

Nuestra Facultad

TESIS DOCTORALES

ADVANTAGES AND APPLICATIONS OF QUANTITATIVE MOLECULAR IMAGING

El término imagen molecular hace referencia a toda modalidad de imagen biomédica (Figura 1) capaz de detectar y cuantificar procesos celulares in vivo de forma remota y no invasiva. La mayoría de las técnicas de imagen, hoy en día ampliamente extendidas en la práctica clínica, se han desarrollado sobre modelos preclínicos, en su mayoría roedores. Aunque son varias las modalidades englobadas bajo el término de imagen molecular éstas difieren principalmente en sus fundamentos físicos y en el tipo de información que proporcionan, anatómica (CT y RM) y/o funcional (PET, SPECT, RM y óptica).

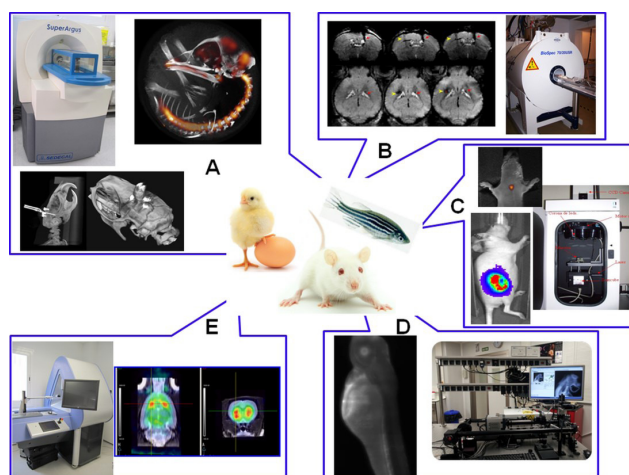


Figura 1. Modalidades de imagen molecular para pequeño animal. Ejemplos ilustrativos de la variedad de imágenes que se pueden obtener. (A) Imágenes PET-CT de la función cerebral en embriones de pollo (arriba) y CT en 3D de una cabeza de rata. (B) Imagen cerebral por RM. (C) Imagen óptica: fluorescencia (arriba) y bioluminiscencia. (D) Vista de un pez cebra vivo obtenida mediante SPIM. (E) Imagen combinada SPECT-RM del cerebro de una rata.

ADN: Ácido desoxirribonucleico

CT: Tomografía computarizada

^{18}F -FDG: 2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa

hMSCs: Células madre mesenquimales humanas

PET: Tomografía por emisión de positrones

RM: Resonancia magnética

SPECT: Tomografía por emisión de fotón único

SPIM: Microscopía de haz de láser plano

Si nos olvidamos de sus diferencias y nos centramos en el flujo de trabajo típico que encontramos cuando se hacen estudios preclínicos (con animales de experimentación) podemos simplificar el proceso en cuatro pasos (Figura 2).

Primeramente prepararemos al sujeto (paso 1); generalmente esta fase es sencilla porque suele implicar un cambio en la dieta uno o varios días antes de la imagen. El mismo día del estudio administraremos un agente de contraste o sonda (paso 2). Lo cual, simplificando mucho, nos permitirá resaltar detalles en nuestra imagen. Tras estos pasos necesitaremos de instrumentación especializada para adquirir la imagen (paso 3). En lo relativo a la instrumentación, hoy en día se aboga por la combinación de varias modalidades de imagen dentro de una misma máquina (PET-CT, PET-RM, Óptica-CT), lo que representa un reto de diseño. Por último, una vez obtenida la imagen tendremos que analizarla (paso 4). Especialmente en los estudios preclínicos, el análisis de la imagen combinará la inspección visual (altamente extendida en el diagnóstico clínico) con la obtención de valores numéricos (datos cuantitativos), lo cual puede requerir el uso de sofisticados programas informáticos. Estos valores refuerzan los hallazgos obtenidos en la inspección visual y además aportan información adicional y objetiva sobre el estado del tejido/órgano que estamos examinando.

Esta tesis se ha centrado en explorar tres estrategias para mejorar la calidad del resultado a diferentes niveles a lo largo del proceso de formación de imágenes: desde el protocolo preparatorio pre-imagen (Figura 2, paso 1), pasando por nuevas sondas moleculares de imagen (Figura 2, paso 2) y finalizando con algoritmos de post-proceso (Figura 2, paso 4). Estas estrategias se han probado en tres escenarios preclínicos distintos que respondían a tres problemas de investigación clínicos.

Hoy en día nadie puede discutir la importancia de la ^{18}F -FDG en la práctica clínica. Esta molécula (marcada radiactivamente) es captada por las células al ser muy parecida a la glucosa, especialmente por aquellas con alto metabolismo como los tumores, lo que permite su localización. Su principal limitación reside en que diversos órganos, como el cerebro o el corazón (Figura 3A), también captan altas cantidades de ^{18}F -FDG en condiciones normales, lo que dificulta el diagnóstico de diversas patologías. Se han propuesto varios protocolos pre-imagen (basados en el uso de dietas o fármacos) para re-

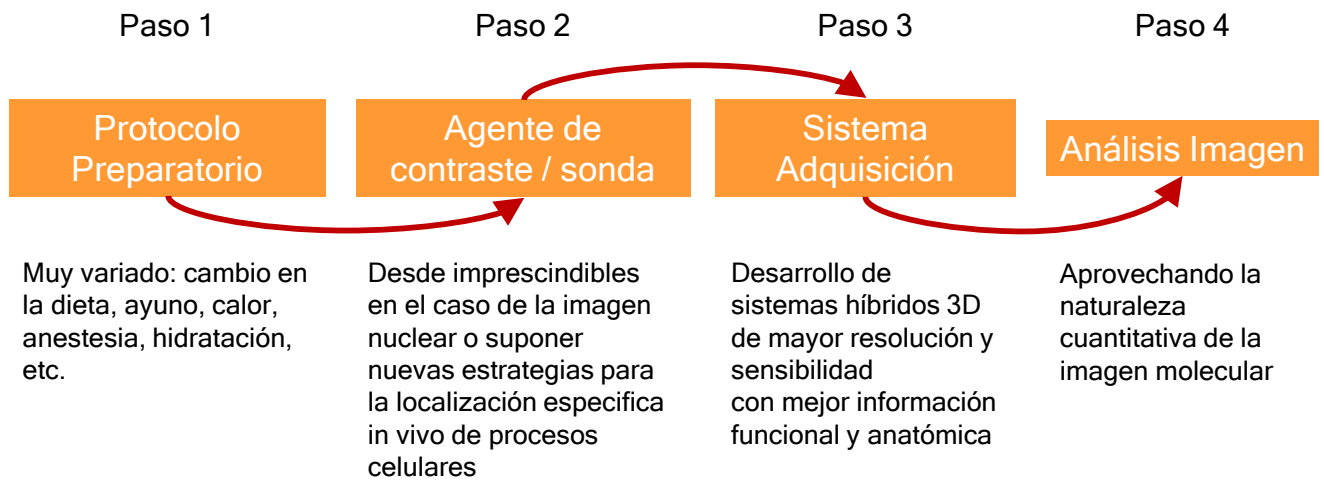


Figura 2. Esquema de pasos para obtener una imagen. Debemos destacar que estos pasos no son imprescindibles en todas las modalidades. Por ejemplo, la obtención de una imagen de RM no requiere del uso de agentes de contraste (paso 2). En algunos otros casos el uso de agentes de contraste en RM permite diferenciar entre tejido patológico y sano.

ducir la captación inespecífica de ^{18}F -FDG, especialmente del corazón, pero hasta ahora no se ha realizado ningún estudio comparativo. La primera parte de esta tesis trata de mejorar la imagen de lesiones cercanas al corazón mediante la reducción del fondo, es decir, intentando “apagar” la captación de ^{18}F -FDG por parte del corazón. Para ello presentamos un protocolo simple y efectivo que aprovecha la capacidad que tiene el tejido cardiaco para cambiar de sustrato metabólico (de glucosa a ácidos grasos), mejorando así la visualización de lesiones en su vecindad. La Figura 3 muestra cómo es posible eliminar la captación del tejido miocárdico mediante el uso de una dieta alta en grasas (Figura 3A basal frente a 3B). Además este “apagado” permite visualizar mejor las lesiones cercanas al corazón (Figura 3B comparada con 3C).

Por otro lado, son muchos los esfuerzos que se dedican al desarrollo de nuevos agentes/sondas de imagen para que tengan una interacción más específica con la diana. Sólo un pequeño número de estas nuevas sondas llegan a tener aplicación clínica, porque en muchos casos no cumplen los requisitos de seguridad necesarios, sobre todo si implican el uso de material genético. El uso de este tipo de sondas, conocidas como vectores genéticos, es esencial cuando se quiere seguir el camino que realizan un grupo de células tras ser introducidas en un organismo vivo, es decir, para el seguimiento de terapias celulares. La segunda parte de esta tesis aprovechó nuevas estrategias de la biología molecular para desarrollar un vector genético para imagen óptica más seguro para poder seguir y visualizar las células. En este caso, la mejora en la

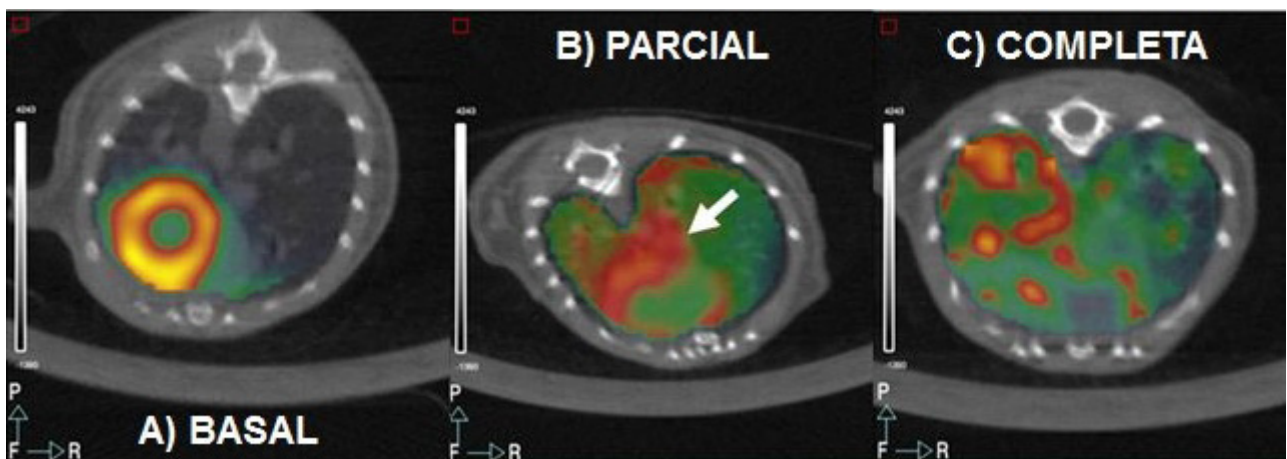


Figura 3. Imagen PET-CT de la cavidad torácica. (A) Imagen PET (color) típica del corazón tras la administración de ^{18}F -FDG, donde el miocardio del ventrículo izquierdo aparece muy intenso. (B) Si la dieta no funciona correctamente, no podemos distinguir si la zona marcada por la flecha es parte del corazón o es una lesión pulmonar. (C) Si el miocardio desaparece de la imagen, entonces todas las lesiones son claramente visibles.

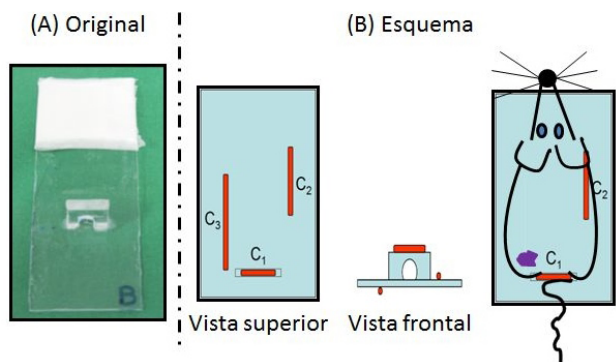


Figura 4. Cama multimodalidad. (A) Imagen real de la cama. (B) Esquema de la cama y la colocación de los marcadores (C_1 , C_2 y C_3). El animal se coloca como representa el dibujo, el orificio del puente permite pasar la cola hasta la base, con este montaje los marcadores quedan en distintos planos (C_3 está posicionado bajo la cama por eso no aparece) y rodean la región de interés, el neuroblastoma (morado).

seguridad se basa en conseguir que el material genético introducido en la célula no se integrase en del ADN celular, lo cual puede causar mutaciones. Dicho efecto mutagénico se debe a la presencia de restos de ADN bacteriano (organismos de los que proceden dichos vectores, conocidos como plásmidos). Por ello, en este trabajo se diseñó un nuevo vector (denominado minicírculo, debido a su reducido tamaño y su forma circular) al que se le eliminó el material genético bacteriano, lo que evita su integración aleatoria en el ADN de las células humanas, es decir, lo hace más seguro. Además, y dado que se trata de una sonda para imagen, necesitábamos que dicho vector permaneciese funcional a lo largo del tiempo. Esto se consiguió haciendo al minicírculo heredable, es decir, se divide cuando la célula se replica y así está presente en las células hijas, proporcionando una amplia ventana de tiempo, meses, para seguir el movimiento de las células.

Por último, aunque los vectores genéticos descritos anteriormente tienen claras ventajas funcionales frente a los métodos tradicionales de marcaje celular (radiotrazadores), estos últimos son los únicos de aplicación clínica habitual debido a su rápido y sencillo uso en el marcaje celular. Como ya hemos mencionado, el principal interés del marcaje celular, además de para el diagnóstico, es poder visualizar los movimientos de las terapias celulares tan en boga hoy en día. El motivo es que una vez que inyectamos las células en un organismo nos quedamos ciegos a sus efectos y los únicos datos que tenemos son

indirectos. Esta ceguera ha suscitado que se plantee si los efectos de las terapias son directos (llegan y reparan el daño) o por el contrario no alcanzan la región de interés pero activan respuestas de reparación en el organismo. En este contexto, el último trabajo de esta tesis analizó si las hMSCs alcanzan directamente el tejido tumoral tras ser inyectadas en un modelo de ratón portador de un tumor (neuroblastoma). Cuando trabajamos con técnicas de imagen nuclear (PET y SPECT), en muchos casos el reto del análisis de la imagen reside en la localización de la señal al no ofrecer mucha información anatómica. Por ello, el uso de la imagen nuclear se combina con otras modalidades que aporten información anatómica (Figura 1A PET-CT y 1E SPECT-RM), lo que se conoce como imagen multimodalidad. Aunque lo ideal sería contar con máquinas (conocidos como sistemas híbridos) que engloben dos o más modalidades, hoy en día algunas combinaciones son poco realistas. La parte final de esta tesis trata de mejorar la localización de la señal cuando la actividad en la región de interés es muy baja en comparación con el fondo, empleando imagen multimodalidad. Para ello diseñamos una cama multimodalidad con tres marcadores que rodeaban la región de interés (Figura 4). También validamos un método de registro semi-automático, es decir, de una herramienta informática que permita la combinación de las imágenes SPECT/RM de pequeño animal obtenidas con sistemas no híbridos. Este procedimiento nos ha permitido demostrar la llegada al neuroblastoma de hMSCs marcadas con ^{111}In -oxina, 24-48 horas después de su implantación.

En resumen, esta tesis demuestra que: 1) los protocolos pre-imagen basados en dietas altas en grasas suprimen la captación de ^{18}F -FDG por parte del miocardio, lo que de hecho mejora la visualización de lesiones inflamatorias cerca del corazón; 2) es posible diseñar prometedoras sondas genéticas que eviten los problemas de seguridad y proporcionen una amplia ventana de tiempo para realizar estudios de imagen; y 3) el diseño de un dispositivo de transporte y sujeción simple (cama) permite sacar partido a estudios multimodalidad de sistemas no híbridos, SPECT-RM, para la localización y cuantificación de regiones con baja señal.

Lorena Cussó Mula

Unidad de Medicina y Cirugía Experimental
Hospital General Universitario Gregorio Marañón