

# Imágenes moleculares y microimágenes de resonancia magnética en la biotecnología y la farmacéutica modernas

✉ Carlos Cabal, Evelio González, Yulenia Torne, Angel Rojas

Unidad de Resonancia Magnética, Centro de Neurociencias de Cuba, CIREN  
Ave. 25 No. 15202 esq. 158, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba  
E-mail: carlos.cabal@cneuro.edu.cu

## RESUMEN

Las imágenes de resonancia magnética son esenciales para estudiar de modo *no invasivo* la naturaleza biológica, con elevado contraste y alta resolución temporal y espacial. Se describe el estado actual del arte de las microimágenes y de las imágenes moleculares de resonancia magnética, nuevas ideas transformadoras de las investigaciones y aplicaciones en la biotecnología y la industria medicofarmacéutica que constituyen una herramienta efectiva para el establecimiento de la relación metabólica y genotípica con la expresión fenotípica y para comprobar diseños de moléculas activas así como su relación estructura-función e interacción con blancos terapéuticos. Se expone el uso de mecanismos contrastantes endógenos y exógenos. Se destaca la importancia de estos métodos que detectan, cuantifican y visualizan fenómenos dinámicos moleculares y celulares en tejidos y órganos, con resoluciones espaciales de hasta decenas de micras y temporales, de milisegundos. Se detalla su utilización para el estudio de afecciones como la isquemia cerebral y el cáncer. Se hace referencia a los avances obtenidos en los equipos, dispositivos, metodologías y mecanismos de contraste para elevar la productividad, especificidad, fiabilidad e impacto de las investigaciones. En breve tiempo, los estudios por imágenes serán ineludibles para el diseño, desarrollo y validación de nuevas drogas.

**Palabras clave:** imágenes moleculares, resonancia magnética, biotecnología, industria farmacéutica

*Biotecnología Aplicada* 2009;26:293-303

## ABSTRACT

**Micro-magnetic and molecular magnetic resonance imaging in modern biotechnology and pharmacy.** Magnetic Resonance Imaging is an essential diagnostic technique for the non-invasive study of biological entities with high contrast as well as high spatial and temporal resolution. This work describes the current state of the art in Micro-Magnetic Resonance Imaging and Molecular Magnetic Resonance Imaging. These new technologies are transforming the modus operandi of the current research and applications being performed and developed in the biotechnological and medical-pharmaceutical industries; establishing metabolic and genotypic relationships to phenotypical traits and validating the design of active molecules, their structure-function relationship and their interaction with the intended target. The use of endogenous and exogenous contrast mechanisms is also described. Therefore, underlining the importance, a special emphasis is being placed on these methods capable of detecting, quantifying and visualizing dynamic molecular and cellular phenomena in tissues and organs at spatial resolutions of the order of dozens of microns and temporal resolutions of milliseconds. Examples of the application of these methods in the study of pathologies like cancer and brain stroke are shown. The development of recent advances in hardware, devices and contrast mechanisms is referred to increase productivity, specificity, reliability and impact in experimental work. In the near future, the study of these techniques will be an indispensable tool for the design, development and validation of new pharmaceuticals.

**Keywords:** molecular images, magnetic resonance, biotechnology, pharmaceutical industry

## Introducción

La posibilidades de las imágenes de resonancia magnética (IRM) para el estudio "no invasivo" de la naturaleza viva con resolución espacial y contraste no igualadas, junto con elevadas resoluciones temporales es un hecho en la clínica, la preclínica, la industria y las investigaciones biomédicas contemporáneas. Sin embargo, estas potencialidades se encuentran en una franca revolución [1-5].

El presente trabajo pretende resumir y divulgar el estado actual del arte de dos métodos emergentes de las IRM, plataforma de ideas que transforman concepciones alrededor de las investigaciones y aplicaciones en la biotecnología y la industria medicofarmacéutica: las microimágenes ( $\mu$ RM) y las imágenes moleculares de RM (ImRM). Estos conceptos de  $\mu$ RM y de ImRM son nuevos y sus fronteras están en ampliación. Una buena aproximación a una definición de ellos es la siguiente: las  $\mu$ RM son aquellas imágenes de es-

tructuras biológicas vivas con resoluciones espaciales del orden de algunas pocas decenas de micras, elevado contraste y tiempos de imágenes que permiten estudiar los detalles anatómicos y los procesos fisiológicos al nivel de células, tejidos y órganos, sin alterarlos (Figura 1); por otra parte, las ImRM *in vivo* y *no invasivas* constituyen la representación visual, la caracterización estructural y funcional así como la cuantificación de los procesos biológicos a niveles celulares y moleculares [6]. Cuando se enuncian las posibilidades de las  $\mu$ RM y las ImRM para las investigaciones al nivel molecular, celular y tisular de seres vivos se incluyen las plantas. Estas técnicas son aplicables en la botánica y la biotecnología agrícola, campos que rebasan el alcance de este trabajo [7].

Las  $\mu$ RM y las ImRM también desempeñan un papel decisivo en la evaluación genómica y el establecimiento de los nexos entre la metabólica, la pro-

1. Bernstein MA, King KF, Zhou XJ. Handbook of MRI Pulse Sequences. London: Elsevier Academic Press;2004.

2. Rodríguez I, Pérez-Rial S, González-Jiménez J, Pérez-Sánchez JM, Herranz F, Beckmann N, et al. Magnetic resonance methods and applications in pharmaceutical research. J Pharm Sci 2008;97:3637-65.

3. Epstein FH. MR in mouse models of cardiac disease. NMR Biomed 2007;20:238-55.

4. Dijkhuizen RM, Nicolay K. Magnetic resonance imaging in experimental models of brain disorders. J Cereb Blood Flow Metab 2003;23:1383-401.

5. Anderson SA, Frank JA. MRI of mouse models of neurological disorders. NMR Biomed 2007;20:200-15.

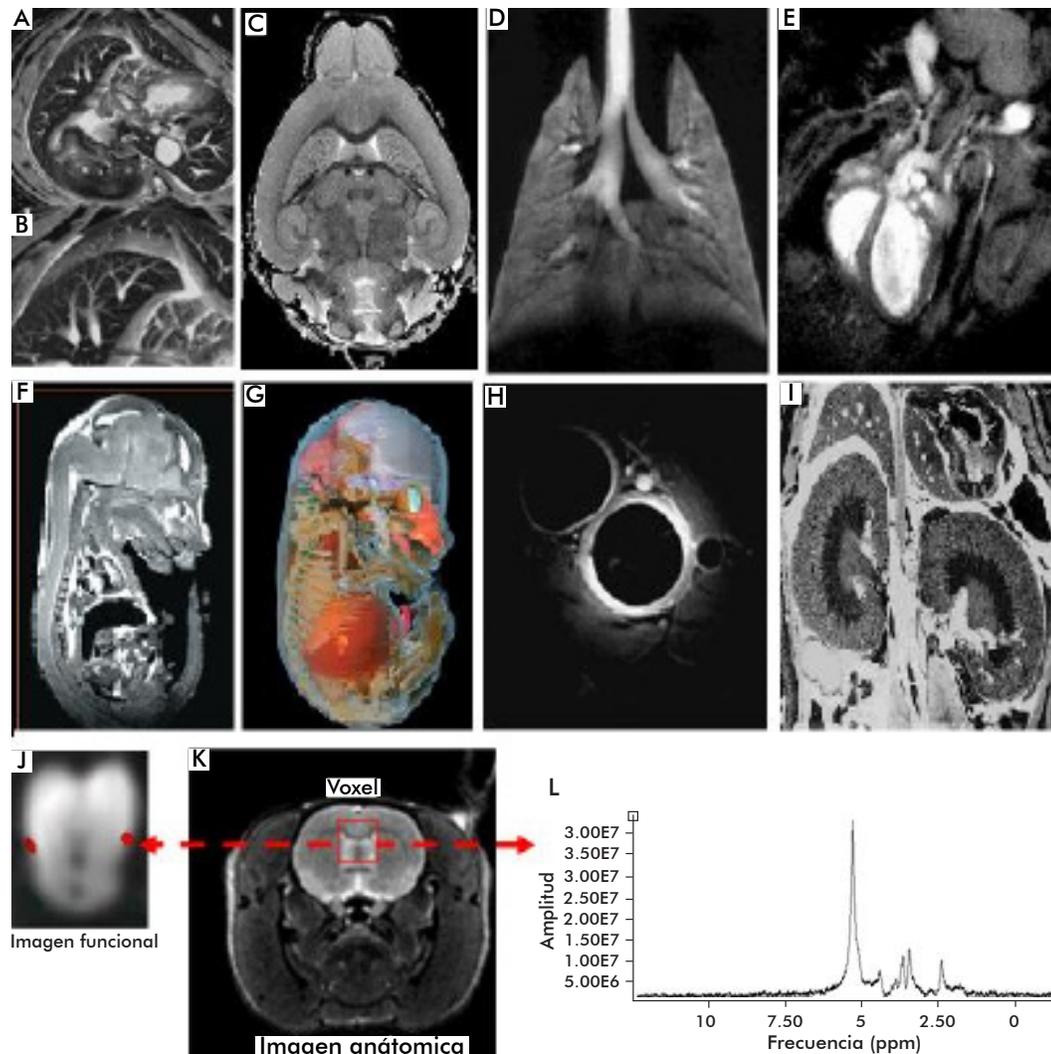


Figura 1. Diversos métodos de  $\mu$ RM: (a-b) Reconstrucción 3D de abdomen de rata (resolución  $50 \times 50 \times 500 \mu\text{m}$ ,  $B_0 = 7.1 \text{ T}$ ) [24]; (c) Cerebro de rata (resolución  $21.5 \mu\text{m}$ ,  $B_0 = 11.7\text{T}$ ). [24]; (d) Pulmones de rata ( $B_0 = 2.0 \text{ T}$ ). [30]; (e) Corazón obtenido usando la técnica de flujo ( $B_0 = 4.7\text{T}$ ) [\*]; (f-g) Feto de rata (resolución de  $21 \mu\text{m}$ ,  $B_0 = 7.0\text{T}$ ) [24]; (h) Imagen del esófago de un conejo mediante el uso de la microbobina endoscópica en el equipo clínico ( $B_0 = 1.5\text{T}$ ) [\*]; (i) Estudio de riñón, ( $B_0 = 7.0\text{T}$ ). (j) [24] Zonas neuronales activadas por estimulación olfativa de región del cerebro de ratón que aparece en k; (k) Imagen anatómica de ratón; (l) Espectro de los metabolitos del vóxel donde están las neuronas activadas de (j) [cortesía del Dr. Saint-Jalmes].

teórica y las expresiones fenotípicas, para conocer las bases de las diferentes enfermedades [2, 4, 7, 8]. Son un complemento efectivo para la comprobación de diseños de moléculas activas, su relación estructura-función e interacción con los blancos terapéuticos [2-14].

La contribución de las  $\mu$ RM y las ImRM para complementar y acelerar los estudios de toxicidad es creciente, incrementa la rapidez y fiabilidad de los resultados y de la evaluación farmacocinética de nuevas moléculas terapéuticas a nivel molecular, celular, y tisular, de órganos y del organismo [2-14]. Estos métodos garantizan una precisión superior, menor consumo de animales de experimentación y de reactivos, reducción significativa de la laboriosidad de la histología, disminución de los intervalos de muestreo de los parámetros de los modelos y la cuantificación de

las observaciones, todo lo cual conlleva una aceleración y abaratamiento de los ensayos. Al limitarse el sacrificio de los animales de experimentación y confrontar al modelo consigo mismo, la precisión de los estudios longitudinales y transversales se ve favorecida notablemente [14, 15].

Una comparación de la resolución espacial, el tiempo de imagen, la profundidad máxima del examen, el costo de los equipos y las posibilidades de las diversas modalidades de imágenes expone que en mayor o menor medida todas brindan valiosa información; no obstante, solo las IRM ofrecen información molecular, celular, anatómica y fisiológica, tienen record en resolución espacial y su resolución temporal es igual o mejor que las demás. Otra ventaja de las IRM no esbozada con toda claridad en la literatura está relacionada con la potencialidad real de que procedimien-

6. Hoehn M, Himmelreich U, Kruttwing K, Wiedermann D. Molecular and cellular MR imaging: Potentials and challenges for Neurological applications. *J Magn Reson Imaging* 2008;27:941-54.

7. Köckenberger W. Nuclear Magnetic resonance micro-imaging in the investigation of plant cell metabolism. *J Exp Botany* 2001;52:641-52.

8. Cherry SR. In vivo molecular and genomic imaging: new challenges for imaging physics. *Phys Med Biol* 2004;49:13-48.

9. El-Deiry WS, Sigman CC, Kelloff GJ. Imaging and oncology drug development. *J Clin Oncol* 2006;24:3261-73.

10. Weissleder R, Mahmood U. Molecular imaging. *Radiology* 2001;219:316-33.

tos, tecnologías y software, desarrollados en animales sean trasladables a humanos y viceversa, puesto que las bases experimentales de obtención de la información de RM para humanos y animales es muy similar. Su desventaja radica en el precio de los equipos que es casi de un orden superior a los demás métodos de imágenes [12].

El número de trabajos dedicados a las  $\mu$ RM y las ImRM aumenta exponencialmente en los últimos 10 años [16]. Los trabajos dedicados a evaluar la posición de las entidades regulatorias internacionales ante estas tecnologías son cada vez más frecuentes y favorables [13-15]. En pocos años, los estándares para el estudio, validación y registro requerirán documentarse con información proveniente de imágenes. La introducción, empleo y desarrollo de estas modalidades de imágenes, en todos los campos de investigación y aplicación en la biotecnología y la biomedicina, se hace una imperiosa necesidad para mantenerse en la modernidad y en niveles mundiales de competitividad.

### Métodos de resonancia magnética

El fenómeno de la resonancia magnética (RM) se basa en los procesos de polarización (ordenamiento) y excitación de los momentos magnéticos de los núcleos ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{31}\text{P}$ ...) que constituyen los átomos de los seres vivos. Para producir la polarización de los momentos magnéticos, el cuerpo a estudiar se introduce en el seno de un campo magnético exterior homogéneo de relativa alta intensidad ( $B_0$ ). La excitación se logra haciendo incidir sobre el cuerpo pulsos de ondas electromagnéticas de radiofrecuencias (pulsos RF) que sacan al magnetismo de su posición ordenada o de equilibrio. Los procesos de recuperación del equilibrio, una vez que ha cesado el pulso de RF, se caracterizan por dos tiempos llamados tiempos de relajación T1 y T2. Los valores de T1 y T2 dependen de las propiedades biofísicas y químicas (densidad de la sustancia, estructuras y movimientos moleculares, barreras biológicas, temperatura, pH...) de todos los elementos, desde las moléculas hasta los órganos. La intensidad de la señal de RM (intensidad en cada píxel de la IRM) es una función de la densidad de los núcleos magnéticos ( $\rho$ ) y de los tiempos T1 y T2, de ahí el poder informativo que tiene la IRM [1]. El núcleo más utilizado es el de hidrógeno ( $^1\text{H}$ ) por su abundancia, pues aporta la señal más intensa y forma parte de la molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  y de otras estructuras moleculares.

En las IRM es la señal proveniente del agua, en sus diferentes estados, la que se registra y refleja en la imagen. En todos los procesos fisiológicos, normales o patológicos, las concentraciones, las movilidades, las asociaciones y las interacciones del  $\text{H}_2\text{O}$  cambian, todo lo cual se refleja en la señal de RM y en las IRM [17].

Para obtener las IRM es necesario aplicar sincrónicamente con los pulsos de RF otros pulsos de gradientes de campos magnéticos (G) convenientemente seleccionados. Las múltiples modalidades de imágenes, algunas de las cuales serán tratadas posteriormente, constituyen variantes de combinaciones de pulsos de RF, de G y de tiempos, para que se desarrollen los procesos de relajación mencionados [1]. Los diferentes procedimientos para obtener IRM exploran me-

orar su calidad para visualizar con precisión los procesos moleculares, celulares y tisulares que se investigan. Los equipos de IRM, tanto para el estudio de humanos como de animales de experimentación, poseen bibliotecas de secuencias de pulsos para obtener las diferentes modalidades de imágenes. Un elevado número de parámetros, como la resolución espacial, la relación señal-ruido y el tiempo de imagen, pueden ser modificados en los experimentos de IRM mediante la selección de las secuencias y parámetros que tienen las bibliotecas. Por otra parte, existen atlas de imágenes bidimensionales (2D) y tridimensionales (3D) de órganos humanos y de ratones y ratas [18].

### Imágenes sopesadas en $\rho$ , T1 y T2

Las clásicas IRM, si reflejan más la densidad del agua ( $\rho$ ) o los tiempos T1 o T2, se conocen como imágenes sopesadas en  $\rho$ , T1 o T2. Los procesos patológicos están asociados con variaciones del contenido y la movilidad del agua, por tanto se expresan en los valores de T1 y T2 y en las IRM [17]. Durante los primeros años de las aplicaciones biomédicas de las imágenes sopesadas en T1, T2 y  $\rho$  demostraron su potencialidad para detectar lesiones cerebrales en modelos animales de isquemia, tumores, heridas postraumáticas y esclerosis múltiple [2, 4, 5]. Un crecimiento de la densidad de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}$ ), de T1 y T2 en tejidos patológicos es atribuido al incremento del agua intersticial asociada con el desarrollo de edemas vasogénicos. Ha sido demostrado que en los cerebros de ratas y Gerbil, los T1 y T2 se correlacionan bien con el contenido de agua del tejido y los cambios de T2 son más intensos. También sucede que los cambios de T2 son más pronunciados en los edemas tumorales en animales de experimentación. La demostración de una sensibilidad mayor de las imágenes sopesadas en T2 ha implicado su mayor aplicación en estudios experimentales y clínicos [4, 5]. En estadios tempranos de la isquemia aguda en modelos se ha demostrado que cambios de T1 y T2 son atribuibles a la disminución de la oxigenación de los tejidos (imágenes de T2) y a la interrupción del flujo sanguíneo (imágenes de T1).

### Imágenes sopesadas en difusión

Un método poderoso y prometedor ha ampliado las posibilidades de las IRM. Las imágenes sopesadas en difusión (DWI / Diffusion Weighted Imaging), son aquellas que reflejan en cada píxel de la imagen, la intensidad y la dirección del movimiento de difusión de las moléculas de agua en cada una las microzonas del objeto bajo estudio. El  $\text{H}_2\text{O}$ , sometida al movimiento molecular, tanto libre como formando parte de las esferas de hidratación de otras moléculas e iones, produce un cambio de la movilidad de sus acompañantes, en dependencia de la naturaleza de los procesos fisiológicos moleculares y celulares donde participan.

La difusión en cada uno de los píxeles (cuyos volúmenes fluctúan desde algunas decenas de picolitros hasta algunos microlitros) depende de factores bioestructurales como son los obstáculos o barreras (membranas celulares, barrera hematoencefálica, macromoléculas, etc.). El coeficiente de difusión (D) del  $\text{H}_2\text{O}$  varía significativamente cuando ocurre a lo largo o perpendicularmente a la barrera, lo cual se refleja en la intensidad de cada píxel en las imágenes

11. Beckmann N, Mueggler T, Allegrini PR, Laurent D, Rudin M. From anatomy to the Target: Contributions of magnetic resonance imaging to preclinical pharmaceutical research. *Anat Rec (New Anat)* 2001;265:85-100.

12. Rudin M, Weissleder R. Molecular imaging in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:123-31.

13. Borsook D, Bleakman D, Hargreaves R, Upadhyay J, Schmidt KF, Becerra L. A "BOLD" experiment in defining the utility of fMRI in drug development. *Neuroimage* 2008;42:461-66.

14. Herholz K, Coope D, Jackson A. Metabolic and molecular imaging in neuro-oncology. *Lancet Neurol* 2007;6:711-24.

15. Hoffman JM, Gambhir SS, Kelloff GJ. Regulatory and reimbursement challenges for molecular imaging. *Radiology* 2007; 245:645-60.

16. González M. Comportamiento de la producción científica de las investigaciones sobre resonancia magnética en modelos de experimentación en animales. Consultoría BIOMUNDI. IDICT 2009.

17. Dhenain M, Ruffins SW, Jacobs RE. Three-dimensional digital mouse atlas using high-resolution MRI. *Dev Biol* 2001; 232:458-70.

18. Le Bihan D. The "wet mind": water and functional neuroimaging. *Phys Med Biol* 2007;52:57-90.

nes de RM. Además, con el D medio o aparente en cada píxel (ADC/Apparent Diffusion Coefficient) es posible determinar la densidad y la orientación de las barreras biológicas de cada una de las microrregiones por DWI, más concretamente, imágenes ADC [17].

Para poder medir la difusión es necesario aplicar un gradiente de campo magnético adicional, cuya orientación permite explorar la ubicación y alineación de las mencionadas barreras. Para obtener la información ADC y definir la orientación de las barreras hay que registrar al menos dos imágenes consecutivas, lo que implica severas condiciones de sujeción del sujeto para evitar que movimientos involuntarios afecten la calidad de la información [1, 17].

Las DWI han brindado nuevas posibilidades por ser imágenes más sensibles a variaciones celulares y anomalías en los tejidos así como por poder determinar las zonas de afección con más resolución y en estadios más tempranos que las imágenes sopesadas en T1 y T2. Por ejemplo, solo unos minutos después de la isquemia cerebral, los valores de ADC en los tejidos cerebrales disminuyen del 30 al 40% en las DWI [4, 5]. Disminuciones del ADC se han reportado en la evolución de los edemas citotóxicos, atribuibles a que parte del agua se mueve de la zona extracelular, con relativa libertad, hacia compartimentos intracelulares con alta densidad de barreras para su difusión.

Una rápida e intensa disminución del ADC ocurre durante la despolarización anóxica. El paso de la despolarización del tejido isquémico a la zona frontera de la isquemia es acompañada de una inflamación transitoria detectada por imágenes rápidas de ADC. Estas perturbaciones temporales del tejido contribuyen a expandir la lesión. Con DWI se ha podido determinar el volumen de las lesiones y su evolución [2, 4, 5, 19].

Las DWI han sido utilizadas para monitorear la efectividad de las respuestas de los tumores ante las terapias conducentes a matar las células cancerígenas, por ejemplo, en modelos de células del tumor 9L glioma. Bajo la terapia disminuye la densidad celular y aumentan los espacios intercelulares, la movilidad del agua y la difusión, lo que se refleja con particular sensibilidad en las imágenes [4, 5, 20].

Las DWI y su sensibilidad ante las barreras han permitido hacer mapas de orientación, tamaño e integridad de las estructuras fibrosas del tejido blanco, para inferir los caminos de conectividad neuronal tridimensionalmente: la tractografía o arquitectura de las conectividades nerviosas. Han sido espectaculares los resultados en este campo y son aún muy prometedores para el estudio del sistema nervioso central [21].

### Espectroscopia *in vivo*

La espectroscopia es el primero de los métodos de RM (ERM) que aportó información molecular *in vivo*. Los estudios de espectroscopia pueden realizarse *in vitro*, *in vivo* y con órganos y tejidos perfundidos. La ERM cada vez se hace más esencial en las investigaciones farmacéuticas, en la metabolómica *in vivo* de la isquemia e infarto cerebral [5], en las enfermedades degenerativas de las articulaciones, en los desórdenes cardiovasculares [3], en el cáncer y en las enfermedades respiratorias y de la piel. En la figura 1L se muestra la ERM de los metabolitos de una región neuronal (Figura 1J) del cerebro de un ratón, activados bajo un estímulo olfativo.

La ERM brinda la posibilidad de determinar la concentración y distribución de las drogas administradas y de su interacción con las diana. Ofrece información de procesos metabólicos que ocurren al nivel de los tejidos y de los órganos [2, 3, 5, 22-24]. Los metabolitos importantes detectados y sus espectros, cuyas concentraciones han sido medidas por ERM de <sup>1</sup>H, aparecen tabulados en la literatura. Muchos de ellos tienen una participación primordial en los fenómenos relacionados con la aparición y desarrollo de las enfermedades. Ejemplo de ello es la concentración de N Acetil Aspartato (NAA) y los lactatos (Lac) indisolublemente ligados a la isquemia hipóxica. El NAA es considerado un marcador de la integridad neuronal, mientras que el lactato lo es del metabolismo anaeróbico. Inmediatamente que se produce un daño isquémico se observa un decrecimiento del NAA y un aumento del Lac. La ERM es utilizada también para determinar la temperatura cerebral [2, 5, 22, 23]. Es usual en las investigaciones emplear métodos de espectroscopia multinúcleos. Además del estudio del <sup>1</sup>H, mucho menos frecuentemente se realizan estudios con núcleos de <sup>31</sup>P, <sup>23</sup>Na, <sup>19</sup>F y <sup>133</sup>Cs, presentes en los sistemas biológicos o en los fármacos que se les suministran.

La esencial desventaja de la espectroscopia *in vivo* con relación a los métodos de imágenes está vinculada con la concentración de los átomos de <sup>1</sup>H que registran. En el caso de las imágenes se trata de concentraciones de agua hasta de 100 moles, mientras que la concentración de metabolitos es de algunas decenas de milimoles. Eso implica que la resolución espacial de la espectroscopia es mucho menor con voxels que posean lados cuyas dimensiones sean del orden de los centímetros [2, 5].

Hay que incluir en el arsenal de las IRM las sopesadas en perfusión (PWI), las cuales, con contraste interno o con agentes contrastantes externos permiten obtener información cuantitativa de parámetros vitales para la investigación *in vivo*: la perfusión del tejido, el tiempo medio de tránsito y la fracción de volumen que la sangre ocupa en el tejido, entre otros. Estos parámetros junto con los que aporta la angiografía de RM han sido vitales en la dilucidación de los procesos y desórdenes cerebrovasculares y para estudiar la efectividad de la acción de los fármacos en los diferentes tejidos [2, 5, 19].

### Resonancia magnética funcional

La resonancia magnética funcional (fMRI / Funcional Magnetic Resonance Imaging) se basa en los cambios del magnetismo de la sangre cuando esta varía sus estados de oxigenación (BOLD/ Blood Oxygenated Level Depent). La oxihemoglobina (diamagnética) se convierte en desoxihemoglobina (paramagnética) producto de los procesos metabólicos al nivel celular, proceso que se traduce en un acortamiento del T2 y por tanto en una disminución de la intensidad en los píxeles donde los cambios de los niveles de oxigenación ocurren más intensamente.

La fMRI está siendo utilizada en la práctica clínica desde años atrás [2, 5, 13, 25]; a la vez, se estudia la actividad neuronal en modelos. Adquiriendo dos series de imágenes consecutivas, la primera con el sujeto en reposo (estado basal) y la segunda con el sujeto bajo un estímulo (auditivo, visual, olfativo, químico u otros) puede determinarse (por resta de las

19. Chen F, Suzuki Y, Nagai N, Sun X, Wang H, Yu J et al. Microplasma and Tissue Plasminogen Activator: Comparison of Therapeutic Effects in Rat Stroke Model at Multiparametric MR Imaging. *Radiology* 2007;244:429-38.

20. Barrett T, Brechbiel M, Bernardo M, Choyke PL. MRI of Tumor Angiogenesis. *J Magn Reson Imaging* 2007;26:235-49.

21. Mori S. *Brain Mapping: The Methods*. 2nd ed. New York: Elsevier Science; 2002.

22. Weber R, Ramos-Cabrera P, Hoehn M. Present status of magnetic resonance imaging and spectroscopy in animal stroke models. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:591-604.

23. Lamb H J, van der Meer R W, de Roos A, Bax JJ. Cardiovascular molecular MR imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007;34:99-104.

24. Johnson GA, Ali-Sharief A, Badea A, Brandenburg J, Cofer G, Fubara B et al. High-throughput morphologic phenotyping of the mouse brain with magnetic resonance histology. *Neuro Image* 2007;37:82-9.

25. Borsook D, Becerra L, Hargreaves R. A role for fMRI in optimizing CNS drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5:411-25.

imágenes) la zona activada del cerebro (Figura 1J). La relación entre la acción de los fármacos y la actividad cerebral ha sido inferida a partir de la señal BOLD con la aplicación o no de estímulos [13, 25]. La sensibilidad de la fMRI a los estados de oxigenación ha sido ampliamente aplicada a la estimación de procesos cerebrovasculares en animales como la isquemia y hemorragias y en la evaluación de la efectividad de la recuperación de los tejidos cuando son reoxigenados después de la reperusión [13, 25].

### Imágenes moleculares y mecanismos de contraste

Las ImRM *in vivo no invasivas* son definidas como la representación visual, la caracterización (estructural y funcional) y la cuantificación de procesos biológicos a niveles celulares y moleculares. Esta u otras definiciones tienen en común que la imagen muestra un proceso biológico a nivel molecular y celular, cuantificable y que ocurre *in vivo* y de manera *no invasiva*.

La unión de los avances de las ImRM con las tecnologías de la biología molecular y celular ha engendrado una disciplina en expansión que ofrece impactos notables en la detección muy temprana de enfermedades, la individualización de tratamientos y el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos y biotecnológicos [2, 4, 6, 8, 10-14]. Una de las bondades más distintiva de las IRM en sistemas biológicos es el elevado contraste que se logra para los tejidos blandos [1-8]. El contraste logrado en las imágenes clínicas y de animales de experimentación es muy superior al resto de las técnicas existentes [12], ya que depende de la densidad de las sustancias y especialmente, de la movilidad del agua que integra las diferentes estructuras.

La movilidad del H<sub>2</sub>O se diferencia en varios órdenes de magnitud cuando pasa del estado libre al asociado a una macromolécula y cambia también en dependencia de los estados fisiológicos de las células, tejidos y órganos [12, 17]. En las últimas dos décadas, nuevos experimentos, procedimientos y técnicas revelan las reservas de contraste de las IRM para evidenciar mejor las diferencias de las estructuras biológicas, sus cambios en el tiempo y su dependencia de los estados fisiopatológicos.

El contraste en las IRM puede manejarse e incrementar por vía endógena (intrínseca) o por agentes exógenos (extrínsecos) al sistema biológico.

#### Mecanismos endógenos de contraste

Los mecanismos endógenos se basan fundamentalmente en producir diferencias de los estados de magnetización o en aprovechar las que se producen de manera natural por los procesos biomoleculares, empleando secuencias de pulsos apropiadas para reflejar en las imágenes, procesos tales como la difusión, la perfusión sanguínea de los tejidos, el flujo de diferentes fluidos biológicos u otros.

La fMRI es el método más conocido de aprovechamiento del contraste endógeno porque visualiza la entrega de oxígeno al tejido nervioso, cambio de la oxihemoglobina a desoxihemoglobina. Otros métodos de IRM como los de las imágenes sopesadas en perfusión (PWI) y las de flujo aprovechan similarmente los mecanismos endógenos para lograr contraste [2, 5, 19].

Más recientemente, basándose en los adelantos de la ingeniería genética se han desarrollado nuevas vías de incrementar el contraste y de estudiar con ello, procesos enzimáticos, de marcaje de células y otros [26]. El contraste IRM puede ser genéticamente controlado mediante el uso de una proteína expresada del agente contrastante (o en principio ARN contrastante) sin necesidad de síntesis o de agente exógeno [26]. En este ejemplo, un gen dirige la producción intracelular de metaloproteína que forma un complejo con los iones metálicos endógenos y se convierte en un agente contrastante (AC). Un número apreciable de mecanismos de contraste han sido diseñados basándose en el Fe<sup>2+</sup> endógeno, el más abundante ión paramagnético en sistemas biológicos [26]. El más simple procedimiento es la expresión del contenido de Fe<sup>2+</sup> en proteínas. El nivel de expresión de Fe<sup>2+</sup> almacenado en forma de proteína ferritina (Ft) ha sido influyente en los mecanismos de contraste en el cerebro y ya se ha demostrado cómo la expresión de Ft ectópica puede ser manipulada como contraste artificial *in vivo* [26]. Estos autores usan la transfección viral para introducir los genes Ft en el cerebro del ratón. La expresión de Ft en células muestra una mayor cantidad de Fe<sup>2+</sup> que en las células de control sin una evidente toxicidad. El Fe<sup>2+</sup> del grupo hemo de la mioglobina también ha sido sobreexpresado en animales transgénicos. La mioglobina actúa como AC, sobre todo en los tejidos musculares. En este caso el contraste adicional logrado es pobre, quizás por el nivel de expresión o porque se produce una efectividad de relajación pequeña [26].

Se han generado otros procedimientos totalmente endógenos para incrementar el contraste mediante el uso de sistemas enzimáticos. Uno de ellos ha sido el que aprovecha la acumulación de melanina bajo control genético, pigmento biopolimérico que recoge los iones paramagnéticos e influye en el contraste IRM. La melanina es generada en el camino iniciado por la enzima tirosina hidroxilasa que cataliza la transformación de la tiroxina a melanina, precursora de la dopoquinina. Se muestra como la sobreexpresión de la tirosina hidroxilasa en cultivos de células humanas, incrementa la afinidad por iones metálicos y crece el contraste [26].

#### Mecanismos exógenos de contraste

El empleo de los agentes contrastantes (AC) exógenos es parte de los procedimientos clínicos establecidos desde hace más de 20 años [4, 27, 28]. Los mecanismos exógenos se han caracterizado por la introducción, fundamentalmente por vía intravenosa, de los AC paramagnéticos que varían el estado magnético de los tejidos, las células o las moléculas cercanas a su localización. Han sido empleados con éxito sobre todo en los estudios de RM de los tejidos del cerebro, el hígado, el sistema digestivo, el sistema linfático, las mamas, los riñones y el sistema cardiovascular. En la última década, se han incrementado los trabajos en las investigaciones y aplicaciones farmacéuticas con animales de laboratorio y se han abierto las puertas a las ImRM. Los AC más empleados en la práctica clínica y en las investigaciones y aplicaciones biomoleculares han sido el Gadolinio - ácido Dietileno Triamino Penta Acético, Gd (DTPA) y el Gadolinio - ácido 1,4,7,10 tetraazaciclododecane 1,4,7,0 ácido triacéti-

26. Westmeyer GG, Jasanoff A. Genetically controlled MRI contrast mechanisms and their prospects in systems neuroscience research. *Magn Reson Imaging* 2007;25:1004-10.

27. Kim J-H, Park K, Nam H-Y, Lee S, Kim K, Kwon I-C. Polymers for bioimaging. *Prog Poly Sci* 2007;32:1031-53.

28. Meade TJ, Taylor AK, Bull SR. New magnetic resonance contrast agents as biochemical reporters. *Curr Opin Neurobiol* 2003;13:1-6.

co, Gd (DOTA) [4, 27, 28]. Lo fundamental reside en acumular suficiente concentración de AC en el área de interés, a la vez que se mantiene el mínimo nivel en otras zonas. El relativo bajo peso molecular de los ligandos de Gd<sup>3+</sup> hace que se difunda rápidamente fuera del flujo sanguíneo, después de ser suministrado por vía venosa, lo que mejora la calidad de las imágenes. Los ligandos coordinados con el ión paramagnético reducen su toxicidad, aumentan la persistencia en sangre e incrementan el contraste significativamente. La conjugación de estos ligandos de relativo bajo peso molecular con polímeros biocompatibles tales como las poliamidas, los polisacáridos, los PLL, las albúminas, mejoran sus propiedades biofísicas y farmacológicas. Adicionalmente a los ligandos han sido utilizados como portadores de los AC dendrímeros, liposomas o combinaciones [27, 28].

El estado de la magnetización del AC y de sus cercanías puede cambiar en dependencia de los procesos fisiológicos que tienen lugar en las estructuras biológicas. Esta propiedad de los AC ha sido aprovechada con éxito en el estudio de la actividad enzimática, la expresión genética, la asociación de proteínas, la activación del pH y del Ca<sup>2+</sup> celulares y las presiones parciales de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> al nivel de células [8, 10, 28]. La envoltura del ión Gd<sup>3+</sup> se diseña de forma tal, que todos sus enlaces de coordinación estén ocupados por ejemplo con azúcares que impiden el acceso al H<sub>2</sub>O y que no modifican el contraste de la ImRM. Sin embargo, estos azúcares tienen grupos funcionales que les permiten interactuar con una enzima dada, como la β-galactosidasa. Esa interacción produce una “hendidura” en la envoltura del Gd<sup>3+</sup>, lo cual permite al H<sub>2</sub>O introducirse en la esfera de coordinación y reflejarse de inmediato en la intensidad de la imagen de la microrregión donde ocurre el proceso enzimático. Este AC ha sido aplicado con éxito al monitoreo *in vivo* de la expresión genética en *Xenopus laevis* [28, 29]. El Ca<sup>2+</sup> intracelular es importante para la transmisión de señales. Ha sido diseñado otro AC intracelular que se activa con la presencia de concentraciones micromolares de Ca<sup>2+</sup>. Con mecanismos similares también se ha estudiado la presencia de iones de Zn<sup>2+</sup> [28]. Existen agentes contrastantes que permiten explorar el pH extracelular en tejidos sanos y cancerígenos, lo cual se registra en el contraste de las ImRM [28].

Una dirección de estudio muy prometedora es el empleo de la transferencia de magnetización de agentes hiperpolarizados, en particular, los gases nobles, que incrementan notablemente la relación señal-ruido y el contraste; ello permite el estudio del sistema respiratorio (Figura 1D) y otros de muy altas complejidades anatómico-funcionales [30].

Un AC de particular interés para los estudios del sistema nervioso es el ión paramagnético de manganeso, Mn<sup>2+</sup>, que como el Gd produce reducciones apreciables de los tiempos T1 y T2 de los protones de las moléculas de H<sub>2</sub>O en la vecindad del ión [31, 32].

Es conocido que el Mn<sup>2+</sup> es un metal pesado, esencial como cofactor en un grupo de enzimas que incluyen la superoxididmutasa [31-33], el Piruvato carboxilasa [34] y la Glutamina sintetasa [31]. El Mn<sup>2+</sup> puede introducirse en las células nerviosas excitadas por alguno de los mecanismos de transporte de Ca<sup>2+</sup>, su comportamiento intracelular ha sido estudiado [31].

Penetra dentro de las neuronas a diferencia de los AC de Gd que permanecen en el sistema vascular por no poder atravesar la barrera hematoencefálica.

Tres aplicaciones trascendentes del Mn<sup>2+</sup> como AC de las IRM en el SNC son [31]:

- *El estudio de la arquitectura cerebral*, que permite el estudio de la conectividad entre las diferentes zonas del cerebro. Investigaciones recientes en roedores [35-39], primates e insectos han demostrado la utilidad de la RM con contraste de Mn<sup>2+</sup> para brindar información de la citoarquitectura del cerebro.

- *La identificación de los tractos neuronales*, como consecuencia de su movimiento de manera definida dentro de las neuronas, que hace posible su seguimiento para definir así la arquitectura de los canales neuronales en las regiones limitadas de interés donde fue inyectado el Mn<sup>2+</sup> localmente. Los primeros estudios de tractos neuronales fueron realizados en ratones para determinar los canales olfativos y visuales [31]. Una de las aplicaciones más espectaculares de las ImRM con Mn<sup>2+</sup> ha sido el estudio de los cambios de las dimensiones y la conectividad de las diferentes regiones del cerebro, asociados a los procesos cognitivos y de plasticidad del cerebro [40, 41].

- *La determinación de las regiones de excitación neuronal*, por penetrar al interior de las células excitadas y permitir que las ImRM sean empleadas para determinar las regiones activas independientes de los parámetros hemodinámicos, con más precisión espacial que con la clásica fMRI.

Sin embargo, es conocida la elevada toxicidad del Mn<sup>2+</sup>. La habilidad para lograr su suministro óptimo en la región de interés, con dosis apropiadas, mínimos tiempos de residencia y diseño adecuado del experimento de RM, determinarán si se afianzan sus posibilidades para las ImRM.

#### Otro medio de contraste exógeno: nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas (npm) también conocidas como nanopartículas superparamagnéticas transformarán las actuales técnicas diagnósticas y terapéuticas de las ImRM [27, 42]. Su biocompatibilidad, biodisponibilidad y biodegradabilidad han contribuido a la extensión de sus aplicaciones en la detección, diagnóstico y tratamiento de enfermedades como las cerebrovasculares, el cáncer y las cardiovasculares (evaluación del riesgo isquémico, lesiones del miocardio, aterosclerosis, detección y caracterización de las placas de ateroma y otras disfunciones vasculares) [3, 5, 23, 27, 43]. Las npm son clasificadas de acuerdo con sus dimensiones: las superiores o menores a 50 nm se les llaman SPIO y USPIO respectivamente [27]. Sus potencialidades están dadas por las numerosas formas que se han obtenido, con diversas composiciones químicas y con un diseño modular que les permite asumir funciones simultáneas de marcaje, direccionamiento y seguimiento celular, transportador y dosificador de agentes terapéuticos, todo lo cual eleva la eficiencia de la relación medicamentodiana y a la vez incrementa notablemente el contraste en las ImRM facilitando su microlocalización a través del tiempo [27, 42].

El revestimiento de las npm con biomoléculas y biopolímeros ha sido la plataforma para garantizar su biocompatibilidad, biodistribución, estabilidad y

29. Louie AY, Huber MM, Ahrens ET, Rothbacher U, Moats R, Jacobs RE, et al. In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging. *Nat Biotechnol* 2000;18:321-5.

30. Driehuis B, Walker J, Pollaro J, Cofer GP, Mistry N, Schwartz D, et al. 3He MRI in mouse models of asthma. *Magn Reson Med* 2007;58:893-900.

31. Jasanoff A. MRI contrast agents for functional molecular imaging of brain activity. *Curr Opin Neurobiol* 2007;17:593-600.

32. Silva AC, Bock A. Manganese-enhanced MRI: An exceptional tool in translational neuroimaging. *Schizophr Bull* 2008;34:595-604.

33. Gunter TE, Gavin CE, Aschner M, Gunter KK. Speciation of manganese in cells and mitochondria: a search of the proximal cause of manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology* 2006;27:765-76.

34. Zwingmann C, Leibfritz D, Hazell AS. Brain energy metabolism in a sub-acute rat model of manganese neurotoxicity: an ex vivo nuclear magnetic resonance study using [1H- 13C] glucose. *Neurotoxicology* 2004;25:573-87.

35. Natt O, Watanabe T, Boretius S, Radulovic J, Frahm J, Michaelis T. High-resolution 3D MRI of mouse brain reveals small cerebral structures in vivo. *J Neurosci Methods* 2002;120:203-9.

36. Watanabe T, Radulovic J, Boretius S, Frahm J, Michaelis T. Mapping of the habenulo-interpeduncular pathway in living mice using manganese-enhanced 3D MRI. *Magn Reson Imaging* 2006;24:209-15.

37. Silva AC, Lee JH, Wu CW et al. Detection of cortical laminar architecture using manganese-enhanced MRI. *J Neurosci Methods STAT- In-Data-Rev* 2008;2:246-57.

38. Lee JH, Silva AC, Merkle H, Koretsky AP. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging of mouse brain after systemic administration of MnCl<sub>2</sub>: dose-dependent and temporal evolution of T1 contrast. *Magn Reson Med* 2005;53:640-8.

39. Watanabe T, Frahm J, Michaelis T. Functional mapping of neural pathways in rodent brain in vivo using manganese-enhanced three-dimensional magnetic resonance imaging. *NMR Biomed* 2004;17:554-68.

40. Van der Linden A, Verhoye M, Van Meir V, Tindemans I, Eens M, Absil P, et al. In vivo manganese-enhanced magnetic resonance imaging reveals connections and functional properties of the songbird vocal control system. *Neuroscience* 2002;112:467-74.

41. Van der LA, Van MV, Tindemans I, Verhoye M, Balhazart J. Applications of manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) to image brain plasticity in song birds. *NMR Biomed* 2004;17:602-12.

42. Sun C, Lee JSH, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:1252-65.

adecuada farmacocinética, de ahí su amplio rango de aplicaciones. Agentes terapéuticos, agentes diana, agentes para el perfeccionamiento de la permeabilidad y colorantes fluorescentes han sido colocados en la estructura de la cápsula de envoltura de las npm [27, 42] (Figura 2).

Una de las ventajas de las npm como portadoras de agentes terapéuticos es la relación del área de su superficie con el volumen de la partícula, lo cual permite un número elevado de moléculas terapéuticas adosadas a cada npm (Figura 2). Ligandos diana como proteínas, péptidos, aptamer y moléculas pequeñas han sido investigados para incrementar la acumulación de npm en sitios específicos. Hoy constituyen un elemento esencial en las posibilidades de las ImRM para el monitoreo en tiempo real del diseño de medicamentos y el uso de estrategias de terapias combinadas.

La mayor limitación de la mayoría de los agentes químicos terapéuticos es su relativa inespecificidad y sus potenciales efectos sobre los tejidos sanos. Sin embargo, la elevada penetración del campo magnético a través de los tejidos biológicos y las habilidades desarrolladas en el manejo remoto de campos magnéticos de configuraciones deseadas han permitido conducir las npm a microrregiones de interés, visualizar y diferenciar los estadios fisiológicos de células y tejidos [44, 45].

Las propiedades fisicoquímicas de la npm portadora (dimensiones, morfología, carga eléctrica, superficie química), las intensidades y configuraciones de los campos magnéticos, la profundidad de la localización del tejido enfermo, la velocidad del flujo sanguíneo y el nivel de vascularización en la zona son parámetros determinantes de esta nueva tecnología para la entrega y liberación del fármaco [45, 46].

Las acciones antisépticas y de terapia génica han elevado su efectividad mediante la npm y su control con ImRM. El uso de npm y su monitoreo como porta-

dores de oligodioxynucleótidos (ODs) o con vectores genéticos supera muchos de los problemas actuales de la terapia génica, asociados con la capacidad de liberar los agentes terapéuticos [47, 48]. Las npm han sido utilizadas como portadoras de pequeñas interferencias de RNA que han aparecido en los últimos años como una plataforma terapéutica emergente [49, 50]. El marcado, el rastreo por ImRM y la conducción de células son posibles gracias al dopaje de éstas con npm. Las USPIO han sido incorporadas con éxito a poblaciones de células madre.

Desarrollos recientes han permitido obtener npm multifuncionales que exhiben a la vez propiedades superparamagnéticas, dopadas con colorantes fluorescentes que permiten su detección al nivel celular a partir de las imágenes ópticas de fluorescencia y de las IRM. Con IRM se realiza la planificación quirúrgica y se asiste el acto quirúrgico con la visualización por ambos métodos de las fronteras del tumor en modelos animales para su extirpación precisa [51] (Figura 3). Las ImRM asistidas con npm han permitido investigar la migración y el tráfico de células, la detección de la apoptosis y la actividad enzimática [27, 42].

### Estudios del cáncer y de la isquemia cerebral

Las ImRM han permitido de manera sensible y específica monitorear importantes blancos moleculares y comportamientos en estadios primarios de los eventos carcinogénicos [9, 10, 14, 20, 51-53].

Las npm han sido extensamente examinadas para mejorar la detección, el diagnóstico y el manejo terapéutico en la clínica de tumores sólidos, para ello se adosa a la npm un agente citotóxico que la convierte en un transportador magnético a la diana (*Magnetic Target Carrier* / MTC). Posteriormente una inyección intravenosa de la suspensión coloidal de la npm y la aplicación de un gradiente de campo magnético exter-

43. Sosnovik DE, Nahrendorf M, Weissleder R. Molecular magnetic resonance imaging in cardiovascular medicine. *Circulation* 2007;115:2076-86.

44. Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys D: Appl Phys* 2003;36:R167-81.

45. Dobson J. Magnetic nanoparticles for drugs delivery. *Drug Dev Res* 2006;67: 55-60.

46. Neuberger T, Schopf B, Hofmann H, Hofmann M, Von Rechenberg B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system. *J Magn Mater* 2005;293:483-96.

47. Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Kruger A, et al. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther* 2002;9:102-09.

48. Krotz F, de Wit C, Sohn HY, Zahler S, Gloe T, Pohl U, et al. Magnetofection a highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Ther* 2003;7:700-10.

49. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21 -nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494-8.

50. Ryther RCC, Flynt AS, Phillips JA, Patton JG. siRNA therapeutics: big potential from small RNAs. *Gene Ther* 2005;12:5-11.

51. Tréhin R, Figueiredo JL, Pittet MJ, Weissleder R, Josephson L, Mahmood U. Fluorescent nanoparticle uptake for brain tumor visualization. *Neoplasia* 2006;8(4): 302-11.

52. Weissleder R. Molecular imaging in cancer. *Science* 2006;312:1168-71.

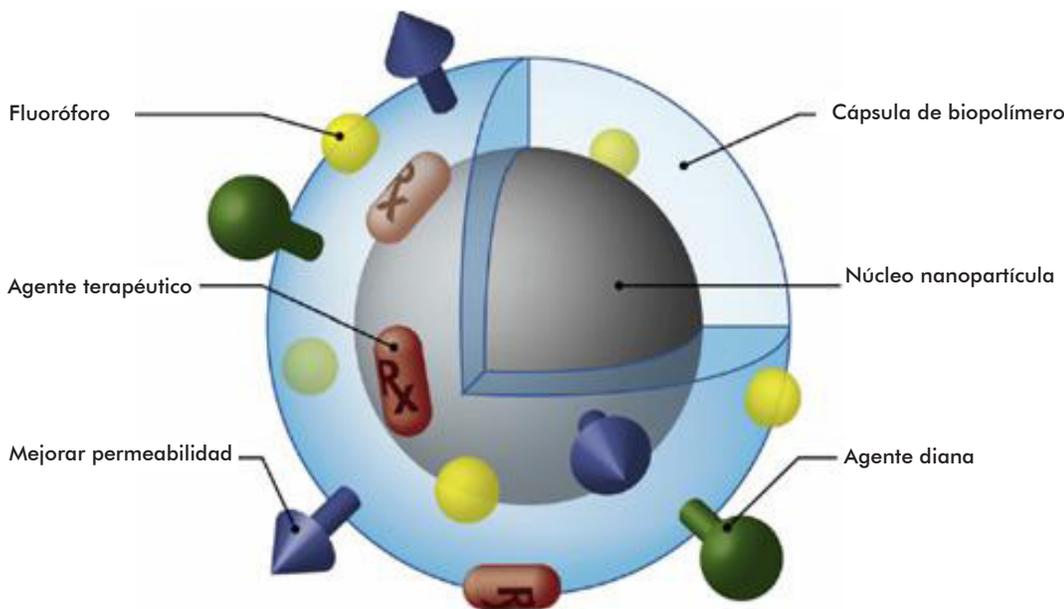


Figura 2. Esquema de una nanopartícula magnética. Se observa el núcleo súper paramagnético y varios ligandos con fines terapéuticos, para mejorar la permeabilidad y dirigir la partícula a la diana [45].

no conduce con efectividad el agente terapéutico a la zona patológica. La exactitud de IRM para detectar la linfadenopatía maligna ha sido mejorada con el uso de nrm de ferumoxtrano-10 [54-56]. Un nodo linfático normal capta el agente USPIO y aparece como hipointenso en la IRM. El ganglio con metástasis se observa de manera diferente en las imágenes. Esto ha sido usado en el cáncer de seno, de pulmón, cerebral y de cuello de útero, etc. Por otra parte, partículas USPIO han mostrado la identificación efectiva de metástasis de nódulos de linfomas con diámetros de 5 a 10 mm [57]. Actualmente, en el diagnóstico clínico con RM usando nrm SPIO es posible distinguir lesiones tumorales menores de 2 a 3 mm en el hígado [58]. Muchos otros trabajos están referidos a la angiogenesis, la cuantificación del volumen del tumor y la delimitación más exacta de sus fronteras a nivel celular (Figura 3). Múltiples formulaciones de nrm están siendo sometidas a diferentes fases de ensayos clínicos entre los cuales uno de los más avanzados es el Combindex que se encuentra en la última fase de ensayo para la detección *lympho* de metástasis en el cáncer de próstata [42].

Los anticuerpos monoclonales (ACM) fueron los primeros agentes diana asociados a nrm y continúan siendo los más usados y monitoreados con ImRM. Uno de los inconvenientes de los ACM son sus grandes dimensiones y su inherente inmunogenicidad, pueden causar nrm conjugadas que limitan más su difusión a través de las barreras biológicas.

Las nrm han sido evaluadas como portadoras de variedad de agentes terapéuticos. Medicamentos tradicionales como el Etopósido, Doxorubicina, Metotrexato han sido encapsulados en nrm para el tratamiento potencial de enfermedades que van desde la artritis rematoidea hasta los tumores malignos de próstata y mama [59-62]. También han sido investigadas las nrm como portadoras de proteínas y péptidos con fines terapéuticos [62]. Ejemplo de ello es el Herceptin<sup>TM</sup>, que incorporado dentro de liposomas dopados con nrm demostró su efecto contra la proliferación de las células tumorales en mama. También ha sido demostrada la liberación específica de Herceptin<sup>TM</sup> en células NIH3T.7 que expresan el HER2/neu *in vivo*. El Chlorotoxin es un péptido de alta afinidad con variedad de tumores, exhibe capacidades de inhibir la invasión tumoral como los gliomas [63], las nrm dopadas con él permiten su introducción en las células diana lo que incrementa el efecto terapéutico con relación al del péptido cuando se suministra libre [64].

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios para tratar de comprender los mecanismos implicados en el daño cerebral post isquémico, así como para desarrollar estrategias que minimicen sus repercusiones [19, 22, 24, 65-76]. Se han realizado numerosos estudios en ratas que muestran la efectividad de los métodos de IRM para la detección y seguimiento de la lesión producida por un accidente vascular encefálico [72-78]. Estudios en ratas Wistar, a las cuales se les indujo la isquemia mediante la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO), muestran claramente la localización del infarto. Se determinó el volumen del infarto y su evolución después de 3, 7 y 24 semanas de ocurrido el accidente.

Las investigaciones más recientes realizadas con modelos animales de isquemia cerebral han aportado

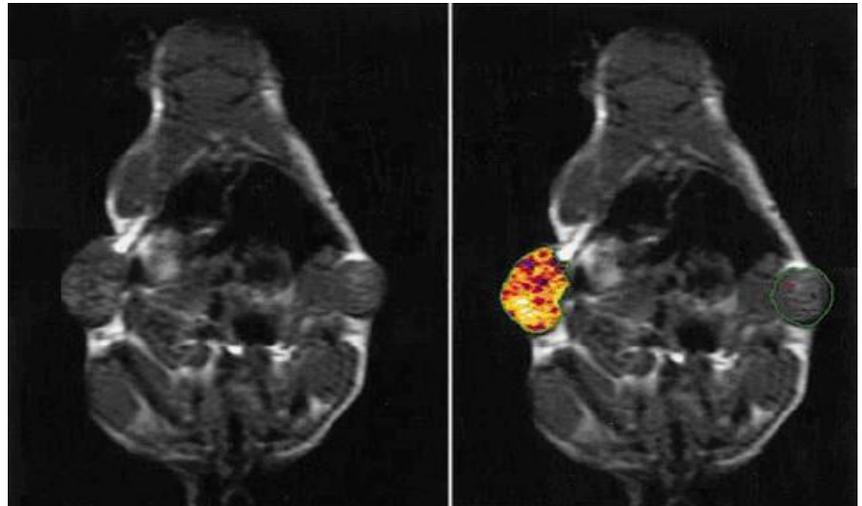


Figura 3. Tumor en ratón transgénico con el uso de USPIO como agente contrastante: (a) Antes de suministrar contraste; (b) Aplicación del contraste que destaca la zona y fronteras del tumor [8].

conocimientos acerca de la apoptosis y la necrosis celular en esta enfermedad y se ha monitoreado la actividad fagocítica y microglia en la zona de tejido infartado, así como la homeostasis de la barrera hematoencefálica.

El seguimiento de la evolución del infarto ante diferentes tratamientos farmacológicos y la medición de la respuesta inflamatoria posterior mediante IRM han sido exitosos. Un estudio reciente [19] incluye la inducción del infarto a cuatro grupos de animales: uno de control y tres a los que se les aplica por vía intravenosa agentes trombolíticos como la microplasma y el activador del plasminógeno tisular (tPA) respectivamente, con dos dosis. Por distintos métodos de IRM (perfusión, difusión, T2) se monitoreó después de transcurridas 1 hora y 24 horas, los volúmenes, el volumen sanguíneo cerebral (rCBV) y el flujo sanguíneo cerebral (rCBF) de las lesiones isquémicas en corteza y subcorteza, y se evalúa la respuesta del tejido a las aplicaciones terapéuticas. Se comparan los resultados con las evaluaciones histológicas [19] (Figura 4). Se continúa comparando los métodos de  $\mu$ RM en busca de mayor especificidad [71].

### Control de los experimentos de IRM con modelos animales

El monitoreo y estabilización continua de los parámetros vitales es esencial, tanto para preservar y conocer el estado orgánico funcional del animal como para garantizar la calidad de la información obtenida. Sincronizar adecuadamente la adquisición de los datos con los movimientos propios (usualmente el sincronismo cardíaco y respiratorio) permite disminuir y compensar los artefactos que los movimientos biológicos inducen en la imagen.

Comúnmente, durante un estudio se miden: el nivel de saturación de O<sub>2</sub> en la sangre, la temperatura corporal, la presión sanguínea, el ritmo cardíaco y la frecuencia respiratoria. Estas variables tienen una estrecha relación con el tamaño, peso, edad y especie del animal, lo que implica un conocimiento previo de los rangos en que oscilan estos valores [76-77]. Varios au-

53. Schellenberger EA, Sosnovik D, Weissleder R, Josephson L. Magneto/optical annexin V, a multimodal protein. *Bioconjug Chem* 2004;15:1062-7.

54. Stets C, Brandt S, Wallis F, Buchmann J, Gilbert FJ, Heywang-Köbrunner SH. Axillary lymph node metastases: A statistical analysis of various parameters in MRI with USPIO. *J Magn Reson Imaging* 2002;16:60-8.

55. Weissleder R, Moore A, Mahmood U, Bhorade R, Benveniste H, Chiozza EA, et al. *In vivo* magnetic resonance imaging of transgene expression. *Nat Med* 2006;6:351-5.

56. Harisinghani MG, Weissleder R. Sensitive, noninvasive detection of lymph node metastases. *PLoS Med* 2004;1:e66.

57. Semelka RC, Helmlinger TK. Contrast agents for MR imaging of the liver. *Radiology* 2001;218:27-38.

58. Kohler N, Sun C, Wang J, Zhang MQ. Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intercellular uptake into human cancer cells. *Langmuir* 2005;21:8858-64.

59. Kohler N, Sun C, Fichtenholtz A, Gunn J, Fang C, Zhang MQ. Methotrexate-immobilized poly (ethylene glycol) magnetic nanoparticles for MR imaging and drug delivery. *Small* 2006;2:785-92.

60. Schulze K, Koch A, Schopf B, Petri A, Steitz B, Chastellain M et al. Intraarticular application of superparamagnetic nanoparticles and their uptake by synovial membrane – an experimental study in sheep. *J Magn Mater* 2005;293:419-32.

61. Jain TK, Morales MA, Sahoo SK, Leslie-Pelecky DL, Labhasetwar V. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. *Mol Pharmacol* 2005;2:194-205.

62. Kute T, Lack CM, Willingham M, Bishwokama B, Williams H, Barrett K, et al. Development of Herceptin resistance in breast cancer cells. *Cytometry A* 2004;57:86-93.

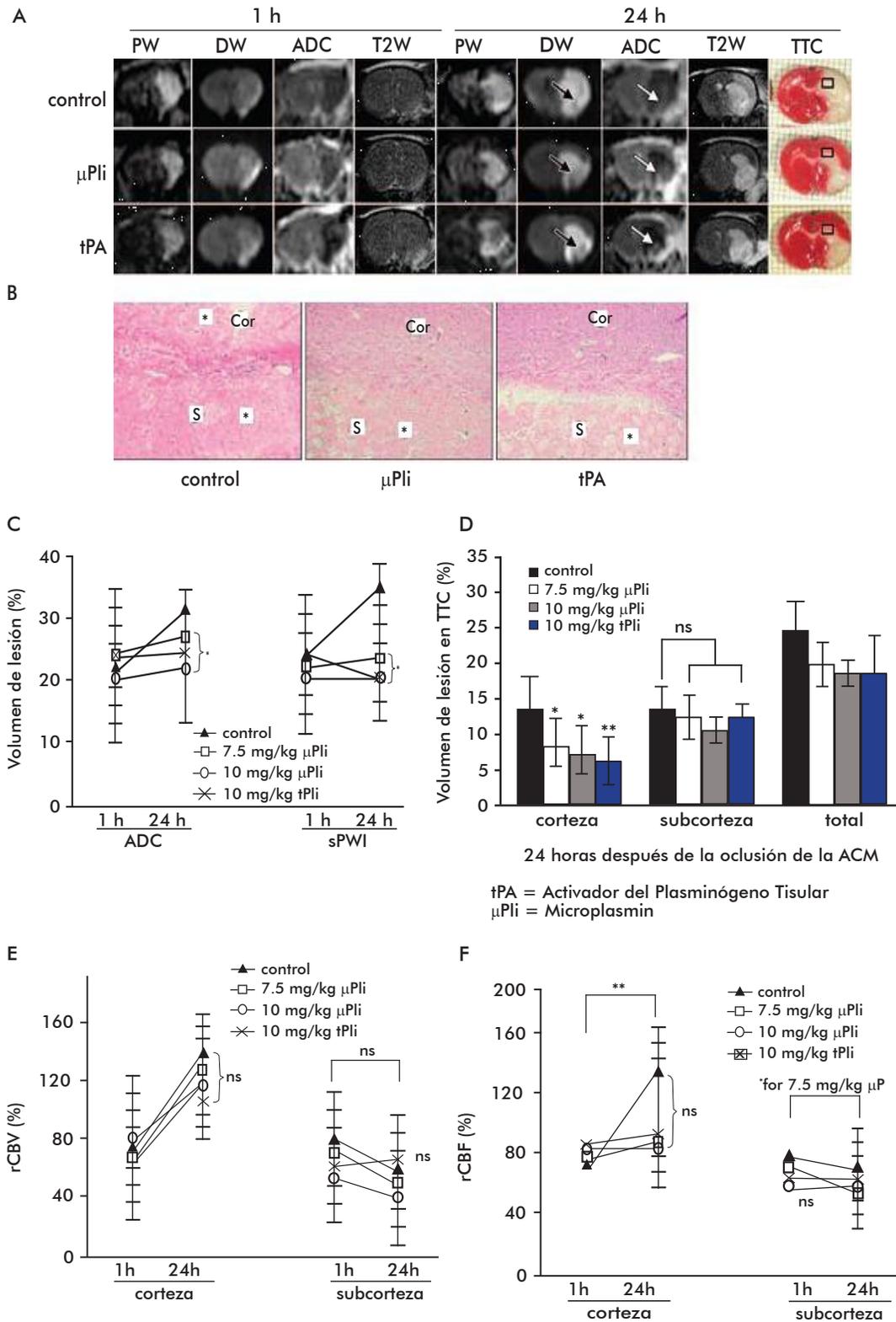


Figura 4. Estudio evolutivo de isquemia cerebral a 3 grupos de ratas en dos instantes diferentes: (a) Lesiones visualizadas con IRM de Perfusión (PW), Difusión (DW y ADC) y T2W y los cortes histológicos correspondientes teñidos con TTC; (b) Hallazgos correspondientes a las zonas señaladas por los rectángulos en las láminas teñidas con TTC; (c-f) Cambios cuantitativos del volumen de las lesiones, el volumen sanguíneo cerebral (rCBV) y el flujo sanguíneo cerebral rCBF en corteza (Cor) y subcorteza (S) [19].

tores se han dedicado a encontrar métodos más eficaces para reducir los efectos indeseables de la ausencia de este sincronismo en la clínica y la preclínica [79-87].

Las características anatómicas y funcionales (tamaño, ritmo cardíaco y respiratorio, etc.) de la mayoría de los modelos constituyen un reto experimental importante a la hora de garantizar reproducibilidad, evaluación adecuada y escalamiento de los resultados a estudios en humanos. Estos factores son decisivos en la calidad de las imágenes y registros que se obtienen, pues afectan la resolución espacial y temporal, lo que genera errores que ocultan detalles anatómicos significativos o falsean determinadas afecciones [79].

Con resoluciones espaciales submilimétricas y tiempos de obtención de imágenes de decenas de minutos se impone mucha severidad en el posicionamiento del animal. Para disminuir los errores por movimiento y posición, especialmente en estudios de larga duración, se emplean mecanismos de soporte y anestesia general [81, 82].

La IRM se combina con otras técnicas como el EEG [80-90] y el ECG [86-88]. El registro simultáneo también tiene desventajas asociadas con las interferencias que en alguna medida producen los equipos de monitoreo en la máquina de RM. Tal es el caso de los artefactos originados en la IRM a causa de la presencia de los equipos de EEG y ECG. Los equipos para trabajar próximos a campos magnéticos intensos deben cumplir determinadas normas y requisitos para no afectar su funcionamiento ni interferir con el resto del equipamiento que se encuentra en las cercanías. El empleo de dispositivos para la regulación de la temperatura es de vital importancia en estudios de animales recién nacidos propensos a la pérdida de calor y por consiguiente, a la hipotermia. Se pueden estudiar además, la reacción de los modelos ante estímulos diferentes. También estos equipos son de gran utilidad en el seguimiento y control del animal cuando se le introduce AC en el torrente sanguíneo, para evitar complicaciones que pongan en riesgo su salud. Toda la información recopilada resulta útil en la realización de comparaciones sobre el estado del animal antes, durante y al final de cada experimento.

Dispositivos compatibles con la RM se comercializan por varias firmas. Grupos de investigación han desarrollado sus propias aplicaciones en este campo, lo que ha hecho más versátiles sus instalaciones.

### Las máquinas de RM para la experimentación en modelos animales

Existen equipos para la experimentación animal y otros para uso en humanos, aunque en múltiples ocasiones se han empleado estos últimos con éxito en estudios de algunos modelos [91]. Si bien existen diferencias entre las aplicaciones clínicas y las de experimentación animal, desde el punto de vista de la RM es posible de manera cuantitativa comparar los resultados, trasladar y homologar metodologías desarrolladas en equipos para uno u otro fin [2, 11, 12, 91-93].

Los productores más importantes de equipos para estudiar modelos animales son la Varian y la Bruker. Una expresión comercial de la búsqueda de continuidad de la preclínica a la clínica es la creación de una plataforma única del software de manipulación de los parámetros de ambos tipos de equipos anunciada recientemente por Siemens y Bruker.

Los equipos para modelos se caracterizan por tener una alta intensidad de campo (2.0-21.1 Teslas) y aberturas útiles para posicionar el animal (bore) de 7 a 30 cm. Subir los campos asegura más alta relación señal-ruido y mejora la resolución espacial, no obstante, ello trae consigo problemas tecnológicos que empobrecen la calidad de la imagen. Las resoluciones record están entre los 43  $\mu\text{m}$  en menos de 30 min y los 21.5  $\mu\text{m}$  en 2 h [76]. Las resoluciones temporales alcanzadas permiten estudiar procesos de hasta 40 ms.

Desde el 2000, el National Institutes of Health, National Center for Research Resources (NIH/NCRR) creó el centro Mouse Biomedical Informatics Research Network (MBIRN) para la recolección y organización del flujo de datos sobre este tema. En su sitio público [93] se comparten herramientas y métodos para calibrar y recolectar datos en diferentes equipos e imágenes de modelos animales [5].

El incremento de la productividad y posibilidades de las instalaciones de RM se está logrando a partir de las siguientes acciones:

- Dispositivos para el estudio simultáneo y en igualdad de condiciones de más de 8 animales.
- Uso de esteras que garantizan la entrada y salida continua de los sujetos de experimentación al equipo de RM con intervalos exactos de tiempo.
- Nuevas bobinas, incluso endoscópicas, para acercar el sensor a la zona de interés.
- Monitoreo multiparamétrico, registro continuo y conjunto de señales fisiológicas con las imágenes.
- Uso de AC como las npm, que permiten aumentar el contraste, trasladar fármacos y monitorear procesos fisiológicos al nivel molecular y celular.
- Desarrollo de npm con propiedades bioluminiscentes para estudios multimodales de RM y fluorescencia [94].

### Conclusiones

Las ImRM y  $\mu\text{RM}$  brindan la posibilidad de detectar, seguir, cuantificar y visualizar fenómenos dinámicos moleculares y celulares en todos los tejidos y órganos de seres vivos con métodos diferentes y complementarios en un mismo equipo, *in vivo* de manera *no invasiva* y con resoluciones espaciales de decenas de micras y temporales, de milisegundos.

Son crecientes el número de trabajos y los impactos prácticos en todos los campos de las investigaciones, estudios preclínicos y clínicos. La disminución de los tiempos, la laboriosidad de los estudios histológicos, la reducción de la cantidad de animales necesarios y los costos de los estudios junto a la elevación de la exactitud y precisión de la información estructural y funcional de procesos biomoleculares, celulares, tejidos y órganos hacen imprescindible una atención especial a estos métodos emergentes. La introducción, empleo y desarrollo de estas modalidades de imágenes en las investigaciones y aplicaciones biotecnológicas y la biomédicas constituye una imperiosa necesidad para situarse en los niveles mundiales de competitividad. En pocos años los estándares para el estudio, validación y registro requerirán documentarse con información proveniente de modalidades de imágenes.

Para las investigaciones de  $\mu\text{RM}$  y de ImRM es imprescindible disponer de acceso a instalaciones de RM poderosas. No obstante, la identificación de los problemas de importancia científica y de aplicaciones

63. Dshane J, Garner CC, Sontheimer H. Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. *J Biol Chem* 2003;278:4135-44.

64. Veisheh O, Sun C, Gunn J, Kohler N, Gabikian P, Lee D, et al. Optical and MRI multifunctional nanoprobe for targeting gliomas. *Nano Lett* 2005;5:1003-08.

65. Moseley ME. Molecular imaging and stroke. *Stroke* 2009;40(suppl 1):S30-3.

66. Chen F, Suzuki Y, Nagai N, Peeters R, Coenegrachts K, Coudyzer W, et al. Visualization of stroke with clinical MR imagers in rats: A feasibility study. *Radiology* 2004;233:905-11.

67. Stracke ChP, Katoh M, Wiethoff AJ, Parsons EC, Spangenberg P, Spuntrup E. Molecular MRI of cerebral venous sinus thrombosis using a new fibrin-specific MR contrast agent. *Stroke* 2007;38:1476-81.

68. Kidwell ChS, Alger JR, Saver JL. Evolving Paradigms in imaging the ischemic penumbra with multimodal magnetic resonance imaging. *Stroke* 2003;34:2729-35.

69. Jones SC, Kharlamov A, Yanovski B, Kim DK, Easley KA, Yushmanov VE, et al. Stroke onset time using sodium MRI in rat focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2006; 37:883-8.

70. Chen F, Liu Q, Wang H, Suzuki Y, Nagai N, Yu J, et al. Comparing two methods for assessment of perfusion-diffusion mismatch in a rodent model of ischaemic stroke: a pilot study. *Br J Radiol* 2008; 81:192-8.

71. West GA, Golshani KJ, Doyle KP, Lessov NS, Hobbs TR, Kohama SG et al. A new model of cortical stroke in the rhesus macaque. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29:1175-86.

72. Wood AK, Klide AM, Pickup S, Kundel HL. Prolonged general anesthesia in MR Studies of Rats. *Acad Radiol* 2001;8:1136-40.

73. Hachinski V, Iadecola C, Petersen RC, Breteler MM, Nyenhuis DL, Black SE, et al. National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Canadian Stroke Network Vascular Cognitive Impairment harmonization standards. *Stroke* 2006;37:2220.

74. Chen F, Suzuki Y, Nagai N, Sun X, Wang H, Marchal G, et al. Microplasmid and Tissue Plasminogen Activator: Comparison of Therapeutic at Multiparametric MR Imaging. *Radiology* 2007;244 Suppl 2:429-38.

75. Wiart M, Davoust N, Pialat JB, Destret V, Moucharrarie S, Cho TH, et al. MRI Monitoring of Neuroinflammation in Mouse Focal Ischemia. *Stroke* 2007; 38:131-7.

76. Lodygensky G, Inder T, Neil J. Application of Magnetic Resonance Imaging in Animal Models of Perinatal Hypoxic-Ischemic Cerebral Injury. *Int J Dev Neurosci* 2008;26:13-25.

77. Mirsattari SM, Bihari F, Leung LS, Menon RS, Wang Z, Ives JR, et al. Physiological monitoring of small animals during magnetic resonance imaging. *J Neurosci Methods* 2005;144:207-13.

78. Justicia C, Ramos-Cabrera P, Hoehn M. MRI Detection of secondary damage after stroke: chronic iron accumulation in the thalamus of the rat brain. *Stroke* 2008;39:1541-7.

para la biotecnología y la industria de medicamentos, la formación de colectivos con un enfoque multidisciplinario son pasos previos que requieren de tiempo y de capacidades organizativas.

Es inminente la obtención de desarrollos inéditos de los equipos, sus dispositivos, las metodologías y los mecanismos de contraste, en el uso de los modelos animales, en la elevación de las resoluciones espaciales y temporales y en la disminución de los tiempos de imágenes, todo lo cual aumentará la productividad, especificidad, fiabilidad e impacto de las investigaciones. Un esfuerzo particular deberá hacerse para

encontrar herramientas que contribuyan a hacer más efectivo el traslado de los resultados de los estudios de los modelos a humanos.

### Agradecimientos

Al colectivo del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Cuba por haber contribuido con su interés a motivar este trabajo. A BIOMUNDI por la información aportada. A Juan Carlos García por su colaboración en la búsqueda de información. A Yolanda Sarzo por su esmerada participación en la corrección del trabajo.

79. Knutsson H, Andersson M, Wigstrom L, Borga M, Sigfridsson A. Motion artifact reduction in MRI through generalized DFT. Proc IEEE Int Symp Biomed Imaging 2004;1:896-9.

80. Brau AC, Hedlund LW, Johnson GA. Cine Magnetic Resonance Microscopy of the Rat Heart Using Cardiorespiratory-Synchronous Projection Reconstruction. J Magn Reson Imaging 2004;20:31-8.

81. Deans AE, Wadghiri YZ, Berrios-Otero CA, Turnbull DH. Mn enhancement and respiratory gating for in utero MRI of the embryonic mouse central nervous system. Magn Reson Med 2008;59:1320-8.

82. Driehuys B, Nouis J, Badea A, Bucholz E, Ghaghada K, Petiet A, et al. Small Animal Imaging with Magnetic Resonance Microscopy. ILAR J 2008;49:35-53.

83. Uribe S, Muthurangu V, Boubertakh R, Schaeffter T, Razavi R, Hill DL, et al. Whole-heart cine MRI using real-time respiratory self-gating. Magn Reson Med 2007;57:606-13.

84. Hiba B, Richard N, Janier M, Croisille P. Cardiac and respiratory double self-gated

cine MRI in the mouse at 7 T. Magn Reson Med 2006;55:506-13.

85. Hiba B, Richard N, Janier M, Croisille P. A robust method for auto-synchronized MRI in the mouse at 7 T. Comput Cardiol 2005;25:817-20.

86. Park HD, Cho SP, Lee KJ. A Method for Generating MRI Cardiac and Respiratory Gating Pulse Simultaneously based on Adaptive Real-Time Digital Filters. Comput Cardiol 2006;17:813-6.

87. Brau AC, Wheeler CT, Hedlund LW, Johnson GA. Fiber-Optic Stethoscope: A Cardiac Monitoring and Gating System for Magnetic Resonance Microscopy. Magn Reson Med 2002;47:314-21.

88. Krakow K, Allen PJ, Symms MR, Lemieux L, Josephs O, Fish DR. EEG recording during fMRI experiments: Image quality. Hum Brain Mapp 2000;10:10-5.

89. Wang Z, Ives JR, Mirsattari SM. Simultaneous electroencephalogram-functional

magnetic resonance imaging in neocortical epilepsies. Adv Neurol 2006;97:129-39.

90. Salek-Haddadia A, Lemieux L, Merschhemke M, Diehla B, Allen PJ, Fish DR. EEG quality during simultaneous functional MRI of interictal epileptiform discharges. Magn Reson Med 2003;21:1159-66.

91. Brokmann MA, Kemmling A, Groden C. Current issues and perspectives in small rodent magnetic resonance imaging using clinical MRI scanners. Methods 2007;43:79-87.

92. West GA, Golshani KJ, Doyle KP, Lessov NS, Hobbs TR, Kohama SG, et al. A new model of cortical stroke in the rhesus macaque. J Cereb Blood Flow Metab 2009;29:1175-86.

93. Mouse Biomedical Informatics Research Network (MBIRN). Consultado 4 de agosto, 2009, disponible en: <http://nbirn.net/research/testbeds/mouse/index.shtml>

94. Dohager RS, Flentje K, Moss B, Pan MH, Kesarwala A, Piwnica-Worms D. Advances in bioluminescence imaging of live animal models. Curr Opin Biotech 2009;20:45-53.

Recibido en agosto de 2009. Aprobado en diciembre de 2009.