

Evolución del uso de las radiaciones ionizantes en investigación biomédica

M^aT. Macías

El trabajo presenta la evolución, como proceso de cambio, en el uso de las radiaciones ionizantes en investigación biomédica, reflejando el consumo de radioisótopos en los 20 últimos años en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid "Alberto Sols", indicando los motivos del cambio habido.

Se describen, a continuación, las técnicas radioisotópicas aplicadas en la actualidad, y se propone el uso futuro de los radioisótopos en investigación biomédica, destacando la relevancia que las técnicas de imagen molecular tendrán en este ámbito científico.

This article presents the evolution, as a change of process, with the use of radioactivity in biomedical research, showing the consume of radioisotopes during the last 20 years indicating the evidences of these changes.

The radioisotopic techniques applied at the present are described, and the future use of the radioisotopes in biomedical research is proposed, emphasizing the importance that the Molecular Imaging Techniques will have in this scientific area.



MARÍA TERESA MACÍAS

Licenciada en Ciencias Biológicas. Inicia su actividad profesional en el campo de la Protección Radiológica en el año 1989 en el Instituto de Investigaciones Biomédicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Desde 2001 es jefe del Servicio de Protección Radiológica del Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC-UAM.

INTRODUCCIÓN

La investigación biomédica es un ámbito multidisciplinar en el que participan diferentes disciplinas como la biología, medicina, química, física, bioinformática. Uno de sus objetivos fundamentales es conocer las alteraciones moleculares, base de numerosas enfermedades [1]. Como consecuencia, a comienzos del siglo XXI la medicina está adoptando una aproximación molecular para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad [2].

Las radiaciones ionizantes y la biología han caminado juntas desde el descubrimiento de los rayos X por Roentgen en 1896 [3], produciéndose un cambio importante en la investigación biológica y médica desde que el sincrotrón de E. Lawrence en Berkeley empezó a producir isótopos radiactivos mediada la década de los años treinta, [4]. Entre los años 1945 y 1956 hubo un impacto masivo del uso de radioisótopos en investigación biológica, creciendo el número de estudios radiactivos en un porcentaje significativo [4].

Desde sus primeras aplicaciones las técnicas radioisotópicas han sido un componente integral en el desarrollo de la biología molecular, proporcionado elevada sensibilidad y coste reducido

[5]. Las ventajas derivadas del uso de los radioisótopos artificiales en estas aplicaciones están ampliamente descritas en la literatura científica [5-9].

Sin embargo, el uso de los radioisótopos como herramienta básica en las técnicas de bioquímica y biología molecular comenzó a decaer al final del milenio, siendo sustituidos por compuestos fluorescentes y luminiscentes que han dado lugar a métodos alternativos de marcaje no radiactivo [9].

En la actualidad, el marco normativo, la disposición de guías técnicas, la implementación de las medidas de protección radiológica y la formación apropiada, han permitido reducir considerablemente los riesgos derivados de las técnicas radioisotópicas [5], pero continúan estando presentes. Este hecho impulsó en la última década del siglo XX, el desarrollo de técnicas alternativas no radiactivas (fluorescencia, quimioluminiscencia y quimioluminiscencia).

Las técnicas no radiactivas pueden proporcionar igual precisión y sensibilidad que las técnicas radioisotópicas, permitiendo evitar los riesgos radiológicos, aumentar la seguridad, reducir el coste derivado de las medidas de protección, y obtener resultados con más rapidez que las técnicas

radioisotópicas. Como ejemplo, se pueden citar las técnicas de hibridación. El tiempo de marcaje de una sonda radiactiva oscila entre 5 min y 3 h frente a los 30 min que se necesitan para un marcaje no radiactivo. Por otra parte, el tiempo de detección también presenta diferencias significativas, siendo de una hora a una semana en el caso de marcaje radiactivo frente a 1 a 3 h en el caso de no radiactivo.

Este artículo presenta la evolución, entendida como proceso de cambio, en el uso de radioisótopos en los últimos 20 años, en investigación biomédica, presentando técnicas realizadas con radiaciones ionizantes en la actualidad.

EVOLUCIÓN

Para desarrollar el objetivo propuesto en este trabajo, se ha realizado un análisis del consumo promedio de radioisótopos en la instalación radiactiva del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid (IIBM, CSIC-UAM), en los últimos 20 años. Las líneas generales de investigación del centro indicado se focalizan en torno a la biología del cáncer, fisiopatología endocrina y sistema nervioso, estudios metabólicos y procesos de

señalización celular y desarrollo de modelos experimentales de enfermedades humanas. Los datos presentados son fácilmente extrapolables, en la actualidad, a otros centros de investigación biológica.

Los elementos como el fósforo, el azufre, el carbono y el hidrógeno, son los átomos mayoritarios de las moléculas biológicas, por ello sus correspondientes isótopos radiactivos han sido los de mayor uso en investigación biomédica.

El ^{32}P fue uno de los primeros radionucleidos producido en un ciclotrón [4], ha sido uno de los más utilizados en investigación biomédica desde sus primeras aplicaciones en diagnóstico y terapia en la década de los años cuarenta [4], hasta sus numerosos usos en el marcaje de ácidos nucleicos [6,8]. Sin embargo, su consumo, reflejado en la figura 1, comenzó a disminuir en los primeros años de la última década del siglo XX, produciéndose una notable reducción al final de la misma, mantenida en la primera década del presente siglo, a excepción de los incrementos habidos en los años 2007 y 2008 debidos a la realización de marcajes de cultivos celulares con dicho radioisótopo. Los resultados presentados en la figura 1

muestran una reducción próxima al 98% en el consumo de ^{32}P en el tiempo analizado.

Al final de la década de los años treinta el ^{35}S y el ^{14}C prometían convertirse en trazadores ideales para los ensayos bioquímicos [4].

El ^{35}S ha sido utilizado, entre otras aplicaciones, para secuenciar ácidos nucleicos [9] y marcar proteínas [6,9]. Su consumo, reflejado en la figura 2, se ha mantenido estable en el intervalo de 2000 MBq a 4000 MBq durante la última década del siglo XX hasta los dos últimos años, en los que se ha incrementado su uso. Sin embargo, durante la primera década del siglo XXI, se observan bajadas y subidas (hasta un 300% en 2003) anuales, aumentando su uso en los últimos años.

El ^{14}C sintetizado por primera vez un año después que el ^3H [4], ha sido un radioisótopo de reducido consumo en investigación biomédica, dado que las técnicas realizadas con este radioisótopo para marcar hidratos de carbono [9] o, de manera ocasional, proteínas [6], generalmente, requieren bajas actividades. Su consumo en el periodo analizado, mostrado en la figura 2, está situado en el intervalo de 100 MBq a 200 MBq, descendiendo de manera significativa en los últimos cinco años.

La producción inicial de ^3H en un ciclotrón fue consecutiva a la del ^{32}P [4]. Fue utilizado en técnicas bioquímicas clásicas como ensayos enzimáticos [8] y en técnicas de biología molecular como el marcaje de proteínas [6] y ensayos binding [8]. Su consumo, reflejado en la figura 2, fue estable en el intervalo de 1.500 MBq a 3.000 MBq hasta los últimos años del siglo XX, momento en el que comienza a disminuir, observándose una significativa reducción próxima al 98%, como ha ocurrido con el ^{32}P .

El ^{125}I y el ^{131}I han sido los radioisótopos clásicos para marcar proteínas desde sus primeras aplicaciones [4,6]. Sin embargo, una disminución paulatina del consumo de ^{125}I se observa en los primeros cinco años de la última década, manteniéndose su uso reducido, con pequeñas variaciones, durante la primera década del siglo XXI. Los datos presentados en la figura no 2, revelan una reducción del consumo de ^{125}I próxima al 78%.

En el caso del ^{131}I , su consumo se mantuvo estable durante los primeros años analizados, pero, prácticamente, cesa en los últimos años del pasado siglo, se reinicia a comienzos del siglo XXI, produciéndose un fuerte incremento (superior al 800%) en el año 2007, consecuencia del marcaje metabólico de animales de experimentación, y disminuye, de nuevo, en los años sucesivos (figura 2). En la actualidad este radioisótopo se utiliza, fundamentalmente, para la técnica indicada.

La manipulación de ^{32}P implica un considerable riesgo de irradiación, debido a su energía, en caso de no disponer de los blindajes adecuados. Ello justifica, en buena medida, la significativa reducción en su consumo. Por otra parte, la disminución habida en el uso de ^3H podría ser debida a la difícil detección de este radioisótopo por su baja energía.

Esta significativa reducción en el uso de radioisótopos deriva del desarrollo e implementación de técnicas alternativas no radiactivas, utilizando como herramientas compuestos fluorescentes o luminiscentes que sustituyen a los radionucleidos. Sin embargo todavía hay diferentes escenarios en los que el uso de radioisótopos continúa ofreciendo importantes ventajas sobre los métodos no radiactivos.

TÉCNICAS RADIOISÓTOPICAS

En el ámbito de la investigación biológica, una técnica radioisotópica se define como el "método de aplicación

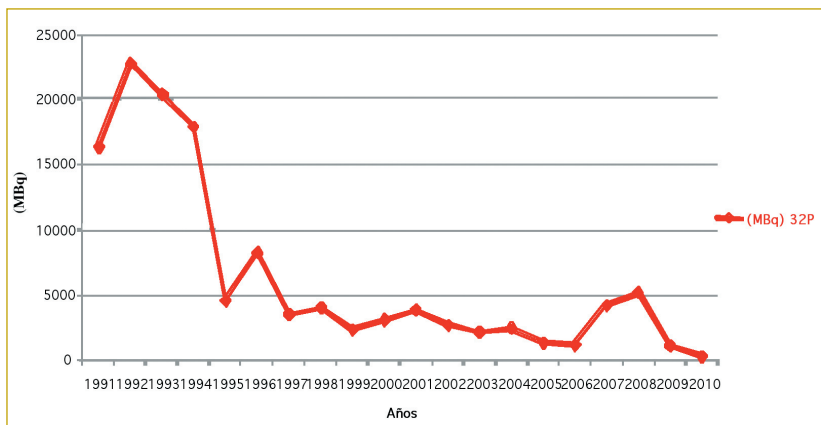


Figura 1: Uso de ^{32}P .

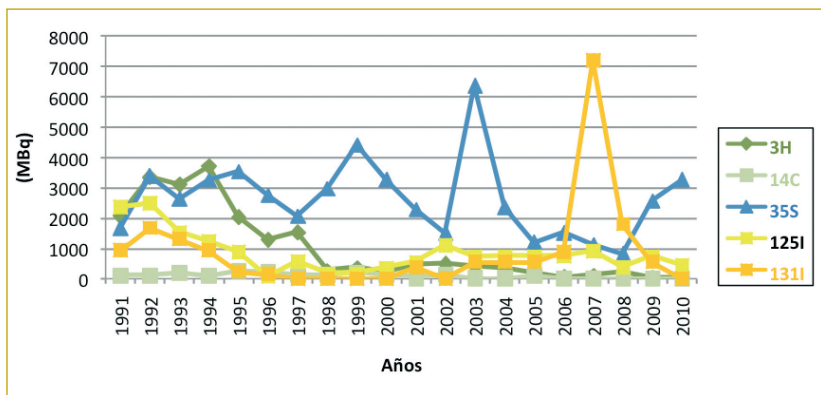


Figura 2: Uso de radioisótopos.

Técnica	Subtécnica	Radioisótopo	Frecuencia de uso
Ensayos enzimáticos	Ensayo CAT	^{14}C	Baja
	Ensayo TRAP	^{32}P	Baja
	Cinéticas enzimáticas	^3H , ^{14}C	Baja
Marcaje de cultivos celulares	Proliferación celular	^3H	Baja
	Síntesis de novo de proteínas	^{35}S	Alta
	Fosforilación de proteínas	^{32}P	Baja
	Estudios de captación	^{125}I	Media
Hibridación	Southern, Northern Blot	^{32}P	Baja
	Hibridación <i>in situ</i>	^{35}S	Media
Caracterización de AN	Footprinting	^{32}P	Media
	Retardo en gel	^{32}P	Media
	Estudios de replicación	^{32}P	Media
Radioyodación	Radioinmunoensayo	^{125}I / ^{131}I	Media
Ensayos <i>binding</i>	Estudio de receptores	^{125}I	Baja
	Estudio de neurotransmisores	^3H	Baja
Transcripción <i>in vitro</i>	Detección de mRNA	^{35}S , ^{32}P	Baja
Traducción <i>in vitro</i>	Síntesis de proteínas	^{35}S	Baja

CAT: Cloranfenicol Acetil Transferasa.

TRAP: Protocolo de amplificación de repetición de telómeros.

Tabla 1: Técnicas radioisotópicas *in vitro*.

de los radioisótopos en diferentes disciplinas científicas cuyo objetivo es el estudio de los distintos procesos biológicos que tienen lugar a nivel molecular y fisiológico” [10]. Estas aplicaciones se pueden abordar de dos maneras diferentes: mediante ensayos *in vitro* o bien mediante ensayos *in vivo*.

Estas técnicas permiten estudiar metabolismo, vías de señalización, alteraciones en la expresión y regulación génica, alteraciones moleculares y diferentes eventos biológicos asociados al desarrollo de las diferentes enfermedades, en diferentes áreas de investigación. Una revisión relativa al uso de técnicas radioisotópicas en la investigación del cáncer puede ser consultada en Macías, M.T. [11].

No es objeto de este trabajo, exponer los riesgos radiológicos implícitos al desarrollo de las diferentes técnicas radioisotópicas ni las medidas de protección aplicadas para mitigarlos.

Técnicas *in vitro*

Las técnicas *in vitro* realizadas en investigación biomédica aportan una serie de conocimientos básicos imprescindibles, que serán, posteriormente confirmados en estudios *in vivo* previos a la investigación preclínica.

Las técnicas radioisotópicas, de biología molecular y celular *in vitro* se han utilizado de manera rutinaria

durante la segunda mitad del siglo XX, en investigación básica en los laboratorios de biología debido a su elevada sensibilidad y precisión. Sin embargo, como se ha indicado previamente, estas técnicas están siendo sustituidas, en gran medida, por técnicas no radiactivas. Ahora bien, las técnicas alternativas no siempre permiten conseguir el objetivo del estudio en curso, por ello algunas de las técnicas radioisotópicas *in vitro* continúan realizándose.

En la tabla 1 se reflejan las técnicas radioisotópicas *in vitro*, realizadas, en la actualidad, en el IIBM, indicando los radioisótopos correspondientes y la frecuencia de uso.

Los ensayos enzimáticos utilizando radioisótopos, fueron, como se ha indicado, una técnica clásica en los laboratorios de bioquímica. Sin embargo, estas técnicas han sido desplazadas prácticamente, por ensayos no radiactivos. En la actualidad, sólo algunas actividades enzimáticas continúan determinándose mediante ensayos radiactivos, como se indica en la tabla 1.

En relación con los marcajes de cultivos celulares, los estudios clásicos de proliferación celular con ^3H para cuantificar la síntesis de ADN han sido sustituidos en más de un 90% por técnicas no radiactivas. Lo mismo ha sucedido con los marcajes de

cultivos celulares con ^{32}P realizados, fundamentalmente, para fosforilar proteínas, excepto en determinadas situaciones en las que las técnicas alternativas no permitan obtener el objetivo planteado. Sin embargo, en otros, escenarios como el estudio de la síntesis de novo de proteínas, el marcaje de cultivos celulares con ^{35}S continua e incluso muestra un pequeño incremento, debido a que la escasa cantidad de proteína en el sistema de estudio requiere elevada sensibilidad [12,13]. Por otra parte, se mantienen los estudios de captación de ^{125}I en cultivos de células transformadas [14].

En la actualidad, para llevar a cabo técnicas de hibridación de ácidos nucleicos (*Northern* o *Southern Blot*), es posible utilizar tanto las técnicas radiactivas como las no radiactivas, pudiendo obtener en las dos situaciones buena resolución y sensibilidad, parámetros importantes en la hibridación. Sólo en aquellas ocasiones que requieren una sensibilidad muy elevada (inferior a 10 fg) es preciso marcar con ^{32}P aunque tanto el tiempo de marcaje como el de detección de la sonda sean superiores, como se ha indicado previamente. Este cambio de técnicas justifica, la disminución presentada en el consumo de ^{32}P en las últimas dos décadas. En cuanto a las técnicas de hibridación *in situ*

con ^{35}S [15], continúan realizándose, siendo su frecuencia de uso superior a las hibridaciones con ^{32}P .

Respecto a otras técnicas de marcaje con ^{32}P aplicadas en estudios de regulación de la expresión génica como la caracterización de ácidos nucleídos [16,17] o el marcaje de oligos antisentido [18,19], continúan realizándose con una frecuencia media, igual que ocurre con las técnicas de radioyodación con $^{125}\text{I}/^{131}\text{I}$ para posteriores radioinmunoensayos [20-22].

El estudio de receptores realizado mediante ensayos binding con radioisótopos [6,8], fue, también, una técnica radioisotópica clásica, pero, en la actualidad estos ensayos con ^{125}I o ^3H están prácticamente en desuso. Lo mismo sucede con las técnicas de transcripción con ^{32}P o ^{35}S y traducción *in vitro* con ^{35}S que han sido sustituidas, en gran medida, por técnicas no radiactivas.

Para valorar los datos presentados, es conveniente considerar que las diversas técnicas realizadas están sujetas a las diferentes líneas de investigación en desarrollo en cada momento, hecho que puede modificar el consumo de radioisótopos en el transcurso del tiempo.

Técnicas *in vivo*

Los estudios *in vivo* son imprescindibles para trasladar los resultados de la investigación básica a la práctica clínica. En ellos se contemplan dos grupos de técnicas: la irradiación biológica, y por otra parte, el marcaje de animales de experimentación.

a) Técnicas de irradiación de cultivos celulares y/o animales de experimentación

En estas técnicas se utilizan irradiadores biológicos equipados con fuentes encapsuladas, generalmente de ^{137}Cs , de alta actividad (30 TBq -37 TBq) o equipos de rayos X. En ellas no se manipula la muestra (cultivos celulares o pequeños animales de experimentación como ratones, ratas o conejos), sólo se le administra una determinada dosis de radiación acorde con el objetivo del estudio en curso.

Las técnicas de irradiación biológica se llevan a cabo con numerosos objetivos, destacando los siguientes estudios:

- Efectos biológicos provocados por la radiación ionizante: cambios en la expresión génica [23], mecanismos de reparación del ADN en respuesta al daño radioinducido [24-25], inducción de respuesta adaptativa [26], bystander effects [27-28],

radiosensibilidad e inestabilidad cromosómica [29], biomarcadores de exposición ocupacional a radiaciones ionizantes [30].

- Efecto terapéutico de la radiación ionizante en tumores previamente inducidos en modelos animales [31-32].
- Agentes que modifican los efectos de la radiación ionizante: radiosensibilizadores o radioprotectores Radiosensibilidad [33-34].
- Otros objetivos:

Valorar tratamientos de terapia génica [35-36], inmunodepleción como tratamiento ablativo previo al trasplante de médula ósea, valorar el uso de terapias combinadas: radioterapia y terapia génica o quimioterapia.

b) Técnicas de marcaje de animales de experimentación

En este abordaje se utilizan fuentes no encapsuladas, como las utilizadas en las técnicas *in vitro*, marcadas con diferentes radionucleídos, generalmente ^{125}I y/o ^{131}I , que son administradas al organismo en estudio.

Desde que se dispuso de los radioisótopos artificiales, el marcaje de animales de experimentación se ha realizado, entre otras aplicaciones, para estudiar la dinámica de procesos bioquímicos y fisiológicos así como para cuantificar diferentes compuestos, ej. hormonas tiroideas con ^{131}I [4]. En la actualidad, también se llevan a cabo en técnicas de imagen molecular, para estudiar nuevos agentes de radioinmunoterapia [37], y con un objetivo terapéutico, administrando ^{131}I en tumores previamente inducidos en modelos animales para valorar el potencial del simporter de yodo y sodio (NIS) en estudios de terapia génica [38-42] (estos marcajes explican el incremento de uso de ^{131}I mostrado en la figura 2).

Técnicas de imagen molecular

El término imagen molecular fue acuñado en 1990 [43] y corresponde al conjunto de modalidades de imagen biomédica cuyo objetivo es la visualización y cuantificación *in vivo*, de manera completamente no invasiva, de diferentes procesos biológicos y patológicos a nivel molecular y celular que diferencian un tejido sano de un tejido patológico.

Existen diferentes técnicas de imagen molecular, basadas en el uso de radiaciones ionizantes como la Tomografía por Emisión de Positrones (PET), la Tomografía por Emisión de Fotón Único (SPECT), la Tomografía

Computarizada (CT) o técnicas no radiactivas como la Resonancia Magnética (RM), técnicas de bioluminiscencia y fluorescencia y ecografía.

Gambhir SS, uno de los fundadores de la imagen molecular como disciplina científica [44] y Massoud TF publicaron una revisión relativa a dichas técnicas [45] presentando un análisis comparativo en términos de resolución espacial, temporal y sensibilidad, exponiendo las ventajas y desventajas de cada una de ellas.

En el presente siglo, se está realizando un importante progreso para adaptar las técnicas de imagen molecular al estudio de pequeños animales de experimentación. Se han desarrollado microSPECT [46-47] y microPET con una resolución espacial de 1,8 mm3 [48]. Una revisión de las técnicas de imagen molecular utilizadas en investigación biomédica ha sido publicada por Pérez J. [49], indicando la infraestructura y recursos necesarios para su desarrollo.

Estas técnicas, además de las ventajas previamente indicadas, se llevan a cabo en tiempos cortos y permiten repetir el experimento varias veces con el mismo animal, reducir el error debido a diferencias naturales entre distintos animales y disminuir el número de animales que deben ser sacrificados.

Las técnicas de imagen molecular aplican en diferentes áreas de investigación [44, 50]: oncología, neurología, estudios de expresión génica, cardiología y farmacología. Los objetivos de estas técnicas en el estudio de animales de experimentación son numerosos, destacando los siguientes:

- Oncología

Conocer las bases moleculares de los diferentes procesos implicados en el desarrollo tumoral: proliferación, diferenciación, angiogenesis, activación de oncogenes, y progresión tumoral: apoptosis y metástasis [11].

Valorar la respuesta tumoral a nuevos agentes quimioterápicos.

- Neurología y neurociencia

Visualizar procesos de neurotransmisión, activación y funcionalidad cerebral en patologías neurológicas, neurodegenerativas y psiquiátricas [51-52].

Desarrollar modelos animales para el estudio de diferentes patologías neurológicas: Alzheimer, Parkinson, y la evaluación preclínica de las nuevas terapias.

- Expresión génica y terapia génica

Visualizar la expresión génica y transgénica *in vivo* de genes endógenos y

genes terapéuticos, de manera especial para desarrollar y validar estudios de terapia génica [53 - 55].

– Cardiología

Evaluar la funcionalidad cardiovascular.

Detectar enfermedad coronaria.

– Farmacología

Conocer la farmacocinética y biodisponibilidad de fármacos nativos o etiquetados con marcadores apropiados.

CONCLUSIONES

De acuerdo con uno de los principios básicos de la protección radiológica, la Justificación, sólo cuando el uso de radiaciones ionizantes sea absolutamente esencial o bien de lugar a una mejora significativa en los resultados, su uso estará justificado. Desde que comenzaron a utilizarse las radiaciones ionizantes, en la década de los años treinta, en investigación biológica, esta premisa se ha mantenido, al no disponer de técnicas alternativas. Sin embargo, en la actualidad la situación ha cambiado de manera significativa y no estaría justificado el uso máximo de radioisótopos.

Durante la primera década del siglo XXI, las técnicas no radiactivas han tenido un fuerte desarrollo y han desplazado en gran medida el uso de radioisótopos en investigación biomédica. Estas técnicas alternativas no radiactivas, evitan los riesgos radiológicos y la producción de residuos radiactivos, disminuyen costes y proporcionan resultados con mayor rapidez. Ahora bien, conviene mencionar que los métodos no radiactivos no están exentos de riesgos, considerando que determinados sustratos fluorescentes y quimioluminiscentes así como sus productos, pueden ocasionar alergias y ser potenciales carcinógenos.

La reducción más significativa se ha producido en las técnicas radioisotópicas in vitro. No obstante, considerando que los resultados son mejores en aquellas aplicaciones que requieren máxima sensibilidad y/o resolución, continuarán en uso siempre que la cantidad de la muestra analizada sea baja en el sistema de estudio.

El uso de las radiaciones ionizantes en investigación biomédica se dirige hacia la implementación de las técnicas in vivo, impulsado por el creciente desarrollo de las técnicas de Imagen Molecular para pequeños animales de experimentación y al avance en la terapia génica.

Las técnicas de imagen molecular en pequeños modelos animales se han convertido en un puente esencial entre los estudios in vitro y su traslación a las aplicaciones clínicas [56]. Aunque se pudiera pensar que las técnicas in vivo podrían desplazar a las técnicas in vitro, esto no sería posible, dado que su desarrollo es fundamental para la investigación biomédica.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr Fernando Usera Mena sus constructivas críticas y sugerencias para la corrección al manuscrito y a Dña. Sonia Muñoz su colaboración en las figuras del documento.

REFERENCIAS

1. Phelps ME (1999). PET The Merging of Biology and Imaging into Molecular Imaging. *The Journal of Nuclear Medicine*. 41(4):661-681.
2. Neves AA, and Brindle KM (2006). Assessing response to cancer therapy using molecular imaging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Reviews on Cancer*. Vol 1766, 2, 242-261.
3. Apisarnthanarax S and Clifford Chao KB (2005). Current imaging paradigms in Radiation Oncology. *Radiation Research*. 163: 1-25
4. Santesmases M.J. y Romero A. 2003. La física y las ciencias de la vida en el siglo XX: radiactividad y biología. Universidad Autónoma de Madrid.
5. IAEA-TECDOC-1528. (2006). Organization of Radioisotope Based Molecular Biology Laboratory.
6. Slater R.J. (1990). Radioisotopes in Biology. A practical Approach. : IRL Press. Oxford.
7. Knoche H. W. (1991). Radioisotopic Methods for biological and Medical Research". Oxford University Press
8. Hemmilä I., Stahlberg T. and Mottram P. (1994). Bioanalytical applications of labeling technologies. Wallac Company.
9. Usera F. (1995). Técnicas sustitutivas al uso de radioisótopos marcadores en investigación biológica. *Radioprotección* no 9, Vol. III. Pp 7-15.
10. Macías, M.T., Pulido, J., Ruiz, A., Sánchez, M., Sánchez, A. y Usera, F. (2002). Guía técnica de gestión de materiales residuales con contenido radiactivo en centros de investigación y docencia. Sociedad Española de Protección Radiológica, publicación no 7. Senda. Madrid.
11. Macías M.T. (2009). Use of radionuclides in cancer research and

treatment. *Clin Transl Oncol* (2009) 11:143-153.

12. Díez-Sánchez C., y col. (2003). Mitochondria from ejaculated human spermatozoa do not synthesize proteins. *FEBS Letters* 553: 205-208.
13. Fernández-Silva P, Acín-Pérez R, Fernández-Vizarra E, Pérez-Martos A, Enriquez JA. (2007). In vivo and in organello analyses of mitochondrial translation. *Methods Cell Biol*. 80:571-88.
14. Riesco-Eizaguirre G. y col. (2009). The BRAFV600E Oncogene Induces Transforming Growth Factor α Secretion Leading to Sodium Iodide Symporter Repression and Increased Malignancy in Thyroid Cancer. *Cancer Res* 2009; 69: (21).
15. Ceballos A, Belinchon MM, Sanchez-Mendoza E, Grijota-Martinez C, Dumitrescu AM, Refetoff S, Morte B, Bernal J. (2009). Importance of monocarboxylate transporter 8 for the blood-brain barrier-dependent availability of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology* 150(5):2491-6..
16. Cebolla B. y col. (2008). DREAM Mediates cAMP-Dependent, Ca²⁺-Induced Stimulation of GFAP Gene Expression and Regulates Cortical Astroglialogenesis. *The Journal of Neuroscience* 28(26):6703– 6713.
17. Rada P, Rojo AI, Chowdhry S, McMahon M, Hayes JD, Cuadrado A. (2011). SCF(beta-TrCP) promotes Glycogen synthase kinase-3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. *Mol Cell Biol*. 2011 Jan 18.
18. Pelczar, Hélène y otros (2010). Evidence for an RNA polymerization activity in axolotl and Xenopus egg extracts. *PLoS One* Volume: 5, Issue: 12, Pages: e14411
19. von Guggenberg, E y col. (2010). In Vitro Characterization of Two Novel Biodegradable Vectors for the Delivery of Radiolabeled Antisense Oligonucleotides, *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 25 (6): 723-731.
20. Medina-Gomez G., Calvo RM, Obregón MJ. (2008). Thermogenic effect of Triiodothyroacetic acid at low doses in rat adipose tissue, without adverse side effects in the thyroid axis. *Amer J Physiol (Endocr. Metab.)* 294: 688-697.
21. Palos F., et al. (2008). Pendred syndrome in two Galician families: insights into clinical phenotypes through cellular, genetic and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metabolism* 93:267-277.

22. Isorna E., Obregón MJ, et al. (2009). Iodothyronine deiodinases and thyroid hormone receptors regulation during flatfish (*Solea Senegalensis*) metamorphosis. *J Experimental Zoology (Molecular & Developmental Evolution)* 312B: 231-246.
23. Uehara, Y, y col. (2010). Gene Expression Profiles in Mouse Liver after Long-Term Low-Dose-Rate Irradiation with Gamma Rays. *Radiation Research* 174 (5): 611-617.
24. Chen, Yixu y col (2010). Drosophila RecQ5 is required for efficient SSA repair and suppression of LOH in vivo. *Protein Cell*. Volume: 1, Issue: 5, Date: 478-90.
25. Kumara A., Fernandez-Capetillo O., and Carrera A.C. (2010). Nuclear phosphoinositide 3-kinase α controls double-strand break DNA repair. *PNAS* vol. 107, no. 16: 7491-7496.
26. Cao, Yi y col. (2011). Induction of adaptive response: Pre-exposure of mice to 900 MHz radiofrequency fields reduces hematopoietic damage caused by subsequent exposure to ionising radiation. *Int J Radiat Biol* Feb 7.
27. Coleman C.N. (2003). Linking Radiation Oncology and Imaging through Molecular Biology (or Now that Therapy and Diagnosis have separated, It's time to get together again). *Radiology*. 228:29-35.
28. Staudacher, AH y col. (2010). If Bystander Effects for Apoptosis Occur in Spleen after Low-Dose Irradiation In Vivo then the Magnitude of the Effect Falls within the Range of Normal Homeostatic Apoptosis. *Radiation Research*, 174 (6): 727-731 Part 1.
29. Nagasawa, Hatsumi y col. (2011). Differential role of DNA-PKcs phosphorylations and kinase activity in radiosensitivity and chromosomal instability *Radiation Research*, Volume: 175, Issue: 1, Pages: 83-9.
30. Templin, Thomas y col. (2011). Whole mouse blood microRNA as biomarkers for exposure to -rays and (56)Fe ion. *Int J Radiat Biol* . Jan 28.
31. Vinchon-Petit, S y col. (2010). External irradiation models for intracranial 9L glioma studies. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* no 29.
32. Wu N, Jin SZ, et al. (2008). Increase in efficacy of cancer radiotherapy by combination with whole-body low dose irradiation. *Int J Radiat Biol*. 84(3): 201-10.
33. Udayakumar, Thirupandiyur S y col. (2011). Adenovirus E2F1 overexpression sensitizes LNCaP and PC3 prostate tumor cells to radiation in vivo. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Volume: 79, Issue: 2, Pages: 549-58.
34. El-Ghazaly MA y col (2010). Effect of selective COX-2 inhibitor, celecoxib on adjuvant-induced arthritis model in irradiated rats. *International Journal of Radiation Biology* 86 (12): 1079-1087.
35. Du, SS y col. (2010). Radiation-induced liver Fibrosis is mitigated by Gene Therapy inhibiting transforming growth factor-Beta signalling in the rat. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 78 (5): 1513-1523.
36. Hunter, Michael James et al. (2011). Gene therapy for canine leukocyte adhesion deficiency with lentiviral vectors using the MSCV and human PGK promoters. *Hum Gene Ther*. Jan 30.
37. Maneesh J. (2007). Optimization of radioimmunotherapy of solid tumors: biological impediments and their modulation. *Clinical Cancer Research* 13:1374:1382.
38. Montiel-Equihua CA, Martín-Duque P, de la Vieja A, Quintanilla M, Burnet J, Vassaux G, Lemoine NR. (2008). Targeting sodium/iodide symporter gene expression for estrogen-regulated imaging and therapy in breast cancer. *Cancer Gene Ther*. 15(7):465-73.
39. Peerlinck I, et. Al. (2009). Targeted radionuclide therapy using a Wnt-targeted replicating adenovirus encoding the Na/I symporter. *Clin Cancer Res*. Nov 1;15(21):6595-601.
40. Baril P, Martin-Duque P, Vassaux G. (2010). Visualization of gene expression in the live subject using the Na/I symporter as a reporter gene: applications in biotherapy. *Br J Pharmacol*. 159(4):761-71. Review.
41. Merron A, et al. (2010). Assessment of the Na/I symporter as a reporter gene to visualize oncolytic adenovirus propagation in peritoneal tumours. *G. Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 37(7):1377-85.
42. Jeon, YH et. al. (2010). Human Sodium Iodide Symporter Added to Multidrug Resistance 1 Small Hairpin RNA in a Single Gene Construct Enhances the Therapeutic Effects of Radioiodine in a Nude Mouse Model of Multidrug Resistant Colon Cancer. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceutical* 25 (6): 671-679.
43. Schaller BJ, Modo M, Buchfelder M (2007). Molecular imaging of brain tumors: a bridge between clinical and molecular medicine?. *Mol Imaging Biol*. 9(2):60-71.
44. Vallabhajosula S. (2009). *Molecular Imaging. Radiopharmaceuticals for PET and SPECT*. Springer.
45. Massoud TF and Gambhir SS (2003). Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes & Development* 17:545-580.
46. Meikle SR, Kench P et al (2005). Small animal SPECT and its place in the matrix of molecular imaging technologies. *Physics in Medicine and Biology*. 50:R45-R61.
47. Chatziioannou AF (2005). Instrumentation for molecular imaging in preclinical research MicroPET and Micro-SPECT. *Proc Am Thorac Soc*. 286:533-6, 510-11.
48. Pomper MG. (2001). *Molecular Imaging: an overview. New development in Medicine. Academic Radiology* Vol. 8, no 11.
49. Pérez J. (2010). *Imagen Molecular en investigación biomédica. La unidad de Imagen Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Radioprotección*, no 62, Vol. XVII. Pp 26-34.
50. Phelps ME. (2003). *Molecular Imaging and Its Biological Applications*. Springer.
51. Lemoine, L y col. (2010). [F-18]F15599, a novel 5-HT1A receptor agonist, as a radioligand for PET neuroimaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 37 (3): 594-605.
52. Thompson, Paul W. y col. (2009). Interaction of the amyloid imaging tracer FDDNP with hallmark Alzheimer's disease pathologies. *J Neurochem*. Volume: 109, Issue: 2: 623-30.
53. D Dingli, B J Kemp, et al (2005). Combined I-124 Positron Emission Tomography/Computed Tomography Imaging of NIS Gene Expression in animal models of stably transfected and intravenously transfected tumor. *Mol Imaging Biol* 8:16-23.
54. Hsieh YJ, Ke CC, et al. (2007). Radioiodide imaging and treatment of ARO cancer xenograft in a mouse model after expression of human sodium iodide symporter. *Anticancer res*. 27(4B):2515-22.
55. Jeon YH, et. al. (2007). Human sodium iodide symporter gene adjunctive radiotherapy to enhance the preventive effect of hMUC1 DNA vaccine. *Int J Cancer* 121(7):1593-9.
56. Koo V, Hamilton PW and Williamson K (2006). Non-invasive in vivo imaging in small animal research. *Cell Oncol* 28 (4): 127-139. ■