Imagen de Alta Resolución en Pequeños Animales de Laboratorio

JJ Vaquero, A Molins, M Soto-Montenegro, J Pascau, M Penedo, L Ricon, M Desco
Hospital GU "Gregorio Marañón", Madrid

Resumen

La posibilidad de visualizar y cuantificar la función de un determinado órgano en animales de laboratorio es una herramienta científica de gran importancia en el estudio de modelos de enfermedades humanas, en el descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos y en la caracterización del fenotipo de animales transgénicos y noqueados. La tomografía por emisión de positrones (PET) y la imagen proyectiva de radiofármacos marcados con emisores de positrones proporcionan una herramienta genérica y no invasiva para la investigación científica en los casos anteriormente expuestos.

En este trabajo se describe un sistema mutimodal PET/CT basado en cámaras de coincidencia y detectores de estado sólido para los rayos X, diseñado para adquirir tanto imágenes tomográficas como de proyección con alta resolución temporal, con capacidad para visualizar ratas y ratones, estos últimos en cuerpo completo en un solo campo de visión.

Los más recientes avances en instrumentación para imagen médica han conducido al diseño y desarrollo de sistemas que de una forma más o menos óptima permiten generar imágenes multimodales imposibles de obtener con un solo equipo. Los aparatos resultantes de estas integraciones se dirigen fundamentalmente al desarrollo de la investigación traslacional en biología molecular y medicina, teniendo como principal objetivo la optimización de la relación entre la resolución espacial, la sensibilidad y la especificidad, tres parámetros cuya optimización simultánea es por hoy todo un desafío para la tecnología existente. La evolución de la genómica y de la Biología Molecular, así como la investigación con animales modificados genéticamente (noqueados, transgénicos, modelos animales portadores de determinadas enfermedades) ha hecho necesario la implantación de sistemas no invasivos de imagen para pequeños animales con el fin de realizar estudios longitudinales llevados a cabo en periodos de tiempo relativamente largos; la disponibilidad de estos sistemas es escasa y muy limitada.

Un ejemplo de la utilidad de la imagen molecular en pequeños animales son los modelos transgénicos de ratones para el estudio del cáncer. Estos animales resultan caros y no siempre desarrollan sus tumores en zonas accesibles mediante palpación, lo que impide saber si la enfermedad se está manifestando en un determinado momento, y obliga a recurrir a la autopsia y a la posterior biopsia (Lewis, Achilefu et al. 2002; Weissleder 2002). La utilización de sistemas de imagen animal multimodal permite conocer no sólo la existencia de estos tumores, sino localizarlos anatómicamente con precisión. Esto abarata los costes de la investigación, aumenta la fiabilidad de los estudios, y permite el uso de un solo animal para un estudio longitudinal completo, reduciendo además la variabilidad estadística entre sujetos inevitable con otros métodos. Queda pues patente que las técnicas de imagen molecular como procedimiento para el estudio de la enfermedad, el análisis farmacocinético, y la visualización de la expresión génica, son herramientas muy prometedoras. Si a esto se añade que los estudios realizados mediante estas técnicas permiten su traspaso al entorno clínico y a las aplicaciones en humanos de una forma mucho más rápida, podremos entender el alto interés que despierta esta nueva área de la ciencia tanto social como científicamente.

Las modalidades que actualmente despiertan más interés son dos: la PET (Positron Emission Tomography) y el CT (Computerized Tomography). La PET es probablemente la técnica más potente para el estudio in vivo de procesos biológicos en animales de laboratorio, siendo sus principales ventajas la realización de mediciones cuantitativas funcionales de forma no invasiva, así como la posibilidad de realización de estudios longitudinales. Esta modalidad de imagen permite estudiar, visualizar y cuantificar múltiples procesos bioquímicos y fisiológicos tales como el metabolismo glicídico, la tasa de síntesis proteica, la proliferación celular, la actividad enzimática, la tasa de consumo de oxígeno, el metabolismo b-oxidativo, el pH intracelular, el flujo sanguíneo, la transmisión de señales, la expresión

génica y su regulación, entre otros. Con sistemas PET específicos para animales los estudios se pueden repetir sobre un mismo sujeto a diferentes intervalos de tiempo, pudiendo monitorizar la evolución temporal del trazador utilizando el mismo sujeto como control. Las ventajas de la imagen PET son claras, pero los desafíos tecnológicos que supone su realización en una escala adecuada a pequeños animales de laboratorio y con una resolución y sensibilidad suficientes son importantes. Es necesario el desarrollo de tecnologías que permitan alcanzar la resolución espacial y la sensibilidad adecuadas con un coste razonable, pues se trata de diseñar aparatos para uso en laboratorio, lo que limita la cantidad de recursos que se pueden asignar a este fin. Concretamente, la relativa baja resolución espacial de estos sistemas dificulta la identificación de las estructuras y obliga en muchos casos a la localización de "marcas" que permitan localizar con precisión las activaciones visualizadas. Cuando existe la denominada captación no específica, es posible discernir este tipo de referencias anatómicas, pero conforme los trazadores van siendo más selectivos, empieza a resultar difícil, si no imposible, identificar estructuras que sirvan de referencia. De ahí surge la necesidad de utilizar varias modalidades simultáneamente.

Las técnicas de imagen funcional, que son capaces de registrar y cuantificar compuestos metabólicamente significativos en el interior del sujeto estudiado, aumentan la información aportada al investigador si se presentan junto con modalidades de imagen estructural como el CT, que proporciona una adecuada localización anatómica de los datos funcionales (Vaquero, Desco et al. 2001). Si ambos estudios son además adquiridos en la misma máquina, el proceso de registro necesario para alinearlos correctamente resultará sencillo y eficiente. Es incluso posible que los datos adquiridos por una de las modalidades pueda aportar información que sirva para tratar los datos de otras, ayudando a realizar correcciones necesarias para la reconstrucción de la imagen adquirida.

El Laboratorio de Imagen de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del “Gregorio Marañón” lleva varios años trabajando en estudios funcionales que hacen uso de diferentes sistemas de adquisición de imagen médica en animales de laboratorio. Este grupo ha desarrollado un sistema de adquisición de imagen PET con el que actualmente realiza dichos estudios funcionales. Hasta ahora con esta modalidad se han realizado estudios funcionales de ratones y ratas, en los que no siempre resulta posible localizar anatómicamente los resultados, puesto que la PET sólo ofrece información funcional sobre el volumen estudiado. Se hace imperativo por lo tanto la incorporación de un sistema de adquisición de imagen que proporcione información anatómica en la que situar los niveles de actividad medidos por la PET, y el sistema de CT cubre dicha necesidad.

Equipos híbridos PET/CT

La fusión del PET/CT es una nueva tecnología que combina la información estructural de CT con la información metabólica del PET en un sistema de imágenes. Esencialmente, las lesiones pequeñas se detectan con el PET y se localizan exactamente usando CT. El PET se utiliza cada vez más en la diagnóstico del cáncer, para determinar la extensión de la enfermedad y para evaluar la respuesta del tratamiento. En ciertas situaciones la exploración PET no es suficiente para que el facultativo establezca con precisión la localización exacta del tumor, su sección más activa o su posible malignidad. Las imágenes detalladas que proporciona la fusión del PET/CT pueden disminuir la necesidad de exploraciones adicionales.

La situación descrita también sucede en los equipos PET dedicados a la exploración de pequeños animales de laboratorio. Para resolver este problema, algunos centros disponen de sistemas PET de alta resolución combinados con tomógrafos TAC miniaturizados para la exploración animal con fines de experimentación. La mayoría de estos sistemas cuentan con dos equipos distintos e independientes (uno PET y otro CT), alineados geométricamente en su eje axial, para facilitar el registro y fusión posterior de las imágenes (una funcional y otra anatómica) producidas por ambos. Otros emplean un soporte especial donde el animal está colocado con precisión y totalmente inmóvil, que se puede utilizar tanto en el PET como en el CT. Estos métodos no garantizan el registro adecuado de las imágenes de distintas modalidades, lo que justifica la intensa actividad investigadora en el diseño de nuevos equipos multimodales integrados.

Probablemente la más completa y actualizada referencia al estado de la técnica es la publicación Molecular Imaging and Biology, que reúne todas las comunicaciones presentadas en los congresos anuales de la Academy of Molecular Imaging (AMI, www.ami-imaging.org), que en el año 2003 se celebró en Madrid. Este congreso cubre todo el espectro, desde el diseño de sistemas hasta su aplicación en humanos o en la industria farmacéutica.

Descripción del sistema PET

El sistema esta basado en dos cámaras de centelleo constituidas por sendas matrices de cristales de 1.5 mm x 1.5 mm x 12 mm de LYSO acoplados ópticamente a un tubo fotomultiplicador sensible a posición (PSPMT). Las imágenes de proyección se adquieren con las cámaras giradas 90 grados , y colocando el animal en horizontal en el punto medio entre las cámaras. Esta imagen se genera aceptando únicamente aquellos eventos cuya línea de coincidencia sea perpendicular o casi perpendicular al plano de ambos detectores. La adquisición de datos tomográficos se hace en 3D rotando los detectores alrededor

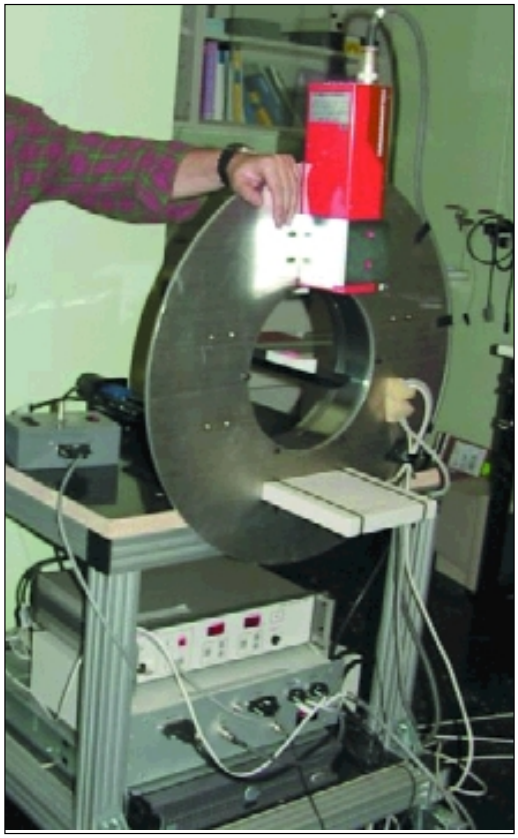
del eje axial y calculando los sinogramas a partir de la codificación angular generada durante el giro. El sistema tiene un campo de visión de 48 mm x 48 mm con una separación entre detectores de 180 mm, lo que permite obtener una resolución espacial en imagen reconsruida de 1.8 mm FWHM (FBP), con un grosor de rodaja de 0.8 mm para 56 rodajas. La resolución de energía media es de 20%, utilizándose un enventanado de 250-650 keV. Para una ventana de coincidencia de 5ns (resolución estimada de 2ns FWHM) la sensibilidad es de 180 cps /uCi para una fuente puntual en el centro, permitiendo una máxima tasa de conteo de 80 Kcps por pareja de detectores.

La consola del operador permite la visualización de imágenes en modo pila y negatoscopio, con visor triplanar que permite la navegación por el volumen tridimensional mostrando las reconstrucciones axial, sagital y coronal, e integra herramientas de zoom, nivel y ventana y información de la imagen en cualquier momento. Las opciones para el análisis de imágenes mediante volúmenes de interés incorporan herramientas para la segmentación manual y semiautomática, y generan información de volumen, actividad máxima, mínima y media para cada volumen creado.

Descripción del sistema CT

Se trata de un sistema de tomografía mediante rayos X de alta resolución, diseñado para su uso con pequeñas muestras de laboratorio tanto in vitro como in vivo. La imagen de proyección es generada a partir de una fuente de rayos X microfoco (50 micrómetros) de 75W, y detectada por un sensor de estado sólido de tecnología CMOS. El detector integra una etapa de CsI depositado en columnas encargado de la conversión de los fotones incidentes a luz visible, y una etapa de detección de la luz generada por integración de carga. Las imágenes tienen un tamaño de 2k x 2k pixels de 50 micrómetros. En el mismo dispositivo se realiza la conversión analógico a digital con una resolución de 12 bits, y el resultado de ésta es directamente registrado por una frame grabber digital conectado a la consola. Esta configuración alcanza una tasa de transferencia de 2 imágenes por segundo, a máxima resolución, y permite variar tanto el voltaje de polarización y corriente suministrada a la fuente como el periodo de integración de la adquisición, lo que permite que el tomógrafo pueda ser utilizado con muestras que se muevan dentro de un amplio rango de tamaños, pesos y densidades.

El sistema permite explorar en una sola pasada un volumen máximo de 75 mm de diámetro por 75 mm de longitud, con trasporte automático de la muestra hasta la posición de exploración, acceso libre al interior del gantry previa desconexión de los rayos X, y posibilidad de realizar varios campos solapados para aumentar el volumen explorado en el sentido longitudinal. Este tomógrafo permite introducir muestras pequeñas de todo tipo incluyendo estudios in vivo de pequeños animales de laboratorio, garantizando su no destrucción o daño al ser posible regular la dosis a la que es expuesta la muestra, y permitiendo el acceso directo al usuario (desconexión automática de la emisión de rayos X), así como el uso de sistemas de soporte vital (oxígeno, líquidos, gases anestésicos) y de monitorización fisiológica. La consola de usuario integra la adquisición tomográfica y fluoroscópica en tiempo real, reconstrucción de imágenes, presentación en distintos modos, que incluyen montaje, stack y películas dinámicas, herramientas para el análisis cuantitativo, almacenamiento de datos en formato Interfile y compatible DICOM, importación de datos crudos, Interfile o DICOM, y herramientas de registro y visualización multimodal. Permite además el acceso vía red a estaciones externas así como el envío y recepción de estudios. La resolución de la imagen final es de 50 micras en todo el campo de visión, y la reconstrucción de imagen se hace directamente en 3D en proyección cónica. Se incluyen dos posibles esquemas de reconstrucción, iterativa con SART (Simultaneous Algebraic Reconstruction Technique) y analítica con FDK (Feldkamp-Davis-Kress Algorithm).





Sistema CT en el que se aprecian el tubo de rayos X microfoco y el detector plano de estado sólido. Para la foto se han retirado las cubiertas y los sistemas auxiliares (izq). Proyección volumétrica de una adqusición de un ratón de 20 gramos a

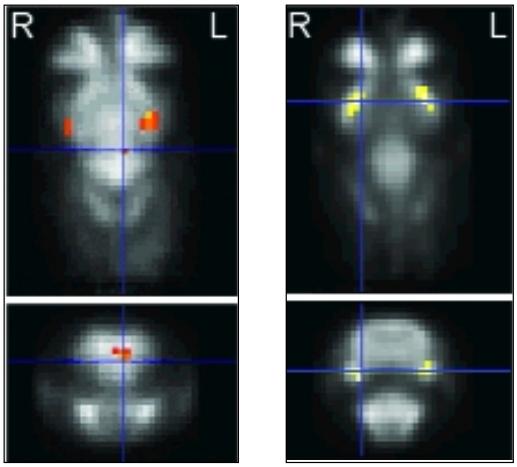
Aplicaciones

Mapas de estadísticos paramétricos para el estudio de estimulaciones sensoriales

Mediante técnicas de cuantificación estadística es posible la búsqueda de efectos de interés presentes en neuroimágenes funcionales como la PET. Una herramienta de creciente uso para el diseño y análisis de estos estudios estadísticos es el software SPM (Statistical Parametric Mapping) de libre distribución (http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm).

Previamente a un estudio de imagen funcional mediante SPM, las imágenes deben ser sometidas a un procesado de modo que sea posible efectuar sobre ellas el estudio estadístico. Este pre-procesado consta de tres etapas: realineado, normalización espacial y filtrado espacial. Posteriormente a este procesado, en el cual las imágenes a estudio se han situado en un espacio anatómico estándar y se ha mejorado su relación señal/ruido, las imágenes PET están en disposición de ser sometidas al análisis estadístico. En el Laboratorio de Imagen de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón" se ha adaptado la metodología SPM al análisis de imágenes PET de animales de laboratorio.Por ejemplo, en un estudio de estimulación sensorial a 12 ratas Wistar hembra se les inyecto 18-FDG i.v.. A 8 de dichas ratas se las tuvo en condiciones de luz ambiente durante 60 minutos (grupo control), mientras que las 4 ratas restantes estuvieron en frente de una luz estroboscópica de frecuencia 10Hz con uno de sus ojos tapado (grupo de estudio). Posteriormente, las ratas se escanearon con un sistema PET durante un periodo de 90 minutos. Una vez adquiridas las imágenes se realizó el estudio SPM.

Para el análisis SPM, las imágenes reconstruidas se re-alineraron mediante registro rígido basado en Mutual Information (MI) respecto a una imagen referencia de [18F]-FDG . Dicha imagen referencia se obtuvo al co-registrar y promediar las imágenes del grupo control. Antes de la normalización espacial se segmentó manualmente una máscara delimitando la región a estudiar: el cerebro. Las imágenes enmascaradas fueron suavizadas con un filtro gaussiano (1.5 x 1.5 x 3.0 mm. FWHM) y analizadas con la versión software SPM2 mediante un test t de Student. En la figura X se muestran las diferencias estadísticamente significativas encontradas entre ambos grupos ($p < 0.001$ sin corregir; $k > 10$).



(a) (b)

Figura X. Mapa estadístico paramétrico ($p<0.001;k>10$) revelando: (a) una hiperactividad de la corteza auditiva y visual, (b) y una hipoactivación de la amigdala.

Estudio de localización de metástasis pulmonares en ratón:

En la figura 4 se pueden observar los cortes sagitales, coronales y axiales de un ratón de peso de 20 gramos, donde se pueden observar perfectamente la cavidad pulmonar, que se corresponde con la zona de estudio. En la siguiente figura (Fig. 5) tenemos la imagen que se obtuvo tras inyectar 18-FDG por la vena de la cola y tras un período de captación de 40 minutos. Se observa captación en corazón, intestino y músculos de las patas. Sin embargo, la localización de otras estructuras se hace más difícil. Por ello, se recurre a la fusión de FDG-CT como muestra la figura 6; donde tenemos perfectamente localizadas el resto de las estructuras.

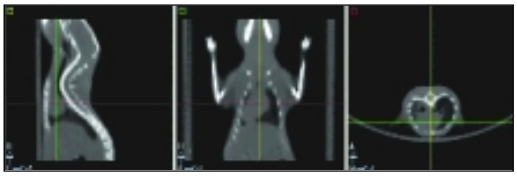


Figura 4: Tomografía computerizada de un ratón (cortes sagital, coronal y axial)

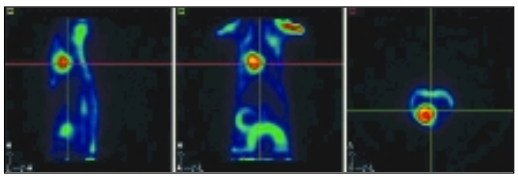


Figura 5: FDG-PET de un ratón (cortes sagital, coronal y axial)

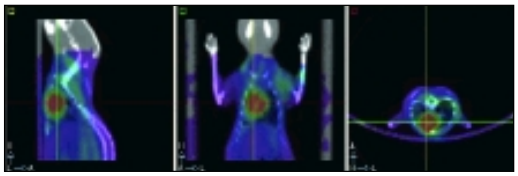
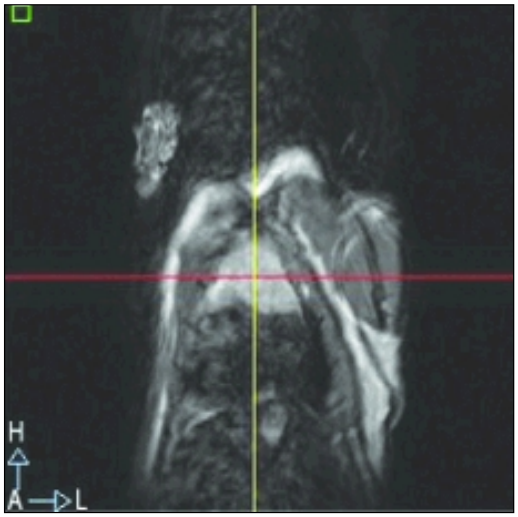


Figura 6: PET-CT de un ratón (cortes sagital, coronal y axial)

A) Estudio del estadiaje de un tumor

En esta ocasión se ha utilizado resonancia magnética como fuente de información anatómica en lugar de la tomografía computerizada. En la figura 7 se observa el corte coronal de un ratón, donde se puede ver perfectamente los pulmones y el corazón. Cuando únicamente se cuenta con una imagen PET, en ocasiones resulta difícil no solamente localizar el tumor; y cuando se cuenta solamente con una imagen anatómica verdaderamente resulta complicado determinar el estado en el que se encuentra el tumor. Se hace por ello necesario realizar una fusión de ambas modalidades de imagen para conseguir una información lo mas completa posible. En la figura 8 podemos ver que aunque en la resonancia se aprecia un tumor de tamaño considerable, en el PET la captación que encontramos no es muy elevada; y ello es debido a que el tumor tenga ciertas partes necrosadas que sean las responsables de la no captación de FDG. debido a que el tumor tenga ciertas partes necrosadas que sean las responsables de la no captación de FDG.



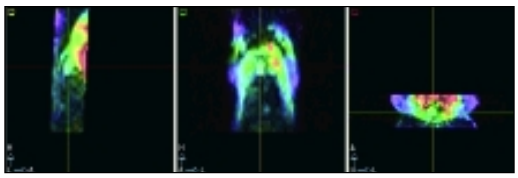


Figura 8: Fusión PET-RM donde se aprecia una captación de glucosa menor a la esperada, debido quizás a la necrosación de ciertas partes del tumor.

Referencias

1. S. Siegel, J.J. Vaquero, L. Aloj, J. Seidel, E. Jagoda, W.R. Gandler, W.C. Eckelman, M.V. Green, "Initial Results from a PET/Planar Small Animal Imaging System", IEEE Trans on Nucl Sci, in press, 1999.

2. J. Seidel, W.R. Gandler, I.N. Weinberg, A. Markowitz, N.J. Lobaugh, M.V. Green, "Collimatorless Projection Imaging of Positron Emitters with an Opposed Pair of BGO Scintillation Cameras", J Nucl Med, vol. 36, pp. 177P, May 1995.

3. C.A. Johnson, J. Seidel, R.E. Carson, W.R. Gandler, et al., "Evaluation of 3D reconstruction algorithms for a small animal PET camera", IEEE Trans Nucl Sci, vol. 44, pp. 1303-1308, June 1997.

4. S. Weber, A. Terstegge, H. Herzog, et al., "The Design of an Animal PET: Flexible Geometry for Achieving Optimal Spatial Resolution or High Sensitivity", IEEE Trans Med Imag, vol. 16, pp. 684-689, October 1997.

5. C.J. Marriott, J.E. Cadorette, R. Lecomte, V. Scasnar, et al., "High-resolution PET imaging and quantitation of pharmaceutical biodistributions in a small animal using avalanche photodiode detectors", J Nucl Med, vol. 35, pp. 1390-1396, August 1994.

6. S.R. Cherry, Y. Shao, R.W. Silverman, K. Meadors, et al., "MicroPET: A high resolution PET scanner for imaging small animals", IEEE Trans Nucl Sci, vol. 44, pp. 1161-1166, June 1997.

7. A.G. Weisenberger, E.L. Bradley, S. Majewski, M.S. Saha, "Development of a novel radiation imaging detector system for in vivo gene imaging in small animal studies", IEEE Trans Nucl Sci, vol. 45, pp. 1743-1749, June 1998.

8. M. Desco, editor, Monográfico sobre PET, Revista de la Real Academia de Ciencias, vol. 96, no. 1-2, 2002

9. J.M. Ollinger: Maximum-likelihood reconstruction of transmission images in emission computed tomo-

graphy via the EM algorithm, IEEE Trans. Med. Imag., 13(1): 89-101, March 1994.

10.Y. Vardi, L. A. Shepp and L. Kaufman: A statistical model for Positron Emission Tomography, J. Amer. Stat. Assoc., 80(389):8-20, March 1985.

11.H.M. Hudson and R.S. Larkin: Accelerated image reconstruction using ordered subsets of projection data, IEEE Trans. Med. Imag., 13(4): 601-609, Dec. 1994.

12.P.E. Kinahan and J.G. Rogers, "Analytic 3D image reconstruction using all detected event," IEEE Trans. Nucl. Sci., vol. 36, pp. 964-968, 1988.

13.C.A. Johnson, Y. Yan. R.E. Carson, R.L. Martino, and M.E. Daube-Witherspoon, "A system for the 3D reconstruction of retracted-septa PET data using the EM algorithm," IEEE Trans. Nucl. Sci., vol. 42, pp. 1223-1227, 1994.

14.K. Erlandsson, P.D. Esser, S.E. Strand, R.L. van Heertum, "3-D reconstruction for a multi-ring PET scanner by single slice rebinning and axial deconvolution," Phys. Med. Biol., 39: 619-629, 1994.

15.M. Defrise, P.E. Kinahan, D.W. Townsend, et al. "Exact and approximate rebinning algorithms for 3D-PET data", IEEE Trans. Med. Imag. 16:145-158; 1997.

16.Mueller, K., R. Yagel, et al. (1999). "Anti-aliased three-dimensional cone-beam reconstruction of low-contrast objects with algebraic methods." IEEE Trans. Med. Imag. 18: 519-537.

17.J. Seidel, J.J. Vaquero, J. Pascau, M. Desco, C.A. Johnson, M.V. Green, "Features of the NIH Atlas Small Animal PET Scanner and its Use with a Coaxial Small Animal Colume CT Scanner." Proc. IEEE Intl. Symp. Biomed. Imag., pp545-548; 2002

18.Siewerdsen, J. H. and D. A. Jaffray (2000). "Optimization of x-ray imaging geometry (with specific application to flat-panel cone-beam computed tomography)." Medical Physics 8(27): 1903-1915.

19.Wang G., L. T.-H., Cheng P-C.,Shinozaki D.M., (1993). "A General Cone-Beam Reconstruction Algorithm." IEEE Transactions on Medical Imaging 12(3): 486-497.