

# IMAGEN MOLECULAR

JUAN JOSÉ VAQUERO LÓPEZ



## INTRODUCCIÓN

La imagen molecular puede ser definida en el contexto de la imagen médica como aquella modalidad capaz de detectar procesos celulares a nivel molecular en vivo. Esta definición establece la diferencia con las otras técnicas que tienen por objetivo el análisis de las estructuras tridimensionales que caracterizan moléculas con interés biológico, como pueden ser por ejemplo las proteínas. De esta forma la imagen molecular permite el estudio de procesos celulares de forma remota y no invasiva, sin perturbar el sistema bajo estudio.

La mayoría de las técnicas de imagen molecular se han desarrollado en modelos de roedores (ratas y ratones) apoyados en ensayos *in vitro* que han resultado ser determinantes para la completa caracterización y puesta a punto de la metodología. Sin embargo, 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 <sup>18</sup>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 en el diag-

nóstico y tratamiento del cáncer. 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, resultando atrapada una mayor cantidad en aquellos tejidos con mayor consumo energético. 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 sobre expresión del gen que los codifica.

Este reciente auge que ha cobrado la imagen molecular se debe a una serie de circunstancias que han propiciado un nuevo impulso a esta técnica, entre las que se halla el hecho de que la tecnología haya llegado a un grado de maduración en cuanto al desarrollo de sistemas de imagen que ha aumentado el número de modalidades que pueden registrar esta

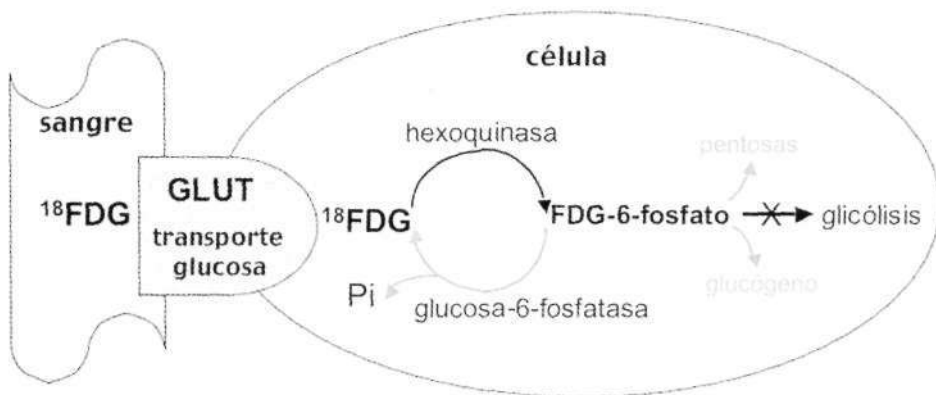


FIGURA 1. Ciclo metabólico de la  $^{18}\text{F}$ FDG. La FDG entra en la célula mediante los transportadores GLUT de igual forma que lo hace la glucosa, e inicia igualmente la vía glicolítica con la acción de la hexoquinasa en el carbono 6, produciéndose la fosforilación. El siguiente paso en esa vía sería la isomerización producida por la fosfoglucosa isomerasa, pero el 2-FDG-6P resultado de la fosforilación no es un sustrato adecuado, y por lo tanto ahí se detiene el ciclo, produciéndose el atrapamiento metabólico. La desfosforilación catalizada por la glucosa-6-fosfatasa en general no es significativa, excepto en las células hepáticas. Las vías alternativas de las pentosas o la síntesis de glucógeno tampoco representan un valor significativo en el intervalo de observación.

actividad molecular. Evidentemente, el acercamiento entre la biología molecular y de las tecnologías de imagen ha sido en gran parte el desencadenante de este rápido desarrollo. Cabe pues esperar que en un futuro cercano se produzca una aceleración en la transferencia de estas técnicas a la práctica clínica, abriendo nuevos horizontes en el estudio y tratamiento de las enfermedades en humanos. Este optimismo está respaldado por el hecho de que campos de la ciencia aparentemente desconectados convergen en la búsqueda de las soluciones a los problemas que plantea el nuevo paradigma de la imagen molecular. Los nuevos dispositivos que se han desarrollado al amparo de estos proyectos son capaces de registrar esta función metabólica con una gran resolución tanto espacial como temporal, y dado que el cambio funcional precede al cambio anatómico en el desarrollo de una patología, esta característica propia de la imagen molecular de visualizar la función va a suponer una valiosísima herramienta en el diagnóstico precoz de la enfermedad, dejando la imagen anatómica en un plano secundario en cuanto a esta detección temprana se refiere.

Así pues, el investigador dispone de herramientas de imagen molecular con prestaciones hasta ahora impensables: sistemas de tomografía de positrones con resoluciones que mejoran notablemente las de los sistemas usados en clínica, tomógrafos computerizados de rayos X con resoluciones en el rango de las mieras, sistemas de resonancia magnética capaces de visualizar el feto de un roedor *in vivo*, sistemas de micro-tomografía óptica, o incluso biomicroscopios de ultrasonidos para analizar la microvasculatura.

Son varias las áreas de la ciencia que han contribuido al desarrollo de esta nueva tecnología, empezando con la biología molecular y las herramientas que se han desarrollado en ese campo para la manipulación automática del ADN. Los mecanismos de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los procedimientos automáticos para el estudio de la expresión génica *in vitro*, como por ejemplo las micromatrices o el muestreo diferencial, han permitido la secuenciación del genoma humano proporcionando un gran número de nuevas dianas para el desarrollo de fármacos y para todo tipo de terapias. Junto con las técnicas de ADN recombinante que permiten diseñar

sondas y trazadores para imagen, se han estudiado múltiples modelos de enfermedades humanas sobre roedores así como transgénicos y *noqueadas*; todo esto hace que el estudio del proceso de la enfermedad pueda ser realizado en vivo y en condiciones controladas como no había sido posible hacerlo hasta ahora.

Los últimos avances en química también han repercutido directamente en el desarrollo de la imagen molecular: la química combinatoria permite, por ejemplo, diseñar de forma eficiente pequeñas moléculas y péptidos aplicables como sondas de procesos celulares cuando en la búsqueda de nuevos fármacos se estudian relaciones de activación. La gran capacidad de cálculo de los sistemas informáticos modernos permite la manipulación de los grandes volúmenes de datos implicados, al igual que han hecho posible el desarrollo de las técnicas de micromatrices y de chips «génicos» fabricados con la misma tecnología que se usa en la industria de los semiconductores.

Todos estos esfuerzos y avances en el campo de la investigación comparten en sus fundamentos la misma hipótesis: el hecho de que la imagen molecular supone un nuevo paradigma dirigido a estudiar y comprender la bases moleculares de la enfermedad, que es la nueva aproximación que poco a poco va reemplazando a la tradicional basada en sistemas u órganos como principal objeto de estudio de dicha enfermedad. No sería de extrañar que en un futuro cercano los tumores dejen de clasificarse en relación con el órgano que afectan y pasen a denominarse en función de la anormalidad genética subyacente, lo que permitirá, aparte de una individualización del diagnóstico, una aproximación al tratamiento más efectiva.

A la vista de lo anteriormente expuesto se podrían enumerar los objetivos específicos de la imagen molecular: 1. Ayudar a comprender los procesos celulares a nivel molecular en entornos intactos; 2. Desarrollar nuevas técnicas de imagen; 3. Visualizar la expresión génica y sus procesos asociados; 4. Estudiar la génesis y el desarrollo de enfermedades a nivel molecular; 5. Ayudar al diseño de nuevos fármacos; 6. Proporcionar una herramienta para la monitorización terapéutica; y 7. Desarrollar las bases del nuevo paradigma de imagen clínica molecular

mediante una aproximación multidisciplinar. El éxito de esta nueva disciplina depende en gran parte de la aceptación que pueda tener fuera del entorno en el que se está fraguando, fundamentalmente en aquellos campos de la ciencia en los que tradicionalmente se ha trabajado con métodos *in vitro* y en los cuales el salto a la técnica *in vivo* supondría un cambio cualitativo importante. Las claves para asegurar el éxito de esta transferencia radican en la capacidad de desarrollar sistemas de imagen suficientemente sensibles, sondas reporteras con el máximo grado de especificidad que sea posible alcanzar, y métodos de amplificación para los casos en los que la sensibilidad sea baja. La alta especificidad de la sonda debe traducirse en un «lavado» de la misma fuera de las áreas de interés de forma que en el momento de hacer la imagen el contraste sea el máximo. Esto implica que las especificaciones que deben ser exigidas a dicho trazador, muchas veces más estrictas que para diseñar un fármaco, han de incluir aspectos de toxicidad y de facilidad de atravesar las barreras fisiológicas que encuentre entre el torrente sanguíneo y la célula diana. Estas condiciones suelen cumplirlas con mayor facilidad los trazadores utilizados en la PET dado que se basan en moléculas «naturales» y no en agentes quelantes de átomos metálicos, por lo que su efecto farmacológico puede ser controlado más fácilmente. Todos estos aspectos serán tratados con más detalle en las siguientes secciones.

## MODALIDADES DE IMAGEN

### Imagen con radioisótopos

La medicina nuclear ha sido desde sus orígenes una técnica de imagen intrínsecamente molecular y en la actualidad su uso clínico está ampliamente extendido. Todas las técnicas de medicina nuclear (gammagrafía de proyección plana, SPECT —tomografía por emisión de fotón único— o PET) son suficientemente sensibles (pueden detectar concentraciones nano y pico molares) como para poder ser utilizadas en estudios a nivel tisular, celular e incluso genético, aún cuando su resolución espacial y temporal es muy baja. De las tres técnicas, la PET es la que mejores características presenta para su explotación en la inves-

tigación biomédica. Mientras que la gammagrafía plana y la SPECT utilizan isótopos en cuya desintegración emiten un solo fotón de radiación gamma, en PET se utilizan dos rayos gamma resultado de la aniquilación de un positrón y un electrón, siendo este positrón la partícula emitida por isótopo inestable en el proceso de desintegración. Al disponer de dos rayos gamma que se emiten en la misma dirección pero en sentidos opuestos, para la determinación de la dirección de dichos rayos se puede hacer uso de la denominada colimación electrónica en vez de usar colimadores físicos (los habitualmente utilizados en gammagrafía y SPECT) que deterioran notablemente 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. Estos isótopos se pueden utilizar para reemplazar átomos estables en una molécula, obteniendo de esta forma un trazador, como por ejemplo puede ser la  $^{18}\text{F}$ FDG (fluoro-2-deoxi-D-glucosa), uno de los más comúnmente utilizados en imagen clínica. El trazador, una vez inyectado en el sujeto sigue su proceso metabólico hasta alcanzar una distribución en el organismo, momento en el cual se hace la captación de datos y la generación de la imagen. Puesto que los isótopos utilizados en PET ( $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ ) han de generarse en ciclotrones, y dado que sus períodos de semidesintegración son cortos (el más largo entre los mencionados es el del  $^{18}\text{F}$ , 109 minutos), es necesario generarlos y procesarlos *in situ*. Este es el aspecto que hace que uso de la PET sea más complicado y caro que la SPECT, dado que la instalación de un ciclotrón y de una radiofarmacia, así como su mantenimiento y la dotación de personal especializado para explotarla suponen unos gastos elevados cuya amortización requiere una planificación cuidadosa.

La formación de imagen mediante la técnica PET empieza por la detección de los rayos gamma generados a partir de la desintegración del par positrón-electrón. Por tratarse de rayos gamma de alta energía la técnica más comúnmente empleada utiliza cristales de centelleo para la conversión de esa radiación en luz, seguida de una conversión fotón-electrón realizada mediante tubos fotomultiplicadores, que son unos dispositivos electrónicos que amplifican la tenue señal del centello hasta niveles que el sistema electrónico puede tratar. Dado que en la aniquilación positrón-

electrón se generan dos rayos gamma, la detección en coincidencia de estos pulsos en detectores opuestos determina la denominada línea de coincidencia, y mediante un proceso de ordenación de estas líneas en función de su localización espacial se obtienen los sinogramas. Estos sinogramas así generados constituyen los datos de partida para el procedimiento matemático denominado reconstrucción tomográfica, del que se obtiene como resultado final las imágenes. Aunque esta técnica de formación de imagen es conceptualmente sencilla, no está exenta de problemas que complican el proceso de cuantificación en la imagen final. Por ello es necesario integrar en el cálculo de la reconstrucción procedimientos para corregir estos efectos, entre los que destacan la dispersión del rayo gamma producida en el propio objeto, o más importante, la atenuación. Sólo con la adecuada corrección de estos efectos se puede conseguir una cuantificación fiable en la imagen final. Una limitación de la técnica PET que no tiene la SPECT es que no pueden usarse dos trazadores con distintos isótopos simultáneamente, pues dado que el proceso de generación de los rayos gamma es el mismo, independientemente de la energía inicial de cada positrón, al ser los rayos gamma de igual energía no es posible distinguir el isótopo de procedencia de cada rayo. Sin embargo en la técnica SPECT la energía del rayo gamma depende exclusivamente del isótopo utilizado y es distinta para cada uno de ellos; mediante el uso de ventanas de energía que seleccionan uno u otro rayo gamma si se pueden separar las procedencias y por lo tanto realizar estos estudios multitrazador. De ahí el interés que existe por desarrollar la técnica de imagen SPECT con mejor resolución y sensibilidad: en los últimos años han aparecido instrumentos dedicados para animales que incorporan tecnologías especiales que optimizan estos parámetros.

## **Tomografía de rayos X**

La tomografía por rayos X (CT) en pequeños animales ha supuesto una importante avance en las técnicas de imagen molecular dado que con resoluciones del orden de las decenas de micras y tiempos de adquisición en el rango de los minutos, aporta unas imágenes anatómicas de gran valor en estudios de expresión génica y caracterización de fenotipos, aparte de las convencionales aplicaciones de exploración de la

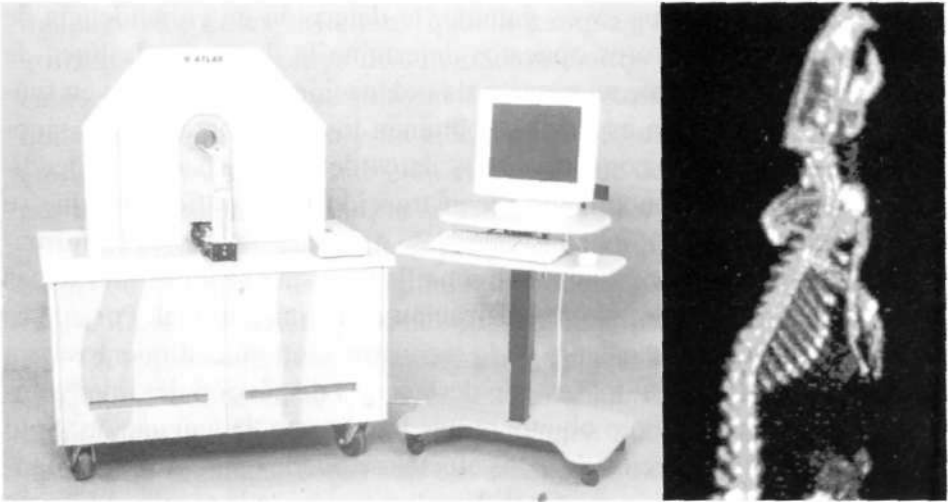


FIGURA 2. Izquierda: ATLAS, sistema PET de alta resolución para animales de laboratorio desarrollado en los National Institutes of Health, USA. Las principales características del sistema son: módulos con doble centelleador (tecnología «phoswich»); sensibilidad del 1.8% para un campo axial de 20 milímetros, alta resolución (1.3 mm con reconstrucción iterativa). Estas prestaciones, consideradas como las más avanzadas según el estado de la técnica actual, permiten al sistema producir imágenes como la que se presenta a la derecha; se trata de una rata de 325 gramos inyectada con isótopo  $^{18}\text{F}$ , que es un marcador óseo. Proyección tridimensional sagital del volumen completo reconstruido mediante técnicas iterativas 3D.

población y monitorización del tratamiento. Podría decirse que no es una técnica de imagen molecular en el estricto sentido de la definición, pero la tomografía de rayos X ha demostrado ser una herramienta importante 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 otra imagen corregistrada, normalmente de menor resolución espacial. Conseguir que esta técnica se convierta en un verdadero método de imagen molecular depende de la posibilidad de desarrollar trazadores 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 utilizan una fuente de rayos X de baja energía y foco pequeño, y como

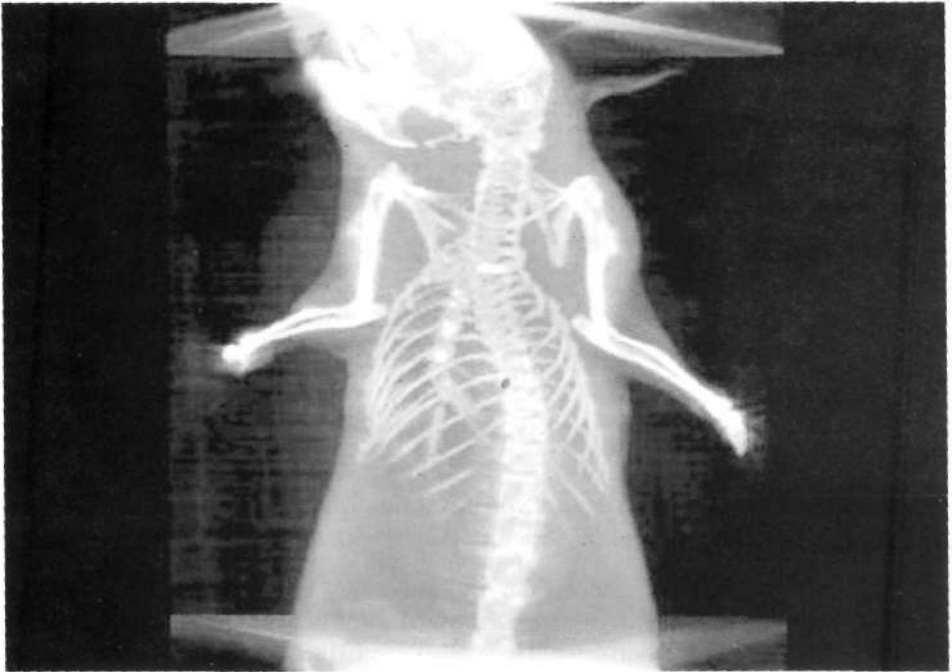


detector un dispositivo de área (en vez de lineal, como ocurre en los sistemas de humanos), constituyendo el conjunto fuente-detector una geometría de haz de cono (*cone-beam*) que permite explorar el volumen entero en tiempos muy cortos (en sistemas comerciales entre 15 y 30 minutos para resoluciones de 50 $\mu$ m y 100 $\mu$ m respectivamente), si bien es preciso utilizar métodos de reconstrucción especialmente adaptados a este tipo de proyecciones.

Como contrapartidas de la imagen de rayos X cabe mencionar por un lado el bajo contraste que presentan las imágenes en tejidos blandos, lo que hace necesario el uso de contrastes inyectados en aplicaciones en las que se preciso delimitar el órgano bajo estudio, y por otro la dosis de radiación ionizante a la que expone la muestra, que no es despreciable y que limita el número de exploraciones que se pueden hacer en un mismo sujeto.

### **Imagen de resonancia magnética**

La imagen de resonancia magnética (IRM) se basa en la medida de determinadas características físicas de los núcleos de espín no entero, principalmente de hidrógeno (protones), que en presencia de un campo magnético (normalmente impuesto por un imán de gran intensidad y homogeneidad) generan una magnetización neta en la muestra. Las diferencias en los entornos moleculares de esos protones así como la abundancia de los mismos determinará el contraste de una imagen en función de una secuencia de pulsos electromagnéticos aplicados a la muestra. Estos pulsos serán gradientes de campo magnético y pulsos de radiofrecuencia sintonizados de tal forma que resuenen con la frecuencia característica de precesión de los protones, frecuencia que a su vez es función de la intensidad del campo magnético principal que genera la magnetización neta. La capacidad de registrar información anatómica, funcional e incluso química (la espectroscopia mediante resonancia magnética es una técnica que mide la concentración de metabolitos contenidos en un punto de la muestra) permite obtener imágenes multimodales que intrínsecamente están alineadas en el espacio (registradas), lo que quiere decir que de una misma estructura se pueden obtener



*FIGURA 3. Tomografía de rayos X: Proyección volumétrica de la reconstrucción tomográfica cónica de un ratón. Nótese en los segmentos superior e inferior el artefacto típico de estas geometrías. El prototipo desarrollado en el Hospital GU Gregorio Marañón de Madrid utiliza un detector de semiconductor para la generación de imagen, y un tubo microfoco como fuente de rayos X: se pueden llegar a conseguir reconstrucciones del cuerpo entero del ratón con resoluciones volumétricas de 50  $\mu\text{m}$ , voxel isotrópico.*

simultáneamente varias medidas que corresponden al mismo punto, lo que constituye una herramienta poderosa para la investigación. Las resoluciones que se pueden llegar a conseguir van a ser función del equipo y de la secuencia utilizada, y para la obtención de imagen microscópica (10  $\mu\text{m}$  de resolución) son necesarios instrumentos especializados de alto campo, con bobinas captadores de la señal especialmente diseñadas para cada aplicación.

Si bien la resolución espacial puede llegar a ser muy alta, la resolución temporal se ve comprometida en los estudios de IRM: aunque el desarrollo de secuencias ultra rápidas ha sido importante en los últimos años, resolución espacial, relación señal a ruido y resolución temporal

son tres parámetros que compiten entre sí obligando a sacrificar al menos uno de ellos en el diseño de una determinada secuencia para un experimento.

Entre las múltiples aplicaciones que tiene esta técnica cabe destacar, aparte de la imagen anatómica, estudios de cuantificación espectroscópica, de farmacocinética, de permeabilidad y difusión de agua, o incluso medidas de pH. También se han desarrollado agentes de contraste inteligentes que en presencia de una determinada enzima se activan o se desactivan, cambiando las propiedades paramagnéticas del entorno en el que se encuentran.

Sin embargo, a pesar de ser una técnica muy sensible en la diferenciación visual de tejido blando, la principal limitación que presenta en estudios de imagen molecular es su relativa baja sensibilidad, del orden de mili a micromolar para medida de concentración metabolitos. Esta baja sensibilidad hace necesario el desarrollo de mecanismos de amplificación que permitan aumentar la señal; para ello se utilizan cationes metálicos convenientemente quelados, o incluso nanopartículas superparamagnéticas. El desarrollo de estos agentes de contraste constituye un área de investigación tanto básica como clínica.

De todas las variantes de la técnica de IRM aquí presentadas, la que mayores posibilidades ofrece en aplicaciones de imagen molecular tal vez se a espectroscopia, que ha demostrado poder identificar la presencia de determinados transgenes en tumores, así como expresión génica en modelos de desordenes neuromusculares en ratones.

## **Imagen óptica**

La técnica de imagen óptica es probablemente la más extendida en la investigación biomédica para su uso *in vitro* y *ex vivo* debido a su sencillez y a su bajo coste. Existen una amplia disponibilidad de preparados o *kits* de laboratorio para realizar experimentos de bioluminiscencia y fluorescencia de diversos tipos con múltiples aplicaciones sobre todo en microscopía. Sin embargo su aplicación *in vivo* has estado siem-

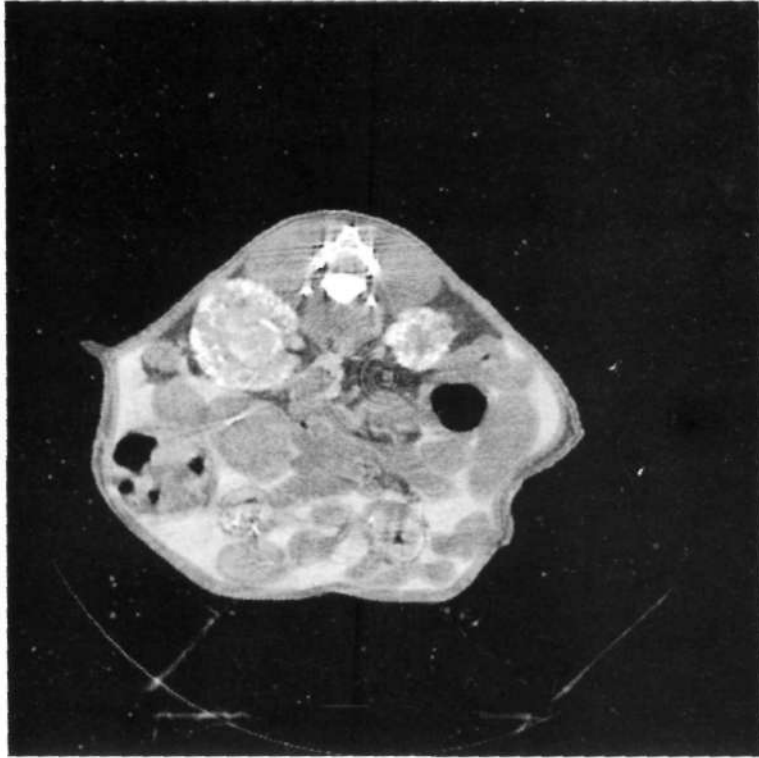


FIGURA 4. Tomografía de rayos X: Corte axial abdominal de un modelo de ratón con riñón poliquístico «oprk» originado por una mutación insercional. La imagen está realizada con el sistema microCT y usando contraste IP, inyectado 30 minutos antes de la realización de la exploración. La presencia de quistes origina una distribución desigual de contraste entre ambos riñones. Imagen cortesía del Dr. M. Paulus, Oak Ridge National Laboratory, USA.

pre limitada por los condicionantes que imponen las propiedades físicas del tipo de radiación luminosa empleada, que va desde el ultravioleta hasta el infrarrojo cercano. Aún así, en los últimos años han aparecido técnicas como la tomografía de coherencia óptica, que permite realizar imágenes tomográficas con resoluciones en el rango de las decenas de micras. Junto a esta alta resolución la imagen óptica también presenta la ventaja de tener una alta resolución temporal pues la mayoría de las técnicas en este campo son capaces de proporcionar imágenes en tiempo real.

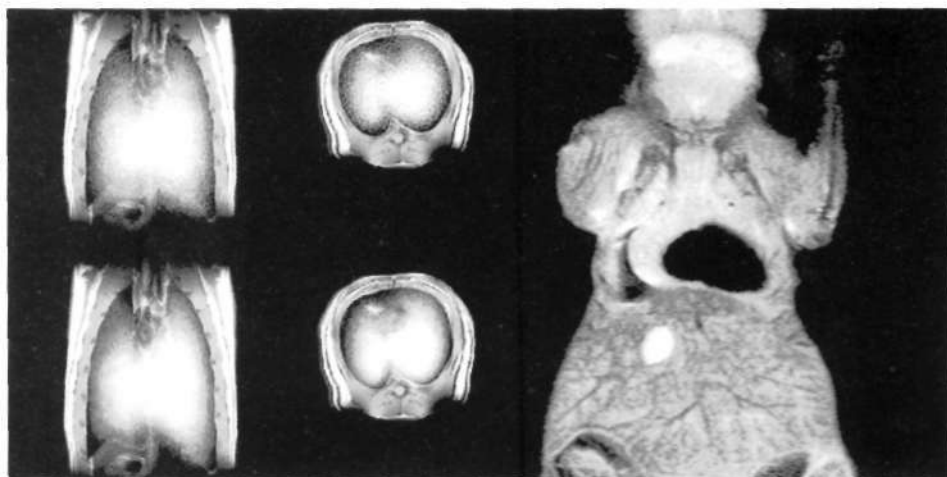


FIGURA 5. Imagen de resonancia magnética. Izquierda: Superposición de imágenes de pulmón de rata normal, de espín eco potenciada en T1 como referencia anatómica, y de una imagen de  $^{19}\text{F}$  (arriba) y otra de  $^3\text{He}$  (abajo). Estos contrastes se utilizan para visualizar la cavidad pulmonar, que en condiciones normales no produce señal alguna de RM. Ambas adquisiciones se realizaron con una secuencia rápida especialmente diseñada para este experimento (COMSPIRA) con una selección radial, matriz de  $128 \times 128$  y TE de 250 microsegundos. Derecha: Uso de la IRM en la caracterización del fenotipo: imagen adquirida con una secuencia de eco de espín rápida potenciada en T2. Se observa el tino sobredimensionado en un modelo de ratón noqueado. Imágenes cortesía del Prof. Ruiz-Cabello, Grupo de RMN del Instituto de Estudios Biofuncionales, Universidad Complutense de Madrid.

Trasladar la imagen óptica a la experimentación in vivo no esta exenta de complicaciones, y los avances más significativos han venido por parte de las nuevas sondas y los mecanismos que incorporan para generar fotones de luz que de alguna manera recojan información sobre el proceso bajo estudio. Así pues es posible disponer de sondas basadas en proteínas de fluorescencia en el rojo, fluorocromos activables, sondas bioluminiscentes, o combinaciones de ellas que funcionando en diferentes zonas del espectro permiten ser utilizadas para la realización de imágenes multicanal *in vivo*.

Las complicaciones técnicas a las que antes se hacia referencia radican en la dificultad que presenta la detección de la luz emitida en el interior del organismo vivo bajo estudio, dado que independientemente

de los desarrollos y los grandes avances que se han logrado en el diseño de detectores, el tejido biológico presenta una cierta opacidad en las longitudes de onda de la radiación utilizada. Precisamente gracias al desarrollo dispositivos muy sensibles tipo CCD (*charged coupled devices*, dispositivos acoplados en carga) se han podido transferir técnicas en principio solo viables en cultivos celulares a animales en vivo, si bien es verdad que en la mayoría de los experimentos con animales se prefiere utilizar ratones transgénicos del tipo «desnudo» cuya piel resulta especialmente transparente a las longitudes de onda utilizadas.

Los mecanismos habitualmente más utilizados son la fluorescencia y la bioluminiscencia. Dado que en la fluorescencia la emisión de luz está estimulada por luz y no se origina como consecuencia de una reacción química, el tejido de interés deberá contener una sustancia que absorba la luz de excitación y que como resultado genere una nueva emisión. Lógicamente la excitación ha de ser capaz de atravesar todos los tejidos intermedios hasta llegar al lugar de interés, y la emisión generada deberá ser capaz de llegar al exterior del cuerpo para poder ser detectada. Normalmente cuando se diseñan estas sondas se procura que las emisiones se localicen alrededor del infrarrojo cercano (NIR, *near infrared*), dado que en esas longitudes de onda (de 700 a 900 nm aproximadamente) la penetración en el tejido biológico es mayor al no interferir con sustratos endógenos: De aquí el creciente interés en el desarrollo de sondas y contrastes con fluorescencia en el NIR. Como contrapartida el ruido de fondo en estas imágenes puede ser significativo cuando aparecen fenómenos de autofluorescencia. En este punto conviene recalcar la diferencia entre esta técnica de fluorescencia en NIR y la imagen de transmisión NIR, que se basa en la atenuación y dispersión diferencial de la radiación NIR en el tejido en función de su composición; la aplicación clínica más conocida es la detección de determinados tipos de tumor de mama.

Otro mecanismo de producción de luz de interés es la bioluminiscencia. En este caso la producción de luz es resultado de un proceso biológico que normalmente se habrá asociado a la función que se esté estudiando: la luz la produce el propio sujeto. 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, la luciferina, interactúa con la enzima luciferasa, y en el proceso de oxidación de esta última se produce la emisión de fotones de luz. La gran ventaja de esta técnica es que al no disponer el animal bajo estudio de un sustrato endógeno para la luciferasa, no existe ruido de fondo, lo que hace que la relación señal a ruido sea muy alta permitiendo la visualización de grupos celulares de tan solo un millar de células. La bioluminiscencia tiene como desventaja frente a la fluorescencia la necesidad de incorporar el sustrato para que se produzca la emisión.

Existe aún otro mecanismo más interesante, el mediado por fotoproteínas (complejos estables de luciferina y luciferasa), que han demostrado ser de gran valor en la investigación del calcio mensajero intracelular. Una de estas fotoproteínas, la denominada GFP (*green fluorescence protein*) acepta energía en forma de fotones de luz violeta (395 nm) (que pueden provenir de una reacción de bioluminiscencia o de una fuente de radiación externa), y reemite otros fotones en una longitud de onda mayor (509 nm). Esta proteína tiene un gran valor en la investigación genética puesto que se puede usar como indicador de función y de expresión: añadiendo el gen de la GFP a otros genes, funcionan como reporteros de la expresión del gen al que se han asociado dada la facilidad con la que se visualiza esa fluorescencia verde. Existen variantes, como la EGFP, con mayor longitud de onda de excitación y que produce del orden de 35 veces más emisiones.

En párrafos anteriores se ha hecho referencia a los avances en el desarrollo de la tecnología de CCDs, que es la base instrumental de esta modalidad de imagen molecular. Si bien aquí no se pretende profundizar en aspectos técnicos relacionados con la instrumentación, si es conveniente hacer un breve repaso al estado de la técnica. El dispositivo electrónico CCD convierte la radiación fotónica en carga eléctrica, que convenientemente tratada acaba siendo una imagen digital. Este dispositivo ha pasado en pocos años de ser un instrumento científico a ser un bien de consumo utilizado en cámaras fotográficas y de video, en la industria automovilística o incluso en juguetes, de forma que su producción masiva ha abaratado sensiblemente los costes. Al mismo tiempo se ha conseguido aumentar la sensibilidad: la radiación luminosa que llega

al dispositivo es de poca energía, y por lo tanto la carga eléctrica producida es pequeña. Si esta carga es de una magnitud similar al ruido electrónico intrínseco del dispositivo (la denominada corriente de oscuridad, que no es más que la señal que produce el CCD cuando no está siendo iluminado por ninguna fuente, y que es función directa de la temperatura a la que está el dispositivo), entonces se hace indistinguible y por lo tanto el sistema electrónico digital lo tratará como ruido de fondo, no generando imagen. Por esta razón, en los sistemas de bioluminiscencia el dispositivo CCD se enfría mediante sistema de refrigeración de diversa índole con el fin de bajar su corriente de oscuridad hasta niveles tales que permitan detectar señales mínimas procedentes de la muestra. No por esto el instrumento deja de ser sencillo: sea cual sea el procedimiento de refrigeración elegido, el sistema completo consiste tan solo en una cámara oscura en la que se coloca la muestra y el detector CCD, más el sistema informático que la controla y procesa los datos hasta generar la imagen. De esta forma los niveles de trazador detectables con estos métodos son mínimos, llegando a sensibilidades del orden de décimas de picomol por mililitro; esta sensibilidad junto con su gran resolución temporal y su bajo coste hacen que esta técnica sea muy atractiva como método de ensayo rápido y económico de nuevas hipótesis y modelos. En las técnicas de fluorescencia NIR el detector CCD no ha de ser tan sensible, pero al sistema de hay que añadirle una lámpara de excitación, normalmente de luz visible, que estimule la fluorescencia.

Estas técnicas no están exentas de problemas que pueden restringir su uso. Probablemente la limitación más seria sea la transmisión de la radiación a través del tejido biológico. Se calcula de por cada centímetro de tejido la señal se reduce en un orden de magnitud; además, esta atenuación y la dispersión asociada no es constata y uniforme, y depende del tejido (la piel y los músculos presentan la menor atenuación) y de la longitud de onda de la luz. Además la presencia de oxihemoglobina y deoxihemoglobina cambian notablemente estos parámetros. Esta limitación en la profundidad impone serias restricciones a la posibilidad de hacer estudios tomográficos, razón por la cual estos sistemas generan imágenes de proyección planar, lo que a su vez restringe la posibilidad de realizar estudios cuantitativos. No obstante, hay trabajos en los que



mediante el uso de excitaciones especiales y conjuntos de detectores colocados alrededor de la muestra, se consigue realizar imagen tomográfica de fluorescencia con resoluciones de 3 milímetros aproximadamente.

Una **última** desventaja que es también consecuencia de la limitada penetración de la radiación luminosa, es la difícil aplicación de estas técnicas en estudios con humanos dado el mayor grosor de los órganos y tejidos.

## Ultrasonidos

De todas las técnicas comentadas hasta el momento, esta es la única que no hace uso de radiación electromagnética para la formación de la imagen. La técnica de ultrasonidos utiliza ondas acústicas que al atravesar los diferentes tejidos, producen ecos que son detectados y procesados, extrayendo de ellos una serie de características mecánicas de la muestra explorada. De esta forma, y utilizando ultrasonidos de muy alta frecuencia (en el rango de los 40 a los 60 MHz), se pueden realizar imágenes en pequeños animales con muy alta resolución, entre 15 y 40  $\mu\text{m}$ , dando lugar a lo que se denomina 'biomicroscopía por ultrasonidos'. Por tratarse de **una** técnica no invasiva que no utiliza radiación

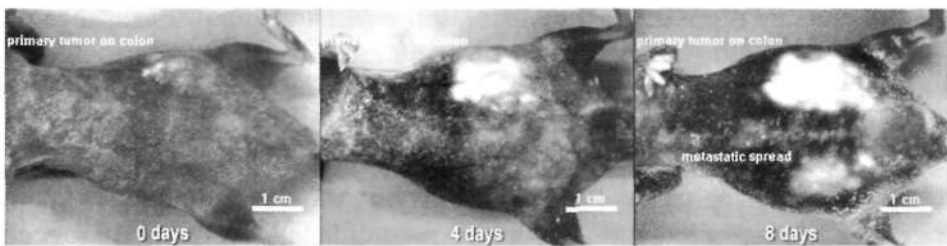


FIGURA 6. Monitorización del crecimiento de un tumor de colon mediante imagen de fluorescencia. El tumor inoculado al ratón contiene células que expresan GFP, y por lo tanto van a producir fluorescencia tanto en el tumor primario como en las metástasis que se produzcan. La secuencia muestra la evolución del tumor en un mismo sujeto a lo largo de 8 días. Las zonas brillantes son las de mayor concentración de células tumorales que expresan la GFP. Imágenes cortesía del Dr. Hoffman, AntiCancer Inc., USA.

ionizante, puede emplearse en el estudio del desarrollo embrional, de la angiogénesis tumoral y en general en el estudio del desarrollo tumoral, aparte de las aplicaciones habituales en estudios de función cardiaca o circulatoria y microcirculatoria mediante el uso del Doppler, o como herramienta para la monitorización de intervenciones quirúrgicas *in vivo*.

Otra ventaja adicional que tiene la biomicroscopia de ultrasonidos frente a otras técnicas de imagen es su capacidad para presentar imágenes en tiempo real, lo que permite realizar estudios funcionales de una forma sencilla y económica. A esto se añaden los recientes avances en el diseño de agentes de contraste, que se pueden dividir en dos grandes grupos: intravasculares, como son las microburbujas de perfluorocarbono o aire encapsuladas en *un* polímero que se destruye al ser expuesto a los ultrasonidos, y que abren un amplio abanico de aplicaciones centradas principalmente en el estudio de la microvascularización y flujo sanguíneo, lo que representa una herramienta de enorme utilidad en estudios de revascularización en la monitorización de terapias antiangiogénicas. El otro grupo de contrastes, aunque principalmente también intravasculares, son los dirigidos a receptores de membranas celulares. Estos contrastes utilizan nanopartículas ligadas al marcador que modifican las propiedades mecánico-acústicas del tejido al que se ligan. Estos contrastes abren nuevos campos a la investigación y el uso de los ultrasonidos como técnica de imagen molecular.

## **Multimodalidad**

Si bien la fusión de dos modalidades de imagen no se debería considerar como una técnica diferente por sí misma, 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. Para corregistrar estudios (poner en correspondencia espacial uno a uno todos los puntos de los distintos volúmenes que representan las diferentes modalidades) es necesario eliminar las diferencias de tamaño, posicionamiento, orientación o incluso distorsión espacial entre ellos. El proceso consiste en una búsqueda de la transformación geomé-

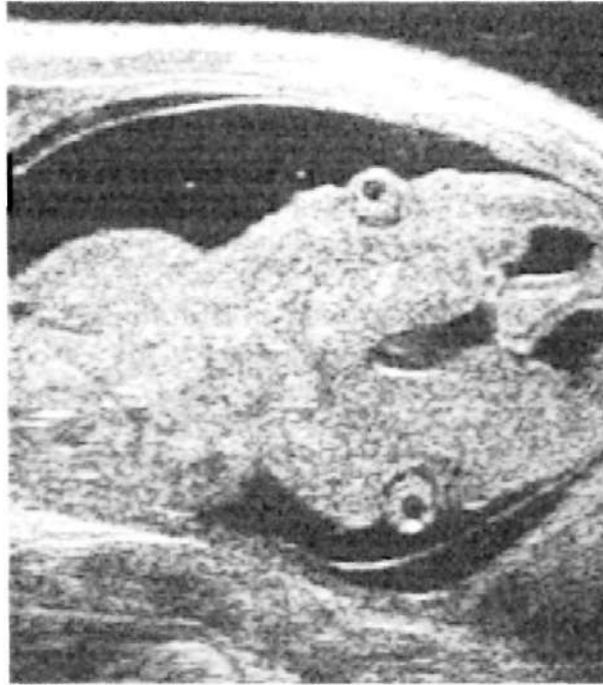


FIGURA 7. Imagen de la cabeza un feto de ratón in vivo mediante la técnica de biomicroscopía por ultrasonidos. La resolución espacial de estas imágenes adquiridas en tiempo real puede ser de hasta 30  $\mu\text{m}$ . La naturaleza no invasiva de esta técnica permite al neurobiólogo estudiar el desarrollo embrionario y neonatal en un mismo espécimen. Imagen cortesía de VisualSonics, Inc, Canadá.

trica necesaria para poner las dos imágenes en concordancia y aplicación de esa transformación a uno de los 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, y se emplean los términos intramodalidad e intermodalidad según sean estudios de la misma o diferentes modalidades, así como intra e intersujeto según provengan del mismo o de distintos sujetos.

Aparte de estas técnicas informáticas para realizar la imagen multimodalidad, en los últimos años se ha desarrollado sistemas que integran en un solo dispositivo al menos dos modalidades, como por ejemplo el PET-CT, el SPECT-CT o incluso la IRM-PET. Ya están disponibles

versiones comerciales de sistemas PET-CT destinados al uso con humanos; los principales argumentos a favor de estos dispositivos son al posibilidad de hacer las dos exploraciones intrínsecamente registradas, en un tiempo mínimo, y sin necesidad de trasladar al paciente. Aparte de esto, la técnica PET se beneficia del uso del CT como una medida de atenuación de mejor calidad que la que realiza el PET, y por lo tanto se supone que esta corrección de atenuación, paso imprescindible para lograr una buena cuantificación en el estudio PET, será mucho más precisa. Algo similar está ocurriendo en la instrumentación de imagen molecular para pequeños animales de laboratorio: si bien no existen equipos disponibles comercialmente, son varios los grupos de investigación que se están aventurando a integrar dos e incluso tres modalidades en un solo sistema. Estos sistemas ofrecerán nuevas posibilidades al investigador que podrá desarrollar y caracterizar sondas de imagen y cuantificar sus parámetros con mucha mayor precisión de lo que se puede hacer actualmente, y lo que tal vez sea más importante, estos sistemas permitirán una mejor interpretación de los datos.

## APLICACIONES

Si bien es cierto que la potencialidad de estas técnicas de imagen molecular abren un amplio abanico de posibilidades, la aplicación estrella se encuentra en los estudios relacionados con la genética, bien sea en la caracterización de fenotipos, en la monitorización de terapias con sondas génicas, o en la propia terapia génica. En la actualidad 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 con especímenes vivos no resulta tan trivial, dado que aparecen una serie de nuevos condicionantes que obligan a resolver problemas de biocompatibilidad, sensibilidad y facilidad de transporte, entre otros. Algunos autores plantean este problema en forma de preguntas generales que suponen verdaderos retos: ¿Qué proceso se quiere visualizar, cuales son las dianas?; ¿Cómo se puede llegar a ellas de una forma eficiente? 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 aumentar esta 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. Cada una de estas preguntas merecería un tratamiento en profundidad más allá del apunte que aquí se hace, especialmente el diseño de sondas para imagen.

Con excepción de la espectroscopia mediante RM, el resto de las modalidades funcionales (sin considerar aquella información funcional que pueda derivarse del análisis de imágenes de ultrasonidos o de tomografía de rayos X) obtienen el contraste dependiendo de la presencia y concentración de una sonda. Existe una amplia variedad de sondas (moleculares, reporteras, inteligentes, nanopartículas, activables, etc.) pero todas 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 IRM o técnicas ópticas, el segmento reportero o generador de señal suele ser grande (una proteína de fluorescencia, o un átomo con propiedades paramagnéticas) y por lo tanto su presencia en la sonda puede limitar la función de la misma; en técnicas nucleares, por el contrario, este segmento se limita a un isótopo, que en caso de la PET apenas modifican la molécula original pues se trata tan solo 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 las sondas fluorescentes o de IRM pueden diseñarse de tal forma que solo se activen cuando interactúen con sus dianas, incluso se han construido sondas para IRM que pueden encenderse o apagarse según este presente o no un determinado compuesto.

Otro aspecto importante a tener en cuenta en el diseño de sondas es su especificidad: cuanto mayor sea esta, 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 lo que se pretende visualizar es un proceso fisiológico o cuando se monitoriza la evolución de una patología en estados más avanzados. Independientemente de esta especificidad el problema del ruido de fondo 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. Esta es una de las razones por las cuales las sondas activables e inteligentes han cobrado especial relevancia, sobre todo en técnicas ópticas: previamente a su hibridación, un fluoroforo unido covalentemente a un segmento de ADN se coloca en las cercanías de un apagador (*quencher*) que impide la fluorescencia, del cual se separa una vez hibridado y como consecuencia de esta separación se inicia la fluorescencia. Mecanismos similares basados en proeasas (captasinas y capasas) están siendo objeto de investigación, con resultados prometedores hasta el momento. También son esperanzadores los avances logrados mediante bioluminiscencia dado que al generar la emisión de luz mediante un procedimiento puramente químico y sin necesidad de que exista una estimulación luminosa externa, los problemas de autofluorescencia que pueden generar ruido de fondo son bastante menos probables.

Independientemente de la especificidad de la sonda, esta tiene que llegar a sus dianas, y por lo tanto deberá tener unas propiedades farmacocinéticas tales que permita alcanzar concentraciones mínimas 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 otra droga, y por lo tanto, si en la distribución se encuentra con barreras infranqueables, su atrapamiento no es específico, o su excreción es demasiado rápida, su utilidad será dudosa. Este es uno de los mayores problemas con los que se encuentran las sondas de IRM dado que los átomos metálicos utilizados suelen ser grandes, y por lo tanto van a tener dificultades para atravesar la membrana celular. Una nota adicional en cuanto a la afinidad de una sonda en su uso con

receptores: aún cuando la afinidad sea alta y su comportamiento farmacocinético adecuado, puede darse el caso de que el contraste alcanzado no sea el adecuado debido a la no existencia o disponibilidad del suficiente número de receptores o a la propia cinética de aclarado en el espacio intersticial; este es un claro ejemplo en el que las técnicas comúnmente aplicadas *in vitro* (lavado del resto no ligado) no son válidas para el experimento *in vivo*.

Otra de las cuestiones planteadas al principio de esta sección eran los posibles mecanismos de amplificación: aumentar la cantidad de señal en su mismo origen es fundamental para obtener la mayor sensibilidad posible; dado que el número de dianas en el ADN de una célula es limitado, se han desarrollado técnicas denominadas *downstream* en las que la diana no es el ADN o, el mRNA, sino las proteínas por ellas codificadas; la abundancia de estas puede llegar a ser dos ordenes de magnitud mayor. De forma análoga se puede lograr cierto grado de amplificación usando como diana los receptores que expresa la célula. Todas estas diferentes técnicas podrán utilizarse dependiendo del sistema bajo estudio.

## **Expresión génica y fenotipo**

La expresión génica en un fenotipo es la consecuencia del proceso de producción de proteínas codificadas por un determinado gen. Es el ADN del gen quien, mediante la indexación los tripletes de bases que definen un aminoácido, codifica la estructura de la proteína y por lo tanto su función final. El proceso de síntesis de la proteína comienza en el núcleo de la célula con una transcripción en un RNA mensajero, el mRNA. que una vez que ha salido al citoplasma dirige la síntesis de las proteínas en los ribosomas mediante un proceso de traslación. Las proteínas pueden ser catalizadoras de reacciones intracelulares, en cuyo caso se las llama enzimas, pueden encargarse de la señalización o pueden dar estructura a la célula. La expresión de un determinado gen en la forma de síntesis de una proteína es una de las funciones que se pretende visualizar mediante las técnicas de imagen molecular. En muchos casos este gen no es uno 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 ADN 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 también va necesitar la mediación de un gen reportero; una técnica muy habitual en medicina nuclear es la que hace uso de receptores, 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: si el agente de contraste es sustrato para esa enzima y el producto resultante queda atrapado en el citosol, se habrá conseguido el marcaje. Estas técnicas indirectas (la basada en receptores y la basada en enzimas) integran un proceso de amplificación intrínseco, dado que si el primer producto de la expresión

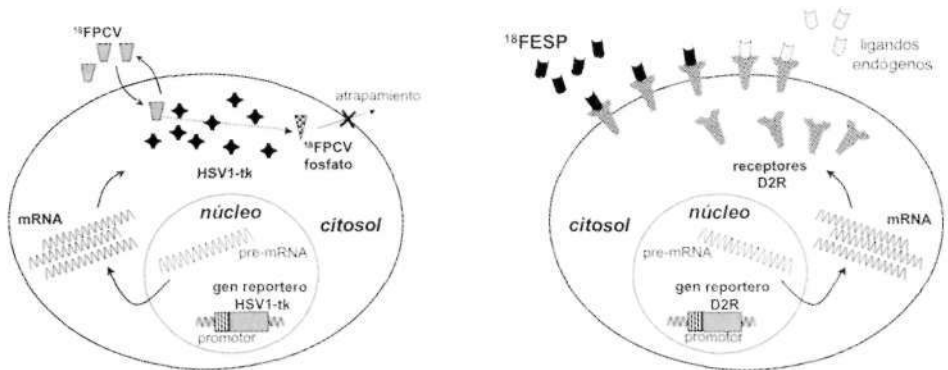


FIGURA 8. Ejemplos de mecanismos usados en imagen de expresión génica. Izquierda: Imagen PET mediada por enzimas. En este ejemplo el  $^{18}\text{F}$ -fluoropenciclovir ( $^{18}\text{FPCV}$ ) actúa como sustrato y es fosforilado por la timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV1-tk), quedando entonces atrapado en el interior de las células que estén expresando dicho gen. Derecha: Imagen PET mediada por receptores:  $^{18}\text{FESP}$  es un ligando que interactúa con receptores de dopamina tipo D2R. Si una célula expresa el gen del D2R, en su superficie dispondrá de estos receptores a los que se ligará la sonda, quedando por lo tanto marcada. En ambos casos se utiliza un adenovirus (AdCMV-HSV1-tk) para mediar el transporte del gen al núcleo de la célula.



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. Sin embargo la dificultad es mayor cuando se busca diseñar un reportero similar para IRM. En este caso lo que se pretende alterar son las propiedades paramagnéticas de la molécula, para lo cual se recurre a átomos de metales; estos iones metálicos, generalmente de gran tamaño, son más complejos de conducir a las dianas, y en algunos casos en los se ha conseguido alterar determinados receptores para que presenten una mayor afinidad a iones de hierro, el propio sistema de regulación celular actúa de forma que impida una alta acumulación de dicho ion. Este es en la actualidad un campo de investigación muy activo.

El uso de sondas ópticas *in vitro* es un área más explorada dado que el uso de proteínas fluorescentes es una técnica bastante extendida en los laboratorios de biología molecular. El principal obstáculo con el que se ha encontrado la transferencia a estudios *in vivo* es la poca penetración de la radiación luminosa antes referida, y por lo tanto restringe la técnica a experimentos en los que el sistema bajo observación se encuentre a unos pocos milímetros por debajo de la piel. No obstante ha sido en el campo de la imagen óptica donde se han conseguido importantes avances en el desarrollo de este tipo de sondas, como por ejemplo la visualización de procesos promovidos por catepsina, una enzima importante en el estudio de las metastagénesis.

## **Desarrollo de nuevas tecnologías**

La aplicación de las técnicas de imagen molecular a la investigación biomédica y su transferencia a la clínica es un área relativamente nueva en la que hay una intensa actividad, acelerada principalmente por la disponibilidad de nuevas tecnologías de detección y reconstrucción de imágenes, que durante los últimos años han permitido mejorar considerablemente tanto la resolución como la sensibilidad de estos métodos. Esta batería de nuevas herramientas facilita la rápida validación de

múltiples sondas de imagen para distintas modalidades. La maduración de estos procedimientos en el área de investigación tiene como consecuencia la rápida transferencia a la clínica, paso no exento de dificultades técnicas que requiere a su vez de nuevos desarrollos que hagan viable el uso de la nueva metodología con humanos.

Uno de los campos más activos en cuanto a aplicaciones se refieren es la oncología, debido entre otras razones al amplio número de dianas de interés para el estudio de este tipo de patologías. El desarrollo de sondas se centra en aplicaciones de visualización de angiogénesis, ciclo celular, apoptosis, factores de crecimiento, 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, si bien recientes desarrollos en IRM están abriendo nuevas oportunidades a esta técnica. Los sistemas multimodales (combinaciones de dos o más de estas tecnologías) se empiezan a abrir paso, inicialmente con la combinación de la PET y la tomografía de rayos X: en la actualidad todos los grandes fabricantes de equipos de imagen médica ya cuentan con esta versión de multimodalidad en sus catálogos. Tal vez el área en el que los usuarios detecten un desarrollo tecnológico más lento es en el área de imagen óptica, en donde la transferencia a la clínica no está siendo tan evidente principalmente debido a la no existencia de un método tomográfico. Así como los últimos avances en técnicas de muy alta resolución y sensibilidad para PET de animales encuentran una vía rápida de transferencia a su equivalente humano, las técnicas ópticas no están teniendo el mismo éxito.

Para concluir, mencionar el hecho de que el desarrollo de la imagen molecular está dando origen a un nuevo perfil profesional que basado en la formación pluridisciplinar ha de manejar aspectos que provienen de campos muy distintos de la ciencia, y de cuya conjunción aparece esa sinergia que da su valor particular a la imagen molecular. Ahora más que nunca, el papel del bioingeniero trabajando junto con biólogos moleculares, fisiólogos, químicos o físicos, empieza a cobrar una especial relevancia, situación a la que no deberían estar ajenos organismos

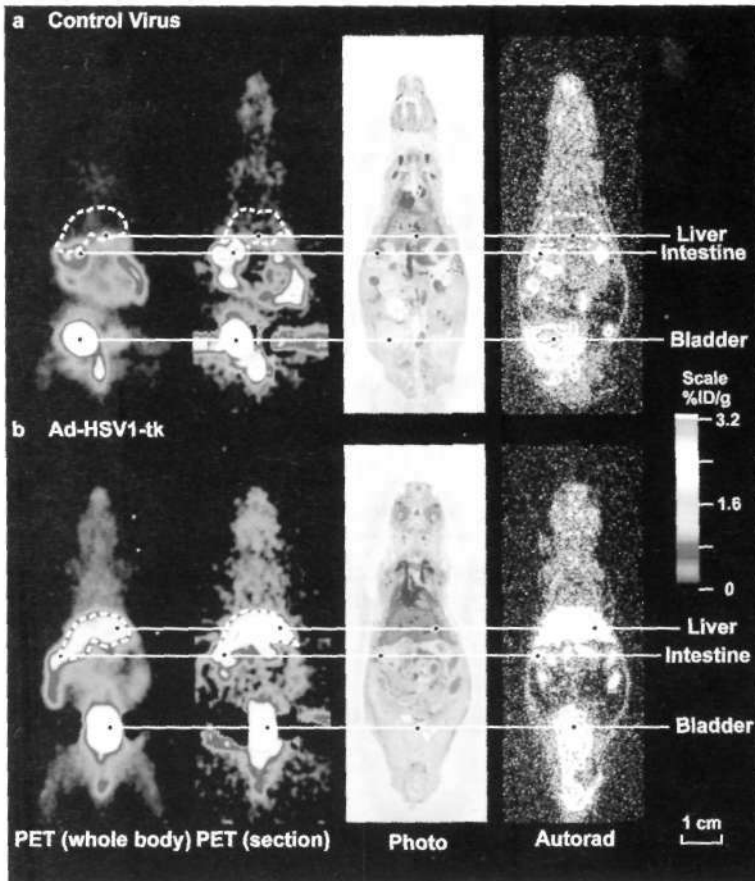


FIGURA 9. Imágenes de expresión génica realizadas con un PET dedicado comparadas con la imagen de autorradiografía (secciones de 45  $\mu\text{m}$ ) y con la fotografía del corte anatómico correspondiente. Se presentan imágenes en corte coronal con la cabeza del animal en la parte superior de la imagen. La región de interés delimitada en las imágenes se corresponde con el hígado. Los ratones fueron inyectados con  $1.5 \times 10^9$  pfu de virus control (panel superior) y la misma cantidad de virus AdCMV-HSV1-tk (panel inferior). Cuarenta y ocho horas después se suministraron entre 80 y 130  $\mu\text{Ci}$  de FGCV. Imágenes cortesía del Prof. S.S. Gambhir, UCLA, USA.

y entidades responsables de proporcionar los medios y cauces para facilitar la formación de este nuevo perfil profesional. El nuevo paradigma que brinda la imagen molecular abre unos horizontes de posibilidades para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad que apenas acaban de empezar a ser explorados.

## REFERENCIAS

- M. Desco, editor: Número especial sobre PET, *Revista de la Real Academia de ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, vol. 96, núm. 1-2. 2002
- M.G. Pomper; Molecular Imaging: and Overview. *Academic Radiology*, vol. 8. num. 11. pag. 1141-1153. 2001
- 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.
- C. Nichol, E.E. Kim. Molecular Imaging and Gene Therapy, *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 42. num. 9. pag. 1368-1374. 2001.
- 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.
- 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.