosis have been associated with the formation of VM structures, such as the pro-apoptotic XIAP-associated factor 1 (XAF1). Recently, *in vivo* xenograft models of ovarian cancer have shown that the overexpression of XAF1 decreases the number of VM structures (39). Moreover, *in vitro* assays with SKOV3 cells revealed that proliferation, migration and invasion were inhibited, and the levels of VEGF were reduced when XAF1 was exogenously overexpressed (39). Therefore, XAF1 is a potent negative regulator of VM in ovarian cancer.

It has been shown that VEGF-A regulates the expression of the axon guidance factor semaphorin 4D (Sema4D) (95), which has been identified as a promoter of VM in non-small cell lung cancer (96), where the recognition of Sema4D by the plexin B1 receptor activates the small GTPase RhoA, which is implicated cell motility. However, when plexin B1 was inhibited, a disruption of the RhoA/ROCK signaling occurred, suppressing VM formation. Additionally, the presence of VM in clinical specimens correlated with increased levels of Sema4D (96). In an ovarian cancer cell line (A2780), soluble Sema4D promoted angiogenesis and VM via plexin B1 (95); moreover, in clinical samples from patients, a high expression of Sema4D had a positive correlation with the malignant degree of epithelial ovarian cancer. Interestingly, it was observed that VEGFR-2, plexin-B1, and Sema4D control the expression of CD31, MMP-2, and VE-cadherin in ovarian cancer cells, which are the markers and initiators of angiogenesis and VM (95).

CSCs are present in ovarian cancer and are positive for CD133, a unique surface marker of CSCs (97). It is known that CD133+ cells promote VM in several cancer types (41, 91, 98–101). The combined expression of CD133 and VM in samples from patients was associated with high-grade ovarian carcinoma, late-stage disease, non-response to chemotherapy and shorter overall survival (41). The trans-differentiation of CD133+ CSCs into ECs may induce VM formation and the expression of EC markers such as VE-cadherin (101) and VEGFR-2 (91). Moreover, it has been shown that in hypoxic environment the subpopulation of CD133+ CSCs is augmented when Twist1 was overexpressed (100). This finding shows that hypoxia may exert an effect on CSCs that probably leads to VM formation.

CSCs can also exhibit a high activity of aldehyde dehydrogenase-1 (ALDH1) (97). The expression of ALDH1 has been evaluated in different types of tumor, including breast cancer, colorectal cancer, and ovarian cancer and strongly correlates with VM, determining an unfavorable clinical outcome (102–104). Although the precise mechanism has not been described, it is known that ALDH1 and VM increase in response to hypoxia (105).

Hypoxia regulates several pathways in cancer, such as angiogenesis, and it has been related to VM in melanoma, glioblastoma, ovarian cancer, and hepatocellular carcinoma (68–70, 106). Hypoxia induces VM formation by up-regulating VE-cadherin expression. The main effectors of this pathways, HIF-1 α and HIF-2 α , positively regulated VE-cadherin expression; this effect is through the binding of HIF to hypoxia response elements (HRE) located in VE-cadherin promoter in glioblastoma cells (106). Interestingly, it was observed that EMT is promoted in a hypoxic environment and as a result, VM was induced in SKOV3 and OVCAR3 cells (69). *In vitro* assays showed that hypoxia leads to increased invasion, migration and an enhancement of MMP-2 activity. Therefore, EMT induction as a response to hypoxia is a master regulator of VM in ovarian cancer cells. Moreover, this study demonstrated that in ovarian cancer samples, the levels of HIF-1 α were strongly associated with VM formation and the expression of Twist1, Slug, and Vimentin.

Another important regulator of VM under hypoxic conditions are the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and the phospho-STAT3 (p-STAT3). It has been suggested that p-STAT3 promote VM, this is due to the binding of pSTAT3 to HIF-1 α , which in turn delays its degradation (107, 108). In gastric adenocarcinoma, VM was associated with an increased expression of HIF-1 α , STAT3, and p-STAT3 (109). Moreover, STAT3 acts as a transcription factor in VEGF-A transcription (110). Interestingly, in SKOV3 cells p-STAT3 was found in the nucleus, suggesting that was transcriptionally active (111). In addition, when STAT3 was inhibited, the formation of VM structures was completely avoided, suggesting that p-STAT3 is an important regulator of VM in ovarian cancer cells.

The Wnt family members regulate EC differentiation and vascular development (112) and has been associated with VM. In glioma and colon cancer, the canonical Wnt/ β -catenin pathway induced VM by increasing the expression of VEGFR-2 and VE-cadherin (59, 113). Interestingly, in ovarian cancer, the non-canonical Wnt signaling is implicated in VM formation. It was found that Wnt5a is overexpressed in tumor samples and is associated with VM (114). Moreover, *in vitro* analysis revealed that Wnt5a overexpression is linked to PKC pathway activation. Furthermore, it was shown that Wnt5a overexpression induced EMT, increased invasion and motility of SKOV3 cells (114).

An important proangiogenic factor in ovary is the human gonadotropin (HCG). The fifth subunit of β -HCG, CGB5, was shown to promote VM formation *in vitro* in OVCAR3 cells (115). Additionally, overexpression of CGB5 induced the growth of ovarian cancer cells in a xenograft murine model, as well as VM (116). It was also shown that the activation of luteinizing hormone receptor (LHR), which is the HCG receptor, is required for the promotion of VM formation by CGB5. In another study, it was found that ovarian cancer cells exogenously expressing HCG induced an overexpression of HIF-1 α . Importantly, vascular markers such as CD31 and VEGF were also upregulated in those cells (117). Therefore, the HCG/LHR axis induces VM by HIF-1 α regulation in ovarian cancer.

TABLE 2 | VM related miRNAs in different types of cancer.

miRNA	Type of cancer	miRNA target	References
miR-26b	HCC Glioma	VE-cadherin, Snail and MMP-2 EphA2	(123, 124)
miR-141	Glioma Renal carcinoma	EphA2	(122, 125)
miR-27a/b	Ovarian cancer HCC	VE-cadherin Twist1	(126, 127)
miR-101	HCC	TGF- β R, Smad2 and SDF1	(129)
miR-200a	Ovarian cancer	EphA2	(85)
miR-204	Breast cancer	PI3K, c-SRC	(130)
miR-373	Glioma	EGFR	(131)
miR-186	Gastric cancer Prostate cancer	Twist1	(132, 133)
miR-29b	HCC	STAT3 and MMP-2	(134)
miR-193b	Breast cancer	DDAH1	(77)
miR-539-5p	Glioma	Twist1	(135)
miR-490-3p	Breast cancer	Twist1	(136)
miR-765	Ovarian cancer	VEGF-A	(128)

VM, vasculogenic mimicry; HCC, hepatocellular carcinoma.

MICRO-RNAS AS REGULATORS OF VM IN OVARIAN CANCER

Micro-RNAs (miRNAs) are single stranded and non-coding RNA molecules of 19–25 nucleotides in length that have a post-transcriptional regulatory function (118). Different studies have demonstrated that miRNAs are involved in several physiological processes such as cell proliferation, invasion, migration, differentiation, as well as pathological processes including angiogenesis and VM (119–122). The dysregulation in the expression of these RNA molecules is often observed in numerous types of cancer. Diverse studies demonstrate that miRNAs post-transcriptionally regulate different signaling molecules involved in VM process (123–136); examples of these miRNAs are enlisted in **Table 2**.

A well-described miRNA family is miR-26, which includes miR-26a and miR-26b. Those are commonly downregulated in several types of cancer such as glioma, HCC, and gastric cancer (124, 137, 138). For instance, in gastric cancer miR-26a and–26b suppress angiogenesis by targeting hormone growth factor (HGF) mRNA and consequently affecting HGF/VEGF signaling (138). Moreover, in HCC miR-26b has been identified as tumor suppressor since its down-regulation promotes VM and angiogenesis (123).

Similarly, another cluster of miRNAs belonging to the miR-200 family (miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, and miR-429) has been widely studied in several types of cancers (125, 139–142). It has been shown that miR-141 overexpression inhibits VM formation through directly targeting EphA2 transcript, decreasing EphA2 protein levels in glioma and renal carcinomas (122, 125).

Hitherto, three miRNAs (miR-200a, miR-27b, and miR-765) have been described as VM regulators in ovarian cancer through directly targeting 3'UTRs of VM-related transcripts (85, 126, 128) (**Table 3**). The miR-200a was the first microRNA found in ovarian cancer capable of regulating VM (85). Tumors with low miR-200a expression correlate with the presence of VM structures and poor overall survival. An inverse correlation between mRNA and protein EphA2 levels and miR-200a expression was observed in ovarian cancer samples, suggesting a direct regulation among them. *In silico* assays revealed a miR-200a binding site at EphA2 3'UTR; this observation was confirmed in SKOV3 ovarian cancer cells, where a direct binding of miR-200a to EphA2 3'UTR was observed through luciferase assays. Consequently, the levels of EphA2 protein and mRNA decreased in this model. In agreement, it was shown that the EphA2 overexpression restores VM in miR-200a expressing cells, indicating that miR-200a inhibits VM by mainly targeting EphA2 (85).

Previously, it has been described that VE-cadherin expression is related to VM formation in different types of cancer. A bioinformatic study identified miR-27b as putative regulator of VE-cadherin by the detection of a binding site at VE-cadherin 3'UTR. Concordantly with this result, luciferase assays demonstrated that miR-27b binds to VE-cadherin mRNA 3'UTR in ovarian cancer cells. Furthermore, expression levels of VE-cadherin mRNA and protein in different ovarian cancer cell lines negatively correlate with miR-27b expression. Low metastatic cell lines OVCAR3 and SKOV3 express high amounts of miR-27b and low VE-cadherin mRNA, compared to metastatic cells ES2 and Hey1B that exhibit low amounts of miR-27b and high VE-cadherin mRNA. Overexpression of miR-27b on high VE-cadherin expressing cells decreases VE-cadherin mRNA and protein levels. When miR-27b is overexpressed in metastatic ovarian cancer cell lines (Hey1B and ES2), the migration, invasion, and VM are decreased in *in vivo* models (126).

A recent study aimed to determine the set of miRNAs regulated in an early stage before complete VM establishment under hypoxia conditions. It was shown that SKOV3 ovarian cancer cells grown under hypoxia conditions form a higher number of 3D capillary-like structures than those cells grown under normoxia conditions (128). A set of miRNAs involved in the regulation of tumorigenesis-related pathways, as well as several genes involved in VM and angiogenesis was found. Among them, miR-765 was highly downregulated under hypoxia (128). Moreover, its restoration promotes a dramatic inhibition of 3D capillary-like structures and down-regulates VEGF-A expression. Importantly, it was demonstrated that VEGF-A mRNA is a direct target of miR-765, since it binds to VEGF-A 3'UTR. Additionally, low levels of miR-765 and high levels of VEGF-A were associated with low overall survival from a cohort of 1,485 ovarian cancer patients (128).

Although only three miRNAs have been directly associated with VM in ovarian cancer, several signaling pathways, and proteins controlling this mechanism are regulated by miRNAs (143–164); therefore, these non-coding transcripts could have a potential role on VM regulation. **Table 3** shows the common VM targets in ovarian cancer that are regulated by miRNAs.

TABLE 3 | VM related miRNAs in ovarian cancer.

miRNA	Expression in OC (↑up ↓down)	Target related to VM in OC	Direct/indirect VM target	References
miRNAs RELATED WITH VM IN OVARIAN CANCER				
miR-27b	↓down	VE-cadherin	Direct 3'UTR binding	(126)
miR-200a	↓down	EphA2	Direct 3'UTR binding	(85)
miR-765	↓down	VEGF-A	Direct 3'UTR binding	(128)
miRNAs PROBABLY RELATED WITH VM IN OVARIAN CANCER				
miR-92	↑up	HIF-1 α	Indirectly by targeting HIF inhibitor VHL	(143)
miR-199a-5p	↓down in Hypoxic OC		Direct 3'UTR binding	(144)
miR-199	↓down		By protein levels	(145)
miR-125	↓down		By protein levels	(145)
miR-138	↓down in invasive OC		Direct 3'UTR binding	(146)
miR-145	↓down		Indirectly by targeting p70S6K1	(147)
miR-718	↓down	VEGF	Direct 3'UTR binding	(148)
miR-126	↓down		By protein levels	(149)
miR-497	↓down		Direct 3'UTR binding	(150)
miR-92	↑up		Indirectly by targeting HIF inhibitor VHL and increasing HIF-1 α	(143)
miR-199	↓down		By mRNA levels	(145)
miR-125	↓down		By mRNA levels	(145)
miR-145	↓down		Indirectly by targeting p70S6K1	(147)
miR-520d-3p	↓down	EphA2	Direct 3'UTR binding	(151)
miR-365	↓down	Wnt5a	Direct 3'UTR binding	(152)
miR-490-3p	↓down	MMP-2	By mRNA and protein levels	(153)
miR-106b	↓down		By mRNA and protein levels	(154)
miR-122	↓down		By protein levels	(155)
miR-122	↓down	MMP-14	By protein levels	(155)
miR-15a-3p	↓down	Twist1	Direct 3'UTR binding	(156)
miR-532-5p	↓down		Direct 3'UTR binding	(157)
miR-219-5p	↓down		Direct 3'UTR binding	(158)
miR-320	↓down		Direct 3'UTR binding	(159)
miR-548c	↓down		Direct 3'UTR binding	(160)
miR-214	↓down	SEMA4D	Direct 3'UTR binding	(161)
miR-193b	↓down	uPA	Direct 3'UTR binding	(162)
Mir-23b	↓down		By mRNA and protein levels	(163)
miR-519a	↓down	STAT3	Direct 3'UTR binding	(164)

VM, vasculogenic mimicry; OC, ovarian cancer.

CLINICAL IMPLICATIONS OF THE SIGNALING MOLECULES OF VM IN OVARIAN CANCER

Anti-angiogenic therapies have shown limited effects against cancer progression, due to alternative vascularization processes, such as VM, triggered by aggressive tumor cells (10). The knowledge of the mechanisms and signaling molecules involved in VM may lead to the development of novel anti-vascularization therapies that overcome the limitations found in conventional therapies. Therefore, it is necessary to explore the possible therapeutical strategies that could improve the clinical outcome of ovarian cancer patients.

Therapies targeting VM have not been developed in ovarian cancer so far. However, some inhibitory molecules of VM elements have been studied and have shown promising anti-VM

effects (165–174). These inhibitor molecules are summarized in **Table 4**.

Studies using pancreatic cancer cells showed that Ginsenoside Rg3, a tetracyclic triterpenoid saponin, reduces VM in xenograft mice models. Moreover, the expression of VE-cadherin, EphA2, MMP-2, and MMP-9 was also down-regulated after the treatment (174). Ginsenoside Rg3 has been proved in ovarian cancer derived cells restraining HIF-1 α expression by activating the ubiquitin-proteasome pathway. This effect efficiently blocked migration and EMT in *in vitro* and *in vivo* ovarian cancer models, promising a novel anti-VM therapeutic agent (175, 176).

It has been shown that PARP inhibition sensitizes for chemo and radiotherapy in different types of tumors. In melanoma cells that were treated with PARP inhibitors (PJ-34, Isoquinolinone, or Olaparib) a reduction of pro-metastatic and VM markers was observed (177). PARP I inhibitors, such as Olaparib

TABLE 4 | Inhibitor molecules that target VM-related proteins.

VM-related protein	VM Inhibitor	Cancer type	Drug action	Reference
CD133	3-phenylthiazolo [3,2-a] benzimidazoles (4b Compound)	Breast cancer Colon cancer	Inhibits cell surface expression of CD133.	(165)
Mig-7	D-39 (derived from medicinal plant <i>Liriope muscari</i>)	Ovarian cancer	Suppresses Mig-7 expression.	(166)
uPA	WX-671 (Mesupron or Upamostat)	Pancreatic cancer	Inhibits Serine proteases (including uPA).	(167)
XAF1	ATRA (All <i>trans</i> retinoic acid)	Colon cancer	Promotes the overexpression of XAF1.	(168)
CD147	AC-73	HCC	Inhibits dimerization of CD147.	(169)
CD133 and CD44	TX-402 (Tirapazamine)	Ovarian cancer	Decreases CD133 and CD44 levels.	(170)
HIF-1 α	Noscapine	Ovarian cancer	Promotes proteasome-mediated degradation of HIF-1 α .	(171)
EphA2	4a Compound	Glioblastoma	Inhibits EphA2 directly.	(172)
VE-Cadherin	Sunitinib	Renal cell carcinoma	Inhibits Tyrosine-kinases (including VE-Cadherin).	(173)

The different molecules with a potential VM-therapeutic effect that has been tested in different types of cancer. VM, vasculogenic mimicry; HCC, hepatocellular carcinoma.

and Rupaparib, have been approved for the treatment of recurrent BRCA-associated ovarian cancer by the Food and Drug Administration (FDA); while Niraparib is used as maintenance therapy following chemotherapy for recurrent ovarian cancer (178). Nevertheless, to date there is no information about their effect on VM in ovarian cancer.

Thalidomide is an immunomodulatory agent with strong anti-angiogenic properties and has been proved in ovarian cancer, glioblastoma, hepatocellular carcinoma, and multiple myeloma in diverse clinical trials. Induction therapy with thalidomide significantly improved the overall response rate, progression free survival and overall survival (179). Previously, it has been shown that thalidomide suppresses tumor growth and angiogenesis in murine models (180). Interestingly, in a xenograft mouse model of melanoma, it was observed that mice treated with Thalidomide induced necrosis in melanoma cells. In addition, VM and tumor growth were significantly reduced compared to non-treated specimens. This effect could be related to the down-regulation of NF-kappaB signaling pathway (181). However, further studies are required to elucidate this statement.

A monoclonal antibody has been developed to target VM, unfortunately it has not been introduced for ovarian cancer treatment. This antibody targets the outer-membrane immunoglobulin-like domains of VE-cadherin, blocking receptor function. In lung cancer cells, it was observed that this antibody functions as an anti-VM agent for cancer treatment, since it inhibited the activation of the VE-cadherin-related pathway in VM (182). Due to the advantages that monoclonal antibody therapies imply, its application in ovarian cancer as an anti-VM agent is promising.

Other molecules implicated in VM in ovarian cancer, such as miR-200a, miR-27b, and miR-765 represent potential candidates for anti-tumoral therapies (85, 126, 128). Importantly, the current strategies are focused in the reduction of cancer through restoring the expression of down-regulated miRNAs, also known as miRNA replacement therapy. There are several ways to harness miRNAs in cancer cells for therapeutic purposes, including introduction of synthetic miRNA mimics, miRNA

expressing plasmids, and small molecules that epigenetically alter endogenous expression of miRNAs (183). Such anti-VM strategies could represent an opportunity to venture into the study of new molecules for therapeutic purposes in ovarian cancer. Further studies will be required to prove the effectiveness of such molecules for treatment purposes.

CONCLUDING REMARKS

Ovarian cancer is a common gynecological cancer and it is usually diagnosed in advanced stages where therapeutic success is limited. This type of tumors exhibit an aggressive phenotype characterized by a high rate of metastasis, invasion, and poor treatment response. These features are highly associated with the development of neovasculature formed by both endothelial and tumor cells. Particularly, MV is a process that may be influencing ovarian cancer poor prognosis and limited efficacy of anti-angiogenic strategies. Nevertheless, the mechanisms underlying VM formation in ovarian cancer remains unclear and deserves further studies. Recently, molecules that regulate cellular adhesion, hypoxia and EMT have been identified as key regulators of VM. Additionally, it has been shown an important post-transcriptional regulation mediated by microRNAs, that impact on the expression of VM-related proteins such as VE-cadherin, EphA2, and VEGF. Furthermore, this information has allowed the development of strategies with therapeutic potential directed against VM formation. However, subsequent studies will be necessary to elucidate the mechanisms that allow the development of conventional anti-angiogenic therapies combined with the novel anti-VM targets that improve the clinical outcomes of ovarian cancer patients.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LA-D, LO-N, JM-B, AC-P, JM-M, IM-R, and ML performed the bibliographic review, wrote, and critically

revised the manuscript. ML conceived and directed the manuscript.

FUNDING

This work was partially supported by CONACyT grant CB-251497, PAPIIT-UNAM IN103219, and Instituto Nacional de Cancerología Ref. 018/051/1B1/CE1/1294/18.

REFERENCES

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* (2018) 68:394–424. doi: 10.3322/caac.21492
- Oswald AJ, Gourley C. Low-grade epithelial ovarian cancer: a number of distinct clinical entities? *Curr Opin Oncol.* (2015) 27:412–9. doi: 10.1097/CCO.0000000000000216
- Ricci F, Guffanti F, Damia G, Brogginini M. Combination of paclitaxel, bevacizumab and MEK162 in second line treatment in platinum-relapsing patient derived ovarian cancer xenografts. *Mol Cancer.* (2017) 16:97. doi: 10.1186/s12943-017-0662-3
- Fraser HM, Duncan WC. Vascular morphogenesis in the primate ovary. *Angiogenesis.* (2005) 8:101–16. doi: 10.1007/s10456-005-9004-y
- Kristensen GB, Tropé C. Epithelial ovarian carcinoma. *Lancet.* (1997) 349:113–7. doi: 10.1016/S0140-6736(96)06071-0
- Folkman J. Incipient angiogenesis. *J Natl Cancer Inst.* (2000) 92:94–5. doi: 10.1093/jnci/92.2.94
- Tang H-S, Feng Y-J, Yao L-Q. Angiogenesis, vasculogenesis, and vasculogenic mimicry in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* (2009) 19:605–10. doi: 10.1111/IGC.0b013e3181a389e6
- Choi H-J, Armaiz Pena GN, Pradeep S, Cho MS, Coleman RL, Sood AK. Anti-vascular therapies in ovarian cancer: moving beyond anti-VEGF approaches. *Cancer Metastasis Rev.* (2015) 34:19–40. doi: 10.1007/s10555-014-9538-9
- Xu Y, Li Q, Li X-Y, Yang Q-Y, Xu W-W, Liu G-L. Short-term anti-vascular endothelial growth factor treatment elicits vasculogenic mimicry formation of tumors to accelerate metastasis. *J Exp Clin Cancer Res.* (2012) 31:16. doi: 10.1186/1756-9966-31-16
- van Beijnum JR, Nowak-Sliwinska P, Huijbers EJM, Thijssen VL, Griffioen AW. The great escape; the hallmarks of resistance to antiangiogenic therapy. *Pharmacol Rev.* (2015) 67:441–61. doi: 10.1124/pr.114.010215
- Dome B, Timar J, Dobos J, Meszaros L, Raso E, Paku S, et al. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* (2006) 66:7341–7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4654
- Donnem T, Reynolds AR, Kuczynski EA, Gatter K, Vermeulen PB, Kerbel RS, et al. Non-angiogenic tumours and their influence on cancer biology. *Nat Rev Cancer.* (2018) 18:323–36. doi: 10.1038/nrc.2018.14
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* (1999) 155:739–52. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65173-5
- Tung JJ, Tattersall IW, Kitajewski J. Tips, stalks, tubes: notch-mediated cell fate determination and mechanisms of tubulogenesis during angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* (2012) 2:a006601. doi: 10.1101/cshperspect.a006601
- Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* (2011) 473:298–307. doi: 10.1038/nature10144
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* (1989) 246:1306–9. doi: 10.1126/science.2479986

ACKNOWLEDGMENTS

LA-D and LO-N are students from the following programs: Doctorado en Ciencias Biomédicas and Doctorado en Ciencias Bioquímicas, respectively, at the Universidad Nacional Autónoma de México and are recipients of scholarships from CONACyT, México (221487 and 289892, respectively).

- Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* (2011) 146:873–87. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.039
- Winiarski BK, Wolanska KI, Rai S, Ahmed T, Acheson N, Gutowski NJ, et al. Epithelial ovarian cancer-induced angiogenic phenotype of human omental microvascular endothelial cells may occur independently of VEGF signaling. *Transl Oncol.* (2013) 6:703–14. doi: 10.1593/tlo.13529
- Ghoneum A, Afify H, Salih Z, Kelly M, Said N. Role of tumor microenvironment in the pathobiology of ovarian cancer: insights and therapeutic opportunities. *Cancer Med.* (2018) 7:5047–56. doi: 10.1002/cam4.1741
- Sallinen H, Heikura T, Koponen J, Kosma V-M, Heinonen S, Ylä-Herttuala S, et al. Serum angiopoietin-2 and soluble VEGFR-2 levels predict malignancy of ovarian neoplasm and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer.* (2014) 14:696. doi: 10.1186/1471-2407-14-696
- Sönmezer M, Güngör M, Ensari A, Ortaç F. Prognostic significance of tumor angiogenesis in epithelial ovarian cancer: in association with transforming growth factor beta and vascular endothelial growth factor. *Int J Gynecol Cancer.* (2004) 14:82–8. doi: 10.1111/j.1048-891x.2004.14202.x
- Shmilovich H, Ben-Shoshan J, Tal R, Afek A, Barshack I, Maysel-Auslander S, et al. B-type natriuretic peptide enhances vasculogenesis by promoting number and functional properties of early endothelial progenitor cells. *Tissue Eng Part A.* (2009) 15:2741–9. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0414
- Carbone C, Moccia T, Zhu C, Paradiso G, Budillon A, Chiao PJ, et al. Anti-VEGF treatment-resistant pancreatic cancers secrete proinflammatory factors that contribute to malignant progression by inducing an EMT cell phenotype. *Clin Cancer Res.* (2011) 17:5822–32. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1185
- Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick AS, Jaggi JS, Bambino K, Gupta S, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev.* (2007) 21:1546–58. doi: 10.1101/gad.436307
- Xu F, Feng Y. Peripheral blood CD34+ positive mononuclear cells participate in neovascularogenesis of human ovarian epithelial carcinoma. *Zhonghua Chan Ke Za Zhi.* (2004) 39:620–3. doi: 10.3760/j.issn:0529-567x.2004.09.013
- Brown JM. Vasculogenesis: a crucial player in the resistance of solid tumours to radiotherapy. *Br J Radiol.* (2014) 87:20130686. doi: 10.1259/bjr.20130686
- Liu T, Du X, Sheng X. Genetic alterations following ionizing radiation in human ovarian cancer-derived endothelial cells. *Mol Med Rep.* (2014) 9:2257–64. doi: 10.3892/mmr.2014.2096
- Coukos G, Benencia F, Buckanovich RJ, Conejo-Garcia JR. The role of dendritic cell precursors in tumour vasculogenesis. *Br J Cancer.* (2005) 92:1182–7. doi: 10.1038/sj.bjc.6602476
- Yokoyama Y, Sedgewick G, Ramakrishnan S. Endostatin binding to ovarian cancer cells inhibits peritoneal attachment and dissemination. *Cancer Res.* (2007) 67:10813–22. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0172
- Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors

- mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*. (1999) 284:1994–8. doi: 10.1126/science.284.5422.1994
31. Naumov GN, Akslen LA, Folkman J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle*. (2006) 5:1779–87. doi: 10.4161/cc.5.16.3018
 32. Sood AK, Seftor EA, Fletcher MS, Gardner LM, Heidger PM, Buller RE, et al. Molecular determinants of ovarian cancer plasticity. *Am J Pathol*. (2001) 158:1279–88. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64079-5
 33. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*. (2010) 468:824–8. doi: 10.1038/nature09557
 34. Yang Z, Sun B, Li Y, Zhao XX, Zhao XX, Gu Q, et al. ZEB2 promotes vasculogenic mimicry by TGF- β 1 induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Pathol*. (2015) 98:352–9. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.03.030
 35. Fan Y-L, Zheng M, Tang Y-L, Liang X-H. A new perspective of vasculogenic mimicry: EMT and cancer stem cells (Review). *Oncol Lett*. (2013) 6:1174–80. doi: 10.3892/ol.2013.1555
 36. Cao Z, Bao M, Miele L, Sarkar FH, Wang Z, Zhou Q. Tumour vasculogenic mimicry is associated with poor prognosis of human cancer patients: a systemic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. (2013) 49:3914–23. doi: 10.1016/j.ejca.2013.07.148
 37. Seftor REB, Hess AR, Seftor EA, Kirschmann DA, Hardy KM, Margaryan NV, et al. Tumor cell vasculogenic mimicry: from controversy to therapeutic promise. *Am J Pathol*. (2012) 181:1115–25. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.07.013
 38. Sood AK, Fletcher MS, Coffin JE, Yang M, Seftor EA, Gruman LM, et al. Functional role of matrix metalloproteinases in ovarian tumor cell plasticity. *Am J Obstet Gynecol*. (2004) 190:899–909. doi: 10.1016/j.ajog.2004.02.011
 39. Wang Y, Liu P, Wang X, Mao H. Role of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 in vasculogenic mimicry in ovarian cancer. *Mol Med Rep*. (2017) 16:325–30. doi: 10.3892/mmr.2017.6597
 40. Gao Y, Zhao X, Gu Q, Wang J, Zhang S, Zhang D, et al. Correlation of vasculogenic mimicry with clinicopathologic features and prognosis of ovarian carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. (2009) 38:585–9. doi: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2009.09.003
 41. Liang J, Yang B, Cao Q, Wu X. Association of vasculogenic mimicry formation and CD133 expression with poor prognosis in ovarian cancer. *Gynecol Obstet Invest*. (2016) 81:529–36. doi: 10.1159/000445747
 42. Ge H, Luo H. Overview of advances in vasculogenic mimicry - a potential target for tumor therapy. *Cancer Manag Res*. (2018) 10:2429–37. doi: 10.2147/CMAR.S164675
 43. El Hallani S, Boisselier B, Peglion F, Rousseau A, Colin C, Idhahbi A, et al. A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain*. (2010) 133:973–82. doi: 10.1093/brain/awq044
 44. Folberg R, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry. *APMIS*. (2004) 112:508–25. doi: 10.1111/j.1600-0463.2004.apm11207-0810.x
 45. Racordon D, Valdivia A, Mingo G, Erices R, Aravena R, Santoro F, et al. Structural and functional identification of vasculogenic mimicry *in vitro*. *Sci Rep*. (2017) 7:6985. doi: 10.1038/s41598-017-07622-w
 46. Valdivia A, Mingo G, Aldana V, Pinto MP, Ramirez M, Retamal C, et al. Fact or fiction, it is time for a verdict on vasculogenic mimicry? *Front Oncol*. (2019) 9:680. doi: 10.3389/fonc.2019.00680
 47. Maniotis AJ, Chen X, Garcia C, DeChristopher PJ, Wu D, Pe'er J, et al. Control of melanoma morphogenesis, endothelial survival, and perfusion by extracellular matrix. *Lab Invest*. (2002) 82:1031–43. doi: 10.1097/01.LAB.0000024362.12721.67
 48. Shirakawa K, Kobayashi H, Heike Y, Kawamoto S, Brechbiel MW, Kasumi F, et al. Hemodynamics in vasculogenic mimicry and angiogenesis of inflammatory breast cancer xenograft. *Cancer Res*. (2002) 62:560–6.
 49. Clarijs R, Otte-Höller I, Ruiter DJ, de Waal RMW. Presence of a fluid-conducting meshwork in xenografted cutaneous and primary human uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. (2002) 43:912–8.
 50. Ruf W, Seftor EA, Petrovan RJ, Weiss RM, Gruman LM, Margaryan NV, et al. Differential role of tissue factor pathway inhibitors 1 and 2 in melanoma vasculogenic mimicry. *Cancer Res*. (2003) 63:5381–9.
 51. Frenkel S, Barzel I, Levy J, Lin AY, Bartsch D-U, Majumdar D, et al. Demonstrating circulation in vasculogenic mimicry patterns of uveal melanoma by confocal indocyanine green angiography. *Eye*. (2008) 22:948–52. doi: 10.1038/sj.eye.6702783
 52. Hess AR, Seftor EA, Gruman LM, Kinch MS, Seftor REB, Hendrix MJC. VE-cadherin regulates EphA2 in aggressive melanoma cells through a novel signaling pathway: implications for vasculogenic mimicry. *Cancer Biol Ther*. (2006) 5:228–33. doi: 10.4161/cbt.5.2.2510
 53. Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V. Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. *Science*. (1997) 277:225–8. doi: 10.1126/science.277.5323.225
 54. Tang J, Wang JJ, Fan L, Li X, Liu N, Luo W, et al. cRGD inhibits vasculogenic mimicry formation by down-regulating uPA expression and reducing EMT in ovarian cancer. *Oncotarget*. (2016) 7:24050–62. doi: 10.18632/oncotarget.8079
 55. Thijssen VL, Paulis YW, Nowak-Sliwinska P, Deumelandt KL, Hosaka K, Soetekouw PM, et al. Targeting PDGF-mediated recruitment of pericytes blocks vasculogenic mimicry and tumor growth. *J Pathol*. (2018) 246:447–58. doi: 10.1002/path.5152
 56. Ling G, Wang S, Song Z, Sun X, Liu Y, Jiang X, et al. Transforming growth factor- β is required for vasculogenic mimicry formation in glioma cell line U251MG. *Cancer Biol Ther*. (2011) 12:978–88. doi: 10.4161/cbt.12.11.18155
 57. Kuo Y-C, Su C-H, Liu C-Y, Chen T-H, Chen C-P, Wang H-S. Transforming growth factor-beta induces CD44 cleavage that promotes migration of MDA-MB-435s cells through the up-regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *Int J Cancer*. (2009) 124:2568–76. doi: 10.1002/ijc.24263
 58. Kim E-S, Sohn Y-W, Moon A. TGF-beta-induced transcriptional activation of MMP-2 is mediated by activating transcription factor (ATF)2 in human breast epithelial cells. *Cancer Lett*. (2007) 252:147–56. doi: 10.1016/j.canlet.2006.12.016
 59. Wang H, Fu J, Xu D, Xu W, Wang S, Zhang L, et al. Downregulation of Pygopus 2 inhibits vascular mimicry in glioma U251 cells by suppressing the canonical Wnt signaling pathway. *Oncol Lett*. (2016) 11:678–84. doi: 10.3892/ol.2015.3917
 60. Vartanian A, Gatsina G, Grigorieva I, Solomko E, Dombrovsky V, Baryshnikov A, et al. The involvement of Notch signaling in melanoma vasculogenic mimicry. *Clin Exp Med*. (2013) 13:201–9. doi: 10.1007/s10238-012-0190-9
 61. Wang Y, Yang R, Wang X, Ci H, Zhou L, Zhu B, et al. Evaluation of the correlation of vasculogenic mimicry, Notch4, DLL4, and KAI1/CD82 in the prediction of metastasis and prognosis in non-small cell lung cancer. *Medicine*. (2018) 97:e13817. doi: 10.1097/MD.00000000000013817
 62. McAllister JC, Zhan Q, Weishaupt C, Hsu M-Y, Murphy GF. The embryonic morphogen, Nodal, is associated with channel-like structures in human malignant melanoma xenografts. *J Cutan Pathol*. (2010) 37(Suppl. 1):19–25. doi: 10.1111/j.1600-0560.2010.01503.x
 63. Topczewska JM, Postovit L-M, Margaryan NV, Sam A, Hess AR, Wheaton WW, et al. Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nat Med*. (2006) 12:925–32. doi: 10.1038/nm1448
 64. Gong W, Sun B, Zhao X, Zhang D, Sun J, Liu T, et al. Nodal signaling promotes vasculogenic mimicry formation in breast cancer via the Smad2/3 pathway. *Oncotarget*. (2016) 7:70152–67. doi: 10.18632/oncotarget.12161
 65. Azad T, Ghahremani M, Yang X. The role of YAP and TAZ in angiogenesis and vascular mimicry. *Cells*. (2019) 8:407. doi: 10.3390/cells8050407
 66. Bora-Singhal N, Nguyen J, Schaal C, Perumal D, Singh S, Coppola D, et al. YAP1 regulates OCT4 activity and SOX2 expression to facilitate self-renewal and vascular mimicry of stem-like cells. *Stem Cells*. (2015) 33:1705–18. doi: 10.1002/stem.1993
 67. Wei H, Wang F, Wang Y, Li T, Xiu P, Zhong J, et al. Verteporfin suppresses cell survival, angiogenesis and vasculogenic mimicry of pancreatic ductal adenocarcinoma via disrupting the YAP-TEAD complex. *Cancer Sci*. (2017) 108:478–87. doi: 10.1111/cas.13138
 68. Liu K, Sun B, Zhao X, Wang X, Li Y, Qiu Z, et al. Hypoxia induced epithelial-mesenchymal transition and vasculogenic mimicry formation by

- promoting Bcl-2/Twist1 cooperation. *Exp Mol Pathol.* (2015) 99:383–91. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.08.009
69. Du J, Sun B, Zhao X, Gu Q, Dong X, Mo J, et al. Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation by inducing epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* (2014) 133:575–83. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.02.034
 70. Zhao N, Sun B, Sun T, Ma Y, Zhao X, Liu Z, et al. Hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation via VE-cadherin regulation by Bcl-2. *Med Oncol.* (2012) 29:3599–607. doi: 10.1007/s12032-012-0245-5
 71. Luca M, Huang S, Gershenwald JE, Singh RK, Reich R, Bar-Eli M. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J Pathol.* (1997) 151:1105–13.
 72. Angara K, Borin TF, Rashid MH, Lebedyeva I, Ara R, Lin P-C, et al. CXCR2-expressing tumor cells drive vascular mimicry in antiangiogenic therapy-resistant glioblastoma. *Neoplasia.* (2018) 20:1070–82. doi: 10.1016/j.neo.2018.08.011
 73. Sharma I, Singh A, Siraj F, Saxena S. IL-8/CXCR1/2 signalling promotes tumor cell proliferation, invasion and vascular mimicry in glioblastoma. *J Biomed Sci.* (2018) 25:62. doi: 10.1186/s12929-018-0464-y
 74. Aikins AR, Kim M, Raymundo B, Kim C-W. Downregulation of transgelin blocks interleukin-8 utilization and suppresses vasculogenic mimicry in breast cancer cells. *Exp Biol Med.* (2017) 242:573–83. doi: 10.1177/1535370216685435
 75. Mourad-Zeidan AA, Melnikova VO, Wang H, Raz A, Bar-Eli M. Expression profiling of Galectin-3-depleted melanoma cells reveals its major role in melanoma cell plasticity and vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* (2008) 173:1839–52. doi: 10.2353/ajpath.2008.080380
 76. Lissitzky J-C, Parriaux D, Ristorcelli E, Vérine A, Lombardo D, Verrando P. Cyclic AMP signaling as a mediator of vasculogenic mimicry in aggressive human melanoma cells *in vitro*. *Cancer Res.* (2009) 69:802–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2391
 77. Hulin J-A, Tommasi S, Elliot D, Hu DG, Lewis BC, Mangoni AA. MiR-193b regulates breast cancer cell migration and vasculogenic mimicry by targeting dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1. *Sci Rep.* (2017) 7:13996. doi: 10.1038/s41598-017-14454-1
 78. Basu GD, Liang WS, Stephan DA, Wegener LT, Conley CR, Pockaj BA, et al. A novel role for cyclooxygenase-2 in regulating vascular channel formation by human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* (2006) 8:R69. doi: 10.1186/bcr1626
 79. Robertson FM, Simeone A-M, Lucci A, McMurray JS, Ghosh S, Cristofanilli M. Differential regulation of the aggressive phenotype of inflammatory breast cancer cells by prostanoid receptors EP3 and EP4. *Cancer.* (2010) 116:2806–14. doi: 10.1002/cncr.25167
 80. Hendrix MJ, SefTOR EA, Meltzer PS, Gardner LM, Hess AR, Kirschmann DA, et al. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2001) 98:8018–23. doi: 10.1073/pnas.131209798
 81. Hess AR, Postovit L-M, Margaryan NV, SefTOR EA, Schneider GB, SefTOR REB, et al. Focal adhesion kinase promotes the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res.* (2005) 65:9851–60. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2172
 82. Liu W, Xu G, Jia W, Li J, Ma J, Chen K, et al. Prognostic significance and mechanisms of patterned matrix vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol.* (2011) 28(Suppl. 1):S228–38. doi: 10.1007/s12032-010-9706-x
 83. Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K, Quaranta V. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J Cell Biol.* (2000) 148:615–24. doi: 10.1083/jcb.148.3.615
 84. Czekierdowski A, Czekierdowska S, Stachowicz N, Łozinski T, Gurynowicz G. Mig-7 expression and vasculogenic mimicry in malignant ovarian tumors. *Ginek Pol.* (2017) 88:552–561. doi: 10.5603/GP.a2017.0100
 85. Sun Q, Zou X, Zhang T, Shen J, Yin Y, Xiang J. The role of miR-200a in vasculogenic mimicry and its clinical significance in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* (2014) 132:730–8. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.01.047
 86. Davidson B, Goldberg I, Gotlieb WH, Kopolovic J, Ben-Baruch G, Nesland JM, et al. High levels of MMP-2, MMP-9, MT1-MMP and TIMP-2 mRNA correlate with poor survival in ovarian carcinoma. *Clin Exp Metastasis.* (1999) 17:799–808. doi: 10.1023/A:1006723011835
 87. Hess AR, SefTOR EA, SefTOR REB, Hendrix MJC. Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane Type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry. *Cancer Res.* (2003) 63:4757–62.
 88. Zhao X, Guan J-L. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv Drug Deliv Rev.* (2011) 63:610–5. doi: 10.1016/j.addr.2010.11.001
 89. Mabuchi S, Kuroda H, Takahashi R, Sasano T. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* (2015) 137:173–9. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.02.003
 90. Vartanian A, Stepanova E, Grigorieva I, Solomko E, Baryshnikov A, Lichinitser M. VEGFR1 and PKC α signaling control melanoma vasculogenic mimicry in a VEGFR2 kinase-independent manner. *Melanoma Res.* (2011) 21:91–8. doi: 10.1097/CMR.0b013e328343a237
 91. Yao X, Ping Y, Liu Y, Chen K, Yoshimura T, Liu M, et al. Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) plays a key role in vasculogenic mimicry formation, neovascularization and tumor initiation by Glioma stem-like cells. *PLoS ONE.* (2013) 8:e57188. doi: 10.1371/journal.pone.0057188
 92. Wang J-Y, Sun T, Zhao X-L, Zhang S-W, Zhang D-F, Gu Q, et al. Functional significance of VEGF-a in human ovarian carcinoma: role in vasculogenic mimicry. *Cancer Biol Ther.* (2008) 7:758–66. doi: 10.4161/cbt.7.5.5765
 93. Millimaggi D, Mari M, D'Ascenzo S, Giusti I, Pavan A, Dolo V. Vasculogenic mimicry of human ovarian cancer cells: role of CD147. *Int J Oncol.* (2009) 35:1423–8. doi: 10.3892/ijo.00000460
 94. Petty AP, Garman KL, Winn VD, Spidel CM, Lindsey JS. Overexpression of carcinoma and embryonic cytotrophoblast cell-specific Mig-7 induces invasion and vessel-like structure formation. *Am J Pathol.* (2007) 170:1763–80. doi: 10.2353/ajpath.2007.060969
 95. Chen Y, Zhang L, Liu W-X, Wang K. VEGF and SEMA4D have synergistic effects on the promotion of angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Cell Mol Biol Lett.* (2018) 23:2. doi: 10.1186/s11658-017-0058-9
 96. Xia Y, Cai X-Y, Fan J-Q, Zhang L-L, Ren J-H, Li Z-Y, et al. The role of sema4D in vasculogenic mimicry formation in non-small cell lung cancer and the underlying mechanisms. *Int J Cancer.* (2019) 144:2227–38. doi: 10.1002/ijc.31958
 97. Taniguchi H, Suzuki Y, Natori Y. The evolving landscape of cancer stem cells and ways to overcome cancer heterogeneity. *Cancers.* (2019) 11:532. doi: 10.3390/cancers11040532
 98. Chiao M-T, Yang Y-C, Cheng W-Y, Shen C-C, Ko J-L. CD133+ glioblastoma stem-like cells induce vascular mimicry *in vivo*. *Curr Neurovasc Res.* (2011) 8:210–9. doi: 10.2174/156720211796558023
 99. Lai C-Y, Schwartz BE, Hsu M-Y. CD133+ melanoma subpopulations contribute to perivascular niche morphogenesis and tumorigenicity through vasculogenic mimicry. *Cancer Res.* (2012) 72:5111–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0624
 100. Zhang D, Sun B, Zhao X, Ma Y, Ji R, Gu Q, et al. Twist1 expression induced by sunitinib accelerates tumor cell vasculogenic mimicry by increasing the population of CD133+ cells in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer.* (2014) 13:207. doi: 10.1186/1476-4598-13-207
 101. Wang S-S, Gao X-L, Liu X, Gao S-Y, Fan Y-L, Jiang Y-P, et al. CD133+ cancer stem-like cells promote migration and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma by inducing vasculogenic mimicry formation. *Oncotarget.* (2016) 7:29051–62. doi: 10.18632/oncotarget.8665
 102. Xing P, Dong H, Liu Q, Zhao T, Yao F, Xu Y, et al. ALDH1 expression and vasculogenic mimicry are positively associated with poor prognosis in patients with breast cancer. *Cell Physiol Biochem.* (2018) 49:961–70. doi: 10.1159/000493227
 103. Zhu B, Zhou L, Yu L, Wu S, Song W, Gong X, et al. Evaluation of the correlation of vasculogenic mimicry, ALDH1, KAI1 and microvessel density in the prediction of metastasis and prognosis in colorectal carcinoma. *BMC Surg.* (2017) 17:47. doi: 10.1186/s12893-017-0246-6
 104. Yu L, Zhu B, Wu S, Zhou L, Song W, Gong X, et al. Evaluation of the correlation of vasculogenic mimicry, ALDH1, KiSS-1, and MACC1 in the prediction of metastasis and prognosis in ovarian carcinoma. *Diagn Pathol.* (2017) 12:23. doi: 10.1186/s13000-017-0612-9

105. Wang H-F, Wang S-S, Zheng M, Dai L-L, Wang K, Gao X-L, et al. Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation by vascular endothelial growth factor A mediating epithelial-mesenchymal transition in salivary adenoid cystic carcinoma. *Cell Prolif.* (2019) 52:e12600. doi: 10.1111/cpr.12600
106. Mao X-G, Xue X-Y, Wang L, Zhang X, Yan M, Tu Y-Y, et al. CDH5 is specifically activated in glioblastoma stemlike cells and contributes to vasculogenic mimicry induced by hypoxia. *Neuro Oncol.* (2013) 15:765–79. doi: 10.1093/neuonc/nt029
107. Jung JE, Lee HG, Cho IH, Chung DH, Yoon S-H, Yang YM, et al. STAT3 is a potential modulator of HIF-1-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *FASEB J.* (2005) 19:1296–8. doi: 10.1096/fj.04-3099fje
108. Li S, Meng W, Guan Z, Guo Y, Han X. The hypoxia-related signaling pathways of vasculogenic mimicry in tumor treatment. *Biomed Pharmacother.* (2016) 80:127–35. doi: 10.1016/j.biopha.2016.03.010
109. Song Y-Y, Sun L-D, Liu M-L, Liu Z-L, Chen F, Zhang Y-Z, et al. STAT3, p-STAT3 and HIF-1 α are associated with vasculogenic mimicry and impact on survival in gastric adenocarcinoma. *Oncol Lett.* (2014) 8:431–7. doi: 10.3892/ol.2014.2059
110. Xu Q, Briggs J, Park S, Niu G, Kortylewski M, Zhang S, et al. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene.* (2005) 24:5552–60. doi: 10.1038/sj.onc.1208719
111. Gest C, Mirshahi P, Li H, Pritchard L-L, Joimel U, Blot E, et al. Ovarian cancer: Stat3, RhoA and IGF-1R as therapeutic targets. *Cancer Lett.* (2012) 317:207–17. doi: 10.1016/j.canlet.2011.11.026
112. Dejana E. The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis. *Circ Res.* (2010) 107:943–52. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223750
113. Qi L, Song W, Liu Z, Zhao X, Cao W, Sun B. Wnt3a promotes the vasculogenic mimicry formation of colon cancer via Wnt/ β -catenin signaling. *Int J Mol Sci.* (2015) 16:18564–79. doi: 10.3390/ijms160818564
114. Qi H, Sun B, Zhao X, Du J, Gu Q, Liu Y, et al. Wnt5a promotes vasculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transition via protein kinase C α in epithelial ovarian cancer. *Oncol Rep.* (2014) 32:771–9. doi: 10.3892/or.2014.3229
115. Su M, Wei W, Xu X, Wang X, Chen C, Su L, et al. Role of hCG in vasculogenic mimicry in OVCAR-3 ovarian cancer cell line. *Int J Gynecol Cancer.* (2011) 21:1366–74. doi: 10.1097/IGC.0b013e31822c7529
116. Gao S, Fan C, Huang H, Zhu C, Su M, Zhang Y. Effects of HCG on human epithelial ovarian cancer vasculogenic mimicry formation *in vivo*. *Oncol Lett.* (2016) 12:459–66. doi: 10.3892/ol.2016.4630
117. Su M, Xu X, Wei W, Gao S, Wang X, Chen C, et al. Involvement of human chorionic gonadotropin in regulating vasculogenic mimicry and hypoxia-inducible factor-1 α expression in ovarian cancer cells. *Cancer Cell Int.* (2016) 16:50. doi: 10.1186/s12935-016-0327-0
118. Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol.* (2014) 9:287–314. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104715
119. Wang Z, Zheng C, Jiang K, He J, Cao X, Wu S. MicroRNA-503 suppresses cell proliferation and invasion in osteosarcoma via targeting insulin-like growth factor 1 receptor. *Exp Ther Med.* (2017) 14:1547–53. doi: 10.3892/etm.2017.4648
120. Zeng Q, Wang Y, Gao J, Yan Z, Li Z, Zou X, et al. miR-29b-3p regulated osteoblast differentiation via regulating IGF-1 secretion of mechanically stimulated osteocytes. *Cell Mol Biol Lett.* (2019) 24:11. doi: 10.1186/s11658-019-0136-2
121. Li Q, Li Y, Zhang D, Gao H, Gao X. Downregulation of microRNA-451 improves cell migration, invasion and tube formation in hypoxia-treated HUVECs by targeting MIF. *Mol Med Rep.* (2019) 20:1167–77. doi: 10.3892/mmr.2019.10357
122. Li G, Huang M, Cai Y, Ke Y, Yang Y, Sun X. miR-141 inhibits glioma vasculogenic mimicry by controlling EphA2 expression. *Mol Med Rep.* (2018) 18:1395–1404. doi: 10.3892/mmr.2018.9108
123. Wang Y, Sun B, Sun H, Zhao X, Wang X, Zhao N, et al. Regulation of proliferation, angiogenesis and apoptosis in hepatocellular carcinoma by miR-26b-5p. *Tumour Biol.* (2016) 37:10965–79. doi: 10.1007/s13277-016-4964-7
124. Wu N, Zhao X, Liu M, Liu H, Yao W, Zhang Y, et al. Role of microRNA-26b in glioma development and its mediated regulation on EphA2. *PLoS ONE.* (2011) 6:e16264. doi: 10.1371/journal.pone.0016264
125. Chen X, Wang X, Ruan A, Han W, Zhao Y, Lu X, et al. miR-141 is a key regulator of renal cell carcinoma proliferation and metastasis by controlling EphA2 expression. *Clin Cancer Res.* (2014) 20:2617–30. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3224
126. Liu W, Lv C, Zhang B, Zhou Q, Cao Z. MicroRNA-27b functions as a new inhibitor of ovarian cancer-mediated vasculogenic mimicry through suppression of VE-cadherin expression. *RNA.* (2017) 23:1019–27. doi: 10.1261/rna.059592.116
127. Zhao N, Sun H, Sun B, Zhu D, Zhao X, Wang Y, et al. miR-27a-3p suppresses tumor metastasis and VM by down-regulating VE-cadherin expression and inhibiting EMT: an essential role for Twist-1 in HCC. *Sci Rep.* (2016) 6:23091. doi: 10.1038/srep23091
128. Salinas-Vera YM, Gallardo-Rincón D, García-Vázquez R, Hernández-de la Cruz ON, Marchat LA, González-Barrios JA, et al. HypoxamiRs profiling identify miR-745 as a regulator of the early stages of vasculogenic mimicry in SKOV3 ovarian cancer cells. *Front Oncol.* (2019) 9:381. doi: 10.3389/fonc.2019.00381
129. Yang J, Lu Y, Lin Y-Y, Zheng Z-Y, Fang J-H, He S, et al. Vascular mimicry formation is promoted by paracrine TGF- β and SDF1 of cancer-associated fibroblasts and inhibited by miR-101 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* (2016) 383:18–27. doi: 10.1016/j.canlet.2016.09.012
130. Salinas-Vera YM, Marchat LA, García-Vázquez R, González de la Rosa CH, Castañeda-Saucedo E, Tito NN, et al. Cooperative multi-targeting of signaling networks by angiomiR-204 inhibits vasculogenic mimicry in breast cancer cells. *Cancer Lett.* (2018) 432:17–27. doi: 10.1016/j.canlet.2018.06.003
131. Gao Y, Yu H, Liu Y, Liu X, Zheng J, Ma J, et al. Long Non-Coding RNA HOXA-AS2 regulates malignant glioma behaviors and vasculogenic mimicry formation via the MiR-373/EGFR Axis. *Cell Physiol Biochem.* (2018) 45:131–47. doi: 10.1159/000486253
132. Cao C, Sun D, Zhang L, Song L. miR-186 affects the proliferation, invasion and migration of human gastric cancer by inhibition of Twist1. *Oncotarget.* (2016) 7:79956–63. doi: 10.18632/oncotarget.13182
133. Chang Z, Cui J, Song Y. Long noncoding RNA PVT1 promotes EMT via mediating microRNA-186 targeting of Twist1 in prostate cancer. *Gene.* (2018) 654:36–42. doi: 10.1016/j.gene.2018.02.036
134. Fang J-H, Zheng Z-Y, Liu J-Y, Xie C, Zhang Z-J, Zhuang S-M. Regulatory role of the microRNA-29b-IL-6 signaling in the formation of vascular mimicry. *Mol Ther Nucleic Acids.* (2017) 8:90–100. doi: 10.1016/j.omtn.2017.06.009
135. Guo J, Cai H, Liu X, Zheng J, Liu Y, Gong W, et al. Long non-coding RNA LINC00339 stimulates glioma vasculogenic mimicry formation by regulating the miR-539-5p/TWIST1/MMPs Axis. *Mol Ther Nucleic Acids.* (2018) 10:170–86. doi: 10.1016/j.omtn.2017.11.011
136. Tao W, Sun W, Zhu H, Zhang J. Knockdown of long non-coding RNA TP73-AS1 suppresses triple negative breast cancer cell vasculogenic mimicry by targeting miR-490-3p/TWIST1 axis. *Biochem Biophys Res Commun.* (2018) 504:629–34. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.08.122
137. Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang H-W, et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell.* (2009) 137:1005–17. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.021
138. Si Y, Zhang H, Ning T, Bai M, Wang Y, Yang H, et al. miR-26a/b inhibit tumor growth and angiogenesis by targeting the HGF-VEGF axis in gastric carcinoma. *Cell Physiol Biochem.* (2017) 42:1670–83. doi: 10.1159/000479412
139. Shimono Y, Zabala M, Cho RW, Lobo N, Dalerba P, Qian D, et al. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell.* (2009) 138:592–603. doi: 10.1016/j.cell.2009.07.011
140. Karihtala P, Porvari K, Soini Y, Eskelinen M, Juvonen P, Haapaasaari K-M. Expression levels of microRNAs miR-93 and miR-200a in pancreatic adenocarcinoma with special reference to differentiation and relapse-free survival. *Oncology.* (2019) 96:164–70. doi: 10.1159/000494274

141. Liu D, Song L, Dai Z, Guan H, Kang H, Zhang Y, et al. MiR-429 suppresses neurotrophin-3 to alleviate perineural invasion of pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* (2018) 505:1077–83. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.09.147
142. Li Y, Guan B, Liu J, Zhang Z, He S, Zhan Y, et al. MicroRNA-200b is downregulated and suppresses metastasis by targeting LAMA4 in renal cell carcinoma. *EBioMedicine.* (2019) 44:439–51. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.05.041
143. Guo FJ, Shao YP, Wang YP, Jin YM, Liu SS, Wang QY. MIR-92 stimulates VEGF by inhibiting von Hippel-Lindau gene product in epithelial ovarian cancer. *J Biol Regul Homeost Agents.* (2017) 31:615–24.
144. Joshi HP, Subramanian IV, Schnettler EK, Ghosh G, Rupaimoole R, Evans C, et al. Dynamin 2 along with microRNA-199a reciprocally regulate hypoxia-inducible factors and ovarian cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2014) 111:5331–6. doi: 10.1073/pnas.1317242111
145. He J, Jing Y, Li W, Qian X, Xu Q, Li F-S, et al. Roles and mechanism of miR-199a and miR-125b in tumor angiogenesis. *PLoS ONE.* (2013) 8:e56647. doi: 10.1371/journal.pone.0056647
146. Yeh Y-M, Chuang C-M, Chao K-C, Wang L-H. MicroRNA-138 suppresses ovarian cancer cell invasion and metastasis by targeting SOX4 and HIF-1 α . *Int J Cancer.* (2013) 133:867–78. doi: 10.1002/ijc.28086
147. Xu Q, Liu L-Z, Qian X, Chen Q, Jiang Y, Li D, et al. MiR-145 directly targets p70S6K1 in cancer cells to inhibit tumor growth and angiogenesis. *Nucleic Acids Res.* (2012) 40:761–74. doi: 10.1093/nar/gkr730
148. Leng R, Zha L, Tang L. MiR-718 represses VEGF and inhibits ovarian cancer cell progression. *FEBS Lett.* (2014) 588:2078–86. doi: 10.1016/j.febslet.2014.04.040
149. Luo J, Zhu C, Wang H, Yu L, Zhou J. MicroRNA-126 affects ovarian cancer cell differentiation and invasion by modulating expression of vascular endothelial growth factor. *Oncol Lett.* (2018) 15:5803–08. doi: 10.3892/ol.2018.8025
150. Wang W, Ren F, Wu Q, Jiang D, Li H, Shi H. MicroRNA-497 suppresses angiogenesis by targeting vascular endothelial growth factor A through the PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways in ovarian cancer. *Oncol Rep.* (2014) 32:2127–33. doi: 10.3892/or.2014.3439
151. Nishimura M, Jung E-J, Shah MY, Lu C, Spizzo R, Shimizu M, et al. Therapeutic synergy between microRNA and siRNA in ovarian cancer treatment. *Cancer Discov.* (2013) 3:1302–15. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0159
152. Wang Y, Xu C, Wang Y, Zhang X. MicroRNA-365 inhibits ovarian cancer progression by targeting Wnt5a. *Am J Cancer Res.* (2017) 7:1096–1106.
153. Chen S, Chen X, Xiu Y-L, Sun K-X, Zhao Y. MicroRNA-490-3P targets CDK1 and inhibits ovarian epithelial carcinoma tumorigenesis and progression. *Cancer Lett.* (2015) 362:122–30. doi: 10.1016/j.canlet.2015.03.029
154. Chen S, Chen X, Xiu Y-L, Sun K-X, Zhao Y. Inhibition of ovarian epithelial carcinoma tumorigenesis and progression by microRNA 106b mediated through the RhoC pathway. *PLoS ONE.* (2015) 10:e0125714. doi: 10.1371/journal.pone.0125714
155. Duan Y, Dong Y, Dang R, Hu Z, Yang Y, Hu Y, et al. MiR-122 inhibits epithelial mesenchymal transition by regulating P4HA1 in ovarian cancer cells. *Cell Biol Int.* (2018) 42:1564–74. doi: 10.1002/cbin.11052
156. Fan B, Chen L-P, Yuan Y-H, Xiao H-N, Lv X-S, Xia Z-Y. MiR-15a-3p suppresses the growth and metastasis of ovarian cancer cell by targeting Twist1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* (2019) 23:1934–46. doi: 10.26355/eurrev_201903_17232
157. Wei H, Tang Q-L, Zhang K, Sun J-J, Ding R-F. miR-532-5p is a prognostic marker and suppresses cells proliferation and invasion by targeting TWIST1 in epithelial ovarian cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* (2018) 22:5842–50. doi: 10.26355/eurrev_201809_15911
158. Wei C, Zhang X, He S, Liu B, Han H, Sun X. MicroRNA-219-5p inhibits the proliferation, migration, and invasion of epithelial ovarian cancer cells by targeting the Twist/Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Gene.* (2017) 637:25–32. doi: 10.1016/j.gene.2017.09.012
159. Li C, Duan P, Wang J, Lu X, Cheng J. miR-320 inhibited ovarian cancer oncogenicity via targeting TWIST1 expression. *Am J Transl Res.* (2017) 9:3705–13.
160. Sun X, Cui M, Zhang A, Tong L, Wang K, Li K, et al. MiR-548c impairs migration and invasion of endometrial and ovarian cancer cells via downregulation of Twist. *J Exp Clin Cancer Res.* (2016) 35:10. doi: 10.1186/s13046-016-0288-0
161. Liu Y, Zhou H, Ma L, Hou Y, Pan J, Sun C, et al. MiR-214 suppressed ovarian cancer and negatively regulated semaphorin 4D. *Tumour Biol.* (2016) 37:8239–48. doi: 10.1007/s13277-015-4708-0
162. Mitra AK, Chiang CY, Tiwari P, Tomar S, Watters KM, Peter ME, et al. Microenvironment-induced downregulation of miR-193b drives ovarian cancer metastasis. *Oncogene.* (2015) 34:5923–32. doi: 10.1038/onc.2015.43
163. Yan J, Jiang J, Meng X-N, Xiu Y-L, Zong Z-H. MiR-23b targets cyclin G1 and suppresses ovarian cancer tumorigenesis and progression. *J Exp Clin Cancer Res.* (2016) 35:31. doi: 10.1186/s13046-016-0307-1
164. Tian F, Jia L, Chu Z, Han H, Zhang Y, Cai J. MicroRNA-519a inhibits the proliferation and promotes the apoptosis of ovarian cancer cells through targeting signal transducer and activator of transcription 3. *Exp Ther Med.* (2018) 15:1819–24. doi: 10.3892/etm.2017.5600
165. Al-Ansary GH, Eldehna WM, Ghabbour HA, Al-Rashood STA, Al-Rashood KA, Eladwy RA, et al. Cancer stem cells CD133 inhibition and cytotoxicity of certain 3-phenylthiazolo[3,2-a]benzimi. *J Enzyme Inhib Med Chem.* (2017) 32:986–91. doi: 10.1080/14756366.2017.1347166
166. Huang B, Yin M, Li X, Cao G, Qi J, Lou G, et al. Migration-inducing gene 7 promotes tumorigenesis and angiogenesis and independently predicts poor prognosis of epithelial ovarian cancer. *Oncotarget.* (2016) 7:27552–66. doi: 10.18632/oncotarget.8487
167. Heinemann V, Ebert MP, Laubender RP, Bevan P, Mala C, Boeck S. Phase II randomised proof-of-concept study of the urokinase inhibitor upamostat (WX-671) in combination with gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with non-resectable, locally advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer.* (2013) 108:766–70. doi: 10.1038/bjc.2013.62
168. Wang J, Peng Y, Sun YW, He H, Zhu S, An X, et al. All-trans retinoic acid induces XAF1 expression through an interferon regulatory factor-1 element in colon cancer. *Gastroenterology.* (2006) 130:747–58. doi: 10.1053/j.gastro.2005.12.017
169. Fu Z, Wang L, Cui H, Peng J, Wang S, Geng J, et al. A novel small-molecule compound targeting CD147 inhibits the motility and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget.* (2016) 7:9429–47. doi: 10.18632/oncotarget.6990
170. Nozawa-Suzuki N, Nagasawa H, Ohnishi K, Morishige K-I. The inhibitory effect of hypoxic cytotoxin on the expansion of cancer stem cells in ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* (2015) 457:706–11. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.053
171. Su W, Huang L, Ao Q, Zhang Q, Tian X, Fang Y, et al. Noscapine sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin through inhibition of HIF-1 α . *Cancer Lett.* (2011) 305:94–9. doi: 10.1016/j.canlet.2011.02.031
172. Heinzlmeir S, Lohse J, Treiber T, Kudlinzki D, Linhard V, Gande SL, et al. Chemoproteomics-aided medicinal chemistry for the discovery of EPHA2 inhibitors. *Chem Med Chem.* (2017) 12:999–1011. doi: 10.1002/cmdc.201700217
173. Polena H, Creuzet J, Dufies M, Sidibé A, Khalil-Mgharbel A, Salomon A, et al. The tyrosine-kinase inhibitor sunitinib targets vascular endothelial (VE)-cadherin: a marker of response to antitumoural treatment in metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* (2018) 118:1179–88. doi: 10.1038/s41416-018-0054-5
174. Guo J-Q, Zheng Q-H, Chen H, Chen L, Xu J-B, Chen M-Y, et al. Ginsenoside Rg3 inhibition of vasculogenic mimicry in pancreatic cancer through downregulation of VE-cadherin/EphA2/MMP9/MMP2 expression. *Int J Oncol.* (2014) 45:1065–72. doi: 10.3892/ijo.2014.2500
175. Liu T, Zhao L, Zhang Y, Chen W, Liu D, Hou H, et al. Ginsenoside 20(S)-Rg3 targets HIF-1 α to block hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *PLoS ONE.* (2014) 9:e103887. doi: 10.1371/journal.pone.0103887
176. Liu T, Zhao L, Hou H, Ding L, Chen W, Li X. Ginsenoside 20(S)-Rg3 suppresses ovarian cancer migration via hypoxia-inducible factor 1 alpha and nuclear factor-kappa B signals. *Tumour Biol.* (2017) 39:1010428317692225. doi: 10.1177/1010428317692225

177. Rodríguez MI, Peralta-Leal A, O'Valle F, Rodríguez-Vargas JM, Gonzalez-Flores A, Majuelos-Melguizo J, et al. PARP-1 regulates metastatic melanoma through modulation of vimentin-induced malignant transformation. *PLoS Genet.* (2013) 9:e1003531. doi: 10.1371/journal.pgen.1003531
178. O'Ceirbhail RE. Using PARP inhibitors in advanced ovarian cancer. *Oncology.* (2018) 32:339–43.
179. Tempfer CB, Schultheis B, Hilal Z, Dogan A, Reznicek GA. Thalidomide and lenalidomide for recurrent ovarian cancer: a systematic review of the literature. *Oncol Lett.* (2017) 14:3327–36. doi: 10.3892/ol.2017.6578
180. Bauer JA, Morrison BH, Grane RW, Jacobs BS, Borden EC, Lindner DJ. IFN-alpha2b and thalidomide synergistically inhibit tumor-induced angiogenesis. *J Interferon Cytokine Res.* (2003) 23:3–10. doi: 10.1089/10799900360520397
181. Zhang S, Li M, Gu Y, Liu Z, Xu S, Cui Y, et al. Thalidomide influences growth and vasculogenic mimicry channel formation in melanoma. *J Exp Clin Cancer Res.* (2008) 27:60. doi: 10.1186/1756-9966-27-60
182. Ding J, Jia X, Zuo B, He J, Yang J, He Y. A novel monoclonal antibody targeting a novel epitope of VE-cadherin inhibits vasculogenic mimicry of lung cancer cells. *Oncol Rep.* (2018) 39:2837–44. doi: 10.3892/or.2018.6374
183. Hosseinahli N, Aghapour M, Duijf PHG, Baradaran B. Treating cancer with microRNA replacement therapy: a literature review. *J Cell Physiol.* (2018) 233:574–88. doi: 10.1002/jcp.26514

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Ayala-Domínguez, Olmedo-Nieva, Muñoz-Bello, Contreras-Paredes, Manzo-Merino, Martínez-Ramírez and Lizano. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.