

INSTITUTO DE ESPAÑA  
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

# LA ERA DE LA IMAGEN

DISCURSO DEL  
EXCMO. SR. D. SEBASTIÁN CERDÁN GARCÍA-ESTELLER

LEÍDO EN LA SESIÓN DEL DÍA 28 DE ABRIL DE 2016  
PARA SU INGRESO COMO ACADÉMICO DE NÚMERO

Y CONTESTACIÓN DE LA  
EXCMA. SRA. DÑA. MARÍA CASCALES ANGOSTO



Madrid, 2016





**INSTITUTO DE ESPAÑA  
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA**

# **LA ERA DE LA IMAGEN**

**DISCURSO DEL  
EXCMO. SR. D. SEBASTIÁN Cerdán GARCÍA-ESTELLER  
LEÍDO EN LA SESIÓN DEL DÍA 28 DE ABRIL DE 2016  
PARA SU INGRESO COMO ACADÉMICO DE NÚMERO**

**Y CONTESTACIÓN DEL  
EXCMA. SRA. DÑA. MARÍA CASCALES ANGOSTO**



MADRID - 2016

Editado por Sebastián Cerdán,  
ISBN: 978-84-944103-2-1, Depósito Legal: M-2647-2016

---

Impreso en Realigraf S.A., Pedro Tezano 26, 28039 Madrid

## INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	5
PREÁMBULO.....	9
INTRODUCCIÓN.....	11
El sistema visual en los mamíferos superiores.....	12
El espectro electromagnético.....	14
Historia de la imagen médica.....	17
LA IMAGEN BIOMÉDICA ACTUAL.....	25
Características generales de las imágenes médicas.....	25
Tomografía de emisión de positrones (PET).....	27
Tomografía de emisión de fotón único (SPECT).....	31
Rayos X.....	33
Imagen óptica.....	36
Fluorescencia.....	38
Sondas fluorescentes.....	40
Biomarcadores genéticos.....	40
Biomarcadores de síntesis.....	42
Fluorescencia por Resonancia de Transferencia de Energía (FRET)	42
Bioluminiscencia.....	44
Ultrasonidos.....	45
Resonancia Magnética.....	48
Imagen híbrida.....	58
EPÍLOGO.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	65
CONTESTACIÓN DE LA EXCMA. SRA. DÑA. MARIA CASCALES ANGOSTO.....	79



## **AGRADECIMIENTOS**

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia,  
Excmos. Sres. y Sras. Académicos de Número,  
Ilmos. Sres. y Sras. Académicos Correspondientes,  
Sras. y Sres.,  
Amigos todos;

Hoy cumple dar lectura a mi discurso de ingreso como Académico de Número en la Real Academia Nacional de Farmacia, algo que siempre deseé, pero que nunca creí poder llegar a alcanzar. Ciertamente, no hubiera podido hacerlo solo, y si hoy me encuentro ante Uds. aquí, no es solo por mis modestos méritos, sino principalmente por el gran apoyo que he recibido de todos los Académicos de la corporación, muy especialmente de aquéllos que avalaron mi candidatura, la Dra. María Cascales Angosto, el Dr. Antonio Doadrio Villarejo y la Dra. María Teresa Miras Portugal.

Sin duda es necesario, hoy en especial, resaltar aquí sus trayectorias, pues constituyen el más preciado aval de mi recorrido científico. La Dra. María Cascales dirigió mi tesis doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, entonces bajo la égira del Prof. Ángel Santos-Ruiz, constituyendo mi primer contacto con la incipiente ciencia española de la época. Su constante esfuerzo por superar las habituales situaciones de carencia y su dedicación intensiva al quehacer científico, marcaron mi carrera, alertándome desde muy pronto, sobre las dificultades que entrañaba la ciencia en nuestro país. El Dr. Antonio Doadrio Villarejo, fue mi admirado compañero en los cursos de la licenciatura en Farmacia, forzándome a realizar largas jornadas de estudio, para emular sus logros académicos. Su búsqueda de la excelencia académica constituyó siempre un verdadero estímulo para mí, enseñándome desde el principio que no hay progreso sin esfuerzo. La Dra. María Teresa Miras Portugal, formó parte del Departamento donde me eduqué y su influencia sobre mi fue tan grande, que hoy no se podría comprender mi inclinación a la Neuroquímica, sin su contribución. Su influjo sobre mí, excedió con mucho los aspectos meramente científicos, revelándose como una verdadera tutora intelectual, cuyos pasos seguí discretamente, en la distancia, desde los comienzos de mi carrera. Los tres han influido

sobre mí sobremanera, y sin duda, configuran una parte muy importante del trayecto vital que hoy me trae a la Real Academia Nacional de Farmacia.

Quiero recordar hoy a aquellos Académicos que me precedieron en la medalla número treinta y que hoy no están ya entre nosotros. Mi consideración y respeto al Prof. Manuel Lora-Tamayo, egregio químico orgánico y político eficaz, que configuró una parte importante del sistema educativo español, consolidando la estructura del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, la institución a la que me honro en pertenecer. Mi reconocimiento especial también, al Prof. José Luis Vila Jato, insigne Catedrático de Farmacia Galénica en Santiago de Compostela y pionero de las formulaciones nanofarmacéuticas. Las contribuciones de ambos impresionarían al científico más afianzado y me hacen sentir hoy, como un pequeño estudiante al lado de sus maestros; cuya luz clarificadora ayudará, sin duda, a guiar mis pasos en el futuro.

Deseo agradecer también, a todos los que me ayudaron a desarrollar mi actividad. En primer lugar, mis compañeros y profesores de Facultad, muchos de los cuales forman hoy parte de esta Academia. Sin sus enseñanzas y compañerismo, no hubiera progresado en la convulsa Universidad de la época, ni sería hoy la persona que soy. A mis profesores de investigación, nacionales e internacionales. En primer lugar a la Dra. María Cascales, que guió elegantemente mi doctorado y mis primeros pasos en la investigación. Concluido el doctorado, debo especial gratitud al Prof. Roberto Parrilla y la Dra. Matilde Sánchez-Ayuso, quienes abrieron para mí las puertas de una carrera en Biofísica Médica en la Universidad Autónoma de Madrid y en el CSIC, y a los Profs. John R. Williamson de la Universidad de Pennsylvania y Joachim Seelig, de la Universidad de Basilea, que me permitieron contribuir a los desarrollos de frontera de la bioquímica física del momento. Más concretamente, el Prof. Williamson, estudiante avanzado de Sir Hans Krebs, me enseñó a interpretar el metabolismo intermediario utilizando isótopos enriquecidos en carbono-13 y resonancia magnética de carbono-13, en los albores de esta técnica. El Prof. Seelig, discípulo de Manfred Eigen, por su parte, me abrió las puertas de la espectroscopía “in vivo” y de la imagen por resonancia magnética, cuando muy pocos grupos de investigación en Europa podían utilizar esta técnica. Debo especial gratitud también al Prof.

Manuel Rico, quien me permitió utilizar el espectrómetro de alto campo del CSIC, y me enseñó los fundamentos de la espectroscopía RMN. Todos ellos me enseñaron a buscar la excelencia científica sin importar el esfuerzo ni el tiempo involucrado, ni las penurias asociadas de toda índole. Muy particularmente, les agradezco sus consejos para mantener siempre en lo más alto el rigor científico y para no fragmentar el conocimiento adquirido en pequeñas porciones, simplemente para obtener más publicaciones, como era la norma de la época. Esta filosofía ha presidido desde entonces mi desarrollo científico, se la debo a ellos y he intentado transmitirla a mis alumnos.

Deseo mencionar expresamente aquí a todos mis colaboradores y estudiantes, enalteciendo su respeto, dedicación y confianza, y resaltando que, aunque sin comentárselo directamente, su aprendizaje real era, muchas veces, yo mismo. No quiero olvidar a mis compañeros de laboratorio y amigos, especialmente a la Dra. María Ángeles Martín-Requero del CSIC, que siempre supo suplir mis deficiencias tanto con su valioso consejo, como con su siempre inestimable ayuda. Debo mencionar también aquí, al Prof. Luis Martí-Bonmatí del Hospital La Fe de Valencia, que me enseñó como interaccionar mejor con el mundo de la Radiología Clínica, apoyándome siempre a nivel nacional e internacional, haciéndome participar en sus numerosas iniciativas y facilitándome, siempre, su incondicional y valioso apoyo.

Mi especial gratitud a mi familia, mis padres, hermanos y sobrinos que siempre supieron disculpar con elegancia, mis frecuentes ausencias y mi dedicación excesiva al quehacer científico. De todos ellos aprendí, ya de niño, que es mejor guardar silencio, que verbalizar un comentario inapropiado. Finalmente, quiero agradecer especialmente a mi esposa, la Prof. Paloma Ballesteros, por ser, simplemente como es. Sin su ayuda no hubiera sido capaz, ni siquiera, de comenzar mi carrera. Sin sus innumerables renunciadas a sí misma en mi favor, o sin su apoyo técnico en los muchos desarrollos químicos que ha contribuido, no hubiera podido continuar muchas veces mi labor científica, y muy seguramente, ninguno de nosotros estaría aquí hoy.



## PREÁMBULO

He decidido titular mi discurso de ingreso como “La Era de la Imagen”, no solo porque la imagen biomédica constituye un aspecto central de mi actividad actual, sino porque además, pocos descubrimientos y desarrollos científicos han influido más en nuestra civilización actual durante los últimos años. En efecto, la imagen representa, hoy en día, una parte muy importante en todas nuestras vidas, abarcando todas sus facetas sociales; desde el periodismo, a la política, a la moda, a las relaciones personales y como no, a las ciencias básicas y la medicina. De hecho, muchos de Uds. convendrán conmigo que nuestra sociedad actual está basada más en lo que ve, en la “apariencia”, que en la verdadera realidad, a menudo mucho más difícil de descubrir e interpretar. Por ello, conviene comenzar resaltando que, al examinar cualquier imagen resulta muy importante, distinguir el “polvo” de la “paja”, identificando su verdadero contenido y significado, muchas veces distanciado del aparente mensaje obvio. Muy frecuentemente, la cruda realidad se oculta ante nuestros ojos tras un manto de oscura apariencia, que puede llegar a enmascararla completamente y producir sobre nosotros una impresión final, intencionadamente equivocada. En este contexto, adquieren aquí especial relevancia, las palabras que escribió Miguel de Cervantes para Sancho Panza, en su novela Don Quijote de la Mancha:

*“Mire vuestra merced –respondió Sancho– que aquellos que allí se aparecen no son gigantes, sino molinos de viento, y lo que en ellos parecen brazos son las aspas, que, volteadas del viento, hacen andar la piedra del molino.”*

Por ello, resulta siempre recomendable hacer un especial acopio de objetividad para interpretar cualquiera de las imágenes que nos ofrece la realidad, prestando suma atención, no solo al material que muestran, sino, muy especialmente al que encubren, y todas, créanme, encubren algo, en mayor o menor medida.



## INTRODUCCIÓN

*“Todas las cosas deberían hacerse lo más simple posible, pero no más simples.”*

*Albert Einstein*

La imagen es la representación visual de un objeto mediante técnicas diferentes de diseño, pintura, dibujo, fotografía o cine. Particularmente, nuestra sociedad actual se fundamenta en imágenes y todo aquello que no podemos representar con una imagen, o no existe virtualmente, o resulta mucho más difícil de comprender, y de transmitir. La imagen constituye, por tanto, un vasto campo del conocimiento científico que incluye especialmente, durante los siglos XX y XXI, las imágenes asociadas al diagnóstico médico. He decidido, centrar mi discurso en estas últimas, porque su utilización ha revolucionado la medicina actual, visualizando no-invasivamente la morfología y funcionalidad de los tejidos internos del cuerpo humano, y proporcionando una colección de nuevas herramientas diagnósticas, cuyos fundamentos rara vez resultan conocidos para los que las utilizan. Más aún, el desarrollo de la imagen médica moderna se encuentra imbricado con los progresos en nuestra comprensión sobre la estructura de la materia, con el desarrollo de la electrónica digital y la computación, y con los avances en biología y genética molecular, lo que permite proporcionar, a través de la imagen, una descripción integrada del progreso conjunto de nuestro conocimiento en todas estas áreas.

Comenzaré por describir brevemente la formación de imágenes en nuestro sistema ocular, un proceso que subyace a la percepción del resto de las imágenes. Después presentaré la naturaleza del espectro electromagnético, que constituye el origen físico de todas las imágenes que observamos, y las características básicas de las imágenes, proporcionando una visión histórica de su desarrollo. Finalmente, describiré muy brevemente los fundamentos y aplicaciones de las técnicas de imagen biomédica más utilizadas en la actualidad. En todos los casos, intentaré proporcionar una descripción divulgativa, fácilmente accesible a todos los asistentes, evitando muchas de las complejidades físicas y matemáticas que subyacen a todos los

procesos de imagen. Disculparán, por tanto, los muchos especialistas del auditorio en este campo, si mi discurso les parece simplificado en demasía, pues busca más una panorámica general y divulgativa de los procedimientos de imagen biomédica, que una descripción profunda y detallada de cada uno de ellos.

Por desgracia, la tradición de la Academia en la lectura del discurso de ingreso de un nuevo académico, no permite la utilización de ilustraciones al mismo, lo que no me permitirá alcanzar hoy el detalle gráfico que desearía, omitiendo de la presentación, precisamente, las imágenes y el soporte gráfico. Sin embargo, los asistentes podrán encontrar toda esta información complementaria en la monografía del discurso impreso que les proporcionarán al final de mi lectura, en la salida de esta estancia.

## **El sistema visual en los mamíferos superiores**

Quizá convenga comenzar recordando el mecanismo de obtención de imágenes por nuestro sistema ocular, ya que este aspecto subyace a todas las imágenes que discutiremos más adelante y constituye la base de nuestra percepción del mundo exterior.

Las imágenes que ven nuestros ojos, son el resultado de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia, constituyendo para nosotros la representación gráfica de la realidad, detectada por nuestra retina y procesada de manera muy compleja y complementaria, en diversas zonas de nuestro cerebro (Prasad y Galetta, 2011). El proceso de elaboración de imágenes en nuestros ojos, recuerda mucho al principio de la “cámara oscura”. Brevemente, la luz pasa por la córnea, el humor acuoso, el cristalino y el humor vítreo. Todas estas estructuras refractan la luz de manera que excita los fotorreceptores de la retina. Este proceso se llama “enfoque”, y es llevado a cabo, principalmente, por la córnea y el cristalino. La luz llega entonces enfocada a la retina, donde es recibida por las células fotorreceptoras, los conos y los bastones. En ellas, se transforma en potenciales de acción que viajan por su membrana hasta alcanzar los botones sinápticos. A partir de aquí, los impulsos se transmiten por las células bipolares a los ganglios y de estos a los nervios ópticos hasta alcanzar la fisura calcarina del lóbulo occipital del cerebro, donde se reproduce la imagen captada por la retina planarmente, activando un

grupo especializado de neuronas. Los nervios ópticos se encuentran “decusados” en el quiasma óptico, con el ojo izquierdo inervando la corteza visual derecha y viceversa. La imagen formada en la retina está invertida, sin embargo el procesamiento cerebral de esta imagen, que involucra varias estructuras cerebrales, la hace aparecer erecta en nuestra percepción.

En la retina, los bastones detectan en blanco y negro los bordes de los objetos, mientras que los conos reproducen el color a través un sistema RGB (Red-Green-Blue), con células específicas sensibles a cada uno de estos colores (Fu y Yau, 2007; Weale, 1971). En general, las células fotorreceptoras, se distribuyen heterogéneamente en la retina, con una disposición concéntrica alrededor de la fovea que determina el patrón de activación de las neuronas de la corteza visual. Se conoce que la corteza visual tiene una organización columnar, activando neuronas en correspondencia con la imagen retiniana (Hubel y Wiesel, 1979; Ohki et al., 2005; Reid, 2012; Schmolesky, 1995). Sin embargo, el mecanismo de percepción óptica es mucho más complejo que la simple excitación de la corteza visual, con la profundidad determinada por la interacción entre las señales derivadas de ambos ojos y la identificación de los objetos y su movimiento, proporcionada por diversas estructuras temporales profundas, muchas de ellas asociadas a la memoria (Peelen y Downing, 2007; Quian Quiroga, 2015).

Mucho se ha progresado en los mecanismos moleculares de la fototransducción (Chen, 2005; Mannu, 2014). Brevemente, la cascada de la fototransducción se inicia en la rodopsina, formada por una molécula de opsina y una de 11-*cis* retinal. Existen diversos tipos de retinal, con diferentes máximos de absorción, y también diversas moléculas de opsina. Estas modulan su absorción, por lo que es posible excitar la rodopsina resultante de su combinación, con diversas longitudes de onda, generando así la sensibilidad al color del sistema visual. Un fotón produce la isomerización de 11- *cis* retinal a “todo *trans* retinal”, que al liberarse de la opsina expone su sitio catalítico. La opsina es, entonces, capaz de unirse a otra proteína transmembrana, la transducina, intercambiando su GDP “unido”, por GTP “libre”. Este proceso repetido, genera dos unidades de transducina-GTP que son capaces de liberar las dos subunidades  $\alpha$  de la fosfodiesterasa, activándola, produciendo GMP a partir del c-GMP circundante. Este es

el proceso crucial de la fototransducción, pues permite cerrar los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de GMP e hiperpolarizar la membrana del fotorreceptor, que transmite la señal en forma de potencial de acción y liberación de neurotransmisores.

## El espectro electromagnético

Todas las imágenes se derivan de interacción de la radiación electromagnética con la materia, lo que ha originado que el desarrollo de las imágenes esté íntimamente relacionado con nuestro progreso en el conocimiento de la estructura de la materia. Así, la energía y la longitud de onda de la radiación de excitación determinan las características generales de las imágenes obtenidas, tras su registro mediante un sistema de detección adecuado (Hendee y Ritenour, 2002a).

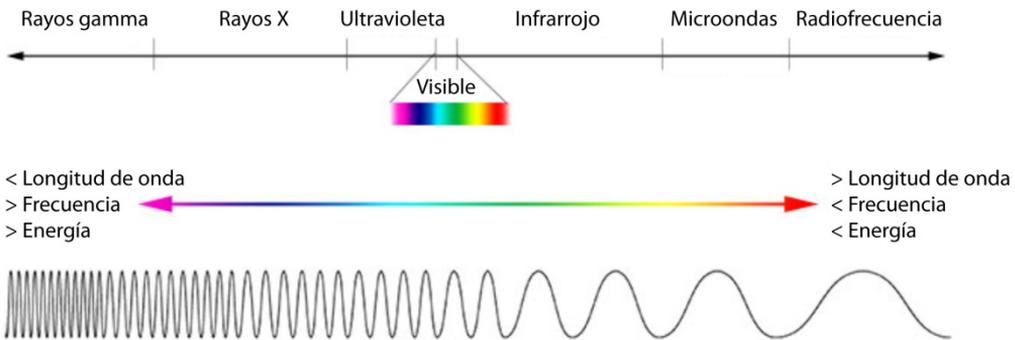


Figura 1. El espectro electromagnético. Adaptado de <http://imagine.gsfc.nasa.gov/science/toolbox/emspectrum1.html>.

Fue muy posiblemente Newton quien descubrió por primera vez, en los siglos XVII-XVIII, el espectro electromagnético al darse cuenta de que la luz se descomponía en una paleta de colores al atravesar un prisma de cuarzo o difractarse a través de las gotas de agua en un día soleado y húmedo (Puff, 2008). Su descubrimiento constituyó la piedra angular de la espectroscopía, pero quedaba limitado entonces, tan solo a la luz visible. En la actualidad, conocemos que existe un espectro mucho más amplio de radiación electromagnética que abarca desde los rayos cósmicos y la radiación nuclear, con longitudes de onda muy cortas, hasta la radiación de radiofrecuencia y la calorífica, con longitudes de onda muy largas, la radiación visible ocupando una franja

central muy estrecha del mismo. Por tanto, la realidad que observan nuestros ojos es una pequeña parte de la que nos rodea y la observación del resto del espectro involucra la transformación de las imágenes de la radiación correspondiente, en imágenes visibles por nuestros ojos.

Max Planck descubrió en 1905, en los albores de la Física cuántica, que la distribución de la energía en el espectro electromagnético no era continua, sino discreta, en niveles de energía cuantizados, separados entre sí por una cantidad fija de energía (Carson, 2000). La energía que separa los niveles está caracterizada por la expresión  $E=h\nu$ , donde  $h$  es la constante de Planck ( $h= 6,62607004 \times 10^{-34}$  J.s) y  $\nu$  la frecuencia. En la parte superior del espectro energético, se encuentra la radiación nuclear, con energías en el intervalo  $10^3$ - $10^6$  eV, asociadas a longitudes de onda de  $10^{-9}$ - $10^{-12}$  m. derivadas de la desintegración nuclear. Estas radiaciones pueden tener naturaleza particulada como las radiaciones alfa, o dual onda-partícula como los fotones gamma o la radiación beta. Los rayos X tienen energías entre  $10$ - $10^4$  eV, con longitudes de onda entre 0,01 y 10 nm asociadas a procesos de redistribución electrónica. En la parte media se encuentra la región ultravioleta/visible/infrarroja; con energías entre  $1$ - $10^3$  eV y longitudes de onda en el rango  $10^{-4}$  a  $10^{-8}$  m, asociadas a transiciones electrónicas ó vibracionales. Finalmente, en el extremo inferior de las energías, se encuentran las microondas, la radiofrecuencia y la radiación calorífica, con energías en el intervalo  $10^{-9}$ - $10^{-2}$  eV y longitudes de onda en el rango  $10^{-3}$ - $10^3$  m. Estas radiaciones incluyen las transiciones de espín electrónico, las ondas ultrasónicas de radar, y las transiciones de espín nuclear.

No es posible comprender el desarrollo actual de las técnicas de imagen sin mencionar su dependencia del desarrollo paralelo de la electrónica asociada a los detectores de la radiación espectral y el procesamiento de sus señales por los modernos computadores digitales (Loken y Williams, 1979; Mixdorf y Goldsworthy, 1996; Vasquez, 2009). La detección de las radiaciones, involucra generalmente la transformación de la radiación recibida por el detector en impulsos eléctricos capaces de ser procesados por computadores digitales. En este sentido, el fundamento de la generación de todas las imágenes que describiremos a continuación, es muy similar al que utilizan nuestros ojos y nuestro cerebro, con sistemas de recepción y

enfoque de la radiación, codificación en impulsos eléctricos y reconstrucción de la imagen observada a partir de la información obtenida.

La detección de las radiaciones de longitudes de onda medias y cortas, se basa en el efecto fotoeléctrico (Richardson y Compton, 1912). Este se describe como la propiedad de algunos metales de emitir electrones tras recibir la excitación por fotones, una explicación que valió el Premio Nobel a Albert Einstein en 1921. La corriente así generada por la radiación, puede ser amplificada, transmitida, digitalizada y procesada por un ordenador en forma de imagen. Las primeras fotocélulas, contenían el fotodetector y el ánodo encerrados en una lámpara de vacío, para favorecer la transferencia de electrones. La aparición de los diodos semiconductores supuso una gran revolución, permitiendo asociarlos a metales fotoeléctricos acoplados sobre soportes sólidos (Lukasiak and Jakubowski, 2010; Parker, 1970; Ter-Pogossian y Phelps, 1973). Este descubrimiento, valió el premio Nobel de Física en 1956 a Shockley, Brattain y Bardeen y permitió ampliar el registro a las radiaciones no visibles como la radiación gamma. Básicamente, los fotodiodos son semiconductores capaces de transformar la luz o radiación nuclear, en corriente eléctrica. Se basan en contactos pn, entre semiconductores p y n de silicio contaminados con impurezas como germanio o silicato de germanio, entre otros. Su funcionamiento se basa en el efecto electrónico interno. Cuando un fotón con suficiente energía golpea el fotodiodo, crea un “agujero electrónico” que se mueve en un campo eléctrico hacia el cátodo, mientras que los electrones se mueven hacia el ánodo, creando así la corriente eléctrica. Varios fotodiodos pueden colocarse en serie, constituyendo los diodos de avalancha, que amplifican enormemente la corriente generada por cada fotón y se utilizan en la mayor parte de los detectores de rayos gamma. El descubrimiento de los fotodiodos consiguió disminuir espectacularmente el tamaño de las fotoválvulas iniciales, permitiendo montar grandes cantidades de detectores sobre los dispositivos múltiples de detección que hoy se utilizan en casi todas las aplicaciones de imagen.

Las longitudes de onda en el rango de los ultrasonidos, utilizan detectores piezoeléctricos, donde las fluctuaciones en presión sonora se transforman en impulsos eléctricos, capaces de ser digitalizados y procesados por un ordenador (Qiu et al., 2015). Normalmente, se utiliza

el mismo material piezoeléctrico, para transmitir el impulso y recibir seguidamente el eco de ultrasonido, agrupando transmisión y recepción sobre transductores ultrasónicos integrados.

Finalmente, las radiaciones de radiofrecuencia, se detectan con antenas apropiadas, con geometría optimizada para detectar las radiaciones emitidas por los diferentes tejidos (Doty et al., 2007). Como en el caso de los ultrasonidos, se emplea muchas veces, pero no siempre, la misma antena para transmitir y recibir la señal de radiofrecuencia. La detección se basa en estos casos, en la inducción electromagnética descubierta por Faraday y Henry. Ambos descubrieron independientemente, que campos magnéticos variables en el tiempo, eran capaces de inducir una corriente eléctrica variable sobre una bobina y viceversa. En estos casos, las corrientes detectadas son muy pequeñas, y se amplifican, digitalizan y procesan en un ordenador para reconstruir la imagen como describiremos más adelante.

## **Historia de la imagen médica**

En esta sección he escogido, para mayor claridad, describir la historia de los diversos métodos de imagen intentando mantener los aspectos cronológicos en cada modalidad, lo que proporciona una descripción histórica de la misma. El lector podrá apreciar que el desarrollo de la imagen biomédica constituye una aventura científico-tecnológica sin posible parangón, jalonada por hasta veintidos premios Nobel, a través de los siglos XX y XXI (Tabla I).

La historia de la imagen médica comienza muy posiblemente con el descubrimiento de los rayos X por Wilhelm Roentgen en 1895 (Bradley, 2008). Este hallazgo se produjo durante uno de los encierros del Rector Roentgen (Figura 2A) en el laboratorio de su casa en Würzburg, para investigar las aplicaciones de los rayos catódicos (Assmus, 1995). Básicamente observó que los rayos catódicos generados en un tubo de Crooke's, hacían fluorescer una placa de cianuro de bario y platino localizada a cierta distancia, incluso cuando colaba una delgada placa de aluminio entre ambos. El 21 de Diciembre de 1895, invitó a su esposa a su laboratorio, y ambos obtuvieron la primera radiografía de la mano de Anna Bertha, donde se apreciaban

Tabla I

Relación de Premios Nobel relacionados con la imagen biomédica

Año	Premiados	Disciplina	Contribución
1901	Wilhelm Conrad Roentgen	Física	Rayos X
1903	Antoine Henri Becquerel, Pierre Curie, Marie Curie	Física	Radiactividad
1906	Joseph John Thompson	Física	Electrón
1908	Ernest Rutherford	Química	Radiactividad
1911	Marie Curie	Química	Radio y Polonio
1918	Max Karl Ernst Ludwig Plank	Física	Teoría cuántica
1921	Albert Einstein	Física	Efecto fotoeléctrico
1922	Niels Henrik David Bohr	Física	Teoría atómica
1929	Príncipe Louis Victor Pierre Raymond de Broglie	Física	Dualidad onda- partícula
1933	George de Hevesy	Química	Isótopos
1935	James Chadwick	Física	Neutrón
1936	Carl David Andersson, Victor F. Hess	Física	Positrón, Radiación cósmica
1939	Ernest Orlando Lawrence	Física	Ciclotrón
1944	Isidor Isaac Rabi	Física	RMN*
1952	Felix Bloch Edward Mills Purcell	Física	Espectroscopía RMN
1956	William Bradford Shockley, John Bardeen, Walter Houser Brattain	Física	Semiconductores, diodos y transistores
1979	Godfrey Newbold Hounsfield, Allan McLeod Cormack	Fisiología y Medicina	Tomografía Axial Computerizada
1991	Richard Ernst	Química	RMN Transformada de Fourier
2002	Kurt Wütrich, John Fenn, Koichi Tanaka	Química	RMN, Espectrometría de masas
2003	Paul C. Lauterbur, Sir Peter Mansfield	Medicina	MRI**
2008	Osamu Shimomura, Martin Chalfie, Roger Y. Tsien	Química	Proteína Verde Fluorescente

\*Resonancia Magnética Nuclear, \*\*Imagen por Resonancia Magnética

con claridad los huesos de las falanges y el anillo colocado en su dedo anular (Figura 2B). Su descubrimiento se extendió rápida y universalmente, y le valió el primer premio Nobel de Física otorgado en 1901, constituyendo así el comienzo de la era de la imagen médica.

Roentgen mostró que los rayos X, llamados así entonces por desconocer su origen, eran capaces de atravesar los tejidos humanos, diferenciando entre tejidos blandos, de baja absorción y tejidos duros, como el hueso, de alta absorción. Roentgen declinó realizar patente alguna sobre su invención, ni tampoco conceder su nombre a los rayos descubiertos, a pesar de lo cual, estos se conocen hasta hoy (en alemán) como *roentgenstrahlen*.

Su descubrimiento se comenzó a utilizar muy pronto, por los médicos italianos en la primera guerra mundial, para detectar las balas de plomo, en los soldados heridos en el frente de Etiopía. La utilización de los rayos X como herramienta diagnóstica se incrementó exponencialmente, utilizando tubos de rayos catódicos optimizados (Figura 2C), lo que disminuyó los tiempos de exposición desde los 12-30 minutos de las radiografías iniciales, hasta las fracciones de segundo actuales.

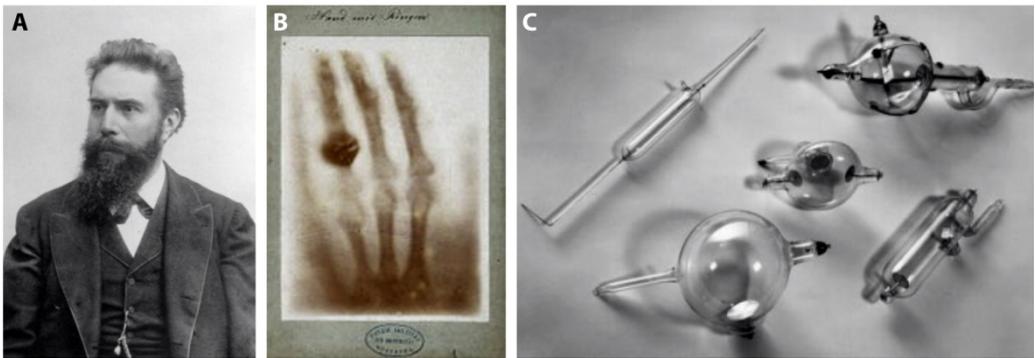


Figura 2. A: Wilhelm Roentgen, B: Primera radiografía de la mano de Anna Bertha Roentgen, C: Tubos de rayos catódicos utilizados por Roentgen para la generación de rayos X.

Este progreso se debió, no solo al incremento en la potencia de los tubos emisores de rayos X, sino al incremento constante y paralelo en la resolución de las películas fotográficas y pantallas fluorescentes

detectoras al principio y después en la detección digital de las imágenes de rayos X.

El descubrimiento del electrón por Thompson en 1897, y las teorías de Bohr y Rutherford sobre la estructura atómica, permitieron asociar más tarde los rayos X, a la radiación electromagnética emitida al reemplazar un electrón arrancado de los orbitales catódicos internos por uno de las capas externas. Thomson, Rutherford y Bohr, recibieron por sus descubrimientos el Premio Nobel de Física y Química en los años 1906, 1908 y 1922, respectivamente. Así, el descubrimiento seminal de los rayos X, precedió entonces a las teorías atómicas, constituyendo uno de los pocos premios Nobel concedidos a un hallazgo experimental sobresaliente, sin conseguir en su momento, proporcionar una explicación razonable sobre su origen, de ahí su nombre.

Los fundamentos de la resonancia magnética comenzaron en los Estados Unidos, cuando el físico de origen polaco Isidor Isaac Rabi, descubrió en la Universidad de Cornell hacia 1935, que los núcleos atómicos se comportan como imanes, presentando un momento magnético discreto cuya orientación se podía cambiar mediante un pulso de radiofrecuencia (Edelman, 2014). Su método de resonancia magnética de haces moleculares, constituyó la base de los relojes atómicos, el máser, y la resonancia magnética moderna en general, valiéndole el premio nobel de Física en 1941.

En 1945, Felix Bloch y Edward Purcell, de las Universidades de Stanford y Harvard, respectivamente, fueron capaces de detectar señales de resonancia magnética a 40 MHz en los protones de la parafina y del agua utilizando el método de Rabi, abriendo así la posibilidad de obtener espectros de resonancia magnética en la materia condensada. Su método fue denominado como Resonancia Magnética Nuclear, para distinguirlo del de los haces moleculares de Rabi y se publicó en sendos artículos de aproximadamente doscientas cincuenta palabras en la revista *Phys. Rev. Lett.*, valiéndoles el Premio Nobel de Física en 1952. Junto con Solomon, Bloembergen, Pound y Morgan sentaron las bases de la espectroscopía de relajación magnética cuya aplicación revolucionaría posteriormente los laboratorios de física, química y biología estructural.

En 1961, Godfrey Hounsfield perfeccionó los algoritmos de reconstrucción tomográfica diseñados por Radon en 1917, para reconstruir una imagen a partir de sus proyecciones, y construyó el primer prototipo de tomografía de rayos X. Se trataba de un tubo de rayos catódicos y un detector que giraban sobre el paciente, obteniendo diferentes secciones y proyecciones del mismo, que se podían reconstruir tomográficamente mediante su algoritmo. Su aportación permitió el desarrollo de la tomografía axial computerizada, por lo que recibió el premio Nobel en 1965 (Hounsfield, 1980).

La historia de la imagen por ultrasonidos puede remontarse al naturalista Lázaro Spalanzani, quien dedujo que los murciélagos utilizaban ultrasonidos para navegar mediante localización de ecos. Jean Daniel Colladon, consiguió probar en 1826, empleando dos campanas de iglesia, que el sonido se transmitía más rápidamente en el agua, que el aire, y René T.H. Laenec inventó, en 1819, la auscultación mediante estetoscopio comentando que;

*Dudo mucho que el estetoscopio llegue alguna vez a la práctica médica general, porque su utilización beneficiosa requiere mucho tiempo y da un buen número de problemas tanto al paciente, como al médico que lo practica.*

Claramente, Laenec no podía estar más equivocado sobre su descubrimiento, que forma parte en la actualidad de la instrumentación médica más utilizada. Pierre y Jacques Curie descubrieron en 1880 el efecto piezoeléctrico, base de los transductores ultrasónicos actuales. El hallazgo llevó al físico Jacques Langevin en 1912, poco después del hundimiento del Titanic, a diseñar el “hidrófono”, un instrumento que permitía detectar icebergs y submarinos durante la primera guerra mundial y al desarrollo del radar, con idénticas aplicaciones, durante la segunda guerra mundial. A esto siguieron los descubrimientos de Karl Dussik en 1942 en Viena, quien diseñó el primer aparato de ultrasonidos para detectar tumores cerebrales, George Ludwig, el internista que diseñó en 1948 un aparato de ultrasonidos para detectar “piedras” en la vejiga e Ian Donald, quien propuso en 1958 el primer aparato de ultrasonidos pulsados de utilidad general en obstetricia y ginecología (Levi, 1997; Schwan, 1994).

La primera imagen PET fue obtenida por Gordon L. Brownell en 1951, en el recientemente creado (entonces), laboratorio de Física, asociado al de Neurocirugía del Hospital General de Massachusetts (Brownell, 1999). Brownell propuso que la utilización de la energía de aniquilación, de los isótopos emisores de positrones, podría ser empleada para detectar tumores cerebrales. Su trabajo se publicó en el *New England Journal of Medicine* en 1951, desarrollando el primer prototipo de tomógrafo PET de coincidencia en 1952 y obteniendo la primera imagen PET de un tumor cerebral en 1953. Curiosamente, la imagen PET se mostraba entonces superpuesta sobre un dibujo, realizado con a lápiz y a mano alzada, de la cabeza del paciente, por no disponer aún de la posibilidad de superponerlo sobre una imagen de rayos X.

Los positrones son componentes nucleares de masa parecida al electrón, pero con carga positiva. Su existencia fue anticipada por Paul Dirac en 1928, detectándose en 1932 por el físico norteamericano Anderson, al fotografiar las trayectorias de los rayos cósmicos en su "cámara de niebla". La historia de la tomografía de emisión de positrones PET va unida al desarrollo de los trazadores emisores de positrones. Los primeros utilizados se basaban en  $^{15}\text{O}$ , porque el ciclotrón del Massachusetts General Hospital estaba basado en deuterio. Existían ciclotrones más poderosos en el Brookhaven National Laboratory, pero solo fueron accesibles a usuarios externos a mediados de los 70 del siglo XX, cuando resultó posible utilizar radiotrazadores de  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$  y  $^{18}\text{F}$ . Este último radioisótopo es actualmente el más utilizado, en su forma de  $^{18}\text{F}$ -2-deoxiglucosa, empleada para múltiples aplicaciones.

La imagen SPECT comenzó en 1963, con los experimentos de David Kuhl y Roy Edwards de tomografía de emisión (Jaszczak, 2006). Aunque los primeros intentos habían utilizado contadores Geiger-Müller para detectar simplemente la radiactividad superficial emitida por el radioisótopo, el descubrimiento de la cámara de centelleo Anger en 1958, permitió realizar las primeras imágenes de órganos de interés. El propio Anger desarrolló, ya en 1969, un tomógrafo longitudinal, capaz de detectar tomográficamente, secciones del objeto, de manera similar a la utilizada en la tomografía de rayos X de Hounsfield. Quizá convenga recordar aquí, que los desarrollos de PET y SPECT, permanecen aún sin el reconocimiento Nobel de la Academia sueca.

Posteriormente, Townsend, y colaboradores proporcionaron, ya en los años 90 del pasado siglo, un desarrollo posterior muy importante que permitió la superposición de imágenes PET y SPECT sobre imágenes de rayos X adquiridas del mismo objeto, proporcionando las primeras imágenes híbridas (Townsend, 2001; Townsend and Beyer, 2002). Su scanner híbrido permitía adquirir en la misma sesión imágenes PET y SPECT, deslizando el objeto sobre el tomógrafo de rayos X primero, y luego sobre el tomógrafo PET o SPECT, reconstruyendo la imagen de fusión de ambas posteriormente. Su descubrimiento abrió la época de las imágenes híbridas, hoy extendida a las tomografías PET/MRI.

En 1973 Paul Lauterbur describió la primera imagen de resonancia magnética, obtenida de dos tubos de agua, después de aplicar el método de Bloch y Purcell, pero esta vez en presencia de un gradiente de campo magnético, lo que le permitió codificar la posición de los dos objetos en el espacio, en función de la frecuencia y fase diferentes detectada para cada tubo (Lauterbur, 1973). Bautizó al nuevo método como “zeugmatografía” (del griego *zeugma*, “lo que une”). Variando la dirección del gradiente obtuvo diferentes proyecciones de los dos tubos, que originaron la imagen correspondiente después de aplicar un método de reconstrucción por proyecciones, que redescubrió por sí mismo, sin conocer los trabajos de Radon o Hounsfield. Casi simultáneamente, Raymond Damadian describió, aunque sin realizar imágenes, que los tumores presentaban propiedades de relajación magnética diferentes de los tejidos normales, abriendo así la aplicación de la RMN en el terreno diagnóstico (Damadian et al., 1973). El método Lauterbur de imagen RMN de “onda continua” fue perfeccionado por Richard Ernst en la Escuela Politécnica Federal de Zürich, quien utilizando su método de RMN pulsada y Transformada de Fourier obtuvo adquisiciones RMN más rápidas y evitó los artefactos de la reconstrucción por proyecciones (Kumar et al., 2011). En 1975, Peter Mansfield obtuvo en Nottingham, la primera imagen RMN de un dedo humano, desarrollando poco después la imagen súper-rápida y el cine por RMN (Mansfield and Maudsley, 1977). Ernst recibió el Premio Nobel de Química en 1991, por sus aportaciones a la espectroscopía de Resonancia Magnética por Transformada de Fourier, mientras que Lauterbur y Mansfield recibieron el Premio Nobel de Medicina en 2003, por las importantes repercusiones médicas de sus descubrimientos.

Finalmente, la imagen óptica es la que más lentamente se ha incorporado a la práctica médica no-invasiva (Mait, 2006). Aunque Euclides ya la describió en su libro *Catóptrica*, 300 años a.c., y las primeras gafas fueron desarrolladas en Florencia en 1270, su utilización diagnóstica se vio limitada por su escasa penetración en los tejidos animales y humanos, lo que por otro lado, había impulsado el desarrollo de las demás modalidades. Quizá su historia más reciente esté asociada a la fotografía. La primera fotografía permanente se atribuye a Joseph Nicéphore Niepce en 1826 o 1827, quien utilizó la cámara oscura para impresionar una película de betún disuelto en aceite de lavanda, secada antes de utilizarla depositada sobre una aleación pulida de estaño, plata y bismuto. Después de días de exposición, la película se endurecía proporcionalmente a la exposición, pudiendo lavar las partes menos endurecidas. Niepse murió repentinamente, dejando sus notas a Louis Daguerre, quien desarrollo la fotografía sobre sales de plata (ioduro de plata generado por la exposición de plata metálica a iodo). Daguerre realizó el descubrimiento central de que las imágenes obtenidas sobre su soporte de plata, podían revelarse rápidamente tras la exposición a vapores de mercurio, lo que redujo los largos tiempos de exposición iniciales, a escasos minutos. Varios desarrollos posteriores permitieron obtener las “fotografías” primero en blanco y negro, y después en color, como las conocemos en la actualidad.

Quizás el mayor progreso en las aplicaciones de la imagen óptica en biología y biomedicina fue el descubrimiento de la proteína verde fluorescente (GFP), su modificación química para abarcar casi todas las longitudes de onda visibles y su ingeniería genética con la preparación de proteínas de fusión con GFP (Tsien, 1998). Esta enorme versatilidad permitió la evaluación in vivo de localización subcelular de proteínas y la visualización de tráfico de células marcadas en la inflamación y la metástasis, entre otros. Los avances merecieron la concesión del Premio Nobel de Química 2008 a Shimomura, el biólogo marino que aisló la GFP en las medusas, Chalfie que anticipó sus modificaciones mediante ingeniería genética y Tsien, quien desarrolló toda una nueva colección de proteínas fluorescentes de diversos colores.

## **LA IMAGEN BIOMEDICA ACTUAL**

### **Características generales de las imágenes médicas**

Las imágenes médicas se pueden clasificar en imágenes de absorción o imágenes de emisión, y ambas a su vez, en imágenes planares, si reflejan la proyección planar del objeto visualizado, o tomográficas, si recogen la distribución tridimensional del objeto visualizado en una colección de secciones transversales (Hendee and Ritenour, 2002b). En las imágenes de absorción, el objeto a visualizar se coloca entre la fuente emisora de radiación y un detector apropiado, proporcionando un mapa de la transmisión de la radiación incidente que alcanza el detector después de traspasar el objeto investigado. En las imágenes de emisión, el agente emisor, normalmente un radioisótopo, se sitúa en el interior del objeto visualizado y se detecta la cantidad de radiación transmitida por el mismo mediante detectores externos apropiados, normalmente cámaras gamma.

Las características generales de las imágenes vienen determinadas por las energías espectrales asociadas a su adquisición y por la sensibilidad y resolución de los métodos de detección utilizados. La penetración de las radiaciones nucleares es muy elevada por su gran energía, mucho menor en las ultravioletas, visibles e infrarrojas, y de nuevo mayor en las imágenes de ultrasonidos y radiofrecuencia, a pesar de su escasísima energía. La sensibilidad y resolución dependen del método de detección utilizado. Así, las radiaciones nucleares se detectan mediante cámaras gamma de centelleo sólido de INa (contaminado con ITI) para las radiaciones de baja energía (como el SPECT) o de ortosilicato de lutecio (LUOS), para las radiaciones PET. La necesidad de preparar colecciones de cámaras gamma para detectar simultáneamente la emisión radiaciones en diferentes direcciones, ocasiona que la resolución de estas imágenes este limitada por el número de cámaras gamma utilizado, lo que ocasiona, en el mejor de los casos y debido a su pequeño tamaño, una resolución normalmente muy baja, en el orden de 5-10 mm. Sin embargo su sensibilidad es muy elevada, pues cantidades muy pequeñas de radioisótopo (fM) son capaces de originar, por su elevada energía, una señal detectable. Las radiaciones visibles se detectan generalmente mediante fotodiodos, agrupados sobre cámaras CCD (Charged Coupled Devices) enfriadas para disminuir el ruido térmico.

Su descubrimiento por William Boyle y George Smith, en los laboratorios Bell durante 1969, fue premiado con el premio Nobel de Física en 2009. La resolución de la imagen óptica viene determinada por el número y tamaño de los fotodiodos utilizados en la cámara CCD y resulta por tanto bastante limitada in vivo. Sin embargo, su sensibilidad resulta muy elevada, pues concentraciones nM- $\mu$ M del cromóforo originan señales detectables. La penetración de las radiaciones visibles es muy reducida variando desde 0,1-1mm en el ultravioleta hasta 5 cm en el infrarrojo cercano.

Las radiaciones de ultrasonidos utilizan transmisores y detectores piezoeléctricos integrados, con gran resolución, escasa sensibilidad (mM) y penetración media. Finalmente, las imágenes de radiofrecuencia utilizan antenas optimizadas de detección, alcanzando una elevada resolución espacial en el rango 1  $\mu$ -500 $\mu$ , una sensibilidad reducida al rango mM y una elevadísima penetración que abarca fácilmente la integridad del cuerpo humano.

Uno de los aspectos más importantes en el proceso de obtención de las imágenes son los algoritmos de reconstrucción de la imagen, a partir de las señales recogidas por los diferentes detectores. La imagen planar es la más simple, pues tan solo necesita proyectar sobre un plano las densidades del material a la radiación incidente. La reconstrucción tomográfica es mucho más compleja y requirió de importantes progresos en la matemática de la reconstrucción (Natterer and Wübbeling, 2001; Vandenberghe et al., 2001). Brevemente, fué Radon el primero que propuso, ya en 1912, un algoritmo para la reconstrucción de imágenes astronómicas, a partir de sus proyecciones sobre diferentes ejes. Godfrey Hounsfield extendió este procedimiento a la obtención de tomogramas de rayos X, proporcionando la primera tomografía axial computerizada (Hounsfield, 1980). Así, la reconstrucción computerizada de los sinogramas originados en diferentes direcciones, permitió la generación de una sección transversal de la radiación transmitida a través del objeto. Las tomografías actuales PET/SPECT/CT utilizan el mismo procedimiento, implementando aproximaciones iterativas, para reconstruir el tomograma PET/SPECT a partir de los sinogramas de cada detector. Conviene resaltar aquí que la aplicación de procedimientos optimizados de reconstrucción, ha permitido incrementar notablemente la resolución de las imágenes PET del cuerpo humano hasta alcanzar,

aproximadamente, los 5 mm y hasta 1 mm en los tomógrafos PET de animales. Por último, la reconstrucción de Fourier es la más utilizada en la imagen de Resonancia Magnética, donde una transformación inversa de Fourier bidimensional o tridimensional permite reconstruir las imágenes tomográficas en el dominio espacial de la frecuencia, a partir de las señales de decaimiento magnético obtenidas en el dominio del tiempo.

### **Tomografía de emisión de positrones (Positron Emission Tomography, PET)**

Algunos radionúclidos inestables, como el  $^{18}\text{F}$ , el  $^{15}\text{O}$  y el  $^{11}\text{C}$ , entre otros emiten espontáneamente positrones durante su estabilización (Basu et al., 2011). Los positrones son partículas nucleares de antimateria, similares al electrón en su masa, pero con carga positiva. Poco después de su emisión nuclear, el positrón colisiona con un electrón de la corteza atómica, produciéndose el fenómeno conocido como “aniquilación”, que caracteriza la interacción materia-antimateria. La “aniquilación” resulta en la pérdida de masa de ambas partículas (de ahí su nombre), y su transformación en dos rayos gamma de altísima energía, 511 keV, emitidos en direcciones opuestas. Los positrones emitidos pueden ser detectados, casi simultáneamente, por cámaras gamma localizadas en posiciones opuestas, en el fenómeno conocido como “coincidencia”. La rotación de las cámaras gamma alrededor del objeto investigado, o su disposición en conjuntos coronales estáticos, permiten detectar, en el punto de entrecruzamiento de todas las coincidencias detectadas, la posición original del radiotrazador (Marsden and Sutcliffe-Goulden, 2000; Schoder et al., 2003). La elevadísima energía de los positrones emitidos, proporciona a la técnica una sensibilidad excepcional, en el rango femtomolar ( $10^{-15}$  M). Sin embargo, la resolución es muy limitada, determinada principalmente por el número de detectores gamma de la corona de detección y el procedimiento de reconstrucción utilizado. En los tomógrafos de humanos la resolución está en el rango de los 5 mm, mientras que en los tomógrafos de roedores puede alcanzar 1 mm. La reconstrucción PET se basa en la estadística obtenida de miles de “coincidencias”, que genera una colección de ecuaciones simultáneas a lo largo las múltiples líneas de respuesta entrecruzadas, que permiten localizar el voxel de origen de la emisión y representarlo en forma de imagen. El mapa resultante muestra la distribución del isótopo

PET. Sin embargo, no todos los fotones PET emitidos, alcanzan las cámaras gamma, pues pueden ser absorbidos antes por materiales de la propia muestra. Para corregir esto, se desarrolló la “corrección de atenuación”, un proceso que permite evaluar las interferencias encontradas por la radiación PET, por aquellas detectadas para los Rayos X proporcionados por un sistema independiente. Los mapas de radiación PET, se acostumbra a representar como mapas “SUV” (Standardized Uptake Values), que muestran la distribución de la radiación PET corregida para la cantidad de radioisótopo administrada, su decaimiento natural y tamaño del sujeto receptor (Figura 3).

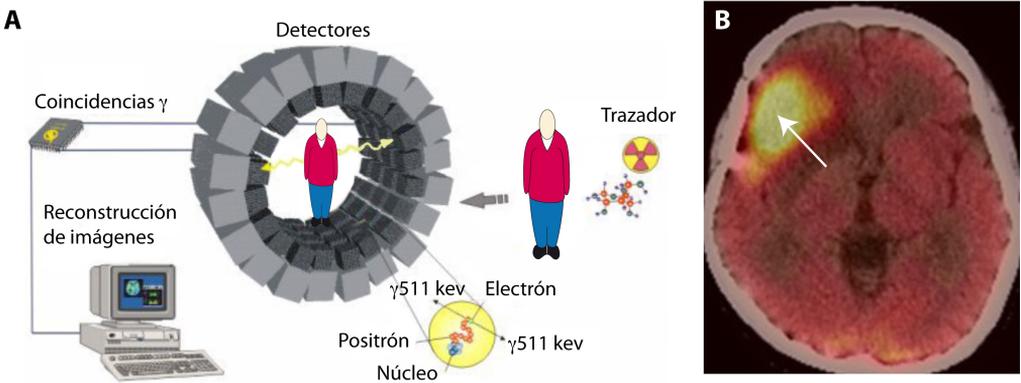


Figura 3. A: Fundamentos de la adquisición de imágenes PET. B: Detección de un glioma (flecha) por su captación exacerbada de FDG.

Los isótopos PET presentan vidas medias muy cortas; el  $^{15}\text{O}$  (2 min),  $^{11}\text{C}$  (20 min), el  $^{13}\text{N}$  (10 min) y el  $^{18}\text{F}$  (110 min), por lo que su utilización está limitada a las proximidades de un ciclotrón y radiofarmacia apropiados. Sin embargo el  $^{18}\text{F}$  tiene una vida media suficientemente larga para permitir su utilización en el mismo día de su producción, generándolo en alta actividad específica y transportándolo rápidamente, desde el lugar de su preparación, hasta el lugar de su utilización. Esta es la razón por la que la mayoría de los radiotrazadores PET actuales van marcados con  $^{18}\text{F}$ .

En la mayor parte de los casos, los radionúclidos emisores se incorporan sobre moléculas apropiadas, que los dirigen hacia los lugares de interés. La combinación más utilizada es la  $^{18}\text{F}$  2-deoxiglucosa (FDG), que muestra no-invasivamente los lugares de captación preferente de glucosa. Brevemente, la FDG es un análogo no

metabolizable de la glucosa, cuyo metabolismo glucolítico no progresa por debajo de la glucosa isomerasa, de la que no es sustrato. Así, la FDG es transportada a través de la membrana plasmática por los mismos transportadores que la glucosa, y es fosforilada intracelularmente por las hexoquiinasas citosólicas. Una vez fosforilada, queda atrapada en el interior celular como deoxiglucosa 6-fosfato. Así, los experimentos de captación de FDG muestran principalmente su transporte, y no su metabolismo, como frecuentemente se escucha, aunque ambos pueden resultar proporcionales en la mayor parte de los casos. La utilización de FDG, ha abierto una nueva era en oncología, permitiendo la detección rápida de tumores por su consumo exacerbado de glucosa (y deoxiglucosa) en comparación con los tejidos normales (Bar-Shalom et al., 2000). Sin embargo, la utilidad de la FDG no se restringe a sus aplicaciones oncológicas y se ha utilizado con éxito en la detección de áreas de activación cerebral. Su principal limitación es la falta de especificidad, ya que todos los tejidos consumen glucosa en mayor o menor grado. En particular, la FDG resulta ávidamente captada también por las áreas de inflamación, algo que puede enmascarar la interpretación de los resultados, originando “falsos positivos”. Algunos autores cifran aproximadamente en, hasta un 30%, la proporción de diagnósticos como “falso positivo” con la utilización de FDG.

Además de la FDG, existe una vasta colección de radiotrazadores PET producidos mediante radiosíntesis química, que se incrementa continuamente con nuevas moléculas (Kegeles and Mann, 1997). La Tabla II recoge algunos de los más utilizados, algunos ya disponibles comercialmente. Conviene recordar aquí, los análogos de  $^{18}\text{F}$ -misonidazol, utilizados como marcadores de hipoxia, los análogos de radiotrazadores de los neurotransmisores serotonina, dopamina, glutamato, GABA, acetilcolina, así como los análogos de las benzodiazepinas y opioides. Entre los más prometedores destaca el compuesto de Pittsburg B (PIB), capaz de detectar las placas de beta-amiloide en la enfermedad de Alzheimer.

Además, es posible marcar cualquier anticuerpo con  $^{125}\text{I}$ , el isótopo PET con mayor vida media (4.2 días), mediante amidación en sus grupos amino, o iodación directa de los anillos de triptófano de sus tirosinas (Bolton and Hunter, 1973; Marchalonis, 1969; Marchalonis et al., 1971).

Tabla II

Algunos de los radiotrazadores PET más utilizados y sus aplicaciones

Radiotrazador	Proceso evaluado/Aplicaciones	Referencias
[ <sup>18</sup> F] FDG	Transporte de glucosa. Evaluación metabolismo energético. Oncología, Cardiología, Neurología	(Belhocine et al., 2006)
[ <sup>11</sup> C] Acetato	Metabolismo energético	(Brogsitter et al., 2013; Jadvar, 2011)
[ <sup>18</sup> F]DOPA	Captación de dopamina. Evaluación de la enfermedad de Parkinson	(Bhidayasiri et al., 2012)
[ <sup>11</sup> C] Metionina	Evaluación de síntesis de proteínas. Imagen de tumores cerebrales	(Glaudemans et al., 2013)
[ <sup>18</sup> F] FET	Alternativa con vida media superior a <sup>11</sup> C metionina, Oncología	(Dunet et al., 2015; Dunet et al., 2012)
[ <sup>18</sup> F] FLT	Proliferación celular, Evaluación de actividad timidina quiinasa, Oncología	(Peck et al., 2015)
[ <sup>18</sup> F] Colina	Evaluación de síntesis de fosfolípidos, Oncología	(Kirienko et al., 2015)
[ <sup>18</sup> F] MISO	Detección de hipoxia, Oncología	(Bourgeois et al., 2011)
[ <sup>18</sup> F] RGD	Detección de integrina α <sub>v</sub> β <sub>3</sub> , Invasión y metástasis, Oncología	(Beer et al., 2008)
[ <sup>11</sup> C] PIB, [ <sup>18</sup> F] FACT	Detección placas beta-amiloide. Enfermedad de Alzheimer.	(Ito et al., 2014)

Finalmente, conviene comentar que el desarrollo de radiotrazadores PET y sus potenciales aplicaciones clínicas es un área en continuo desarrollo. Sin embargo, las aplicaciones rutinarias de la imagen PET encuentran su limitación principal en el elevado coste económico de la tecnología, impuestos por un lado, por los carísimos cristales de ortosilicato de lutecio necesarios en sus cámaras gamma, y por otro, por la necesidad de contar con un ciclotrón muy próximo, para producir los isótopos de vida media más corta.

### **Tomografía de emisión de fotón único (Single Photon Emission Tomography, SPECT)**

Algunos isótopos radioactivos, como  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{129}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  se estabilizan mediante la emisión de fotones gamma de 111 keV. Así, la imagen SPECT (Single Photon Emission Tomography) se origina por emisores de mucha menor energía que la emisión PET, lo que determina su inferior resolución temporal y espacial (Gengsheng et al., 2004). Esto impide que SPECT, a diferencia de PET, pueda proporcionar normalmente imágenes anatómicas o farmacocinéticas. Sin embargo, la mayor vida media de los radionúclidos SPECT, la superior facilidad en generar los radioisótopos, la posibilidad de detectar simultáneamente varios radioisótopos SPECT filtrados por su energía y el inferior coste de las cámaras gamma, hacen de la tomografía SPECT una solución de imagen médica muy asequible. La imagen SPECT se genera tras la emisión isotrópica de fotones gamma, por el radionúclido emisor, y su detección planar o tomográfica, en cámaras gamma de centelleo sólido de yoduro de Na (con trazas de Tl). Como en el caso de PET, la información de las imágenes se enriquece enormemente con su adquisición simultánea o secuencial con la tomografía de Rayos X, en los sistemas híbridos SPECT/CT, que permiten implementar mejor las correcciones de atenuación pertinentes (Bybel et al., 2008). Una característica diferencial importante consiste en los sistemas de colimación que permiten “enfocar” la radiación gamma y determinar la dirección en la que se propaga (Figura 4). Sin embargo, estos constituyen también su principal limitación, pues disminuyen la eficacia de la detección, donde se detectan sólo unos pocos fotones por cada 10.000 emitidos, reduciendo así su sensibilidad. La utilización de varias cámaras gamma, puede permitir disminuir este inconveniente.

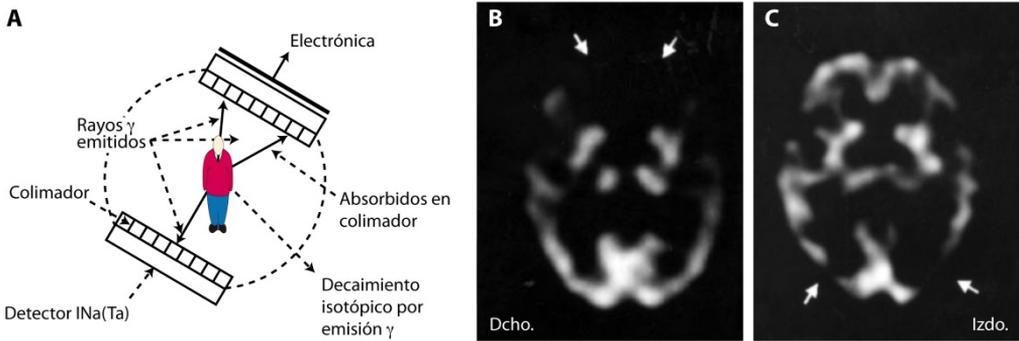


Figura 4. A: Esquema de un tomógrafo SPECT. Imágenes SPECT de perfusión en pacientes con demencia (B) o Alzheimer (C). Nótese como ambas enfermedades disminuyen la captación de  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD en las áreas frontales o temporales posteriores (flechas blancas).

El desarrollo de la imagen SPECT ha sido paralelo al desarrollo de radiotrazadores adecuados. El  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ , el  $^{131}\text{I}$  o  $^{201}\text{Tl}$  son quizás los más utilizados, libres o complejados con agentes quelantes como los oxo- o dioxo derivados, organohidrazinoderivados, poliaminopolicarboxi derivados como el DTPA o macrocíclicos como el DOTA (Muller and Schibli, 2013). El procedimiento sintético general persigue generar reactivos bifuncionales que permitan, por un lado, unir radioisótopo al agente quelante, y por otro dirigirlo hasta la diana biológica apropiada. Entre las aplicaciones más utilizadas, destacan los estudios de perfusión cardiaca o cerebral, con  $^{99m}\text{Tc}$  (o  $^{201}\text{Tl}$ )-MIBI (metoxi-isobutil-isonitrilo) o -HMPAO (hexametilpropilamina oxima), donde las áreas isquémicas captan mucho menos isótopo que las necróticas. Sus complejos con metilendifosfonatos (MDP), permiten también estudios de funcionalidad ósea, donde los tumores óseos, o las metástasis, “captan” más radiotrazador que los tejidos normales. Por otro lado, la utilización de  $^{99m}\text{Tc}$ -HL91 (4,9-diaza-3,3,10,10-tetrametildodecan-2,11-dione dioxima), permite la detección de áreas hipóxicas en tumores y zonas isquémicas. Los complejos  $^{99m}\text{Tc}$ -DOTA o DTPA, permiten evaluar la función renal. Finalmente, el  $^{131}\text{I}$  se utiliza principalmente en estudios de funcionalidad tiroidea, donde los tumores captan mayor cantidad de isótopo que el tiroides normal.

El acoplamiento de estos reactivos sobre péptidos, proteínas y anticuerpos, mediante reacciones de conjugación de sus quelatos con los grupos amino de las proteínas, permite generar reactivos que

detectan receptores específicos incluyendo VEGF ( $^{111}\text{In}$ -bevacizumab) e integrinas ( $^{111}\text{In}$  DTPA A20FMDV2), o incluso receptores de benzodiazepinas y dopamina.

## Rayos X

La imagen de rayos X es, sin duda, la más extendida entre todos los métodos de imagen médica, presente en todos los Hospitales y muchas consultas médicas. Las imágenes de Rayos X se originan cuando los rayos X generados en un tubo de rayos catódicos, atraviesan la muestra e impresionan una placa fotográfica (radiografía convencional), una pantalla fluorescente (fluoroscopia) o una matriz de fotodiodos (radiografía digital). Los párrafos siguientes describen brevemente, la naturaleza de los rayos X, su producción en los tubos de rayos catódicos, su interacción con la materia, su detección y sus principales aplicaciones médicas (Seibert, 2004; Seibert and Boone, 2005).

Los rayos X son radiaciones electromagnéticas similares a las radiaciones visibles o de radiofrecuencia, pero presentan mucha mayor frecuencia y menor longitud de onda. Los rayos X se propagan linealmente, como la luz. Sin embargo, los rayos X se refractan mucho menos que la luz visible, por lo que no existen lentes de rayos X, y se difractan por redes con muy pequeño tamaño de rendija, en el orden de 0,1 nm, como las existentes en los cristales, originando la difracción de rayos X utilizada en química y biología estructural.

Los rayos X se producen en el tubo de rayos catódicos que contiene, dos electrodos, uno negativo, el cátodo que emite electrones al ser calentado y otro positivo, el ánodo, ambos encapsulados al vacío. Cuando se aplica un potencial de aceleración entre 20-200 kV entre los electrodos, los electrones del cátodo se aceleran hacia el ánodo con una energía cinética que es el producto de su carga por la diferencia de potencial aplicada.

Cuando el electrón alcanza el ánodo, transmite la mayor parte de su energía a los átomos del ánodo mediante excitaciones e ionizaciones. Estas energías se disiparán finalmente como energía calorífica. Sin embargo, si el electrón pasa muy cerca de un núcleo atómico, modificará su trayectoria, acelerándose por la carga positiva del núcleo.

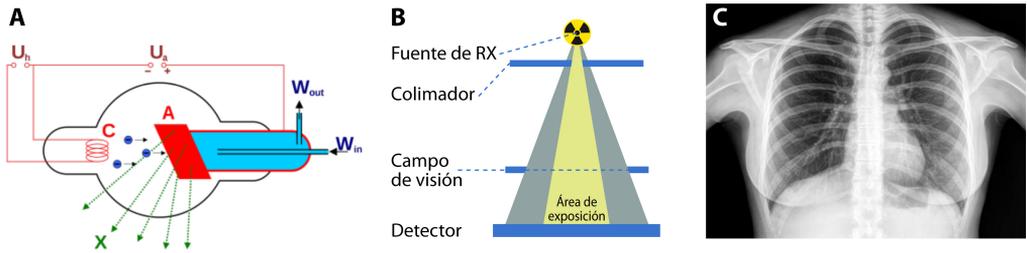


Figura 5. A: Tubo de rayos X, B: Organización general de un densitómetro de rayos X, C: Radiografía anteroposterior de tórax representativa.

En cada una de estas aceleraciones, existe una pequeña probabilidad de que el electrón pierda energía en forma de un fotón. Análogamente, el electrón podría colisionar con el núcleo, transformando toda su energía en un fotón de máxima energía. Estos dos tipos de fotones se denominan “*bremstrahlung*” o “*radiación de frenado*”, y constituyen la mayoría de los rayos X utilizados en imagen diagnóstica. Tan solo una pequeña proporción de los electrones generados en el cátodo (< 1%) originan “*bremstrahlung*”, y su cantidad aumenta con la energía cinética del electrón acelerado y con el número atómico del núcleo utilizado como ánodo. Debido a la elevada disipación de calor, el material utilizado en el ánodo debe tener un elevado punto de fusión y una buena capacidad de conducción calorífica. En este sentido, el tungsteno es el material más utilizado como ánodo en los tubos de rayos catódicos, muchas veces mezclado con renio.

Se puede describir la interacción de los rayos X con la materia, mediante los procesos de atenuación, absorción fotoeléctrica, y dispersión incoherente o coherente. Así, si se coloca una muestra heterogénea, entre el tubo de rayos catódicos y el detector, los rayos X emergentes, reflejan sobre el detector, la densidad a los rayos X en las diferentes regiones de la muestra. En el caso del cuerpo humano, los tejidos duros como los huesos o las calcificaciones, aparecen en blanco, los tejidos blandos, como los pulmones, en negro, y los intermedios, en la escala de grises correspondiente. La atenuación de los rayos X por la materia, se rige por la ley de Lambert-Beer,

$$I_e = I_0 \cdot e^{-\mu \cdot X}$$

donde  $I_e$  es la intensidad del rayo emergente,  $I_0$  la intensidad de los rayos X incidentes,  $\mu$  el coeficiente de extinción a los rayos X del material considerado y  $x$  la distancia de penetración.

Además de la atenuación, la interacción de los rayos X con la materia puede producir, absorción fotoeléctrica y dispersión incoherente (Compton) o coherente. En la absorción fotoeléctrica, un fotón es absorbido por la capa electrónica, que expulsa un electrón (fotoelectrón), creando una vacante en la corteza electrónica. Esta vacante se completa con la caída de un electrón de las capas externas, emitiendo un fotón como la diferencia de energía entre las dos capas (radiación Roentgen característica), o transfiriéndola a un electrón de las capas externas que es expulsado (electrón Auger). La probabilidad de emisión de radiación característica derivada de la absorción fotoeléctrica, aumenta con el número atómico y es mayor para las capas K, aumentando el rendimiento fluorescente con la energía de unión del fotoelectrón. En la dispersión Compton, un fotón colisiona con electrón atómico, y es difractado con menor energía y mayor longitud de onda, proporcionando al electrón el resto de su energía, modificando su trayectoria. Finalmente en la dispersión coherente, los fotones se dispersan por electrones de la corteza, sin transferir energía a los electrones, cediendo una mínima parte de su energía a todo el átomo, por lo que los fotones en dispersión coherente no pierden apenas energía.

Las imágenes de rayos X, representan la proyección planar de la densidad a los rayos X de la muestra sobre el plano de detección, por lo que la técnica se denomina, en general, "densitometría de rayos X". Normalmente, se obtienen dos proyecciones de la muestra, anteroposterior y lateral, para localizar las lesiones en el espacio, evitando las limitaciones en la localización inherentes a la utilización de una sola proyección planar. Sin embargo, la tomografía de rayos X permite la obtención de secciones tomográficas, mediante la reconstrucción de múltiples proyecciones obtenidas mediante la rotación del transmisor y del detector alrededor de la muestra. La imagen de rayos X es muy sensible a la presencia de átomos de alta densidad electrónica, como el calcio de los huesos o lesiones calcificadas, los implantes metálicos o los elementos de elevado peso atómico, como el yodo. Por ello, la mayor parte de los medios de contraste empleados para resaltar

regiones de la imagen de rayos X son compuestos iodados o nanopartículas de hierro.

Las aplicaciones de la imagen de rayos X abarcan casi todos los campos de medicina, estando especialmente indicados para detectar lesiones óseas, o lesiones en la mama. Esta última, se denomina mamografía, y utiliza aparatos de rayos X diseñados al efecto, con gran resolución espacial, capaces de discriminar lesiones de calcificación hasta 0,1 mm.

La fluoroscopia permite la detección en tiempo real de imágenes dinámicas de rayos X, con importantes aplicaciones en cardiología, donde se puede observar en tiempo real el latido cardiaco, o en urología, donde se puede observar la eliminación renal de un medio de contraste. Sin embargo, la fluoroscopia proporciona una deposición de radiación muy elevada, en comparación con la radiografía convencional, lo que desaconseja su utilización continuada.

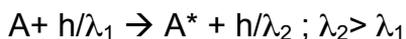
Es posible obtener imágenes de rayos X con resolución tomográfica, mediante la tomografía axial computerizada. Los tomogramas muestran la distribución de la atenuación de rayos X en una o más secciones del paciente. Como en el caso de la fluoroscopia, la deposición de radiación es también muy superior, a la de la radiografía convencional, por lo que su utilización debe acomodarse también a criterios de radioprotección.

## **Imagen óptica**

La imagen óptica permite obtener imágenes de la interacción de radiaciones electromagnéticas con tejidos biológicos, cubriendo desde la radiación ultravioleta (< 400 nm) hasta la del infrarrojo cercano (> 650 nm), pasando por las longitudes de onda visibles, desde la azul (475 nm) y la verde (510 nm) hasta la roja (650 nm) (Luker y Luker, 2008). La principal desventaja de esta región del espectro, es la escasa penetración de estas radiaciones en los tejidos, su reflexión en las interfaces de los mismos y la alta interferencia de absorbentes endógenos tisulares endógenos, como la hemoglobina sanguínea o la mioglobina muscular. La penetración es mayor para las longitudes de onda largas, en la región del rojo (hasta mm) o infrarrojo cercano (hasta cm) y menor en las longitudes de onda cortas como las ultravioletas o las azules (hasta fracciones de mm). Esto hace que las principales

aplicaciones de la imagen óptica se hayan realizado sobre pequeños animales de experimentación, normalmente ratones, más que sobre seres humanos, tan solo accesibles a estos métodos en zonas muy superficiales, como la piel, o mediante sondas intravitales invasivas. Por otro lado, sus principales ventajas incluyen la rapidez de adquisición de las imágenes y posibilidad de obtener imágenes simultáneas de varios animales, lo incrementa muy convenientemente su rendimiento y su utilización farmacéutica en el cribado de drogas.

Existen principalmente dos métodos de imagen óptica: la fluorescencia y bioluminiscencia (Close et al., 2011; Ntziachristos, 2006). La fluorescencia es la radiación emitida por una molécula o fluoróforo, como consecuencia de su excitación por un fotón, normalmente ultravioleta. La radiación fluorescente emitida, tiene menor longitud de onda que la absorbida (desplazamiento de Stokes) y ocurre normalmente en la región visible del espectro, por lo que tras, la iluminación ultravioleta, se observa una radiación visible coloreada.



La bioluminiscencia, es la emisión de luz “en frío”, sin necesidad de excitación electromagnética previa, como consecuencia de una reacción bioquímica, como las catalizadas por los enzimas genéricamente denominados luciferasas,



Existen diferentes luciferasas, capaces de emitir bioluminiscencia en diferentes longitudes de onda. Así, las luciferasas de la luciérnaga emiten luz con un máximo a 560 nm, las de Renilla a 480 nm y las bacterianas a 490 nm. La luciferasa de luciérnaga y las bacterianas utilizan la D-luciferina como sustrato, mientras que la luciferasa de Renilla utiliza la celenterazina, con menor biodisponibilidad, posiblemente por la ausencia de su transportador MDR1 en las células de mamífero. La principal desventaja de la imagen de bioluminiscencia, es la necesidad de administrar D-luciferina al animal examinado, por lo que la emisión de luminiscencia puede reflejar no solo la biodistribución de la luciferasa, sino la biodistribución de la D-luciferina, algo que puede complicar la interpretación de los resultados. Por otro lado, la emisión de bioluminiscencia es normalmente muy reducida, por lo que se requieren recintos de oscuridad, anestesia de

los animales investigados y cámaras de alta sensibilidad. En contraste, la fluorescencia puede ser observada incluso en luz diurna y no requiere anestesia, pudiendo ser observada en animales en movimiento.

Los aparatos de fluorescencia *in vivo*, requieren de un dispositivo de excitación, que puede ser una lámpara de tungsteno, un fotodiodo o un láser, y uno de detección que suele ser un conjunto de fotodiodos. Sin embargo, los aparatos de bioluminiscencia, requieren tan solo el detector de luminiscencia, que suele ser una cámara de CCD (Charged Coupled Device), enfriada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para disminuir su ruido electrónico. Las cámaras CCD contienen fotodiodos sensibilizados a las diferentes radiaciones visibles y filtros apropiados, que permiten optimizar la detección de las diferentes longitudes de onda. Los detectores envían sus señales a un convertidor analógico-digital y este a un ordenador, donde se reconstruye la imagen, normalmente como una matriz de flujo de fotones. Los aparatos de fluorescencia y luminiscencia *in vivo*, pueden combinarse sobre la misma plataforma, una cámara oscura que alberga muestra, transmisores y detectores, con accesos sellados para las conducciones de anestesia.

## **Fluorescencia**

Los aparatos de fluorescencia *in vivo*, pueden utilizar dos métodos de iluminación de la muestra; *Epi-iluminación*, donde el dispositivo de excitación y el de detección se encuentran localizados en el mismo lado del objeto, formando un ángulo definido, o *Trans-iluminación*; donde el dispositivo de excitación y el de detección se encuentran en lados opuestos del objeto. Los aparatos de bioluminiscencia requieren tan solo un detector de altísima sensibilidad para la radiación luminiscente. Frecuentemente, se generan “imágenes planares”, de fluorescencia o bioluminiscencia, colocalizadas sobre una imagen visible del objeto, que permiten observar claramente los lugares correspondientes de emisión. Sin embargo, la naturaleza planar de la imagen, no permite evaluar la localización de la emisión en el espacio, a menos que se realicen adquisiciones anteroposteriores o laterales del mismo objeto, como en los rayos X.

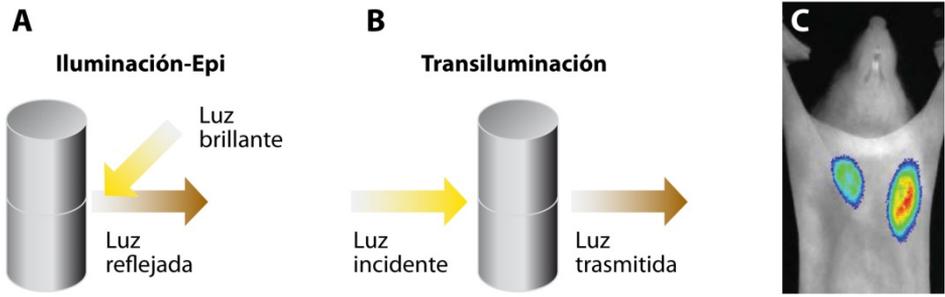


Figure 6. Imagen óptica por A: *Epi*-iluminación, B: *Trans*-iluminación. C: Actividad catepsina en dos tumores implantados subcutáneamente. Modificada de Ntziachristos, V. (2006) Annu. Rev. Biomed. Eng. 8:1–33.

Para superar este inconveniente, se han desarrollado más recientemente, métodos tomográficos de reconstrucción, que permiten la visualización y localización tridimensional de la emisión, en lo que se conoce como Tomografía Molecular de Fluorescencia (FMT, Fluorescence Molecular Tomography). El fundamento es parecido al de la tomografía de rayos X, donde la variación del ángulo de excitación o detección y la reconstrucción de la radiación captada mediante algoritmos específicos, permite la reconstrucción 3D de la radiación emitida (Stuker et al., 2011). Sin embargo, existe una diferencia fundamental entre los rayos X y las radiaciones visibles en su paso a través de los tejidos, y es que estas últimas resultan altamente difractadas por los tejidos. Esto origina una relación no lineal del campo de fotones detectado  $\Phi$ , que depende de las propiedades ópticas del tejido y la distancia del detector, según la expresión;

$$\Phi \sim (\exp(-ikr))/r$$

donde  $r$  es la distancia entre la fuente y el detector, asumiendo que ambas son puntuales, y

$$k = ((-c\mu_a + i\omega)/cD)^{1/2}$$

donde  $\mu_a$  el coeficiente de absorción que depende del número de onda de propagación del fotón,  $D$  el coeficiente de difusión,  $c$  la velocidad de la luz en el tejido y  $\omega$  la frecuencia del haz de fotones que ilumina el tejido. El campo de fotones  $\Phi$ , describe la dependencia genérica de los

fotones detectados de la naturaleza del tejido, sin considerar sus heterogeneidades, proporcionando una idea general de la complejidad de la atenuación de fotones por los tejidos. La presencia de interfaces, contribuye dificultades adicionales, produciendo una “curvatura” del haz, que depende de las posiciones relativas del emisor y el detector. No resulta posible extenderse más aquí sobre los fundamentos de la reconstrucción tomográfica de imágenes ópticas, pero el lector interesado puede encontrar descripciones más detalladas en las publicaciones (Kepshire et al., 2009; Ntziachristos, 2006). Sin embargo, conviene mencionar, que los procedimientos de reconstrucción tomográfica de las imágenes ópticas, no han alcanzado aún entre la comunidad científica, el reconocimiento que hoy mantienen las reconstrucciones tomográficas de rayos X, PET o SPECT. Por ello, los instrumentos recientes permiten combinar las reconstrucciones de tomografía óptica, con la tomografía de rayos X, en formato híbrido, para una mejor localización de los puntos de emisión.

### ***Sondas fluorescentes***

La imagen de fluorescencia requiere de la utilización de fluoróforos específicos que permiten examinar diversos procesos biológicos fundamentales de manera no invasiva, constituyendo una verdadera herramienta de imagen molecular. Se pueden distinguir dos abordajes principalmente; (i) Transgénesis basada en la expresión del gen de proteínas fluorescentes (como la GFP, Green Fluorescent Protein) o de construcciones genéticas incluyendo el promotor de la proteína fluorescente acoplado al gen de elección, tanto en células específicas como en animales completos (Bizzarri et al., 2009; Hoffman, 2005, 2012; Stepanenko et al., 2011; Stepanenko et al., 2008), y (ii) abordajes, no genéticos, basados en la utilización de fluoróforos de síntesis, específicos para detectar cambios en distintos procesos o entornos (Gross y Loew, 1989; Han y Burgess, 2010; O'Malley et al., 1999; Tsien, 1989).

### ***Biomarcadores genéticos***

La mayoría de los abordajes genéticos involucran la expresión de GFP, o sus variantes, en sistemas celulares o murinos (Tsien, 1998). La GFP fue descubierta por Shimomura en 2009, en la medusa *Aequorea Victoria*. El cDNA de GFP codifica por un polipéptido de 283

aminoácidos y 27 kDa. La GFP es una proteína monomérica en forma de barril, cuyo cromóforo endógeno es la *p*-hidroxibencilidimidazolinona, producida por los aminoácidos 65-67, Ser-Tyr-Gly en la proteína nativa. La conformación tridimensional provoca un ataque nucleófilo de la Gly67 sobre el carbonilo de la serina65, seguido de deshidrogenación dependiente de O<sub>2</sub>, de la Tyr66. Esto coloca el grupo aromático en conjugación con la imidazolinona, volviéndole sensible a la luz. Solo en esta conformación la GFP se vuelve fluorescente. De hecho es posible modificar la longitud de onda de emisión de la GFP, haciendo mutagénesis dirigida sobre estos residuos, construyendo una familia de GFPs fluorescentes en el rango violeta-rojo (Shaner et al., 2008; Shaner et al., 2005), lo que valió, a Roger Tsien, el Premio Nobel de química en 1998. Hay que indicar que la GFP no requiere de otras proteínas, sustratos o cofactores, para emitir fluorescencia.

Los primeros experimentos de imagen con GFP permitieron visualizar el proceso metastásico *in vivo* (Hoffman, 2005, 2012). Se transfectaron establemente células tumorales y las transplantaron sobre diversos modelos murinos, mostrando que se podían detectar, por su fluorescencia verde, metástasis en casi todos los órganos aislados, al nivel de una sola célula. Además, se observaron células individuales en el proceso de intra- y extra-vasación, incluyendo la formación de filopodios. Conviene resaltar aquí, que la observación de células individuales metastásicas excede la capacidad de las técnicas histológicas convencionales y que estos estudios permitieron visualizar, por primera vez, micrometástasis *ex vivo* (Chisima et al., 1997).

El primer ratón verde se generó en 1997 (Okabe et al., 1997), mostrando expresión generalizada de GFP excepto en el pelo y las células rojas de la sangre, y no mostró patología alguna directamente detectable. Este descubrimiento abrió la posibilidad de utilizar este ratón, transfectado con células expresando proteínas con otro color, como la proteína roja fluorescente, para estudiar las interacciones entre huésped y tumor *in vivo*, abriendo una nueva época en la biología celular y molecular.

Desde entonces, las combinación de promotores de proteínas fluorescentes de diversos colores, con genes de proteínas que se expresan en el núcleo, la membrana celular, los microtúbulos, las

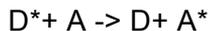
mitocondrias o en las diferentes fases del ciclo celular, han permitido estudiar el tráfico intracelular de proteínas en células individuales, o la distribución de células con diferentes fases de su ciclo en tejidos, abriendo una nueva era en la biología celular (Stepanenko et al., 2011; Stepanenko et al., 2008).

### ***Biomarcadores de síntesis***

Los fluoróforos de síntesis incluyen sensores intracelulares de pH y  $pCa^{2+}$ , entre otros, así como indicadores de la actividad proteasa, el estado redox o el potencial de membrana celular (Gross and Loew, 1989; Han and Burgess, 2010; Tsien, 1989). Todos ellos se basan en la modificación de las propiedades fluorescentes del fluoróforo, por las circunstancias ambientales mencionadas. Entre los más utilizados, destacan el BCECF para pH, el FURA-2 e Indo-1 para  $Ca^{2+}$ . Todos ellos utilizan el método radiométrico para corregir por los efectos de la concentración del fluoróforo, sobre la magnitud determinada. Este método se basa en medir la relación de fluorescencia a una longitud de onda sensible al proceso estudiado y otra longitud de onda insensible, lo que produce una medida final independiente de la concentración del fluoróforo.

### ***Fluorescencia por Resonancia de Transferencia de Energía (FRET)***

El método FRET (Fluorescence by Resonance Energy Transfer) utiliza la transferencia de energía entre dos fluoróforos, uno donador (D) y otro aceptor (A), para estudiar la proximidad espacial entre los mismos (Jares-Erijman and Jovin, 2003; Shrestha et al., 2015). Básicamente se producen las siguientes reacciones;



De esta manera, la excitación de la molécula donadora, produce la emisión de fluorescencia (de mayor longitud de onda) en la molécula aceptora, de una manera que depende de la distancia entre ambas. De esta manera el efecto FRET constituye una verdadera “regla de medir

molecular”, que ha alcanzado numerosas aplicaciones en biología y medicina.

Para que ocurra el efecto FRET, se deben cumplir varias condiciones; (i) el espectro de fluorescencia de emisión del donador debe solaparse con el espectro de fluorescencia de absorción del emisor, (ii) las moléculas de donador y aceptor deben encontrarse muy próximas (típicamente entre 1-10 nm), (iii) Los momentos de transición de la molécula donadora y aceptora deben ser aproximadamente paralelos, y (iv) el tiempo de vida media de la fluorescencia en el donador debe ser suficientemente largo para permitir que ocurra FRET.

La ecuación que define FRET fue proporcionada por Foster, por lo que este mecanismo recibe el nombre de Energía de Transferencia Foster;

$$k_T(r) = 1/\tau_D (R_0/r)^6$$

donde  $k_T(r)$  es la velocidad de transferencia de energía del donador al aceptor,  $r$  la distancia entre donador y aceptor,  $\tau_D$  la vida del fluoróforo donador en ausencia de aceptor, y  $R_0$  el conocido radio de Foster, proporcionado por el solapamiento espectral entre la banda de emisión del donador y la banda de absorción del aceptor.

Los sensores FRET se construyen acoplando a una molécula, o macromolécula de reconocimiento, los dos fluoróforos (donador y aceptor) suficientemente próximos. Los cambios de conformación del sensor de reconocimiento inducidos por el entorno, son capaces de modificar el efecto FRET observado, de manera que la detección de estos cambios proporciona información sobre la conformación del sensor y su sensibilidad al entorno. Se han diseñado también sensores FRET intermoleculares, cuando el efecto FRET aparece si interaccionan a corta distancia dos moléculas portadoras de los fluoróforos FRET. Así, ha sido posible construir sensores FRET para iones ( $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Hg^{2+}$ , etc...), detectar interacciones proteína-proteína, o cambios conformacionales in vivo (Truong et al., 2001). En este sentido, se han empleados proteínas fluorescentes codificadas genéticamente, cuya expresión puede dirigirse a orgánulos subcelulares específicos (Aoki et al., 2013; Aoki y Matsuda, 2009; Miyawaki et al., 2003; Moussa et al., 2014). Uno de los pares FRET más populares para este propósito es la combinación CFP (Cyan-

Fluorescent Protein) y YFP (Yellow Fluorescent Protein). La utilización de estos pares ha permitido visualizar *in vivo* el funcionamiento de algunos sistemas de señalización celular. En este sentido, conviene mencionar aquí los experimentos que permitieron observar *in vivo* la asociación de subunidades de proteínas independientes marcadas, respectivamente, con fluoróforos aceptores y donadores, por la aparición del efecto FRET derivado de su colocalización y proximidad intracelular (Miyawaki and Tsien, 2000; Truong y Ikura, 2001).

## **Bioluminiscencia**

La bioluminiscencia en animales enteros está siendo progresivamente más aplicada por su bajo coste, alto rendimiento y relativa facilidad de uso para visualizar una gran variedad de eventos celulares y moleculares *in vivo* (Close et al., 2011). Las proteínas luminiscentes están ganando preferencias sobre sus homólogas fluorescentes, por la ausencia de bioluminiscencia endógena en los tejidos de mamíferos. Esta circunstancia, contrasta con la prevalencia de compuestos endógenos fluorescentes que pueden interferir con la detección de las moléculas exógenas de interés. Sin embargo, la necesidad ineludible de administrar sustratos bioluminiscentes exógenos, como la luciferina, para visualizar la reacción bioluminiscente, puede dificultar la interpretación de los experimentos, al depender la bioluminiscencia detectada, no sólo de la presencia de la reacción bioluminiscente, sino de la biodistribución del sustrato bioluminiscente suministrado. Más aún, la realización de registros longitudinales repetidos de bioluminiscencia, requiere administraciones repetidas del sustrato bioluminiscente en cada tiempo ensayado, una circunstancia dictada por la necesidad de mantener constante la concentración de sonda bioluminiscente a lo largo del experimento y por la rápida eliminación de las sondas bioluminiscentes *in vivo*.

Las principales proteínas bioluminiscentes son las luciferasas de luciérnaga (F-Luc), que requiere como sustrato la D-luciferina, la de Renilla (R-Luc), que requiere como sustrato la celenterazina y las bacterianas (L-ux) que utilizan como sustrato un aldehído de cadena larga y fosfato de riboflavina reducida.

Las principales aplicaciones incluyen el seguimiento de células bioluminiscentes administradas *in vivo*, incluyendo el destino de células

troncales, de células del sistema inmune y de células tumorales. Especial atractivo presentan los estudios de expresión génica, donde el gen promotor F-Luc puede acoplarse al gen de interés, y visualizar su expresión en determinadas condiciones (Josserand et al., 2007). En este sentido, es interesante mencionar la utilización de ratones transgénicos bioluminiscentes conteniendo construcciones F-luc/NF $\kappa$ B, como indicadores de inflamación. En este último caso, la inyección del lipopolisacárido bacteriano (LPS) en estos animales, desencadena una reacción inflamatoria generalizada, que puede visualizarse como un aumento heterogéneo en la emisión bioluminiscente de diversos órganos, tras la administración de D-luciferina.

Finalmente, también se ha utilizado imagen de bioluminiscencia (Bioluminescence Imaging, BLI), para medir interacciones proteína-proteína *in vivo* mediante el efecto BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer), donde el cromóforo donador es una molécula bioluminiscente y el aceptor, una molécula fluorescente (Pfleger and Eidne, 2006). La observación del efecto BRET permite evaluar la interacción entre ambos cromóforos y estimar su distancia como se ha indicado en el apartado anterior (Kaczor et al., 2014).

## **Ultrasonidos**

El oído humano es capaz de detectar ondas sonoras en el rango desde 20 Hz a 20 kHz. Las ondas sonoras con frecuencia superior a 20 kHz se denominan ultrasonidos. Estas ondas propagan energía mecánica, causando la vibración de las partículas materiales en un medio continuo y elástico. La propagación del sonido tras una percusión, se representa adecuadamente en estos casos, por el desplazamiento de compresiones y descompresiones, a lo largo de modelos mecánicos lineales de bolas conectadas por muelles.

Las ondas sónicas no se pueden propagar en el vacío, pues no existen ni muelles, ni partículas, que mover. Sin embargo, en un medio determinado, la velocidad  $c$  de propagación del sonido, depende de su longitud de onda  $\lambda$  y de su frecuencia  $\nu$ ,  $c=\lambda.\nu$ , siendo cuatro o cinco veces superior en los tejidos a la del aire (1430 m.s<sup>-1</sup>/agua, 1541 m.s<sup>-1</sup>/cerebro, 1549 m.s<sup>-1</sup>/hígado y 1450 m.s<sup>-1</sup>/grasa, 340 m.s<sup>-1</sup>/aire).

El fundamento de la imagen de ultrasonidos es similar al SONAR (SOund NAvigation And Ranging) y al RADAR (RAdio Detection And

Ranging). Básicamente, un corto tren de ondas sonoras emitidas por un transductor piezoeléctrico, es reflejado por un tejido o una interfaz, de manera que vuelve a ser detectada poco después, como un “eco”, por el mismo transductor piezoeléctrico, con una intensidad “atenuada” muy inferior (Chan y Perlas, 2011). El tiempo transcurrido entre la emisión y la detección de la reflexión ultrasónica, y la atenuación de la radiación reflejada, vienen determinadas por las propiedades del (los) medio(s) que atraviesa. Esto permite resolver las distancias viajadas por el ultrasonido en los diferentes tejidos e interfaces, así como sus propiedades, a través de los tiempos de retardo del eco reflejado y de su atenuación. Estas características pueden representarse gráficamente en una imagen de ultrasonidos o “ecografía”, que contiene la distribución de tejidos y barreras de propagación ultrasónica, en el área examinada por el transductor piezoeléctrico. Las limitaciones de extensión en el presente discurso impiden presentar aquí una descripción matemática más detallada de este proceso. Sin embargo, el lector interesado podrá obtener más detalles sobre la transmisión y la reflexión del ultrasonido en los tejidos y su reconstrucción en imágenes en las siguientes publicaciones (Carlsen, 1975; Lieu, 2010; Nelson and Pretorius, 1998).

Las diferentes propiedades de los tejidos, a la transmisión del ultrasonido vienen determinadas, por su “impedancia acústica”  $Z$ , una propiedad característica de cada tejido o medio, que mide la relación entre la presión acústica que presentan las partículas que lo constituyen y su velocidad de movimiento. En este sentido, la impedancia acústica, refleja, en términos más coloquiales, la “resistencia” del tejido a la propagación del ultrasonido. Así, las imágenes de ultrasonido más convencionales, conocidas como imágenes de ultrasonidos en modo B (Brightness en inglés) o 2D, muestran sobre un mapa las zonas de diferente intensidad o “ecogenicidad” de la región examinada. Las zonas “hiperecoicas” reflejan interfaces con gran diferencia de impedancia sonora, como las interfaces agua-aire que ocurren en el diafragma, entre los pulmones y el tejido hepático, “isoecoicas” en los tejidos musculares como el miocardio, o “anecoicas” en los tejidos con elevado contenido en aire como los pulmones. Existen otras modalidades de ultrasonido que muestran en una dimensión, el movimiento de diversas estructuras como el miocardio adulto o fetal (Modo M), la Amplitud (Modo A) normalmente utilizada para localizar

los nervios ópticos, o incluso la perfusión sanguínea mediante el efecto Doppler.

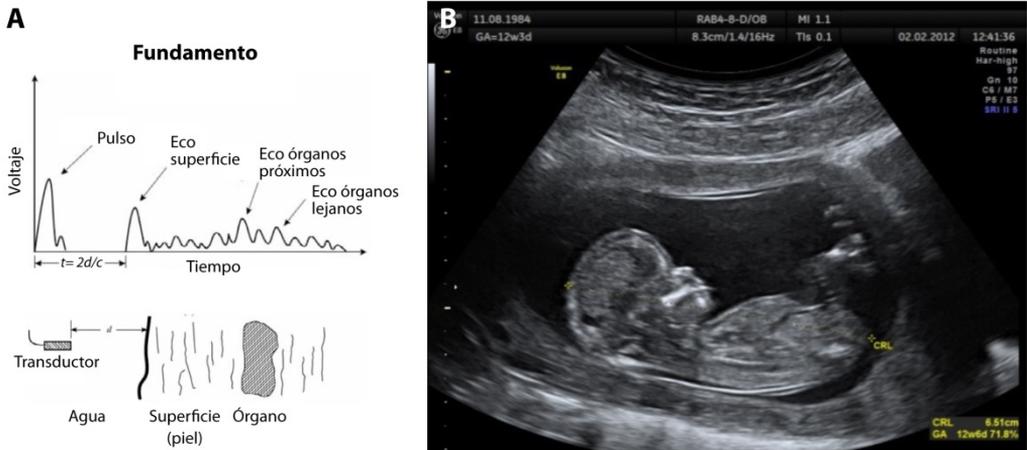


Figura 7. A: Fundamento de la imagen por ultrasonidos, B: Imagen representativa de ultrasonidos durante el embarazo.

Dado que la imagen de ultrasonidos se adquiere en tiempo real, permite resolver el movimiento de tejidos, como el corazón, o la velocidad de flujo sanguíneo, constituyendo hoy día un método eficaz de evaluación de la función cardíaca y vascular. Dada la penetración de los ultrasonidos y su inocuidad, pueden ser empleados sin riesgo en mujeres embarazadas, constituyendo el método de elección en imagen obstétrica y ginecológica.

La tecnología de ultrasonidos ha progresado espectacularmente en los últimos años. Los avances se deben principalmente a la mejora en los transductores piezoeléctricos, la formación de haces ultrasónicos, la compresión de pulsos, la imagen de armónicos, las técnicas para la medida de flujo sanguíneo y movimiento, la imagen tridimensional y tetradimensional y los agentes de contraste ultrasónicos. En este último aspecto merece especial mención el desarrollo de “microburbujas”, que han permitido detectar, dinámicamente la expresión de proteínas específicas en endotelio macro- y microvascular, revelando aspectos cruciales sobre la angiogénesis, la inflamación y la aterotrombosis (Stride y Saffari, 2003). En general se trata de micropartículas de ácido poli(láctico-co- glicólico, PLGA), o liposomas ecogénicos repletos de gas, que se decoran en su

superficie con reactivos inmuno dirigidos, para detectar antígenos característicos de diversos procesos patológicos. Las primeras micropartículas se llenaban de gases, como el aire o  $N_2$ , aunque las más recientes encapsulan perfluorocarbonos o hexafluoruro de azufre ( $SF_6$ ), por su menor difusividad a través del material encapsulante, lo que extiende su periodo de efectividad en sangre. Su elevadísima impedancia sonora, las hace muy diferentes de las propiedades sonoras de la sangre y los tejidos. Así, su direccionamiento activo mediante anticuerpos acoplados a su superficie, permite resaltar las zonas de la imagen que acumulan el antígeno seleccionado. Más concretamente, se han diseñado microburbujas para la detección del factor de crecimiento vascular endotelial (VGEF), proteínas de adhesión como la proteína de adhesión intracelular ICAM-1 o la proteína vascular de adhesión celular VCAM-1, entre otras (Gessner y Dayton, 2010; Kogan et al., 2010).

## **Resonancia Magnética**

La imagen por Resonancia Magnética se basa en la excitación del magnetismo nuclear por pulsos de radiofrecuencia y la detección de la radiofrecuencia emitida por los núcleos excitados durante su proceso de relajación (McRobbie et al., 2003; Wood and Wehrli, 1998). La excitación nuclear suele ser muy rápida, con pulsos de radiofrecuencia de escasos milisegundos (o incluso microsegundos), mientras que la relajación nuclear es un proceso mucho más lento, del orden segundos o incluso minutos. Por tanto, es posible utilizar la misma bobina para la transmisión y recepción, siempre que ambos procesos no ocurran simultáneamente (Matwiyoff y Brooks, 1998). La posición de cada núcleo en el espacio se codifica mediante la aplicación de tres gradientes magnéticos ortogonales que proporcionan sus coordenadas (Hashemi et al., 2010). A continuación se describe brevemente los fundamentos físicos de la imagen por resonancia magnética nuclear.

Los núcleos con un número impar de neutrones o de protones muestran un momento angular  $m$  no nulo, caracterizado por un momento magnético nuclear  $\mu$  (Abragam, 1983). Este momento magnético asemeja el comportamiento de los núcleos a pequeños dipolos magnéticos, como describió Isidor Isaac Rabi. Sin embargo, todas las magnitudes nucleares se encuentran cuantizadas. Los núcleos de hidrógeno tienen un número cuántico de spin  $m=1/2$ , lo que

indica que cuando se aplica un campo magnético externo  $B_0$ , se crean dos estados energéticamente diferentes, caracterizados por momentos magnéticos  $\mu = \pm 1/2$  y energías  $E = -\gamma (h/2\pi) \mu B_0$ , donde  $\gamma$  y  $h$  son la relación giromagnética ( $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{T}^{-1}$ ), una característica de cada núcleo, y la constante de Planck ( $\text{J}\cdot\text{s}$ ), respectivamente. El estado  $\mu = +1/2$ , presenta una energía inferior, con su momento magnético orientado paralelamente a  $B_0$ , mientras que el estado  $\mu = -1/2$  presenta una energía superior y una orientación antiparalela a  $B_0$ . La distribución de la población de protones entre los dos niveles de energía sigue la estadística de Boltzman, donde el equilibrio térmico determina las poblaciones de protones en los dos niveles;

$$p_{\text{alto}}/p_{\text{bajo}} = e^{-\Delta E/kT}$$

donde  $p_{\text{alto}}$  y  $p_{\text{bajo}}$  representan las poblaciones de protones de los niveles de energía nuclear “alto” ó “bajo”,  $\Delta E = E_{\text{alto}} - E_{\text{bajo}}$  es la diferencia de energía entre ambos niveles,  $k$  la constante de Boltzman y  $T$  (K) la temperatura absoluta. En el equilibrio, el nivel de energía inferior contiene un número ligeramente superior de núcleos al del nivel de energía superior. Esto se manifiesta por la aparición de un vector de magnetización macroscópica, lo que hace que la muestra de protones se comporte como un pequeño imán, cuando se introduce en un campo magnético externo. En estas condiciones, el momento magnético neto de la muestra, precesa alrededor del vector del campo magnético con una frecuencia angular  $\omega_L = \gamma \cdot B$ , conocida como la frecuencia de Larmor.

La Resonancia Magnética es un fenómeno físico que consiste en inducir transiciones permitidas entre estados nucleares de energía diferente (Ernst et al., 1990). Solo se permiten transiciones donde la variación del momento angular nuclear  $m$  es uno. Durante el proceso de excitación por Resonancia Magnética, se inducen transiciones entre los niveles de energía adyacentes con una energía

$$\Delta E = E_{\text{alto}} - E_{\text{bajo}} = \gamma h B$$

Estas transiciones promocionan núcleos del nivel inferior al superior, alterando el equilibrio de Boltzman y creando una situación termodinámica inestable, ligeramente alejada del equilibrio, que tiende a recuperarse cuando la excitación se detiene, mediante la emisión de la energía absorbida en el proceso conocido como “relajación magnética” (Gore and Kennan, 1998). Más concretamente, las transiciones se

inducen mediante la aplicación de un pulso corto de radiofrecuencia  $B_1$ , orientado perpendicularmente a la dirección del campo magnético estático. Este pulso, produce un giro de  $90^\circ$  en la magnetización original, que precesa después del pulso en un plano perpendicular a la dirección original  $B_0$ . Cuando cesa el pulso de radiofrecuencia, la magnetización retorna exponencialmente a los valores de equilibrio en un proceso helicoidal anisotrópico, caracterizado por dos constantes de velocidad de primer orden, los tiempos de relajación  $T_1$  y  $T_2$ .  $T_1$  es el tiempo de relajación longitudinal y caracteriza la velocidad de recuperación de la magnetización de equilibrio en la dirección del campo magnético externo  $B_0$ .  $T_2$  es el tiempo de relajación transversal, y caracteriza la velocidad de recuperación de la magnetización de equilibrio en el plano perpendicular a  $B_0$ . Las inevitables inhomogeneidades del campo magnético externo, hacen que la desaparición de magnetización en la sección transversal sea más rápida que  $T_2$ , una situación que viene caracterizada por la magnitud eficaz  $T_2^*$ ;

$$1/T_2^* = 1/T_2 + \gamma\pi\Delta B$$

donde  $\Delta B$  (T) representa la contribución de las inhomogeneidades del campo a  $T_2^*$ .

La recuperación de la magnetización de equilibrio, es un proceso de precesión helicoidal, descendente en el plano transversal, y ascendente en el eje del campo magnético aplicado. Por ser un campo magnético variable en el tiempo, es capaz de inducir un voltaje exponencialmente descendente en el tiempo ( $V_{(t)}$ ), en una bobina localizada en el plano transversal al campo magnético estático. Así, se puede describir la recuperación de la magnetización de equilibrio después de un pulso de radiofrecuencia, por la ecuación de Bloch;

$$dM/dt = \gamma M_x B - (M_x + M_y)/T_2 - (M_z + M_0)/T_1$$

que indica que la recuperación de la magnetización de equilibrio, y por tanto el voltaje observado en la bobina, dependen tanto de  $T_1$  como de  $T_2$ .

Es posible enfatizar las contribuciones de  $T_1$  o de  $T_2$ , empleando secuencias de pulsos específicas, como la secuencia de inversión-recuperación (IR), o la secuencia del eco de espín (SE),

respectivamente, entre otras (Bydder et al., 1998; Frahm y Häenicke, 1998).

La imagen de resonancia magnética descrita por Lauterbur, implica localizar en el espacio tridimensional, la localización de un voxel (volume element) de la muestra, en un pixel (picture element) de la imagen (Wood y Wehrl, 1998). Para ello, propuso codificar las tres coordenadas del espacio, mediante la aplicación de gradientes magnéticos ortogonales diferentes. Las coordenadas  $z$  y  $x$ , se codifican mediante los gradientes de campo magnético  $G_z$  y  $G_x$ , respectivamente. Esto ocurre, porque la frecuencia de resonancia de cada voxel  $i$  es dependiente del campo magnético aplicado según la ecuación

$$h\nu_i = \gamma (B_0 + G_z x)_i$$

Así, es posible seleccionar en el espacio la posición de la sección del corte (dirección  $z$ ) y la dirección horizontal de la imagen (dirección  $y$ ). La dirección vertical de la imagen se codifica mediante un gradiente de fase, un descubrimiento trascendental de Lauterbur, que muy posiblemente le permitió resolver tridimensionalmente la imagen y alcanzar el premio Nobel. Este gradiente, no afecta a la frecuencia de resonancia, sino a la fase de la señal recibida, que puede manipularse mediante aplicación de un gradiente magnético ( $G_y$ ) perpendicular a los otros dos. Así, la imagen de resonancia magnética, es el resultado de la aplicación de tres gradientes; el gradiente de selección de sección ( $G_z$ ), el gradiente de lectura ( $G_x$ ) y el gradiente de fase ( $G_y$ ). La resolución de la imagen depende de la fuerza de los gradientes aplicados y de las propiedades magnéticas de la muestra, pudiendo alcanzar pixeles de escasos micrones con gradientes magnéticos lo suficientemente intensos. En esto, la imagen de resonancia magnética es completamente diferente de las radiaciones nucleares, ultravioleta, visibles y ultrasonidos, donde la resolución de la imagen está determinada principalmente por la longitud de onda de la radiación utilizada, según las leyes de refracción y reflexión de ondas y las propiedades de la muestra. Dado que la resolución de la imagen de resonancia magnética depende de la intensidad de los gradientes aplicados, y no de la longitud de onda de la radiación de excitación, es posible alcanzar resoluciones muy elevadas, independientemente de que la longitud de onda de las radiofrecuencias utilizadas este en el rango 10-100 m.

En general, las imágenes se pueden descomponer en millares de ondas de tipo seno, o coseno, variables en el tiempo, con diferente frecuencia y orientación (Wood y Wehrli, 1998). La herramienta matemática que expresa la relación entre las dos maneras de expresar la misma información, en el dominio del tiempo, y en el dominio de la frecuencia  $\nu$ , es la Transformada de Fourier. Esta transformación matemática, descompone las señales adquiridas en el dominio del tiempo, en una distribución de señales de tipo seno o coseno de diferentes frecuencias. Más concretamente, la Transformada de Fourier de una función continua  $F(k)$  es:

$$F(k) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x)e^{-i2\pi kx} dx$$

donde  $k$  representa la coordenada de la señal en el espacio de la frecuencia (o espacio  $k$ ). En MRI, la señal que se pretende descomponer, es el eco que contiene la información codificada en frecuencia y fase, necesaria para reconstruir la imagen. Después de la aplicación del “gradiente de selección” de sección, todos los espines en la sección precesan a la misma frecuencia y fase definidas por la frecuencia de excitación y la intensidad del gradiente. En este punto, todos los protones de la muestra parecen iguales en la Transformación de Fourier. Es la aplicación de dos gradientes adicionales, los gradientes de “fase” y de “lectura”, lo que introduce en cada pixel variaciones de frecuencia y fase que permiten reconstruir el plano seleccionado en la región de interés en sus dos direcciones  $x$  e  $y$ . Cuanto más intensos son los gradientes aplicados, mayor es la separación alcanzada entre los espines codificados. La señal final de resonancia se adquiere en forma de eco, que incluye así todas las frecuencias de la muestra con diferentes amplitudes y fases en las tres direcciones del espacio. Esta señal compleja se amplifica, digitaliza y se desmantela en sus componentes individuales mediante el análisis de Fourier, transformando todo el espacio  $k$  adquirido en la imagen MRI que visualizamos.

Las fuentes primarias del contraste endógeno MRI en los tejidos, son las densidades de protones (NH), el tiempo de relajación longitudinal ( $T_1$ ) y el tiempo de relajación transversa ( $T_2$ ) (Hendrick, 1998). Se pueden encontrar además otras fuentes de contraste como el flujo, la susceptibilidad magnética, la difusión del agua, aunque sus efectos sobre el contraste observado son menores. El contraste  $C_x$

entre dos tejidos A y B se puede expresar como  $C_x = (x_A - x_B) / (x_B + x_A)$ , donde x representa la fuente de contraste evaluada. En general, las propiedades inherentes del contraste endógeno entre los tejidos, permanecen constantes, independientemente del método de imagen MRI utilizado, aunque conviene mencionar que los tiempos de relajación  $T_1$  y  $T_2$  aumentan con campos magnéticos estáticos crecientes.

La señal MRI ( $S(TE, TR)$ ) en una secuencia de eco de espín, depende de los parámetros magnéticos endógenos del tejido, como su densidad protónica  $N(H)$ , sus tiempos de relajación  $T_1$  y  $T_2$  y también de las condiciones instrumentales exógenas de la adquisición  $TR$  y  $TE$ ;

$$S(TE, TR) = N[H] [1 - 2 e^{-(TR-TE/2)/T_2} + e^{-TR/T_1}] e^{-TE/T_2}$$

Así, variando los parámetros de adquisición  $TE$  y  $TR$ , la secuencia de eco de espín se puede utilizar para enfatizar cambios en  $T_1$ ,  $T_2$  o  $N[H]$ , entre diferentes tejidos (Figura 8). Por tanto, el contraste de MRI depende al menos cinco parámetros, tres endógenos determinados por el tejido y dos instrumentales, seleccionados por el operador. Esta versatilidad en la generación del contraste es muy superior al resto de las imágenes médicas, cuyo contraste se basa principalmente en una única propiedad del tejido, como por ejemplo, la densidad a la transmisión de electrones en las imágenes de rayos X.

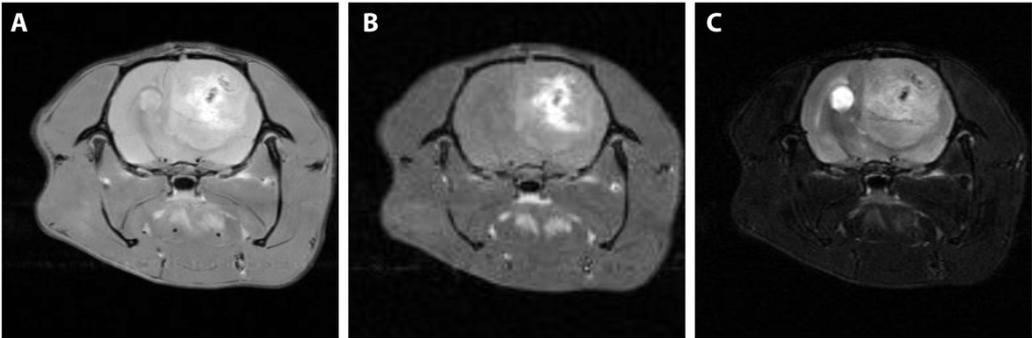


Figura 8. Imágenes representativas MRI de eco de espín de un cerebro de rata con un tumor C6 implantado ponderadas en densidad protónica (A), ponderadas en  $T_1$  con contraste de Gd (III) DTPA (B) y ponderadas en  $T_2$  (C). Cortesía de Teresa Navarro, del Servicio de Imagen y Espectroscopía por Resonancia Magnética del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”.

Existen numerosas secuencias de adquisición MRI que enfatizan otros parámetros endógenos del tejido, como la susceptibilidad magnética o la imagen de difusión, o proporcionan métodos de adquisición rápida y super-rápida, que permiten adquirir imágenes completas de MRI en escasos milisegundos. Sus fundamentos son demasiado complicados para ser desarrollados adecuadamente aquí. El lector interesado puede encontrar descripciones excelentes de estas técnicas en las referencias (Bradley et al., 1998; Bydder et al., 1998; Frahm y Häenicke, 1998).

Las imágenes MRI pueden clasificarse en estructurales y funcionales. Las estructurales son imágenes MRI, ponderadas en  $T_1$  o  $T_2$ . Las imágenes ponderadas en  $T_2$  (Figura 8A), presentan una elevada resolución anatómica y pueden revelar estructuras de muy pequeño tamaño, como el hipotálamo y los núcleos sub-hipotalámicos. En estas imágenes las zonas con  $T_2$  más elevado, como los ventrículos cerebrales o zonas inflamadas aparecen como hiper-intensas, mientras que las zonas con menores valores de  $T_2$ , como el tejido cerebral aparecen como hipo-intensas. Dado que los diversos tejidos muestran un rango muy amplio de valores de  $T_2$ , es posible resolver muy satisfactoriamente y de manera completamente no invasiva, la heterogeneidad tisular y sus patologías en todos los tejidos blandos.

Las imágenes ponderadas en  $T_1$ , presentan una resolución anatómica inferior a las de  $T_2$ , pero permiten resolver con mayor facilidad las áreas donde se acumulan agentes de contraste paramagnético, lo que les confiere un gran valor funcional. En estas imágenes, las zonas de elevado  $T_1$  aparecen como hipo-intensas y las zonas con valores inferiores, como hiper-intensas. Así, los ventrículos cerebrales que contienen el líquido cefalorraquídeo, aparecen como hiper-intensas o brillantes, en las imágenes de  $T_2$  o hipo-intensas u oscuras en las imágenes pesadas en  $T_1$ . Dado que la administración de agentes de contraste paramagnético, disminuye los valores de  $T_1$  de las zonas donde se acumulan, estas aparecen muy brillantes e hiper-intensas en la imagen, permitiendo localizar muy fácilmente, por su brillo característico, las zonas inflamadas de permeabilidad capilar incrementada o las roturas de la barrera hemato-encefálica (Figura 8B). En este sentido, conviene mencionar que las imágenes pesadas en  $T_1$ , adquiridas después de la administración de un agente de contraste paramagnético, permiten evaluar cuantitativamente la perfusión sanguínea en los diversos tejidos mediante la técnica DCE (Dynamic Contrast

Enhanced) MRI. Este permite determinar no invasivamente, el flujo sanguíneo cerebral (CBF, Cerebral Blood Flow), el volumen sanguíneo cerebral (CBV, Cerebral Blood Volume) y el tiempo de tránsito medio (Mean Transit Time) en la región seleccionada.

Las técnicas funcionales incluyen principalmente las imágenes BOLD (Blood Oxygenation Dependent MRI) y las imágenes ponderadas en difusión DWI (Diffusion Weighted Imaging). Las imágenes BOLD, son imágenes pesadas en  $T_2^*$ , que revelan cambios en la susceptibilidad magnética de los tejidos. Se utilizan principalmente para detectar las zonas de activación cerebral, sensorial o motora, por el incremento en la oxigenación y la perfusión sanguínea asociados fisiológicamente a la activación neuronal. Los cambios en contraste BOLD se producen principalmente por los cambios en las propiedades magnéticas de la hemoglobina en el proceso de oxigenación/desoxigenación. La desoxi-hemoglobina, contiene  $Fe^{3+}$  y es paramagnética, mientras que la oxihemoglobina contiene  $Fe^{2+}$  y es diamagnética. De manera simplificada, la oxigenación de la sangre induce un cambio en el estado de reducción del Fe de la hemoglobina que aumenta la intensidad de las imágenes ponderadas en  $T_2^*$ . En las zonas de activación cerebral, se produce un incremento en el consumo de oxígeno sanguíneo, que aumenta la proporción de desoxihemoglobina, aumentando su paramagnetismo y la intensidad de las imágenes BOLD. Este efecto, se acompaña por incremento reactivo en el flujo sanguíneo microvascular inducido por la desoxigenación, que acentúa aún más la hiper-intensidad. Es difícil discriminar entre la contribución relativa del cambio de susceptibilidad magnética de la hemoglobina y las alteraciones en la perfusión sanguínea, por lo que bastará convenir por ahora, que las imágenes BOLD reflejan cambios complejos en la hemodinámica asociada a la activación neuronal.

Las imágenes ponderadas en difusión, permiten detectar cambios en la difusión browniana del agua en los tejidos (Attenberger et al., 2009; Holdsworth y Bammer, 2008; Hussain et al., 2010). Se basan normalmente en la secuencia de Stejskal-Tanner, una modificación de la secuencia del eco de espín, que coloca un gradiente de sensibilización a la difusión, entre los pulsos de  $90^\circ$  y  $180^\circ$ , permitiendo así evaluar la difusión del agua o los metabolitos. Dado que el gradiente de difusión se puede orientar en cualquier dirección del espacio, es posible medir la difusión del agua en múltiples direcciones, como realiza la técnica DTI (Diffusion Tensor Imaging). La

expresión que relaciona los cambios en intensidad de la señal MRI en presencia  $S(\delta, \Delta, G)$  y ausencia  $S(0)$  con el coeficiente de difusión del agua ADC es;

$$S(\delta, \Delta, G)/S(0) = e^{-\gamma^2 \delta^2 G^2 (\Delta - \delta/3) \text{ADC}}$$

donde,  $\Delta$  representa el tiempo de difusión explorado,  $\delta$  la duración del pulso del gradiente de difusión y  $G$  su intensidad. De hecho, la expresión  $\gamma^2 \delta^2 G^2 (\Delta - \delta/3)$  se denomina abreviadamente como “valor b” (en honor a Denis Le Bihan), y define el grado de sensibilización a la difusión del método. Los valores “altos de b” (100-3000 s.mm<sup>2</sup>) reflejan intensidades y duración elevadas del gradiente de difusión, mientras que los valores “bajos de b” (1-100 s.mm<sup>2</sup>) están asociados a duraciones e intensidades más pequeñas. Los valores “bajos de b” codifican movimientos muy rápidos de la molécula de agua, como los observados en el flujo microvascular, mientras que los valores “altos de b”, enfatizan los movimientos más lentos de la difusión del agua en los tejidos.

La interpretación de las imágenes de difusión es compleja, porque aún no disponemos de modelos matemáticos optimizados para interpretar la difusión del agua en las células y tejidos *in vivo*. En general se acepta que los valores “altos de b” miden el coeficiente de difusión del agua en el espacio extravascular y los valores “bajos de b” miden el flujo sanguíneo microvascular.

La imagen pesada en difusión ha alcanzado un desarrollo notable en los últimos años, porque la mayoría de las enfermedades están asociadas a cambios en la difusión del agua en los tejidos. Así, la difusión del agua, está muy relacionada con la celularidad del tejido, con valores más pequeños de ADC en los entornos de celularidad elevada como las zonas de crecimiento de los tumores y más elevados en sus centros necróticos. También se releja en el coeficiente de difusión las zonas de isquemia cerebral o miocárdica, donde las zonas de inflamación peri-necrótica o “penumbras” están asociadas a coeficientes de difusión más reducidos.

Finalmente, aunque desde el principio se estableció que las imágenes MRI estaban dotadas inherentemente de un elevado contraste endógeno, se han desarrollado numerosas generaciones de agentes de contraste que permiten resaltar su contraste mediante la

administración de agentes de contraste exógenos (Strijkers et al., 2007). Los agentes de contraste para resonancia magnética pueden clasificarse en paramagnéticos y super-paramagnéticos. Los agentes paramagnéticos utilizan metales paramagnéticos, normalmente de la serie de la tierras raras como Gd(III) y Dy(III), o sus complejos con ligandos lineales como el DTPA (ácido dietilen-triamino-pentaácetico) o macrocíclicos como el DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacetico). Todos ellos reducen los tiempos de relajación del agua tisular en las regiones donde se acumulan, que aparecen como hiper-intensas en secuencias ponderadas en  $T_1$ . Tan solo los quelatos resultan de utilidad clínica, pues los metales libres son tóxicos por su competencia con iones fisiológicos como el  $Ca^{2+}$  o el  $Mg^{2+}$ . Merece resaltarse que las concentraciones de quelatos de Gd(III) necesarias para resaltar la intensidad de imágenes MRI, está en el rango mM, por lo que hace necesario administrar intravenosamente dosis muy altas, del orden de 0.5M para alcanzar contrastes apreciables.

Los agentes de contraste super-paramagnéticos son nanopartículas super-paramagnéticas, normalmente constituidas por cristales de óxidos ferroso-férricos o magnetitas ( $Fe_3O_4$ ) recubiertos de derivados de dextrano. Normalmente, las nano-partículas super-paramagnéticas suelen clasificarse por su tamaño, como nano-partículas super-paramagnéticas pequeñas (SPIO, Super-Paramagnetic Iron Oxide) con tamaños entre 100-200 nm, o ultra-pequeñas (USPIO, ultra-small super-paramagnetic iron oxide nano-particles) con tamaños entre 5 y 50 nm, normalmente. Las nano-partículas SPIO pueden contener en su interior varios cristales de  $Fe_3O_4$ , mientras que las nano-partículas USPIO, suelen contener solo un cristal de  $Fe_3O_4$ . Las partículas super-paramagnéticas inducen principalmente una reducción en  $T_2$ , sin afectar significativamente, a bajas concentraciones, los valores de  $T_1$ . Así, las regiones de tejido que acumulan nano-partículas super-paramagnéticas, aparecen como hipo-intensas en imágenes ponderadas en  $T_2$  o  $T_2^*$ .

La primera generación de los agentes de contraste para MRI, adolece de defectos importantes en sensibilidad y especificidad. Estos inconvenientes se han intentado superar desarrollando agentes nanoparticulados más sensibles y específicos. Es particular, se han acoplado numerosas unidades de Gd(III)DTPA o Gd(III)DOTA a proteínas inmunodirigidas, mejorando simultáneamente la relajatividad

del agente y su especificidad por determinados antígenos tisulares. Análogamente, se han decorado nano-partículas superparamagnéticas, con anticuerpos específicos o péptidos direccionales, permitiendo la detección de la expresión de antígenos específicos en determinadas enfermedades (Atanasijevic y Jasanoff, 2007; Atanasijevic et al., 2006; Atanasijevic et al., 2010; Jasanoff, 2005).

Las nuevas nano-formulaciones de los agentes de contraste están abriendo una nueva época en este campo (Gao et al., 2016; Kobayashi y Brechbiel, 2005). Así, ha resultado posible encapsular agentes de contraste y agentes terapéuticos en liposomas, constituyendo las primeras generaciones de nano-medicinas cuyo destino puede ser visualizado no invasivamente mediante MRI. Los liposomas de transporte pueden ser modificados para incluir sensores que liberen la carga interna en respuesta a estímulos del entorno, como el pH, la temperatura o la presencia de determinados metales.

Finalmente, es interesante resaltar aquí la detección de la liberación de dopamina en el Sistema Nervioso Central, utilizando un análogo de serotonina marcado con Gd(III)DOTA, empleando una estrategia de competición entre el ligando sintético y el endógeno, por su fijación al receptor (Lee et al., 2014). Este abordaje podría permitir en el futuro la detección no invasiva de la neurotransmisión glutamérgica o gabaérgica, abriendo una nueva era en neurociencia.

## **Imagen Híbrida**

Las secciones anteriores han mostrado que no existe una sola técnica de imagen que reúna todas las características necesarias para que sea considerada óptima. Las técnicas de imagen nuclear muestran una elevada sensibilidad, pero una resolución muy limitada. Las técnicas de imagen por rayos X, presentan una elevada resolución espacial, pero una especificidad limitada. Las modalidades de imagen óptica presentan una elevada sensibilidad, pero una penetración muy reducida y finalmente las técnicas MRI, aunque muestran una elevada resolución espacial, adolecen de una sensibilidad muy reducida. Por todo ello, resultaría muy útil combinar dos o más técnicas de imagen para compensar las deficiencias de unas con las ventajas de las otras (Hricak et al., 2010). La asociación de diversas modalidades sobre una única imagen, se contempla como un efecto sinérgico, muy superior a la simple adición de los dos, o más, tipos de imágenes que la integran.

En particular resultan interesantes las combinaciones de imágenes que proporcionan resolución anatómica, con imágenes que proporcionan información funcional. Así resultaría muy ventajoso combinar imágenes anatómicas de rayos X o de MRI, con imágenes funcionales PET, SPECT u ópticas.

Los primeros intentos de imagen híbrida comercial comenzaron combinando la elevadísima sensibilidad de las técnicas de imagen nuclear PET o SPECT, con la gran resolución anatómica de la imagen por rayos X (Tudisca et al., 2015). Las plataformas integradas desplazaban la muestra primero a través de los cabezales rayos X y SPECT, muchas veces combinados sobre el mismo arnés, y después sobre la corona de detectores PET. Desde entonces, la combinación PET/CT se ha establecido como el método de imagen PET de elección.

Más recientemente se han propuesto las combinaciones PET/MRI (Antoch y Bockisch, 2009; Fraum et al., 2016). Estas plataformas pueden contemplar la adquisición PET y MRI de manera concatenada, en aparatos independientes, bien trasladando el paciente de uno a otro, o bien integrada y simultánea, donde la corona de detectores PET se localiza en el interior del imán MRI. Esta última permite, prácticamente con simultaneidad, la adquisición de las imágenes PET y MRI, aunque muchas veces la calidad de las imágenes MRI se degrada por la presencia de la sonda PET integrada y viceversa. Otro inconveniente de esta combinación es la dificultad de realizar la corrección de atenuación, una operación necesaria y de más fácil realización en la combinación PET/CT.

La imagen foto-acústica, combina las ventajas de la imagen de ultrasonidos, con las de la imagen óptica y ha progresado sensiblemente en la última década (Wang et al., 2002; Xu y Wang, 2006). Su principal ventaja es la utilización de radiaciones de excitación de muy baja energía, como los ultrasonidos, muy lejos de la gran deposición de energía de los rayos X o la medicina nuclear. Por otro lado, su principal limitación incluye la escasa penetración de la radiación luminosa en los tejidos, a pesar de lo cual ha encontrado interesantes aplicaciones en imagen de la piel y sus patologías, de la glándula mamaria y sus patologías o de pequeños animales.

Aunque no utilizan la imbricación de dos tipos de imagen, las técnicas opto-genéticas han causado recientemente una importante

revolución en neurociencia (Deisseroth, 2011; Fenno et al., 2011). Este abordaje combina la expresión de genes de opsina con proteínas específicas, de manera que los aductos pueden ser “activados” o “inhibidos” por pulsos de luz de una, o más, longitudes de onda. Así, resulta posible hoy, dirigir la expresión de proteínas acopladas a opsina, a neuronas específicas, haciéndolas disparar o inhibirse, en respuesta a estímulos luminosos. Aunque los experimentos iniciales utilizaban neuronas en cultivo, su utilización ha progresado a animales in vivo y microscopías multi-fotón.

## EPILOGO

En los párrafos anteriores he presentado brevemente la historia y los fundamentos de la imagen moderna, así como sus aplicaciones más importantes a la biomedicina. En este contexto, creo que todos convendríamos fácilmente hoy, que ni el propio Roentgen podía anticipar, a comienzos del siglo XX, cuál sería el desarrollo de la imagen médica en nuestros días. La imagen biomédica actual se ha extendido a todas las regiones del espectro electromagnético, desde la radiación nuclear, hasta las ondas de radiofrecuencia, o sus formas híbridas. Sus marcadores se han combinado con precursores genéticos que permiten la expresión controlada de las sondas en determinados órganos u organelos subcelulares. Esta evolución espectacular, se ha reconocido desde entonces con la concesión de hasta veintidos premios Nobel que abarcan desde la Física a la Química o la Medicina.

El conocimiento adquirido en este periodo, configura un vasto progreso que, no sólo ha cambiado los procedimientos y mejorado la eficacia de la medicina moderna, sino que se ha extendido a muchas otras áreas de la sociedad, configurando toda una época dominada por la utilización de las imágenes y que hoy hemos conocido como “La era de la imagen”. Estoy seguro, de que si pudiéramos mirar al desarrollo de la imagen desde la perspectiva del siglo XXII, quedaríamos aún más sorprendidos de lo que hoy estaría Roentgen, al visualizar los desarrollos que aún no se habían producido, pero cuyo germen ya esta depositado. Sin embargo, quizás sea recomendable ahora recordar a este respecto la famosa frase de Mario Benedetti,

*“Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas, de pronto, cambiaron todas las preguntas.”*

En efecto, la imagen del futuro tendrá que utilizar la experiencia acumulada para responder a nuevas necesidades. En este sentido es fácil prever que la necesidad de incrementar el contenido informativo de las imágenes requerirá la utilización combinada de diversas modali-

dades. Ya no será suficiente obtener una información anatómica sobre la localización de las lesiones, sino que resultará necesario proporcionar un diagnóstico molecular no-invasivo, individualizado para cada paciente, de cada patología examinada. Esto requerirá que los desarrollos “en paralelo” de las diversas modalidades de imagen, tal y como los conocemos hoy, se transformen en “convergentes”, primero combinando dos modalidades de imagen como hemos indicado, y posteriormente, permitiendo la combinación de todas las modalidades de imagen en una imagen integral del sujeto explorado, cubriendo todo el espectro electromagnético. Esto podría conducir al desarrollo de nuevas plataformas de imagen integral, donde la utilización de un sólo tomógrafo multimodal pudiera proporcionar todas las imágenes del espectro electromagnético, resaltadas o no, por nuevos agentes de contraste multimodalidad, hiperselectivos para cada patología e individuo.

Más aún, la simple detección de la patología en el acto médico de la imagen, podría no resultar suficiente en el futuro. Resultará vital entonces, disminuir drásticamente todos los costes de la medicina, combinado lo más eficientemente posible y en una sola actuación, los procedimientos de diagnóstico con los abordajes terapéuticos. Esta nueva aproximación médica, conocida como imagen teragnóstica, combinará los medicamentos con sondas de imagen multimodal visualizables no-invasivamente, permitiendo así observar de manera cuantitativa, si el medicamento utilizado ha llegado a su lugar de acción, su concentración local y si ha producido el efecto deseado. Este mismo abordaje, permitirá utilizar células troncales modificadas adecuadamente y marcadas con sondas de imagen no-invasiva, para reparar tejidos dañados de manera fácilmente visualizable, en cualquier lugar de nuestra anatomía. Así mismo, podría resultar posible utilizar la expresión de terapias génicas avanzadas para expresar, o inhibir la expresión, de los transgenes administrados en respuesta a las radiaciones electromagnéticas utilizadas para obtener la imagen. Los nuevos abordajes optogenéticos, donde se co-expresan genes espe-

cíficos acoplados a la expresión de opsinas, representan un claro precedente en esta dirección.

Debo terminar ahora, y deseo hacerlo con otra frase célebre del preclaro escritor uruguayo Mario Benedetti, que resume convenientemente este discurso;

*“Algunas cosas del pasado desaparecieron, pero otras abren una brecha al futuro y son esas las que hoy quiero rescatar.”*

He dicho.



## BIBLIOGRAFÍA

- Abragam, A. (1983). Principles of Nuclear Magnetism. (Oxford: Oxford University Press).
- Antoch, G., Bockisch, A. (2009). Combined PET/MRI: a new dimension in whole-body oncology imaging. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 36 Suppl 1, S113-120.
- Aoki, K., Kamioka, Y., Matsuda, M. (2013). Fluorescence resonance energy transfer imaging of cell signaling from in vitro to in vivo: basis of biosensor construction, live imaging, and image processing. *Development, Growth & Differentiation* 55, 515-522.
- Aoki, K., Matsuda, M. (2009). Visualization of small GTPase activity with fluorescence resonance energy transfer-based biosensors. *Nature Protocols* 4, 1623-1631.
- Assmus, A. (1995). Early History of X-Rays. *Beam Line Summer 1995*, 10-24.
- Atanasijevic, T., Jasanoff, A. (2007). Preparation of iron oxide-based calcium sensors for MRI. *Nature Protocols* 2, 2582-2589.
- Atanasijevic, T., Shusteff, M., Fam, P., Jasanoff, A. (2006). Calcium-sensitive MRI contrast agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles and calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 14707-14712.
- Atanasijevic, T., Zhang, X.A., Lippard, S.J., Jasanoff, A. (2010). MRI sensing based on the displacement of paramagnetic ions from chelated complexes. *Inorganic Chemistry* 49, 2589-2591.
- Attenberger, U.I., Runge, V.M., Stemmer, A., Williams, K.D., Naul, L.G., Michaely, H.J., Schoenberg, S.O., Reiser, M.F., Wintersperger, B.J. (2009). Diffusion weighted imaging: a comprehensive evaluation of a fast spin echo DWI sequence with BLADE (PROPELLER) k-space sampling at 3 T, using a 32-channel head coil in acute brain ischemia. *Investigative Radiology* 44, 656-661.
- Bar-Shalom, R., Valdivia, A.Y., Blaufox, M.D. (2000). PET imaging in oncology. *Seminars in Nuclear Medicine* 30, 150-185.

- Basu, S., Kwee, T.C., Surti, S., Akin, E.A., Yoo, D., Alavi, A. (2011). Fundamentals of PET and PET/CT imaging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1228, 1-18.
- Beer, A.J., Niemeyer, M., Carlsen, J., Sarbia, M., Nahrig, J., Watzlowik, P., Wester, H.J., Harbeck, N., Schwaiger, M. (2008). Patterns of alphavbeta3 expression in primary and metastatic human breast cancer as shown by 18F-Galacto-RGD PET. *Journal of Nuclear Medicine* : official publication, Society of Nuclear Medicine 49, 255-259.
- Belhocine, T., Spaepen, K., Dusart, M., Castaigne, C., Muylle, K., Bourgeois, P., Bourgeois, D., Dierickx, L., Flamen, P. (2006). 18FDG PET in oncology: the best and the worst (Review). *International Journal of Oncology* 28, 1249-1261.
- Bhidayasiri, R., Chotipanich, C., Joutsa, J., Tepmongkol, S., Wannachai, N., Johansson, J., Juiklom, W., Rinne, J.O. (2012). Boxing and Parkinson disease: a link or a myth? An 18F-FDOPA PET/CT study in retired Thai traditional boxers. *Parkinsonism & Related Disorders* 18, 694-696.
- Bizzarri, R., Serresi, M., Luin, S., and Beltram, F. (2009). Green fluorescent protein based pH indicators for in vivo use: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393, 1107-1122.
- Bolton, A.E., Hunter, W.M. (1973). The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a 125I-containing acylating agent. *The Biochemical Journal* 133, 529-539.
- Bourgeois, M., Rajerison, H., Guerard, F., Mouglin-Degraef, M., Barbet, J., Michel, N., Cherel, M., Faivre-Chauvet, A. (2011). Contribution of [64Cu]-ATSM PET in molecular imaging of tumour hypoxia compared to classical [18F]-MISO--a selected review. *Nuclear Medicine Review. Central & Eastern Europe* 14, 90-95.
- Bradley, W.G. (2008). History of medical imaging. *Proceedings of the American Philosophical Society* 152, 349-361.
- Bradley, W.G., Chen, D.-Y., Atkinson, D.J., Edelman, R.R. (1998). Fast Spin-Echo and Echo-Planar Imaging. In *Magnetic resonance imaging*. D.D. Stark, and W.G. Bradley, eds. (St. Louis, Missouri: Mosby), pp. 125-157.

- Brogsitter, C., Zophel, K., Kotzerke, J. (2013). 18F-Choline, 11C-choline and 11C-acetate PET/CT: comparative analysis for imaging prostate cancer patients. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 40 Suppl 1, S18-27.
- Brownell, G.L. (1999). A history of positron emission tomography. Presentation prepared in celebration of the 50th year of services by the author to the Massachusetts General Hospital on October 15th, 1999.
- Bybel, B., Brunken, R.C., DiFilippo, F.P., Neumann, D.R., Wu, G., Cerqueira, M.D. (2008). SPECT/CT imaging: clinical utility of an emerging technology. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 28, 1097-1113.
- Bydder, G.M., Hajnal, J.V., Young, I.R. (1998). Use of the Inversion Recovery Pulse Sequence. In *Magnetic resonance imaging*. D.D. Stark, and W.G. Bradley, eds. (St. Louis, Missouri: Mosby), pp. 69-86.
- Carlsen, E.N. (1975). Ultrasound physics for the physician. A brief review. *Journal of Clinical Ultrasound* : JCU 3, 69-75.
- Carson, C. (2000). The origins of the quantum theory. *Beamline*, 6-19.
- Close, D.M., Xu, T., Sayler, G.S., Ripp, S. (2011). In vivo bioluminescent imaging (BLI): noninvasive visualization and interrogation of biological processes in living animals. *Sensors* 11, 180-206.
- Chan, V., Perlas, A. (2011). Basics of Ultrasound Imaging. In *Atlas of Ultrasound-Guided Procedures in Interventional Pain Management*. S.N. Narouze, ed. (Springer Science+Business Media), pp. 13-19.
- Chen, C.K. (2005). The vertebrate phototransduction cascade: amplification and termination mechanisms. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 154, 101-121.
- Chisima, T., Miyagi, Y., Wang, X., Yamaoka, H., Shimada, H., Moossa, A.R., Hoffman, R.M. (1997). Cancer invasion and micrometastasis visualized in live tissue by green fluorescent protein expression. *Cancer Res.* 57, 2042-2047.

- Damadian, R., Zaner, K., Hor, D., Dimaio, T. (1973). Human tumors by NMR. *Physiological Chemistry and Physics* 5, 381-402.
- Deisseroth, K. (2011). Optogenetics. *Nature Methods* 8, 26-29.
- Doty, F.D., Entzminger, G., Kulkarni, J., Pamarthy, K., Staab, J.P. (2007). Radio frequency coil technology for small-animal MRI. *NMR in biomedicine* 20, 304-325.
- Dunet, V., Pomoni, A., Hottinger, A., Nicod-Lalonde, M., Prior, J.O. (2016). Performance of 18F-FET versus 18F-FDG-PET for the diagnosis and grading of brain tumors: systematic review and meta-analysis. *Neuro-oncology* 18, 426-434.
- Dunet, V., Rossier, C., Buck, A., Stupp, R., Prior, J.O. (2012). Performance of 18F-fluoro-ethyl-tyrosine (18F-FET) PET for the differential diagnosis of primary brain tumor: a systematic review and Metaanalysis. *Journal of Nuclear Medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 53, 207-214.
- Edelman, R.R. (2014). The history of MR imaging as seen through the pages of radiology. *Radiology* 273, S181-200.
- Ernst, R.R., Wokaun, A., Bodenhausen, G. (1990). Principles of Nuclear Magnetic Resonance in one and two dimensions. (Oxford: Oxford University Press).
- Fenno, L., Yizhar, O., Deisseroth, K. (2011). The development and application of optogenetics. *Annual Review of Neuroscience* 34, 389-412.
- Frahm, J., Häenicke, W. (1998). Rapid Scan Techniques. In Magnetic resonance imaging. D.D. Stark, and W.G. Bradley, eds. (St. Louis, Missouri: Mosby), pp. 87-124.
- Fraum, T.J., Fowler, K.J., McConathy, J. (2016). PET/MRI:: Emerging Clinical Applications in Oncology. *Academic Radiology* 23, 220-236.
- Fu, Y., Yau, K.W. (2007). Phototransduction in mouse rods and cones. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 454, 805-819.

- Gao, Z., Ma, T., Zhao, E., Docter, D., Yang, W., Stauber, R.H., Gao, M. (2016). Small is Smarter: Nano MRI Contrast Agents - Advantages and Recent Achievements. *Small* 12, 556-576.
- Gengsheng, L.Z., Galt, J.R., Wernick, M.N., Aarsvold, J.N. (2004). Single-Photon Emission Tomography. (London: Elsevier Academic Press).
- Gessner, R., Dayton, P.A. (2010). Advances in molecular imaging with ultrasound. *Molecular imaging* 9, 117-127.
- Glaudemans, A.W., Enting, R.H., Heesters, M.A., Dierckx, R.A., van Rheeën, R.W., Walenkamp, A.M., Slart, R.H. (2013). Value of <sup>11</sup>C-methionine PET in imaging brain tumours and metastases. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 40, 615-635.
- Gore, J.C., Kennan, R.P. (1998). Physical and Physiological Basis of Magnetic Resonance. In Magnetic resonance imaging. D.D. Stark, and W.G. Bradley, eds. (St. Louis, Missouri: Mosby), pp. 33-67.
- Gross, D., Loew, L.M. (1989). Fluorescent indicators of membrane potential: microspectrofluorometry and imaging. *Methods in Cell Biology* 30, 193-218.
- Han, J., Burgess, K. (2010). Fluorescent indicators for intracellular pH. *Chemical Reviews* 110, 2709-2728.
- Hashemi, R.H., Bradley, W.G., and Lisanti, C.J. (2010). MRI: The Basics. (Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, Wolters Kluwer).
- Hendee, W.R., and Ritenour, E.R. (2002a). Medical Imaging. (New York: Wiley-Liss, Inc.).
- Hendee, W.R., Ritenour, E.R. (2002b). Medical Imaging Physics. (New York: Wiley-Liss, Inc.).
- Hendrick, R.E. (1998). Image Contrast and Noise. In Magnetic resonance imaging. D.D. Stark, and W.G. Bradley, eds. (St. Louis, Missouri: Mosby), pp. 43-67.
- Hoffman, R.M. (2005). The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer in vivo. *Nature Reviews in Cancer* 5, 796-806.

- Hoffman, R.M. (2012). Live cell Imaging in Live Animals with Fluorescent Proteins. *Methods in Enzymology* 506, 197-224.
- Holdsworth, S.J., Bammer, R. (2008). Magnetic resonance imaging techniques: fMRI, DWI, and PWI. *Seminars in Neurology* 28, 395-406.
- Hounsfield, G.N. (1980). Computed medical imaging. *Science* 210, 22-28.
- Hricak, H., Choi, B.I., Scott, A.M., Sugimura, K., Muellner, A., von Schulthess, G.K., Reiser, M.F., Graham, M.M., Dunnick, N.R., Larson, S.M. (2010). Global trends in hybrid imaging. *Radiology* 257, 498-506.
- Hubel, D.H., Wiesel, T.N. (1979). Brain mechanisms of vision. *Scientific American* 241, 150-162.
- Hussain, M.S., Bhagat, Y.A., Liu, S., Scozzafava, J., Khan, K.A., Dillon, W.P., Shuaib, A. (2010). DWI lesion volume reduction following acute stroke treatment with transient partial aortic obstruction. *Journal of Neuroimaging* : official journal of the American Society of Neuroimaging 20, 379-381.
- Ito, H., Shinotoh, H., Shimada, H., Miyoshi, M., Yanai, K., Okamura, N., Takano, H., Takahashi, H., Arakawa, R., Kodaka, F., et al. (2014). Imaging of amyloid deposition in human brain using positron emission tomography and [18F]FACT: comparison with [11C]PIB. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 41, 745-754.
- Jadvar, H. (2011). Prostate cancer: PET with 18F-FDG, 18F- or 11C-acetate, and 18F- or 11C-choline. *Journal of Nuclear Medicine* : official publication, Society of Nuclear Medicine 52, 81-89.
- Jares-Erijman, E.A., Jovin, T.M. (2003). FRET imaging. *Nature Biotechnology* 21, 1387-1395.
- Jasanoff, A. (2005). Functional MRI using molecular imaging agents. *Trends in neurosciences* 28, 120-126.
- Jaszczak, R.J. (2006). The early years of single photon emission computed tomography (SPECT): an anthology of selected reminiscences. *Physics in Medicine and Biology* 51, R99-115.

- Josserand, V., Texier-Nogues, I., Huber, P., Favrot, M.C., Coll, J.L. (2007). Non-invasive in vivo optical imaging of the lacZ and luc gene expression in mice. *Gene Therapy* 14, 1587-1593.
- Kaczor, A.A., Makarska-Bialokoz, M., Selent, J., de la Fuente, R.A., Marti-Solano, M., Castro, M. (2014). Application of BRET for studying G protein-coupled receptors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 14, 411-425.
- Kegeles, L.S., Mann, J.J. (1997). In vivo imaging of neurotransmitter systems using radiolabeled receptor ligands. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 17, 293-307.
- Kepshire, D., Mincu, N., Hutchins, M., Gruber, J., Dehghani, H., Hypnarowski, J., Leblond, F., Khayat, M., Pogue, B.W. (2009). A microcomputed tomography guided fluorescence tomography system for small animal molecular imaging. *The Review of Scientific Instruments* 80, 043701.
- Kirienko, M., Sollini, M., Lopci, E., Versari, A., Chiti, A. (2015). Applications of PET imaging with radiolabelled choline (11C/18F-choline). *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine 59, 83-94.
- Kobayashi, H., Brechbiel, M.W. (2005). Nano-sized MRI contrast agents with dendrimer cores. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 2271-2286.
- Kogan, P., Gessner, R.C., Dayton, P.A. (2010). Microbubbles in Imaging: Applications Beyond Ultrasound. *Bubble Science Engineering and Technology* 2, 3-8.
- Kumar, A., Welti, D., Ernst, R.R. (2011). NMR Fourier zeugmatography. 1975. *Journal of magnetic resonance* 213, 495-509.
- Lauterbur, P.C. (1973). Image formation by induced local interactions. Examples employing Nuclear Magnetic Resonance. *Nature* 242, 190-191.
- Lee, T., Cai, L.X., Lelyveld, V.S., Hai, A., Jasanoff, A. (2014). Molecular-level functional magnetic resonance imaging of dopaminergic signaling. *Science* 344, 533-535.

- Levi, S. (1997). The history of ultrasound in gynecology 1950-1980. *Ultrasound in Medicine & Biology* 23, 481-552.
- Lieu, D. (2010). Ultrasound physics and instrumentation for pathologists. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 134, 1541-1556.
- Loken, M.K., Williams, L.E. (1979). A history of computers in nuclear medicine. *Seminars in Nuclear Medicine* 9, 197-200.
- Lukasiak, L., Jakubowski, A. (2010). History of semiconductors. *Journal of Telecommunications and Information Technology* 1, 3-9.
- Luker, G.D., Luker, K.E. (2008). Optical imaging: current applications and future directions. *Journal of Nuclear Medicine* : official publication, Society of Nuclear Medicine 49, 1-4.
- Mait, J.N. (2006). A history of Imaging: Revisiting the Past to Chart the Future. *Optics and Photonics News February 2006*, 22-27.
- Mannu, G.S. (2014). Retinal phototransduction. *Neurosciences* 19, 275-280.
- Mansfield, P., Maudsley, A.A. (1977). Medical imaging by NMR. *The British journal of Radiology* 50, 188-194.
- Marchalonis, J.J. (1969). An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *The Biochemical Journal* 113, 299-305.
- Marchalonis, J.J., Cone, R.E., Santer, V. (1971). Enzymic iodination. A probe for accessible surface proteins of normal and neoplastic lymphocytes. *The Biochemical Journal* 124, 921-927.
- Marsden, P., Sutcliffe-Goulden, J. (2000). Principles and technology of PET scanning. *Nuclear Medicine Communications* 21, 221-224.
- Matwiyoff, N.A., Brooks, W.M. (1998). Instrumentation. In Magnetic resonance imaging. D.D. Stark, and W.G. Bradley, eds. (St. Louis, Missouri: Mosby), pp. 15-32.

- McRobbie, D.W., Moore, E.A., Graves, M.J., Prince, M.R. (2003). MRI from Picture to proton. (Cambridge: Cambridge University Press).
- Mixdorf, M.A., Goldsworthy, R.E. (1996). A history of computers and computerized imaging. *Radiologic Technology* 67, 291-296.
- Miyawaki, A., Sawano, A., Kogure, T. (2003). Lighting up cells: labelling proteins with fluorophores. *Nature Cell Biology Suppl*, S1-7.
- Miyawaki, A., Tsien, R.Y. (2000). Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein. *Methods in Enzymology* 327, 472-500.
- Moussa, R., Baierl, A., Steffen, V., Kubitzki, T., Wiechert, W., Pohl, M. (2014). An evaluation of genetically encoded FRET-based biosensors for quantitative metabolite analyses in vivo. *Journal of Biotechnology* 191, 250-259.
- Muller, C., Schibli, R. (2013). Single photon emission computed tomography tracer. Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. *Progres dans les Recherches sur le Cancer* 187, 65-105.
- Natterer, F., Wübbeling, F. (2001). Mathematical Methods of Image Reconstruction. (Philadelphia: Society for Industrial and Applied Mathematics SIAM).
- Nelson, T.R., Pretorius, D.H. (1998). Three-dimensional ultrasound imaging. *Ultrasound in Medicine & Biology* 24, 1243-1270.
- Ntziachristos, V. (2006). Fluorescence molecular imaging. *Annual Review of Biomedical Engineering* 8, 1-33.
- O'Malley, D.M., Burbach, B.J., Adams, P.R. (1999). Fluorescent calcium indicators: subcellular behavior and use in confocal imaging. *Methods in Molecular Biology* 122, 261-303.
- Ohki, K., Chung, S., Ch'ng, Y.H., Kara, P., Reid, R.C. (2005). Functional imaging with cellular resolution reveals precise micro-architecture in visual cortex. *Nature* 433, 597-603.
- Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., Nishimune, Y. (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS letters* 407, 313-319.

- Parker, R.P. (1970). Semiconductor nuclear radiation detectors. *Physics in Medicine and Biology* 15, 605-620.
- Peck, M., Pollack, H.A., Friesen, A., Muzi, M., Shoner, S.C., Shankland, E.G., Fink, J.R., Armstrong, J.O., Link, J.M., Krohn, K.A. (2015). Applications of PET imaging with the proliferation marker [18F]-FLT. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine 59, 95-104.
- Peelen, M.V., Downing, P.E. (2007). The neural basis of visual body perception. *Nature reviews. Neuroscience* 8, 636-648.
- Pfleger, K.D., Eidne, K.A. (2006). Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nature Methods* 3, 165-174.
- Prasad, S., Galetta, S.L. (2011). Anatomy and physiology of the afferent visual system. In *Handbook of clinical neurology*. C. Kennard, and R.J. Leigh, eds. (Elsevier B.V.), pp. 3-19.
- Puff, B. (2008). A light history of electromagnetic waves: waves and particles before wave-particle duality. *Colgate Academic Review* 4.
- Qiu, Y., Gigliotti, J.V., Wallace, M., Griggio, F., Demore, C.E., Cochran, S., and Trolrier-McKinstry, S. (2015). Piezoelectric micromachined ultrasound transducer (PMUT) arrays for integrated sensing, actuation and imaging. *Sensors* 15, 8020-8041.
- Quiñero, R. (2016). Neuronal codes for visual perception and memory. *Neuropsychologia* 83, 227-241.
- Reid, R.C. (2012). From functional architecture to functional connectomics. *Neuron* 75, 209-217.
- Richardson, O.W., Compton, K.T. (1912). The Photoelectric Effect. *Science* 35, 783-784.
- Schmolesky, M. (1995). The Primary Visual Cortex. In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson, eds. (Salt Lake City (UT)).

- Schoder, H., Erdi, Y.E., Larson, S.M., Yeung, H.W. (2003). PET/CT: a new imaging technology in nuclear medicine. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 30, 1419-1437.
- Schwan, H.P. (1994). History of medical and biological ultrasound at the University of Pennsylvania. *Ultrasound in Medicine & Biology* 20, 639-644.
- Seibert, J.A. (2004). X-ray imaging physics for nuclear medicine technologists. Part 1: Basic principles of x-ray production. *Journal of Nuclear Medicine Technology* 32, 139-147.
- Seibert, J.A., Boone, J.M. (2005). X-ray imaging physics for nuclear medicine technologists. Part 2: X-ray interactions and image formation. *Journal of Nuclear Medicine Technology* 33, 3-18.
- Shaner, N.C., Lin, M.Z., McKeown, M.R., Steinbach, P.A., Hazelwood, K.L., Davidson, M.W., Tsien, R.Y. (2008). Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nature Methods* 5, 545-551.
- Shaner, N.C., Steinbach, P.A., Tsien, R.Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods* 2, 905-909.
- Shrestha, D., Jenei, A., Nagy, P., Vereb, G., Szollosi, J. (2015). Understanding FRET as a research tool for cellular studies. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 6718-6756.
- Stepanenko, O.V., Stepanenko, O.V., Shcherbakova, D.M., Kuznetsova, I.M., Turoverov, K.K., Verkhusha, V.V. (2011). Modern fluorescent proteins: from chromophore formation to novel intracellular applications. *BioTechniques* 51, 313-314, 316, 318 passim.
- Stepanenko, O.V., Verkhusha, V.V., Kuznetsova, I.M., Uversky, V.N., Turoverov, K.K. (2008). Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes. *Current Protein & Peptide Science* 9, 338-369.
- Stride, E., Saffari, N. (2003). Microbubble ultrasound contrast agents: a review. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, *Journal of Engineering in Medicine* 217, 429-447.

- Strijkers, G.J., Mulder, W.J., van Tilborg, G.A., Nicolay, K. (2007). MRI contrast agents: current status and future perspectives. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry* 7, 291-305.
- Stuker, F., Ripoll, J., Rudin, M. (2011). Fluorescence molecular tomography: principles and potential for pharmaceutical research. *Pharmaceutics* 3, 229-274.
- Ter-Pogossian, M.M., Phelps, M.E. (1973). Semiconductor detector systems. *Seminars in Nuclear Medicine* 3, 343-365.
- Townsend, D.W. (2001). A combined PET/CT scanner: the choices. *Journal of Nuclear Medicine* : official publication, Society of Nuclear Medicine 42, 533-534.
- Townsend, D.W., Beyer, T. (2002). A combined PET/CT scanner: the path to true image fusion. *The British Journal of Radiology* 75 Spec No, S24-30.
- Truong, K., Ikura, M. (2001). The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo. *Current Opinion in Structural Biology* 11, 573-578.
- Truong, K., Sawano, A., Mizuno, H., Hama, H., Tong, K.I., Mal, T.K., Miyawaki, A., Ikura, M. (2001). FRET-based in vivo Ca<sup>2+</sup> imaging by a new calmodulin-GFP fusion molecule. *Nature Structural Biology* 8, 1069-1073.
- Tsien, R.Y. (1989). Fluorescent indicators of ion concentrations. *Methods in Cell Biology* 30, 127-156.
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* 67, 509-544.
- Tudisca, C., Nasoodi, A., Fraioli, F. (2015). PET-MRI: clinical application of the new hybrid technology. *Nuclear Medicine Communications* 36, 666-678.
- Vandenberghe, S., D'Asseler, Y., Van de Walle, R., Kauppinen, T., Koole, M., Bouwens, L., Van Laere, K., Lemahieu, I., Dierckx, R.A. (2001). Iterative reconstruction algorithms in nuclear medicine. *Computerized medical imaging and graphics* : the official journal of the Computerized Medical Imaging Society 25, 105-111.

- Vasquez, A. (2009). Sources, condensers and detectors: their evolution in medical imaging. *Biomedical instrumentation & technology / Association for the Advancement of Medical Instrumentation Suppl*, 37-40.
- Wang, X., Xu, Y., Xu, M., Yokoo, S., Fry, E.S., Wang, L.V. (2002). Photoacoustic tomography of biological tissues with high cross-section resolution: reconstruction and experiment. *Medical Physics* 29, 2799-2805.
- Weale, R.A. (1971). Rods and cones: a review. *Vision Research* 11, 1191-1192.
- Wood, M.L., Wehrli, F.W. (1998). Principles of Magnetic Resonance Imaging. In Magnetic resonance imaging. D.D. Stark, and W.G. Bradley, eds. (St. Louis, MO: Mosby), pp. 1-14.
- Xu, M., Wang, L.V. (2006). Photoacoustic imaging in biomedicine. *Review of Scientific Instruments* 77, 1-22.



**CONTESTACIÓN DE LA EXCMA. SRA. DÑA.**

**MARIA CASCALES ANGOSTO**

**AL DISCURSO DE INGRESO COMO ACADÉMICO DE NÚMERO  
DEL EXCMO. SR. D.**

**SEBASTIÁN CERDÁN GARCÍA-ESTELLER,**

**LEIDO EL 28 DE ABRIL DE 2016, EN LA REAL ACADEMIA  
NACIONAL DE FARMACIA, MADRID.**



Señor Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia,  
Señoras y Señores Académicos,  
Señoras y Señores

Sebastián Cerdán García Esteller ingresa hoy en la Real Academia Nacional de Farmacia y me cabe a mí el honor y la satisfacción de contestar a su discurso y darle la primera bienvenida en nombre de todos los Académicos. Son muchas las veces, que he ocupado esta Tribuna para presentar o contestar a un nuevo candidato electo de nuestra Real Academia, siempre un amigo que accedía a esta casa tras las protocolarias votaciones, avalado por un magnífico *curriculum vitae*. Tengo por tanto, suficiente experiencia en estos trances y agradezco de todo corazón a nuestro Presidente que haya delegado hoy en mí esta noble tarea. Sin embargo, el acto solemne que celebramos hoy, tiene para mí unas connotaciones muy peculiares, porque la persona que ingresa y a la que voy a contestar es, no solo un entrañable y admirado amigo que posee las cualidades antes descritas, sino que reúne además otras especiales características que hacen que este momento sea para mí de una extraordinaria trascendencia: el nuevo Académico, el profesor Sebastian Cerdán García Esteller ha sido uno de mis doctorandos.

Me encuentro ante el grato deber de poner de manifiesto ante todos ustedes los méritos profesionales y las cualidades personales de Sebastián, cualidades que le han hecho merecedor del rango de Académico de Número. Méritos tales como su formación pre y postdoctoral, su trayectoria científica, su labor de magisterio y gestión y su personalidad humana. A pesar de los fuertes vínculos de amistad y afecto que me unen al beneficiario, he de intentar a mi mejor entender, no apartarme de la objetividad necesaria para proclamar los hechos más destacados que singularizan la vida de nuestro nuevo compañero académico, para que los que me escuchan puedan juzgar la exactitud de mis afirmaciones

### **Trayectoria profesional**

Sebastián nace en Madrid en 1953, cursa sus estudios de primera y segunda enseñanza en el Colegio del Pilar (siendo

compañero de curso de José María Aznar) y termina el bachillerato con las mejores calificaciones. Estudia su carrera universitaria en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, obteniendo el grado de Licenciado en 1975 con el Premio Extraordinario de Licenciatura José Rodríguez Carracido.

Una vez terminada la Licenciatura, con una Beca de Formación del Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Educación y Ciencia, se incorpora a mi grupo en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la misma Universidad, para hacer su Tesis Doctoral, justo cuando yo acababa de volver de un sabático en Londres, en el Courtauld Institute of Biochemistry, con una beca de la Royal Society. Como en aquellos tiempos ya contábamos con un animalario propio, pudimos empezar una nueva línea de investigación sobre “Mecanismos de hepatotoxicidad en animales de experimentación”. Sebastián realizó primero su Memoria de Licenciatura (Tesina) y después su Tesis Doctoral, obteniendo en ambas la máxima calificación y Premio Extraordinario al grado de Doctor en 1978.

Con cierta nostalgia vienen ahora a mi memoria recuerdos de tiempos vividos que fueron tan felices y fructíferos por las grandes dosis de entusiasmo que poníamos en todo. Empezábamos entonces a estudiar en animales el efecto hepatotóxico de fármacos y en aquellos días intensos de actividad cuántas veces se nos hacía bien entrada la noche determinando parámetros bioquímicos en homogenados hepáticos mediante reacciones de óxido-reducción acopladas, siguiendo las técnicas de Bergmeyer, tan en boga en la década de los setenta del siglo XX. Sebastián era y seguirá siendo incansable.

Una vez terminada su Tesis y ante la imposibilidad de lograr una situación estable en el Departamento, con gran pena para mí, porque perdía a un extraordinario colaborador, se vio obligado a lo que llamamos en lenguaje coloquial “buscarse la vida”.

No había nada que él no pudiera conseguir. Se encontraba con su Título de Doctor bajo el brazo ante un mundo que había que conquistar y se puso a ello. Comenzó opositando a una plaza de profesor adjunto de Biofísica que obtuvo con el número uno. Los que me escuchan saben cuántas horas de estudio conlleva preparar una

oposición. Así consiguió ser el primer profesor de Biofísica en la Universidad Española. Se trataba de un gran reto para él, pues la Biofísica se encontraba en España entonces en ciernes y atravesaba una difícil época de limitaciones que impedían su desarrollo. Lejos de desanimarse y conformarse con esta situación y establecerse como funcionario, a verlas venir, Sebastián se marchó a los Estados Unidos donde se incorporó en uno de los grupos más competitivos de Biofísica en la Universidad de Pensilvania. Allí permaneció durante cinco años, especializándose y contribuyendo al desarrollo de la Resonancia Nuclear Magnética en Biomedicina. En este periodo obtuvo una beca internacional, que otorgaban los *National Institutes of Health* (NIH) a brillantes postdoctorales extranjeros.

Transcurridos esos 5 años, ya en España, se vuelve a presentar a unas oposiciones, esta vez para una plaza de Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, con perfil en Biofísica, plaza que obtuvo sin la menor dificultad, pero que no pudo ejercer como tal por carecer entonces de la mínima instrumentación e infraestructura necesarias para el desarrollo de su trabajo. Después del esfuerzo que supone una oposición, otro desaliento vino a frustrar sus ilusiones, pero siguió en la brecha y tuvo la suerte que las autoridades del propio Consejo, consideraron la situación y le permitieron que se trasladara a Suiza para desarrollar su labor en el Biocentro de la Universidad de Basilea, amparado por una de las becas EMBO de larga duración. En Basilea permaneció tres años.

Es, por fin, en 1988, cuando vislumbrando la posibilidad de conseguir uno de los instrumentos de Resonancia Magnética, decidió volver a España y establecer su laboratorio en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, donde empezó a poner a punto su línea de investigación, pudiendo crear así uno de los primeros grupos de investigación en Resonancia Magnética Nuclear Biomédica de nuestro país. En el transcurso del tiempo este grupo ha llegado a conseguir un alto nivel científico con repercusión internacional, que se mantiene hasta la fecha bajo su dirección.

De Científico Titular, plaza ganada por oposición pasó por concurso oposición a Investigador Científico y a Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, culminando así una trayectoria científica de excelencia.

En este momento de mi disertación, imagino que los que me escuchan estarán pensando que el devenir del Doctor Cerdán en los diez años transcurridos desde que terminó su Tesis Doctoral, hasta que pudo establecerse como grupo propio, después de dos oposiciones ganadas y dos largas estancias en extranjero, entra en al campo de lo novelesco. Diez años intensos sin perder los ánimos, con una resistencia sin límites y haciendo lo imposible para salir siempre “a flote”. Entre tanta mediocridad que nos rodea, en continua protesta, hay personas que se trazan una línea, rompen todos los moldes y consiguen lo imposible.

### **Su paso por la Academia**

Entre las muchas actividades que ha realizado nuestro recipiendario quiero citar como importantes aquellas relativas a nuestra Academia. Sebastian Cerdán García Esteller no es un extraño en esta casa. Además de su ingreso en 2010 como Académico Correspondiente, mucho antes, en 1982, recibió el Premio de la Real Academia de Farmacia. En la entrega de dicho premio en la solemne apertura de curso, Sebastián no estuvo presente por encontrarse en los Estados Unidos y fue su padre, don José Cerdán Fuentes, quien tuvo la gran satisfacción de recogerlo (como documento acreditativo existe una fotografía en los archivos de la Academia). Recuerdo que en aquella ocasión presidió el Acto Académico nuestro querido compañero Federico Mayor Zaragoza, entonces Ministro de Educación en el Gobierno de Calvo Sotelo.

### **Contribuciones científicas**

El Profesor Cerdán ha protagonizado a lo largo de su devenir en la ciencia, una evolución difícil de igualar. Aquello que comenzó investigando en mi grupo en la Facultad de Farmacia en los años 70 del pasado siglo, el papel del ciclo de las pentosas fosfato en la hepatocarcinogénesis experimental, continuó con la regulación del ciclo de la urea y de su enzima limitante, la carbamoil fosfato sintetasa I y ya en los años 80, se adentró en el estudio de la regulación *in vivo* del ciclo tricarbóxico, desarrollando en los Estados Unidos y Suiza, nuevos planteamientos utilizando la espectroscopía de Resonancia Magnética y el  $C^{13}$ . Así, sus investigaciones fueron derivando de manera paulatina, desde la bioquímica clásica, hasta las nuevas

tecnologías de la biofísica más avanzada. Estoy convencida hoy que su formación multidisciplinar como farmacéutico, unida a lo inquieto de su carácter han sido la base para poder alcanzar todas sus aspiraciones.

En los últimos años ha desarrollado una serie muy extensa de nuevas aplicaciones de la Imagen por Resonancia Magnética a la Biomedicina. Entre sus contribuciones más relevantes destacan la caracterización de la interacción metabólica *in vivo* entre neuronas y células de glía en el cerebro adulto, el desarrollo de la espectroscopía multinuclear para estudios metabólicos y más recientemente el desarrollo de nuevos abordajes de Resonancia Magnética para la caracterización fenotípica de enfermedades neurodegenerativas en animales transgénicos. De todas ellas, resaltaría la utilización del deuterio, como un isótopo complementario al  $C^{13}$  y el desarrollo de los métodos de medida de la actividad *in vivo* de la lanzadera malato aspartato, una contribución que le valió reconocimiento internacional. Su laboratorio ha sido uno de los primeros en desarrollar ésta avanzada tecnología en nuestro país.

En su vertiente de investigación aplicada, ha patentado y transferido a la industria una nueva serie de indicadores del  $pH_i$  y  $pH_e$  para  $^1H$  RMN y descrito y patentado una nueva serie de complexonas de Gd (III) con eficacia mejorada con potencial utilidad como agentes de contraste selectivo en diversas enfermedades.

Sus publicaciones incluyen aportaciones a revistas internacionales del mayor impacto. Nature Comm., JBC y PNAS, entre otras. Desde su incorporación a España, forma parte, de paneles editoriales de revistas de elevado prestigio y difusión internacional de Resonancia Magnética en Biomedicina.

Brevemente, puedo resumir ahora su actividad científica con los siguientes indicadores: dieciséis Tesis Doctorales dirigidas (cuatro en curso), seis sexenios de investigación (el último 2007-2013), citas Totales/Promedio 2736 en 5 años, publicaciones 148 e índice h 31.

Su laboratorio mantiene una intensa actividad a nivel internacional con numerosos intercambios y visitas recíprocas de investigadores europeos. Mención especial merecen la coordinación de los Proyectos con la Comunidad de Madrid y su participación en

Proyectos Europeos y su colaboración con la industria farmacéutica nacional. En resumen, su actividad científica internacional, nacional y con la industria queda reflejada en que ha sido capaz de movilizar recursos externos por más de 10 millones de euros.

## **Magisterio y Gestión**

Es momento ahora de referirme a su faceta de magisterio. Los discípulos y alumnos del Profesor Cerdán constituyen la mejor demostración de su capacidad para la enseñanza. Muchos de ellos han alcanzado puestos muy destacados. Unos en la dirección de prestigiosos centros de Resonancia Magnética en España y otros han desarrollado su carrera en el extranjero. Como ejemplo, cabe citar uno de ellos, Tiago Rodrigues, recientemente nombrado Ministro de Educación en Portugal. Estoy convencida de que ninguno de sus colaboradores hubiera alcanzado las destacadas posiciones que hoy ocupan, sin la influencia decisiva y el ejemplo de su maestro.

El Profesor Cerdán ha ostentado los siguientes cargos de gestión: Director del Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC/UAM, Secretario de la Sociedad de Biofísica de España (1996-2002), Vocal y Presidente de la Sociedad Europea de Resonancia Magnética en Biología y Medicina (1996-2000, 2004-2010), "Fellow" de la Sociedad Europea de Resonancia Magnética en Biología y Medicina, miembro del Consejo Directivo (Board of Trustees) de la Sociedad Internacional de Resonancia Magnética en Medicina y Académico correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia (2010). Estas contribuciones configuran una personalidad dialogante, con elevada eficacia gestora y con una amplia experiencia en la intermediación y en la resolución de conflictos.

## **Breve comentario a su discurso**

En el discurso protocolario de ingreso que acabamos de escuchar, Sebastián nos ha ilustrado acerca de la historia y fundamentos de la imagen biomédica. Como él ha mencionado, el desarrollo de la imagen biomédica actual, ha estado conectado con los avances en el conocimiento de la estructura de la materia, el progreso de la electrónica y los semiconductores y el desarrollo de los computadores digitales. Tomados todos ellos en conjunto, es posible contar con veintidós Premios Nobel, relacionados directa o

indirectamente con la imagen, lo que ha abierto una verdadera “Era de la Imagen” en la que nos encontramos inmersos. De hecho, la influencia de la imagen ha trascendido el ámbito científico y se ha configurado como una verdadera herramienta social, una parte esencial de nuestra civilización actual. Creo que su discurso ha proporcionado las pautas para comprender la génesis de la imagen médica en general, y visualizar su futuro en un contexto de medicina integral personalizada.

### **Aspectos de su personalidad**

Quiero resaltar algunos de los aspectos de su personalidad, a mi juicio, más importantes: en primer lugar, su compromiso y dedicación a la ciencia, un aspecto que ha constituido el pilar fundamental de su trayectoria de vida; en segundo lugar su optimismo, tesón y esfuerzo; y en tercer lugar, su lucha ante el desaliento y su pasión por las “causas perdidas”.

Sebastián es sensible, altruista y bueno, amigo real y auténtico que destaca por su nobleza. Nobleza en el sentido que la define Ortega, como la exigencia por las obligaciones en servicio de algo trascendente. Es infatigable y posee además de dinamismo, la facultad de ilusionarse por problemas de índole muy diversa. Intenta hacer bien las cosas sin preocuparse de más.

Casado con Paloma Ballesteros, compañera de curso y Catedrática de Química Orgánica de la UNED, forman una pareja muy unida en todos los aspectos de la vida, el personal y el profesional. Yo me siento muy honrada de mantener con ellos una profunda amistad a pesar de los años transcurridos.

Sebastián es muy aficionado a la naturaleza. Siempre que su trabajo se lo permite, su mayor placer es retirarse a la Sierra Madrileña de Guadarrama donde posee una casa. Le gusta pasear, incluso perderse, por el monte y disfrutar de ese enorme placer de confundirse con la naturaleza de aquellos parajes y captar la energía que el Creador ha puesto entre tanta belleza.

También es aficionado a la música toca la guitarra y la bandurria. Durante los años que cursaba la licenciatura y el doctorado formó parte de la Tuna de la Facultad de Farmacia y durante ese tiempo tuvo

innumerables amigos “tunos” entre ellos mi hermano Federico. Persona amable, simpática con gran don de gentes y muy amigo de sus amigos. En los tiempos que formaba parte de mi grupo de investigación, cuando teníamos una pequeña fiesta, Sebastián siempre nos amenizaba tocando su bandurria.

Señor Presidente, Señoras y Señores académicos, Amigos

Escuchando esta tarde en nuestra Academia el discurso de ingreso del Doctor Cerdán he sentido una gran emoción ante lo que ha supuesto su aventura profesional en el panorama que le ha tocado vivir, tan lleno de contradicciones y vicisitudes que hubieran llevado al fracaso a cualquier persona menos valiente y preparada

Es por esto que la incorporación del Sebastián Cerdán García Esteller a nuestra Academia, ocupando la medalla nº 30, es del mayor interés pues viene a llenar un hueco con un tema como la Resonancia Magnética Nuclear de tanta repercusión en el campo de la biomedicina y diagnóstico de la enfermedad. Además la actividad investigadora, tanto la básica como la aplicada del Doctor Cerdán encaja perfectamente en el grupo de nuestros Académicos que hoy en día cultivan e integran el grupo de la Biofísica. Por último, la academia se enriquece al incluir en sus filas a un profesional de la CIENCIA en mayúsculas, con una trayectoria definida, del que me siento legítimamente orgullosa, un orgullo que espero poder compartir a partir de hoy con todos ustedes al darle, con un abrazo, mi más cariñosa bienvenida.

He dicho.





