

IMAGEN MOLECULAR

DR. MANUEL DESCO Y DR. JUAN JOSÉ VRAQUERO

Unidad de Medicina y Cirugía Experimental.

Hospital General Universitario Gregorio Marañón

Introducción

Se considera imagen molecular a toda aquella modalidad de imagen biomédica capaz de detectar procesos celulares a nivel molecular en vivo, y que permite el estudio de dichos procesos de forma remota y no invasiva, sin perturbar el sistema bajo estudio. La mayoría de las técnicas de imagen molecular se han desarrollado sobre modelos de roedores (ratas y ratones), apoyados en ensayos previos *in vitro*

El auge que está cobrando la imagen molecular se debe, entre otras circunstancias, al acercamiento entre la biología molecular y las tecnologías de imagen, y se espera que se produzca una aceleración en la transferencia de estas técnicas a la práctica clínica. De hecho, algunas de estas características propias de la imagen molecular están ya presentes en técnicas de amplio uso clínico en humanos como son la imagen de medicina nuclear o la imagen de resonancia magnética. Los protocolos de imagen de tomografía por emisión de positrones (PET) basados en la ^{18}F Fluorodeoxiglucosa (FDG) son un ejemplo típico: la visualización del aumento del metabolismo de este análogo de la glucosa como indicativo de un desarrollo tumoral es una técnica bien conocida y extendida para el diagnóstico del cáncer y la evaluación de sus resultados terapéuticos. El atrapamiento celular que sufre este trazador, consecuencia de la fosforilación por acción de la hexoquinasa y su imposibilidad de proseguir en su ruta metabólica, hacen que esta molécula se acumule en las células, resultado atrapada una mayor cantidad en aquellos tejidos con mayor consumo energético (Figura 1). Los factores en los que se basa esta técnica para su uso en oncología son, por un lado el hecho constatado de que la actividad enzimática de la vía glicolítica está aumentada en el tejido tumoral, y por otro la presencia de mayor número de transportadores de membrana para la glucosa, consecuencia de la sobreexpresión del gen que los codifica.

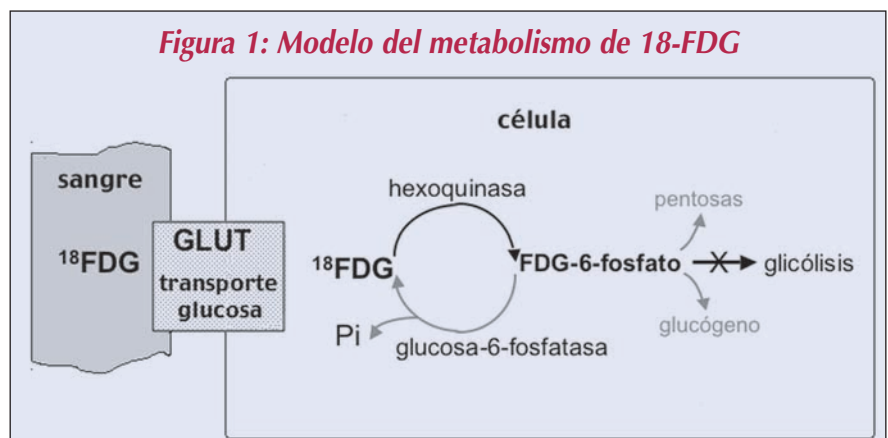
El concepto clave en estas técnicas es el de "sonda para imagen molecular", o trazador. Se llama así a cualquier compuesto capaz de proporcionar, de una parte, un componente de afinidad o especificidad, que determina la diana biológica a

que se unirá, y, de otra parte, un componente que permita su detección externa, mediante una u otra técnica de imagen. Es interesante resaltar que un mismo componente de afinidad podía unirse a diferentes componentes de detección, facilitando la elección de la técnica de imagen más adecuada. El éxito de la imagen molecular se debe, en gran medida, a la buena aceptación que recibe en aquellos campos de la biología molecular en los que tradicionalmente se ha trabajado con estos procedimientos de marcado mediante sondas *in vitro*, y en los cuales el salto a la técnica *in vivo* supone un avance importante. La clave para incrementar el uso y la difusión de estas técnicas radica en la capacidad para desarrollar sistemas de imagen suficientemente sensibles, sondas de gran especificidad y métodos de amplificación para los casos en los que la sensibilidad sea baja.

Imagen nuclear

Se llama Medicina Nuclear a la especialidad que utiliza para el diagnóstico imágenes obtenidas mediante la administración de sustancias radiactivas, que se incorporan a las rutas metabólicas del organismo. Estas técnicas de imagen son intrínsecamente moleculares, y su uso clínico en la actualidad está ampliamente extendido y aceptado. Las sondas para imagen nuclear utilizan como componente de detección un átomo radiactivo, cuyas emisiones pueden detectarse desde el exterior del sujeto bajo estudio mediante sensores de radiación. Existen básicamente tres variantes: la imagen plana (gammagrafía), la tomografía de elementos emisores de fotón único (SPECT) y la tomografía de emisión de positrones (PET). De estas tres técnicas, la PET es la que mejores características presenta para la investigación biomédica por su mayor sensibilidad (puede detectar concentraciones nanomolares), resolución espacial y temporal, y por su carácter cuantitativo. Mientras que la gammagrafía plana y la SPECT utilizan isótopos en cuya desintegración se emite un solo fotón de radia-

Figura 1: Modelo del metabolismo de ^{18}F -FDG



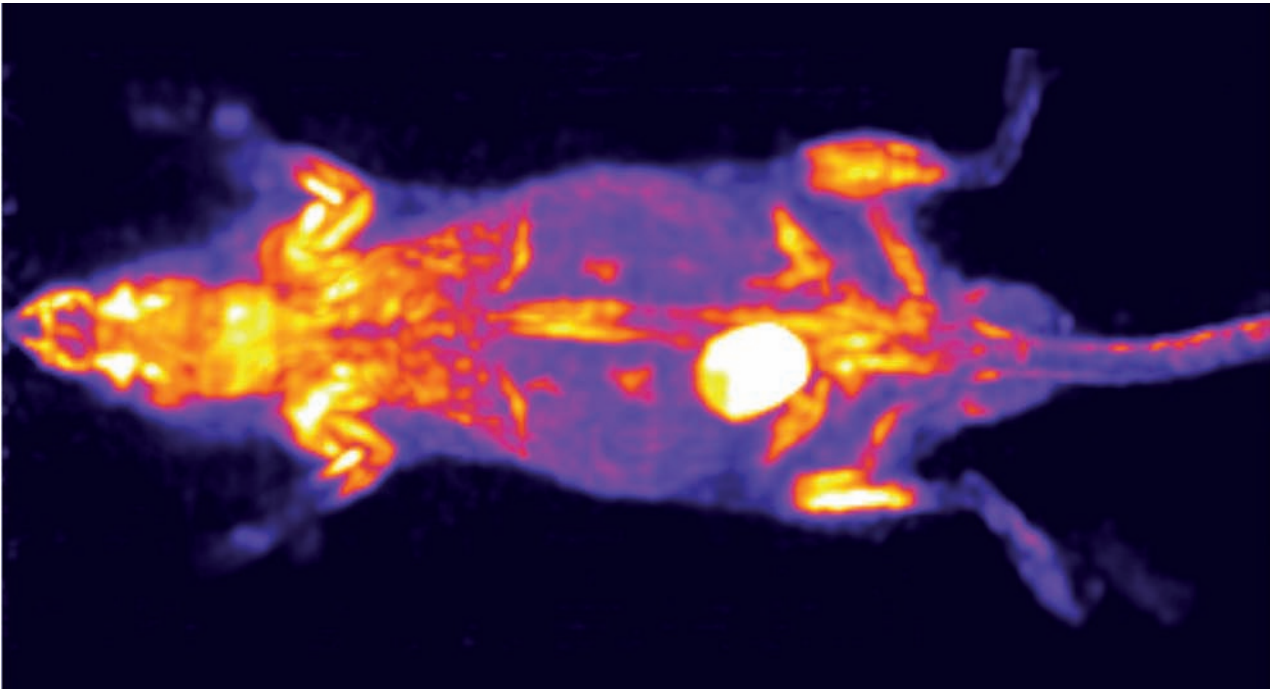


Figura 2: Imagen PET de un ratón de 20 g inyectado con FDG. Se aprecia la captación en músculos y cerebro, así como la acumulación en la vejiga.

ción gamma, en PET se utilizan isótopos cuya desintegración da lugar a la emisión de un positrón (antipartícula del electrón), que viaja un corto recorrido hasta aniquilarse con un electrón dando lugar a dos rayos gamma que se emiten en la misma dirección y en sentidos opuestos. Esto permite utilizar en imagen PET la denominada colimación electrónica, que evita el uso de colimadores de plomo (habitualmente utilizados en gammagrafía y SPECT) que deterioran la sensibilidad y la resolución espacial. Además de esta mayor sensibilidad y resolución, los isótopos habitualmente usados en PET corresponden a átomos constituyentes de la materia orgánica, como son el carbono, el oxígeno, el nitrógeno y el flúor, presentes en abundancia de forma natural en el tejido biológico, lo que amplía mucho el abanico de sustancias que pueden ser marcadas. El mayor inconveniente de estos isótopos emisores de positrones deriva de que presentan periodos de semidesintegración muy cortos (minutos), por lo que han de generarse en ciclotrones y radiofarmacias *in situ* o muy cercanas al centro de imagen, lo que establece una dependencia que acaba incidiendo en el coste de la prueba.

El contraste de las imágenes de Medicina Nuclear representa la concentración alcanzada por el trazador en los diferentes órganos y sistemas: las imágenes obtenidas son, por tanto, un mapa de la distribución de dicho trazador en el organismo. (Figura 2).

Aunque la técnica de formación de imagen es conceptualmente sen-

cilla, no está exenta de problemas que dificultan el proceso de cuantificación de la imagen final. Por ello es necesario integrar en el cálculo de la reconstrucción de la imagen procedimientos para corregir diversos efectos, entre los que destacan la dispersión y la atenuación del rayo gamma producida en el propio objeto. Sólo tras la adecuada corrección de estos efectos se puede conseguir una cuantificación fiable. **Aun así, en este momento las imágenes nucleares (sobre todo la PET) proporcionan una información cuantitativa mucho más fiable que la derivada de ninguna de las otras técnicas.** (Figura 3)

En los últimos años ha tenido lugar un enorme crecimiento del número de sistemas dedicados para imagen de pequeños animales, tanto PET como SPECT.

Asimismo, la mayor facilidad para el uso de sondas, no necesariamente aprobadas para uso humano, abre un gran abanico de aplicaciones en imagen molecular experimental.

Una de las dificultades que debe afrontar la imagen nuclear en cualquiera de sus modalidades es su relativamente baja resolución espacial, que dificulta la identificación de las estructuras. De ahí surge el interés de utilizar simultáneamente otras modalidades de imagen morfológica que aporten esa información anatómica, como por ejemplo la tomografía de rayos X o la resonancia magnética.

Tomografía de rayos

La tomografía por rayos X (CT, TAC) aporta una información anató-

Se considera imagen molecular a toda aquella modalidad de imagen biomédica capaz de detectar procesos celulares a nivel molecular en vivo, y que permite el estudio de dichos procesos de forma remota y no invasiva.

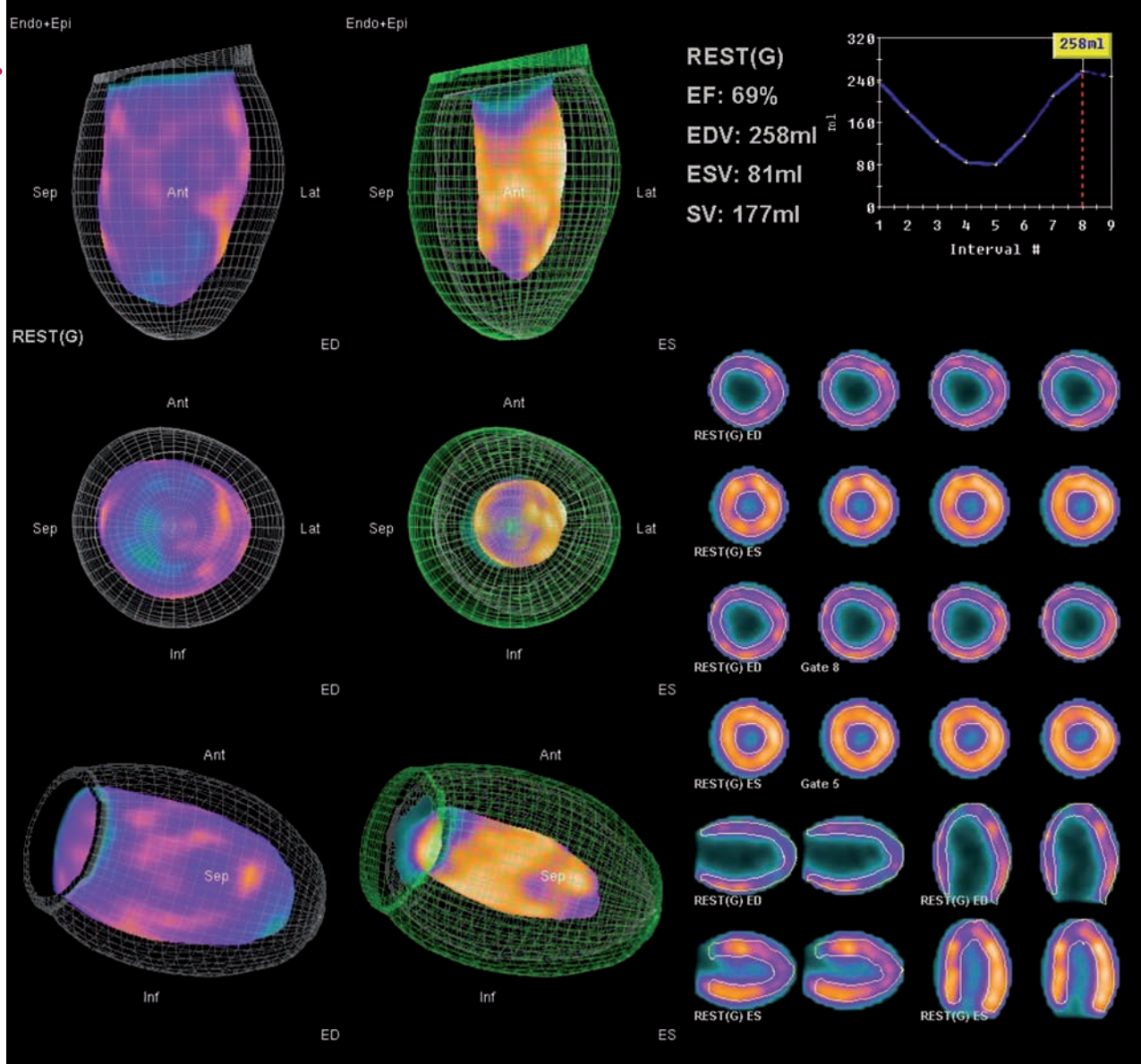


Figura 3: PET dinámico cardíaco de una rata. Los datos adquiridos en el sistema pre-clínico son exportados a una estación de trabajo donde son analizados con las mismas herramientas usadas para el diagnóstico clínico, cuantificando los mismos parámetros manejados en estudios con pacientes. (ml=microlitro)

mica tridimensional de gran valor diagnóstico. El contraste en estas imágenes depende de un parámetro físico relativamente "simple": el coeficiente de atenuación a los rayos X de la materia que atraviesa, directamente relacionado con la densidad del tejido.

La tomografía por rayos X en pequeños animales ha supuesto un importante avance en las técnicas de imagen molecular, dado que aporta imágenes anatómicas con resoluciones del orden de las decenas de micras y tiempos de adquisición en el rango de los minutos. Estas imágenes tienen aplicación sobre todo para caracterizar el fenotipo en estudios de expresión génica, aparte de su uso convencional para exploración de la población y monitorización de tratamientos. Podría decirse que no es una técnica de imagen molecular en el estricto sentido de la definición, pero ha demostrado ser una herramienta especialmente útil cuando se combina con otras modalidades de imagen funcional, dado que aporta una información anatómica-estructural que permite una mejor localización de las funciones representadas en la imagen funcional, normalmente de menor resolución espacial. Conseguir que esta técnica se convierta en un verdadero método de imagen molecular depende de la posibilidad de desarrollar traza-

dores que, una vez acumulados en el objeto diana, produzcan una atenuación diferencial con respecto al tejido no marcado. Actualmente esto es objeto de investigación. En cuanto a la tecnología se refiere, los sistemas tomográficos para pequeños animales suelen utilizar una fuente de rayos X de baja energía y foco pequeño, y detectores de área (en vez de lineales, como ocurre en los sistemas de humanos), constituyendo el conjunto fuente-detector una geometría de haz cónico (*cone-beam*) que permite explorar el volumen entero en tiempos cortos (entre 15 y 30 minutos para resoluciones de 100 μ m y 50 μ m respectivamente), si bien es preciso utilizar métodos de reconstrucción especialmente adaptados a este tipo de geometría.

Como inconvenientes de la imagen de rayos X cabe mencionar, por un lado, el bajo contraste que presentan los tejidos blandos (salvo que se usen agentes de contraste) y, por otro, la dosis de radiación ionizante a que se expone la muestra, que no es despreciable y limita el número de exploraciones que se pueden realizar a un mismo sujeto. Sus mayores ventajas son la simplicidad de manejo y que puede integrarse fácilmente con otras modalidades, en dispositivos de imagen híbrida. (Figura 4)

Imagen de resonancia magnética

La imagen por resonancia magnética (MRI) se basa en un fenómeno físico relativamente complejo, denominado resonancia magnética nuclear. Sin entrar en detalles, podemos decir que es un fenómeno por el cual determinados núcleos atómicos pueden absorber y emitir energía electromagnética (ondas de radio) de una frecuencia muy precisa (resonancia) cuando se someten a un intenso campo magnético. Aunque hay varios elementos de interés biológico cuyos núcleos presentan el fenómeno de resonancia magnética (hidrógeno, fósforo, sodio, carbono, etc.), la mayoría de los sistemas de imagen trabajan sobre el núcleo de hidrógeno.

Para generar una imagen de resonancia magnética es necesario colocar la muestra en el seno de un potente campo magnético constante, habitualmente producido por un electroimán superconductor refrigerado por helio líquido. La muestra se "ilumina" con impulsos de ondas de radio cuya frecuencia corresponde a la de resonancia del tipo de núcleo investigado (habitualmente el hidrógeno), devolviendo después los tejidos esta energía también en forma de pulsos de radiofrecuencia que son captados por una antena o bobina. Las diferencias químicas en los entornos moleculares de esos núcleos resonantes, así como la abundancia de los mismos, constituyen la base del contraste de la imagen. Sin embargo, en función de la secuencia de pulsos electromagnéticos aplicados a la muestra, es posible obtener imágenes muy variadas que pueden representar muy diferentes propiedades del tejido.

Es destacable la capacidad de la MRI para obtener información anatómica (Figura 5), funcional e incluso de composición química (mediante la llamada espectroscopia por resonancia magnética). La resolución espacial alcanzada depende sobre todo de la intensidad del campo magnético aplicado, llegando incluso a la obtención de imagen microscópica (10 μ m de resolución) con instrumentos especializados de

El auge que está cobrando la imagen molecular se debe, entre otras circunstancias, al acercamiento entre la biología molecular y las tecnologías de imagen

alto campo y muy pequeño campo de visión.

Los avances más interesantes en MRI se derivan de la introducción de nuevos mecanismos de contraste. Para imagen morfológica o estructural se pueden generar diferentes tipos de imagen, capaces de realzar o atenuar ciertas estructuras o tejidos (líquido, grasa, etc.), y capaces también de estudiar el flujo sanguíneo (angiografía por resonancia magnética, MRA), incluso sin utilizar medios de contraste externos. Aún más interesante es la reciente posibilidad de obtener imágenes funcionales de diversos tipos, por ejemplo de activación cerebral

(*Functional MRI*, fMRI).

La espectroscopia de resonancia magnética (MRS), antes mencionada, abre la posibilidad de realizar análisis químicos "in-vivo". Por el momento sólo se pueden detectar por este método unos pocos metabolitos, pero ya se aplica para caracterizar algunos tumores (cerebrales, de próstata).

Los medios de contraste para MRI son por ahora bastante inespecíficos (cationes metálicos convenientemente quelados); se administran por vía endovenosa y se distribuyen por el líquido extracelular. Se están desarrollando diferentes agentes más específicos, por ejemplo marcadores de pH. El aumento del número de sondas para MRI, podría abrir un abanico de aplicaciones semejante al que tiene la Medicina Nuclear, eso sí, sin utilizar radiación ionizante y con mejor resolución.

Por el momento, la principal limitación de la MRI como técnica de imagen molecular es su relativamente baja sensibilidad, sólo llega a detectar concentraciones del orden de mili a micromolar. Esta baja sensibilidad hace muy aconsejable el desarrollo de mecanismos de amplificación que permitan aumentar la señal; para ello se utilizan nanopartículas de óxidos férricos con propiedades superparamagnéticas. Es posible "funcionalizar" dichas nanopartículas mediante la aplicación de un revestimiento sobre el

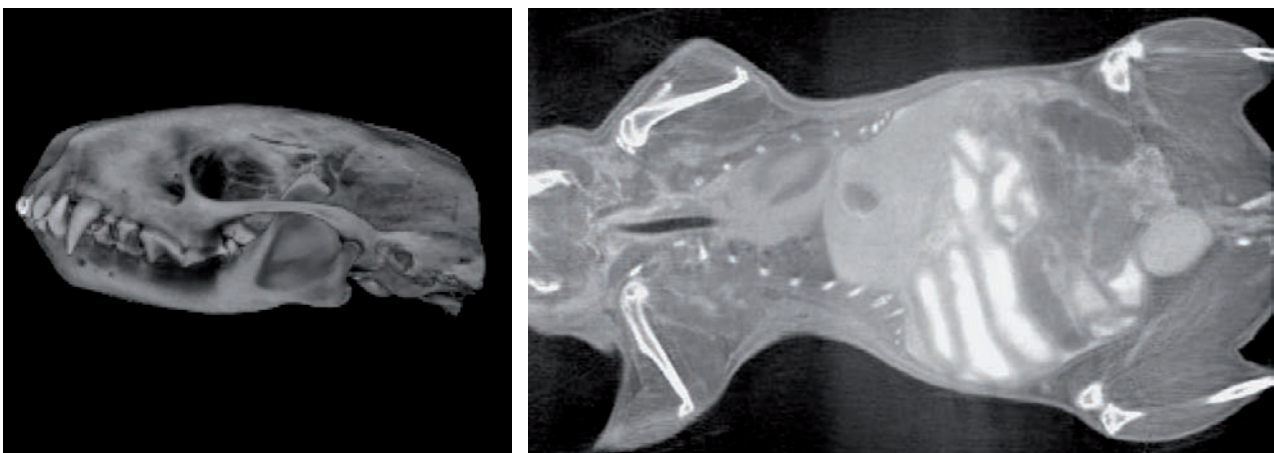


Figura 4: Ejemplos de imagen de tomografía de rayos X: Representación tridimensional de un cráneo de mofeta (panel izquierdo). Corte coronal de una rata a la que se le ha inyectado intraperitonealmente un contraste yodado (panel derecho).

que se pueden aplicar distintas sustancias, por ejemplo, anticuerpos. El desarrollo de estos agentes de contraste constituye un área de investigación muy prometedora, sobre todo en lo relativo a agentes de contraste inteligentes que se activan o desactivan en presencia de una determinada enzima, cambiando selectivamente las propiedades magnéticas del entorno en que se encuentran.

Desde un punto de vista práctico, las limitaciones actuales más importantes de la MRI derivan de su elevado tamaño y peso, del precio de la instrumentación, así como de las dificultades para la realización de exploraciones por su elevada duración y sobre todo coste.

Imagen óptica

La imagen óptica es probablemente la técnica más extendida actualmente en la investigación biomédica para su uso *in vitro* y *ex vivo*, debido a su sencillez y a su bajo coste. Existe una amplia disponibilidad de preparados o *kits* de laboratorio para realizar experimentos de bioluminiscencia y fluorescencia, sobre todo en microscopía.

El traslado de la imagen óptica a la experimentación *in vivo* no está exento de complicaciones, derivadas de la dificultad que supone la detección de la luz emitida en el interior del organismo vivo bajo estudio, dado que el tejido biológico es parcialmente opaco a las longitudes de onda de la luz utilizada. Gracias al desarrollo de cámaras muy sensibles tipo CCD (*charged coupled devices*, dispositivos acoplados en carga) se han podido transferir para uso *in vivo* técnicas en principio sólo viables en imagen de microscopio. De todos modos, en la mayoría de los experimentos con animales se prefiere utilizar ratones del tipo "desnudo", cuya piel resulta especialmente transparente a las longitudes de onda utilizadas.

En los últimos años han aparecido nuevas técnicas, como la tomografía de coherencia óptica, que

Se llama "sonda para imagen molecular", o trazador a cualquier compuesto capaz de proporcionar un componente de afinidad o especificidad, que determina la diana biológica a que se unirá y otro componente que permita su detección externa, mediante una u otra técnica de imagen.

permite realizar imágenes tomográficas (tridimensionales, por tanto) alcanzando resoluciones milimétricas en muestras pequeñas. La imagen óptica también presenta la ventaja ofrecer una alta resolución temporal y una extraordinaria sensibilidad, que puede llegar a detectar concentraciones picomolares en algunos casos.

Los dos mecanismos de generación de la radiación luminosa son la fluorescencia y la bioluminiscencia. Con el primero se utiliza una luz incidente cuya longitud de onda excita el llamado fluoróforo, que emite luz (fluorescencia) en otra longitud de onda mayor. La radiación excitadora debe ser capaz de atravesar los tejidos hasta llegar al lugar de interés, y la emisión fluorescente generada deberá ser capaz también de salir del tejido para poder ser detectada. Cuando se diseñan sondas fluorescentes para uso *in vivo* se procura que las emisiones se localicen en el infrarrojo cercano

(NIR, *near infrared*, 700~900nm), dado que a esas longitudes de onda la penetración en el tejido biológico es mayor. De ahí el creciente interés en el desarrollo de sondas y contrastes con fluorescencia en el NIR.

El segundo mecanismo de producción de luz es la bioluminiscencia. En este caso, la luz es el resultado de una reacción química. La bioluminiscencia es un fenómeno habitual en la naturaleza, y, si bien la química subyacente difiere dependiendo de la especie, el mecanismo es similar: un sustrato, (típicamente, la luciferina), interactúa con una enzima (luciferasa), dando lugar a la emisión de fotones de luz. La gran ventaja de las técnicas bioluminiscentes es que, al no disponer el animal bajo estudio de un sustrato endógeno para la luciferasa, no existe emisión de fondo, con lo que la relación señal a ruido y la sensibilidad

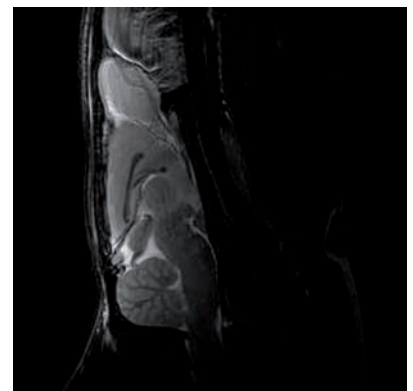
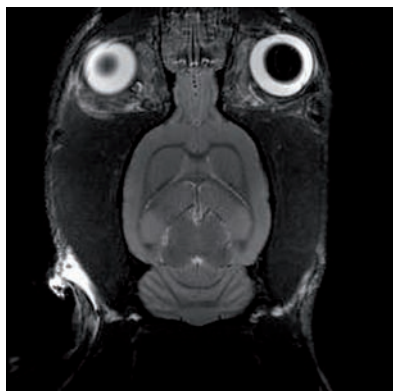
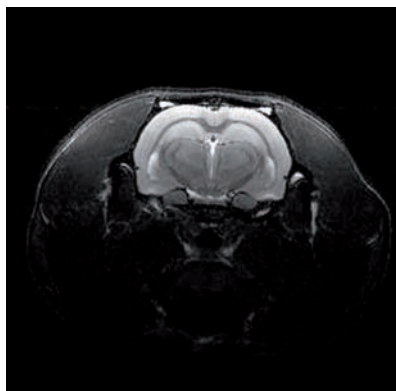


Figura 5: Imágenes axial, coronal y sagital de una cabeza de rata adquirida en un sistema de imagen para animales con un campo de 7 Teslas.

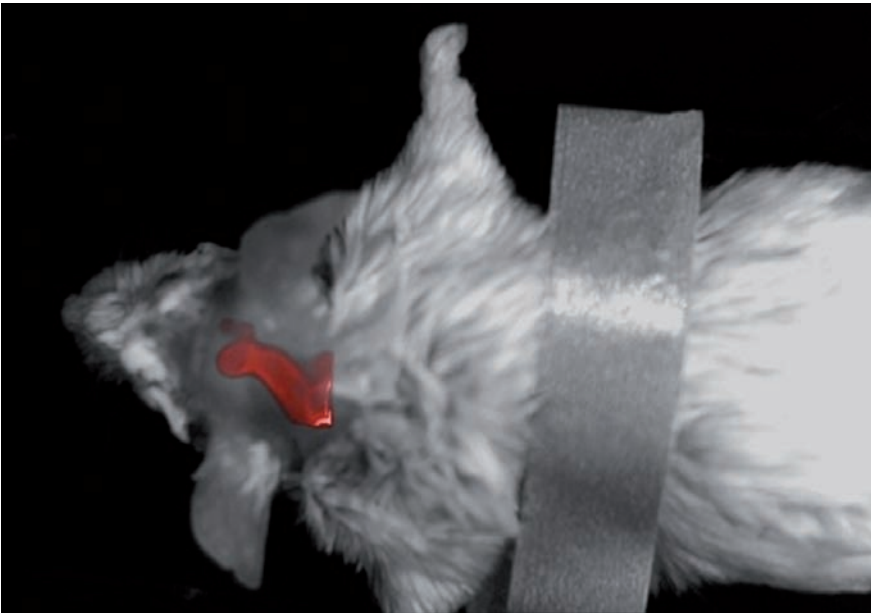


Figura 6: Imagen FDOT, reconstrucción tridimensional de la concentración del fluoróforo Alexa Fluor 750, inyectado transcranealmente en un ratón adulto, superpuesta a una imagen fotográfica

son muy altas, detectándose concentraciones hasta picomolares.

De hecho, los avances más significativos se refieren al diseño de nuevas sondas, de tal modo que sea posible disponer proteínas fluorescentes en el rojo y en el infrarrojo cercano, fluorocromos activables, sondas bioluminiscentes, o combinaciones de ellas que, funcionando en diferentes zonas del espectro, permitan su utilización para la realización de imágenes *in vivo*.

La limitación más importante de las técnicas de imagen óptica es la escasa penetración de la radiación luminosa en el tejido biológico. Por cada centímetro de tejido, la señal se reduce en un orden de magnitud; además, esta atenuación y la dispersión asociada no son constantes y uniformes, ya que dependen de las características ópticas de cada tejido. Esta limitación impone serias dificultades al proceso matemático de reconstrucción de estudios tomográficos, razón por la cual hasta el presente, la mayoría de estos sistemas generan imágenes de proyección plana, lo que a su vez limita la capacidad cuantitativa de los estudios.

Hay trabajos recientes en los que utilizando sondas en el NIR, patrones de excitación especiales y conjuntos de detectores colocados alrededor de la muestra, se consigue realizar imagen tomográfica de fluorescencia con resolución milimétrica: es la denominada tomografía óptica de fluorescencia difusa (FDOT, *Fluorescent Diffuse Optical Tomography*) o tomografía molecular de fluorescencia (FMT, *Fluorescent Molecular Tomography*). La FDOT permite obtener la distribución espacial 3D de la concentración de estos marcadores en animales pequeños *in-vivo* de forma no invasiva (Figura 6).

En los últimos años se han diseñado muchas nuevas sondas moleculares fluorescentes. Estas sondas pretenden servir de contraste para una gran variedad de procesos biológicos, como expresión de proteasas

(apoptosis, inflamación), angiogénesis o microcalcificaciones óseas. Por otra parte, los avances en ingeniería genética han permitido controlar la expresión de proteínas fluorescentes (GFP-DSRED) en células específicas, permitiendo marcar grupos de células concretos (linfocitos T, células neuronales, etc.). La reconstrucción en imágenes de la distribución tridimensional de la concentración de estos contrastes convierte a la FDOT en una técnica con un enorme potencial para la investigación biomédica en animales pequeños.

Una última desventaja de las técnicas de imagen óptica, también consecuencia de la limitada penetración de la radiación luminosa, es la difícil extrapolación de estas técnicas a estudios con humanos, dado el mayor espesor de los órganos y tejidos.

ción de estas técnicas a estudios con humanos, dado el mayor espesor de los órganos y tejidos.

Ecografía

La ecografía utiliza ondas acústicas que se propagan por el tejido, reflejándose en las interfases entre materiales de distinta densidad en forma de ecos. Estos ecos son detectados y procesados, construyendo con ellos una imagen que representa la posición de las diferentes interfases acústicas. La fuente de contraste, por tanto, es también la densidad del tejido, como en la imagen por rayos X, pero con tres diferencias esenciales: la radiación utilizada es no ionizante, y por tanto inocua; la imagen representa un sólo plano de corte; y lo que se representa en la imagen son las transiciones entre tejidos de diferente densidad. Esto último dificulta la interpretación de las imágenes, que requiere un entrenamiento específico. Una variante de la técnica, llamada ecografía Doppler, aprovecha el efecto físico del mismo nombre para proporcionar información sobre el flujo sanguíneo, ofreciendo así una nueva fuente de contraste, muy útil en ciertas enfermedades cardíacas (valvulares, congénitas). (Figura 7)

Utilizando ultrasonidos de muy alta frecuencia (40 a 60 MHz) se pueden obtener imágenes de pequeños animales con muy alta resolución, del orden de las decenas de μm , dando lugar a lo que se denomina 'biomicroscopía por ultrasonidos'.

Por tratarse de una técnica no invasiva y que no utiliza radiación ionizante, suele emplearse para el estudio del desarrollo embrionario, además de las aplicaciones habituales en estudios de función cardíaca o circulatoria y microcirculatoria, mediante el uso del efecto Doppler.

A esto se añaden los recientes avances en el diseño de agentes de contraste, que se pueden dividir en dos grandes grupos. El primero lo constituyen los

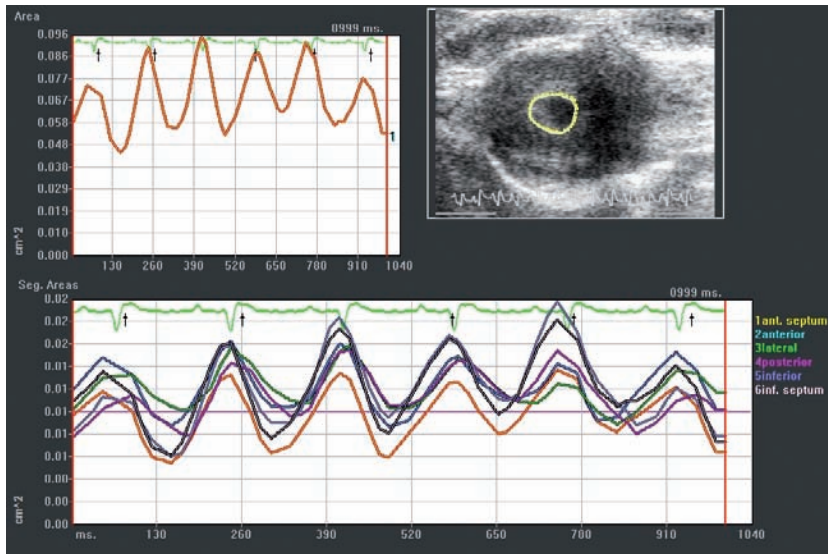


Figura 7: Análisis cuantitativo regional del movimiento endocárdico en un estudio ecográfico de corazón de rata, obtenido con un equipo para uso humano y un transductor pediátrico.

medios intravasculares (que suelen ser microburbujas de CO₂ o aire, encapsuladas en un polímero que se destruye al ser expuesto a los ultrasonidos). La presencia de estos agentes genera una fuerte señal, que permite aplicaciones dirigidas principalmente al estudio de la microvascularización. El segundo grupo de contrastes incluye algún componente que establece una afinidad por estructuras bioquímicas, por ejemplo receptores de membranas celulares. Estos contrastes utilizan nanopartículas ligadas al marcador que modifican las propiedades mecánico-acústicas del tejido al que se ligan, y abren nuevos campos para el uso de los ultrasonidos como técnica de imagen molecular e incluso para la liberación dirigida de fármacos.

La transferencia a la clínica y la aplicación de las técnicas de imagen molecular es un área de intensa actividad, acelerada por la disponibilidad de nuevas tecnologías de detección y reconstrucción de imágenes

Multimodalidad

La fusión de imágenes procedentes de distintas modalidades no se debería considerar como una técnica diferente por sí misma, pero la complejidad que implica la realización de estos estudios obliga a hacer algunas consideraciones al respecto. Las diferentes modalidades de imagen ofrecen información complementaria y de su combinación surgen ventajas adicionales. Registrar dos estudios es poner en correspondencia espacial uno a uno todos los puntos de los distintos volúmenes que representan las diferentes modalidades; para ello es necesario eliminar las diferencias de tamaño, posición, orientación o incluso distorsión espacial entre ellos. El proceso consiste en una búsqueda de la transformación geométrica necesaria para poner las dos imágenes en concordancia, seguido de la aplicación de esa transformación a uno

de dichos estudios (registro), para posteriormente hacer una visualización conjunta del resultado (fusión). Los criterios por los que se pueden clasificar los distintos tipos de registro de imágenes son muchos, empleándose los términos intra-modalidad e inter-modalidad según sean estudios de la misma o diferentes modalidades, así como intra e inter-sujeto según provengan del mismo o de distintos sujetos.

En los últimos años se han desarrollado sistemas de imagen híbridos, que integran en un solo dispositivo al menos dos modalidades, como por ejemplo el PET-CT, el SPECT-CT o incluso la MRI-PET (figura 8). Desde finales de los noventa, los sistemas PET-CT destinados al uso clínico han desplazado a los sistemas PET puros, dado que son capaces de hacer las dos exploraciones (anatómica y funcional) intrínsecamente registradas, en una misma sesión, en un tiempo mínimo y sin necesidad de trasladar al paciente. Además, la técnica PET se beneficia de la información del CT para tener una excelente medida de atenuación, mejorando la capacidad cuantitativa del estudio PET. Algo similar está ocurriendo en la instrumentación de imagen molecular para pequeños animales de laboratorio, para los cuales ya existen sistemas trimodalidad PET/SPECT/CT y combinaciones PET/MRI. Estos sistemas ofrecen nuevas oportunidades al investigador para desarrollar y caracterizar sondas de imagen y cuantificar sus parámetros con mucha mayor

precisión, a la vez que permiten una mejor interpretación de los datos.

Aplicaciones

Las técnicas de imagen molecular abren un amplio abanico de posibilidades prácticas, siendo las aplicaciones más prometedoras las relacionadas con la expresión génica, bien sea en la caracterización de fenotipos, en la monitorización de terapias, o en la propia terapia génica. El principal motor del desarrollo de nuevas aplicaciones es la disponibilidad de sondas específicas. Si bien para la investigación *in vitro* hay una amplia variedad de estas sondas y la mayoría están disponibles comercialmente, su uso *in vivo* no resulta trivial, puesto que aparecen nuevos condicionantes que obligan a resolver problemas de biocompatibilidad, sensibilidad y facilidad de transporte, entre otros.

Este problema se plantea en forma de preguntas generales: ¿Qué proceso se quiere visualizar, cuáles

son las dianas?; ¿cómo se puede llegar a ellas de una forma eficiente?, dado que existen una serie de barreras biológicas que el trazador tendrá que atravesar; ¿qué sondas (biocompatibles, con suficiente afinidad) se pueden utilizar que se manifiesten y señalen el proceso objeto del estudio?; ¿se dispone de algún mecanismo de amplificación que permita detectar mejor la señal?; ¿qué modalidades de imagen hay disponibles, que instrumentos se pueden utilizar? Esta última cuestión se refiere a las soluciones que ha dado la técnica a los problemas de sensibilidad y de resolución, tanto espacial como temporal. Las respuestas estas preguntas merecerían un tratamiento en profundidad más allá del apunte que aquí se hace, especialmente el diseño de sondas para imagen. No obstante, existe una amplia variedad de sondas (moleculares, reporteras, inteligentes, nanopartículas, activables, etc.) y todas ellas tienen en común su arquitectura: una parte de la sonda presenta una cierta afinidad por la diana, mientras que la otra parte, ligada a la primera, genera la señal, cuya naturaleza dependerá de la modalidad. En técnicas de medicina nuclear este segmento es un radioisótopo, que en caso de la PET apenas modifican la molécula original pues se trata tan sólo de una sustitución isotópica. Sin embargo, estas sondas nucleares están siempre activadas (la emisión de rayos gamma o de positrones está ocurriendo permanentemente durante toda la vida del isótopo, independientemente de dónde se encuentre el trazador), mientras que algunas sondas fluorescentes o para MRI pueden diseñarse de tal forma que sólo se activen y produzcan señal cuando interactúen con sus dianas.

Otro aspecto importante a tener en cuenta en el diseño de sondas es su especificidad: cuanto mayor sea ésta, más selectiva será la información que aporten. Esta alta especificidad se logra mediante el uso de sustratos, ligandos, proteínas recombinantes o incluso anticuerpos con dianas muy particulares. Las sondas de baja especificidad se usan cuando se pretende visualizar un proceso fisiológico global (por ejemplo, la perfusión de un órgano o tejido), o cuando se monitoriza la evolución macroscópica de una patología en estados relativamente avanzados. Independientemente de esta especificidad, el problema del ruido de fondo (la captación inespecífica antes referenciada) siempre existe: para el sistema detector de imagen, la señal que proviene de una sonda metabolizada y localizada en su diana es exactamente igual que la de una sonda que circule libremente, y por lo tanto se hace necesario establecer un periodo transitorio en el que, a la vez que la sonda se va fijando en su diana, el remanente de trazador libre va siendo eliminado del sistema, lo que en términos técnicos sería equivalente a eliminar el

ruido y por lo tanto incrementar la relación señal a ruido.

Independientemente de la especificidad de la sonda, ésta tiene que llegar a sus dianas, y por lo tanto deberá tener unas propiedades farmacocinéticas tales que permita alcanzar concentraciones adecuadas durante todo el tiempo que sea necesario para realizar la imagen. Aunque se administre en concentraciones traza, el compuesto estará sometido a los mismos procesos de distribución, absorción, metabolismo y excreción que cualquier otro fármaco, y por lo tanto, si en la distribución se encuentra con barreras infranqueables, si su atrapamiento no es específico, o si su excreción es demasiado rápida, su utilidad será dudosa. Cuando se trabaja con receptores, puede ocurrir que, aún cuando la afinidad sea alta y su comportamiento farmacocinético adecuado, el contraste alcanzado respecto al fondo no sea suficiente, debido a la no existencia o no disponibilidad de un número de receptores, o a la propia cinética de aclarado en el espacio intersticial, es decir, que al no existir un número de dianas suficiente, a pesar de que el mecanismo de ligando sea bueno, puede no alcanzarse la relación señal a ruido suficiente como para generar una buena imagen.

También se ha mencionado la posibilidad de usar mecanismos de amplificación: aumentar la cantidad de señal en su mismo origen es fundamental para obtener la mayor sensibilidad posible. Por ejemplo, dado que el número de dianas en el DNA de una célula es limitado, se han desarrollado técnicas denominadas *downstream* en las que la diana no es el DNA o el mRNA, sino las proteínas por ellas codificadas, cuya abundancia puede llegar a ser dos órdenes de magnitud mayor. De forma análoga, se puede lograr cierto grado de amplificación usando como diana receptores que exprese la célula.

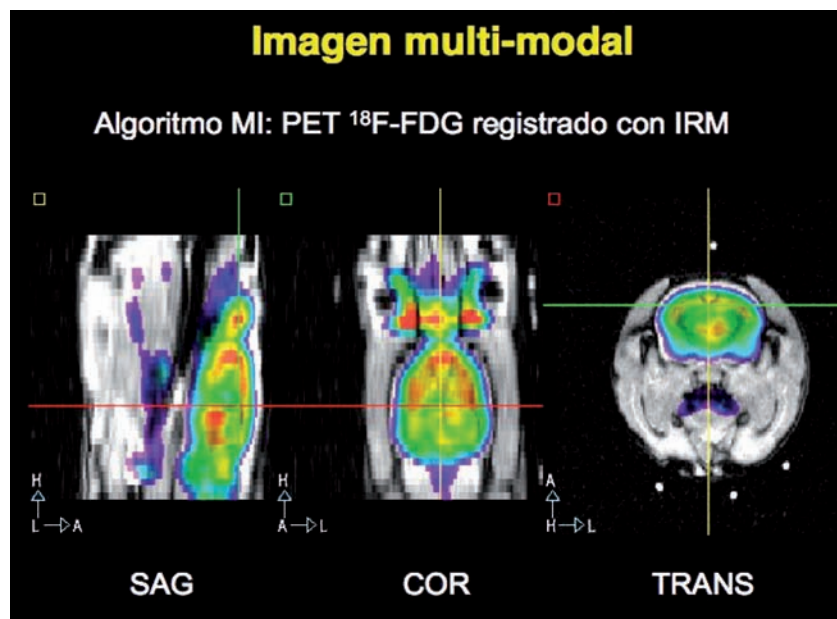


Figura 8: Registro y fusión de una imagen PET de una cabeza de rata (en color) sobre una resonancia magnética del mismo animal (en grises) mediante un algoritmo de información mutua (MI). La actividad registrada en el PET (captación de glucosa) se correlaciona en la imagen de resonancia magnética con la localización de las zonas del cerebro esperadas.

Expresión génica y fenotipo

La producción de las proteínas codificadas por determinados genes (expresión génica) se manifiesta en un fenotipo. El proceso de síntesis de una proteína es una de las funciones que se pueden visualizar mediante las técnicas de imagen molecular. En muchos casos, este gen no es propio de la célula, sino un *transgen* que se ha introducido en la misma, bien sea mediante un vector viral (el más comúnmente usado), mediante liposomas, o directamente como DNA desnudo; si va asociado a un gen terapéutico se tratará de un proceso de monitorización y visualización de terapia génica.

La visualización de la expresión génica endógena necesita también la mediación de un gen reportero; una técnica muy habitual en medicina nuclear es la que hace uso de receptores de membrana, y en ese caso el mecanismo indirecto utilizado será la expresión del gen mediante la producción de la proteína del receptor.

También es posible utilizar como mensajero secundario una enzima que esté codificada por el gen objeto de estudio: el marcaje se consigue gracias a que el agente de contraste es sustrato para esa enzima, y el producto resultante queda atrapado en el citosol. **Estas técnicas indirectas (la basada en receptores y la basada en enzimas) constituyen un proceso de amplificación intrínseco, dado que si el primer producto de la expresión génica es el mRNA, su abundancia es mucho menor que la de las proteínas que codifica, y por lo tanto la sensibilidad del experimento sería menor.** Estas sondas reporteras son más sencillas de diseñar cuando se trabaja con la técnica PET, dado que el isótopo a introducir sustituye a un átomo natural presente en las moléculas del trazador. Las sondas para MRI o imagen óptica son más difíciles de diseñar, ya que el gran tamaño del componente emisor (nanopartícula o fluoróforo) puede alterar el comportamiento de la molécula.

Desarrollo de nuevas tecnologías

La transferencia a la clínica y la aplicación de las técnicas de imagen molecular es un área de intensa actividad, acelerada por la disponibilidad de nuevas tecnologías de detección y reconstrucción de imágenes. Estas nuevas herramientas facilitan la validación rápida de múltiples sondas de imagen para las distintas modalidades. Consecuencia de la maduración de estos procedimientos es la transferencia a la clínica, proceso que no está exento de dificultades técnicas y que requiere a su vez de nuevos desarrollos que hagan viable el uso de la nueva metodología para humanos.

La oncología es uno de los campos más activos en cuanto a aplicaciones se refiere, debido al elevado número de dianas de interés para el estudio de este tipo de patologías. El desarrollo de sondas se centra en aplicaciones de visualización de factores de creci-

Las técnicas de imagen molecular abren un amplio abanico de posibilidades prácticas, siendo las aplicaciones más prometedoras las relacionadas con la expresión génica

miento, angiogénesis, ciclo celular, apoptosis, mecanismos de metástasis e invasión, migración de células, etc., y especialmente en la caracterización génica mediante el establecimiento de los vínculos entre la expresión fenotípica y la parte del genoma responsable. En la actualidad, la PET se considera como la herramienta más versátil para este propósito. Los sistemas multimodales se abren paso, inicialmente con la combinación de la PET y la tomografía de rayos X, y más recientemente con la imagen de resonancia magnética.

IMÁGENES

Todas las imágenes presentadas en este artículo han sido adquiridas, reconstruidas y procesadas en el Laboratorio de Imagen Médica de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, con la instrumentación allí disponible.

Bibliografía

- L. Fass, Imaging and cancer: A review, *Molecular Oncology*, vol. 2, pag. 115-152, 2008.
- T.F. Massoud, S.S. Gambhir, Molecular Imaging in Living Subjects: Seeing Fundamental Biological Processes in a New Light, *Genes & Development*, vol. 17, pag. 545-580, 2003.
- A.F. Chatziioannou, Molecular Imaging of Small Animals with Dedicated PET Tomographs, *European Journal of Nuclear Medicine*, vol. 29, num. 1, pag. 98-114, 2002.
- M. Desco, editor; Número especial sobre PET, *Revista de la Real Academia de ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, vol. 96, núm. 1-2, 2002.
- J.S. Lewis, S. Achilefu et al., Small Animal Imaging: Current Technology and Perspectives for Oncological Imaging, *European Journal of Cancer*, vol. 38, pag. 2173-2188, 2002.
- R. Weissleder, Scaling Down Imaging: Molecular Mapping of Cancer in Mice, *Nature Reviews*, vol.2, pag. 1-8, 2002.
- C. Nichol, E.E. Kim, Molecular Imaging and Gene Therapy, *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 42, num. 9, pag. 1368-1374, 2001.
- M.G. Pomper; Molecular Imaging: and Overview. *Academic Radiology*, vol. 8, num. 11, pag. 1141-1153, 2001
- S. S. Gambhir, J. R. Barrio, M. E. Phelps, M. Iyer, M. Namavari, N. Satyamurthy, L. Wu, L. A. Green, E. Bauer, D. C. MacLaren, K. Nguyen, A. J. Berk, S. R. Cherry, and H. R. Herschman, "Imaging Adenoviral-Directed Reporter Gene Expression in Living Animals With Positron Emission Tomography," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 96, pag. 2333-2338, 1999.