

# Imagen molecular con nanopartículas

Irene Fernández Barahona<sup>1</sup>, Jesús Ruiz Cabello<sup>2,3</sup>, Fernando Herranz<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Nanomedicina para Imagen Molecular. Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares. Madrid

<sup>2</sup>Dpto de Fisicoquímica II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, Madrid

<sup>3</sup>CIBER de Enfermedades Respiratorias, Madrid

## 1. INTRODUCCIÓN A LA IMAGEN MOLECULAR

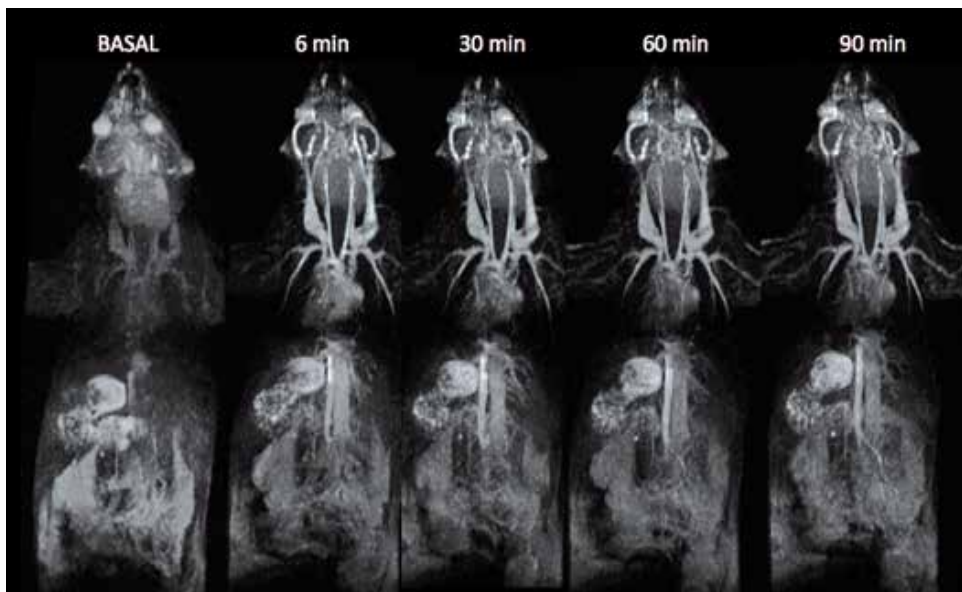
Se puede definir la imagen molecular (IM) como la visualización y medida de procesos biológicos a escala subcelular y de manera no invasiva. Inicialmente desarrollada para la detección de antígenos mediante microscopía óptica, la IM cubre en la actualidad todos los tipos de imagen biomédica. En la *Tabla 1* se recogen las principales modalidades de imagen médica que se emplean en IM. De todas ellas, a la hora de hablar de IM, necesariamente *in vivo*, y con capacidad de traslación a la práctica clínica, las técnicas más importantes por sus características son las de imagen nuclear, la resonancia magnética y la tomografía computerizada. Especialmen-

te relevante es el uso de técnicas de imagen nuclear, la tomografía por emisión de positrones (PET, en inglés) y la tomografía por emisión de fotón único (SPECT, en inglés). La importancia de estas técnicas en IM es tal que todavía mucha gente emplea ambos términos, imagen nuclear e imagen molecular, como sinónimos. Este papel dominante es debido a la excelente sensibilidad que presentan, en el rango nanomolar (nM), ideal para la detección de la mayoría de procesos en los que se emplea la IM administrando dosis subterapéuticas de los trazadores. Como desventaja de las técnicas nucleares (ver *Tabla 1*) la más destacada es la baja resolución espacial y el empleo de sustancias radiactivas. En el otro extremo se >>>

**Tabla 1. Principales técnicas para imagen molecular.**

FRI: imagen de reflectancia fluorescente; FMT, tomografía molecular de fluorescencia; US, ultrasonidos; PET, tomografía por emisión de positrones; SPECT, tomografía computerizada de fotón único; MRI, imagen por resonancia magnética; CT, tomografía computerizada.

Modalidad	Resolución espacial (mm)	Tiempo de imagen	Nanopartícula	Ventajas	Desventajas
Fluorescencia	<1 (FRI); 1 (FMT)	Segundos a minutos, minutos (FMT)	<i>Quantum dots</i> , <i>Up-converting nanophosphors</i>	Sensibilidad, gran número de sondas	Baja resolución espacial
Ultrasonidos	0.04-0.1 (subclínica); 0.15-1 (clínica)	De segundos a minutos	nanoburbujas	Tiempo real, bajo coste. Buena resolución	Dependiente de operador, sondas poco eficaces
PET	1-2 (microPET) 6-10 (PET clínico)	Minutos	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , AuNP, Silica, QDs. Liposomas dopadas o con quelantes	Sensibilidad, cuantitativa, ng de sonda	Radiación, resolución espacial
SPECT	0.5-2 (microSPECT); 7-15 (clinical SPECT)	Minutos	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , AuNP, Silica, QDs. Liposomas dopadas o con quelantes	Sensibilidad, cuantitativa, ng de sonda	Radiación, resolución espacial (menos que PET)
MRI	0.01-0.1 (subclínica) 0.5-1.5 (clínica)	Minutos a horas	Óxidos de Fe, Mn, Gd. Liposomas, dendrímeros	Resolución; anatómica y funcional	Sensibilidad, tiempo de estudio
CT	0.02-0.3 (subclínica); 0.5-2 (clínica)	Minutos	AuNP, NPs dopadas con Iodo	Resolución	Radiación, uso en tejido blando limitado



**Figura 1.**

Angiografía por resonancia magnética en ratón antes y varios tiempos después de la inyección de nanopartículas de óxido de hierro como agentes de contraste T1. (Bhavesh et al. 2015).

» encuentran técnicas como la resonancia magnética nuclear (MRI, en inglés) y la tomografía computerizada (CT, en inglés) en las cuales destaca por encima de todo la excelente resolución que presentan. Por el contrario, son técnicas con una sensibilidad reducida lo que puede llegar a limitar su uso en ciertas aplicaciones. De esta forma vemos que, del conjunto de técnicas de imagen biomédica a nuestra disposición, tenemos un grupo con altísima sensibilidad pero limitada resolución espacial (PET, SPECT, Fluorescencia) y otras con gran resolución espacial pero sensibilidad moderada (MRI, CT). No es de extrañar por tanto que el paso siguiente sea el uso de imagen híbrida, combinando dos de estos tipos de técnicas, desde el PET/CT, la más empleada hasta la fecha, hasta nuevos desarrollos como el FMT/CT y más recientemente la PET/MRI.

Además de las técnicas de imagen, un aspecto inherente al campo de la IM es el del uso de un trazador o sonda para imagen; siendo este cualquier compuesto químico que proporciona señal en, al menos, una técnica de imagen y que presenta un grado alto de especificidad biológica hacia una diana en concreto. De los distintos tipos de compuestos químicos que se pueden emplear como sondas en IM, las nanopartículas (NPs) presentan una serie de ventajas que han atraído un interés enorme en los últimos años. Además de las ventajas particulares de cada material, ya que no es lo mismo un óxido de hierro que una partícula de oro, lo que hace más interesante el uso de las NPs en imagen, son aquellas propiedades que derivan de su tamaño. Por ejemplo, debido a esa escala nanométrica, la relación superficie/volumen es extremadamente alta lo que se traduce en la posibilidad de incluir una gran cantidad de vectores (péptidos, anticuerpos, etcétera) por nano-

partícula. Esta gran densidad de ligandos permite beneficiarse de la multivalencia y por tanto de una mayor señal *in vivo* con menor cantidad de sonda inyectada. Otro aspecto importante es la posibilidad de variar fácilmente el tamaño de las NPs, esto permite modular la farmacocinética de las sondas. De esta manera se puede conseguir sondas con mayor o menor tiempo de circulación en sangre, con eliminación hepática o renal, según las necesidades de cada caso.

Por último, otro aspecto fundamental es el de la multifuncionalización, la posibilidad de incluir en una única sonda componentes que den señal en varias técnicas de imagen, que aporten especificidad biológica e, incluso, fármacos para el tratamiento de la patología. Todos estos aspectos, carga de ligando, farmacocinética y multifuncionalización, son muy difíciles o imposibles de conseguir empleando otro tipo de sondas para IM.

## 2. NANOMATERIALES PARA IMAGEN MOLECULAR

Debido a las propiedades fisicoquímicas inherentes al material (óxido de hierro, *quantum dots*, etcétera) o por la introducción en la estructura de otros compuestos que proporcionan señal en imagen (liposomas, dendrímeros), la variedad de nanomateriales que se emplean en IM es muy grande y sobrepasa con mucho la breve introducción que aquí estamos dando. Por esta razón nos centraremos en describir brevemente aquellos con un número mayor de aplicaciones y, especialmente, con un uso claro en imagen *in vivo*. De aquellos que cumplen estos requisitos nos parecen especialmente importantes dos: las partículas de óxido de hierro y los liposomas.

### Nanopartículas de óxido de hierro

La principal aplicación de estas nanopartículas es como sondas para MRI gracias a su magnetismo. Además, debido a sus propiedades dependientes del tamaño, es posible conseguir partículas que proporcionan señal en los dos tipos de contraste más empleados en MRI, de realce en  $T_2$  (señal negra) o de realce en  $T_1$  (señal brillante) lo que constituye una enorme ventaja en IM ya que en función de la patología que se quiera estudiar se puede emplear uno u otro. Además de por su biocompatibilidad, la versatilidad de la química que se puede llevar a cabo sobre su superficie es una ventaja añadida. En MRI, el mayor número de aplicaciones, con mucho, es como agente de contraste con realce en  $T_2$ , oscureciendo los tejidos en los que se acumulan (Herranz et al. 2014; Cheng et al. 2015).

Con estas características varias formulaciones han sido aprobadas para su uso clínico por agencias reguladoras de diferentes países. Sin embargo, en la mayoría de los casos no son de uso cotidiano en la clínica, debido principalmente al contraste negativo. La señal negra que proporciona es, en muchos casos, complicada de identificar por la presencia de señales hipointensas en los tejidos (por sangrado, presencia de metales como el  $Ca^{2+}$ , etcétera). Por este motivo, su uso como agentes de contraste con realce  $T_1$ , que proporciona una señal brillante, está ganando popularidad (Kim et al. 2011; Bhavesh et al. 2015). Esta posibilidad existe, como decíamos antes, debido al gran control del tamaño que se obtiene en la síntesis de estas partículas. Esto permite obtener partículas de unos 10 nm de tamaño de núcleo, superparamagnéticas, y por tanto con señal negativa, o partículas de unos 3 nm de núcleo, paramagnéticas y con señal positiva, brillante, en MRI (Figura 1).

### Liposomas

Los liposomas son vesículas compuestas por fosfolípidos anfífilos que, en agua, forman una bicapa con un volumen interior acuoso. Pueden por lo tanto encapsular moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas, además de la posible funcionalización de su superficie. Por este motivo su uso *in vivo* es común para la liberación controlada de fármacos.

Debido a la versatilidad de su estructura se han empleado en una gran variedad de técnicas de imagen. Por ejemplo añadiendo iones  $Gd^{3+}$  en su superficie, lo que les convierte en muy buenos agentes de contraste para MRI con realce en  $T_1$  (Ren et al. 2016). Además existen ejemplos de liposomas para la casi totalidad de técnicas de IM. Sin embargo, en los últimos años ha cobrado especial importancia su uso como nano-radiotrazadores para imagen PET. (S. Lee et al. 2016; Edmonds et al. 2016). La posibilidad de introducir el radioisótopo en el núcleo hidrofílico o en la superficie, junto con la introducción de otros compuestos o sondas para imagen, ofrece una gran versatilidad a este nanomaterial. A esto hay que añadir el tipo de radioisótopo empleado que puede variar tanto el tipo de imagen (SPECT o PET) como el tipo de aplicación. Así para el estudio de biomoléculas como anticuerpos es necesario emplear un isótopo de vida media larga ( $^{89}Zr$ ,  $^{124}I$ ) mientras que en el caso de usar péptidos se pueden usar isótopos de vida media corta ( $^{68}Ga$ ,  $^{18}F$ ), de todos estos casos existen ejemplos empleando liposomas como plataforma nanométrica. En cuanto a las aplicaciones, la combinación de liposomas y radioisótopos está especialmente indicada para imagen molecular en cáncer (Figura 2). Para ello se puede emplear tanto un “targeting” activo, mediante una bioconjugación apropiada, como por una >>>

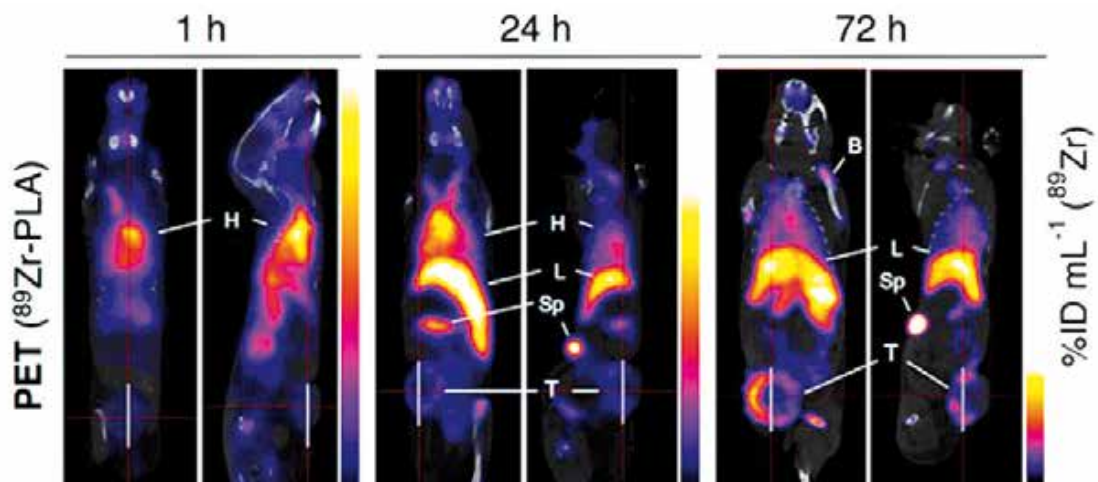


Figura 2

Imagen PET-CT con liposomas dopados con  $^{89}Zr$  en un modelo de ratón con cáncer de mama varios tiempo posteriores a su inyección (B: hueso, H: corazón, L: hígado, Sp: bazo, T: tumor). (Edmonds et al. 2016).

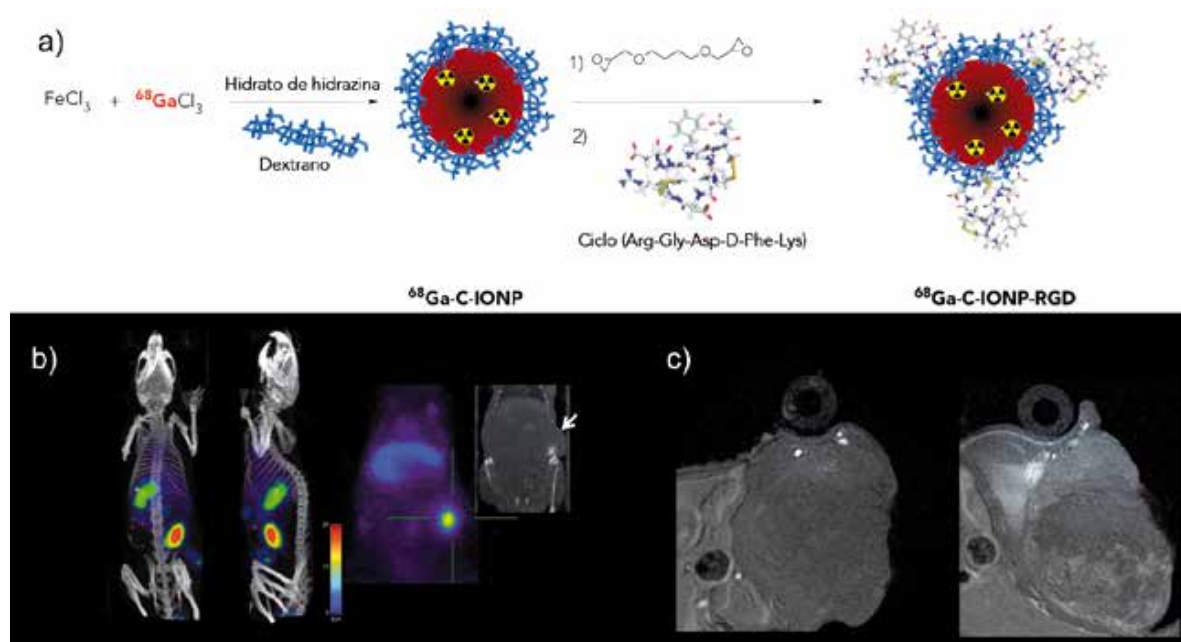


Figura 3

a) Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro dopadas en el núcleo con  $^{68}\text{Ga}$  para imagen híbrida PET/CT y MRI; b) imagen PET/CT de modelo *xenograft* de tumor de mama una hora después de la inyección de las nanopartículas y c) imagen por resonancia magnética del mismo tumor después de la imagen PET (Pellico *et al.* 2016).

>>> acumulación pasiva, mediante el efecto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*, en inglés).

### 3. NANOMATERIALES HÍBRIDOS

El uso de nanomateriales como sondas para proporcionar señal en una de las técnicas empleadas en IM es uno

**EL EMPLEO DE NANOPARTÍCULAS, para imagen molecular es un campo relativamente nuevo en nuestro ámbito pero muy activo, como el gran número de publicaciones de los últimos años refleja claramente. El interés en este tema es debido a las enormes posibilidades que esta aproximación ofrece.**

de los campos más activos de investigación y, como decíamos en la sección anterior, los ejemplos son numerosos. Sin embargo, donde, en nuestra opinión, el potencial de combinar nanopartículas e imagen muestra todas sus posibilidades es en el de la imagen híbrida (D. Lee *et al.* 2012). Como decíamos, esta consiste en el uso de, al menos, dos técnicas de imagen, idealmente una funcional y

otra anatómica. La gran superficie específica de las nanopartículas y la posibilidad de incorporar varios compuestos químicos en distintas posiciones es lo que posibilita este tipo de aproximaciones, difíciles o imposibles de conseguir empleando sondas basadas en compuestos químicos “tradicionales”. En lo que a combinaciones se refiere, básicamente existen todas las posibilidades entre las técnicas de imagen destacadas en la *Tabla 1*. De todas ellas probablemente la más útil para llevar a cabo un proyecto de IM es la que permite combinar, en una sola sonda, señal para PET, MRI y fluorescencia. Así, en un experimento típico, se introducirían en la composición de la nanopartícula hasta cuatro componentes distintos; una biomolécula para proporcionar la selectividad *in vivo*, un compuesto que proporcione señal para PET, otro para MRI y otro para fluorescencia. En función del tipo de nanopartícula, algunas de esas propiedades puede ser inherente al nanomaterial (por ejemplo la señal en MRI por parte de las nanopartículas magnéticas) con lo que el número de compuestos extra que hay que añadir se podría ver reducido. Otro aspecto que hay que tener en cuenta es el orden en el que los distintos componentes se añaden a la mezcla de reacción; en función de su composición, se puede diseñar una

síntesis en la que se añaden todos los compuestos a la vez o, más habitual, de forma secuencial, con reacciones que suelen conllevar pasos de activación-reacción.

A modo de ejemplo del uso de nanomateriales mostraremos una contribución que nuestro grupo ha realizado recientemente y en la que se emplean nanopartículas de óxido de hierro (para imagen  $T_1$  en MRI) dopadas en el núcleo con  $^{68}\text{Ga}$  (para imagen PET) para el diagnóstico de tumores mediante imagen PET/MRI (Pellico et al. 2016). En dicho trabajo lo que se muestra es que es posible sintetizar, en un solo paso, la nanopartícula de óxido de hierro e incorporar un isótopo de vida media corta como el  $^{68}\text{Ga}$  mediante el uso de microondas (Figura 3a). Debido a que las partículas son extremadamente pequeñas (~3 nm) y proporcionan contraste positivo (realce en  $T_1$ ) además de la señal en el PET.

Para demostrar su utilidad se empleó un péptido cíclico muy conocido, RGD que se une preferentemente a las integrinas  $\alpha_v\beta_3$ , para la detección de procesos de angiogénesis. Dicho péptido se unió de forma covalente, mediante un *linker*, a las nanopartículas como se puede apreciar en la figura. El nano-radiotrazador así funcionalizado se probó en un modelo xenograft en ratón. Como se puede ver en la Figura 3b la detección por PET/CT no deja lugar a dudas, con una señal muy clara en el tumor y mínima acumulación en el hígado. El mismo tumor visto por MRI (Figura 3c) revela primero la clara señal positiva, comparando basal (izquierda) y una hora posinyección (derecha) con mucha menos sensibilidad que el PET pero con mucha mejor resolución espacial. ■

## CONCLUSIONES

El empleo de nanopartículas para imagen molecular es un campo relativamente nuevo pero muy activo, como el número de publicaciones de los últimos años refleja claramente. Este interés es debido a las enormes posibilidades que esta aproximación ofrece. De las innumerables combinaciones que se pueden emplear, tanto de nanomateriales como de técnicas de imagen, aquellas que combinan partículas claramente biocompatibles con técnicas como la PET y la MRI son las más pro-

metedoras en un futuro cercano para uso en imagen preclínica y clínica. ■

## PARA LEER MAS

Bhaves R, et al. 2015. T1-MRI Fluorescent Iron Oxide Nanoparticles by Microwave Assisted Synthesis. *Nanomaterials* 5 (4): 1880–90.

Cheng KK, et al. 2015. Curcumin-Conjugated Magnetic Nanoparticles for Detecting Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Mice Using Magnetic Resonance Imaging (MRI). *Biomaterials* 44 (March): 155–72.

Dykman LA, et al. 2016. Multifunctional Gold-Based Nanocomposites for Theranostics. *Biomaterials* 108 (November): 13–34.

Edmonds S, et al. 2016. Exploiting the Metal-Chelating Properties of the Drug Cargo for In Vivo Positron Emission Tomography Imaging of Liposomal Nanomedicines. *ACS Nano* 10 (11): 10294–307.

Estelrich J, et al. 2015. Nanoparticles in Magnetic Resonance Imaging: From Simple to Dual Contrast Agents. *International Journal of Nanomedicine* 10: 1727–41.

García J, et al. 2015. Nanoparticle-Based Multimodal PET/MRI Probes. *Nanomedicine* (London, England) 10 (8): 1343–59.

Herranz F, et al. 2014. Superparamagnetic Nanoparticles for Atherosclerosis Imaging. *Nanomaterials* 4 (2): 408–38.

Kim BH, et al. 2011. Large-Scale Synthesis of Uniform and Extremely Small-Sized Iron Oxide Nanoparticles for High-Resolution T1 Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *Journal of the American Chemical Society* 133 (32): 12624–31.

Lahooti A, et al. 2016. Dual Nano-Sized Contrast Agents in PET/MRI: A Systematic Review. *Contrast Media & Molecular Imaging* 11 (6): 428–47.

Lee D, et al. 2012. "Multifunctional Nanoparticles for Multimodal Imaging and Theragnosis. *Chem. Soc. Rev.* 41 (7): 2656–72.

Lee S, et al. 2016. Copper-64 Labeled Liposomes for Imaging Bone Marrow. *Nuclear Medicine and Biology* 43 (12): 781–7.

Pellico J, et al. 2016. Fast Synthesis and Bioconjugation of  $^{68}\text{Ga}$  Core-Doped Extremely Small Iron Oxide Nanoparticles for PET/MR Imaging. *Contrast Media and Molecular Imaging* 11 (3): 203–10.

Ren L, et al. 2016. MRI-Guided Liposomes for Targeted Tandem Chemotherapy and Therapeutic Response Prediction. *Acta Biomaterialia* 35: 260–8.

Sanghani A, et al. 2017. Multifunctional Nanoparticle Composites: Progress in the Use of Soft and Hard Nanoparticles for Drug Delivery and Imaging. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, e1466.