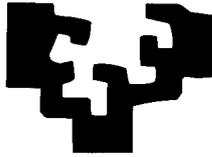


eman ta zabal zazu



Universidad Euskal Herriko
del País Vasco Unibertsitatea

Departamento de Cirugía y Radiología y Medicina Física

Facultad de Medicina y Odontología

***Embolización de metástasis hepáticas de
adenocarcinoma de colon con un magnetofluido:
Caracterización por Imagen del modelo experimental.***

José Javier Echevarria Uraga

Leioa, 2009

Director de Tesis: Prof. Ignacio García-Alonso Montoya

A Miriam, Jon y Teresa.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a las siguientes personas su desinteresado apoyo y ayuda:

- Fernando Plazaola, a quien debo mi interés y entusiasmo por el mundo de la investigación.
- Maite Insausti, por su insustituible colaboración en el campo de las “nano”.
- Begoña Fernández, José Alejandro Larena y Félix Sanz, que desde OSATEK han posibilitado la realización de los estudios de RM.
- José Luis Miguélez, maestro y buen compañero de trabajo.
- Los técnicos de Radiología del Hospital de Galdakao-Usánsolo, por su paciencia y comprensión en tantas sesiones vespertinas.
- Roberto Bilbao y la Fundación Vasca de Innovación e Investigación Sanitarias, por su impulso y ayuda.
- Roberto Maniega, que supo presentarme a las personas adecuadas para encauzar mi inquietud.
- Mi amigo Nacho, por su generosidad.

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado gracias a la financiación recibida en la Convocatoria 2007 de Proyectos de Investigación Sanitaria del Departamento de Sanidad del Gobierno Vasco (Proyecto 2008111012) y del Fondo de Investigaciones Sanitarias (Proyecto PI080941).

**AUTORIZACION DEL DIRECTOR DE TESIS
PARA SU PRESENTACION**

Prof. Dr. Ignacio García-Alonso Montoya, como Director de la Tesis Doctoral **Embolización de metástasis hepáticas de adenocarcinoma de colon con un magnetofluido: Caracterización por Imagen del modelo experimental** realizada en el **Departamento de Cirugía y Radiología y Medicina Física** por el Doctorando Don **José Javier Echevarria Uraga**, autorizo la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En Bilbao, a 21 de abril de 2.009

El Director de la Tesis

Fdo.: Prof. Dr. Ignacio García-Alonso Montoya

CONFORMIDAD DEL DEPARTAMENTO

El Consejo del Departamento de Cirugía y Radiología y Medicina Física, en reunión celebrada el día 22 de abril de 2.009, ha acordado dar la conformidad a la admisión a trámite de presentación de la Tesis Doctoral titulada : “**Embolización de metástasis hepáticas de adenocarcinoma de colon con un magnetofluido: Caracterización por Imagen del modelo experimental**” dirigida por el **Prof. Dr. Ignacio García-Alonso Montoya** y presentada por **Don José Javier Echevarria Uruga** ante este Departamento.

En Leioa, a 22 de abril de 2.009

Vº Bº
Director del Departamento

Fdo.:
Secretario del Departamento

Prof. Jaime J. Méndez Martín

Prof. Ignacio García-Alonso Montoya

ACTA DE GRADO DE DOCTOR
ACTA DE DEFENSA DE TESIS DOCTORAL

Doctorando: **D. José Javier Echevarria Uruga**

Título de la tesis: **Embolización de metástasis hepáticas de adenocarcinoma de colon con un magnetofluido: Caracterización por Imagen del modelo experimental.**

El Tribunal designado por la Subcomisión de Doctorado de la UPV/EHU para calificar la Tesis Doctoral arriba indicada y reunido en el día de la fecha, una vez efectuada la defensa por la doctoranda y contestadas las objeciones y/o sugerencias que se le han formulado, ha otorgado por _____ la calificación de:

unanimidad ó mayoría

En Leioa, a

El Presidente,

El Secretario,

Prof.

Prof.

Vocal 1º

Vocal 2º

Vocal 3º

Prof.

Prof.

Prof.

El doctorando

D. José Javier Echevarria Uruga

INTRODUCCIÓN

Las neoplasias colo-rectales constituyen uno de los procesos tumorales más frecuentes en el mundo occidental. Representan la tercera causa de patología neoplásica tras los procesos tumorales de pulmón y mama, y son responsables de aproximadamente el 10% de todas las muertes por cáncer que ocurren en Norteamérica y Europa¹. Casi la mitad de los pacientes aquejados de neoplasia colo-rectal desarrollarán metástasis hepáticas en el curso de su enfermedad, y en un 15-25% de los afectados están ya presentes en el momento del diagnóstico^{2,3}. Estas cifras avalan por sí solas el interés de cualquier trabajo de investigación centrado en el tratamiento de las metástasis hepáticas.

A lo largo de este apartado de Introducción abordaremos el estado actual del tratamiento local de las metástasis hepáticas, los modelos experimentales utilizados en el desarrollo de nuevas terapias, el papel que las técnicas de diagnóstico por imagen pueden jugar en dichos tratamientos, así como la aplicación del fenómeno físico conocido como histéresis a este campo de la terapia antineoplásica.

El tratamiento local de las metástasis hepáticas en el cáncer colo-rectal

El tratamiento de elección en la patología metastásica hepática es el quirúrgico, que muestra la mejor supervivencia a largo plazo, con tasas a los cinco años en torno al 24-38%⁴ y que en series con pacientes muy seleccionados llega a alcanzar el 58%⁵. Sin embargo, debido a la propia localización de los implantes tumorales o a las condiciones clínicas de los pacientes, sólo un 8-27% de los afectados por metástasis hepáticas serán candidatos a cirugía⁶.

Para aquellos pacientes no subsidiarios de la terapia quirúrgica, existen en la actualidad varias alternativas locales de escasa toxicidad sistémica, con las que se pretenden conseguir supervivencias similares a las obtenidas con cirugía. La terapia local no quirúrgica se basa en dos tipos de procedimientos que pueden además ser combinados, las técnicas de punción trans-parietal percutánea y los procedimientos terapéuticos trans-arteriales.

- **Técnicas trans-parietales percutáneas**

Las técnicas de punción trans-parietal percutánea son un grupo de procedimientos en los que se trata de provocar una necrosis tisular directa mediada por la inserción de agujas que, atravesando la pared abdominal, se ubiquen en el seno de las metástasis. Se llevan a cabo de forma similar, y son guiados habitualmente por técnicas de imagen, tales como la ecografía o la tomografía computada. En estas técnicas, la necrosis tumoral puede conseguirse por métodos químicos o térmicos. Los primeros se basan en la instilación de sustancias con efecto citotóxico directo en los nichos tumorales. Entre los agentes más usados en este tipo de procedimientos destaca el etanol. En los segundos, la necrosis tisular se consigue mediante una variación

térmica controlada y, de estos procedimientos, la termoablación mediada por una aguja-antena inductora de radiofrecuencia cuenta con la aplicación clínica más amplia y contrastada.

El tratamiento local de la patología metastática con etanol ha sido extensamente utilizado⁷, y mantiene una cierta vigencia. En esta técnica se usa alcohol etílico al 95% que se inyecta mediante una o varias agujas de 20-22 gauge (G), previamente ubicadas en la lesión tumoral. Tras su inyección intra-tumoral, el etanol difunde por el intersticio y produce una necrosis coagulativa por la combinación de deshidratación del citoplasma celular, desnaturalización de las proteínas y trombosis de pequeños vasos⁸. Los nódulos tumorales menores de 3cm son los más adecuados para este tratamiento⁷ y las únicas contraindicaciones absolutas al uso percutáneo del etanol son la coagulopatía y la ascitis no controlables, y las metástasis extra-hepáticas^{9,10}.

Por otro lado, en los procedimientos percutáneos de termoablación por radiofrecuencia, se provoca una necrosis coagulativa mediada por calor. Ya en los años setenta se realizaron experimentos clínicos que tenían en cuenta la mayor sensibilidad a la temperatura de las células tumorales que las células de los tejidos normales, en el rango de 41-44°C, rango de hipertermia ligera¹¹. Sin embargo, la necrosis tisular o termoablación se consigue con calentamientos superiores a los 46°C¹². En la termoablación por radiofrecuencia se insertan agujas o sondas de 18-21G que en su extremo distal cuentan con electrodos capaces de provocar necrosis tisulares en volúmenes tumorales de hasta 4cm de diámetro. En general, la radiofrecuencia es un procedimiento indicado en pacientes no quirúrgicos, con hasta tres lesiones metastáticas de menos de 4cm de tamaño¹³. Como contraindicaciones absolutas a este procedimiento se consideran la coagulopatía y la ascitis no reversibles, la cirugía previa con anastomosis bilio-digestiva, la invasión tumoral portal

y la enfermedad crónica hepática en estadio C de Child. Tampoco puede practicarse este tratamiento en pacientes portadores de marcapasos¹³.

- **Procedimientos terapéuticos trans-arteriales**

La segunda alternativa de tratamiento local la constituyen los procedimientos trans-arteriales. Se basan en la administración de diferentes combinados terapéuticos a través de un catéter de ubicación endo-vascular selectiva, con objeto de alcanzar las neoplasias a través de su lecho arterial. Estas técnicas se sustentan en el hecho de que el hígado sano es vascularizado fundamentalmente por vía venosa, mientras que metástasis y micrometástasis reciben irrigación de arteria hepática^{14,15}. En éste ámbito, se encuadran los procedimientos de administración trans-arterial de micropartículas embolizantes, bien solas, o bien más frecuentemente asociadas a agentes quimioterápicos, procedimiento denominado quimioembolización trans-arterial¹⁶. En estos procedimientos, la isquemia tisular inducida por las micropartículas embolizantes y el incremento de la permeabilidad vascular secundario a la hipoxia que favorece el paso de los fármacos al intersticio, presentan un efecto sinérgico¹⁶⁻¹⁸. De hecho, se ha demostrado que las concentraciones intra-tumorales de quimioterápico obtenidas son entre 10 y 25 veces superiores a las conseguidas mediante una simple infusión intra-arterial del fármaco^{19,20}.

A esta combinación de micropartículas embolizantes y agentes quimioterápicos, suele además añadirse lipiodol® (laboratorio Guerbet, Francia), contraste yodado de base grasa por el que el tejido tumoral muestra gran avidéz²¹. La adición del lipiodol® aporta una serie de ventajas: permite visualizar el lecho tumoral mientras el procedimiento se realiza bajo radioscopia, actúa como vehiculizante de los agentes quimioterápicos²², y muestra capacidad embolizante tanto a nivel arterial como venoso²³.

- **Limitaciones de la terapia local**

A pesar de todo lo detallado, la terapia anti-tumoral local muestra una eficacia relativa. Así, la terapia con etanol en el paciente aquejado de metástasis hepáticas, parece sólo exitosa en lesiones pequeñas, puesto que la difusión del alcohol en lesiones de tamaño superior a los 3cm se torna dificultosa^{10,24}.

Por otro lado, mediante termoablación con radiofrecuencia se consiguen tasas de supervivencia a los cinco años del 30%²⁵ que sólo alcanzan el 40% cuando se aplican criterios de indicación muy estrictos²⁶. Además, los individuos sometidos a radiofrecuencia presentan un mayor riesgo de recidiva local que los operados, evento que quizás venga motivado por un incremento en la producción de citoquinas de regeneración hepática que favorezcan reactivaciones tumorales microscópicas²⁷.

Finalmente, en lo referente a la terapia trans-arterial, la quimioembolización es un procedimiento que presenta complicaciones en hasta un 4,4% de pacientes²⁸, y que demuestra una respuesta terapéutica y unas tasas de supervivencia muy variadas, según los criterios de selección de individuos y de las diferentes combinaciones de quimioterápicos empleadas²⁹.

Resulta por tanto evidente la necesidad de continuar desarrollando nuevos procedimientos terapéuticos, tanto a nivel clínico como experimental. En este sentido, se está investigando sobre la utilidad de agentes antiangiogénicos, solos o combinados con quimioterapia clásica³⁰, y también en procedimientos de termoterapia inducida por láser³¹ o por nanopartículas magnéticas³²⁻³⁴.

Modelos experimentales de metástasis

La aparición, desarrollo y progresión de todos los procesos metastáticos implican una sucesión de eventos comunes: expansión local de la neoplasia primaria, intravasación de células al torrente circulatorio, circulación por el árbol vascular, y finalmente, extravasación a distancia³⁵.

En los primeros momentos del desarrollo de un proceso neoplásico, la nutrición de las células tumorales se basa en fenómenos de difusión. Sin embargo, la expansión local hacia los tejidos vecinos resulta posible cuando se desencadenan los fenómenos de angiogénesis tumoral, que posibilitan la llegada de oxígeno y nutrientes a mayores volúmenes de células tumorales.

Desde los primeros momentos, las neoplasias pueden liberar células al torrente circulatorio. Estas células tumorales circulantes, en caso de sobrevivir a los efectos mecánicos del flujo vascular y a los ataques del sistema inmune, llegan a territorios en donde asentar y crecer, dando lugar a las metástasis.

La extravasación de las células tumorales puede producirse por varios mecanismos. Se han descrito situaciones en las que las células neoplásicas atraviesan el endotelio mediante invaginaciones, que pueden acabar produciendo auténticos canales³⁶. En otras ocasiones, trombos tumorales constituidos por células neoplásicas, plaquetas y fibrina, son capaces de desencadenar fenómenos inflamatorios y reactivos que incrementan la permeabilidad capilar, provocando la retracción y el despegamiento del endotelio^{35,37-39}. Finalmente, como causa de extravasación se han considerado también situaciones en las que se produce una multiplicación tumoral intra-vascular que acaba provocando el estallido del árbol circulatorio y el paso de células neoplásicas al espacio extravascular⁴⁰.

Por cualquiera de los mecanismos descritos, las células extravasadas se acantonan en los tejidos, se adaptan al nuevo ambiente, se multiplican, generan un estroma y, en definitiva, se establecen como metástasis.

Gran parte de los conocimientos sobre el proceso metastático procede del estudio de modelos experimentales. Sin embargo, sus resultados han de ser analizados con cuidado, ya que realmente estos modelos se desarrollan en situaciones artificiales. En general, se pueden considerar dos tipos de modelos, los realizados *in vitro* y los sistemas metastáticos experimentales.

1. Modelos experimentales metastáticos “in vitro”

Los modelos *in vitro* presentan acusadas limitaciones a la hora de interpretar los resultados, sin embargo son de gran utilidad en los siguientes aspectos:

- Fenotipado tumoral⁴¹.
- Modulación de la angiogénesis, crecimiento vascular e interrelación celular tumoral y neocapilar⁴².
- Desprendimiento de células tumorales y estudios de interacción celular intratumoral⁴³⁻⁴⁷.
- Invasión de cultivos histológicos por células tumorales^{48,49}.
- Crecimiento y cinética celular con marcaje radiactivo.
- Tests de adhesión a sustratos celulares y/o matriciales^{37,38}.
- Tests de resistencia a acciones citolíticas de células inmunitarias⁵⁰.
- Tests de sensibilidad a los tratamientos anti-tumorales quimioterápicos, hormonoterápicos, radioterápicos, o de otros tipos⁵¹⁻⁵⁵.

2. Sistemas metastáticos experimentales

Por otro lado, los estudios con animales reproducen situaciones más semejantes al proceso neoplásico humano. Los modelos animales más usados pueden enmarcarse en los siguientes apartados:

- **Modelo natural.** Es el más similar al humano. Consiste en provocar el desarrollo de un tumor primario, mediante administración de carcinógenos o por inoculación directa, que posteriormente se diseminará e inducirá metástasis a distancia. Sin embargo, sólo sirve en determinados tipos de neoplasias y además su rendimiento es muy bajo, requiere gran cantidad de animales y los tiempos y plazos de experimentación son muy largos.
- **Modelo artificial.** Inducción de metástasis sin neoplasia primaria. Se fundamenta en la inyección en el torrente circulatorio de gran cantidad de células tumorales anaplásicas, de crecimiento rápido, para analizar las últimas fases del proceso de metástasis. Estos sistemas permiten evaluar diferencias de comportamiento biológico entre distintas líneas tumorales, respuestas a diversos tratamientos y la influencia de las modificaciones del huésped en el rendimiento metastático⁵⁶.

En nuestra experiencia el crecimiento de metástasis artificiales es un proceso reproducible, con un comportamiento bastante homogéneo para cada tipo de neoplasia y modelo de inoculación. Las vías más utilizadas son la intravenosa y para el estudio de las metástasis hepáticas, la intra-esplénica⁵⁷. Otro modelo experimental empleado en la investigación de las metástasis se basa en el estudio de animales atímicos en los que se inoculan neoplasias heterogénicas humanas⁵⁸.

En los sistemas metastáticos experimentales, debe controlarse además el rendimiento metastático, es decir, la capacidad de que se desarrollen metástasis en los modelos aplicados. Estas determinaciones pueden realizarse mediante diferentes procedimientos:

- **Peso de la víscera colonizada.** Es un indicador inexacto, puesto que no toma en consideración otros factores que con frecuencia alteran el peso además de la masa tumoral, tales como el edema o la infiltración por células inmunitarias⁵⁹.
- **Incidencia de metástasis.** Valora la aparición o no de metástasis en cada animal. No permite evaluar distintas fases del proceso de metástasis y no sirve cuando el rendimiento es próximo al 100%⁶⁰.
- **Número de metástasis superficiales.** En ciertos órganos, como el pulmón, la presencia de tumor en la superficie es un fiel indicador del estado del órgano⁶¹. Sin embargo, el uso de este sistema resulta más controvertido en el hígado, pues en este órgano la invasión tumoral se distribuye irregularmente por los lóbulos y es a menudo de ubicación profunda intra-parenquimatosa^{57,62}.
- **Supervivencia.** Valora el efecto final del proceso de metástasis. Es un parámetro aceptado para estudios de tratamientos. Sin embargo, no permite analizar los distintos pasos del desarrollo neoplásico, ni la causa del fallecimiento⁶³.
- **Estimación histológica del tamaño y número de metástasis.** Es el procedimiento más trabajoso, pero el más completo. Permite evaluar la cantidad global de tejido metastático, el tamaño y número de los implantes y la distribución por el parénquima del órgano colonizado⁶⁴.

Caracterización por imagen del modelo experimental

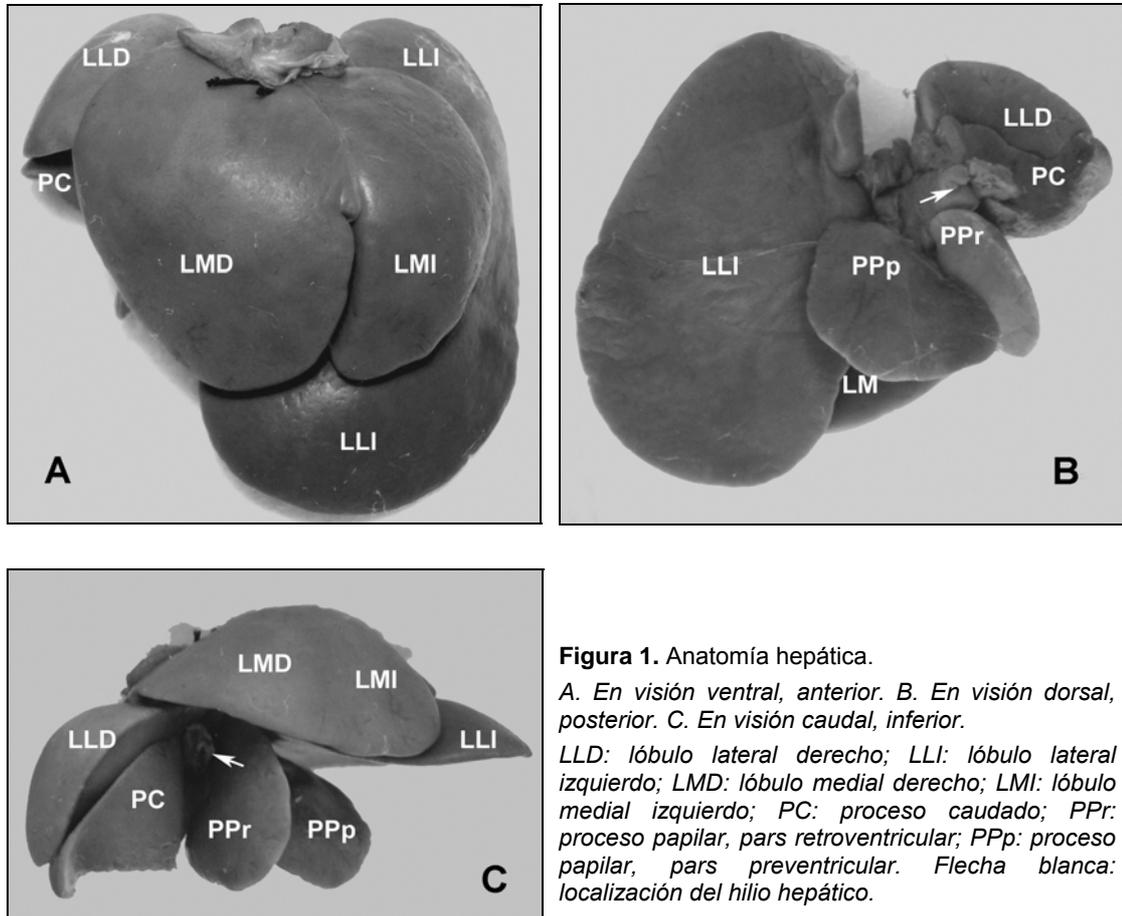
En oncología experimental, el desarrollo del propio modelo de la patología neoplásica a estudio, requiere de un seguimiento y control estrecho de la progresión tumoral, lo que habitualmente supone la realización de sacrificios selectivos de animales de diferentes series y en diferentes intervalos de tiempo. La posibilidad de aplicar métodos de diagnóstico por imagen capaces de detectar y monitorizar la progresión de un proceso neoplásico de forma "no invasiva", supondría una alternativa a esta práctica. Ello permitiría además la realización de estudios experimentales de tipo longitudinal, con controles sucesivos en el "mismo animal", lo que incrementaría notablemente el valor de estos estudios a la hora de realizar una valoración estadística y comparativa de sus resultados. En el presente trabajo se estudiará la utilidad y aplicabilidad de equipos de Ecografía, Tomografía Computarizada Multi Corte y Resonancia Magnética de uso clínico, en las diferentes fases del desarrollo del modelo experimental.

Previamente a la descripción de las técnicas de imagen que se aplicarán en el desarrollo y caracterización del modelo, resultará de interés el conocimiento de la anatomía macroscópica del hígado de la rata.

1. Anatomía hepática en la rata

El hígado de la rata adulta es una víscera sólida y segmentada, situada en hemiabdomen superior, protegida por la parrilla costal y de un peso medio aproximado de 7g. Anatómicamente se han definido varios lóbulos hepáticos: medial derecho e izquierdo, lateral derecho, lateral izquierdo, y caudado. Su identificación e

individualización es posible dado que se trata de estructuras con una amplia independencia anatómica (figura 1).



El lóbulo medial presenta una escotadura central que lo divide en dos porciones, derecha e izquierda. Este lóbulo se localiza más ventral, y tapa a los dos lóbulos laterales. Los lóbulos laterales muestran un tamaño variable, aunque en general el lóbulo lateral izquierdo es de tamaño sensiblemente superior. En localización más dorsal se encuentra el lóbulo caudado. Esta estructura se divide en dos segmentos, el proceso caudado y el proceso papilar. El proceso caudado muestra una característica morfología en lengüeta y se ubica bajo el lóbulo lateral derecho. En su superficie más caudal presenta una depresión en la que se adaptan la glándula adrenal y el riñón derechos. El proceso papilar se localiza en línea media y vertiente izquierda. Lo

conforman dos pequeñas aletas de parénquima hepático, la pars preventricular más lateral, y la pars retroventricular en posición más medial⁶⁵. La parcial localización retro-gástrica de esta porción del hígado, dificulta su valoración con técnica de imagen ecográfica.

El hilio hepático se encuentra tapado por los lóbulos laterales y se ubica entre el proceso caudado y la pars retroventricular del proceso papilar. Lo constituyen la arteria hepática, la vena Porta y la vía biliar extra-hepática. En localización más profunda al hilio se identifica la vena Cava inferior. Es de resaltar que la rata carece de vesícula biliar (figura 2).

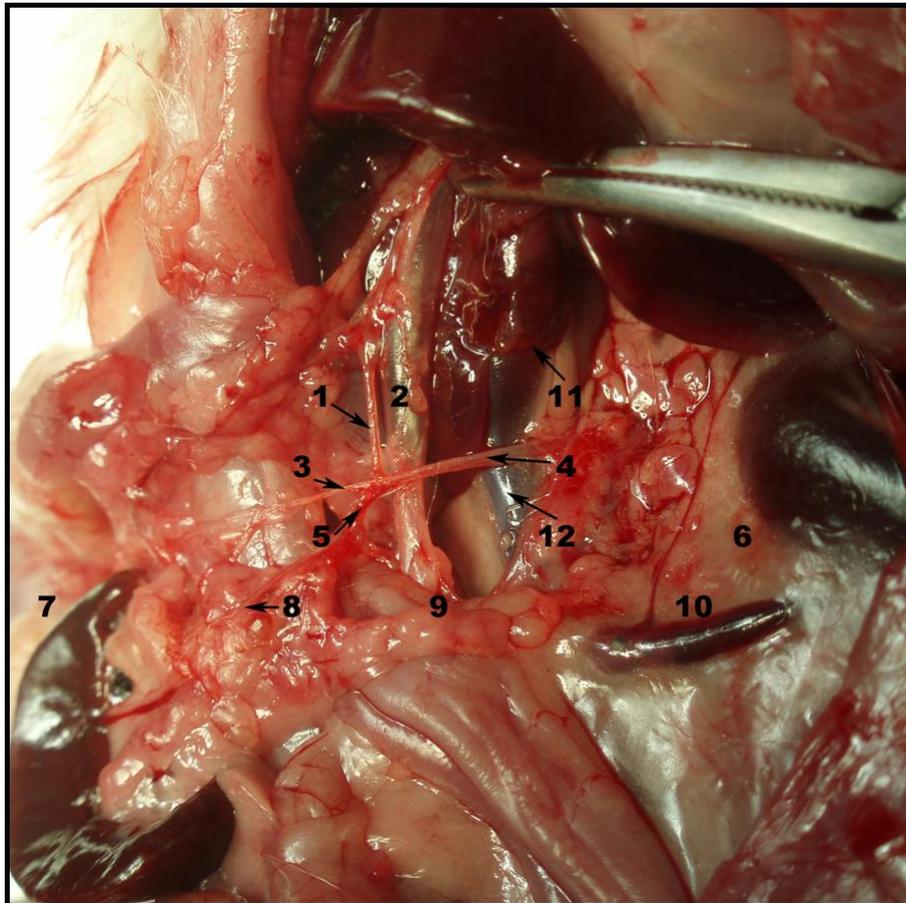


Figura 2. Anatomía hepática loco-regional.

Visión in vivo tras laparotomía media. Estómago y bazo desplazados hacia la derecha.

1: Arteria hepática. 2: Vena Porta. 3: Arteria gástrica izquierda. 4: Tronco Celiaco. 5: Arteria gastroduodenal. 6: Riñón izquierdo. 7: Bazo. 8: Arteria esplénica. 9: Tejido pancreático. 10: Vena renal izquierda. 11: Pars retroventricular. 12: Vena Cava inferior.

2. Técnicas de diagnóstico por imagen

2.1. Ecografía

La ecografía (US) es una técnica de diagnóstico que se basa en el uso de ondas mecánicas en el espectro de los ultrasonidos para la obtención de imágenes. En la actualidad, las ondas cuyas frecuencias se encuentran en el rango 2-20 Mhz son las de utilidad clínica diagnóstica. Estas ondas sónicas son emitidas por sondas o transductores ecográficos, los cuales a su vez recogen el eco o sonido reflejado procedente de los tejidos sobre los que se han aplicado. Este eco se transforma en señales eléctricas y éstas posteriormente en imágenes. Las ondas sónicas de frecuencias más altas presentan una menor capacidad de penetración en los tejidos, pero proporcionan imágenes de alta resolución espacial. Son de utilidad para el estudio detallado de tejidos o estructuras anatómicas que se encuentren ubicados a unos pocos centímetros del transductor. Por otro lado, las sondas que emiten ondas con frecuencias más bajas son adecuadas para el estudio de órganos localizados más profundamente.

La obtención de imágenes en US se basa en el fenómeno de impedancia acústica o capacidad de los tejidos de reflejar el sonido, y depende de la velocidad de la onda sónica y de la densidad del medio que alcanza. Dado que los diferentes tejidos presentan una impedancia acústica característica, producirán ecos distintos, y serán estas diferencias las que permitirán conseguir las imágenes ecográficas⁶⁶. Sin embargo, este fenómeno presenta un problema cuando se produce una interfase entre medios con gran diferencia de impedancia, puesto que en esta circunstancia todo el haz sónico es reflejado. Esta situación aparece invariablemente al aplicar la sonda ecográfica sobre la superficie del área a explorar, dado que la mínima lámina de aire [impedancia del aire: $0,0001 \text{ (gr/cm}^2 \text{ seg)} 10^{-5}$] que queda entre la sonda y los

tejidos corporales de base acuosa [impedancia del agua: $1,5 \text{ (gr/cm}^2 \text{ seg)} 10^{-5}$], impide absolutamente la transmisión del sonido⁶⁶. Para solventar el problema debe eliminarse esta interfase, lo que se consigue mediante la aplicación de un gel acuoso sobre la región a examen.

2.1.1. Técnicas ecográficas básicas

Las técnicas ecográficas básicas, con posible aplicación práctica en el diagnóstico de patología neoplásica hepática de ámbito experimental y cuya utilidad será evaluada, son el Modo B en tiempo real y la ecografía Dópler (US-Dópler).

La US Modo B en tiempo real es una modalidad que permite obtener imágenes anatómicas bidimensionales y en movimiento, en función de cómo el operador manipule y dirija el transductor. El diagnóstico ecográfico convencional se basa en esta técnica, puesto que la aplicación de diferentes criterios semiológicos hace posible distinguir en mayor o menor medida, la imagen anatómica normal de la patológica.

Por otro lado, la US-Dópler hace referencia a un conjunto de técnicas con un uso básicamente restringido al estudio vascular, que permiten valorar diferentes parámetros hemodinámicos en base al denominado efecto Dópler, o cambio de la frecuencia de recepción del sonido debido al movimiento de la fuente emisora. En este escenario, el cambio de la frecuencia viene determinado por el movimiento de la sangre dentro del vaso que se estudia, de tal forma que el transductor que emite un sonido, posteriormente lo recoge modificado por el flujo sanguíneo⁶⁶. En US-Dópler se han desarrollado varias modalidades de imagen, tales como el Análisis Espectral, el Dópler Color y el Dópler Tríplex.

En el análisis espectral, las variaciones en los flujos vasculares son convertidas en una gráfica continua de ondas. Los glóbulos rojos que circulan en los vasos con diferentes velocidades y direcciones producen múltiples señales de cambio de

frecuencia. Estas señales audibles, son transformadas mediante el algoritmo de transformación de Fourier en una gráfica o espectro de onda, en el que se observan los tres componentes de la señal: tiempo, frecuencia y amplitud⁶⁶. Cuando se valoran las arterias, las ondas obtenidas presentan bruscos cambios en su morfología motivados por los impulsos cardiacos sistólico y diastólico. Las venas, sin embargo, muestran un espectro de aspecto ondulante. De las gráficas así obtenidas, es posible determinar en centímetros por segundo (cm/s), las velocidades máxima (Vmax) y mínima (Vmin) de la sangre en el árbol vascular, de tal forma que se pueden establecer valores y rangos de normalidad o patología⁶⁶.

En la US-Dópler Color, a la señal Dópler procedente de un vaso se le asigna un color, azul o rojo, en función del sentido del flujo sanguíneo, de tal forma que cuando la sangre se aleja del transductor aparece con tonalidad azul y cuando se aproxima de color rojo. Estas imágenes de color se combinan con una imagen ecográfica bidimensional en tiempo real, lo que permite valorar conjuntamente la integridad anatómica de los vasos y las características de los flujos vasculares.

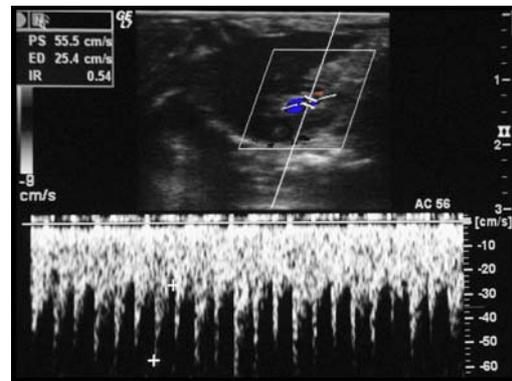


Figura 3. Ecografía Tríplex Dópler.

Onda espectral de arteria hepática.

Finalmente, la US-Dópler Tríplex posibilita la exposición simultánea y en tiempo real del análisis espectral y de la imagen Dópler Color procedentes del vaso, mientras éste es explorado (figura 3).

2.1.2. Utilidad de la Ecografía Bidimensional en la patología tumoral hepática

El parénquima hepático normal es ligeramente ecogénico y presenta una ecoestructura fina y homogénea. Se han descrito una serie de signos ecográficos

cuya identificación se relaciona con la presencia de patología tumoral hepática, y que se han agrupado en signos hepáticos directos e indirectos y signos extra-hepáticos⁶⁷.

Los signos hepáticos directos hacen referencia a las características de las lesiones tumorales ubicadas en el seno del tejido hepático. En general, los nódulos tumorales son bien visualizados con US bidimensional, ya que presentan diferencias de impedancia acústica con respecto al tejido hepático circundante⁶⁸. Las lesiones tumorales muestran un aspecto de imagen desde muy ecogénico a hipoecoico, que resalta sobre el patrón ecográfico de fondo. Además pueden aparecer como nódulos únicos o múltiples, con bordes más o menos bien definidos, y con aspecto uniforme, heterogéneo o en diana. En general, el aspecto ecográfico es inespecífico de la estirpe celular tumoral, aunque las lesiones muy vascularizadas^{69,70} y las metástasis del tubo digestivo⁷¹⁻⁷³ suelen ser hiperecoicas. Por otro lado, la aparición de focos hipo o anecoicos en el seno de las masas tumorales, suele implicar la presencia de áreas de necrosis intra-tumoral^{67,74}.

Los signos hepáticos indirectos hacen referencia a alteraciones en la morfología del hígado e incluyen la hepatomegalia tumoral y las alteraciones en el contorno. En las hepatomegalias tumorales, los bordes hepáticos que en condiciones normales son angulados, adoptan un aspecto convexo o incluso policíclico. Por otro lado, los tumores que asientan en la superficie de la superficie hepática, provocan elevaciones convexas en la misma que contrastan con la lisa y homogénea superficie hepática normal.

Finalmente, los signos extra-hepáticos hacen relación a la detección de masas adyacentes al hígado que traducen implantes tumorales peritoneales o adenopatías metastásicas.

Cuando se detecta una masa hepática, el diagnóstico diferencial que se plantea de inicio debe establecerse con las lesiones de tipo inflamatorio o infeccioso. Los abscesos presentan en US un aspecto variado⁷³. Las paredes pueden aparecer bien definidas o irregulares y engrosadas, y el contenido puede mostrarse desde anecoico a hiperecoico. Las lesiones muy necróticas aparecerán hipoecoicas, pero si el contenido es espeso se mostrarán hiperecoicas. Incluso pueden exhibir un aspecto mixto, con niveles e interfases líquido-líquido. Finalmente, cuando dentro de una lesión inflamatoria aparecen focos muy ecogénicos con sombra acústica posterior, puede sospecharse de la presencia de burbujas gaseosas en su seno.

En el presente trabajo tratarán de definirse las características morfológicas ecográficas de metástasis hepáticas de adenocarcinoma de colon en hígado murino, y se estudiará la utilidad de esta técnica diagnóstica en la detección de las mismas.

2.1.3. Utilidad de la Ecografía Dópler en la patología hepática

La cuantificación de los valores de las diferentes velocidades del flujo sanguíneo ha permitido definir índices que relacionan estos datos, y a partir de los cuales es posible calcular la impedancia distal de los lechos vasculares. En general, los índices más comúnmente usados en la valoración de flujos arteriales, y que relacionan las velocidades máxima y mínima, son: el Índice de Resistencia (IR), el Índice de Pulsatilidad (IP) y la Relación S/D⁶⁶.

IR= $V_{max} - V_{min} / V_{max}$
IP= $V_{max} - V_{min} / V_{media}$
Relación S/D= V_{max} / V_{min}

Estos parámetros son de uso común, aplicables a cualquier territorio anatómico, y habitualmente determinados automáticamente por el propio sistema lógico del

ecógrafo cuando se practica un estudio espectral. Sin embargo, también se han descrito índices para valoración selectiva de los flujos hepáticos, y que hacen referencia tanto a los componentes arteriales como a los venosos portales. Dentro de este apartado caben destacar: el Índice de Congestión Portal (ICP), el Índice Dópler de Perfusión (IDP) y la Razón Arterio-Portal (razón A/P).

ICP= área portal / velocidad portal

IDP= flujo arteria hepática / flujo hepático total

Razón A/P= Vmax arteria hepática/ Vmax Porta

El interés de estos índices radica en que sus valores tienden a elevarse en situaciones en las que existe una disminución del flujo portal, motivado por un incremento en las resistencias a nivel intra-hepático. Este evento aparece en la patología hepática crónica difusa⁷⁵⁻⁷⁷, y se ha llegado incluso a observar una relación directa entre la elevación de la razón A/P y el grado de fibrosis hepática⁷⁸.

En base a estas consideraciones resulta razonable sospechar que en situaciones de enfermedad hepática difusa neoplásica, pueda producirse también una alteración detectable en los flujos vasculares. En el presente trabajo se intentarán descubrir y cuantificar los hipotéticos cambios experimentados por los flujos vasculares, atribuibles al desarrollo de patología tumoral difusa. Por otro lado, debido a que uno de los objetivos será además la localización selectiva de flúidos magnéticos en los lechos tumorales por vía vascular, en función de estos estudios hemodinámicos resultará de interés determinar los intervalos de tiempo más favorable para la práctica de las infusiones. Dado que las metástasis hepáticas reciben flujo exclusivamente arterial^{14,15}, los índices que a priori pueden tener más valor son aquellos en los que se evalúen las velocidades arteriales y en los que se relacionen éstas con las

velocidades portales. En función de todo ello, y de las limitaciones del propio modelo derivado del tamaño de las estructuras vasculares a evaluar, los parámetros hemodinámicos seleccionados han sido: pV_{max} , aV_{max} , IR y razón A/P.

2.2. Resonancia Magnética

La Resonancia Magnética (RM) es una técnica en la que se generan imágenes a partir de la señal procedente de los núcleos de hidrógeno, presentes en los diferentes tejidos de un organismo, el cual se encuentra sometido a un campo magnético potente y sobre el que se aplican diferentes pulsos de radiofrecuencia. El núcleo de hidrógeno está formado por un único protón, y es además el elemento más abundante en los organismos vivos, ya que forma parte de las moléculas de agua. Todo ello implica que en los estudios de RM se obtienen imágenes o mapas de la densidad de protones y por tanto, de la distribución del agua en el organismo.

2.2.1. Fundamentos de la obtención de la imagen en RM

En condiciones normales, los protones de un organismo se encuentran orientados en cualquier posición del espacio, girando constantemente sobre sí mismos. Este movimiento de giro se llama espín y puesto que el protón tiene carga eléctrica positiva, crea un pequeño campo magnético a su alrededor con un vector o momento magnético asociado.

Cuando un organismo es sometido a un campo magnético externo potente, los protones homogeneizan su orientación, de tal forma que todos los momentos magnéticos se alinean con las líneas de fuerza del campo magnético externo. El primer paso en el proceso de obtención de imágenes por RM, se basa en la ordenación de los diferentes vectores magnéticos de los núcleos de hidrógeno del

organismo a estudio, sometiendo al mismo a un potente campo magnético. En este ámbito, el campo magnético es producido por el imán del escáner de RM.

Posteriormente, mediante diferentes tipos de antenas emisoras de radiofrecuencia, se aplican sobre el organismo series o secuencias de pulsos intermitentes de ondas. Estas ondas de radiofrecuencia transmiten energía a los protones, provocando una alteración en sus momentos magnéticos. Los protones así excitados, pierden la orientación paralela al campo externo y adquieren un cierto ángulo de inclinación respecto al mismo.

Cuando cesa el pulso de radiofrecuencia, los protones tienden a volver al equilibrio electromagnético y a reorientarse con el campo externo. En este proceso de reorientación ceden la energía que les había sido suministrada, mediante dos mecanismos de relajación nuclear⁷⁹:

- Relajación longitudinal T1: relacionada con la mayor o menor dificultad de cesión energética al medio.
- Relajación transversal T2: relacionada con las interacciones que se producen entre los espines que retornan al equilibrio.

Cada vez que se emite un pulso de radiofrecuencia se desarrollan los efectos descritos, y para obtener las imágenes de RM se requiere encadenar series de diferentes tipos de pulsos que constituyen las distintas secuencias de RM.

La alternancia en la emisión de los pulsos de radiofrecuencia y los efectos inducidos a nivel nuclear, desencadenan variaciones en el propio campo magnético del organismo estudiado. Estas alteraciones presentarán además diferentes características en función de la composición del tejido de procedencia. Dado que un campo magnético variable es capaz de producir una corriente eléctrica, ésta puede inducirse en una antena receptora localizada junto al organismo explorado. Estas señales eléctricas

generadas en las antenas receptoras, posteriormente digitalizadas y tratadas mediante transformaciones de Fourier, se convertirán en las imágenes de RM.

2.2.2. Imanes y campo magnético

El imán es uno de los elementos fundamentales de un equipo de RM, y debe ser capaz de generar un campo magnético muy potente, estable y homogéneo.

Las unidades en las que se mide el campo magnético son el Tesla (T) y el Gauss (G). El Tesla es la unidad de medida del sistema internacional y equivale a 10.000 Gauss. Los equipos de RM de uso clínico habitual cuentan con imanes que generan campos magnéticos de 0,5 a 3T, y las máquinas diseñadas específicamente para pequeños animales de experimentación alcanzan valores de 7T y hasta de 12T. Para hacerse una idea de la magnitud de estos campos magnéticos, debe considerarse que la del campo magnético terrestre es de 0,5G.

En la actualidad, estos potentes campos magnéticos son producidos por electroimanes superconductores. En estos imanes, el campo magnético es inducido por una corriente eléctrica que atraviesa bobinas compactas fabricadas con hilos conductores de aleaciones especiales, tales como las obtenidas a base de niobio y titanio. Estos materiales, enfriados a temperaturas próximas al cero absoluto, no ofrecen resistencia al paso de la corriente eléctrica y posibilitan la producción de campos magnéticos intensos⁸⁰.

2.2.3. Bobinas de radiofrecuencia

Otro de los elementos necesarios para generar las imágenes de RM es el relacionado con la producción de ondas de radiofrecuencia, y con la recepción de la señal procedente de los tejidos sobre los que aquellas han sido aplicadas. El sistema de bobinas de radiofrecuencia realiza esta tarea, y para el procedimiento de emisión y

recepción de las ondas, cuenta con antenas integradas en el propio equipo de RM y con antenas externas al imán⁸⁰.

Las ondas de radiofrecuencia se encuentran dentro del espectro de las ondas electromagnéticas. A diferencia de las ondas mecánicas que necesitan de un medio material para propagarse, las electromagnéticas son capaces de propagarse en el vacío. Las ondas de radiofrecuencia de utilidad en RM poseen frecuencias del orden de unas decenas de MHz⁸¹. Para el procesado de estas ondas, la mayoría de los aparatos cuentan con una antena integrada en el imán, y que puede actuar como antena transmisora y receptora. Además de ella, el sistema de radiofrecuencia cuenta con una serie de antenas externas movibles, que pueden conectarse y desconectarse. Estas antenas son útiles para el estudio de áreas concretas del organismo, y se sitúan en contacto o alrededor de las mismas, lo que permite obtener imágenes de gran calidad de la zona explorada⁸⁰.

2.2.4. Bobinas de gradientes

El tercer elemento fundamental para la obtención de las imágenes de RM lo constituyen las bobinas de gradientes. Se trata de tres pares de bobinas electromagnéticas, situadas en el interior del escáner de RM, y que producen campos magnéticos multidireccionales, de corta duración y escasa potencia. Los gradientes tienen como cometido codificar espacialmente la señal de RM, lo que supone asignar una localización espacial correcta a los núcleos de hidrógeno que emiten la señal⁷⁹.

2.2.5. Secuencias de RM

El término “secuencia de adquisición” hace referencia a la combinación de pulsos de radiofrecuencia y gradientes de campo magnético que se aplican de forma ordenada y secuencial sobre un organismo, y que son capaces de proporcionar información relevante del mismo. De forma prácticamente constante se están desarrollando

nuevas secuencias de RM, sin embargo las más básicas y convencionales, descritas a continuación, mantienen su vigencia.

Secuencia Eco de Espín o Spin-Echo (SE)

Las secuencias SE son las más elementales. El ciclo de pulsos de radiofrecuencia comienza con un pulso que produce una inclinación en los vectores de magnetización de los átomos de hidrógeno de 90°. Posteriormente se aplican uno o dos pulsos de 180° para obtener uno o dos ecos o señales⁷⁹. Esta combinación de pulsos se repite durante un periodo de tiempo lo suficientemente prolongado, que permita obtener la cantidad de señal adecuada para generar unas imágenes óptimas.

El tiempo que transcurre entre el pulso de 90° y la obtención de la señal se denomina tiempo de eco (TE), y entre dos pulsos sucesivos de 90°, tiempo de repetición (TR). Ambos parámetros se miden en milisegundos (ms), y sirven además para describir las diferentes secuencias. El TE controla la ponderación de la imagen debida a la relajación T2, mientras que el TR hace referencia a la relajación T1. Mediante variaciones de los parámetros TR y TE, se pueden obtener secuencias SE potenciadas en T1, en T2 o en una combinación de ambos o densidad de protones (DP)⁷⁹ (tabla1).

Tabla 1. Valores de TR y TE en las diferentes secuencias SE potenciadas en T1, T2 y DP.

Secuencias SE	TR (ms)	TE (ms)
T1	400-800	10-40
T2	1.500-3.000	80-120
DP	1.500-3.000	10-40

En los distintos tipos de secuencias SE, se obtienen series de imágenes en las que los tejidos exhiben diferentes características de señal (figura 4). Así por ejemplo, el agua en secuencias potenciadas en T1 aparece con una señal intermedia o baja (iso o hipointensa), y en secuencias potenciadas en T2 se muestra brillante (hiperintensa). Dado que los procesos patológicos presentan normalmente una mayor cantidad de agua libre, aparecen hiperintensas en T2. El interés de las secuencias SE radica, sobre todo, en su capacidad para ofrecer imágenes anatómicas de gran calidad.

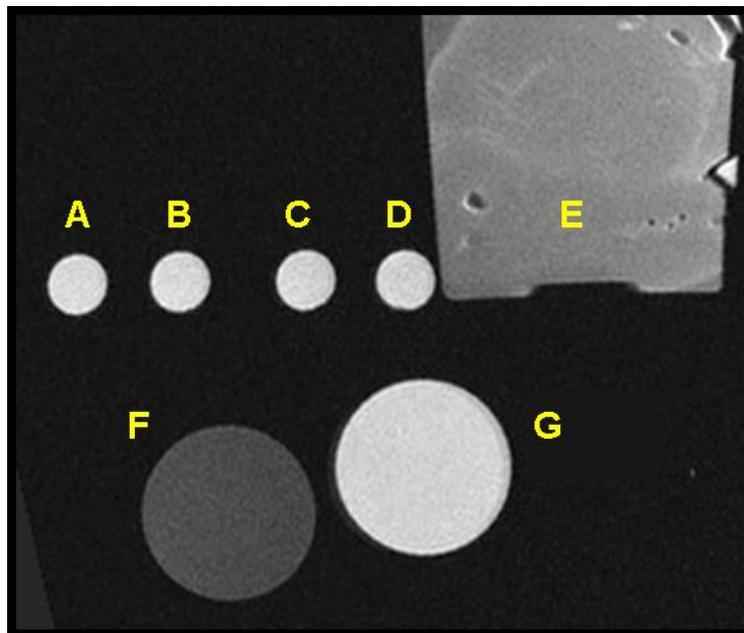


Figura 4. Características de señal de diferentes sustancias en secuencia SE T1.

A-D. Se muestran cuatro viales rellenos de un magnetofluido de base grasa, con cantidades progresivamente mayores de nanopartículas de hierro. La señal es similar en las cuatro muestras.

E. Pieza de tejido hepático sumergida en suero fisiológico. El hígado, rico en agua, y el suero fisiológico se muestran hipointensos.

F. Vial hipointenso relleno de suero fisiológico. G. Vial levemente hiperintenso relleno de grasa.

Secuencia de Inversión-Recuperación (IR)

Es una modificación de la secuencia SE, en la que el ciclo de pulsos comienza con un pulso de inversión de 180°. En la secuencia IR, tras el pulso inicial, se espera un tiempo denominado tiempo de inversión (TI), previo al inicio de la secuencia SE

convencional. El TI es un parámetro seleccionado por el operador que puede oscilar entre 100 y 3.000 ms, y que permite controlar el tipo de contraste de la imagen⁷⁹.

En esta secuencia se pueden aprovechar los diferentes tiempos de relajación de los componentes de un tejido, para anular la señal procedente de una determinada sustancia. Si se elige un TI corto, es posible sustraer la señal de las sustancias con T1 corto, tales como la grasa, y las secuencias así obtenidas se denominan STIR (Short Time Inversion Recovery) (figura 5). Una peculiaridad de las secuencias STIR es que en ellas los efectos T1 y T2 se suman, y esta propiedad incrementa la señal de los tejidos patológicos. Si a eso se añade el incremento relativo del contraste motivado por la supresión de la grasa, se entiende fácilmente la sensibilidad y aplicabilidad de esta secuencia en la detección de la patología, incluida la tumoral primaria o metastática.

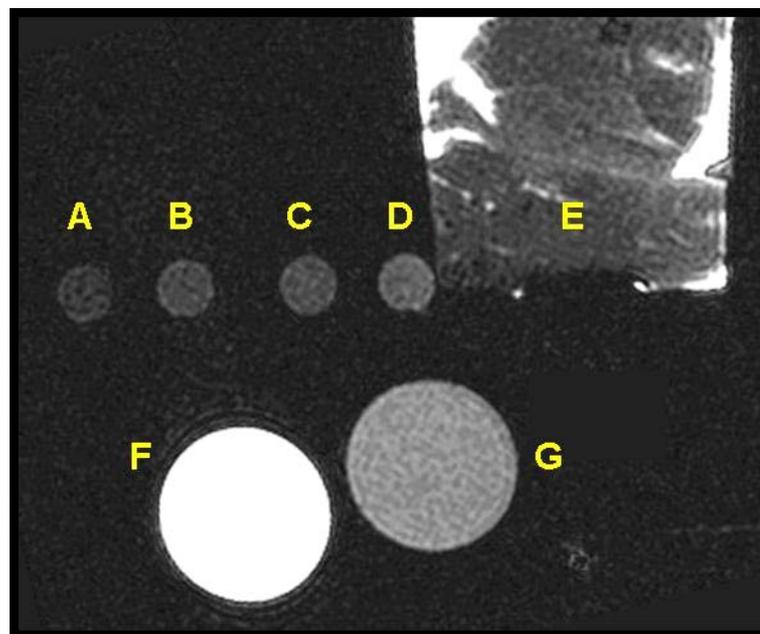


Figura 5. Características de señal de diferentes sustancias en secuencia STIR.

A-D. Los cuatro viales rellenos del magnetofluido de base grasa se muestran hipointensos.

E. Pieza de tejido hepático sumergida en suero fisiológico. El hígado aparece hipointenso y el suero fisiológico se muestra muy hiperintenso.

F. Vial hiperintenso relleno de suero fisiológico. G. Vial hipointenso relleno de grasa.

Secuencia de Eco por Gradiente (EG)

Las secuencias EG son una variante de las SE, en las que se consigue acortar los tiempos de exploración disminuyendo la duración de los ciclos de pulso. En estas secuencias, el pulso inicial de 90° de las secuencias SE es sustituido por un pulso que produce una menor inclinación del vector de magnetización, de entre 10 y 70°. Además, el segundo pulso de 180° es sustituido por la activación de uno de los gradientes⁷⁹.

Todo ello permite la utilización de un TR más breve de 10 a 150ms, y de un TE también muy corto, de 4 a 10ms.

Las secuencias EG son muy sensibles también a la presencia de sustancias paramagnéticas en los tejidos. La susceptibilidad magnética de una sustancia es una medida de la tendencia a magnetizarse cuando se coloca en un campo magnético externo⁸². Las sustancias paramagnéticas tales como los iones metálicos o las sustancias que contienen hierro (productos de degradación de la sangre, fragmentos metálicos, prótesis) poseen una alta susceptibilidad magnética, lo que da lugar a variaciones locales del campo magnético que provocan pérdida de señal en el área de influencia de la sustancia paramagnética (figura 6). Si la alteración de la señal es intensa, el efecto desarrollado se denomina artefacto de susceptibilidad magnética, y provoca una acusada distorsión en la imagen. Sin embargo, estos efectos también tienen una aplicación clínica, y en este contexto se han desarrollado secuencias EG para ser usadas en procedimientos de detección y cuantificación no invasiva de la sobrecarga férrica en el hígado^{83,84}.

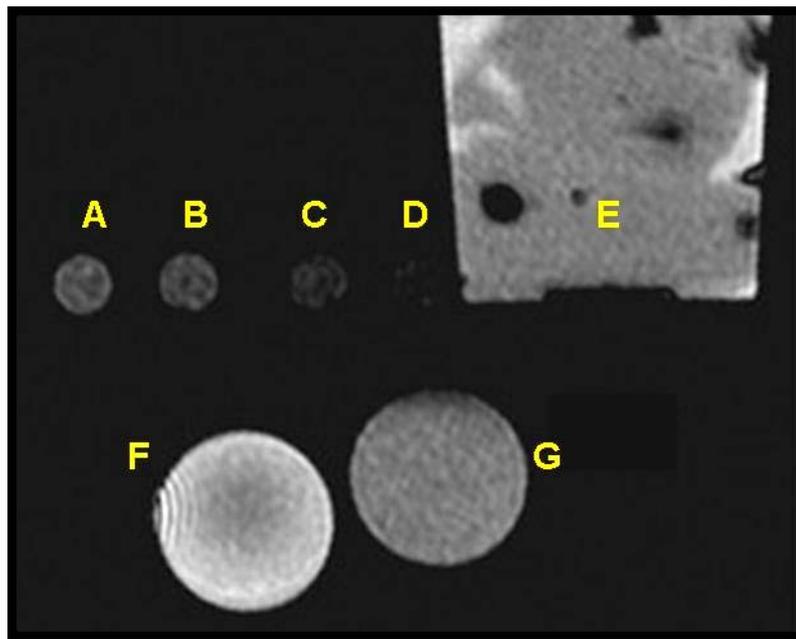


Figura 6. Características de señal de diferentes sustancias en secuencia EG.

A-D. Se observa una progresiva caída de la señal en los viales con mayores concentraciones de hierro, debido a un fenómeno de susceptibilidad magnética muy evidente en las secuencias EG.

E. Pieza de tejido hepático sumergida en suero fisiológico. El hígado y el suero fisiológico se muestran hipointensos.

F. Vial levemente hipointenso relleno de suero fisiológico. G. Vial hipointenso relleno de grasa.

2.2.6. Contribución de la RM al diagnóstico por imágenes y sus principales limitaciones

Como puede intuirse de lo dicho hasta aquí, la RM es una técnica de imagen que ofrece interesantes ventajas respecto a otros procedimientos⁷⁹.

- **Suministra una excelente resolución de contraste.**

Incluso sin la administración de un material de contraste exógeno al organismo, puesto que aprovecha el contraste intrínseco de los materiales. Al igual que en otras técnicas de imagen, el contraste puede ser regulado mediante el *software* de procesamiento de las imágenes; pero además, la RM ofrece la posibilidad de obtener imágenes de diferentes escalas de grises, aprovechando características

intrínsecas de los propios tejidos que pueden ser puestas de manifiesto mediante diferentes tipos de secuencias de obtención de imagen.

- **Permite obtener imágenes en diferentes planos espaciales.**

La adquisición de las imágenes se realiza en cualquier plano espacial (axial, sagital, oblicuo o combinación de los mismos), independientemente de cómo se disponga el organismo a explorar. Además, permite también la realización de diferentes tipos de reconstrucciones tridimensionales.

- **La señal no resulta artefactada al atravesar el hueso.**

Este extremo es importante puesto que en otras técnicas de imagen, tales como la ecografía o la tomografía computada, la valoración de estructuras contenidas por hueso compacto, o situadas en sus proximidades, resulta imposible o muy dificultada.

Pese a todo ello, la RM presenta también desventajas. Una de las más importantes se deriva de la sensibilidad de la técnica al movimiento. Los estudios de RM requieren de un cierto tiempo de exploración, más o menos prolongado, durante el cual, el organismo a estudio debe permanecer inmóvil. La falta de una adecuada inmovilidad condiciona que se generen imágenes distorsionadas, no aptas para diagnóstico. Esta limitación se hace especialmente evidente al utilizar esta técnica en animales de experimentación. Por ello, una adecuada anestesia y sedación que permita mantener a los animales inmovilizados, sosegados y con ciclos cardio-respiratorios rítmicos y uniformes, se hace necesaria durante la totalidad de la exploración.

2.2.7. Aportación de la RM al modelo experimental

Las razones que motivan la utilización de esta técnica en nuestro modelo experimental se exponen a continuación:

- La RM proporciona una elevada resolución de contraste lo cual permite la realización de secuencias anatómicas de gran detalle, incluso en estructuras de pocos milímetros de tamaño.
- Es una técnica muy sensible al incremento del agua libre, evento que aparece en la patología neoplásica hepática. La RM es, por tanto, muy sensible en la detección de lesiones tumorales. Esta característica, al ser intrínseca de los tejidos, no hace necesaria la administración de un contraste exógeno intravenoso, lo que facilita la aplicación de la técnica en animales de laboratorio.
- La RM es también capaz de evidenciar los depósitos de materiales paramagnéticos. Dadas las características de nuestro estudio experimental, la posibilidad de contar con una técnica sensible en la detección de metástasis hepáticas y capaz de poner de manifiesto la presencia depósitos metálicos en las mismas, resulta potencialmente óptima.

Todas las características expuestas convierten a la RM en una técnica de imagen con elevado potencial en nuestro modelo experimental, por la cual, sus posibles aplicaciones en nuestro trabajo serán desarrolladas en profundidad.

2.3. Tomografía Computarizada

La Tomografía Computarizada (TC) puede definirse como un método de diagnóstico radiológico en el que se consigue una imagen que es la reconstrucción bidimensional de un plano tomográfico o seccional de un objeto, mediante un ordenador.

La imagen *cruda*, no tratada, de un corte de TC es producto de los efectos de los rayos X al atravesar la materia, una vez que los fotones incidentes han sido atenuados y dispersados por los electrones de los átomos. El haz de rayos que emerge del

organismo explorado impresiona unos mecanismos de recogida energética denominados detectores. Esta información es posteriormente sometida a un proceso de transducción analógico-digital con el que se obtienen secuencias de imágenes o cortes tomográficos⁸⁵.

2.3.1. Principios básicos de la TC

La imagen que se consigue en la TC es un mapa de los valores de atenuación de los rayos X correspondientes a una sección transversal del organismo que se está explorando. Las diversas estructuras normales y patológicas poseen diferentes valores o coeficientes de atenuación, lo que hace posible su representación en tonos o escalas de grises en un monitor.

En la TC se emplea un estrecho haz de radiación generado en un tubo de rayos X, que atraviesa un organismo en un plano perpendicular u oblicuo al eje del objeto (tomografía axial) y posteriormente incide en un sistema de detectores que lo transforma en una señal eléctrica. Esta señal es expresión inversa del fenómeno de atenuación o absorción que sufren los rayos X al atravesar la materia, e interactuar con los electrones de los átomos⁸⁵.

El tubo emisor de rayos se encuentra montado en una estructura anular que mediante un movimiento circular, barre planos sucesivos del organismo. En el proceso de elaboración de una imagen, la información procedente de los detectores es ordenada en una matriz cuadrada, de idénticas dimensiones en los ejes x e y, compuesta por entre 256x256 a 1024x1024 elementos o píxels (*picture element*). Cada uno de estos elementos esta representando realmente un volumen o vóxel, de un espesor determinado⁸⁶. El vóxel incorpora la dimensión relativa al espesor de la sección o corte del organismo examinado, que se mide en el eje longitudinal de exploración o eje z. El tamaño del píxel en los ejes x-y del plano de sección es 10 a 20 veces más pequeño

que la dimensión del eje z. El vóxel es, por tanto, anisotrópico, es decir, sus bordes no tienen igual tamaño y conforman realmente un prisma de base cuadrada. Esta característica ha limitado enormemente la capacidad de reconstrucción multiplanar de la TC convencional.

Cuando se realiza la reconstrucción de las imágenes, a cada vóxel se le asigna un valor numérico de acuerdo con el grado de atenuación que haya sufrido el haz de rayos en el punto representado. Este valor numérico responde a una escala de unidades de atenuación denominadas unidades Hounsfield, UH, propia de la TC. En esta escala el valor cero corresponde a la atenuación del agua, los valores por debajo del cero, hasta -50 UH, corresponden a la grasa, y hasta -1000 UH al aire. En lo referente a los valores positivos, los tejidos blandos, con alto contenido hídrico, presentan unos valores de entre 40 y 60 UH, y el hueso alcanza las 1000-2000 UH ⁸⁷. En general, en la terminología de la TC, aquellos tejidos con valores de atenuación inferiores al cero se denominan hipodensos, los que presentan unas cifras similares al agua se califican de isodensos, y aquellos tejidos con alta atenuación se designan como hiperdensos.

2.3.2. Tomografía Computarizada Multi Corte

La Tomografía Computarizada Multi Corte (TCMC) ha transformado la tecnología seccional de la TC convencional, en tecnología volumétrica.

En las exploraciones de TC, las imágenes se obtenían mediante una sucesión de eventos que se repetían el número de veces necesario para conseguir un barrido completo del área anatómica a estudiar. La consecución de una imagen seccional requería de un giro completo del tubo de rayos alrededor del organismo a estudio mientras se realizaba un disparo continuo de rayos X. Posteriormente, la superficie o mesa de exploración sobre la que se encontraba el organismo, se desplazaba en el

eje longitudinal z, se repetía el giro del tubo mientras se efectuaba un nuevo disparo de rayos x, y así sucesivamente se iban adquiriendo todas las imágenes.

En la TCMC, la obtención de la imagen se realiza de diferente modo. De una parte, tanto el tubo de rayos X como la mesa de exploración, giran y se trasladan respectivamente con un movimiento continuo y uniforme, de tal forma que el barrido del área a escanear se lleva a cabo en un único desplazamiento del organismo a estudio. Esta tecnología espiral se desarrolló en la primera revolución de la TC, la TC Helicoidal, y también se aplica en la TCMC. Pero además, en esta última, el arco o anillo único de detectores empleado en TC convencional o TC Helicoidal, ha sido sustituido por un número progresivamente mayor de anillos detectores dispuestos en hileras paralelas. En la actualidad, los equipos de uso clínico habitual se encuentran dotados de 8, 16, 32 ó hasta 64 hileras de detectores. Este incremento en el número de detectores ha hecho posible la obtención simultánea de múltiples secciones tomográficas de espesor muy fino, de tal forma que prácticamente se consigue una adquisición volumétrica y no múltiples secciones secuenciales. Esta transformación ha propiciado las siguientes aportaciones al diagnóstico por TC ^{86,88-90}:

- Reducción radical de los tiempos de examen y de la exposición a la radiación.
- Posibilidad de practicar rangos de exploración mucho más extensos.
- Obtención de imágenes cuasi-isotrópicas: gran incremento en la resolución espacial del eje z motivado por la drástica disminución del espesor del vóxel.

2.3.3. Post-procesado de las imágenes en TCMC

Estas innovaciones han incrementado sustancialmente la capacidad de análisis tridimensional y multiplanar^{88,89,91,92} y además han mejorado la competencia diagnóstica en el estudio de estructuras de dimensiones progresivamente

menores^{90,93,94}, incluso de tamaño inferior al mm. Con la adecuada selección de los parámetros de exploración y usando el *software* de reconstrucción suministrado en los equipos, se pueden generar imágenes bidimensionales y tridimensionales en diferentes proyecciones y con distintos espesores de corte. La herramienta de post-proceso bidimensional de uso ordinario se denomina MPR (*Multi Planar Reformations*), mientras que en ámbito tridimensional son muy útiles las herramientas MIP (*Maximum Intensity Projections*) y VRT (*Volume Rendering Techniques*)⁸⁶.

Reconstrucciones multiplanares, MPR

Las reconstrucciones multiplanares son imágenes bidimensionales reformateadas en planos arbitrarios, a partir del cúmulo de imágenes axiales obtenido en una exploración. Las reconstrucciones coronales o sagitales son generadas mediante la extracción y exposición exclusiva de aquellos vóxel que, de todo el volumen de datos, se corresponden con los planos de corte seleccionados (figura 7).

En general, las MPR poseen un espesor de corte igual a la anchura de un píxel, pero también se pueden generar imágenes de calidad y con mayor espesor, en el rango de 1 a 7mm.

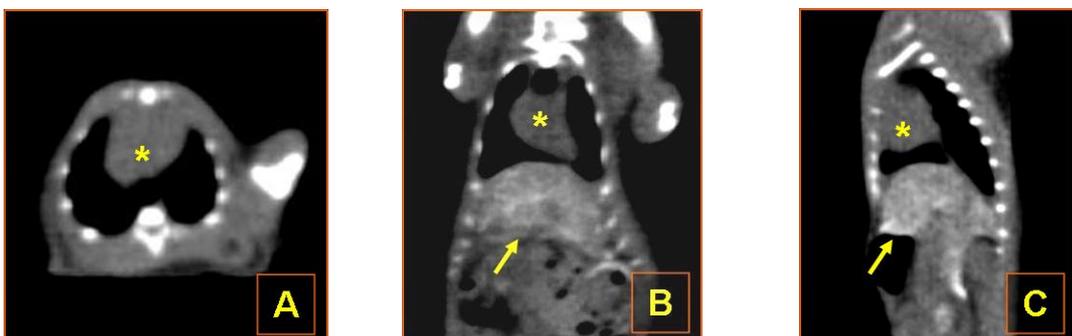


Figura 7. Reconstrucciones multiplanares.

A: Corte de TCMC a nivel de tórax murino. Se observan los pulmones muy hipodensos y el corazón (asterisco). B: MPR coronal, se identifican los pulmones, el corazón y el hígado hiperdenso (flecha) realzado con contraste. C: MPR sagital, se observan las costillas, el pulmón, el corazón y el hígado.

Proyecciones de máxima intensidad, MIP

Mediante el uso de la herramienta MIP, se consiguen imágenes tridimensionales de un volumen del organismo, en una proyección y con un espesor que son seleccionados por el operador. Esta técnica tiene la peculiaridad de que en el plano de representación elegido se priorizan los vóxeles con valores de UH más elevados. Las reconstrucciones MIP son muy útiles en estudios de hueso o de angiografía por TCMC, en las que las arterias rellenas de medio de contraste intravenoso destacan intensamente con respecto a los tejidos blandos adyacentes (figura 8).

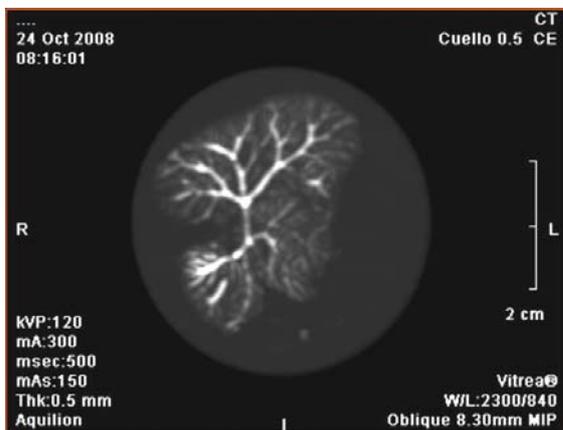


Figura 8. MIP de árbol vascular hepático murino.

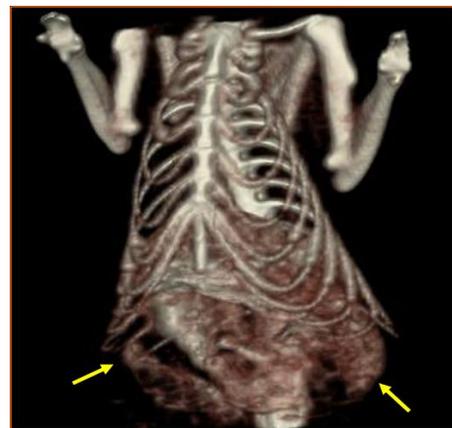


Figura 9. VRT de tórax y abdomen superior.
El parénquima hepático (flechas) resulta visible por la presencia de contraste en el árbol vascular.

Reconstrucciones volumétricas, VRT

En las técnicas de tipo VRT se asignan unos rangos de opacidad o de color en una escala continua, según los diferentes valores de atenuación expresados en UH. Con ello se consiguen imágenes volumétricas con elevada definición de contornos, e imágenes que muestran los órganos y diferentes estructuras con un aspecto semitransparente. En estos estudios también los espesores de reconstrucción y las diferentes proyecciones espaciales son seleccionados por el operador (figura 9).

2.3.4. Medios de contraste

Para incrementar la resolución de contraste, es decir, para aumentar la capacidad de discriminar entre distintos tipos de tejidos con similar coeficiente de absorción, pero de diferente naturaleza histológica, en la mayor parte de estudios de TC resulta necesaria la utilización de algún tipo de medio de contraste. Según la vía de administración, los medios de contraste pueden clasificarse en⁸⁶:

- **Gastrointestinales:** De administración oral o rectal, se emplean como relleno del tracto digestivo, de tal forma que permitan su distinción de las estructuras adyacentes con densidad de partes blandas. A este fin pueden usarse soluciones yodadas, suspensiones de sulfato de bario, preparaciones de metilcelulosa y agua, e incluso gases como el aire o el CO₂.
- **Parenterales:** De administración intra-vascular, su uso permite el estudio de las estructuras vasculares, la valoración y exploración de los diferentes parénquimas viscerales en busca de masas neoplásicas o inflamatorias, o también la evaluación de la vía excretora urinaria. Son suspensiones de yodo, con concentraciones de 300-400mg/ ml, que se administran habitualmente por una vía venosa periférica a dosis de 1-2ml/kg, en función del tipo selectivo de exploración a realizar^{95,96}.
- **Intra-cavitarios:** Se usan en el control de procedimientos intervencionistas percutáneos tales como las colangiografías, colecistografías, fisulografías o abscesografías.

Tipos específicos de contrastes: Lipiodol Ultra-Fluide®

El Lipiodol Ultra-Fluide® (480mg I/ml; laboratorios Guerbet, Francia) es un contraste yodado singular. Descubierta en 1910, su uso clínico se inició en 1926⁹⁵, y se utilizó

principalmente en estudios linfográficos. El lipiodol® es un etil-éster de aceites yodados obtenidos a partir de semillas de amapola, que contiene un 48% de yodo. En la actualidad se emplea como agente embolizante y anti-tumoral en procedimientos de quimioembolización arterial trans-catéter de neoplasias hepáticas²¹⁻²³. El lipiodol® administrado por vía arterial alcanza el sinusoides hepático y provoca embolización irregular y transitoria durante varios días. En modelos experimentales se ha comprobado que dosis de hasta 0,4ml/kg, son bien tolerados por los animales inoculados²², y que además, en el tejido tumoral, el lipiodol® es captado por las células neoplásicas mediante un fenómeno de pinocitosis, lo cual prolonga su tiempo de permanencia en el mismo⁹⁷.

Estas características han alentado su empleo concomitante con otras sustancias a la hora de evaluar la utilidad de posibles terapias en modelos de neoplasia hepática primaria o metastásica, tal es el caso de nuestro modelo experimental.

Nanopartículas magnéticas: aplicación del fenómeno de histéresis en la terapéutica anti-neoplásica

El nanómetro es la unidad de longitud que equivale a una milmillonésima (10^{-9}) parte de un metro. En la actualidad se diseñan y producen materiales de dimensiones en el rango de los nanómetros, y que se denominan nanopartículas. Algunas de estas nanopartículas se elaboran con diferentes metales que poseen propiedades magnéticas, y el estudio sobre su posible aplicación como agentes de contraste o como mediadores de termoterapia se encuentra en auge. La carencia de efectos tóxicos y la ausencia de incompatibilidades con los organismos biológicos son algunas de las razones que hacen muy interesante el uso de las nanopartículas magnéticas en biomedicina^{98,99}.

La termoterapia como terapéutica anti-tumoral local, presenta una importante ventaja frente a los tradicionales tratamientos no quirúrgicos, radioterapia y quimioterapia, motivada por su escasa toxicidad tanto loco-regional como sistémica. Es más, se está valorando el uso conjunto de estos tratamientos tradicionales con la termoterapia, dado que hay estudios que sugieren un impacto positivo sobre la supervivencia en la patología metastática hepática no quirúrgica¹⁰⁰.

Actualmente pueden considerarse dos tipos de tratamientos por calor. La hipertermia ligera, en el rango de 41-46°C, es capaz de estimular una respuesta inmune no específica frente a procesos tumorales. Por otro lado, la termoablación, en niveles de calor en torno a 46-56°C, produce destrucción del tejido tumoral por necrosis celular directa, coagulación o carbonización⁹⁸.

1. Estrategias de hipertermia oncológica

En función del mecanismo o fuente productora de calor, las diferentes modalidades anti-tumorales se encuadran en tres categorías⁹⁸:

- **Hipertermia por contacto directo con la fuente de calor.** Su aplicación se ha descrito a varios niveles: “cuerpo entero”, perfusión de órgano aislado, o directamente sobre una lesión neoplásica, tal es el caso de la inyección directa de suero caliente, a 96°C, en lechos tumorales.
- **Hipertermia mediada por aplicadores de superficie.** En esta modalidad el calor es generado por ultrasonidos, microondas o por radiofrecuencia.
- **Hipertermia mediada por implantes.** El calor se genera por dispositivos insertados en los organismos: agujas de radiofrecuencia o microondas, fibras de láser o mediadores electromagnéticos.

2. Hipertermia mediada por inducción magnética

En la actualidad, una de las vías de investigación en la terapia térmica se focaliza en el desarrollo de mediadores electromagnéticos. Estos mediadores son varillas, semillas o partículas, de rango milimétrico a nanométrico, que tras ser implantados en los tejidos y ser expuestos a campos magnéticos o eléctricos externos generados por diferentes tipos de aplicadores, tienen la capacidad de transformar la energía en calor. La combinación que ofrece la utilidad clínica más adecuada es la que se establece entre los aplicadores inductivos, productores de un campo magnético externo, y los mediadores con propiedades magnéticas.

2.1. Histéresis: fundamento físico de la termoterapia por inducción magnética

Las sustancias ferromagnéticas, tales como el hierro, son aquellas que mantienen un momento magnético incluso cuando el campo magnético externo es nulo. Este efecto se debe a la fuerte interacción existente entre los momentos magnéticos de los átomos individuales de la sustancia magnética, que los hace alinearse de forma paralela entre sí. En circunstancias normales, los materiales ferromagnéticos están divididos en regiones llamadas 'dominios'; en cada dominio, los momentos magnéticos atómicos están alineados en paralelo, pero los momentos de dominios diferentes no apuntan necesariamente en la misma dirección. Cuando un material ferromagnético es expuesto a un campo magnético externo, los diferentes dominios tienden a alinearse en la dirección del campo magnético. Al variar el campo magnético externo, los diferentes dominios también se realinean, pero este ciclo de cambio de orientaciones no es homogéneo, de tal forma que en la sucesión de variaciones en el estado de magnetización se produce calor. Este fenómeno denominado histéresis es, por tanto, la cualidad que poseen algunos materiales de producir calor cuando son expuestos a un campo magnético externo alternante. Además la cantidad de calor producida puede ser variada y modulada mediante modificaciones en la amplitud o frecuencia del campo magnético externo^{12,98}. La tecnología referente a los sistemas o aplicadores inductivos de los campos magnéticos externos se encuentra en desarrollo, pero la mayoría de los experimentos se han realizado con generadores que trabajan con amplitudes de campo magnético de unas pocas decenas de kA m^{-1} y con rangos de frecuencia de 50kHz- 1MHz⁹⁸.

2.2. Modalidades de mediadores magnéticos

La hipertermia por inducción magnética puede ser conseguida mediante la utilización de distintos tipos de mediadores aplicados por procedimientos diferentes¹⁰¹.

2.2.1. Mediadores o implantes intersticiales

Son varillas o semillas de materiales ferromagnéticos, de 1mm de diámetro y 10-70mm de longitud, que se insertan directamente en las neoplasias mediante cirugía. Esta técnica presenta notables inconvenientes tales como el requerimiento quirúrgico para el implante de los mediadores, el riesgo de migración de los mismos o la dificultad en el acceso al lecho tumoral.

2.2.2. Mediadores intracelulares

Los mediadores intracelulares son partículas nanométricas de administración intravenosa, diseñadas para ser absorbidas selectivamente por las células neoplásicas. Estos mediadores presentan grandes ventajas, aunque su aplicación se encuentra en fases preclínicas de experimentación.

2.2.3. Inyección directa de mediadores en nichos tumorales

Consiste en la inyección de suspensiones de micropartículas o nanopartículas directamente en los nichos tumorales. Mediante estos procedimientos de inserción directa, se han aplicado nanopartículas magnéticas en modelos experimentales de cáncer de hígado y de mama^{14,33}, y a nivel clínico en cáncer de próstata y en diferentes tipos de neoplasias recidivantes^{32,102,103}.

2.2.4. Embolización arterial tumoral con mediadores

En este tipo de procesos, los mediadores térmicos son ubicados en los lechos tumorales a través del árbol vascular. A nivel experimental se ha demostrado que es

mediante este procedimiento como se consigue una distribución más homogénea de las nanopartículas en los tejidos, lo que posibilitará una hipertermia y, por tanto, un tratamiento más efectivo¹⁴.

2.3. Nanopartículas magnéticas

En estudios experimentales se han valorado diferentes tipos de mediadores para ser administrados por vía intravenosa. Dado que el tamaño de estos mediadores se encuentra en rango nanométrico, de 9 a 200 nm, se catalogan como nanopartículas. En lo referente a la naturaleza química de las sustancias empleadas, aunque las nanopartículas de Fe_3O_4 han sido las más usadas, también se han estudiado otras combinaciones entre óxidos de hierro y plata, oro, manganeso o cobalto^{14,34,104,105}.

Para que las nanopartículas magnéticas puedan ser administradas por una vía vascular, generalmente venosa, no selectiva, su biocompatibilidad debe ser incrementada. Ello permitirá aumentar su vida media intra-vascular, de tal forma que los procesos de opsonización y posterior captura y eliminación por parte del sistema monocito-macrófago sean, en la medida de lo posible, postergados. En general, puede decirse que cuanto más pequeña, neutra e hidrofílica es una partícula, más posibilidades tiene de escapar a los procesos de depuración. Así las cosas, las nanopartículas pueden ser embebidas en liposomas o en cápsulas poliméricas¹⁰⁶, que vayan además recubiertas de macromoléculas hidrofílicas tales como dextranos. Además, las propias nanopartículas pueden ser ligadas directamente a diferentes sustancias: oligosacáridos, oligopéptidos, ácido fólico, anticuerpos, fragmentos de ARN, etc¹⁰⁷. Estas sustancias también incrementan la biocompatibilidad e incluso favorecen la captación de las nanopartículas por las células de los tejidos diana⁹⁸, convirtiéndolas en mediadores intracelulares.

En territorio hepático y dada la especial vascularización de la patología neoplásica, exclusivamente arterial^{14,15}, las nanopartículas magnéticas con capacidad de inducir hipertermia, han sido vehiculizadas por vía vascular de diferente modo. Para este territorio se han diseñado ferrofluidos, a base de suspensiones de nanopartículas magnéticas en lipiodol®, que han sido administrados a través del árbol arterial, en un intento de embolización tumoral selectiva o cuasi-selectiva. La distribución de estos fluidos en el árbol arterial neoplásico y hepático, se ha estudiado en modelos experimentales de neoplasia hepática primaria^{14,34,108}, empleándose para ello nanopartículas de óxido de hierro de entre 100-200nm.

2.4. Vehiculización de las nanopartículas magnéticas en la patología metastática hepática

La vehiculización intra-tumoral de fluidos magnéticos por vía vascular en territorio hepático, se ha estudiado en modelos de neoplasia primaria inducida por implante directo de células tumorales^{14,34,108}. Nuestro trabajo experimental se desarrolla sobre un modelo diferente, de metástasis múltiples generadas por diseminación hematológica, similar al proceso de diseminación metastática en condiciones fisiopatológicas.

En este contexto, hemos desarrollado un fluido magnético a base de una suspensión de nanopartículas de óxido de hierro en lipiodol®, el cual se ha administrado por vía intra-arterial en nuestro modelo experimental, y con el objetivo final de que pueda ser útil en termoterapia de patología metastática hepática.

Por otro lado, la naturaleza ferromagnética de las nanopartículas y su suspensión en el contraste yodado lipiodol®, hará posible verificar la distribución del fluido magnético por los órganos y tejidos infundidos mediante la utilización de técnicas de diagnóstico por imagen tales como la RM y la TCMC.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La administración de lipiodol®+nanopartículas magnéticas debería producir un doble efecto terapéutico:

- En un primer momento, el lipiodol induciría isquemia e hipoxia tisular directa y subsecuentemente un incremento en la permeabilidad capilar que favorecería el paso al intersticio de las nanopartículas.
- Posteriormente, las nanopartículas metálicas sometidas a un campo magnético externo alternante, generarían una hipertermia capaz de provocar una necrosis tumoral. Este evento resultaría además favorecido por dos circunstancias concomitantes^{34,109}. Por un lado, el microentorno de hipoxia previamente originado, haría a las células tumorales más susceptibles de sufrir lesión por calor. Por otro lado, un árbol vascular arterial ocluido, y la ausencia de un sistema venoso portal en el tejido neoplásico, impedirían la disipación térmica mediada por el flujo vascular y favorecerían el efecto *horno*.

El objetivo principal de este trabajo consiste en desarrollar un método de terapia térmica local mediada por una suspensión de nanopartículas magnéticas y lipiodol®, para lo cual, dichas nanopartículas -tras su administración por vía intra-arterial- deben quedar preferentemente ubicadas en el tejido metastático hepático.

Dado que la consecución de un depósito tumoral selectivo de las nanopartículas magnéticas evitará lesiones en el parénquima hepático sano, valorar la distribución de las mismas en un modelo de neoplasia diseminada resulta de crucial importancia

antes de precisar su hipotética capacidad de inducción térmica. En este mismo contexto, el desarrollo de procedimientos de monitorización no invasiva, capaces de determinar la presencia de depósitos de nanopartículas magnéticas en distintos tejidos, tal y como se ha explorado en otros modelos experimentales¹¹⁰, resultará de alto interés.

Como paso previo a la utilización terapéutica del fluido magnético elaborado, en el presente trabajo se plantearán, por tanto, una serie de objetivos intermedios a estudio:

- Desarrollo de un modelo experimental de metástasis hepáticas y su caracterización mediante técnicas no invasivas de imagen.
- Estudio de la distribución del magnetofluido en hígado sano, mediante técnicas de imagen y de laboratorio.
- Estudio de la distribución vascular arterial del magnetofluido en el modelo experimental neoplásico, tanto con técnicas de laboratorio como de imagen.

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo Experimental

En este apartado serán tratados los aspectos relativos a la descripción de los animales de experimentación usados en nuestro trabajo, la línea celular neoplásica seleccionada y los procedimientos anestésicos y quirúrgicos desarrollados para la inducción de múltiples metástasis hepáticas.

1. Reactivos biológicos

1.1. Animales de experimentación

En nuestras experiencias se han empleado ratas singénicas Wag/RijCrl machos y hembras de 8-10 semanas de edad (200-300g de peso). Nuestra cepa es originaria de Harlam-Netherland, y ha sido expandida en el Estabulario de la UPV/EHU. Los animales, estabulados en grupos de cinco, se han mantenido en ritmo circadiano de 12 horas, con alimentación (PanLab A-04) y bebida “ad libitum”. Estas ratas muestran un ritmo de crecimiento moderado, llegando a estabilizarse en la decimocuarta semana, en la que alcanzan un peso de 300g los machos y de 200g las hembras. La supervivencia no suele superar los 22 meses en los machos y los 31 meses en las hembras.

Todos los procedimientos han sido realizados de acuerdo con la legislación vigente referente a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, Real Decreto 1201/2005, de 10 de Octubre.

1.2. Línea celular

Para la inducción de metástasis se ha utilizado una línea celular estabilizada de adenocarcinoma de colon originaria de ratas singénicas Wag/RijCrl. Las células fueron

suministradas por “Cell-Lines-Service (CLS®)”, (lotes 300387- Pr44 y 300387-Pr45), y se corresponden con el pase nº 21 del cultivo.

Cada criovial fue expandido en un pase del que se obtuvieron nuevos lotes que se conservan en nitrógeno líquido. A partir de uno de estos crioviales (pase nº 22) se realizó una siembra en frascos de 75 cm², y se obtuvieron alícuotas de 1 ml que fueron nuevamente congeladas (pase nº 23). Todas las experiencias se han realizado a partir de la siembra en frascos de 25 cm² de las células de uno de estos crioviales del pase 23, asegurando así que todos los cultivos se obtienen en condiciones prácticamente idénticas.

2. Pautas anestésicas

Tanto los procesos quirúrgicos como los estudios de imagen que sean practicados en las ratas, requieren de una adecuada analgesia y sedación animal que permita la óptima ejecución de los mismos. En nuestro estudio se han utilizado diferentes técnicas de anestesia, dependiendo de la fase del proceso experimental.

2.1. Anestesia inhalatoria con éter

El éter es un agente anestésico inflamable que no reporta ventajas sobre otros productos inductores de anestesia inhalatoria, por lo que su uso se encuentra muy restringido.

2.1.1. Técnica anestésica

La manipulación del éter se lleva a cabo en una campana extractora de gases que impide una exposición excesiva del personal de laboratorio al gas anestésico.

En una cubeta transparente de tapa corrediza y con un volumen aproximado de 1500cc se prepara un lecho de algodón que se impregna con éter. Al ser transparente,

permite observar a la rata y valorar el efecto del anestésico. Se considera que la inducción anestésica es la adecuada cuando se aprecia que los movimientos cesan y que el animal está relajado.

2.1.2. Complicaciones y tratamiento

Debe prestarse una extrema atención en el proceso de inducción, con el fin de evitar la sobre-dosificación anestésica que conduzca a una parada cardio-respiratoria.

Ésta es la principal complicación del éter y su tratamiento pasa por la instauración de maniobras de reanimación cardio-pulmonar. En esta técnica se realiza un masaje cardiaco enérgico, presionando directamente sobre el esternón y la parrilla costal con el segundo y tercer dedos. Debe evitarse un exceso de presión capaz de producir fracturas costales. Simultáneamente, se mantiene la ventilación soplando a través de un tubo de goma que se adapta al hocico del animal. La presión de ventilación no debe ser muy alta, para evitar el insuflado gástrico que dificulte posteriormente los movimientos respiratorios del diafragma.

Esta maniobra deberá iniciarse inmediatamente después de la parada, y se mantendrá, al menos, durante 5-10 minutos.

2.1.3. Aplicación práctica

La inhalación de éter ha sido útil como paso previo a la aplicación intra-peritoneal de otros anestésicos, de tal forma que facilite el manejo de los animales que vayan a ser manipulados.

También se ha utilizado en los procedimientos de eutanasia, como inductor de una anestesia profunda previa a la luxación cervical.

2.2. Anestesia inhalatoria con Halotano y Óxido Nitroso

El Halotano es un potente anestésico que se vaporiza fácilmente. No es inflamable ni explosivo, y constituye un excelente anestésico para emplear en la rata.

Por otro lado, el Óxido Nitroso, aunque a dosis capaces de inducir anestesia produce hipoxia severa, tiene un cierto efecto analgésico, por lo que puede emplearse combinado con otros gases dentro de una pauta balanceada de anestesia.

2.2.1. Técnica anestésica

La inducción anestésica se realiza en una cámara transparente (30cm x 20cm x 20cm) que se encuentra conectada a los tubos dispensadores de los gases. En esta cámara, el animal respira una mezcla gaseosa controlada a base de:

- O₂: 0,5 l/min.
- N₂O: 1 l/min.
- Halotano: 3% (límites aconsejados 3- 4%)

La inducción con halotano requiere 2-3 minutos y se considera adecuada cuando la rata ha perdido los reflejos osteo-tendinosos y duerme tranquilamente.

El mantenimiento de la anestesia se realiza mediante una máscara aplicada el hocico de la rata, y que se encuentra conectada a un tubo que suministra una mezcla de gases similar a la anteriormente descrita. En esta nueva mezcla, sin embargo y para evitar toxicidad, la concentración de Halotano se reduce al 2%, o incluso al 1% en situaciones de cirugía prolongada.

Una vez concluida la cirugía, se cierra el aporte de halotano y de óxido nitroso, manteniéndose sólo el oxígeno hasta que se recupera el tono muscular en la cola. Esto ocurre en tan solo 15 ó 30 segundos. Tras una anestesia mantenida durante unos 20 minutos, la reversión completa lleva, aproximadamente, dos minutos. El tiempo de

recuperación depende de la precisión del control de la dosis de anestésico administrado.

Una vez recuperado el tono muscular, se retira la máscara y el animal se introduce en su jaula aplicando un foco de calor que permita mantener una temperatura ambiente de unos 37°C.

2.2.2. Complicaciones y tratamiento

El halotano deprime los sistemas respiratorio y cardiovascular. Este efecto es dosis dependiente y en ratas sanas este efecto no es clínicamente significativo si se mantienen las dosis normales.

El óxido nitroso en dosis anestésicas produce severa anoxia, más aún si se asocia con un relajante muscular. Sin embargo, este efecto nocivo se evita cuando se usa combinado con otros gases anestésicos.

2.2.3. Aplicación práctica

La mezcla se ha empleado en los procesos quirúrgicos de inducción tumoral.

2.3. Anestesia intra-peritoneal con Ketamina y Diazepam

La Ketamina es un agente anestésico disociativo capaz de producir una marcada analgesia. No deprime la respiración, lo que supone una interesante característica. Presenta un escaso carácter relajante muscular, es más, tras su utilización el tono muscular aumenta y puede incluso llegar a desarrollarse hipertonia. La Ketamina puede causar también un incremento de la presión intra-ocular y por ende un exoftalmos que requerirá de una adecuada protección corneal. A nivel cardiovascular es frecuente un efecto hipertensor leve.

El Diazepam es una benzodiazepina con marcada acción sedante y cuya asociación con otros agentes anestésicos potentes disminuye la necesidad de los mismos. A

dosis elevadas puede incluso inducir el sueño. Presenta una significativa acción relajante de la musculatura esquelética y no afecta a la frecuencia cardiaca ni a la presión arterial. Presenta el inconveniente de que no es compatible en la misma solución con la Ketamina.

La administración conjunta de Ketamina y Diazepam proporciona una anestesia de 20-30 minutos de duración seguida de un periodo prolongado de sueño de 90-120 minutos. El “periodo de sueño” es el tiempo que tarda la rata en recuperar los reflejos osteotendinosos. Este tiempo es más largo que el de anestesia propiamente dicha y, por tanto, transcurridos los minutos de anestesia el efecto analgésico desaparece y aunque la rata permanece relajada cualquier maniobra quirúrgica resultará dolorosa.

El Diazepam anula los efectos de la Ketamina sobre el tono muscular, y con su asociación se consigue una adecuada relajación muscular. Finalmente, también elimina el efecto hipertensor arterial¹¹¹.

2.3.1. Técnica anestésica

Dado que ambos anestésicos son incompatibles en la misma solución, la inducción anestésica se inicia con la inyección intra-peritoneal del Diazepam a dosis de 5mg/kg. Los efectos del mismo comienzan a hacerse evidentes a partir de los cinco o seis minutos. En este momento, la rata mantiene sus respuestas motoras, pero puede manipularse con facilidad y presenta una apreciable relajación muscular. A los diez minutos de la inyección se aplica la Ketamina, a dosis de 100mg/kg. Los efectos de la misma se desarrollan con rapidez y a los cinco o diez minutos ya se ha instaurado una anestesia profunda.

Esta técnica presenta la ventaja de que en caso de necesitar prolongar el periodo de sueño, ésto se puede conseguir repitiendo la inyección de la Ketamina, a mitad de dosis.

2.3.2. Complicaciones y cuidados

La utilización de ambos fármacos de la forma descrita es muy segura y no suelen desarrollarse complicaciones, sin embargo, la administración simultánea de los mismos puede ocasionar la muerte del animal.

Debe considerarse la posible aparición de exoftalmos y en su caso prevenir el desarrollo de sequedad corneal administrando lágrima artificial.

En general, en la recuperación post-anestésica deben aplicarse los cuidados habituales, con especial atención en evitar la hipotermia.

2.3.3. Aplicación práctica

Esta modalidad anestésica ha sido utilizada en los procesos quirúrgicos de administración de los magnetofluidos por vía vascular.

También se ha usado para hacer posible la práctica de las pruebas de imagen. La combinación ha resultado muy útil al proporcionar notable relajación muscular, ventilación rítmica y ritmo cardiaco normalizado, de tal forma que la motilidad animal se ha reducido al mínimo, aspecto de especial interés en las pruebas de RM. Además la posibilidad de aumentar el tiempo de sueño con dosis sucesivas, también ha sido importante en ocasiones en las que se realizan pruebas de imagen seriadas, tales como TCMC y posteriormente RM, o combinaciones de procesos quirúrgicos con práctica posterior de pruebas de imagen.

El efecto sedante del Diazepam resulta también muy útil en el proceso de depilación previo a la práctica de los estudios ecográficos.

3. Técnicas quirúrgicas de inducción tumoral

En este apartado se describe el procedimiento quirúrgico empleado en nuestro estudio para inducir metástasis en el hígado de las ratas. El resto de procesos quirúrgicos practicados en las diferentes fases del trabajo serán descritos en cada apartado particular.

3.1. Inoculación esplénica de células tumorales

Mediante la inoculación intra-esplénica de células tumorales, se simula la existencia de un tumor primario en el bazo desde el que migrarían las células tumorales por el torrente sanguíneo hasta el hígado, en donde quedarían depositadas. Ya que el bazo es resecado inmediatamente tras la inoculación, se anula la influencia posterior del tumor primario sobre el desarrollo metastático.

Bajo anestesia con halotano, el animal se coloca sobre la mesa de operaciones en decúbito supino. Se adapta el hocico a la máscara del circuito de anestesia y se inmoviliza la rata fijando las patas a la mesa con cinta adhesiva.

La piel se lava con alcohol con fines antisépticos y para humedecer el pelo de modo no interfiera en el acto quirúrgico. A continuación se practica una laparotomía media subxifoidea de 3cm de longitud. A través de la incisión se rechaza el paquete intestinal y se expone el bazo, apoyándolo con delicadeza sobre una gasa. Antes de la inoculación, se dispone una pequeña ligadura de seda 2/0 alrededor del polo esplénico en el que se va a realizar la punción, y no totalmente ceñida. Posteriormente se punciona la pulpa esplénica con una aguja de 25G, y se inocular lentamente la suspensión celular constituida a base de 250.000 células tumorales de adenocarcinoma de colon, vehiculizadas en 0,5ml de solución de Hank. La aguja se

retira lentamente, para permitir que el implante sea uniforme y que el parénquima esplénico no se distienda excesivamente (figura 10).

Una vez retirada la aguja, se tapona el orificio con esponja de fibrina y se ciñe la ligadura para evitar la diseminación de células en la cavidad peritoneal. Transcurridos cinco minutos para permitir la diseminación tumoral hacia el hígado, se practica la esplenectomía.

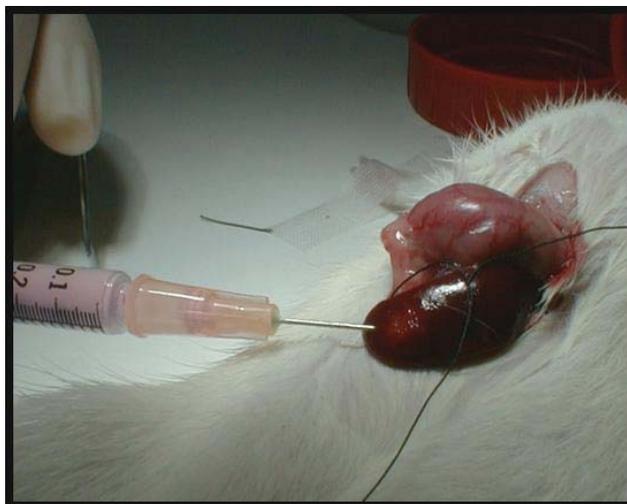


Figura 10. Punción esplénica de células tumorales.

En este acto quirúrgico se identifican los pedículos vasculares del bazo, se ligan de forma individualizada y posteriormente se seccionan, lo que posibilita la extracción esplénica. Finalmente, los muñones vasculares y el resto del paquete intestinal se devuelven a su ubicación originaria en el interior de la cavidad abdominal, y se procede al cierre de la incisión. Se realiza una sutura con puntos sueltos en un plano y para ello se emplea una aguja curva de sección triangular e hilo de seda de 2/0.

3.2. Resección hepática

A los diez días tras la inoculación de las células tumorales se procede a realizar una resección hepática parcial, como estímulo al desarrollo tumoral^{112,113}. Ésta técnica requiere un preciso conocimiento de la anatomía del órgano en la rata y un entrenamiento adecuado para lograr una correcta repetición de los resultados.

Tras anestesiarse al animal, se inmoviliza en posición de decúbito supino sobre la mesa. Se impregna el pelo con alcohol y se practica una laparotomía media subxifoidea de unos 3 cm de longitud. A través de la incisión se seccionan los repliegues de la

cápsula de Glisson que mantienen unido el hígado al diafragma, al estómago y al riñón derecho. A continuación se expone el lóbulo lateral izquierdo y se liga por su base con una hebra de Catgut 2/0. Esta maniobra debe ser especialmente cuidadosa. Una ligadura demasiado alta reduce el porcentaje de hepatectomía realizado. Por el contrario, si es excesivamente baja se pueden comprimir los vasos supra-hepáticos, comprometiendo su drenaje y provocando una insuficiencia hepática aguda. Una correcta ligadura permite, al mismo tiempo, una adecuada hemostasia.

Tras la cirugía, se reintroduce el hígado en la cavidad abdominal y se cierra la laparotomía. Se realiza una sutura con puntos sueltos en un plano, empleando una aguja curva de sección triangular e hilo de seda de 2/0. En todo momento se debe tener en cuenta que una manipulación exquisita del hígado y del resto de vísceras abdominales, reduce significativamente las complicaciones postoperatorias y facilita cirugías posteriores al disminuir la incidencia de adherencias y bridas.

3.3. Material empleado

- Alcohol
- Pinza de disección
- Pinza de Addson
- Tijeras de Mayo
- Tijeras de disección
- Mosquitos
- Disector
- Hebras de seda 2/0
- Hebras de vicryl 2/0
- Espongostan
- Jeringa de 1ml. con aguja 27G
- Vaso de precipitado de 50cc
- Caja de poliestirén con hielo
- Cronómetro
- Gasas y compresas estériles

Caracterización del modelo experimental mediante imagen

En el presente apartado se expone el proceso de aplicación de las diferentes técnicas de imagen, al estudio y caracterización del modelo experimental de metástasis hepáticas de carcinoma de colon.

1. Estudio ecográfico del hígado de la rata

1.1. Equipamiento

Las US se practicaron en dos ecógrafos de uso clínico (figura 11):

a) GE Healthcare: “Logiq 7”

b) Esaote: “MyLab60 XVision”



Figura 11. Equipos de US utilizados. Logiq 7 (a) y MyLab60 XVision (b).

El primero de ellos estaba dotado de una sonda lineal de 10 Mhz, y el segundo de una sonda lineal multi-frecuencia de 6-18 Mhz. Ambos equipos permitían además de los estudios en modo B, bidimensionales en tiempo real, la posibilidad de realizar estudios de US-Dópler tanto de tipo Color, como Análisis Espectral y estudios Tríplex.

1.2. Técnica de exploración

En la realización de los estudios ecográficos, los transductores o sondas deben asentar sobre la piel desnuda del área anatómica a explorar. Con objeto de eliminar la mínima lámina de aire que queda entre la superficie de la piel y la sonda ecográfica, y que actúa como una auténtica barrera impidiendo la transmisión de las ondas de ultrasonidos, es preciso aplicar un gel acuoso que actúe de conductor entre la señal sónica del transductor y el organismo a examinar.

1.2.1. Preparación de los animales

El manto piloso retiene en su seno gran cantidad de aire que entorpece la transmisión del sonido. Por este motivo, para realizar los estudios ecográficos hepáticos, fue necesario depilar la mitad superior del abdomen de las ratas.

Para facilitar la manipulación de los animales, estos fueron sometidos a sedación con Diacepam (5 mg/kg, i.p.). A continuación se procedió a realizar un rasurado mecánico con corta-pelo eléctrico, al que siguió la aplicación de una crema depilatoria estándar. De esta manera se eliminó todo vestigio de la cobertura capilar de las ratas.

1.2.2. Realización de la exploración

Los procedimientos de US se llevaron a cabo bajo anestesia general inducida mediante inoculación intra-peritoneal de Diazepam (5mg/kg) combinada posteriormente a los diez minutos con Ketamina (100 mg/kg, i.p.). Los animales se

inmovilizaron en decúbito supino durante toda la exploración, que se prolongó 10-20 minutos, dependiendo de los hallazgos.

En las US se efectuaron barridos sagitales, axiales y oblicuos que permitieron analizar y abarcar toda la anatomía hepática y del abdomen superior. Dado que los hallazgos de imagen serían posteriormente cotejados con los resultados de necropsia, todas las ratas fueron identificadas con un código de colores que les era rotulado en la base de la cola.

1.3. Evaluación morfológica del hígado sano

Como paso previo a la caracterización por imagen de la patología neoplásica, resultó fundamental el conocimiento de la anatomía normal del área a explorar. Para ello fue preciso definir las características que los diferentes órganos abdominales mostraban en US bidimensional en tiempo real, y se hizo especial hincapié en el estudio anatómico hepático. Asimismo fue necesario ajustar los diferentes parámetros técnicos, tales como calibrado de ganancias y aplicación o no de armónicos, al estudio específico del abdomen de la rata.

El proceso de descripción anatómica se practicó sobre 15 animales, seis hembras de 170-220g y nueve machos de 216-270g. En seis ratas las exploraciones se efectuaron con sonda ecográfica de 10 Mhz y en nueve con sonda de 6-18 Mhz. Los estudios ecográficos se denominaron respectivamente ECO-1 y ECO-2.

1.4. Criterios morfológicos de patología

En nuestro modelo experimental, además de las masas tumorales, nos encontramos con pequeñas lesiones fibro-inflamatorias en el lecho de la resección hepática. Estas lesiones tienen un aspecto de masa, y su posible presencia debe ser tenida en

consideración para no ser interpretados erróneamente como implantes tumorales. Resulta imprescindible caracterizar y diferenciar ecográficamente ambas entidades.

1.4.1 Características ecográficas de las masas fibro-inflamatorias

Con objeto de definir las características ecográficas de estas masas inflamatorias y monitorizar su evolución, se realizaron varias series de exploraciones en tres grupos de 24 ratas hepatectomizadas. Descripción de los diferentes experimentos:

- Grupo ECO-3, n=6, se practicó US a los 11 días de la hepatectomía, y en él se definieron las características ultrasonográficas de las lesiones.
- Experimento ECO-4, n=9, se realizó US a los 10 y 17 días de la cirugía.
- Grupo ECO-5, n=9, se obtuvieron series de US a los 20 y 26 días de la hepatectomía.

Los dos últimos grupos permitieron monitorizar la evolución temporal de las lesiones fibro-inflamatorias. Las US correspondientes a los grupos ECO-3 y ECO-5, se realizaron con sonda de 10 Mhz, mientras que en el grupo ECO-4 se utilizó la sonda multifrecuencia 6-18 Mhz. Tras la realización de las US, los animales fueron sacrificados para cotejar los hallazgos de imagen con los estudios de necropsia.

1.4.2 Características ecográficas de las masas tumorales

La fase de trabajo relativa a la detección, caracterización y monitorización de las lesiones neoplásicas se practicó sobre un total de 46 animales, 17 machos y 29 hembras de 170-286g, agrupados en siete grupos de experiencias. Mediante sonda de 10 Mhz se estudiaron 37 ratas:

- Animales no hepatectomizados (n=23): experimentos ECO-6 a ECO-9.
- Ratras con hepatectomía parcial (n=14): experimentos ECO-10 y ECO-11.

Por otro lado, nueve animales con hepatectomía parcial, grupo ECO-12, se exploraron mediante sonda multi-frecuencia de 6-18 Mhz.

De esta manera, se dispuso de siete grupos de animales cuyas principales características pueden ser resumidas de la siguiente manera (tabla 2):

- ECO-6 (n=8) se realizaron US a los 28 (n=4) y 35 días (n=4) de la inoculación tumoral. Tras las US se sacrificaron los animales para cotejar las imágenes con los hallazgos de la necropsia.
- ECO-7 (n=6) se realizó US seguido de estudio anatomopatológico a los 32 días de inoculación tumoral.
- ECO-8 (n=5) fue estudiado con US a los 28 y 42 días. Tras la segunda exploración los animales fueron sacrificados.
- ECO-9 (n=4) fue explorado a los 70 días de infusión tumoral.
- ECO-10 (n=6) se practicó US y estudio patológico a los 21 días de inoculación tumoral.
- ECO-11 (n=8) se realizaron US a los 30 y 36 días de la siembra tumoral, y las necropsias tuvieron lugar tras la segunda sesión ecográfica.
- ECO-12 (n=9): las US se practicaron a los 20 y 27 días de la inoculación neoplásica. El estudio patológico se realizó tras la segunda US.

En las exploraciones ecográficas practicadas se valoró la sensibilidad de la técnica a la hora de establecer el diagnóstico de infiltración metastásica hepática, así como las características ultrasonográficas de las metástasis.

Tabla 2. Distribución global temporal de los diferentes experimentos de US practicados.

Semanas de evolución	3 (15-21 días)	4 (22-28 días)	5 (29-35 días)	6 (36-42 días)	10 (>63 días)
No Hepatectomía US 10 Mhz (n=23)		ECO-6 † (n=4) ECO-8 (n=5)	ECO-6 † (n=4) ECO-7 † (n=6)	ECO-8 † (n=5)	ECO-9 † (n=4)
Hepatectomía US 10 Mhz (n=14)	ECO-10 † (n=6)		ECO-11 (n=8)	ECO-11 † (n=8)	
Hepatectomía US 6-18 Mhz (n=9)	ECO-12 (n=9)	ECO-12 † (n=9)			

El signo “†”, indica el momento en que los animales fueron sacrificados para cotejar los resultados de la US con los de la necropsia.

Como signos de desarrollo neoplásico se consideraron los siguientes hallazgos:

- Festoneado del contorno hepático motivado por abombamientos focales en la superficie de la víscera.
- Megalias de lóbulos hepáticos caracterizadas por desestructuración del patrón ecográfico y convexidad de bordes.
- Nódulos intra-hepáticos de ecoestructura diferente y distinguible del parénquima circundante.
- Masas sólidas de localización extra-hepática.

1.4.3 Confrontación de hallazgos ecográficos y necrópsicos

Para contrastar los resultados de US con los de necropsia, en ambos se determinó el número, localización y tamaño de los implantes tumorales. En función del tamaño, las metástasis se agruparon en: <3mm, 3-7mm y >7mm. Cuando la infiltración neoplásica fue tan extensa que hizo imposible la cuantificación y determinación del tamaño y número de los implantes individuales en uno o varios lóbulos hepáticos, se usaron respectivamente los términos lóbulo tumoral o hígado tumoral.

En los estudios de necropsia los animales fueron sacrificados mediante anestesia inhalada (éter) y luxación cervical. Inmediatamente se procedió a la extracción hepática y a su análisis visual macroscópico para cuantificar y localizar las metástasis. Posteriormente se tomaron muestras de algunos especímenes para su estudio histológico. Estas muestras fueron fijadas en formol al 10% y posteriormente teñidas con hematoxilina-eosina, para su estudio con microscopía óptica. De esta forma se corroboró la naturaleza neoplásica de las lesiones reveladas en los estudios de imagen y en los análisis visuales macroscópicos de necropsia.

1.5. Evaluación de parámetros hemodinámicos (Ecografía Dópler)

Además de los estudios morfológicos, también se realizaron exploraciones de US-Dópler para valorar diferentes parámetros hemodinámicos en arteria hepática y vena Porta. Las US-Dópler se practicaron en el ecógrafo Logiq 7, con transductor de 10 Mhz.

1.5.1. Adecuación de la técnica Dópler

En un primer momento, se llevaron a cabo varias series de exploraciones con objeto de ajustar la técnica de la US-Dópler. Al igual que en los procedimientos de US bidimensional, los estudios se realizaron bajo anestesia general inducida por

inoculación intra-peritoneal de Diazepam y Ketamina, y con los animales inmovilizados en decúbito supino. Estas exploraciones preliminares se practicaron en seis ratas del experimento ECO-7, en las cinco ratas de ECO-8, y en 4 ratas de ECO-11.

Las diferentes mediciones se obtuvieron a nivel del hilio hepático, y se comenzaba por la evaluación venosa. Tras la identificación de la vena Porta se procedía a ubicar y ajustar el cursor del volumen de muestra al diámetro interno del vaso, y se realizaban las determinaciones hemodinámicas.

En un segundo paso se valoraba la arteria hepática. Dado que su identificación en imagen bidimensional resultaba muy dificultosa, en su teórica ubicación se practi-

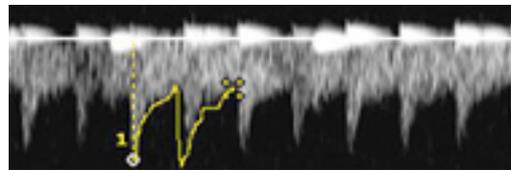


Figura 12. Tren de ondas característico de un vaso arterial.

caban barridos con US-Dópler hasta descubrir un espectro de onda arterial adyacente a la vena Porta (figura 12). En ese momento se ajustaba al mínimo el tamaño del volumen de muestra, y se procedía a la determinación de los diferentes parámetros. Tanto en el análisis venoso como en el arterial, el ángulo de exploración se ajustó al valor más bajo posible, y siempre menor de 60°.

Las exploraciones se prolongaron durante varios ciclos cardiacos. En cada animal se practicaron mediciones en al menos tres diferentes trenes de ondas correspondientes a las distintas velocidades, que permitieron la determinación de los valores medios, medidos en cm/s. De esta forma se calcularon:

- la velocidad máxima en vena Porta (**pVmax**),
- la velocidad máxima en arteria hepática (**aVmax**)

En base a estos datos también fue posible realizar el cálculo del **IR** arterial y de la **razón A/P**.

En ECO-7 se realizaron medidas de velocidades portales a los 32 días de inoculación tumoral, y en ECO-8 a los 28 y 42 días. En ECO-11 se valoraron tanto los parámetros venosos como arteriales a los 30 y 36 días de la inoculación (20 y 26 días tras la hepatectomía).

1.5.2. Determinación de parámetros hemodinámicos en diferentes situaciones.

En el proceso de inducción tumoral, los animales son sometidos a diferentes intervenciones quirúrgicas que alteran la anatomía vascular del territorio hepato-esplénico. No sólo el propio desarrollo de la patología neoplásica puede afectar los diferentes flujos vasculares, sino que éstos pueden también verse influidos tanto por la esplenectomía como por la hepatectomía parcial. Por todo ello, además de precisar los parámetros hemodinámicos en condiciones basales, resulta importante determinar estos valores en las diferentes condiciones descritas, en un intento de descubrir los hipotéticos cambios exclusivamente atribuibles al desarrollo tumoral. En los diferentes grupos de experimentos se valoraron pV_{max} , aV_{max} , IR y razón A/P; también se tuvo en consideración el desarrollo o no de patología tumoral en aquellos animales inoculados con células neoplásicas.

A continuación se describen los detalles de cada uno de los grupos o series de animales sometidos a valoración con US-Dópler (tabla 3):

- Experimento ECO-13(D), estudio de valoración de las velocidades e índices en condiciones basales sobre un grupo de 13 ratas no manipuladas con pesos de 263-300g.
- Experimento ECO-14(D), estudio del efecto de la hepatectomía parcial en un grupo inicial de 10 ratas, no manipuladas previamente, con pesos de 271-297g. Las US-Dópler se practicaron a los 2 (n= 10), 14 (n= 9) y 21 (n= 4) días de la hepatectomía.

- Experimento ECO-15(D), valoración hemodinámica de 12 ratas de 238-273g con inoculación tumoral, esplenectomía y hepatectomía parcial. Se realizaron dos tandas de US-Dópler a los 2 (n=12) y 14 (n= 9) días de las hepatectomías, que se correspondían respectivamente con los días 12 y 24 tras la inoculación tumoral.
- Experimento ECO-16(D), evaluación de 6 ratas de 233-286g, a las que se realizó esplenectomía y hepatectomía parcial, pero no inoculación tumoral. Se practicó US-Dópler previa a la cirugía, y a los 5 (n= 5), 14 (n= 4) y 19 (n= 4) días de la hepatectomía, respectivamente días 15, 24 y 29 tras la esplenectomía.
- Experimento ECO-17(D), valoración de 6 ratas de 249-274g, a las que se realizó inoculación tumoral y esplenectomía seguido a los 10 días de hepatectomía parcial. Se practicó US-Dópler previa a la cirugía y a los 5, 14 y 19 días de la hepatectomía, respectivamente días 15, 24 y 29 tras la esplenectomía e inoculación tumoral.

Tabla 3. Descripción de las diferentes series Dópler.

Experimento	US-Dópler Basal	Inoc / Esplenec	Hepatec Día 0	1ª sem. 1-7 días	2ª sem. 8-14 días	3ª sem. 15-21 días
ECO-13(D)	SÍ	NO/NO	NO	-	-	-
ECO-14(D)	NO	NO/NO	SÍ	Dp (12)	Dp (24)	Dp (31)
ECO-15(D)	NO	SÍ/SÍ	SÍ	Dp (12)	Dp (24)	-
ECO-16(D)	SÍ	NO/SÍ	SÍ	Dp (15)	Dp (24)	Dp (29)
ECO-17(D)	SÍ	SÍ/SÍ	SÍ	Dp (15)	Dp (24)	Dp (29)

Los tiempos del encabezamiento parten de la Hepatectomía, día 0. Dp: indica la realización de la serie, en paréntesis los días transcurridos desde el momento de la inoculación tumoral y/o esplenectomía.

De acuerdo con los experimentos practicados, la valoración hemodinámica basal se realizó en las series ECO-13(D), ECO-16(D) y ECO-17(D). El efecto de la hepatectomía se determinó en ECO-14(D). En función del conocimiento de los efectos derivados de la hepatectomía, los cambios motivados por la esplenectomía serían calculadas en ECO-16(D). Finalmente, y en función de las determinaciones previas, el efecto de la inoculación tumoral podría ser valorado en base a ECO-15(D), ECO-17(D) y ECO-11 (tabla 4).

Tabla 4. Determinación de los parámetros hemodinámicos en función de los diferentes grupos de experimentos.

Determinación hemodinámica	Identificación US-Dópler	1ª sem. 1-7 días	2ª sem. 8-14 días	3ª sem. 15-21 días
Condiciones Basales	ECO-13(D) (n=13) ECO-16(D) (n= 6) ECO-17(D) (n=6)			
Hepatectomía	ECO-14(D)	Dp (n= 10)	Dp (n= 9)	Dp (n= 4)
Esplenectomía & Hepatectomía	ECO-16(D)	Dp (n= 5)	Dp (n= 4)	Dp (n= 4)
Inoculación & Esplenect./Hepatect.	ECO-15(D) ECO-17(D) ECO-11	Dp (n= 12) Dp (n= 6)	Dp (n= 9) Dp (n= 6)	Dp (n= 6) Dp (n= 4)

Dp: indica la realización de la serie.

2. Resonancia Magnética hepática

2.1. Equipamiento

Las exploraciones de RM se realizaron en un equipo de uso clínico Siemens "Symphony" de 1,5 T. Además, para la práctica de los estudios fue necesario utilizar una bobina de cráneo (figura 13).



Figura 13. Equipo de RM.
Bobina de cráneo conectada a la mesa de exploración.

2.2. Técnica de exploración

La RM es una técnica de imagen muy sensible a los artefactos de movimiento, por lo que resulta fundamental mantener una adecuada inmovilización en el animal a explorar. Sin embargo, siempre existe un cierto artefacto de movimiento que no es posible eliminar y que proviene de los latidos cardiacos y de las excursiones respiratorias.

2.2.1. Preparación de los animales

Los procedimientos de RM se llevaron a cabo bajo anestesia general inducida por inoculación intra-peritoneal de Diazepam (5mg/kg) combinada con Ketamina (100mg/kg, i.p.). Para facilitar la manipulación de los animales, éstos, en grupos de tres, fueron dispuestos en posición de decúbito supino en el interior de una cubeta de plástico. Posteriormente eran inmovilizados mediante unas bandas de sujeción, y todo el sistema era introducido en el centro de la bobina de cráneo (figura 14). Finalmente los animales se pasaban al interior del imán.

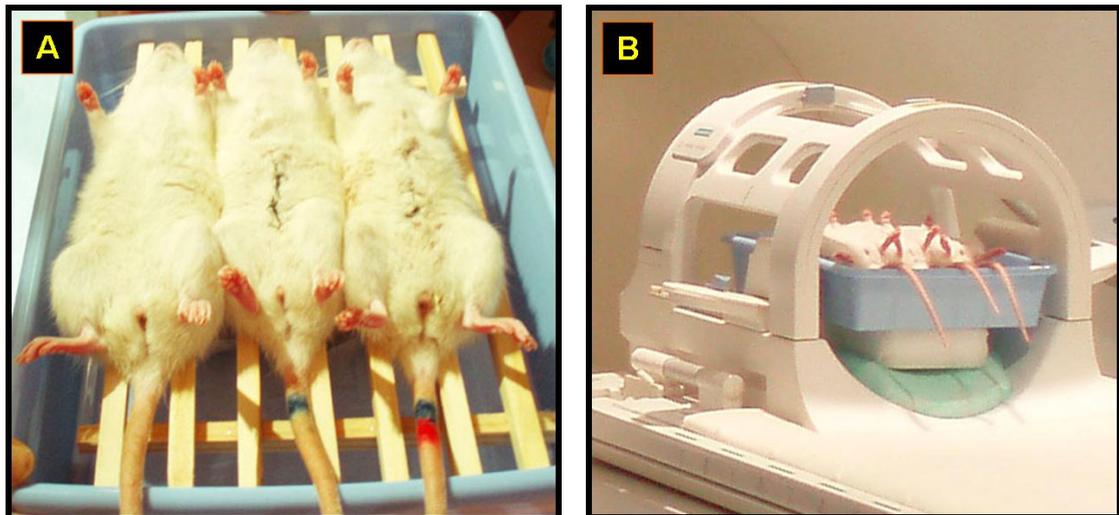


Figura 14. A. Animales en cubeta de plástico. B. Sistema en la bobina de cráneo y sobre la mesa de exploración.

2.2.2. Realización de las exploraciones

En los estudios morfológicos se usaron secuencias de RM potenciadas en T1, T2, DP, EG y STIR (tabla 5), mediante las que se obtuvieron series de imágenes en proyecciones axiales y coronales. Del total de series realizadas, se seleccionarían posteriormente aquellas que mejor permitiesen tanto el estudio de la anatomía, como de la patología tumoral e inflamatoria.

Tabla 5. Parámetros técnicos de las secuencias de RM.

Secuencia/Plano	TR (ms)	TE (ms)	Ángulo	Matriz	Espesor de Corte (mm)	TI (ms)
T1/ Coronal	651	24	90°	160x160	2,5	-
DP/ Coronal	1900	25	150°	150x150	2	-
DP/ Axial	2500	25	70°	113x180	3	-
T2/ Coronal	2170	100	150°	150x150	2	-
STIR/ Coronal	3410-4200	29	150°	169x160	3	130
STIR/ Axial	3600	44	150°	112x140	3	130
EG/ Coronal	120	4,1	20°	150x150	3	-
EG/ Axial	120	14,1	20°	150x150	3	-

Se realizaron varias secuencias STIR coronal modificando el TR, y conservando el resto de parámetros.

El desarrollo del proceso de adquisición y análisis de las imágenes en cada grupo de tres animales se prolongó durante 30-40 minutos. Dado que los hallazgos de imagen serían posteriormente cotejados con los resultados de necropsia, todas las ratas fueron identificadas con un código de colores rotulado en la base de la cola.

2.3. Evaluación anatómica del hígado sano

A fin de describir la anatomía hepática y de realizar una evaluación preliminar de la utilidad de los distintos tipos de secuencias aplicadas, en esta primera fase del estudio se evaluaron tres ratas macho sanas, de 278-311g, experimento RM-1.

Las diferentes secuencias deberían poseer la suficiente capacidad de resolución para identificar e independizar las vísceras sólidas, las asas intestinales y las estructuras vasculares principales. Con estos objetivos, se realizaron las series de imágenes potenciadas en T1, DP, T2, STIR y EG.

2.4. Valoración morfológica de la patología

Como ya se ha descrito en el apartado dedicado a la US, los hallazgos patológicos identificables en imagen pueden corresponder tanto a lesiones de tipo neoplásico, como a masas de estirpe fibro-inflamatoria, secundarias al proceso quirúrgico de inducción tumoral. En las diferentes secuencias de imagen no sólo se intentó conseguir la identificación de la patología, sino también el diagnóstico etiológico, neoplásico o inflamatorio, de la misma.

2.4.1 Características en imagen de los diferentes hallazgos patológicos

Al objeto de definir las características de las lesiones neoplásicas y de las masas inflamatorias, se realizaron exploraciones de RM en tres grupos de nueve animales (tabla 6). Descripción de los diferentes experimentos:

- Experimento RM-2, n=3, ratas de 170-220g sin hepatectomía parcial. La exploración se practicó a los 28 días de la inoculación tumoral. En este experimento se definieron las características de lesiones malignas en estadio precoz y también se seleccionaron las secuencias más idóneas para su valoración.
- Experimento RM-3, n=3, ratas de 190-300g no hepatectomizadas. Los estudios de RM se practicaron a los 33 días de la inyección tumoral. En este experimento se estudiaron las lesiones tumorales en estadio más avanzado.
- Experimento RM-4, n=3, desarrollado en ratas de 217-262g, a las que se había practicado hepatectomía parcial a los 10 días de la inoculación tumoral. La RM fue realizada a los 20 días del inóculo. En esta serie se evaluaron las características de las lesiones tumorales, pero fundamentalmente las masas de tipo inflamatorio.

Tras la realización de los estudios de imagen, los animales fueron sacrificados para comparar los hallazgos observados en la RM con los de la necropsia.

Tabla 6. Distribución temporal de los diferentes experimentos de RM practicados.

Semanas de evolución	3 (15-21 días)	4 (22-28 días)	5 (29-35 días)
No Hepatectomía		RM-2 † (n=3)	RM-3 † (n=3)
Hepatectomía	RM-4 † (n=3)		

El signo “†”, indica el momento en que los animales fueron sacrificados para cotejar RM y necropsia.

En todo este proceso se valoró la sensibilidad de la técnica a la hora de identificar la patología metastática, y la capacidad de discernir entre lesiones malignas e inflamatorias en función de las diferentes características de las mismas.

Como signos de desarrollo tumoral se consideraron los siguientes hallazgos:

- Megalias de lóbulos con intensidad de señal alterada y distinguible del parénquima sano, característicamente hiperintensos en secuencias potenciadas en T2 y STIR.
- Nódulos de intensidad de señal elevada en secuencias T2 y STIR, rodeados de parénquima hepático con intensidad de señal normal.
- Masas de similares características de señal a las descritas anteriormente, pero de localización extra-hepática.

Por otro lado, en las lesiones de tipo fibro-inflamatorio también era predecible encontrar una alteración en la intensidad de la señal similar a la descrita en las metástasis.

Como signos más sugestivos de lesión benigna se consideraron:

- Masas hiperintensas de localización típica, sub-diafragmática izquierda.
- Masas con focos de vacío de señal en su interior, motivados por la presencia de burbujas gaseosas.

2.4.2 Confrontación de los hallazgos de RM con la necropsia

Para contrastar los resultados de la RM con los de necropsia, en ambos procedimientos se determinó el número, localización y tamaño de los implantes tumorales. Cuando la infiltración neoplásica fue tan extensa que hizo imposible la cuantificación y determinación del tamaño y número de los implantes individuales en uno o varios lóbulos hepáticos, se usaron respectivamente los términos lóbulo tumoral o hígado tumoral.

En los estudios de necropsia, los animales fueron previamente sacrificados mediante anestesia inhalada (éter) y luxación cervical. De forma inmediatamente posterior, se procedió a la extracción hepática y al análisis visual macroscópico de la víscera, en busca de implantes tumorales. Con el fin de no perder nódulos situados en el espesor del parénquima hepático, cada lóbulo se dividió en secciones de unos 2-3mm de espesor.

3. Evaluación hepática con Tomografía Computada Multi Corte

3.1. Equipamiento

Los estudios de TCMC se practicaron en un escáner Siemens “Somaton Sensation 10”, dotado de 10 detectores (figura 15).

En la adquisición de las secuencias se emplearon los parámetros descritos en la tabla 7. Para el trabajo de post-procesado se contó con el *software* “syngo CT 2006G”, que además de las habituales imágenes en proyección axial, permitía también generarlas en diferentes planos y con diferentes



Figura 15. Escáner Multi Corte.

espesores de corte. De esta forma fue posible la práctica de reconstrucciones multi-planares (MPR), proyecciones en máxima intensidad de señal (MIP) y reconstrucciones volumétricas (VR).

Tabla 7. Parámetros de adquisición de TCMC.

Colimación del detector	10 x 0,75 mm
Tiempo de rotación	500 ms
Voltaje	120 Kv
Amperaje	130 mAs
Espesor de corte	1 mm

3.2. Técnica de exploración

La realización de las exploraciones hepáticas con TCMC, requiere de la administración intravenosa de un fluido yodado que permita incrementar la resolución

de contraste de esta técnica de imagen. Este líquido o contraste yodado, se inyecta habitualmente por una vía venosa periférica de grueso calibre que permita su infusión en bolo. En el presente trabajo, la administración del contraste se efectuó a través de la vena femoral izquierda, y se usó un fluido con una concentración de yodo de 300mg/ml.

3.2.1. Preparación de los animales

Para la práctica de los estudios, los animales se encontraban inmovilizados en decúbito supino y anestesiados con la combinación estándar utilizada a base de Diazepam (5mg/kg, i.p.) y Ketamina (100mg/kg, i.p.).

En la base de la extremidad inferior izquierda se realizaba una incisión de 1cm de longitud, mediante la cual se abría un ojal en la piel de la rata que permitía visualizar el paquete vásculo-nervioso femoral. Para exponer la vena femoral, se practicaba una cuidadosa disección roma de la zona. Una vez identificada la vena, se canalizaba con una aguja de 30G que se encontraba conectada a un catéter prolongador. A este dispositivo se aplicaba una jeringa pre-cargada con el contraste yodado. Seguidamente la rata era introducida en el escáner, se le inyectaba el contraste (1ml/kg, i.v.) e inmediatamente se lanzaba la exploración.

Una vez finalizada la misma, se sacaba al animal del escáner y se retiraba el sistema de infusión del contraste. Tras unos momentos de compresión vigorosa para favorecer la hemostasia, se suturaba la herida quirúrgica.

3.2.2. Análisis y post-procesado de las imágenes

Inicialmente, se obtuvieron de cada rata 180 cortes axiales de 1mm de espesor, que abarcaban todo el área toraco-abdominal. Posteriormente, y mediante el *software* de reconstrucción, estas imágenes fueron tratadas para conseguir diferentes proyecciones axiales, coronales y sagitales, con espesores de corte de entre 5 y

10mm. De este modo fue posible el estudio tridimensional del abdomen murino, proceso que globalmente, incluida la fase de preparación y la de análisis de datos, se prolongó en cada animal durante 40 minutos.

3.3. Evaluación morfológica de la patología hepática

Las características de las lesiones neoplásicas hepáticas y fibro-inflamatorias se estudiaron en dos ratas macho de 300 g de peso. En estos dos animales se realizaron los estudios de TCMC a los 21 días de la inoculación tumoral. En ambas ratas se había practicado hepatectomía parcial para estimular el desarrollo tumoral. Los hallazgos de imagen fueron posteriormente cotejados con los de necropsia, según la técnica descrita en los apartados previos.

Como criterios de patología se contemplaron los siguientes:

- Detección de lesiones intra-hepáticas nodulares hipo o hipercaptantes respecto del parénquima adyacente.
- Masas extra-hepáticas con captación de contraste.
- Masas con periferia hipercaptante y con ausencia de realce en el interior.

Los dos primeros criterios definirían las lesiones de tipo neoplásico, mientras que el tercero correspondería a las lesiones de tipo fibro-inflamatorio.

Desarrollo, monitorización y vehiculización del magnetofluido.

En este tercer apartado se expondrá el proceso de elaboración de un fluido con propiedades magnéticas y con potencial capacidad de inducción térmica. Asimismo, se describirán los procedimientos de administración vascular del fluido magnético y los procesos enfocados a verificar su vehiculización en hígados de animales sanos.

1. Desarrollo y monitorización “in vitro” del magnetofluido

Las nanopartículas magnéticas son capaces de generar una transferencia de energía inductora de hipertermia al ser expuestas a un campo magnético externo. A continuación se describe la elaboración de un fluido magnético a base de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro suspendidas en el contraste yodado de base grasa lipiodol®, con hipotética capacidad de inducir una hipertermia en aquellos tejidos en los que sea depositado.

1.1. Nanopartículas magnéticas: obtención y caracterización

En este proyecto se ha trabajado con nanopartículas magnéticas de óxido de hierro Fe_3O_4 , que han sido obtenidas mediante la reducción de precursores inorgánicos u organometálicos, por medio de agentes químicos. En este sentido, la adecuada reducción de sales de hierro mediante un poliol ha permitido la obtención de nanopartículas de Fe_3O_4 con tamaños comprendidos entre 3 y 8 nm, rodeadas de ácido oleico.

La caracterización de las nanopartículas se ha realizado mediante distintas técnicas. El tamaño de las nanopartículas y su dispersión mediante microscopía electrónica de

transmisión, y la caracterización magnética mediante magnetómetros SQUID y espectroscopía Mössbauer (figura 16).

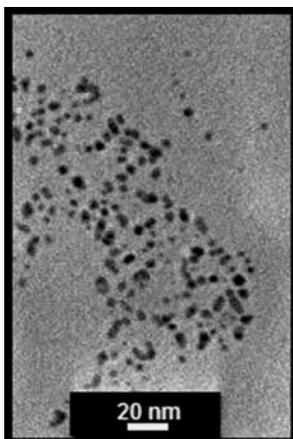


Figura 16. Imagen de nanopartículas magnéticas en microscopía electrónica de transmisión.

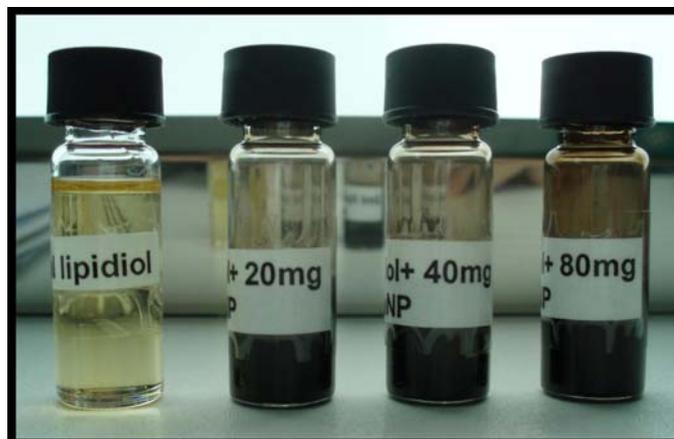


Figura 17. De izquierda a derecha, lipiodol® sólo y con cantidades progresivamente superiores de nanopartículas magnéticas en suspensión. El lipiodol®, amarillo pálido, se torna marrón oscuro cuando se le añaden las nanopartículas.

1.2. Preparación del magnetofluido

El lipiodol® es un aceite yodado, cuyo uso en el ámbito radiológico ha quedado restringido a su aplicación en los procedimientos de embolización trans-arterial de neoplasias hepáticas, dada su tendencia a quedar retenido en la desorganizada neovascularización tumoral. Las nanopartículas magnéticas obtenidas mediante el proceso de síntesis previamente descrito y rodeadas de ácido oleico, resultan aptas para ser suspendidas en este aceite mediante un proceso de ultrasonificación. Teniendo en cuenta las propiedades del lipiodol® y de las nanopartículas de Fe_3O_4 , se obtuvieron varias suspensiones con diferentes concentraciones de nanopartículas, al objeto de determinar la máxima cantidad de metal susceptible de ser vehiculizada por unidad de volumen de contraste. Descripción de las suspensiones (figura 17):

- 20mg de nanopartículas en 6ml de lipiodol®, concentración obtenida: 3,3mg/ml.
- 40mg de nanopartículas en 6ml de lipiodol®, concentración obtenida: 6,6mg/ml.
- 80mg de nanopartículas en 6ml de lipiodol®, concentración obtenida: 13,2mg/ml.

Posteriormente, se tomaron muestras de las diferentes suspensiones para someterlas a pruebas de imagen con RM, y valorar la intensidad de señal de los fluidos al ser expuestos a las distintas secuencias de RM. Dado que la RM es una técnica muy sensible a la presencia de sustancias ferromagnéticas, resultaría interesante determinar la competencia de esta técnica de imagen a la hora de discernir entre fluidos con diferentes concentraciones de nanopartículas metálicas. Los resultados así obtenidos resultarían de utilidad en el diseño y evaluación de los experimentos ulteriores, en los que se aplicarían por vía vascular diferentes suspensiones de nanopartículas metálicas para estudiar su distribución hepática, *in vivo*.

1.3. Monitorización con imagen del magnetofluido

Tres muestras de los fluidos con diferentes concentraciones de nanopartículas y una muestra de lipiodol®, fueron valoradas con diferentes secuencias de RM potenciadas en T1, STIR y EG (tabla 8).

Tabla 8. Parámetros técnicos de las secuencias de RM.

Secuencia	TR (ms)	TE (ms)	Ángulo	Matriz	Espesor de Corte (mm)	TI (ms)
T1	651	24	90°	160x160	2,5	-
STIR	3600	29	150°	169x160	3	130
EG	120	4	20°	150x150	3	-
EG	120	14	20°	150x150	3	-
EG	120	19	20°	150x150	3	-

En esta experiencia se describieron las características de intensidad de señal de las diferentes suspensiones de nanopartículas metálicas, respecto del lipiodol®. Es decir, se valoró si las suspensiones eran hipo, hiper o isointensas respecto al lipiodol®.

2. Vehiculización “in vivo” del magnetofluido

Tras valorar las distintas concentraciones de metal susceptibles de ser solubilizados en el lipiodol®, y una vez caracterizadas por imagen las diferentes suspensiones, se procedió a la práctica de estudios de administración vascular de los magnetofluidos en ratas WAG/RijCrI.

2.1. Estudios de administración por vía intravenosa

En un primer momento se realizaron varios experimentos de infusión intra-vascular a través de abordaje venoso, al mostrar éste una menor complejidad técnica.

2.1.1. Descripción de la técnica de infusión venosa

La práctica de los procedimientos de infusión vascular de los fluidos precisa de una adecuada inducción anestésica. Ésta se consiguió por inoculación de Diazepam (5 mg/kg, i.p.) combinada posteriormente con Ketamina (100 mg/kg, i.p.).

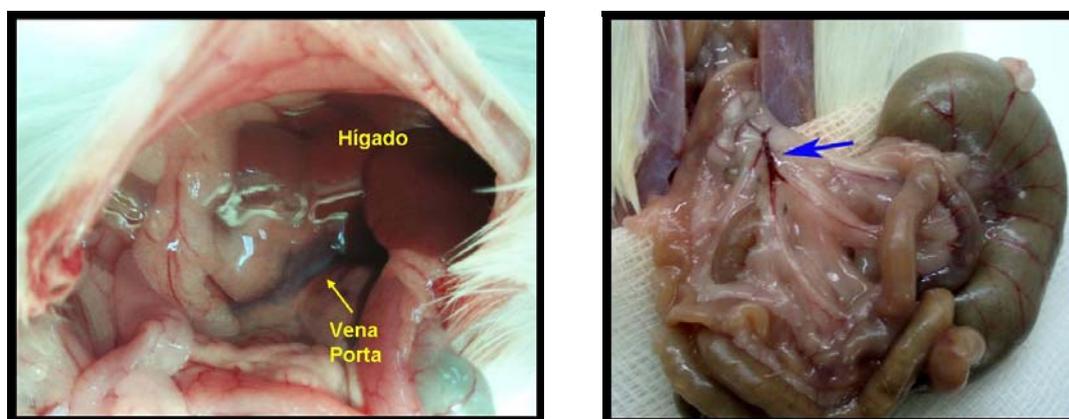


Figura 18. *Tras la laparotomía se identifica la vena Porta en el hilio hepático. Cuando se extraen las asas intestinales, la vena ileo-cólica (flecha azul) se aprecia con nitidez.*

Una vez anestesiado, el animal era inmovilizado en decúbito supino y se le practicaba una laparotomía media sub-xifoidea de 2cm de extensión. Tras extraer el estómago y el ciego, tanto la vena Porta como la vena ileo-cólica quedaban expuestas, y eran

susceptibles de ser puncionadas (figura 18). Posteriormente, usando una aguja de 30G, se procedía a inyectar directamente los diferentes magnetofluidos que habían sido previamente cargados en jeringas de 1ml. Finalizada la inyección se retiraba la aguja, se practicaba hemostasia mediante compresión vigorosa y se suturaba la laparotomía.

2.1.2. Evaluación de la infusión con técnicas de imagen

Al igual que en lo descrito en los apartados dedicados a la monitorización de las suspensiones *in vitro*, y a la caracterización por imagen del modelo experimental tumoral, también se puede obtener una monitorización de la infusión vascular de los fluidos aplicando técnicas de imagen. En este ámbito, y a priori, se estimaron como procedimientos de utilidad práctica la RM y la TCMC. En ambas técnicas de imagen se emplearon las mismas máquinas y, en general, idénticas técnicas de obtención y reconstrucción de imágenes a las descritas en los capítulos anteriores.

En lo referente a la valoración con TCMC, dado que el lipiodol® es un fluido yodado que queda retenido, al menos temporalmente, en los sinusoides hepáticos, no se requirió de administración adicional de otro medio de contraste para visualizar la anatomía hepática. Tras la administración de las suspensiones, se realizaron las exploraciones de TCMC para comprobar la idoneidad del procedimiento de infusión.

Criterios en TCMC, de correcta administración e infusión:

- Hígado con realce homogéneo, hiperdenso, motivado por la presencia de lipiodol® en su árbol vascular.
- Ausencia de extravasaciones de contraste en la zona de punción, caracterizados por acúmulos hiperdensos retroperitoneales.
- Ausencia de depósitos intravenosos groseros de contraste.

Respecto a la RM, la presencia de sustancias paramagnéticas en el parénquima hepático induciría una disminución de la intensidad de señal procedente del hígado. Este hallazgo se debería hacer especialmente patente en las secuencias potenciadas en EG. Criterios en RM de correcta difusión de los fluidos al hígado:

- Homogénea disminución de la intensidad de señal del parénquima hepático en secuencias EG.
- Incremento de la hipointensidad hepática en secuencias EG con TE más prolongado.
- Aumento de la hipointensidad hepática al incrementar la concentración de nanopartículas metálicas suspendidas en lipiodol®.
- Ausencia de extravasaciones de magnetofluído hacia retroperitoneo, caracterizadas por la aparición focos de vacío de señal y severos artefactos de susceptibilidad magnética por presencia de altas concentraciones de metal.

En los experimentos de RM se usaron idénticas secuencias a las descritas en la tabla 8, del apartado 1.3. La descripción de la intensidad de señal hepática se hizo en comparación con la señal de la masa muscular. Ésta era, en general, bien apreciada en las porciones proximales de las extremidades inferiores. En este contexto, la denominación hígado hipointenso, traduciría un hígado con intensidad de señal menor al músculo, hígado hiperintenso supondría que la víscera mostraba una señal superior al músculo, y el término hígado isointenso, haría referencia a la situación en la que el hígado y el músculo mostrasen una intensidad de señal similar.

2.1.3. Experimentos de infusión hepática de fluidos por vía venosa

Al objeto de estudiar la viabilidad de la administración vascular de los fluidos magnéticos, así como de evaluar la eficacia de las técnicas de imagen en la monitorización de los procedimientos de infusión, se realizaron cuatro grupos de experimentos.

Todos los procesos se realizaron en ratas hembra de 170-190g. Descripción:

- Experimento NanoMag-Portal 1, n=3. Infusión a través de vena Porta de entre 0,15 y 0,3 ml de una suspensión de nanopartículas con concentración de metal de 10mg/ ml de lipiodol®. A las 24 horas los animales fueron sacrificados y se les practicó TCMC (tabla 9).

Tabla 9. Características del experimento NanoMag-Portal 1. *np*: nanopartículas.

Magnetofluido				TCMC	RM
Concentración mg np/ ml lipiodol®	Dosis de np (mg)	Dosis lipiodol® absoluta (ml)	Dosis lipiodol® relativa (ml/kg)		
10 mg/ ml	1,5-3 mg	0,15-0,3 ml	0,8-1,6 ml/kg	SI	NO

- Experimento NanoMag-Portal 2, n=5. En tres animales se procedió a infundir a través de vena Porta, 0,3 ml de diferentes suspensiones de nanopartículas con concentraciones de hierro de 3,3mg/ml, 6,6mg/ml y 13,3mg/ml. Un animal no recibió infusión, y a otro se le administraron 0,3 ml de lipiodol® solo. Ambos serían usados como controles en los estudios de imagen. A las 72 horas, y con los animales sedados, se practicaron estudios de TCMC y RM (tabla 10). En la RM se realizaron secuencias T1, EG y STIR.

Tabla 10. Características del experimento NanoMag-Portal 2. *np*: nanopartículas.

Magnetofluido				TCMC	RM
Concentración mg np/ ml lipiodol®	Dosis de np (mg)	Dosis lipiodol® absoluta (ml)	Dosis lipiodol® relativa (ml/kg)		
3,3-13,2 mg/ ml	1- 4 mg	0,3 ml	1,6 ml/kg	SI	SI

- Experimento NanoMag-Portal 3, n=4. A dos ratas se les infundió 0,3ml de una suspensión con 20mg de nanopartículas de hierro por ml de lipiodol®. Un animal no recibió suspensión, y al cuarto se le administró lipiodol® solo. La inyección se realizó por punción portal directa. En las 24 primeras horas tras la infusión se les realizó TCMC y RM (tabla 11).

Tabla 11. Características del experimento NanoMag-Portal 3. *np*: nanopartículas.

Magnetofluido				TCMC	RM
Concentración mg np/ ml lipiodol®	Dosis de np (mg)	Dosis lipiodol® absoluta (ml)	Dosis lipiodol® relativa (ml/kg)		
20 mg/ ml	6 mg	0,3 ml	1,6 ml/kg	SI	SI

- Experimento NanoMag-Portal 4, n=4. A través de vena ileo-cólica, los animales recibieron 0,2ml de suspensión de nanopartículas a concentración 20mg/ml (tabla 12). En este experimento se valoró el tiempo de permanencia del lipiodol® en el árbol vascular hepático, realizándose exploraciones de TCMC a las 24 horas de la infusión y a los 12 y 33 días. También se estudiaron los posibles efectos embolizantes del magnetofluido en el parenquima hepático. Así, tras la realización de la última TCMC, los hígados fueron extraídos y

fijados en formol. Posteriormente se tomaron muestras hepáticas que fueron teñidas con hematoxilina-eosina y evaluadas bajo microscopía óptica.

Tabla 12. Características del experimento NanoMag-Portal 4. *np*: nanopartículas.

Magnetofluido				TCMC	RM
Concentración mg np/ ml lipiodol®	Dosis de np (mg)	Dosis lipiodol® absoluta (ml)	Dosis lipiodol® relativa (ml/kg)		
20 mg/ ml	4 mg	0,2 ml	1 ml/kg	SI	NO

2.2. Evaluación de infusión mediante imagen y espectrometría

La determinación de la correcta infusión de las nanopartículas magnéticas de hierro, además de con técnicas cualitativas de imagen, puede también realizarse con pruebas cuantitativas de laboratorio tales como la espectrometría. En este ámbito, en el experimento NanoMag-Espectro se evaluó la presencia de hierro administrado como nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 , en tejido hepático sano. Para ello, se tomaron muestras de hígados procedentes de ratas que habían recibido una infusión de magnetofluido a base de nanopartículas y lipodol, a través de la vena ileo-cólica. El proceso de administración del fluido fue idéntico al descrito en el apartado en el que se detalla la técnica de infusión venosa, y el experimento se monitorizó con RM.

2.2.1. Descripción de la técnica de análisis con espectrometría

El análisis elemental de hierro se realizó mediante ICP-MS (*inductively coupled plasma-mass spectrometry*) en un aparato Elan 9000, de Perkin-Elmer Sciex. Previamente, las muestras analizadas fueron sometidas a un proceso de digestión con ácido nítrico concentrado, en un horno microondas Multiwave 3000, de Anton Paar. La cuantificación de los analitos se realizó mediante calibración externa, y todo el proceso

de análisis se encontraba adecuadamente validado mediante el uso de materiales de referencia de laboratorio y de otros certificados.

Las muestras estaban constituidas por 0,7-1,1g de tejido hepático, y el proceso de espectrometría permitió determinar la concentración de hierro en microgramos por gramo de tejido.

En condiciones normales existe una cierta cantidad de hierro hepático intrínseco, ubicado principalmente en los hepatocitos y en la hemoglobina de la sangre, detectable con espectrometría e indistinguible del hierro exógeno. Por esta causa fue preciso tomar también muestras de un grupo de ratas de control, con objeto de cuantificar estas concentraciones basales de metal. Los valores medios de concentración de hierro así obtenidos serían posteriormente sustraídos de los valores determinados en las muestras de los animales infundidos con los fluidos. De este modo se conseguiría estimar de forma aproximada, la cantidad de hierro atribuible a administración exógena.

2.2.2. Experimentos de infusión venosa, monitorización con RM y espectrometría

El experimento NanoMag-Espectro se practicó en 12 ratas macho, sanas, de 280-300g. Los animales se dividieron en tres grupos, un grupo control y dos grupos a los que se les administraron diferentes cantidades de magnetofluido. En todos los animales, y de forma previa a realizar los análisis de laboratorio, se practicaron secuencias de RM, T1 y EG, para valorar las características de la señal hepática y verificar la correcta infusión. En los procedimientos de inyección vascular de los fluidos y en los de imagen, los animales se anestesiaron por inoculación de Diazepam (5 mg/kg, i.p.) combinada posteriormente con Ketamina (100 mg/kg, i.p.). Tras la RM fueron sacrificados mediante luxación cervical. Posteriormente se realizó la extracción hepática, el pesaje de la víscera y la toma de muestras para análisis de

espectrometría. Todos los especímenes, una vez identificados, se congelaron en seco a -20°C hasta su procesamiento. Descripción de los diferentes grupos (tabla 13):

- NanoMag-Espectro 0, grupo de control, $n=4$. Ratas no infundidas. Se les realizó RM, extracción hepática, pesaje, y toma de muestras para espectrometría.
- NanoMag-Espectro 1, $n=4$. Ratas infundidas con 0,25ml de fluido magnético constituido por lipiodol® y nanopartículas, suspensión: 12mg/ml. A las 24 horas de la inyección se les realizó RM, extracción hepática, pesaje y toma de muestras.
- NanoMag-Espectro 2, $n=4$. Ratas infundidas con 0,35ml de fluido magnético constituido por lipiodol® y nanopartículas, suspensión: 12mg/ml. A las 24 horas se les practicó RM, hepatectomía, pesaje y toma de muestras para espectrometría.

Tabla 13. Experimentos NanoMag-Espectro. *np*: nanopartículas. *Esp*: espectrometría

Magnetofluido: 12mg de np Fe_3O_4 / ml lipiodol®				RM	Esp
Identificación	Dosis de np (mg)	Dosis lipiodol® absoluta (ml)	Dosis lipiodol® relativa (ml/kg)		
NanoMag-Espectro 0	-	-	-	SI	SI
NanoMag-Espectro 1	3 mg	0,25 ml	0,8 ml/ kg	SI	SI
NanoMag-Espectro 2	4,2 mg	0,35 ml	1,2 ml/ kg	SI	SI

En todos los experimentos se estimó la cantidad total de hierro hepático en base al producto obtenido de multiplicar el peso de la víscera y la concentración de metal determinado en la espectrometría.

2.3. Estudios de administración por vía intra-arterial

Tras determinar las suspensiones más susceptibles de ser administradas con mayor seguridad por vía vascular, se procedió a desarrollar la técnica de administración por vía arterial, a través de tronco celiaco.

2.3.1. Descripción de la técnica de infusión arterial

El procedimiento de infusión de los fluidos magnéticos requirió de la adecuada inducción anestésica, la cual fue mediada por la administración de Diazepam (5 mg/kg, i.p.) combinada posteriormente con Ketamina (100 mg/kg, i.p.). Inicialmente se practicaba una laparotomía media sub-xifoidea de 3cm de longitud, que permitía exponer los vasos arteriales viscerales tras la retracción del hígado y del estómago. Mediante el uso de un microscopio binocular quirúrgico (Leika M651) y tras identificar el tronco celiaco, se ligaban con grapas quirúrgicas removibles sus ramas principales excepto la arterial hepática, en un intento de derivar hacia la misma la mayor parte del flujo vascular celiaco (figura 19).

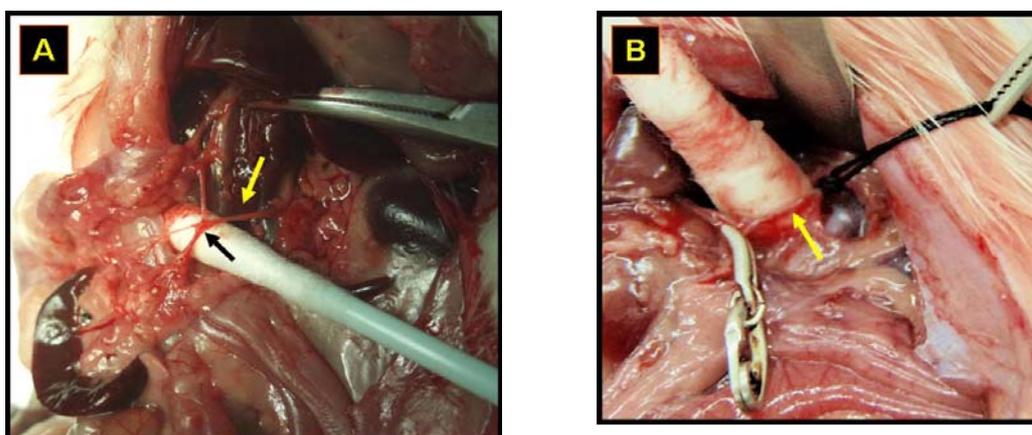


Figura 19. Exposición de tronco celiaco y sus ramas principales.

A. Se indica el área de abordaje arterial (flecha amarilla) y el lugar donde debe ubicarse la ligadura reversible (flecha negra) para forzar el flujo hacia la arteria hepática. B. Una vez ligados los vasos, se procede a realizar la punción del tronco celiaco en el punto indicado (flecha amarilla).

Posteriormente se realizaba punción directa del tronco celiaco mediante una aguja de 30G, la cual se encontraba conectada a un catéter prolongador y a una bomba de infusión pre-cargada con los fluidos magnéticos. Una vez aplicado todo el dispositivo se procedía a la infusión lenta (3 minutos) y selectiva de las suspensiones. A continuación todo el sistema era retirado, se practicaba ligadura reversible de la arteria celiaca y compresión vigorosa para hemostasia. Finalmente, tras eliminar los sistemas de oclusión vascular, se suturaba la laparotomía.

2.3.2. Experimentos de infusión intra-arterial y monitorización con imagen

En un primer momento se evaluó la viabilidad de la infusión por inyección directa del tronco celiaco, experimento NanoMag-Arterial 1. Para ello se procedió a administrar a un grupo de 10 ratas macho sanas, de 294-345g, diferentes cantidades de lipiodol®. Las dosis de lipiodol® oscilaron entre 0,57ml/kg y 0,94ml/kg. En estos animales se ensayó la técnica quirúrgica y se controló además la tolerancia al lipiodol® intra-arterial. En aquellas situaciones en las que se produjo la muerte del animal en las primeras tres horas tras la administración intra-arterial del lipiodol®, se procedió a la extracción del hígado y a su conservación en formol para posteriormente estudiarse mediante TCMC.

En el experimento NanoMag-Arterial 2, se evaluó posteriormente, la correcta difusión del lipiodol® por el parénquima hepático y la idoneidad del procedimiento de infusión. En cinco ratas macho de 306-324g, se procedió a la administración intra-arterial de lipiodol® a dosis de entre 0,49ml/kg y 0,94 ml/kg, y a la práctica de TCMC en las primeras 12 horas tras la inyección. En estos animales, al igual que en el apartado referido a la evaluación con técnicas de imagen de la infusión por vía venosa, la observación en la TCMC de un hígado hiperdenso, así como la ausencia de

extravasaciones en la zona de punción o de depósitos intra-vasculares groseros, se consideraron signos fidedignos de correcta administración del lipiodol®.

En estos experimentos se administró lipiodol® sólo, puesto que los aspectos relativos a la suspensión y administración vascular de fluidos con diferentes concentraciones de nanopartículas, su difusión en parénquima hepático, evaluación con espectrometría y comportamiento en imagen de RM, habían sido extensamente estudiados en el apartado de infusión por vía venosa.

Administración intra-arterial del magnetofluido en el modelo experimental de metástasis hepáticas múltiples

En este capítulo se expondrá el proceso de administración de un fluido magnético por vía de arteria hepática en el modelo experimental murino, y se describirán los estudios enfocados a determinar las características de su distribución, tanto en tejido hepático como en tejido neoplásico.

1. Proceso de inducción tumoral

El estudio experimental se desarrolló en ratas macho WAG/RijCrl de 298-336g. El día cero del experimento, los animales fueron inoculados con células singénicas de adenocarcinoma de colon (línea celular: CC-531), para que desarrollasen patología metastásica hepática. Como fuente de diseminación tumoral se aplicó la técnica de inyección esplénica directa de 250.000 células tumorales vehiculizadas en 0,5ml de solución de Hank. La inoculación celular se realizó usando una aguja de 25G.

A los diez días de la siembra tumoral, se practicaba hepatectomía parcial como estímulo al desarrollo de la patología metastásica.

2. Anestesia

En el proceso de inoculación tumoral, los animales se mantuvieron bajo anestesia inhalada inducida por Halotano. En los procedimientos de infusión de los fluidos magnéticos y para la práctica de las posteriores pruebas de imagen, se utilizó anestesia intra-peritoneal a base de una inyección de Diazepam (5 mg/kg) combinada posteriormente a los diez minutos con Ketamina (100 mg/kg).

3. Preparación del magnetofluido

Se obtuvieron suspensiones con una concentración de 10mg de nanopartículas de óxido de hierro por ml de lipiodol®, a partir de las cuales se prepararon inyectables individualizados con 0,15ml de lipiodol® y 1,5mg de nanopartículas magnéticas. Para reducir el riesgo de muerte atribuible a la administración del lipiodol®, la dosis máxima fue de 0,5ml/kg.

4. Experimento preliminar: vascularización de las metástasis

Aunque la irrigación arterial de las metástasis hepáticas ya ha sido descrita, para comprobar este extremo en nuestro modelo experimental se practicó un sucinto experimento. A un grupo de cuatro ratas macho en las que se habían inducido metástasis hepáticas, se les administró lipiodol® por vía vascular y se estudió la distribución hepática del contraste mediante TCMC.

Descripción del experimento:

A los 50 días de diseminación tumoral dos animales fueron infundidos con 0,2ml de lipiodol® por vía de la vena ileo-cólica, y otros dos recibieron el contraste por la arteria celiaca. Estos procedimientos se practicaron según las técnicas descritas en el apartado previo.

En las siguientes 12 horas tras la administración del contraste, las ratas fueron exploradas con TCMC. En esta prueba de imagen se estudió la distribución del lipiodol® por el parénquima hepático y también su acumulación o no, en el tejido neoplásico.

Posteriormente, los animales fueron sacrificados para cotejar los hallazgos de imagen con los de necropsia.

5. Administración intra-arterial en el modelo experimental

5.1. Procedimiento de infusión

El procedimiento de infusión de los fluidos magnéticos en los animales, requirió de una laparotomía media que permitía exponer los vasos arteriales viscerales tras la retracción del hígado y del estómago. Mediante el uso de un microscopio binocular quirúrgico (Leika M651) y tras identificar el tronco celiaco, se ligaban con grapas quirúrgicas removibles sus ramas principales excepto la arterial hepática, en un intento de derivar hacia la misma la mayor parte del flujo vascular celiaco. Posteriormente se realizaba punción directa del tronco celiaco mediante una aguja de 30G, la cual se encontraba conectada a un catéter prolongador y a una bomba de infusión pre-cargada con los fluidos magnéticos. Una vez aplicado todo el dispositivo se procedía a la infusión lenta (3 minutos) y selectiva de las suspensiones. A continuación todo el sistema era retirado, se practicaba ligadura reversible de la arteria celiaca y compresión vigorosa para hemostasia. Finalmente, tras eliminar los sistemas de oclusión vascular, se suturaba la laparotomía.

El proceso de administración de los magnetofluidos se realizó en dos series de experimentos. En un primer experimento constituido por 13 animales, grupo de infusión precoz (GIP), el proceso se desarrolló a los 24 días de la inoculación tumoral. En un segundo experimento practicado en 10 animales, grupo de infusión tardía (GIT), el proceso tuvo lugar a los 33 días de la inoculación tumoral.

Tanto del experimento GIP como del GIT, se obtuvieron muestras de tejido hepático y de tejido metastático, procedentes de cinco animales. El remanente de ratas de ambos experimentos que habiendo desarrollado metástasis y sobrevivido a los procesos quirúrgicos no recibieron magnetofluido, constituyeron el grupo control.

5.2. Técnicas de imagen

En las primeras 12 horas tras la administración de las suspensiones, los animales se sometieron a TCMC para comprobar la idoneidad del procedimiento de infusión, y a RM para evaluar la presencia de sustancias paramagnéticas en tejido hepático y tumoral. Los estudios se practicaron en los mismos equipos y aplicando idénticos protocolos de exploración a los descritos en apartados previos. En RM se practicaron secuencias T1 (TR: 651ms/ TE: 24ms), STIR (3600/ 29, TI: 130) y EG (120/4 y 120/ 14).

Como criterios de adecuada infusión se consideraron los previamente definidos:

- En **TCMC**, la observación de un hígado hiperdenso motivado por la presencia de lipiodol® en su árbol arterial, así como la ausencia de extravasaciones en la zona de punción o de depósitos intra-arteriales groseros de contraste, se consideraron signos fidedignos de correcta administración de las suspensiones.
- En **RM**, la homogénea caída de la señal hepática en secuencias EG y la ausencia de focos de vacío de señal en retroperitoneo, se interpretaron como signos de adecuada difusión en parénquima hepático.

5.3. Valoración de la inducción neoplásica

Tras los estudios de imagen, tanto las ratas inyectadas como las de control fueron sacrificadas mediante anestesia profunda y luxación cervical. Los hígados fueron extraídos y se realizó análisis visual para determinar el número y tamaño de las metástasis. En función del tamaño, los implantes tumorales se agruparon en: <3mm, 3-7mm y >7mm. Cuando la infiltración neoplásica fue tan extensa que hizo imposible

la cuantificación y determinación del tamaño y número de los implantes individuales, se usó el término hígado tumoral.

5.4. Determinación del hierro tisular mediante espectrometría

Seguidamente, de cada uno de los hígados extirpados se procedió a la toma de muestras de tejido hepático y neoplásico para determinar las concentraciones de hierro.

Cada muestra de tejido hepático fue debidamente pesada e identificada y, en general, estaba constituida por varios cubos de tejido procedente de diferentes localizaciones de la misma víscera.

Por otro lado, también cada una de las muestras de tejido metastático fue adecuadamente pesado e identificado y se componía de material procedente de una o varias lesiones neoplásicas. De las muestras tumorales fue eliminado cuidadosamente cualquier resto de tejido hepático sano, y se intentó obtener material constituido por lesiones metastáticas globalmente enucleadas. De hígados con infiltración neoplásica muy profusa fue posible obtener varias muestras de tejido tumoral.

Todos los especímenes fueron congelados en seco a -20°C hasta su procesado. Para la cuantificación del metal, las muestras se sometieron a un proceso de digestión ácida y las soluciones resultantes se analizaron mediante espectrometría (ICP-MS). En este proceso fueron determinadas las concentraciones medias de hierro en microgramos por gramo de tejido.

Al igual que en los experimentos descritos en el apartado previo, también en los presentes era de interés averiguar las concentraciones de hierro intrínseco, sobre todo el presente en las masas tumorales. Con este fin, determinar las concentraciones de hierro endógeno en tejido hepático y tumoral, fueron obtenidas las muestras de las

ratas de control. Los valores medios de concentración basal de hierro así obtenidos, serían posteriormente sustraídos de los valores determinados en las muestras de los animales infundidos con los fluidos, y permitirían estimar la cantidad de hierro atribuible a administración exógena, tanto en el tejido hepático sano, como en el metastático.

Método Estadístico

1. Estadística descriptiva

Las variables cualitativas se han descrito mediante frecuencias y diagramas de barras. En el caso de las variables cuantitativas, cuando los resultados se ajustaron a una distribución normal se utilizó la media y desviación estándar (DE); en los demás casos, mediante medidas de la mediana y el rango. Para la representación se han usado diagramas de cajas.

2. Análisis multivariante

Cuando las variables han superado el test de normalidad, en el análisis estadístico se utilizaron pruebas paramétricas (ANOVA). Para diferenciar entre pares se usó el test de Newman Keuls.

Cuando el tamaño de la muestra ha hecho muy improbable que las variables sigan una distribución normal y/o sus varianzas sean homogéneas, el análisis estadístico de los resultados se ha realizado mediante pruebas no paramétricas (Test de Wilcoxon para variables relacionadas). Una vez demostradas diferencias significativas entre los grupos mediante Kruskal-Wallis, las comparaciones entre los posibles pares de grupos fueron efectuadas a posteriori mediante U de Mann-Whitney.

El nivel mínimo de significación aceptado fue de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Monitorización del modelo experimental mediante técnicas de imagen

Tal y como se explica en el apartado de Material y Métodos, hemos estudiado el proceso de desarrollo de metástasis hepáticas de carcinoma de colon mediante diferentes técnicas de diagnóstico por imagen, a fin de contar con un método no invasivo de estadificación tumoral, útil en ámbito experimental, y como paso previo a la administración intra-arterial de un fluido magnético con fines terapéuticos.

En los siguientes apartados son presentados los resultados obtenidos con cada una de las técnicas ensayadas: Ecografía (US), Resonancia Magnética (RM), y Tomografía Computada Multi Corte (TCMC).

Una vez completado este capítulo, nos ocuparemos de los resultados relativos a los otros objetivos de nuestra tesis: la vehiculización de los magnetofluidos al tejido hepático y tumoral y la valoración del rendimiento/eficacia de dicha vehiculización.

1. Resultados relativos a la Ecografía

1.1. Estudios ecográficos anatómicos

En los procedimientos practicados para describir la anatomía hepática normal, las imágenes más optimizadas se consiguieron ajustando las ganancias a parámetros de sistema músculo-esquelético humano, y sin aplicar armónicos. Se realizaron barridos sagitales, axiales y oblicuos que permitieron analizar la totalidad de la víscera y de las estructuras de vecindad (figura 20).

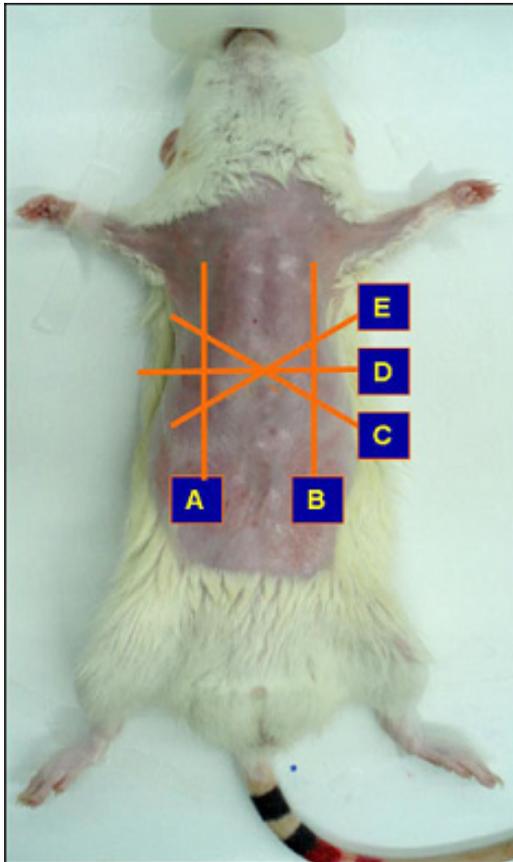


Figura 20. Ejemplar de rata WAG/RijCrl sedado e inmobilizado en posición supino. Región toraco-abdominal depilada. Las líneas naranjas se corresponden con los planos anatómicos de barrido ecográfico mostrados en las figuras 20A-20E.

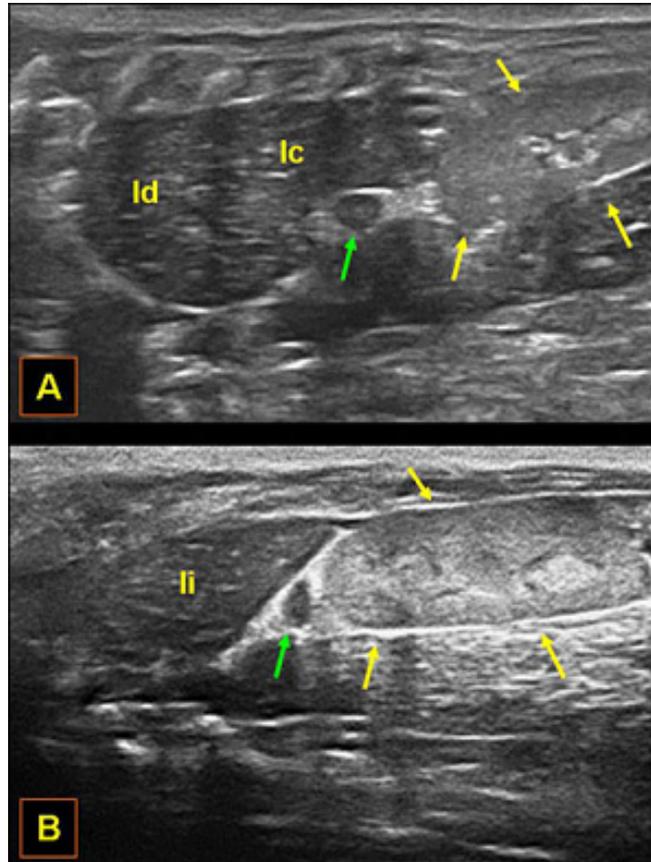


Figura 20A. Barrido sagital lateral derecho.

Se identifican los lóbulos hepáticos derecho (*ld*), y caudado (*lc*), la glándula adrenal derecha (flecha verde) y el riñón (flechas amarillas).

Figura 20B. Barrido sagital izquierdo.

Lóbulo hepático izquierdo (*li*), adrenal (flecha verde) y riñón (flechas amarillas) izquierdos.

El hígado se mostró como un órgano de ecogenicidad intermedia, ecoestructura fina y homogénea, superficie de contornos lisos, y bordes bien definidos y angulados. La característica segmentación hepática no fue evidente salvo en los animales de mayor peso, que presentaban abundantes acúmulos grasos hiperecoicos entre las superficies de los lóbulos adyacentes. El área que mayor dificultad entrañaba en evaluación con US fue la vertiente izquierda del lóbulo caudado, el proceso papilar, que con frecuencia se encontraba oscurecido por abundante gas intra-gástrico.

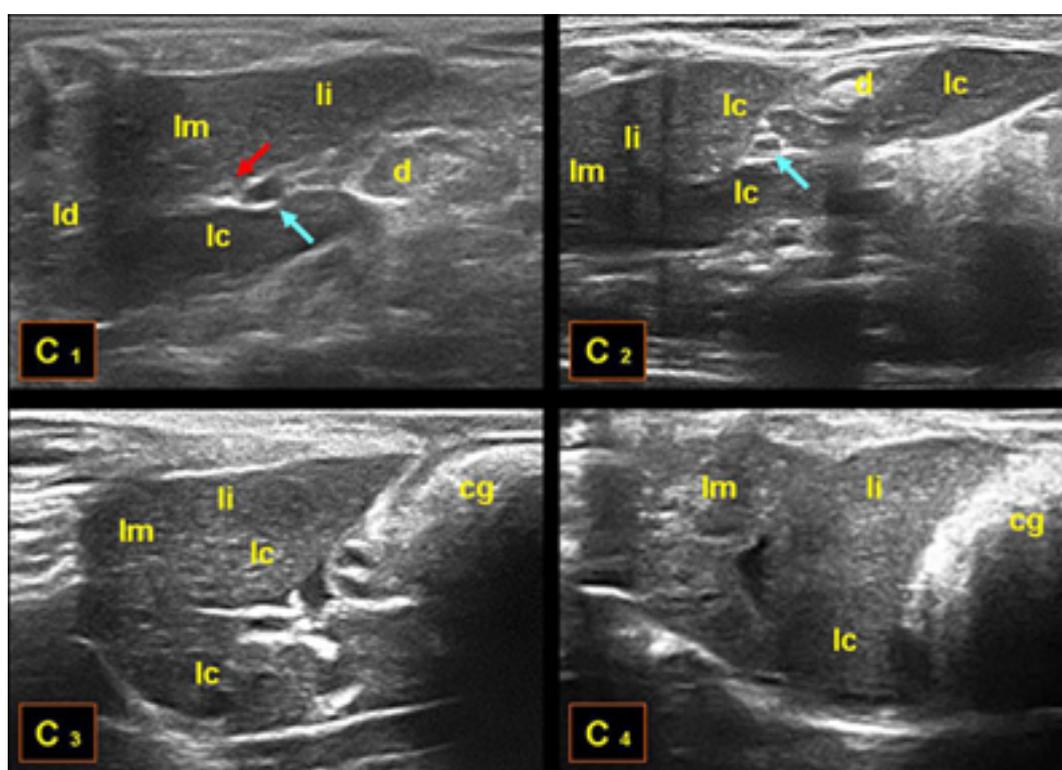


Figura 20C(1-4). Barridos con diferentes grados de oblicuidad.

Lóbulo hepático derecho (ld), izquierdo (li), medial (lm) y diferentes segmentos del lóbulo caudado (lc). Hilio vascular en C₁ y C₂, arteria hepática (flecha roja) y vena Porta (flecha azul), duodeno (d). Cámara gástrica (cg), en C₃ y C₄, con gran sombra acústica posterior motivada por presencia de abundante contenido gaseoso.

El hilio vascular, y las vísceras abdominales fueron identificadas con facilidad. La vena Porta se visualizó en secciones para-sagitales oblicuas, entre el lóbulo izquierdo y el caudado. Aunque con análisis US-Dópler espectral se detectó flujo de tipo arterial en el hilio hepático, la identificación con imagen bidimensional de la arteria hepática, dado

su pequeño tamaño, resultó dificultosa. La vena Cava inferior se observó en el seno del lóbulo caudado y con localización posterior a la vena Porta.

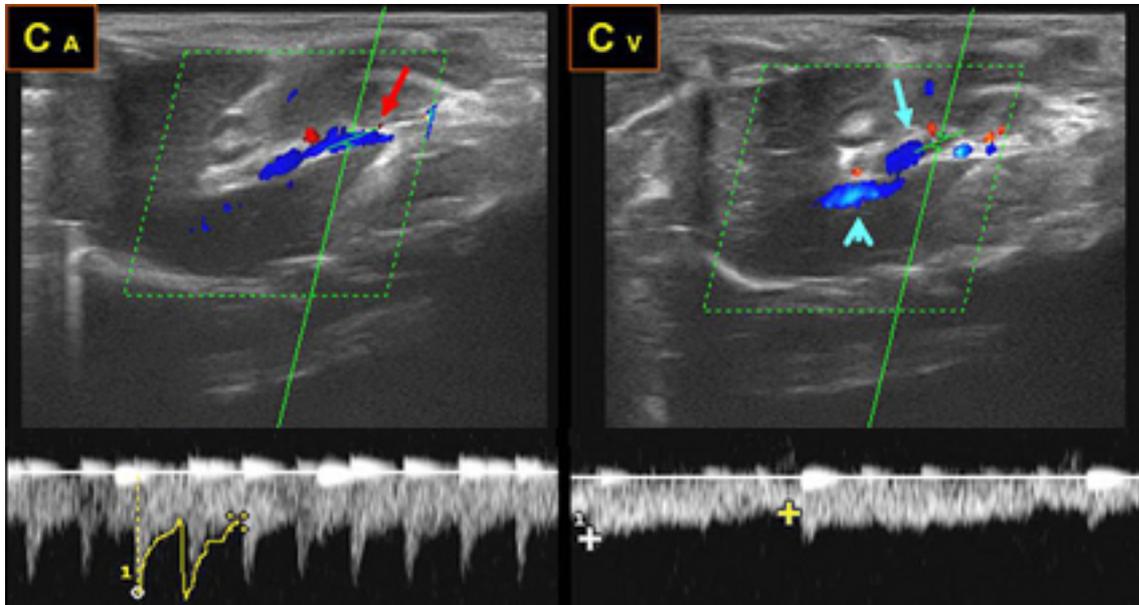


Figura 20C(A,V). Barridos oblicuos del hilio hepático: Tríplex Dópler.

CA: Arteria hepática (flecha roja), onda espectral con pronunciados picos sistólicos. *Cv:* Vena Porta (flecha azul), onda espectral con pequeñas variaciones motivadas por cambios en la presión intra-abdominal secundarios a movimientos ventilatorios. Vena Cava inferior (punta de flecha azul).

En barridos oblicuos izquierdos fue posible identificar el bazo, víscera elongada y de ecoestructura homogénea similar a la hepática. En los barridos sagitales de ambos flancos fueron visualizables ambos riñones y las glándulas adrenales.

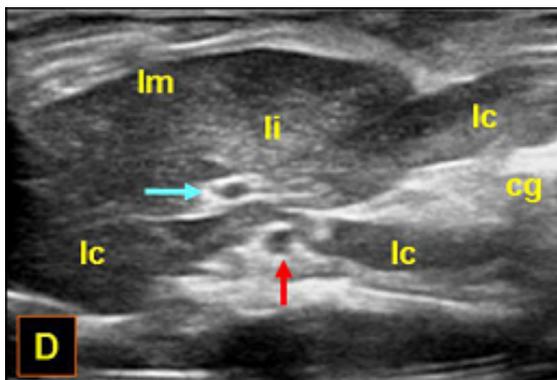


Figura 20D. Barrido axial.

Lóbulo medial (lm), izquierdo (li) y diferentes segmentos del caudado (lc). Porta (flecha azul), y Aorta (flecha roja). Cámara gástrica (cg).

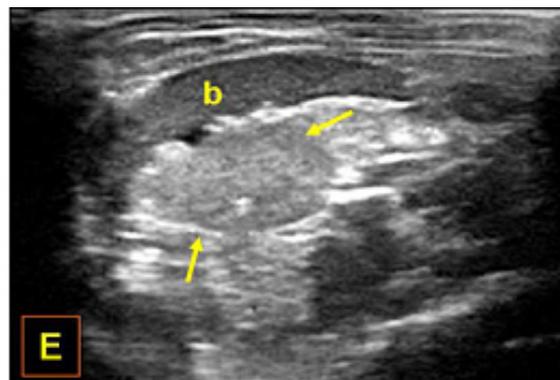


Figura 20E. Barrido oblicuo del flanco izquierdo.

Bazo (b) y riñón izquierdo (flechas amarillas).

1.2. Estudios ecográficos morfológicos de la patología

1.2.1. Masas Inflamatorias

En el grupo de seis ratas **ECO-3**, en el que se realizó US para definir las características de las masas inflamatorias secundarias a la hepatectomía, se observaron lesiones en lecho quirúrgico en cinco animales. Las imágenes se obtuvieron a los 11 días de la cirugía, el tamaño de las lesiones osciló entre 6 y 14mm, y se trató de masas redondeadas con paredes gruesas y bien definidas. El contenido era heterogéneo, y en ocasiones se apreciaron focos muy ecogénicos que sugerían la presencia de burbujas gaseosas. En general, todas las lesiones mostraban un foco central hiperecoico que en el análisis patológico se comprobó que se correspondía con el punto de ligadura quirúrgica (figura 21).

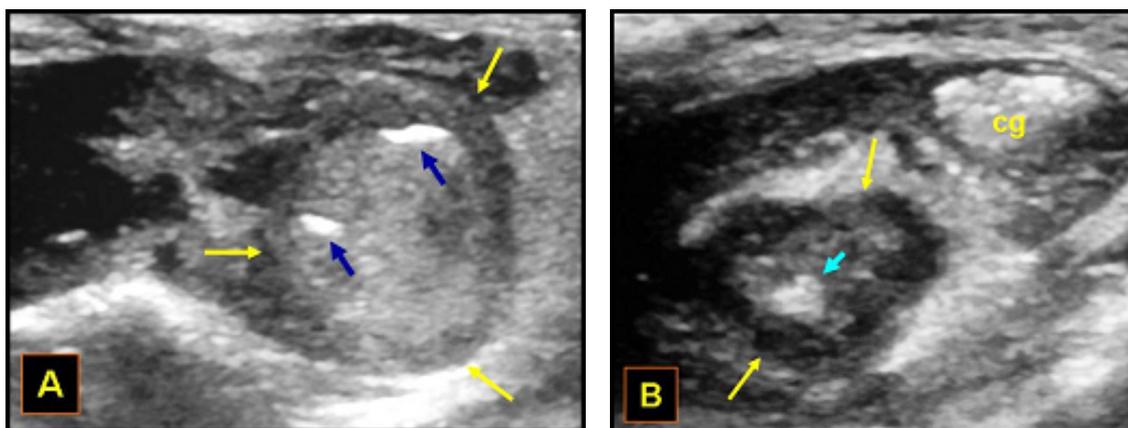


Figura 21. Masas fibro-inflamatorias.

A. Gran masa dependiente del lóbulo medial (flechas amarillas), de paredes gruesas y con contenido heterogéneo y presencia de gas (flechas azules).

B. Lesión dependiente del lóbulo lateral izquierdo (flechas amarillas). Masa heterogénea de paredes gruesas. Foco muy ecogénico traduciendo la sutura quirúrgica (flecha azul). Cámara gástrica (cg).

En el grupo de nueve ratas **ECO-4**, a los 10 días de la cirugía se encontraron masas inflamatorias en seis animales, y a los 17 días en las nueve ratas. En la primera serie de US, el tamaño medio de las lesiones encontradas fue de 9,7mm, rango: 6,8-13,3mm; mientras que en la segunda serie fue de 8,3mm, rango: 5,8-11mm. En los

dos controles US realizados en el grupo **ECO-5** se encontraron masas inflamatorias en ocho de los nueve animales. En la serie realizada a los 20 días de la hepatectomía el tamaño medio de las lesiones inflamatorias fue 6,6mm, rango: 5-8,7mm. En la segunda serie a los 26 días, se identificó una lesión de 6,8mm en un animal y en siete ratas se apreciaron lesiones de tipo cicatricial, pequeñas masas refringentes inferiores a 5mm y con sombra acústica posterior (figura 22). En los estudios de necropsia realizados en los tres grupos de ratas se encontraron lesiones inflamatorias en todos los animales.

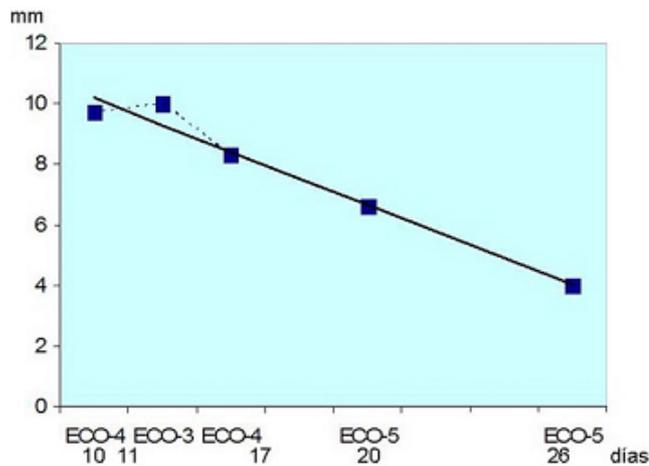


Figura 22. Evolución volumétrica de las masas inflamatorias.

Se observa progresiva disminución de los tamaños medios de las masas, determinados en las diferentes series ecográficas.

1.2.2. Masas Neoplásicas

En el ámbito de la evaluación de las lesiones neoplásicas, en el grupo de US realizadas a **ECO-6** en la 4ª semana de inoculación, no se detectó patología intra-hepática. Únicamente en un animal se apreció una masa extra-hepática sugestiva de implante tumoral en omento. En el posterior estudio de necropsia, se encontraron lesiones metastáticas en dos animales, y se corroboró la presencia de los implantes omentales sugeridos en US. Por otro lado, en las US realizadas en la 5ª semana tras la siembra tumoral, en dos animales se observaron megalias en los lóbulos lateral

izquierdo y caudado que fueron interpretadas como infiltraciones tumorales de los mismos. En la necropsia se comprobó en uno de los animales una importante afectación tumoral del lóbulo lateral izquierdo, mientras que en el otro se observó una infiltración hepática masiva o hígado tumoral (tabla 14).

Tabla 14. Experimento ECO-6 en ratas sin hepatectomía parcial y con sonda de 10 Mhz. Comparativa entre los hallazgos en US y Necropsia.

IDENTIFICACIÓN Experimento/rata (semanas pot-inoc)		ECOGRAFÍA Nº/ Tamaño mm/ Localiz./ Caract. <3/ 3-7/ >3		NECROPSIA Nº/ Tamaño mm/ Localiz. <3/ 3-7/ >3		
ECO-6	1r (4)	0		3	<3	LC
	2a (4)	0	mext	10	3-7	LC+LI+ME
	3v (4)	0		0		
	4n (4)	0		0		
	1n (5)	0		0		
	2n (5)	LI Tumoral	ml	5	>7	LI
	3n (5)	LC Tumoral	ml			Hígado Tumoral
	4n (5)	0		0		

Características ecográficas de desarrollo tumoral. Festoneado de contorno: "f". Megalias de lóbulos: "ml". Nódulos intra-hepáticos: "n". Masas extra-hepáticas: "mext".

"Tumoral": infiltración neoplásica extensa, metástasis confluentes no individualizables. **Localización hepática de las metástasis.** LC: Lóbulo caudado. LD: Lóbulo lateral derecho. LI: Lóbulo lateral izquierdo. LM: Lóbulo medial. ME: implantes tumorales de localización extra-hepática identificados en necropsia.

En las US practicadas en **ECO-7** se encontraron lesiones sugestivas de infiltraciones tumorales en lóbulo caudado en dos ratas, y en un tercer animal se apreciaron dos nódulos intra-hepáticos también en caudado, que sugerían metástasis en el rango 3-7mm. En los estudios de necropsia se corroboraron los hallazgos indicados en US pero se comprobó que las afectaciones neoplásicas eran más extensas. Además se encontró infiltración tumoral no advertida, en lóbulos caudado y derecho de una cuarta rata (tabla 15).

En **ECO-8** se apreciaron signos ecográficos de afectación tumoral en tres ratas. En dos animales se observó festoneado de contornos y en un tercero megalias lobulares. En la necropsia se confirmaron los hallazgos de US, aunque con mayor extensión, y además se revelaron lesiones de <3mm y 3-7mm en dos animales más (tabla 2).

Tabla 15. Experimentos ECO-7 y ECO-8 en ratas sin hepatectomía parcial y con sonda de 10 Mhz.

IDENTIFICACIÓN Experimento/rata (semanas pot-inoc)		ECOGRAFÍA Nº/ Tamaño mm/ Localiz./ Caract. <3/ 3-7/ >3				NECROPSIA Nº/ Tamaño mm/ Localiz. <3/ 3-7/ >3		
ECO-7	1v (5)	LC Tumoral		ml		Hígado Tumoral		
	2v (5)	LC Tumoral		ml		LC Tumoral + LI		
	3v (5)	0				LC Tumoral + LD		
	ar (5)	2	3-7	LC	n	6	3-7	LC+LD+LI
	va (5)	0				0		
	rv (5)	0				0		
ECO-8	3a (6)	Hígado Tumoral		ml		Hígado Tumoral		
	4a (6)	0				1	3-7	LC
	5a (6)	1	3-7	LM	f	23	<3	LC+LM
	1r (6)	2	3-7	LI	f	LI Tumoral		
	1n (6)	0				3	<3	LC+LI

Características ecográficas de desarrollo tumoral. Festoneado de contorno: "f". Megalias de lóbulos: "ml". Nódulos intra-hepáticos: "n". Masas extra-hepáticas: "mext".

"Tumoral": infiltración neoplásica extensa, metástasis confluentes no individualizables. **Localización hepática de las metástasis.** LC: Lóbulo caudado. LD: Lóbulo lateral derecho. LI: Lóbulo lateral izquierdo. LM: Lóbulo medial. **ME:** implantes tumorales de localización extra-hepática identificados en necropsia.

El experimento **ECO-9** se realizó sobre ratas con afectación tumoral teóricamente más evolucionada, puesto que se practicaron a las diez semanas de la siembra tumoral. En las tres ratas que demostraron lesiones tumorales en necropsia, se apreciaron signos

ecográficos de afectación tales como megalias de lóbulos y masas extra-hepáticas (tabla 16).

Tabla 16. Experimento ECO-9 en ratas sin hepatectomía parcial y con sonda de 10 Mhz. Comparativa entre los hallazgos en US y necropsia.

IDENTIFICACIÓN		ECOGRAFÍA				NECROPSIA		
Experimento/rata (semanas pot-inoc)		Nº/ Tamaño mm/ Localiz./		Caract.		Nº/ Tamaño mm/ Localiz.		
		<3/ 3-7/ >3				<3/ 3-7/ >3		
ECO-9	2a (10)	2	>7	LC+LI	ml	15	>7	LC+LI
	4r (10)	Hígado Tumoral		ml+mext		Hígado Tumoral ME		
	2r (10)	0		mext		0 ME		
	3r (10)	Hígado Tumoral		ml+mext		Hígado Tumoral ME		

Los experimentos 10 a 12 se llevaron a cabo en tiempos más precoces dado que se había practicado hepatectomía parcial a los animales. En **ECO-10** se detectaron masas extra-hepáticas en dos animales, pero pasaron inadvertidas las metástasis de <3mm descubiertas en las necropsias de cuatro animales.

En el experimento **ECO-11** se apreciaron megalias de lóbulos sugestivas de lesiones tumorales de 3-7mm en dos animales, de >7mm en una rata y masas extra-hepáticas en dos animales. En las necropsias se corroboraron los hallazgos pero además se revelaron implantes de <3mm afectando a los lóbulos medio y caudado en otras dos ratas (tabla 17).

Tabla 17. Experimentos ECO-10 y ECO-11 en ratas sometidas a hepatectomía parcial y exploradas con sonda de 10 Mhz. Comparativa entre los hallazgos en US y necropsia.

IDENTIFICACIÓN Experimento/rata (semanas pot-inoc)		ECOGRAFÍA Nº/ Tamaño mm/ Localiz./ Caract. <3/ 3-7/ >3				NECROPSIA Nº/ Tamaño mm/ Localiz. <3/ 3-7/ >3		
ECO-10	1a (3)	0				1	<3	LM
	2av (3)	0				3	<3	LD+LM
	3v (3)	0		mext		0		ME
	4n (3)	0		mext		0		ME
	5nr (3)	0				1	<3	LC
	6r (3)	0				1	<3	LM
ECO-11	1av (6)	1	>7	LC	ml			LC Tumoral+LM
	2av (6)	0				4	<3	LC+LM
	6av (6)	1	3-7	LC	ml	1	3-7	LC
	1rv (6)	1	3-7	LC	ml	1	3-7	LC
	2rv (6)	0				4	<3	LC+LM
	4rv (6)	0				0		
	6rv (6)	0		mext		0		ME
	7rv (6)	0		mext		0		ME

Características ecográficas de desarrollo tumoral. Festoneado de contorno: "f". Megalias de lóbulos: "ml". Nódulos intra-hepáticos: "n". Masas extra-hepáticas: "mext".

"Tumoral": infiltración neoplásica extensa, metástasis confluentes no individualizables. **Localización hepática de las metástasis.** LC: Lóbulo caudado. LD: Lóbulo lateral derecho. LI: Lóbulo lateral izquierdo. LM: Lóbulo medial. **ME:** implantes tumorales de localización extra-hepática identificados en necropsia.

En **ECO-12** se usó una sonda multi-frecuencia de 6-18 Mhz mediante la que se detectaron signos sospechosos de metástasis en cinco ratas. Estos hallazgos se caracterizaron por festoneado de bordes de <3mm en tres ratas, nódulo intra-hepático de <3mm en un animal y nódulo intra-hepático y megalia del lóbulo caudado de 3-7mm en una quinta rata. En la necropsia se apreció en general mayor extensión tumoral que

la sugerida en US y además se observaron lesiones tumorales de <3mm, también en las ratas aparentemente sanas en US (tabla 18).

Tabla 18. Experimento ECO-12 en ratas sometidas a hepatectomía parcial y exploradas con sonda de 6-18 Mhz. Comparativa entre los hallazgos en US y necropsia.

IDENTIFICACIÓN		ECOGRAFÍA				NECROPSIA		
Experimento/rata (semanas pot-inoc)		Nº/ Tamaño mm/ Localiz./ Caract. <3/ 3-7/ >3				Nº/ Tamaño mm/ Localiz. <3/ 3-7/ >3		
ECO-12	1n (4)	0				4	<3	LM
	2n (4)	0				1	<3	LC
	3n (4)	1	<3	LC	f	3	<3	LC
	4n (4)	1	<3	LM	f	1	<3	LM
	1v (4)	0				1	<3	LC
	2v (4)	2	3-7	LC	n+ml	10	3-7	LC+LD
	1n1r(4)	0				5	<3	LC+LM
	1n2r(4)	1	<3	LC	f	10	<3	LC
	sn (4)	1	<3	LC	n	10	<3	LC

Características ecográficas de desarrollo tumoral. Festoneado de contorno: "f". Megalias de lóbulos: "ml". Nódulos intra-hepáticos: "n". Masas extra-hepáticas: "mext".

"**Tumoral**": infiltración neoplásica extensa, metástasis confluentes no individualizables. **Localización hepática de las metástasis.** LC: Lóbulo caudado. LD: Lóbulo lateral derecho. LI: Lóbulo lateral izquierdo. LM: Lóbulo medial. **ME:** implantes tumorales de localización extra-hepática identificados en necropsia.

1.2.3. Sinopsis de los estudios ecográficos relativos a Masas Neoplásicas

En el conjunto de experimentos ECO-6 a ECO-12, se comprobó desarrollo neoplásico hepático en el 74% de las ratas inoculadas. En el estudio comparativo entre hallazgos de necropsia y US realizado en base a la localización lobular de las metástasis (figura 23), se comprobó que el 55% de las lesiones presentes en el lóbulo caudado fueron detectadas en US. Los porcentajes de detección relativos a las lesiones ubicadas en lóbulos izquierdo, derecho y medio, resultaron respectivamente del 46%, 33% y 30%. Además todas las masas extra-hepáticas fueron correctamente identificadas.

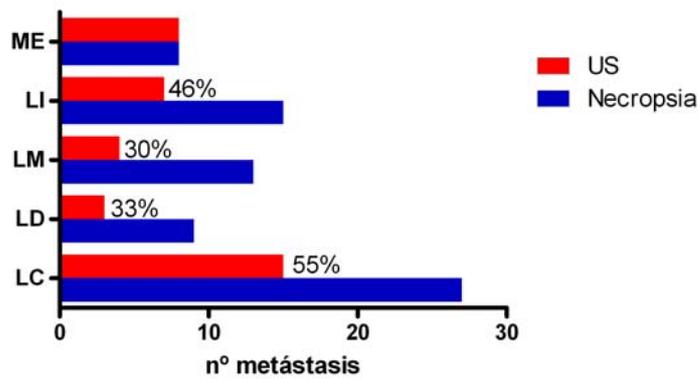


Figura 23. Detección ecográfica de las metástasis en relación a su localización.

LC: Lóbulo caudado. LD: Lóbulo derecho. LM: Lóbulo medio. LI: Lóbulo izquierdo. ME: implantes de localización extra-hepática. Las infiltraciones tumorales hepáticas se han considerado como infiltraciones en los cuatro lóbulos.

Por otro lado, en lo relativo al tamaño tumoral (figura 24), se detectaron el 91% de las lesiones de >7mm, el 66% de las de 3-7mm y sólo un 29% de las de <3mm. Sin embargo, cuatro de las lesiones de <3mm fueron reveladas en ECO-12, experimento que valorado de forma aislada mostró una tasa de detección de lesiones de <3mm de un 50%. Este hecho muy probablemente fue determinado por la más alta frecuencia sónica de la sonda utilizada en el mismo.

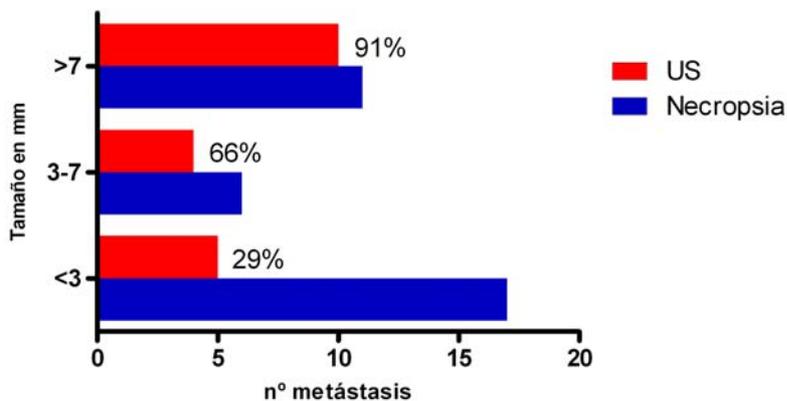


Figura 24. Detección ecográfica de las metástasis en relación a su tamaño.

1.2.4. Correlación ecográfica-patológica

En los análisis visuales realizados para cotejar los hallazgos de ecografía con los de necropsia, fue posible también determinar y relacionar los diferentes tipos morfológicos de implantes tumorales con sus respectivas manifestaciones ecográficas.

Así, los hallazgos ecográficos relativos al festoneado del contorno hepático motivado por pequeños abultamientos en la superficie de la víscera, correspondieron en el estudio de anatomía patológica a pequeños implantes metastáticos subcapsulares (figura 25).

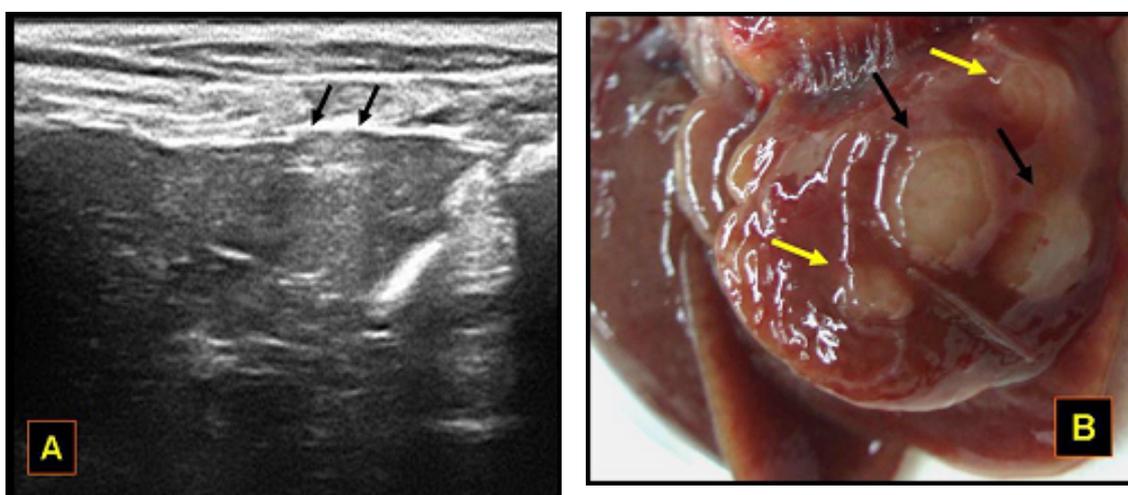


Figura 25. Implantes subcapsulares.

A. Dos lesiones hiperecoicas abomban la superficie del lóbulo caudado izquierdo (flechas negras), en una extensión de 3mm.

B. Necropsia, detalle del lóbulo caudado. Además de las lesiones detectadas en la ecografía (flechas negras), se observa un mayor número de metástasis subcapsulares de menor tamaño (flechas amarillas).

Por otro lado, las megalias de lóbulos caracterizadas por abombamientos difusos de contornos, pérdida de morfología angulada de bordes y patrón ecográfico heterogéneo, todo lo cual creaba una acusada alteración de la imagen hepática, eran la manifestación de profusas infiltraciones tumorales (figura 26).

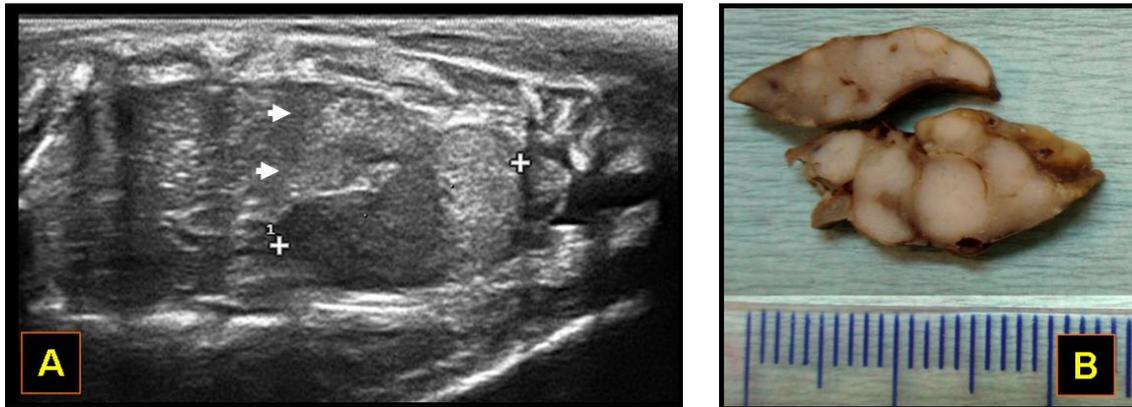


Figura 26. Megalías de lóbulos.

A. Extensa infiltración en proceso papilar del lóbulo caudado (flechas y cruces) que ha perdido su aspecto piramidal y presenta un aspecto hinchado, de masa.

B. Necropsia, cortes histológicos tras fijado en formol, extensa afectación neoplásica, lóbulos tumorales.

C. Estudio de microscopía óptica, nódulo metastático, patrón de arquitectura glandular típico de adenocarcinoma.

Los nódulos redondeados e hiperecoicos, distinguibles del parénquima hepático circundante, traducían metástasis rodeadas de tejido lobular sano (figuras 27-29).

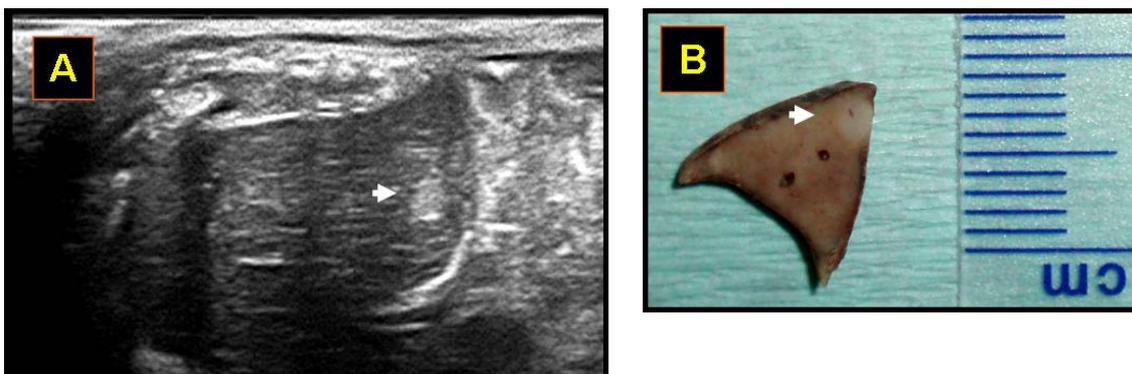


Figura 27. Nódulos intra-hepáticos.

A. Metástasis hiperecoica de 2,5mm. en vértice medial del lóbulo caudado (flecha blanca).

B Corte histológico axial tras fijado en formol, metástasis (flecha blanca) en vértice del lóbulo caudado.

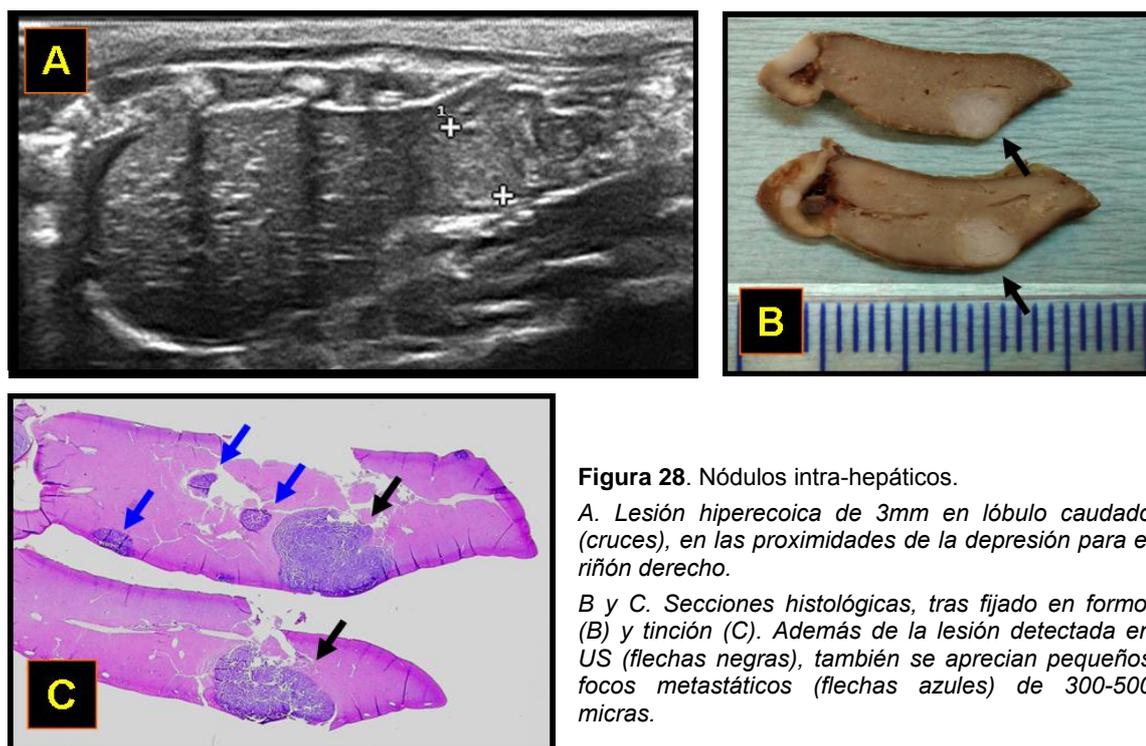


Figura 28. Nódulos intra-hepáticos.

A. Lesión hiperecoica de 3mm en lóbulo caudado (cruces), en las proximidades de la depresión para el riñón derecho.

B y C. Secciones histológicas, tras fijado en formol (B) y tinción (C). Además de la lesión detectada en US (flechas negras), también se aprecian pequeños focos metastáticos (flechas azules) de 300-500 micras.

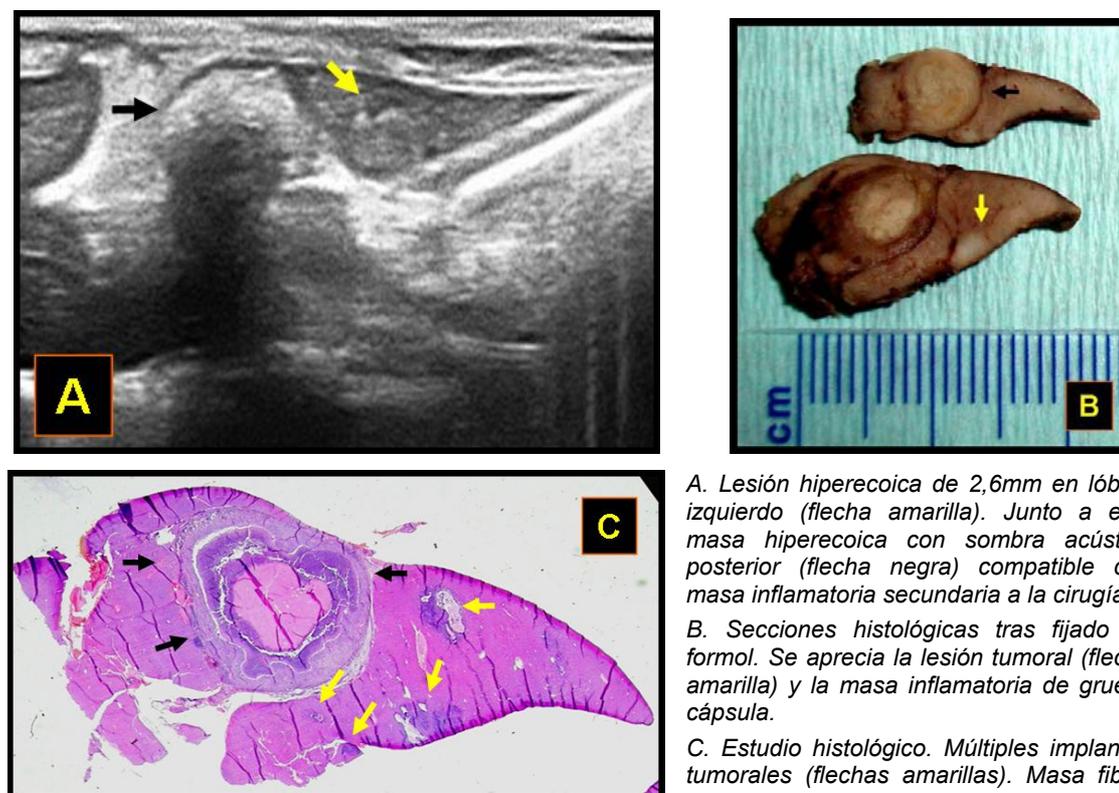


Figura 29. Nódulos intra-hepáticos y masa inflamatoria secundaria a hepatectomía.

A. Lesión hiperecoica de 2,6mm en lóbulo izquierdo (flecha amarilla). Junto a ella, masa hiperecoica con sombra acústica posterior (flecha negra) compatible con masa inflamatoria secundaria a la cirugía.

B. Secciones histológicas tras fijado en formol. Se aprecia la lesión tumoral (flecha amarilla) y la masa inflamatoria de gruesa cápsula.

C. Estudio histológico. Múltiples implantes tumorales (flechas amarillas). Masa fibroinflamatoria (flechas negras). Gruesa pseudocápsula fibrosa que rodea una banda de tejido de granulación y un centro necrótico.

Finalmente, se comprobó la naturaleza neoplásica de las masas sólidas y lobuladas de localización extra-hepática, motivadas por el desarrollo de implantes tumorales en omento o peritoneo (figura 30).

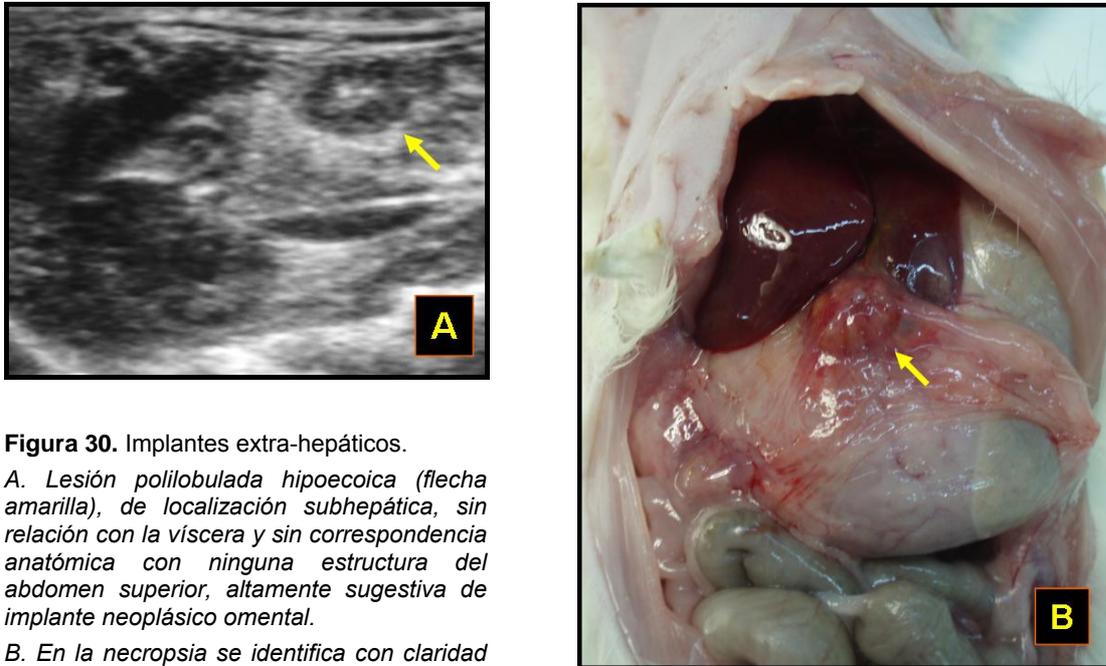


Figura 30. Implantes extra-hepáticos.

A. Lesión polilobulada hipoecoica (flecha amarilla), de localización subhepática, sin relación con la viscera y sin correspondencia anatómica con ninguna estructura del abdomen superior, altamente sugestiva de implante neoplásico omental.

B. En la necropsia se identifica con claridad el implante tumoral.

1.3. Ecografía Dópler

1.3.1. Estudios de adecuación técnica

En los estudios preliminares de US-Dópler, se realizaron diferentes tandas de exploraciones para determinar los parámetros hemodinámicos pV_{max} , aV_{max} , IR y razón A/P. La evaluación venosa portal resultó relativamente sencilla, incluso en estadios tumorales avanzados. Sin embargo, la valoración arterial, ya dificultosa en condiciones basales, se comprobó imposible en situaciones de afectación tumoral de cierta profusión. De todo ello se infería que la práctica satisfactoria de estudios arteriales y portales en nuestro modelo experimental, sólo era posible en un periodo no superior a un mes desde el momento de la siembra neoplásica.

Descripción de los resultados:

- **ECO-7** (n=6), sólo medidas portales a los 32 días (cuarta semana) de la inoculación tumoral, en cinco ratas (tabla 19).

Tabla 19. Experimento ECO-7. Determinaciones en US-Dópler y correlación con necropsia.

Identificación		pVmax 4ª semana	aVmax 4ª semana	IR 4ª semana	Razón A/P 4ª semana	NECROPSIA Nº(Tamaño)/Loc. (<3/ 3-7/ >3)
ECO-7	1v	18.8				Hígado Tumoral
	2v	-				LC Tumoral + LI
	3v	20.8				LC Tumoral + LD
	ar	27.7				6(3-7) LC+LD+LI
	va	18				0
	rv	11.1				0

“Tumoral”: infiltración neoplásica extensa, metástasis confluentes no individualizables. **Localización hepática de las metástasis**. LC: Lóbulo caudado. LD: Lóbulo lateral derecho. LI: Lóbulo lateral izquierdo. LM: Lóbulo medial. ME: implantes tumorales de localización extra-hepática identificados en necropsia.

- **ECO-8** (n=5) mediciones portales a los 28 y 42 días (cuarta y sexta semana respectivamente) de la infusión de células neoplásicas. Imposibilidad de obtención de mediciones arteriales por profuso desarrollo tumoral (tabla 20).

Tabla 20. Experimento ECO-8. Determinaciones en US-Dópler y correlación con necropsia.

Identificación		pVmax		aVmax		IR		Razón A/P		NECROPSIA Nº(Tamaño)/Loc. (<3/ 3-7/ >3)
		4ª	6ª	4ª	6ª	4ª	6ª	4ª	6ª	
ECO-8	3a	20.6	27.2							Hígado Tumoral
	4a	13.1	22.7							1(3-7) LC
	5a	13.5	14.7							23(<3) LC+LM
	1r	15.2	15.7							LI Tumoral
	1n	10.3	13.9							3(<3) LC+LI

- **ECO-11** (n=8), en cuatro animales se consiguen determinaciones arteriales y portales en la cuarta semana de la infusión tumoral, 20 días tras la hepatectomía. Sólo en un animal se consiguen determinaciones arteriales en tiempos posteriores (tabla 21).

Tabla 21. Experimento ECO-11. Determinaciones en US-Dópler y correlación con necropsia.

Identificación		pVmax		aVmax		IR		Razón A/P		NECROPSIA Nº(Tam)/Loc. (<3/ 3-7/ >3)
		4 ^a	5 ^a							
ECO-11	1av	15.1	21.5	31.7		0.5		2.09		LCTumoral+LM
	2av	10.4	20.4	35	42.9	0.57	0.58	3.36	2.10	4(<3) LC+LM
	6av	10.7	23	40		0.55		3.73		1(3-7) LC
	1rv									1(3-7) LC
	2rv	11.3	27	36		0.49		3.1		4(<3) LC+LM
	4rv									0
	6rv									0 ME
	7rv									0 ME

1.3.2. Resultados en los estudios ecográficos Dópler

Posteriormente se practicaron los estudios específicos para evaluación de los diferentes parámetros hemodinámicas.

Descripción de los resultados:

- **ECO-13(D)**, n=13, determinaciones hemodinámicas a ratas no manipuladas. Las exploraciones no entrañaron dificultades (tabla 22).

Tabla 22. Experimento ECO-13(D). Determinaciones hemodinámicas en ratas sin manipulación quirúrgica.

Identificación		pVmax	aVmax	IR	Razón A/P
ECO-13(D)	1v	20,85	40,8	0,64	1,95
	2v	15,9	45,7	0,69	2,87
	3vv	17,2	45,9	0,6	2,66
	4v	24	41,2	0,54	1,71
	1r	19,7	49,5	0,67	2,51
	2r	23,2	31,7	0,44	1,36
	4r	17,4	27	0,5	1,55
	1n	14,3	33,1	0,66	2,31
	1r1a	21,2	39,1	0,61	1,84
	2n1r	21	41,4	0,63	1,97
	2n2r	19,7	43,4	0,69	2,2
	1r1n	17,3	32,5	0,66	1,87
	3r	23,1	36,12	0,67	1,56

- Experimento **ECO-14(D)**, determinaciones en ratas hepatectomizadas. Las US-Dópler practicadas en la primera semana tras la cirugía se realizaron sin dificultades. Los procedimientos en la segunda y tercera semana tras la cirugía, se llevaron a cabo respectivamente sobre nueve y cuatro ratas. Los animales no presentados murieron durante la inducción anestésica (tabla 23).

Tabla 23. Experimento ECO-14(D). Determinaciones hemodinámicas en ratas hepatectomizadas.

Identificación		pVmax			aVmax		
		1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a
ECO-14(D)	4v	14,4	11,9	20	31,8	29,2	34
	1r	19,9	12,1		22,1	15	
	2r	22,7	22,8		25,3	27	
	4r	15,4	19,8	20	41,3	40	35,3
	1n	19,9	17,4		38,2	34,3	
	1r1a	11,7	21	21	29,7		36,3
	2n1r	16,5	31	31	37,8	45	55
	2n2r	17,6	17,9		37,8	31,7	
	1r1n	23	15,9		24	22	
	3r	15,3	14,8		26	29	
Identificación		IR			Razón A/P		
		1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a
ECO-14(D)	4v	0,56	0,67	0,66	2,2	2,45	1,7
	1r	0,49	0,68		1,11	1,23	
	2r	0,57	0,7		1,11	1,18	
	4r	0,67	0,66	0,63	2,6	2,02	1,75
	1n	0,49	0,54		1,91	1,97	
	1r1a	0,59		0,63	2,5		1,7
	2n1r	0,74	0,7	0,54	2,29		1,7
	2n2r	0,64	0,61		2,2	1,59	
	1r1n	0,7	0,8		1,04	1,3	
	3r	0,46	0,67		1,69	1,95	

- Experimento **ECO-15(D)**, se evaluaron ratas a las que se había inoculado células tumorales, y también practicado esplenectomía y hepatectomía parcial. Las US-Dópler se realizaron en la primera semana y segunda semanas tras la cirugía. En la primera sesión se estudiaron 12 ratas y en la segunda nueve. Tres animales no se recuperaron de la anestesia en la primera sesión ecográfica. En todas las ratas se comprobó desarrollo tumoral en la necropsia posterior a la US (tabla 24).

Tabla 24. Experimento ECO-15(D). Determinaciones de US-Dópler y correlación con necropsia.

Identific.	pVmax		aVmax		IR		Razón A/P		NECROP Nº/Tamaño	
	1 ^a	2 ^a								
ECO-15(D)	1n	19,3	10,5	32,4	43	0,57	0,47	1,6	4	4 <3
	2n	18,9	20,1	38,8	76,7	0,63	0,53	2,05	3,8	1 <3
	3n	10,4	11,9	27,8	57,7	0,72	0,4	2,67	4,8	3 <3
	4n	14,9	13,8	38,5	48,7	0,76	0,76	2,58	3,5	1 <3
	1v	21,7	12,9	44,1	57,5	0,54	0,83	2,03	3,5	1 <3
	2v	17,9	14,1	43,4	40,7	0,77	0,61	2,4	2,8	10 3-7
	3v	24,8		47,2		0,78		1,9		1 <3
	1n1v	17,7		34,6		0,78		1,95		3 <3
	1n1r	13,5	22	34,5	66	0,82	0,67	2,5	3	5 <3
	1n2r	16,1	10,2	35,3	51,2	0,68	0,66	2,2	5,01	10 <3
	sn	17,7	11,2	45,2	53,1	0,82	0,62	2,5	4,74	10 <3
	4v	17		49,7		0,8		2,9		1 <3

- Experimento **ECO-16(D)**, se estudiaron ratas a las que se realizó esplenectomía y hepatectomía parcial, pero no inoculación tumoral. Se practicaron cuatro tandas de US-Dópler: previa a la manipulación quirúrgica (n=6), y en la primera (n=5), segunda (n=4) y tercera (n=4) semana tras la hepatectomía (tabla 25).

Tabla 25. Experimento ECO-16(D). "preQ": US-Dópler previa a la cirugía, en condiciones basales.

Identificación		pVmax				aVmax			
		preQ	1 ^a	2 ^a	3 ^a	preQ	1 ^a	2 ^a	3 ^a
ECO-16D	1r	17,9	13,4	17,6	19,7	44	34,8	69,8	66
	3r	26	24,6			48,2	79,5		
	4r	16,9	14,6	8,1	14,2	30,2	42,3	32,7	56,7
	5r	18,4				42,5			
	3r2n	14,7	16,8	11,8	18	41,7	28,4	71	74,6
	4n	15,2	16,7	16,1	13	33,9	27,2	51,7	55

Identificación		IR				Razón A/P			
		preQ	1 ^a	2 ^a	3 ^a	preQ	1 ^a	2 ^a	3 ^a
ECO-16D	1r	0,51	0,72	0,64	0,66	2,45	2,6	3,9	3,3
	3r	0,63	0,78			1,8	3,2		
	4r	0,68	0,72	0,73	0,81	1,7	2,89	4,03	3,9
	5r	0,63				2,3			
	3r2n	0,68	0,65	0,85	0,77	2,8	1,6	6,01	4,1
	4n	0,54	0,59	0,8	0,73	2,23	1,6	3,2	4,2

- En **ECO-17(D)** se valoraron animales a los que se había inoculado células tumorales, y practicado esplenectomía y hepatectomía. A todas las ratas se les realizó cuatro series de US-Dópler: previa a la manipulación quirúrgica, y en la primera, segunda y tercera semana tras la hepatectomía (tabla 26).

Tabla 26. Experimento ECO-17(D).

Identificación		pVmax				aVmax			
		preQ	1 ^a	2 ^a	3 ^a	preQ	1 ^a	2 ^a	3 ^a
ECO-17D	2r	16,1	<i>15,6</i>	<i>16,1</i>	<i>16</i>	47	<i>52,7</i>	<i>73,2</i>	<i>51</i>
	1r1n	14,8	21	12,7	18	41,8	31,2	68,8	33,5
	2r2n	19,9	<i>12,7</i>	<i>13</i>	<i>17</i>	36,9	<i>47,9</i>	<i>84,8</i>	<i>38</i>
	1n	16,2	17,7	19	21,4	32,5	45,1	82,6	42,5
	2n	13,1	15,8	20	14,7	29,2	34,9	47,5	48
	3n	28,2	12,3	13,3	18,4	34,4	37,8	50,1	48,7

Identificación		IR				Razón A/P			
		preQ	1 ^a	2 ^a	3 ^a	preQ	1 ^a	2 ^a	3 ^a
ECO-17D	2r	0,6	<i>0,77</i>	<i>0,66</i>	<i>0,73</i>	2,93	<i>3,3</i>	<i>4,5</i>	<i>3,1</i>
	1r1n	0,64	0,43	0,84	0,72	2,8	1,4	5,4	1,8
	2r2n	0,73	<i>0,54</i>	<i>0,87</i>	<i>0,73</i>	1,85	<i>3,7</i>	<i>6,5</i>	<i>2,23</i>
	1n	0,56	0,72	0,67	0,66	2	2,5	4,3	1,9
	2n	0,52	0,71	0,84	0,71	2,2	2,2	2,37	3,2
	3n	0,64	0,56	0,85	0,78	1,2	3,02	3,8	2,6

“preQ”: US-Dópler previa a la cirugía, en condiciones basales. En cursiva roja los valores de las ratas que no desarrollaron tumor.

En la necropsia final de comprobación de desarrollo tumoral, se apreció en cuatro animales presencia de metástasis. La afectación tumoral consistía en

lesiones menores de 3mm y en número menor de 10. Los animales 2r y 2r2n no desarrollaron tumor macroscópico.

1.3.3. Determinación de parámetros en los diferentes grupos estudiados

Tras las determinaciones hemodinámicas en las diferentes condiciones tanto de manipulación quirúrgica, como de inducción tumoral, y una vez confeccionados los diferentes grupos a estudio, se obtuvieron los siguientes resultados:

- Valores hemodinámicas en condiciones basales, media y desviación estándar, de los estudios ECO-13(D), ECO-16(D) y ECO-17(D), n=25 (tabla 27).

Tabla 27. Valores hemodinámicos, experimentos ECO-13(D), ECO-16(D) y ECO-17(D).

	Media	DS
pVmax (cm/s)	18,53	3,84
aVmax (cm/s)	38,26	6,41
IR	0,61	0,07
Razón A/P	2,05	0,48

- Determinaciones en animales hepatectomizados, n=10, se presenta la media y la desviación estándar (tabla 28), estudio ECO-14(D).

Tabla 28. Valores hemodinámicos, experimento ECO-14(D).

	1ª sem (n=10)		2ª sem (n=9)		3ª sem (n=4)	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
pVmax (cm/s)	17,64	3,68	18,46	5,66	23,00	5,35
aVmax (cm/s)	31,40	6,96	30,36	8,97	40,15	9,94
IR	0,59	0,09	0,67	0,07	0,61	0,05
Razón A/P	1,86	0,59	1,71	0,45	1,71	0,02

- Determinaciones en ratas a las que se realizó esplenectomía y hepatectomía (tabla 29). Estudio ECO-16(D).

Tabla 29. Valores hemodinámicos, experimento ECO-16(D).

	1ª sem (n=5)		2ª sem (n=4)		3ª sem (n=4)	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
pVmax (cm/s)	17,22	4,36	13,40	4,3	16,23	3,14
aVmax (cm/s)	42,44	21,57	56,30	18,04	63,08	9,07
IR	0,69	0,07	0,75	0,09	0,74	0,06
Razón A/P	2,37	0,74	4,28	1,20	3,87	0,40

- Valores hemodinámicas en animales con inoculación tumoral, esplenectomía y hepatectomía (tabla 30), experimentos ECO-11, ECO-15(D) y ECO-17(D).

Tabla 30. Valores hemodinámicos, experimentos ECO-11, ECO-15(D) y ECO-17(D)

	1ª sem (n=18)		2ª sem (n=15)		3ª sem (n=10)	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
pVmax (cm/s)	17,29	3,59	14,75	4,05	15,00	4,05
aVmax (cm/s)	38,78	6,34	57,20	12,85	39,43	6,49
IR	0,69	0,11	0,67	0,14	0,62	0,10
Razón A/P	2,27	0,44	3,92	0,90	2,72	0,73

1.3.4. Efecto de la cirugía sobre los parámetros hemodinámicos

Una vez clasificados los resultados, procederemos a realizar un análisis de cada uno de los parámetros estudiados, en busca de modificaciones en su comportamiento que

puedan ser atribuidas a alguna de las maniobras quirúrgicas practicadas en nuestro modelo. En los diferentes estudios se han considerado como valores de referencia las determinaciones procedentes de las US-Dópler practicadas en condiciones basales.

Velocidad portal máxima

En los estudios centrados en la valoración de los registros de la velocidad en la vena Porta a nivel del hilio hepático, se han encontrado modificaciones significativas que deben ser atribuidas al modelo experimental.

En primer lugar, en los animales que únicamente sufrieron la resección del lóbulo lateral izquierdo de su hígado, se observó una ligera elevación de la velocidad del flujo portal en las mediciones practicadas en la tercera semana pero que no alcanzó significación estadística (figura 31).

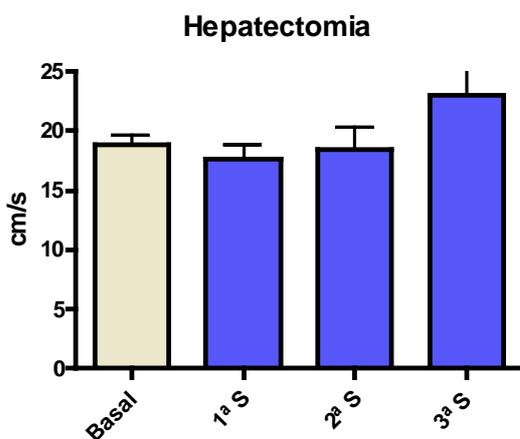


Figura 31. Medidas de pVmax, en animales en los que se realizó hepatectomía parcial. Evolución temporal de valores en relación con las determinaciones hechas en condiciones basales.

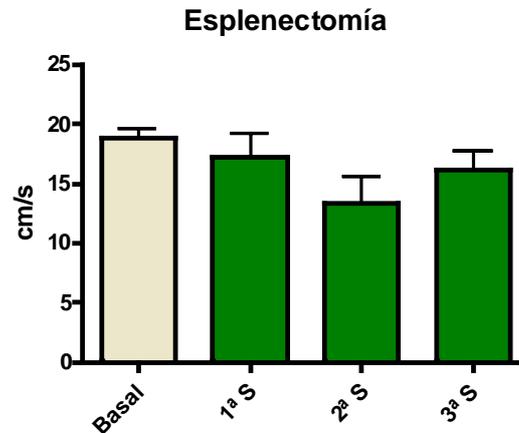


Figura 32. Evolución de pVmax. Diferentes medidas en animales esplenectomizados y hepatectomizados, en relación a medidas basales.

Al añadir la extirpación del bazo a la hepatectomía, se produce un ligero descenso en las medidas de las dos primeras semanas, a la vez que se apunta una cierta recuperación en las determinaciones realizadas en la tercera (figura 32). Sin embargo,

estas diferencias no alcanzaron significación estadística en el análisis mediante ANOVA ($p=0,0677$).

Cuando a la hepatectomía y esplenectomía se añadió la inoculación de células tumorales, el registro de la pVmax fue parecido al grupo anterior, pero sin el repunte de la tercera semana (figura 33). En este caso, el ANOVA confirmó la significación estadística de las variaciones observadas ($p=0,0091$), y el posterior análisis con el Test de Newman Keuls mostró significación a la reducción de la pVmax encontrada en las mediciones tanto de la segunda como de la tercera semana ($p<0,05$).

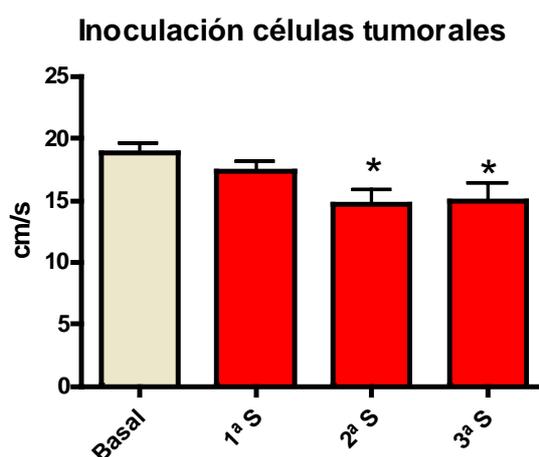


Figura 33. Evolución temporal de los valores de pVmax en animales en los que se inocularon células tumorales, y en relación con las medidas basales.

(*) $p<0,05$ frente a basal.

Velocidad arterial máxima

En lo referente a los animales sometidos únicamente a una hepatectomía parcial, vemos como apenas se pueden observar oscilaciones en la aVmax. De hecho, el análisis de la varianza practicado mediante Kruskal-Wallis (ya que los datos de

medidas en tercera semana no superaron el test de normalidad) informa que las pequeñas variaciones observadas no alcanzan significación estadística (figura 34).

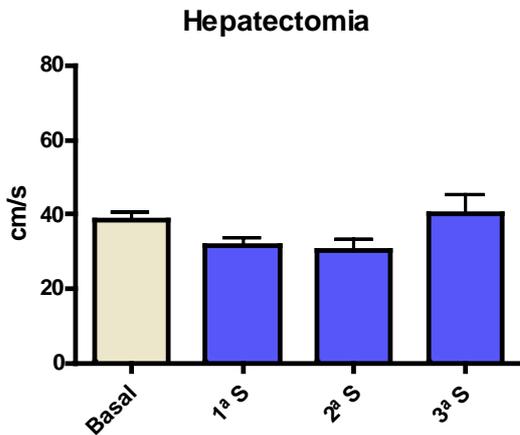


Figura 34. Evolución de la aVmax en animales sometidos a resección del lóbulo lateral izquierdo del hígado.

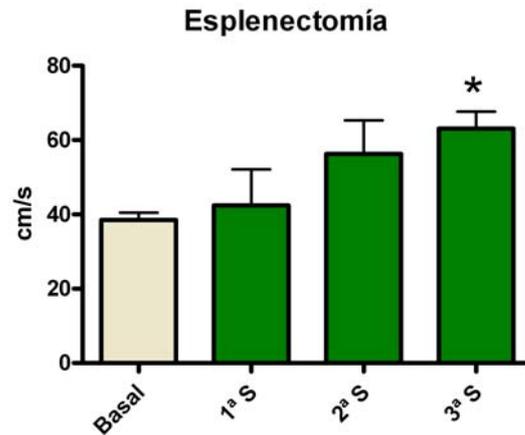


Figura 35. Velocidad arterial máxima en animales sometidos a resección del lóbulo lateral izquierdo del hígado y esplenectomía.

(*) $p < 0,05$ frente a basal.

En cambio, en los animales sometidos a esplenectomía además de resección del 40% de la masa hepática, se observa un incremento progresivo en aVmax (figura 35). La comparación de estos resultados mediante ANOVA (todos los grupos de datos superaron el Test de Normalidad, Kolmogorov-Smirnov) informó de la existencia de diferencias significativas en el conjunto de grupos estudiados. El posterior análisis con el Test de Newman Keuls constató que la diferencia observada en la velocidad arterial máxima entre los valores basales y los de la tercera semana post-hepatectomía era estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Por último, en los animales que recibieron células tumorales (además de ser sometidos a hepatectomía y esplenectomía), se observa la misma elevación de la ve-

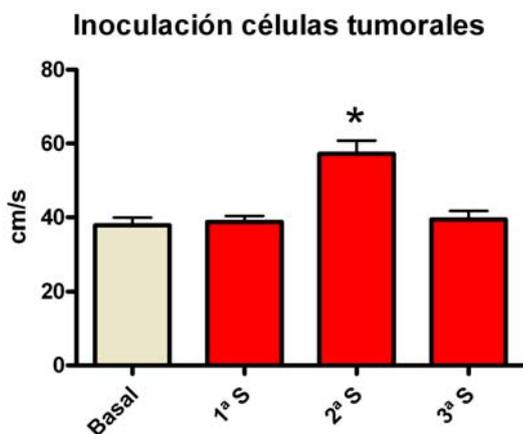


Figura 36. Velocidad arterial máxima en animales en los que se inocularon células tumorales al hígado, a través del bazo.

(*) $p < 0,05$ frente a basal.

locidad arterial máxima en la segunda semana (ANOVA, $p < 0,0001$), pero los valores se normalizan completamente en las mediciones de la tercera (figura 36). El análisis realizado con el Test de Newman Keuls confirma que la elevación de la velocidad en la segunda semana es estadísticamente significativa (tanto frente a los valores previos como frente a los posteriores; $p < 0,05$).

Así pues, como se aprecia con claridad en la figura 37, la elevación de la velocidad arterial máxima encontrada en tercera semana post-cirugía hepática en los animales sometidos a hepatectomía y esplenectomía, desaparece cuando existen además células tumorales en crecimiento en el parénquima hepático ($p < 0,001$).

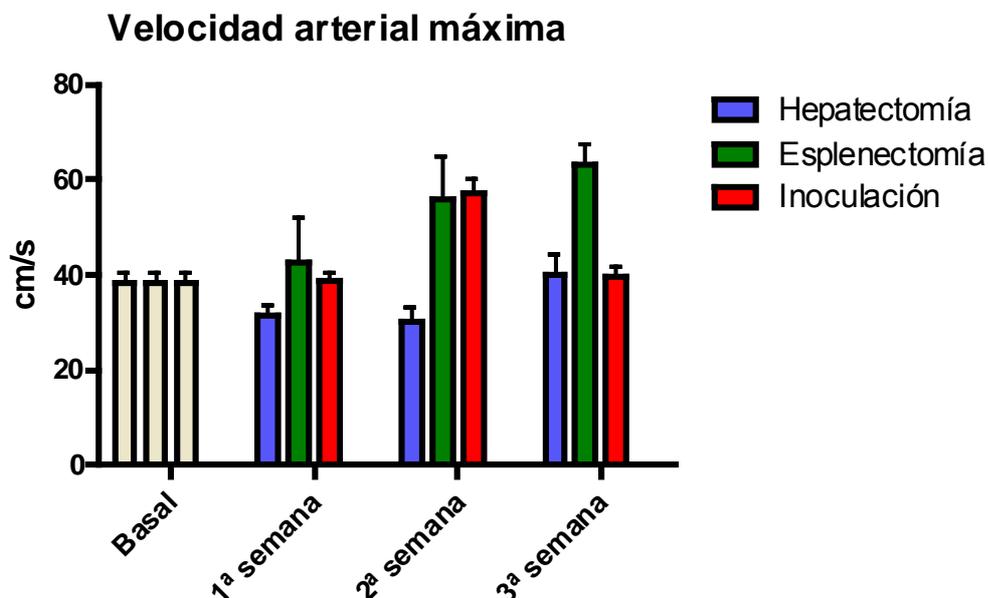


Figura 37. Comparación de los valores de aV_{max} en los tres modelos quirúrgicos estudiados.

Se comprueba la caída de aV_{max} en la tercera semana, en el grupo de animales inoculados, con respecto a los exclusivamente esplenectomizados.

Índice de Resistencia

Este parámetro que informa sobre el aumento de resistencia al flujo arterial en el hígado y que comúnmente se altera en la enfermedad hepática difusa, no se modificó como consecuencia de la hepatectomía parcial (figura 38).

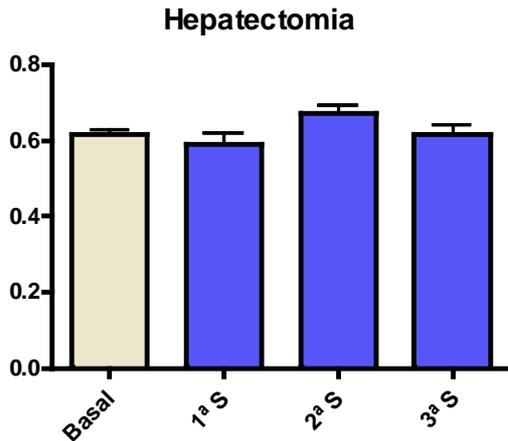


Figura 38. IR en animales a los que se practicó hepatectomía del 40%.

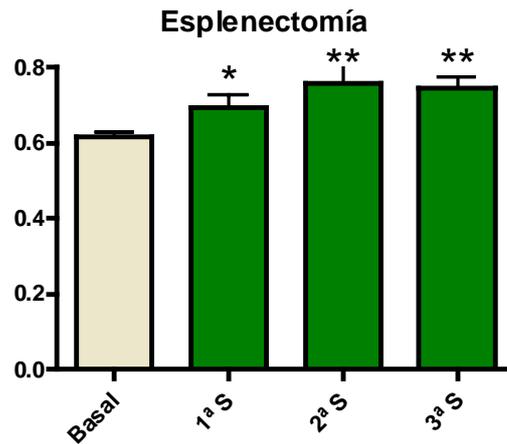


Figura 39. IR en animales con hepatectomía y esplenectomía.

(*) $p < 0,05$ frente a basal. (**) $p < 0,01$ frente a basal.

En cambio, la realización de la esplenectomía, que como hemos visto eleva significativamente los valores de aV_{max} en nuestros animales, también ha inducido una elevación significativa (y progresiva) del IR a lo largo de las semanas que siguen a la cirugía hepática (figura 39).

Sin embargo, en los animales inoculados, la elevación de la aV_{max} (figura 36) no se acompañó de una elevación del IR, lo que supone una diferencia significativa respecto a su control natural que es el grupo de animales sometidos a resección hepática y esplénica, pero sin presencia de células tumorales en el hígado (figura 40).

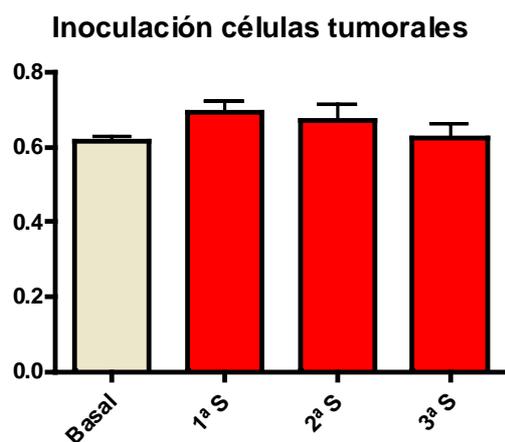


Figura 40. IR en animales en los que se inocularon células tumorales al hígado, a través del bazo.

Razón Arterio-Portal

En los animales únicamente sometidos a resección parcial del hígado, la razón A/P no experimentó modificaciones significativas (figura 41). En cambio, en al añadir la resección del bazo, se observa un incremento importante de la razón A/P a partir de la segunda semana, que se mantiene por encima del doble de los valores basales ($p < 0,001$) en la tercera semana (figura 42).

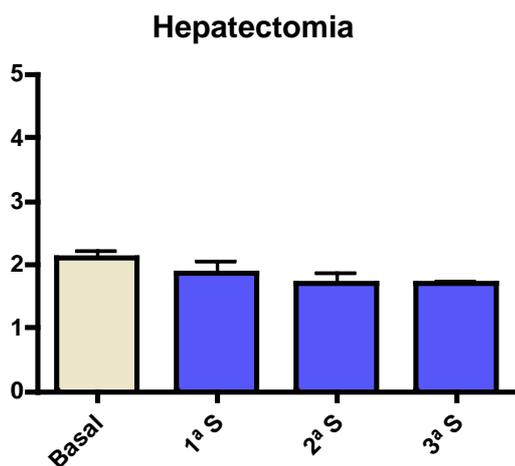


Figura 41. Razón A/P en animales a los que se practicó hepatectomía.

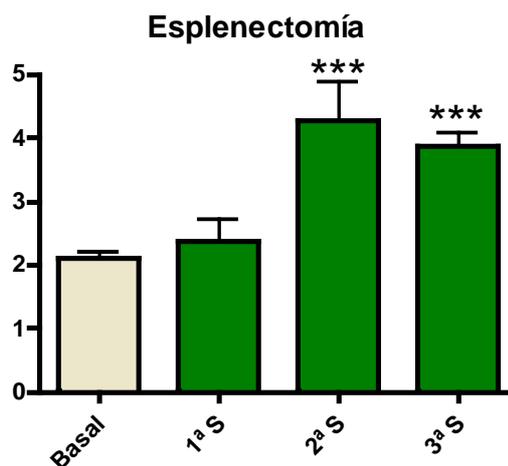


Figura 42. Razón A/P en animales a los que se practicó hepatectomía y esplenectomía.

(***) $p < 0,001$ frente a basal.

En los animales inoculados con células tumorales se observa un patrón de comportamiento de la razón A/P similar al de los animales con resección hepática y esplénica (figura 43). Sin embargo, en la tercera semana, la elevación de la razón A/P fue significativamente menor ($p < 0,01$) que en los animales que no tenían implante tumoral en su hígado (figura 44).

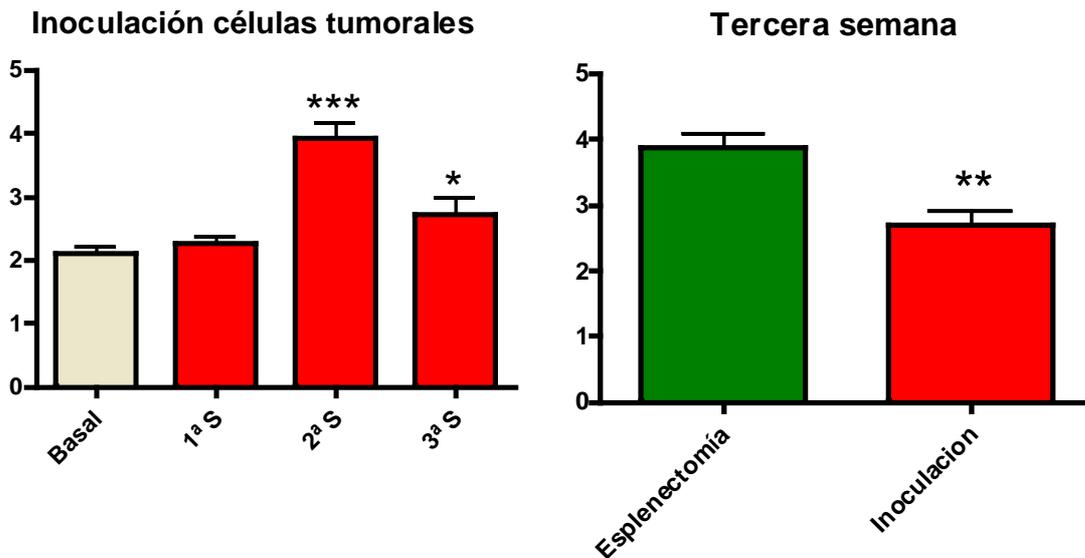


Figura 43. Razón A/P en animales a los que se practicó hepatectomía, esplenectomía e inoculación de células tumorales. (*) $p < 0,05$ frente a basal. (***) $p < 0,001$ frente a basal.

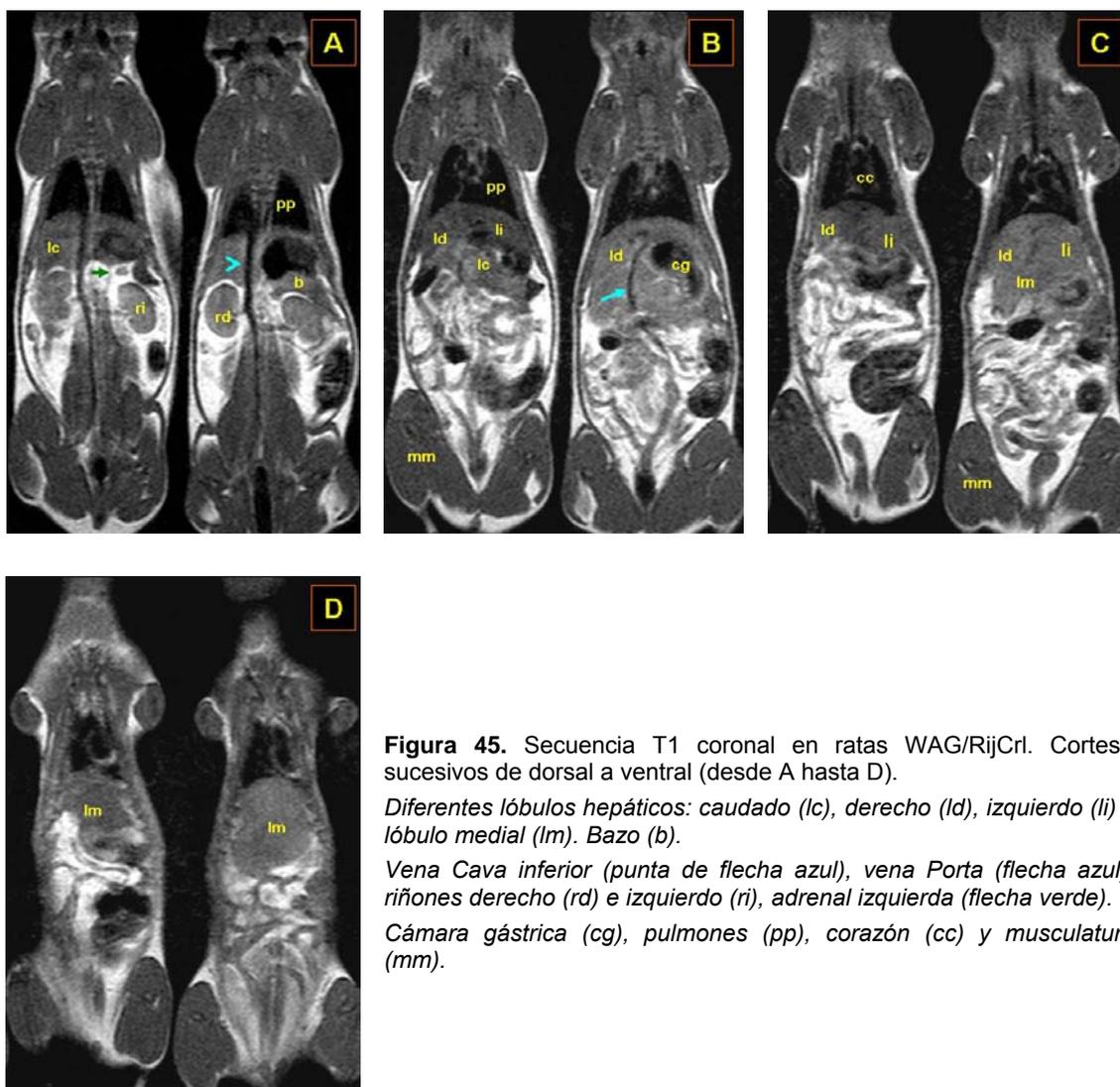
Figura 44. Comparación entre las razones A/P de las ratas esplenectomizadas, libres o no de inoculación tumoral. Tercera semana. (**) $p < 0,01$ frente a basal.

Este hallazgo se relaciona con la caída de las velocidades arteriales y portales observado en la tercera semana tras hepatectomía en los animales inoculados, y que supone un descenso global del flujo vascular hepático, sobre todo a expensas del componente arterial.

2. Resultados en imagen de Resonancia Magnética

2.1. Estudios anatómicos

En los estudios para describir la anatomía hepática normal, se obtuvieron imágenes de óptima calidad en las secuencias coronales, potenciadas en T1 y DP (figura 45).



En estas secuencias realizadas en ratas sanas, el hígado se mostró como una víscera homogénea, de contornos suaves y bordes angulosos, y con una intensidad de señal similar al músculo y al bazo. Los diferentes lóbulos hepáticos no resultaron

distinguibles, aunque su localización anatómica podía intuirse de forma bastante aproximada. Por otro lado, en las secuencias potenciadas en T2, y en las secuencias STIR de TR largo, el hígado apareció muy hipointenso, y su individualización respecto de las vísceras vecinas, sobre todo de aquellas que mostraban gas en su seno, resultó dificultosa. Sin embargo, en las secuencias STIR de TR más corto, el hígado presentó un cierto aumento en la señal, lo que hizo factible su caracterización (figura 46).

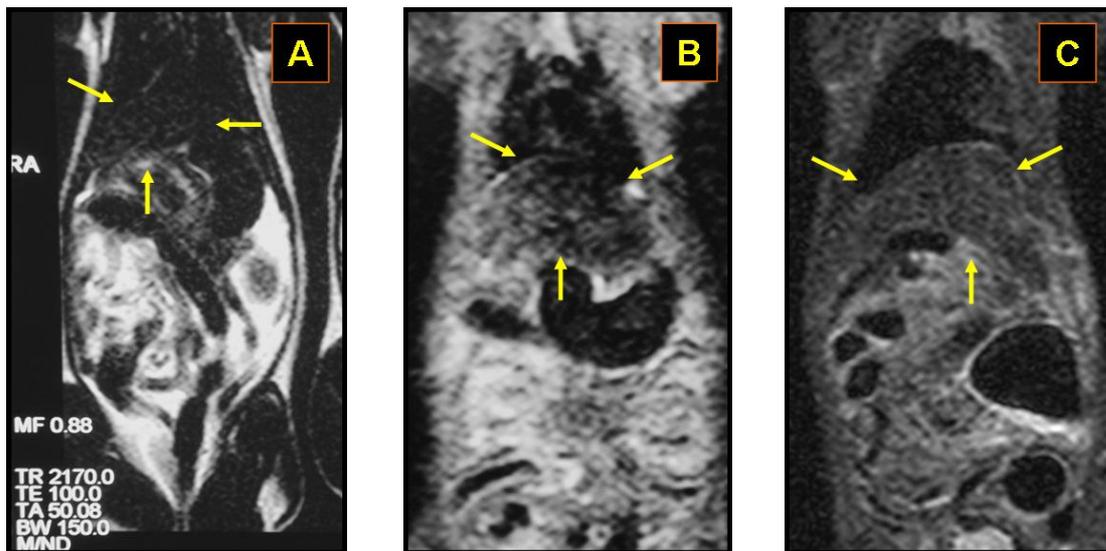


Figura 46. Diferentes secuencias coronales.

Las flechas amarillas indican los contornos hepáticos.

A. Secuencia potenciada en T2, hígado marcadamente hipointenso. B. Secuencia STIR, TR: 4200. Acusada hipointensidad hepática. C. Secuencia STIR, TR: 3410. Se aprecia recuperación de la señal hepática que posibilita su estudio.

Finalmente, las secuencias EG ofrecieron escasa resolución de contraste, lo que unido a su relativamente grueso espesor de corte, las hizo anatómicamente groseras, y no aptas para el análisis morfológico.

En lo referente al tipo de proyección, las secuencias coronales resultaron de evaluación más sencilla que las axiales.

Además del hígado, se pudieron identificar otras estructuras vasculares y viscerales. La vena Porta, y la vena Cava inferior fueron fácilmente visualizables en todo su

recorrido. Sin embargo la Aorta y la arteria hepática escaparon al poder de resolución de esta técnica de imagen. La cámara gástrica y las asas intestinales se delimitaron con claridad. En su seno, y al igual que en los pulmones, fue posible apreciar el intenso vacío de señal motivado por la presencia de aire.

2.2. Estudio de la patología en imagen de RM

Las características de las masas se estudiaron en tres grupos de nueve ratas. Todos los animales fueron inoculados con células tumorales, y sólo uno de ellos no desarrolló patología tumoral. En el grupo de ratas RM-4, se estudiaron además las características de las lesiones fibro-inflamatorias secundarias al proceso de hepatectomía parcial, practicado como estímulo al desarrollo tumoral.

2.2.1. Masas neoplásicas

En el grupo de tres ratas **RM-2**, se realizaron secuencias de RM para definir las características de las lesiones neoplásicas en estadio precoz de desarrollo, y para determinar los estudios más sensibles a la patología. Se practicaron series coronales potenciadas en T1 y EG, y series axiales y coronales STIR de TR corto. Se detectaron metástasis hepáticas de un tamaño mínimo de 2mm (tabla 31).

Tabla 31. Experimento RM-2. Estudio comparativo entre los hallazgos en imagen y las lesiones descubiertas en la necropsia.

IDENTIFICACIÓN		RM			NECROPSIA		
Experimento/rata		Nº/ Tamaño mm/ Localiz.			Nº/ Tamaño mm/ Localiz.		
RM-2	1r	3	3	LC	3	3	LC
	2a	5	2-5	LI+ME	10	1-5	LC+LI+ME
	3v	0			0		

Localización hepática de las metástasis. LC: Lóbulo caudado. LI: Lóbulo lateral izquierdo. ME: implantes tumorales de localización extra-hepática.

Estas pequeñas lesiones tumorales fueron correctamente identificadas en secuencias STIR, tanto en proyección axial, como coronal. Se trató de pequeños nódulos hiperintensos, de bordes mal definidos, claramente distinguibles del parenquima adyacente. Además, en un caso se apreció una gran masa tumoral hiperintensa, de contornos policíclicos y de localización sub-hepática anterior (figura 47).

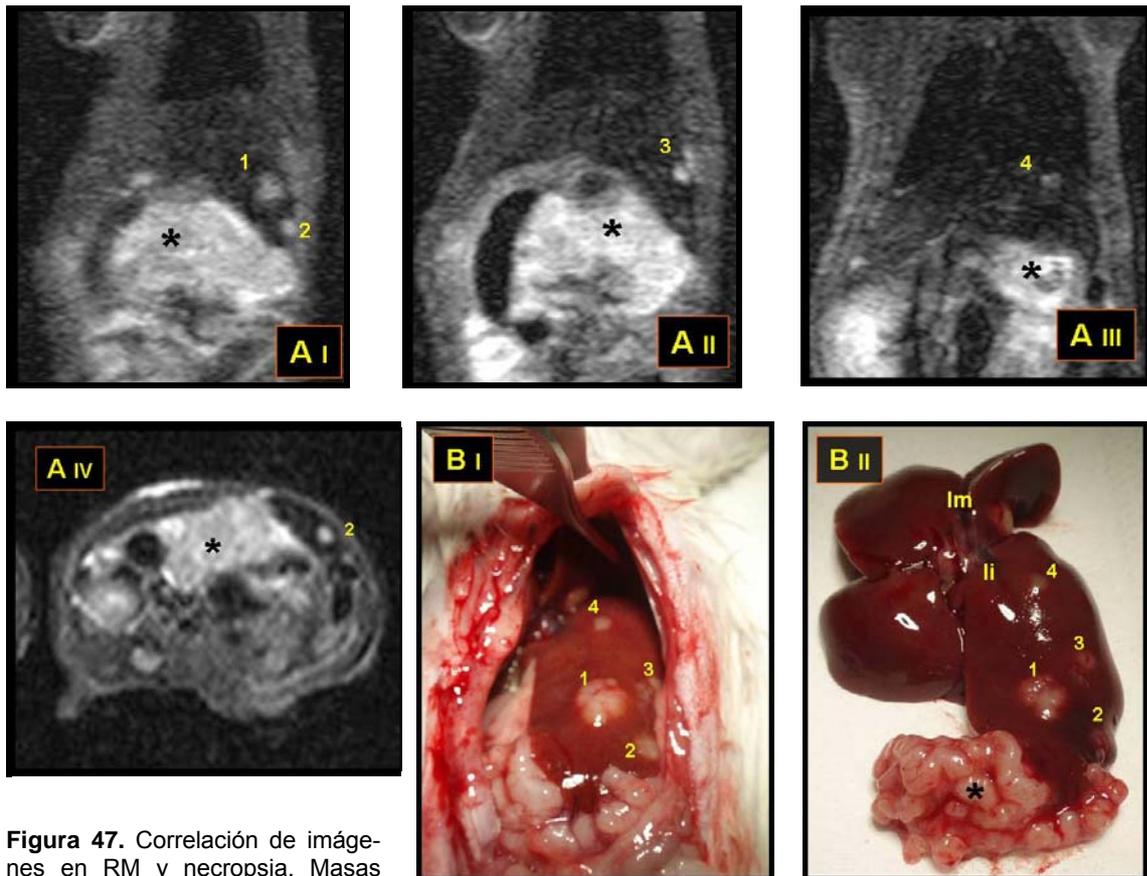


Figura 47. Correlación de imágenes en RM y necropsia. Masas neoplásicas.

Secuencias STIR en proyección coronal (A_I-A_{III}) y axial (A_{IV}). Se detectan cuatro nódulos tumorales hiperintensos y una gran masa sub-hepática (asterisco negro). Correspondencia con las lesiones metastásicas detectadas en el análisis visual macroscópico (B_I-B_{II}). Lóbulo medio: Im. Lóbulo izquierdo: li.

En el experimento **RM-3**, se valoraron lesiones tumorales en un estado evolutivo teóricamente más avanzado. También se realizaron secuencias T1 coronal, y STIR coronal y axial. En este experimento se detectaron correctamente las extensas infiltraciones tumorales que afectaban a los lóbulos caudados en dos animales, y la extensa y difusa patología metastásica que presentó la tercera rata (tabla 32).

Tabla 32. Experimento RM-3. Estudio comparativo entre los hallazgos en imagen y las lesiones descubiertas en la necropsia.

IDENTIFICACIÓN		RM	NECROPSIA
Experimento/rata		Nº/ Tamaño mm/ Localiz.	Nº/ Tamaño mm/ Localiz.
RM-3	2v	LC Tumoral	LC Tumoral
	3v	LC Tumoral	LC Tumoral
	4v	Hígado Tumoral	Hígado Tumoral

“Tumoral”: infiltración neoplásica extensa, metástasis confluentes no individualizables. **Localización hepática de las metástasis.** LC: Lóbulo caudado.

En estos animales se apreciaron grandes lesiones tumorales hiperintensas que abombaban los contornos hepáticos (figura 48).

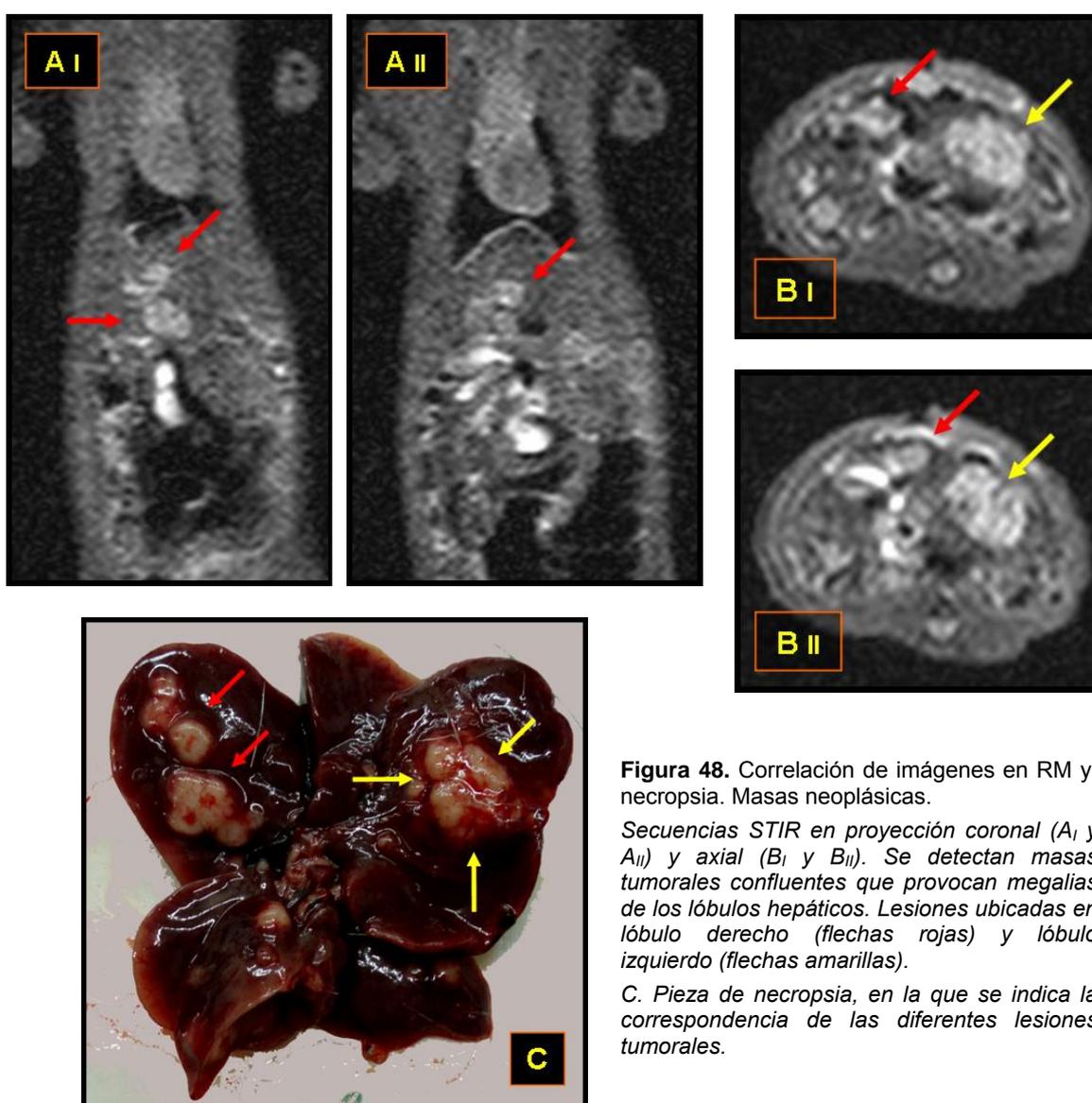


Figura 48. Correlación de imágenes en RM y necropsia. Masas neoplásicas.

Secuencias STIR en proyección coronal (A_I y A_{II}) y axial (B_I y B_{II}). Se detectan masas tumorales confluentes que provocan megalias de los lóbulos hepáticos. Lesiones ubicadas en lóbulo derecho (flechas rojas) y lóbulo izquierdo (flechas amarillas).

C. Pieza de necropsia, en la que se indica la correspondencia de las diferentes lesiones tumorales.

En el experimento **RM-4**, se practicaron también secuencias potenciadas en T1 y STIR. En este grupo de ratas no fue posible identificar los pequeños nódulos tumorales de tamaño inferior a 2mm, que se apreciaron en la necropsia realizada a dos animales. Por otro lado, en una tercera rata se identificó una metástasis de 3mm, rodeada de tejido hepático sano y ubicada en la vertiente derecha del lóbulo caudado. Sin embargo, pasó desapercibida una gran infiltración tumoral en el proceso papilar, probablemente interpretada erróneamente como un acúmulo de asas intestinales (tabla 33).

Tabla 33. Experimentos RM-4. Estudio comparativo entre los hallazgos en imagen y las lesiones descubiertas en la necropsia.

IDENTIFICACIÓN		RM			NECROPSIA		
Experimento/rata		Nº/ Tamaño mm/ Localiz.			Nº/ Tamaño mm/ Localiz.		
RM-4	1n	0			4	<2	LC
	2v	1	3	LC	LC Tumoral		
	4n	0			1	<2	LC

“**Tumoral**”: infiltración neoplásica extensa, metástasis confluentes no individualizables. **Localización hepática de las metástasis**. LC: Lóbulo caudado.

2.2.2. Masas fibro-inflamatorias

En las ratas **RM-4**, se estudiaron además las características de las lesiones inflamatorias. A diferencia de las lesiones neoplásicas más irregulares, este tipo de masas presentaba una morfología esférica y unos contornos mejor definidos. Además, en los de mayor tamaño se observaba una cápsula periférica. También en el seno de las lesiones fue posible identificar focos de vacío de señal, motivados por gas secundario a fenómenos de necrosis. Todos estos hallazgos, descubiertos en una localización típica, subdiafragmática posterior izquierda, resultaban característicos de lesión de etiología inflamatoria (figura 49).

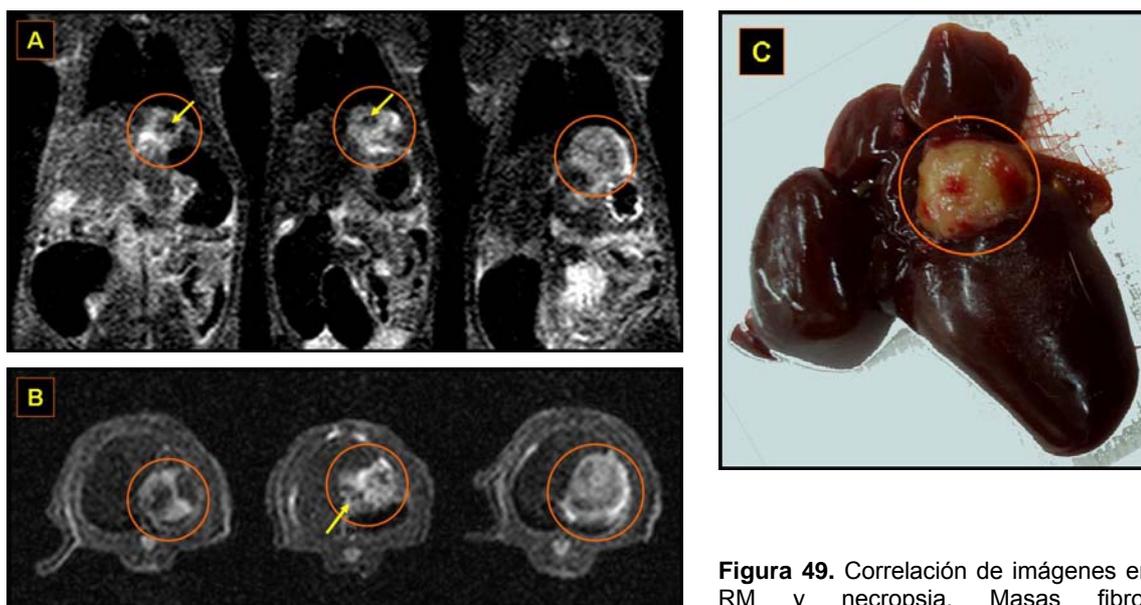


Figura 49. Correlación de imágenes en RM y necropsia. Masas fibro-inflamatorias.

Secuencias STIR en proyección coronal (A) y axial (B). Se detectan masas hiperintensas, de morfología redondeada (circunferencias anaranjadas), y con focos de vacío de señal (flechas amarillas).

C. Pieza de necropsia con lesión fibro-inflamatoria en base de lóbulo lateral izquierdo.

2.2.3. Aportación de la RM al modelo experimental

La RM permitió identificar adecuadamente lesiones tumorales en el 75% de los animales que habían desarrollado patología neoplásica. Las secuencias STIR, tanto en proyección axial, como sobre todo en proyección coronal, resultaron ser las más sensibles a la hora de detectar la patología neoplásica. Aunque su resolución espacial era menor que otras secuencias en las que se obtenían imágenes con menor espesor de corte, mostraron gran resolución de contraste que a la postre fue el factor más útil en la identificación de la patología. Sin embargo, en estas secuencias no fue posible la identificación de nódulos menores de 2mm. La RM también permitió evaluar las infiltraciones tumorales más profundas, aunque en un caso, una extensa afectación del proceso papilar pasó desapercibida. Este hecho refleja la dificultad que entraña la valoración de lesiones no rodeadas de parénquima hepático sano. Finalmente, las lesiones de tipo inflamatorio también presentaron una serie de características que evaluadas cuidadosamente, permitían un diagnóstico etiológico correcto.

3. Resultados en Tomografía Computada Multi Corte

Como ya se ha indicado, la práctica de una TCMC requiere de la administración de un material de contraste que haga posible discernir entre estructuras anatómicas con similar densidad radiológica. En nuestro trabajo, el contraste yodado se administró a través de la vena femoral izquierda. Este proceso, aunque laborioso, se realizó sin complicaciones y permitió la obtención de imágenes de TCMC adecuadamente contrastadas (figura 50).

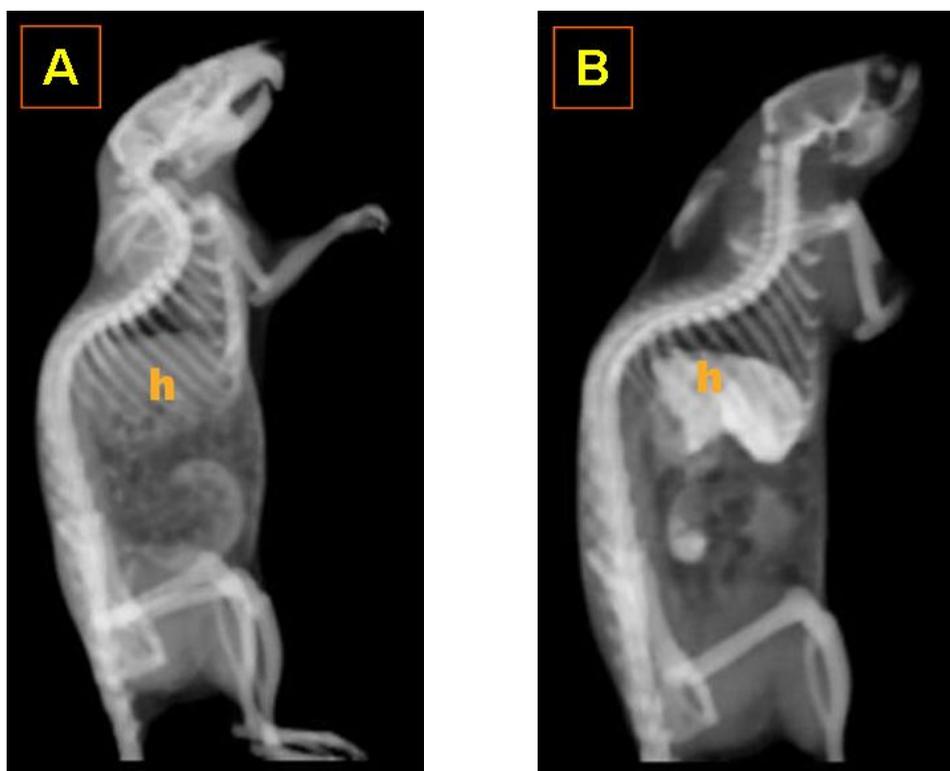
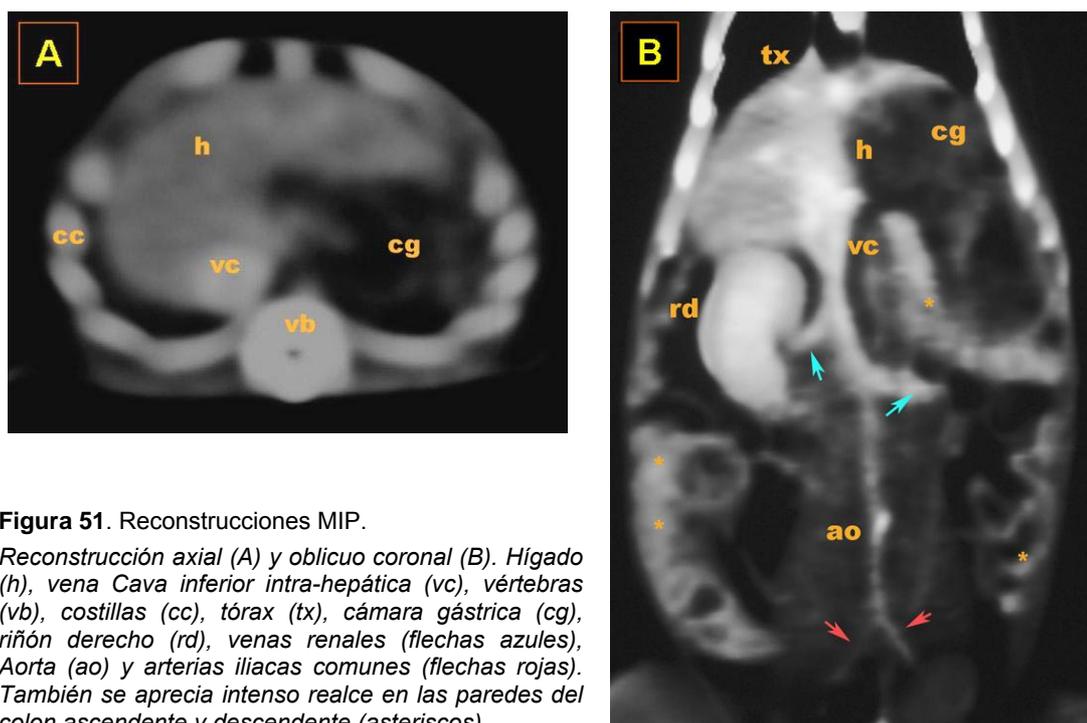


Figura 50. Reconstrucciones sagitales VR, de dos ratas sin (A) y con (B) contraste intravenoso.

En ambas reconstrucciones se identifican fácilmente las estructuras óseas: cráneo, columna, parrilla costal y huesos de las extremidades. Sin embargo, sólo en el animal al que se administró contraste yodado, se puede reconocer el hígado (h), y delimitar sus contornos de las vísceras y asas intestinales adyacentes.

3.1. Aproximación anatómica

En las imágenes obtenidas tras la introducción del contraste intravenoso, el hígado exhibió un homogéneo realce y se mostró como una estructura globalmente hiperdensa. El hilio vascular hepático no era detectable, pero fue posible reconocer la porción intra-hepática de la vena Cava inferior que se encontraba intensamente realzada por contraste procedente de las venas renales. En reconstrucciones coronales se identificó la Aorta y la bifurcación de las arterias iliacas. También se observó intensa captación de contraste en los riñones y en las paredes gástricas e intestinales (figura 51).



3.2. Estudio morfológico de la patología en TCMC

En las dos ratas en las que se realizó TCMC para definir las características de las lesiones fibro-inflamatorias y tumorales, fue posible identificar las primeras (figura 52).

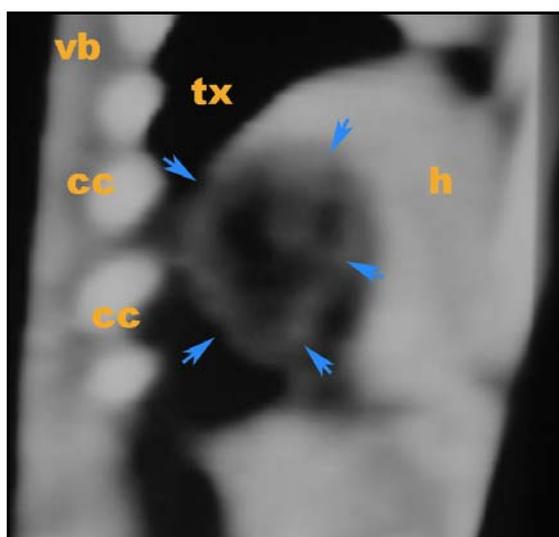


Figura 52. Reconstrucción MIP sagital.

Se aprecia una masa (flechas azules) posterior al parénquima hepático (h), que presenta captación de contraste en periferia y un centro muy hipodenso. La lesión correspondió a una masa fibro-inflamatoria de pared fibrosa y centro necrosado. Vértebras (vb), costillas (cc), tórax (tx).

Sin embargo, en ninguno de los dos animales fue posible detectar imágenes compatibles con infiltración tumoral, de acuerdo a los criterios definidos a tal fin. En el examen de necropsia se encontró una masa tumoral extra-hepática en uno de ellos, y tres lesiones metastáticas de 4mm de diámetro en el otro.

Dada la complejidad del proceso de diagnóstico y su escaso rendimiento, claramente inferior a US y RM, no se practicaron más estudios de TCMC enfocados a la caracterización del modelo experimental.

Resultados relativos a elaboración, monitorización y vehiculización del magnetofluido.

En este apartado se exponen los resultados referentes a la consecución de suspensiones con diferentes concentraciones de nanopartículas, sus características en las distintas secuencias de RM, y la viabilidad de su administración vascular a animales vivos. Asimismo se presentarán los resultados relativos a las diferentes técnicas usadas en la valoración de la infusión hepática.

1. Evaluación del magnetofluido “in vitro”

1.1. Nanopartículas magnéticas y suspensión en lipiodol®

De forma preliminar se obtuvieron suspensiones de nanopartículas magnéticas en aceite yodado (lipiodol®), mediante ultrasonificación. Los fluidos así elaborados presentaron concentraciones de nanopartículas, medidas en mg por ml de lipiodol®, de: 3,3mg/ml, 6,6mg/ml y 13,2mg/ml. Las dos primeras suspensiones se obtuvieron con facilidad, pero en la tercera no se consiguió una suspensión tan homogénea y el componente metálico mostraba tendencia a la precipitación.

1.2. Estudios de RM

Varias muestras de las diferentes suspensiones y de lipiodol® se sometieron a distintas secuencias de RM para estudiar los cambios en las características de la señal atribuibles a la presencia de sustancias ferromagnéticas.

1.2.1. Imágenes potenciadas en T1

En las imágenes potenciadas en T1, tanto la muestra correspondiente al lipiodol® como las diferentes suspensiones de nanopartículas magnéticas, se mostraron hiperintensas. Además no hubo diferencias de intensidad de señal entre las suspensiones con mayor concentración de nanopartículas. Dado que la grasa en secuencias potenciadas en T1 es hiperintensa, las características de señal observadas en las diferentes muestras fueron, por tanto, determinadas por la naturaleza lipídica del lipiodol® (figura 53).

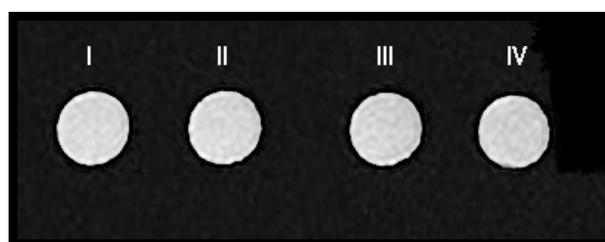


Figura 53. Secuencia axial potenciada en T1 de viales con muestras de los diferentes fluidos.

I: lipiodol®. II: lipiodol® con 3,3 mg de nanopartículas/ml. III: lipiodol® con 6,6 mg de nanopartículas/ml. IV: lipiodol® con 13,2mg de nanopartículas/ml. Las cuatro muestras aparecen hiperintensas.

1.2.2. Imágenes potenciadas en STIR

En las imágenes potenciadas en STIR, secuencia en la que la grasa presenta importante disminución de la intensidad de señal, el vial portador del lipiodol® se mostró claramente hipointenso. Sin embargo, en las muestras con nanopartículas magnéticas se apreció un tenue pero progresivo incremento en la señal, en relación directa al incremento de concentración del metal, y que se hizo más patente en la suspensión más rica en hierro (figura 54).

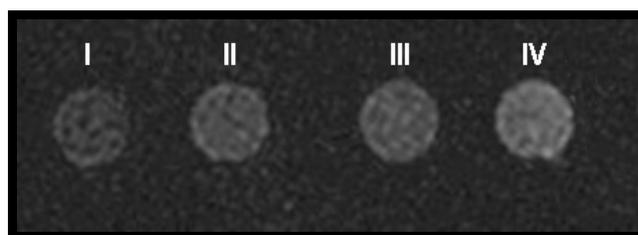


Figura 54. Secuencia axial potenciada en STIR de viales con muestras de diferentes fluidos.

I: lipiodol®. II: lipiodol® con 3,3 mg de nanopartículas/ml. III: lipiodol® con 6,6 mg de nanopartículas/ml. IV: lipiodol® con 13,2mg de nanopartículas/ml. La muestra IV presenta mayor señal que la portadora de lipiodol® solo.

1.2.3. Imágenes potenciadas en EG

Las secuencias EG son muy sensibles a la presencia de pequeñas cantidades de sustancias ferromagnéticas, las cuales producen caídas en la intensidad de la señal allá donde se encuentren. Se realizaron tres tipos de secuencias modificando el TE y conservando el resto de parámetros.

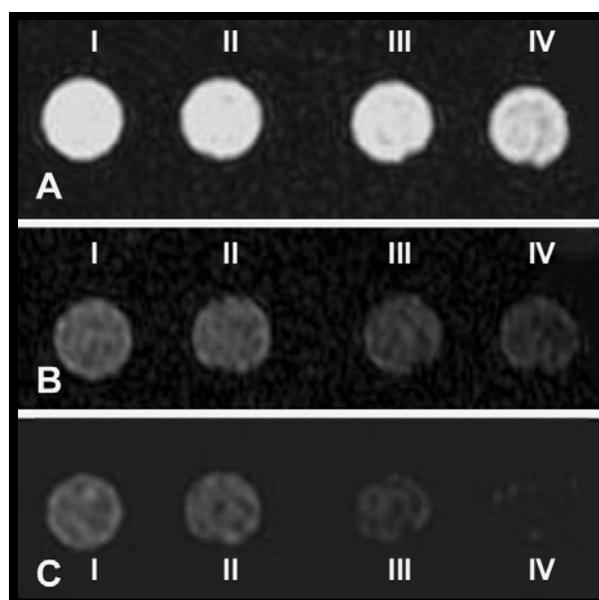


Figura 55. Secuencias axiales potenciadas en EG. A: Secuencia EG con TE: 4ms. B: Secuencia con TE: 14ms. C: Secuencia con TE: 19ms.

I: lipiodol®. II: lipiodol® con 3,3 mg de nanopartículas/ml. III: lipiodol® con 6,6 mg de nanopartículas/ml. IV: lipiodol® con 13,2mg de nanopartículas/ml.

Se observó que al prolongar el TE se producía una atenuación global de la señal proveniente de todos los viales. Por otro lado, el incremento en la concentración de metal en las muestras, se tradujo en una progresiva disminución de la señal de los viales, respecto del vial portador de lipiodol®. Esta apreciación se hizo especialmente patente en las secuencias de TE más prolongado, en las que las muestras con mayor concentración de hierro presentaron pérdida casi absoluta de la señal (figura 55).

1.2.4. Sinopsis de los resultados de RM “in vitro”

Las suspensiones obtenidas de nanopartículas magnéticas y lipiodol® presentaron unas características de señal similares a la grasa en las secuencias potenciadas en T1 y STIR; aunque, en estas últimas, la presencia de metal en suspensión pareció atenuar la pérdida de señal. Por otro lado, las secuencias EG de TE más prolongado resultaron muy sensibles a la presencia de metal, lo que provocó fuertes caídas de la señal procedente de las suspensiones más ricas en hierro. Estas secuencias serían, por tanto, las más idóneas para valorar la presencia de nanopartículas magnéticas en hígados infundidos con los magnetofluidos.

2. Resultados de la vehiculización “in vivo” del magnetofluido

Tras los estudios *in vitro*, se evaluó la posible administración vascular *in vivo* de los magnetofluidos, y su distribución en tejido hepático mediante técnicas de imagen y de laboratorio.

2.1. Experimentos de infusión por vía intravenosa

En el experimento **NanoMag-Portal 1** no se presentaron complicaciones en el acto quirúrgico, ni durante la inyección portal del magnetofluido. Los tres animales toleraron

bien las dosis administradas. En la TCMC realizada se apreció homogénea distribución del contraste por el parénquima hepático (tabla 34).

Tabla 34. Resultados del experimento NanoMag-Portal 1.

IDENTIFICACIÓN Experimento/rata		Magnetofluido: 10mg/ml		TCMC (+, -)	RM				Deceso postQ imprevisto (horas)
		Dosis np (mg)	Dosis lipiodol® (ml/kg)		T1	STIR	EG(4)	EG(14)	
Nanomag- Portal 1	1v	1,5	0,8	+	/	/	/	/	/
	2v	1,5	0,8	+	/	/	/	/	/
	3v	3	1,6	+	/	/	/	/	/

np: nanopartículas. *TCMC*: difusión hepática adecuada "+", difusión hepática deficiente "-". *RM*, Intensidad de señal: hiperintensidad "↑", hipointensidad "↓", isointensidad "↔". *Deceso postQ imprevisto*: muertes de animales no previstas en el modelo experimental.

Aunque en el experimento **NanoMag-Portal 2** no se desarrollaron complicaciones quirúrgicas inmediatas durante el proceso de administración del magnetofluido por vía portal, sí se presentaron complicaciones durante el postoperatorio inmediato:

- El animal 2s, al cual se inyectó lipiodol® solo, murió a las 12 horas de la inoculación.
- La rata 4r, que había recibido 0,3ml de magnetofluido con una concentración de 6,6mg de nanopartículas/ml, también murió en las 48 horas posteriores a la inyección.

Se realizaron estudios de imagen en los tres animales vivos (tabla 35).

Imágenes de TCMC. Se apreció una adecuada infusión del lipiodol® sólo en el animal 5r. En la rata 3a no había lipiodol® hepático, sino que se encontraba disperso por la cavidad peritoneal, lo que fue indicativo de una deficiente técnica quirúrgica (figura 56).

Tabla 35. Resultados del experimento NanoMag-Portal 2.

IDENTIFICACIÓN Experimento/rata		Magnetofluido		TCMC (+, -)	RM				Deceso postQ imprevisto (horas)
		Dosis np (mg)	Dosis ipiodol® (ml/kg)		T1	STIR	EG(4)	EG(14)	
Nanomag- Portal 2	1s	/	/	-	↔	↓	↔	↓	No
	2s	/	1,6	/	/	/	/	/	Sí, tras 12h
	3a	1	1,6	-	↔	↓	↔	↓	No
	4r	2	1,6	/	/	/	/	/	Sí, tras 48h
	5r	4	1,6	+	↔	↔	↓↓	↓↓↓	No

np: nanopartículas. **TCMC:** difusión hepática adecuada "+", difusión hepática deficiente "-". **RM,** Intensidad de señal: hiperintensidad "↑", hipointensidad "↓", isointensidad "↔". **Deceso postQ imprevisto:** muertes de animales no previstas en el modelo experimental.

Imágenes de RM. Se obtuvieron resultados diferentes en función de las secuencias utilizadas (figuras 56 y 57).

- **Secuencia T1.** Los hígados de los tres animales se mostraron isointensos al músculo.
- **Secuencia STIR.** Los hígados sin magnetofluido aparecieron hipointensos.
- **Secuencia EG, TE: 4ms.** El hígado de la rata 5r se mostró claramente hipointenso, debido a la presencia de nanopartículas de hierro.
- **Secuencia EG, TE: 14ms.** Aunque la caída de señal fue más intensa, el hallazgo resultó menos evidente, puesto que en esta secuencia se producía una significativa disminución global de señal tanto en el hígado de control como en el infundido.

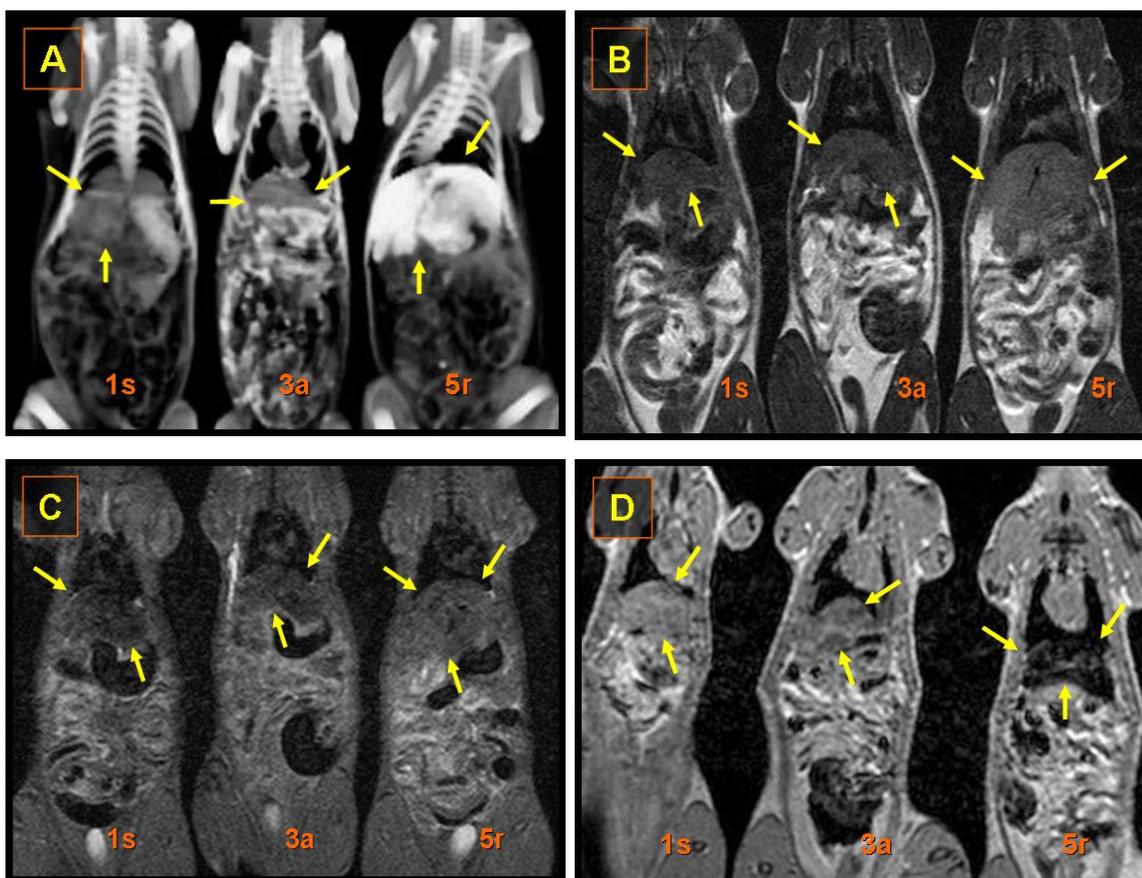


Figura 56. Reconstrucciones y secuencias en proyección coronal.

Las flechas amarillas delimitan los contornos hepáticos.

A. TCMC, reconstrucción VR. Sólo el hígado de 5r aparece intensamente realzado por lipiodol®. En el animal 3a, el lipiodol® aparece disperso por la cavidad abdominal.

B. Secuencia coronal T1 (TR: 651ms/ TE: 24ms). Hígados isointensos en los tres animales.

C. Secuencia STIR (3600/29; TI: 130). El hígado 5r se muestra isointenso al músculo, mientras que en 1s y 3a la víscera aparece hipointensa.

D. Secuencia EG (120/4). El hígado de 5r presenta acusada hiposeñal por presencia del magnetofluido.

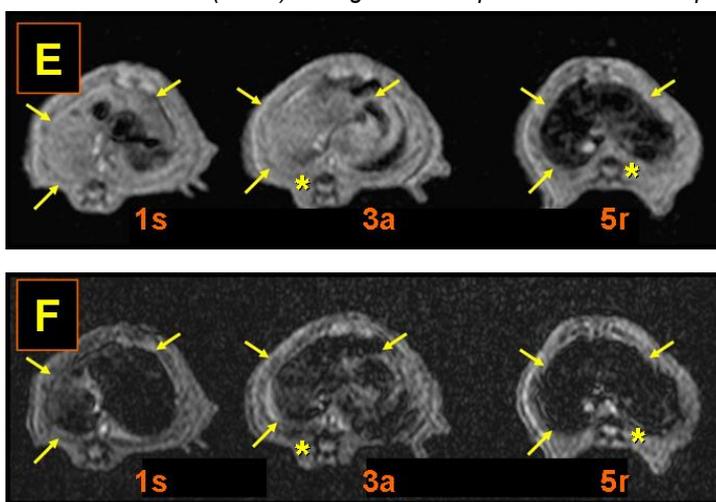


Figura 57. Secuencias axiales.

E. Secuencia EG (120/4). Los hígados de 1s y 3a aparecen isointensos a la musculatura paravertebral (*). El hígado de 5r presenta una acusada hiposeñal.

F. Secuencia EG (120/14). Los hígados de 1s y 3a aparecen hipointensos. El hígado de la rata 5r se muestra muy hipointenso respecto a la musculatura paravertebral (*), sin embargo la disminución de la señal resulta menos evidente que en las imágenes expuestas en D y E.

En el experimento **NanoMag-Portal 3**, se inyectó una alta dosis de magnetofluido que además presentaba una concentración muy elevada de nanopartículas (tabla 36).

Tabla 36. Resultados del experimento NanoMag-Portal 3.

IDENTIFICACIÓN Experimento/rata		Magnetofluido: 20mg/ml		TCMC (+, -)	RM				Deceso postQ imprevisto (horas)
		Dosis np (mg)	Dosis lipiodol® (ml/kg)		T1	STIR	EG(4)	EG(14)	
Nanomag- Portal 3	1s	/	/	-	↔	↓	↔	↓	No
	2a	6	1,6	/	/	/	/	/	Sí, inmediato
	3r	/	1,6	+	↔	↓	↔	↓	No
	4v	6	1,6	+	↔	↔	↓↓	↓↓↓	No

np: nanopartículas. **TCMC:** difusión hepática adecuada "+", difusión hepática deficiente "-". **RM,** Intensidad de señal: hiperintensidad "↑", hipointensidad "↓", isointensidad "↔". **Deceso postQ imprevisto:** muertes de animales no previstas en el modelo experimental.

De los dos animales inoculados con el magnetofluido, uno murió a los pocos minutos de la inyección; probablemente, por desarrollar una trombosis portal masiva.

Imágenes de TCMC. Se apreció intenso realce hepático en las ratas inyectadas con lipiodol® solo (3r) y con magnetofluido (4v).

Imágenes de de RM. El comportamiento de la señal hepática en la rata de control y en los otros dos animales, fue similar al observado en el experimento previo.

El experimento **NanoMag-Portal 4**, permitió valorar el tiempo de permanencia del magnetofluido en el árbol vascular hepático, y los posibles efectos provocados por el mismo a nivel histológico. No se observaron complicaciones durante la inyección a través de vena ileo-cólica, pero un animal murió a las cinco horas de la cirugía.

Imágenes de TCMC. En los estudios practicados a las dos horas, se apreció realce hepático en todas las ratas. A los 12 días se observaban áreas parcheadas que alternaban zonas de realce con regiones limpias de contraste. A los 33 días, no quedaban restos de magnetofluido identificables en TCMC (tabla 37).

Tabla 37. Resultados del experimento NanoMag-Portal 4.

IDENTIFICACIÓN Experimento/rata		Magnetofluido: 20mg/ml		TCMC (+, +/-, -)			Deceso postQ imprevisto (horas)
		Dosis np (mg)	Dosis lipiodol® (ml/kg)	2h	12d	33d	
Nanomag- Portal 4	1r	4	1	+	+/-	-	No
	2n	4	1	+	/	/	Sí, tras 5h
	3v	4	1	+	+/-	-	No
	4r	4	1	+	+/-	-	No

np: nanopartículas. **TCMC:** teñido hepático homogéneo "+", teñido hepático heterogéneo "+/-", ausencia de realce "-". **Deceso postQ imprevisto:** muertes de animales no previstas en el modelo experimental.

Tras las pruebas de imagen, los hígados de los animales fueron extraídos y fijados en formol. En el análisis microscópico de las muestras obtenidas no se identificaron infiltrados inflamatorios, ni fenómenos de necrosis o daño celular. Tampoco se apreciaron macro-agregados de nanopartículas. Sí era posible observar una leve esteatosis y además, los espacios sinusoidales aparecían con aspecto congestivo, quizás denotando un cierto éstasis vascular (figura 58).

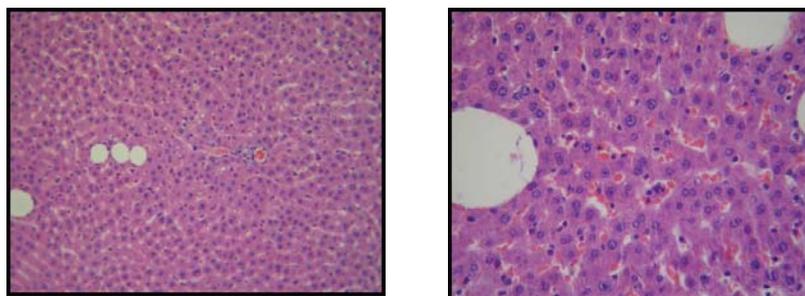


Figura 58. Preparaciones histológicas hepáticas.

2.2. Resultados de la valoración con imagen y espectrometría

El experimento **NanoMag-Espectro 0** se practicó a un grupo de ratas en las que se determinó la cantidad de hierro presente en el hígado no manipulado (tabla 38).

En las diferentes secuencias de RM realizadas, T1 y EG, los hígados de los animales mostraron un comportamiento similar al exhibido en los estudios previos. Las concentraciones totales de hierro hepático se estimaron en función de las concentraciones de metal por gramo de tejido determinadas con espectrometría, y del peso de cada víscera. Este grupo de animales de control mostró un valor medio de hierro hepático de 166,97 microg/gr (DE: 26,93). En este mismo contexto, el valor medio estimado de hierro total hepático fue de 1,41 mg (DE: 0,28).

Tabla 38. Resultados del experimento NanoMag-Espectro 0.

IDENTIFICACIÓN Experimento/rata		Magnetofluido 12mg/ml		RM			Peso Hígado (g)	Espectrom.Fe hepático (microg/g)	Fe total estimado (mg)
		Dosis np (mg)	Dosis lipiodol® (ml/kg)	T1	EG (4) (14)				
Nanomag- Espectro 0	1n	/	/	↔	↔	↓	8,5	151	1,283
	2n	/	/	↔	↔	↓	9	206	1,854
	3n	/	/	↔	↔	↓	8,1	160-180	1,377
	5r	/	/	↔	↔	↓	8,3	147	1,220

np: nanopartículas. RM, Intensidad de señal: hiperintensidad "↑", hipointensidad "↓", isointensidad "↔".

En el experimento **NanoMag-Espectro 1** se administraron 0,25ml de fluido a través de la vena ileo-cólica (tabla 39). En la rata 2a el proceso de inyección fue deficiente, y las determinaciones obtenidas en este animal no se consideraron para los cálculos posteriores. En todos los animales se apreció una significativa hipointensidad hepática en las secuencias EG. El valor medio de concentración de hierro calculado a partir de

las concentraciones medidas con espectrometría, fue de 427,63 microg/g (DE: 21,93).

El valor medio de hierro total estimado fue de 3,24 mg (DE: 0,12).

Tabla 39. Resultados del experimento NanoMag-Espectro 1.

IDENTIFICACIÓN Experimento/rata		Magnetofluido 12mg/ml		RM		Peso Hígado (g)	Espectrom.Fe hepático (microg/g)	Fe total estimado (mg)
		Dosis np (mg)	Dosis lipiodol® (ml/kg)	T1	EG (4) (14)			
Nanomag- Espectro 1	1a	3	0,8	↔	↓ ↓↓	8,2	412	3,378
	2a	3	0,8	↔	↓ ↓↓	8,4	289	-
	3a	3	0,8	↔	↓ ↓↓	7,5	419	3,142
	4r	3	0,8	↔	↓ ↓↓	7,1	453	3,216

En el experimento **NanoMag-Espectro 2**, se inyectó a los animales 0,35ml de suspensión a través de la vena ileo-cólica (tabla 40). En todos los animales se apreció una intensa hipointensidad hepática en las secuencias EG que se hizo especialmente llamativa en las secuencias con TE de 14ms (figura 59).

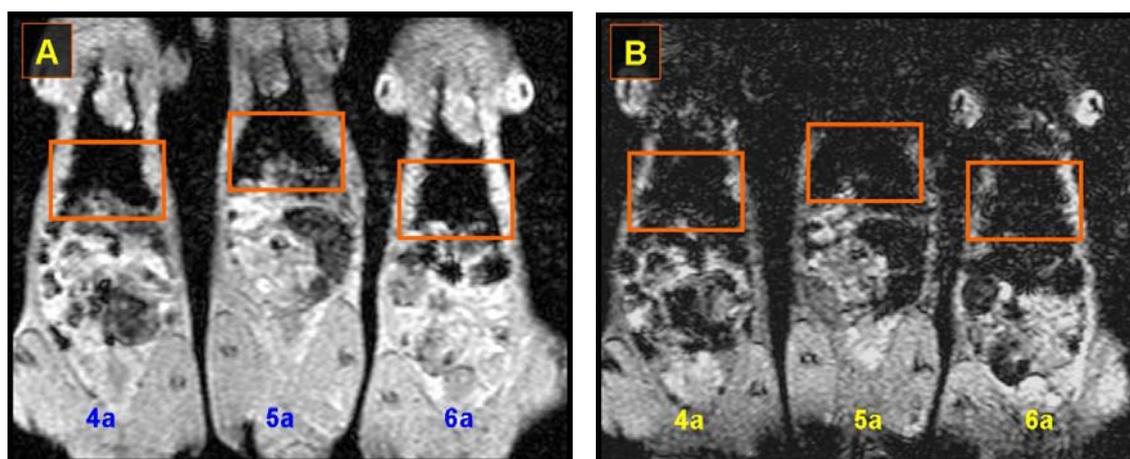


Figura 59. Secuencias en proyección coronal.

Los rectángulos naranjas indican la ubicación del hígado. A. Secuencia EG (120/4), los hígados de las tres ratas aparecen muy hipointensos con respecto a la musculatura de las extremidades inferiores. B. Secuencia EG (120/14), los hígados son extremadamente hipointensos e incluso provocan cierto artefacto de susceptibilidad magnética en las vísceras vecinas, secundario a las elevadas cantidades de hierro.

En estos animales, el valor medio de concentración de hierro fue de 548,43 microg/g (DE: 63,99), y el valor medio de hierro total estimado fue de 4,31mg (DE: 0,83).

Tabla 40. Resultados del experimento NanoMag-Espectro 2.

IDENTIFICACIÓN Experimento/rata		Magnetofluido 12mg/ml		RM			Peso Hígado (g)	Espectrom.Fe hepático (microg/g)	Fe total estimado (mg)
		Dosis np (mg)	Dosis lipiodol® (ml/kg)	T1	EG (4) (14)				
Nanomag- Espectro 2	4a	4,2	1,2	↔	↓↓	↓↓↓	7,3	605	4,416
	5a	4,2	1,2	↔	↓↓	↓↓↓	7,7	513	3,95
	6a	4,2	1,2	↔	↓↓	↓↓↓	9,1	606	5,514
	4v	4,2	1,2	↔	↓↓	↓↓↓	7,5	481	3,607

np: nanopartículas. RM, Intensidad de señal: hiperintensidad "↑", hipointensidad "↓", isointensidad "↔".

Tras sustraer los valores de concentración media de hierro total endógeno, calculados en las ratas de control, de los obtenidos en los animales que recibieron fluido magnético, la concentración media de metal atribuible a administración exógena en las ratas del experimento NanoMag-Espectro 1 fue de 1,83 mg, y en las del experimento NanoMag-Espectro 2 de 2,9mg. Teniendo en cuenta que en estos dos experimentos se administraron 3 y 4,2mg de nanopartículas de hierro, de ello se deduce que en los sinusoides hepáticos quedó aproximadamente depositado el 61% y el 69% del hierro administrado por vía exógena.

2.3. Sinopsis de resultados de la administración intravenosa

Considerando los experimentos de los apartados 2.1 y 2.2, sólo se produjeron muertes durante la cirugía en dos de los 22 animales a los que se les administró fluido, lo que

supone un 9% de mortalidad atribuible al proceso quirúrgico de administración por vía intravenosa.

Por otro lado, tras descartar las dos ratas en las que se comprobó inyección deficiente de lipiodol® o magnetofluido, de los 20 animales inoculados, cuatro murieron por efectos atribuibles a la infusión, lo que supuso globalmente un 20% de mortalidad. Además, tres de los cuatro animales habían recibido dosis de 1,6ml/kg. En las ratas que recibieron dosis menores de 1ml/kg no se produjeron decesos imprevistos.

Pese a que en los experimentos *in vitro* los resultados sugerían que las secuencias EG de TE largo eran las más adecuadas para detectar la presencia de nanopartículas, en los experimentos *in vivo* fueron las secuencias con TE de 4ms, las más adecuadas en la identificación de metal hepático.

2.4. Experimentos de infusión por vía intra-arterial

En el experimento **NanoMag-Arterial 1** para valorar la técnica quirúrgica y la administración intra-arterial del fluido, dos animales murieron en las primeras tres horas tras la cirugía, cuatro en las 24 horas siguientes y tres entre las 24 y 48 horas tras la administración del lipiodol®. Asumiendo las muertes ocurridas en las tres horas tras la cirugía como un efecto directo de la misma, ello supuso un 20% de mortalidad relacionado con el proceso quirúrgico de administración. Por otro lado, de los ocho animales restantes, siete murieron en las horas siguientes a la administración del fluido. Es decir, el 87% de las ratas a las que les administraron dosis de lipiodol® de 0,6 -1ml/kg, murieron en un plazo de 48 horas.

A los dos animales que experimentaron deceso per-operatorio se les extrajo el hígado. Tras fijar la víscera en formol se practicó TCMC. La muerte precoz de los animales evitó la progresión distal del contraste que quedó detenido en el árbol arterial principal. Este evento permitió un estudio pormenorizado de la vascularización del hígado.

Irrigación arterial hepática (figura 60): La arteria hepática, en las proximidades del hilio, se ramifica en tres derivaciones principales:

- Una rama común que irriga tanto el proceso caudado como el lóbulo derecho.
- Segunda ramificación que da flujo a los dos segmentos del proceso papilar.
- Tercer tronco arterial que irriga tanto el lóbulo medial como el lóbulo izquierdo.

De este último tronco nace en primer lugar una rama arterial que nutre parte del segmento derecho del lóbulo medial. Seguidamente, una segunda rama, con bifurcación precoz, da flujo a los segmentos derecho e izquierdo del lóbulo medial. Finalmente, el extremo distal del tercer tronco arterial irriga el lóbulo lateral izquierdo. Esta arteria, en el seno del tejido visceral, se ramifica en varias arteriolas hepáticas.

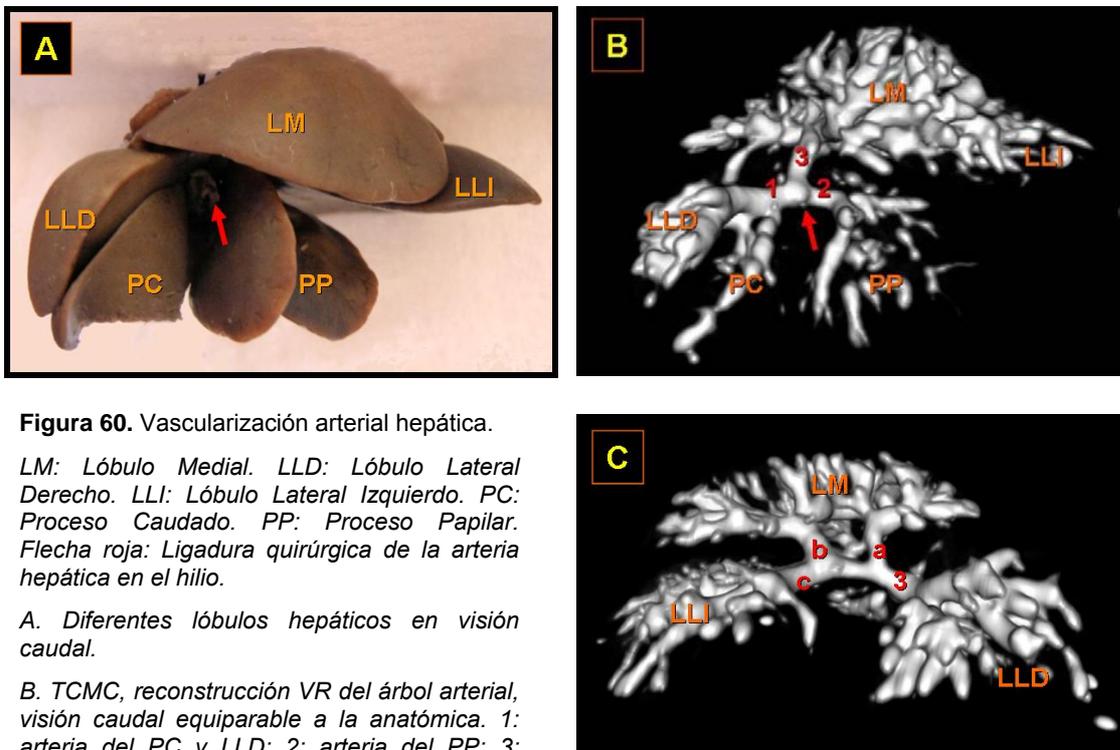


Figura 60. Vasculización arterial hepática.

LM: Lóbulo Medial. LLD: Lóbulo Lateral Derecho. LLI: Lóbulo Lateral Izquierdo. PC: Proceso Caudado. PP: Proceso Papilar. Flecha roja: Ligadura quirúrgica de la arteria hepática en el hilio.

A. Diferentes lóbulos hepáticos en visión caudal.

B. TCMC, reconstrucción VR del árbol arterial, visión caudal equiparable a la anatómica. 1: arteria del PC y LLD; 2: arteria del PP; 3: arteria del LM y LLI.

C. TCMC, reconstrucción VR del árbol arterial, visión craneal, opuesta a la visión anatómica. 3: arteria del LM y LLD; a: arteria del segmento derecho del LM; b: arteria de los segmentos derecho e izquierdo del LM; c: arteria del LLI.

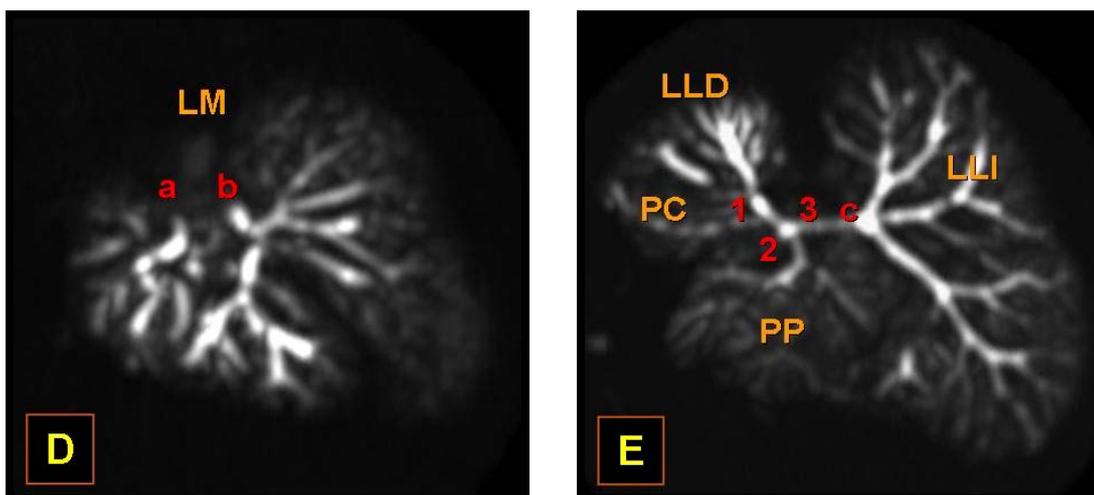


Figura 60 cont. Vascularización arterial hepática.

D. TCMC, reconstrucción MIP del árbol arterial, visión frontal del LM; a: arteria del segmento derecho del LM; b: arteria de los segmentos derecho e izquierdo del LM.

E. TCMC, reconstrucción MIP del árbol arterial en visión frontal y habiendo eliminado el volumen correspondiente a la vascularización del LM. 1: arteria del PC y LLD; 2: arteria del PP; 3: arteria del LM y LLI; c: arteria del LLI.

En el experimento **NanoMag-Arterial 2** se valoró la correcta administración intra-arterial de lipiodol®. En tres casos se apreció una adecuada administración del contraste, caracterizada por homogénea hiperdensidad hepática. Sin embargo, en dos casos (40%) se apreciaron datos de administración deficiente del lipiodol® (figura 61).

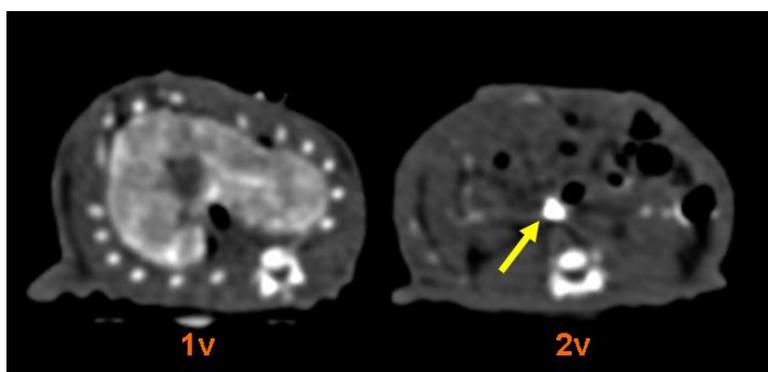


Figura 61. Administración intra-arterial de lipiodol®, TCMC, cortes axiales.

En la rata 1v se observa adecuada y homogénea hiperdensidad en el parénquima hepático, lo cual supone una adecuada infusión del lipiodol®. En la rata 2v se indica un foco hiperdenso retroperitoneal de lipiodol® (flecha) y mínimos focos de contraste en el hígado.

En resumen, la administración intra-arterial del magnetofluído resultó un proceso de realización dificultosa, con un 20% de mortalidad directamente atribuible al mismo. Además, la tasa de procedimientos inadecuados fue elevada: en un 40% de casos el procedimiento no se consiguió realizar correctamente. En este contexto, la TCMC resultó útil para determinar la correcta administración intra-arterial del lipiodol®. Finalmente, las dosis de lipiodol® usadas, bien toleradas en los procesos de administración intravenosa, produjeron una alta mortalidad por vía arterial, lo cual plantea la necesidad de desarrollar procedimientos de infusión selectiva de los fluidos. Estos procedimientos deberán basarse en la característica vascularización arterial descrita en este apartado.

Resultados de los experimentos realizados en el modelo experimental de metástasis hepáticas múltiples

En este apartado se presentan los resultados de los experimentos en los que se administró magnetofluido a través de arteria celiaca, a dos grupos de ratas con metástasis en diferentes estadios evolutivos.

1. Experimento preliminar: vascularización del hígado metastático

Previamente a la administración de los magnetofluidos por vía de la arteria celiaca, se realizó un experimento preliminar para corroborar la irrigación exclusivamente arterial de las metástasis hepáticas. Para ello se administró lipiodol® por vía venosa y arterial y se comprobó su difusión en hígado metastático mediante TCMC. Descripción de los resultados:

•Lipiodol® a través de vena ileo-cólica:

En ninguna de las dos ratas a las que se administró el lipiodol® intra-venoso se produjeron complicaciones derivadas del proceso quirúrgico.

En el escáner realizado en uno de los animales se apreció parcial captación del parénquima hepático. En la necropsia se comprobó que el hígado no realizado se encontraba extensamente infiltrado por tejido neoplásico.

En la TCMC practicada a la segunda rata se observó un foco nodular de ausencia de captación en el lóbulo izquierdo, de 5mm de diámetro. Tras practicar la necropsia al animal, se comprobó que el déficit de captación era motivado por la presencia una lesión tumoral (figura 62).

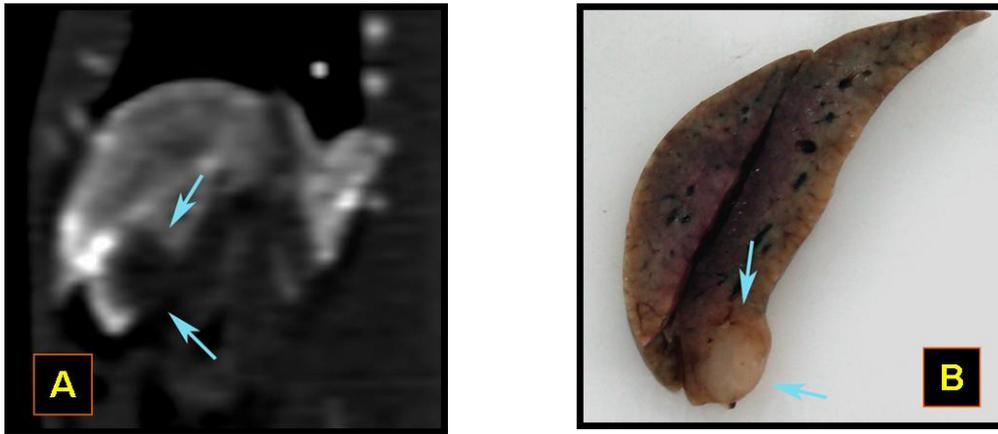


Figura 62. Experimento preliminar, administración intravenosa de contraste.

A. TCMC, reconstrucción sagital. Foco de defecto de captación (flechas azules) en zona profunda de lóbulo lateral izquierdo.

B. Sección histológica similar a la imagen de escáner. Se presenta la lesión metastática (flechas azules) no realizada en el estudio de imagen.

•Lipiodol® a través de arteria celiaca:

El experimento sólo pudo ser concluido en una de las ratas, puesto que el otro animal no se recuperó de la anestesia.

En la rata estudiada se observó una tenue captación de contraste en el parénquima hepático, y una masa hipercaptante ubicada en el proceso papilar. En el estudio de necropsia se comprobó que la lesión realizada con intensidad se correspondía con un conglomerado de varias metástasis (figura 63).

De los resultados obtenidos se deduce que también en nuestro modelo experimental la irrigación de las metástasis procede exclusivamente de vasos arteriales. El aporte de las nanopartículas suspendidas en lipiodol® ha de ser, por tanto, realizado por vía arterial, tal y como había sido previamente planteado.

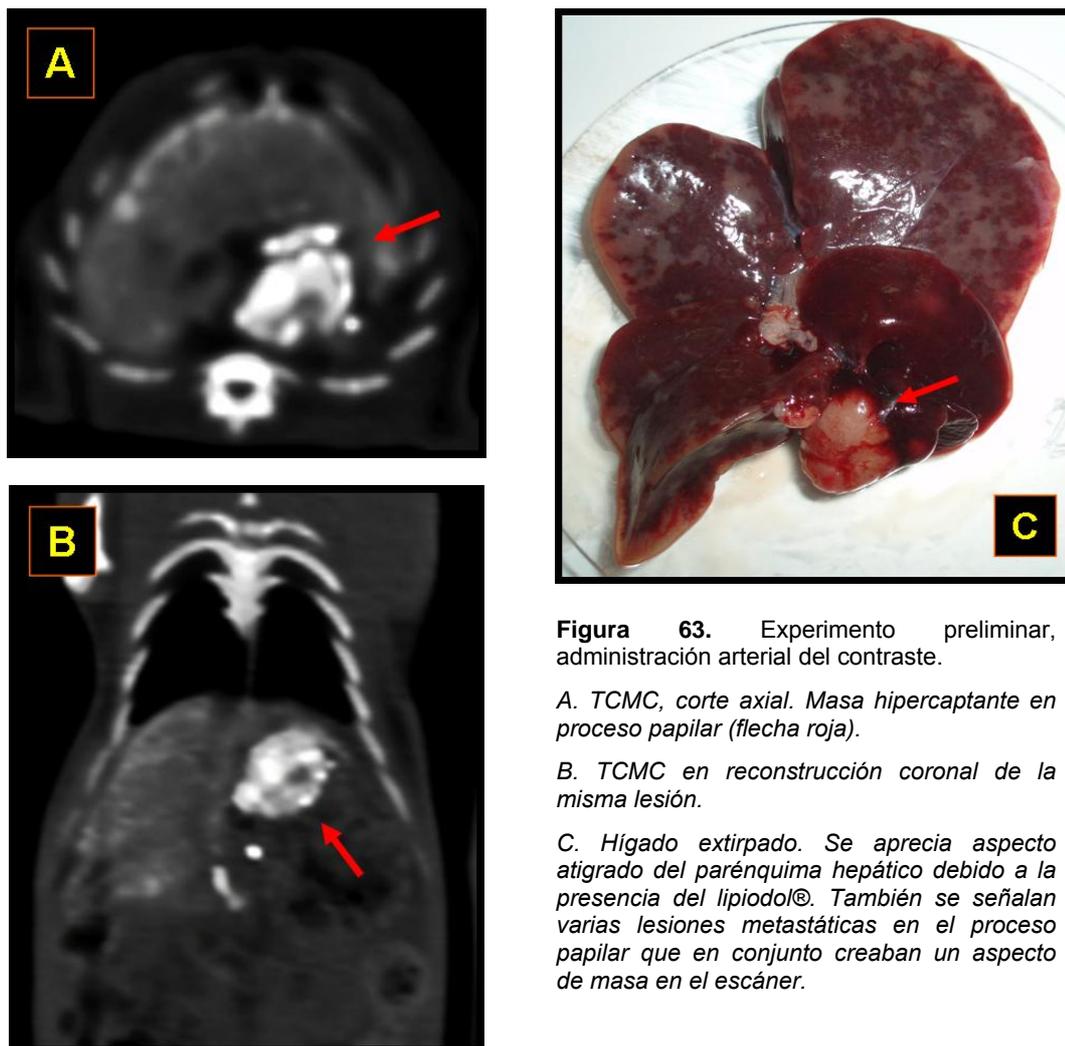


Figura 63. Experimento preliminar, administración arterial del contraste.

A. TCMC, corte axial. Masa hipercaptante en proceso papilar (flecha roja).

B. TCMC en reconstrucción coronal de la misma lesión.

C. Hígado extirpado. Se aprecia aspecto atigrado del parénquima hepático debido a la presencia del lipiodol®. También se señalan varias lesiones metastáticas en el proceso papilar que en conjunto creaban un aspecto de masa en el escáner.

2. Resultados relativos a la administración intra-arterial del magnetofluido en hígado metastático

Los experimentos realizados para evaluar el depósito de nanopartículas magnéticas en hígado y metástasis, se practicaron sobre un número inicial de 23 ratas. De ellas, 20 desarrollaron patología metastática hepática y cinco animales murieron durante los diferentes procesos quirúrgicos y de infusión de los magnetofluidos. La administración de 1,5mg de nanopartículas en 0,15ml de lipiodol®, se practicó a los 24 días de la

diseminación tumoral en el grupo de infusión precoz (GIP), y a los 33 días en el grupo de infusión tardía (GIT). El grupo control quedó constituido también por cinco animales procedentes del remanente de ratas de los grupos anteriores, dos del GIP y tres del GIT.

2.1. Técnicas de imagen

En las siguientes 12 horas tras la administración de las suspensiones, los animales de los experimentos GIP y GIT se sometieron a los procedimientos de imagen.

Descripción de los resultados:

- **Experimento GIP**

En los estudios de TCMC se observó realce homogéneo del parénquima hepático atribuible a la presencia de lipiodol®.

En los procedimientos de RM se detectaron lesiones nodulares hiperintensas, compatibles con metástasis, en las secuencias STIR. En las secuencias EG no fue posible detectar las metástasis, dado que la presencia de nanopartículas en su árbol vascular las hizo indistinguibles del resto del hígado sano (figura 64).

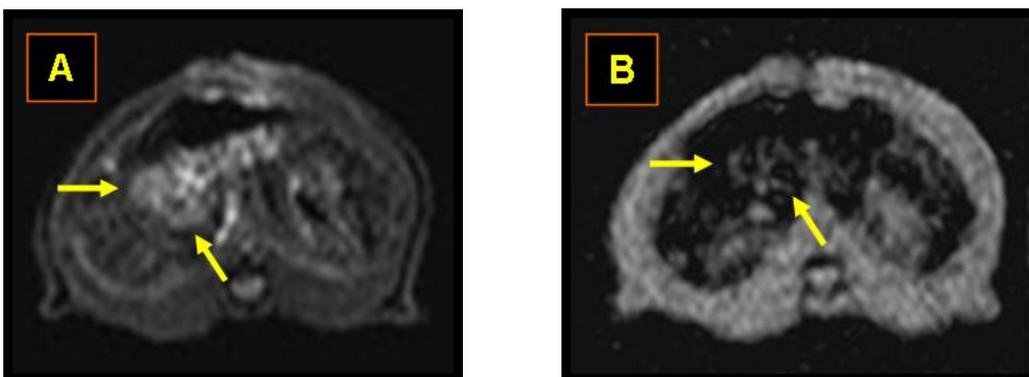


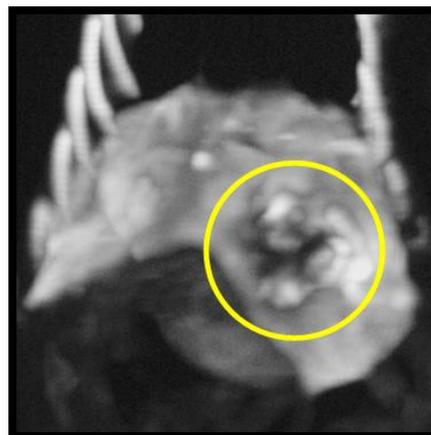
Figura 64. RM del experimento GIP.

A. Secuencia STIR (3600/29; TI: 130). Se indican dos lesiones metastáticas hiperintensas.

B. Secuencia EG (120/4). Las metástasis aparecen hipointensas, al igual que el parénquima hepático circundante.

- **Experimento GIT**

En TCMC el hígado se mostró hiperdenso debido a la presencia del lipiodol®; sin embargo, también se observaron áreas de heterogénea distribución del contraste, en las que se alternaban zonas de ausencia o mínimo realce con focos de hipercaptación.



Estas imágenes eran sugestivas de corresponder a lesiones metastáticas grandes (figura 65).

Figura 65. TCMC del experimento GIT. Hallazgo sugestivo de metástasis en lóbulo izquierdo. Lesión con periferia hipercaptante y centro hipodenso.

En los estudios de RM y en las secuencias STIR, se detectaron masas policíclicas hiperintensas que resultaban compatibles con infiltraciones tumorales más extensas que las observadas en GIP. Sin embargo, en las secuencias EG las masas eran parcialmente identificables. En estas imágenes, las lesiones mostraban una zona central isointensa a la musculatura paravertebral, y una periferia hipointensa indistinguible del parénquima hepático (figura 66).

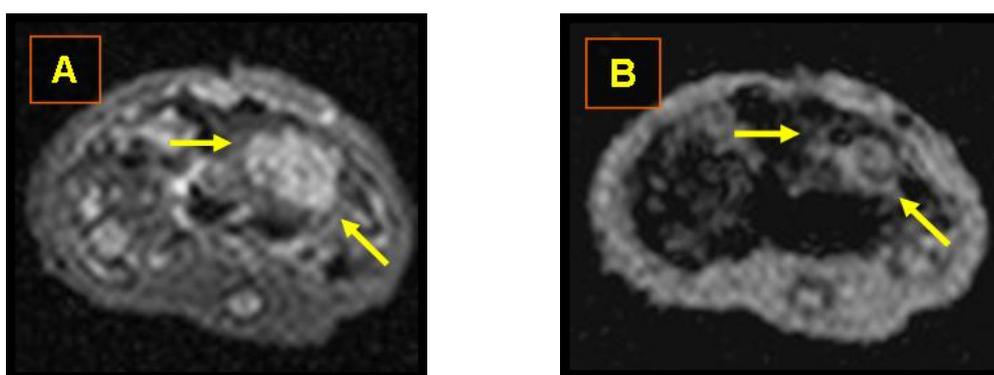


Figura 66. RM del experimento GIT.

A. Secuencia STIR (3600/29/130). Se señala una masa metastática en el lóbulo izquierdo,

B. Secuencia EG (120/4). La metástasis parece más pequeña, con centro isointenso a la musculatura paravertebral, pero con periferia de intensidad de señal similar al hígado adyacente.

La valoración conjunta de los hallazgos derivados de los estudios de TCMC y RM aportó los siguientes resultados:

1. Las metástasis hepáticas en las ratas GIP captaron magnetofluido de forma similar al hígado sano, puesto que no fueron distinguibles en la TCMC y tampoco en las secuencias de RM sensibles a la presencia de nanopartículas.
2. Las metástasis hepáticas en las ratas GIT captaron magnetofluido de forma irregular. Los hallazgos observados en TCMC y RM fueron concordantes con el hecho de que el fluido quedó depositado en la periferia, pero no alcanzó el lecho tumoral más íntimo.

2.2. Resultados de la determinación del hierro con espectrometría

Tras la realización de las pruebas de imagen se procedió a sacrificar a los animales. Se extrajeron los hígados para determinar la infiltración metastática y cotejar los hallazgos con las pruebas de imagen, y para tomar las diferentes muestras tisulares de las que se obtendrían las concentraciones de hierro.

Descripción de los resultados:

- **Experimento GIP**

En el estudio visual, los hígados de las cinco ratas mostraron un desarrollo tumoral no muy profuso, con metástasis que en ningún caso superaron los 3mm de diámetro. Tampoco en ningún caso se apreciaron más de diez focos tumorales (tabla 41).

Las imágenes sugestivas de patología tumoral apreciadas en las secuencias STIR de RM, se correspondieron con lesiones metastáticas.

Del tejido hepático se recogieron cinco muestras de 119-486mg. El valor de la mediana de la concentración de hierro fue de 203,8microg/g (rango: 169,6-236,1).

Del tejido tumoral se tomaron seis muestras con pesos de 22-361mg. La mediana de la concentración de metal en ellas fue de 202,6microg/g (rango: 144,9-371,7), (figura 67).

Tabla 41. Resultados del experimento GIP.

IDENTIFICACIÓN Experiment/ rate	DESARROLLO TUMORAL		MUESTRAS					
			HÍGADO			METÁSTASIS		
	Nº/	Tamaño <3/ 3-7/ >7	Ident.	Peso (mg)	Esptr-Fe microg/g)	Ident.	Peso (mg)	Esptr-Fe microg/g)
GIP	2R	7 <3	2RH	486	169,6	2RM	124	161,7
	3R	8 <3	3RH	281	203,8	3RM	273	186,3
	5R	6 <3	5RH	474	194	5RM	361	144,9
	1AN	10 <3	1ANH	182	236,1	1ANM1	65	218,8
						1ANM2	119	243,9
2AN	7 <3	2ANH	119	214	2ANM	22	371,7	

Esptr-Fe: Valores de las concentraciones de hierro determinadas con espectrometría.

- **Experimento GIT**

Tras la extracción hepática y análisis visual, en las cinco vísceras se apreció desarrollo tumoral más profuso, tanto en el número de implantes como en el tamaño de los mismos (tabla 42).

Se comprobó que los hallazgos observados en TCMC y en RM se correspondieron con metástasis grandes o segmentos hepáticos profusamente infiltrados por patología metastática. En ningún caso se apreció necrosis tumoral.

Para el análisis de espectrometría se tomaron cinco muestras de tejido hepático sano con pesos de 182-493mg. El valor de la mediana de la concentración de hierro fue de 174,3 microg/g (rango: 148,5-213,2).

Por otro lado, se tomaron ocho muestras de tejido tumoral con pesos de 77-492mg. El valor de la mediana del metal obtenida fue de 69,9 microg/g (rango: 47,4-90,8), (figura 67).

Tabla 42. Resultados del experimento GIT.

IDENTIFICACIÓN Experiment/ rata	DESARROLLO TUMORAL		MUESTRAS					
			HÍGADO			METÁSTASIS		
	Nº	Tamaño <3/ 3-7/ >7	Ident.	Peso (mg)	Espr-Fe microg/g)	Ident.	Peso (mg)	Espr-Fe (microg/g)
GIT	2V	12 3-7	2VH	722	203,3	2VM	492	84,5
	4V	10 3-7	4VH	493	174,3	4VM	217	47,4
	2A	10 >7	2AH	182	213,2	2AM1	136	85,8
						2AM2	257	90,8
	1A1R	H. Tumoral	1A1RH	358	168	A1RM1	133	64,7
						A1RM2	77	61,8
A1RM3						95	64,5	
1R	H. Tumoral	1RH	409	148,5	1RM	435	75	

Espr-Fe: Valores de las concentraciones de hierro determinadas con espectrometría.

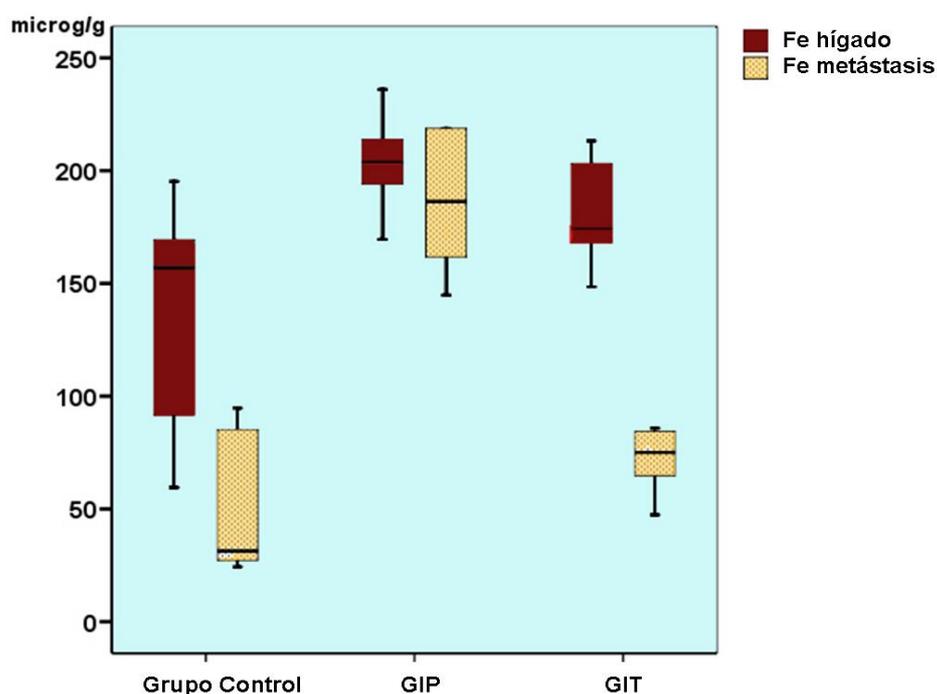
- **Experimento del grupo Control**

Del grupo de cinco ratas que no recibieron fluido magnético se obtuvieron seis muestras de tejido hepático sano y tumoral, para determinar mediante espectrometría las concentraciones de hierro endógeno (tabla 43). El peso de las muestras hepáticas fue de 73-313mg, y el de las metástasis de 48-186mg. La concentración media de metal encontrada en el tejido hepático fue de 138,3 microg/g (DS: 51,6) y en el tejido metastático de 49 microg/g (DS: 31,9), (figura 67).

Tabla 43. Resultados del experimento del grupo de ratas de control.

IDENTIFICACIÓN Experiment/ rata		DESARROLLO TUMORAL		MUESTRAS					
				HÍGADO			METÁSTASIS		
		Nº	Tamaño <3/ 3-7/ >7	Ident.	Peso (mg)	Espr-Fe microg/g)	Ident.	Peso (mg)	Espr-Fe microg/g)
Control	1C	10	<3	1CH	219	195,3	1CM	186	85,3
	2C	15	<3	2CH	313	155,6	2CM1	84	94,7
	3C	H. Tumoral	3CH1	73	91,6	3CM1	51	24,4	
			3CH2	84	59,5	3CM2	48	27,2	
	4C	H. Tumoral	4CH	135	158,4	4CM	170	31,3	
5C	H. Tumoral	5CH	166	169,5	5CM	102	31,5		

Espr-Fe: Valores de las concentraciones de hierro determinadas con espectrometría.

**Figura 67.** Diagrama de Cajas: Concentración de hierro en los diferentes grupos de ratas.

El rectángulo representa el rango intercuartil (RIQ: percentiles 25-75), la línea central es la mediana y los bigotes representan los valores extremos (máximo-mínimo) sin superar 1,5 veces el RIQ.

2.3. Análisis de los resultados de espectrometría

En el análisis estadístico de los resultados, se encontraron diferencias globales significativas tanto en los valores de concentración de hierro hepático como en los determinados en la metástasis (test de Kruskal-Wallis; respectivamente $p:0,037$ y $p:0,02$).

El estudio en detalle mostró diferencias significativas entre el hierro hepático determinado en los experimentos GIP y control ($p: 0.017$), pero no así entre las muestras de los experimentos GIP y GIT ($p: 0.222$).

Hubo diferencias significativas entre las concentraciones de hierro determinadas en las metástasis de las ratas del experimento GIP y las de control ($p: 0.002$), y entre las concentraciones de metal obtenidas de los experimentos GIP y GIT ($p: 0.001$). No se observaron diferencias entre los valores de hierro determinados en metástasis de ratas del experimento GIT y del grupo control ($p: 0.228$).

Tras sustraer los valores de concentración media de hierro endógeno calculados en las ratas de control, de los obtenidos en los animales que recibieron fluido magnético, la concentración media de metal atribuible a administración exógena en las ratas del experimento GIP fue de $172,2$ microg/g (DE: $82,2$) en el tejido tumoral y de $65,2$ microg/g (DE: $24,6$) en el tejido hepático. En estos animales, la razón entre la cantidad de metal exógeno presente en el tejido neoplásico y en el tejido sano resultó de $2,6:1$, es decir, el tejido tumoral acumuló $2,6$ veces más cantidad de hierro que el tejido hepático sano. Por otro lado, los valores de hierro exógeno determinados en las ratas del experimento GIT fueron de $22,7$ microg/g (DE: $14,7$) en el tejido metastático y de $43,1$ microg/g (DE: $26,5$) en el tejido sano. En este grupo, la razón entre el metal exógeno presente en el tejido neoplásico y en el hígado sano resultó de $0,5:1$, es

decir, las metástasis de estos animales con infiltración neoplásica más extensa acumularon la mitad de hierro exógeno que el hígado sano.

Finalmente, en el estudio comparativo entre concentraciones de hierro exógeno determinadas en hígado y metástasis intra-grupo, se encontraron diferencias significativas en el experimento GIP ($p: 0,043$), pero no se encontraron diferencias en el experimento GIT ($p: 0,138$).

DISCUSIÓN

El cáncer colo-rectal supone la tercera causa de enfermedad neoplásica en el mundo occidental. Uno de los retos que en la actualidad sigue planteando esta enfermedad, es el enfoque terapéutico de la patología metastática que un elevado porcentaje de pacientes desarrolla en el curso de su proceso patológico, y que demuestra especial predilección por el asiento hepático. En este mismo contexto puede también encuadrarse la problemática derivada de la recidiva local hepática, que surge tras la realización previa de procedimientos terapéuticos de exéresis tumoral.

En la enfermedad metastática hepática el tratamiento quirúrgico resulta de elección, sin embargo su aplicación no siempre es posible, y además, con relativa frecuencia se producen recurrencias, atribuibles al desarrollo de microimplantes tumorales alojados en el hígado remanente¹¹⁴. Similar inconveniente muestran otras terapias locales tales como la termoablación con radiofrecuencia, en donde las recidivas locales también son frecuentes. En relación con este evento y quizás en su origen, se encuentren los fenómenos de regeneración hepática que de forma fisiológica se desencadenan tras una hepatectomía parcial. Estos fenómenos se relacionan con el incremento de los niveles de determinadas citoquinas y factores de crecimiento, que no sólo estimularían la regeneración del tejido sano, sino también el desarrollo de las micrometástasis^{27,115-120}. Las células tumorales poseen receptores de superficie sensibles a estas sustancias, y su presencia inducirá la replicación celular y el consiguiente incremento de la masa tumoral. Por otro lado, los factores de crecimiento angiogénicos y

estimuladores de los fibroblastos, que desencadenan el desarrollo del andamiaje conectivo-vascular necesario para sustentar el proceso regenerativo-curativo, también colaborarían dando soporte al entramado celular tumoral.

Dado que el hígado es el órgano sólido que con mayor frecuencia sufre patología neoplásica primaria o metastática¹²¹ y de acuerdo con lo expuesto, el desarrollo de técnicas de diagnóstico capaces de detectar con precocidad la lesión neoplásica, y de terapias enfocadas al tratamiento local de la misma, se encuentran en auge tanto en el ámbito clínico como en el experimental.

En los siguientes apartados se evaluarán los resultados obtenidos en nuestro estudio, relativos a la aplicabilidad de diferentes técnicas de diagnóstico por imagen en oncología experimental hepática; y se valorará la aportación de estos procedimientos de diagnóstico no invasivo en la monitorización y desarrollo de un modelo murino de metástasis de adenocarcinoma de colon. También se argumentará sobre la competencia de los procedimientos de imagen a la hora de determinar la adecuada consecución de un depósito intra-vascular de fluidos magnéticos con finalidad terapéutica, tanto en tejido hepático sano como en tejido neoplásico. Finalmente, basándonos en los resultados obtenidos en los procedimientos de imagen, y conjuntamente con las determinaciones aportadas por la aplicación de técnicas de laboratorio, se razonará sobre la teórica capacidad de inducción térmica de los fluidos magnéticos, así como sobre su potencial rendimiento y utilidad en la terapéutica clínica.

La monitorización del modelo experimental mediante técnicas de imagen

1. Evaluación morfológica mediante Ecografía

Una vez solventado el inconveniente de la imprescindible depilación previa a la práctica de la exploración ecográfica, las variaciones en la impedancia acústica entre los diferentes órganos del abdomen de la rata han hecho posible la obtención de imágenes anatómicas adecuadas, tanto del hígado como de las vísceras de vecindad. En este entorno, el conocimiento pormenorizado de la anatomía macroscópica murina, permite posteriormente discriminar con sencillez, en los estudios de US, los diferentes órganos. Además, la posibilidad de complementar las imágenes morfológicas con las derivadas de la aplicación de las diferentes técnicas de US-Dópler, facilita la identificación y localización de las estructuras vasculares arteriales y venosas.

Los dos equipos de US de los que se ha dispuesto han permitido practicar con solvencia los estudios ecográficos anatómicos. Sin embargo y como era previsible, las US obtenidas con la sonda lineal multi-frecuencia de 6-18 MHz, han proporcionado imágenes con mayor detalle anatómico que las conseguidas con el ecógrafo dotado del transductor de 10 MHz. Esta circunstancia resulta concordante con el hecho conocido de que las ondas sónicas de frecuencias más altas proporcionan imágenes de mayor resolución espacial. Además, aunque estas ondas también poseen una menor capacidad de penetración en los tejidos, esta limitación no afecta a las US realizadas en animales con pesos superiores a los 200gr, en los que en general, no se exploran estructuras ubicadas a una distancia del transductor superior a los 25mm.

En lo referente al estudio y reconocimiento morfológico de la patología, la US ha permitido detectar las masas inflamatorias en el 92% de los animales explorados. Esta elevada tasa de detección está motivada por dos causas. De un lado, las propias características morfológicas de las masas inflamatorias les confieren un aspecto lo suficientemente característico como para que puedan ser fácilmente distinguibles de las estructuras de vecindad. Por otro lado, el tamaño de estas lesiones, en varios casos superior a los 10 mm, también ha permitido su localización e identificación. En esta primera aproximación al diagnóstico patológico por imagen, ya se apunta una de las mayores utilidades atribuibles a la monitorización no invasiva de los modelos experimentales, tal es la posibilidad de realizar estudios longitudinales evolutivos, es decir, controles sucesivos del desarrollo nosológico en los mismos individuos¹²². En estas US practicadas sobre los mismos grupos de animales, se ha podido comprobar la progresiva disminución de tamaño de las masas inflamatorias, las modificaciones en sus características morfológicas y su transformación hasta quedar convertidas en lesiones de tipo cicatricial (figura 68). Estos focos cicatriciales se comportan como imágenes altamente ecogénicas o refringentes y su aspecto ecográfico coincide con el de otros procesos cicatriciales pero de diferente etiología, como son los relacionados con fenómenos de necrosis y fibrosis tumoral¹²³.



Figura 68. US evolutiva de las masas inflamatorias.

A. Gran masa inflamatoria de 13 mm. B. Tras 6 días la lesión ha disminuido de tamaño, diámetro: 10 mm. Se observa con mayor claridad la formación de una pseudocapsula que rodea la zona central necrótica hiperecoica. C. En otro animal se observa una lesión muy ecogénica (flechas) que en el análisis patológico se correspondió con una pequeña lesión residual fibro-cicatricial.

Mediante la aplicación de los signos y criterios ecográficos de afectación tumoral hepática⁶⁷ se han detectado globalmente el 52% de las lesiones metastáticas. Las masas extra-hepáticas han resultado de diagnóstico sencillo, y su presencia se ha determinado correctamente en todos los casos. Este hecho muy probablemente viene motivado por las notables diferencias de impedancia acústica existentes entre el tejido tumoral y la grasa hiperecoica peritoneal que envuelve a estos implantes.

La detección de las lesiones intra-hepáticas entraña más dificultades. En trabajos previamente publicados se han estudiado modelos oncológicos animales de lesiones de asiento hepático tales como hepatoma, metástasis de melanoma murino o metástasis de carcinoma humano de colon y de mama¹²²⁻¹²⁴. En estos modelos, las lesiones tumorales presentaban invariablemente un aspecto hipoecoico, y su distinción respecto del parénquima adyacente, según los autores de los trabajos, resultaba adecuada. Sin embargo, las características ecográficas de las lesiones observadas en nuestro modelo son distintas a las descritas en los estudios previamente aludidos. En nuestro modelo experimental, y al igual que se ha constatado a nivel clínico, las metástasis de adenocarcinoma de colon se comportan como nódulos más o menos hiperecoicos⁷¹⁻⁷³, que destacan con mayor o menor claridad sobre el patrón ecográfico de fondo. Quizás este aspecto se encuentre en relación con diferencias en cuanto al grado de vascularización y al estadio evolutivo de las lesiones neoplásicas, puesto que como ya ha sido expuesto, las lesiones más vascularizadas suelen mostrar un aspecto más ecogénico^{69,70}. Dado que en general y *a priori* la vascularización relativa de una lesión disminuye en relación a su incremento volumétrico, esto supondría que la ecoestructura de las lesiones de mayor tamaño disminuiría, lo cual comportaría dificultades en cuanto a su identificación. Sin embargo, este efecto queda minimizado al concurrir otros signos ecográficos. Así, el incremento volumétrico tumoral lleva aparejado el desarrollo de deformidades en los

contornos hepáticos, y esta circunstancia se hace más evidente cuando varias lesiones neoplásicas asientan en un mismo lóbulo hepático. Quizás esta última causa sea la responsable de que las infiltraciones tumorales con mayor porcentaje de detección, 55%, se hallen ubicadas en el lóbulo caudado, localización que con más frecuencia se ha visto afectada por una invasión neoplásica más profusa.

En nuestro trabajo no se han practicado estudios ecográficos longitudinales para evaluar los cambios morfológicos evolutivos de las lesiones tumorales. Sin embargo, la práctica de un amplio número de series de US realizadas en animales con infiltración tumoral hepática más o menos profusa, hace posible el dibujo ecográfico del modelo de progresión neoplásica descrito a continuación (figura 69):

- En estadios iniciales las lesiones neoplásicas aparecen como nódulos hiperecoicos bien definidos.
- Cuando los nódulos se ubican en las proximidades de la cápsula hepática, o cuando al incrementar su volumen alcanzan la superficie del hígado, inducen un festoneado o deformación de los contornos hepáticos.
- En estadios más avanzados las metástasis confluyen e invaden ampliamente los lóbulos hepáticos, los cuales adoptan un aspecto hinchado por la gran masa tumoral que acumulan.
- Durante la progresión volumétrica el patrón ecográfico se modifica, y tiende a volverse más heterogéneo e iso o hipoecoico respecto al hígado; este evento, tal y como se ha apuntado previamente, puede encontrarse en relación a cambios en el grado de vascularización tumoral.

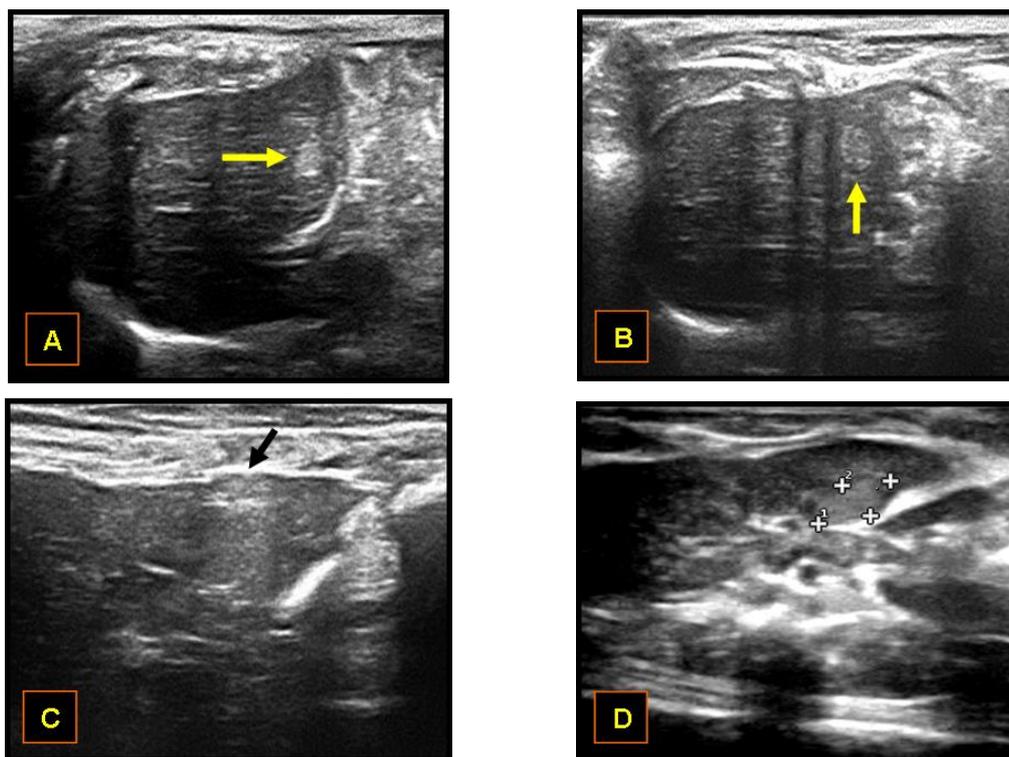
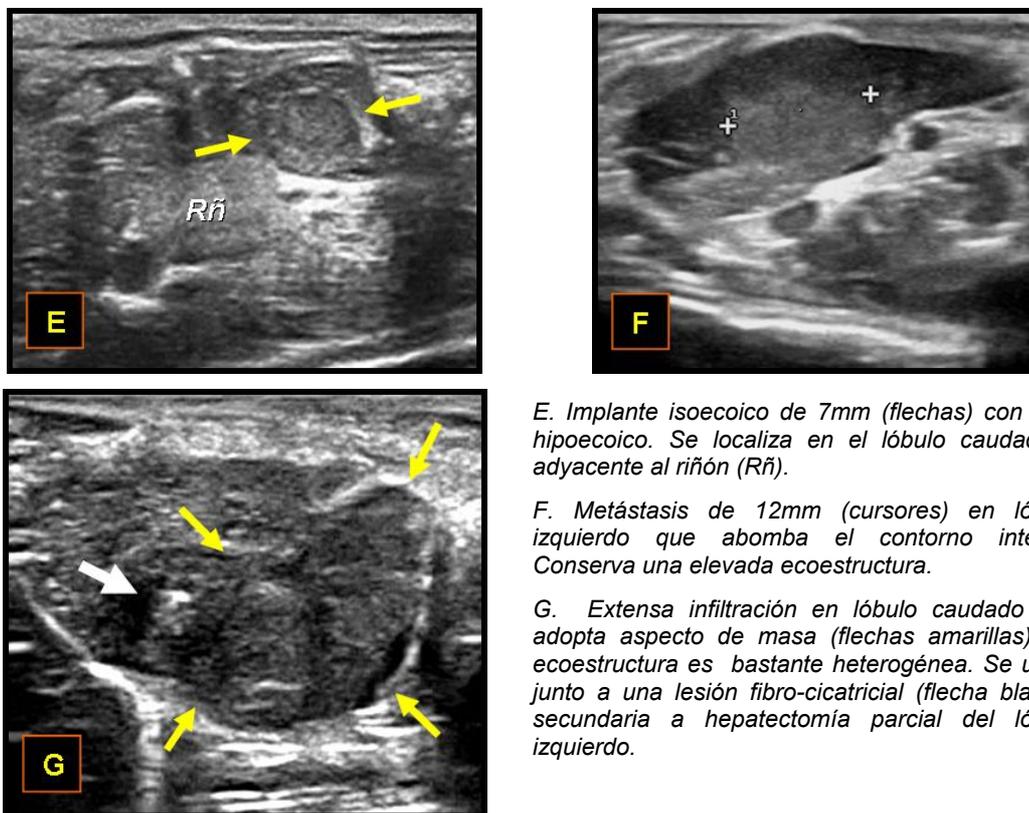


Figura 69. Secuencia evolutiva ecográfica del desarrollo tumoral en el modelo experimental.

A y B. Estadio precoz de metástasis hiperecoicas (flechas amarillas) en dos ratas, diámetro: 2,5mm. C. Festoneado hepático por presencia de dos metástasis subcapsulares (flecha). D. Contorno hepático abombado (cursores de medida) por presencia de un implante hiperecoico de 6x3mm.



E. Implante isoecoico de 7mm (flechas) con halo hipoeicoico. Se localiza en el lóbulo caudado y adyacente al riñón (Rñ).

F. Metástasis de 12mm (cursores) en lóbulo izquierdo que abomba el contorno interno. Conserva una elevada ecoestructura.

G. Extensa infiltración en lóbulo caudado que adopta aspecto de masa (flechas amarillas). La ecoestructura es bastante heterogénea. Se ubica junto a una lesión fibro-cicatricial (flecha blanca) secundaria a hepatectomía parcial del lóbulo izquierdo.

Las variaciones en el patrón ecográfico de las lesiones tumorales han sido también descritas en otros modelos experimentales. Así, la aparición de focos anecoicos en el seno de lesiones sólidas hipoecoicas implica el desarrollo de focos de necrosis tumoral, mientras que la observación de focos de ecoestructura aumentada en lesiones previamente hipoecoicas, denota la aparición de fenómenos fibro-cicatriciales^{122,123,125}. En este ámbito, el conocimiento de la dinámica del desarrollo tumoral y de los cambios morfológicos ecográficos asociados, resultan interesantes no sólo para aprender el curso natural de la enfermedad, sino también porque posibilita la evaluación y monitorización de la eficacia de hipotéticos tratamientos anti-tumorales. La competencia como método de control no invasivo de progresión de la patología que brinda la US, permite evaluar más eficazmente la utilidad de estos nuevos tratamientos^{122,125}, puesto que posibilita la realización de estudios secuenciales de respuesta terapéutica en el mismo grupo de individuos a examen.

Otro de los factores determinantes a la hora de conseguir detectar lesiones en estadios más precoces viene limitado por la potencia acústica de las sondas de US empleadas. En nuestro modelo experimental se han logrado detectar el 91% de las lesiones superiores a 7 mm y sólo el 29% de las lesiones de tamaño próximo a los 3mm. Sin embargo, cuando se han considerado de forma aislada los casos detectados con la sonda lineal multi-frecuencia de 6-18 Mhz, se consiguen identificar el 50% de las lesiones de tamaño igual o menor a 3mm. En estudios experimentales de hepatoma murino y utilizando sondas de 10 MHz, el límite de detección de las lesiones neoplásicas se ha establecido en los 5mm de diámetro tumoral¹²³, mientras que en otros estudios practicados con sondas de 15 MHz el límite ha quedado establecido en los 3,7mm¹²⁴. Finalmente, aplicando la tecnología de biomicroscopía ecográfica¹²⁶ en la que se emplean sondas de muy alta frecuencia, hasta 40 MHz, se consiguen detecciones de lesiones metastáticos hepáticas de hasta 0,22mm de

diámetro¹²². Estas consideraciones demuestran claramente la relación existente entre la frecuencia suministrada por las sondas ecográficas y la capacidad de resolución y detección. Sin embargo, no se debe olvidar el hecho de que la mayor frecuencia implica menor capacidad de penetración en los tejidos, de tal forma que al elegir un equipo de ecografía se debe establecer un balance entre lo que se quiere explorar y la sonda que debe ser utilizada. En este contexto y en el caso de biomicroscopía ecográfica, debe ser observado el detalle de que la profundidad focal efectiva obtenida con esta tecnología se encuentra en el rango de los 6mm, y esta característica es la responsable de que su uso quede restringido a modelos experimentales de ratón.

En función de todo lo expuesto, a la hora de estudiar modelos de patología hepática tumoral, puede resultar de interés elegir estirpes neoplásicas con características ecográficas que permitan una fácil distinción entre tejido patológico y tejido sano. Es posible que las lesiones hipoecoicas resulten mejor identificables que las hiperecoicas, pero en cualquier caso las diferencias de ecoestructura expuestas en nuestro modelo parecen suficientes. Además, el reconocimiento y aparición conjunta de varios signos ecográficos de infiltración tumoral, también incrementa la sensibilidad de la técnica ecográfica y en nuestra experiencia, el uso de sondas con frecuencia máxima de 18 MHz ha resultado de utilidad en la monitorización del modelo experimental.

A modo de síntesis se puede establecer que la valoración morfológica con US del modelo experimental ha exigido del conocimiento preliminar de una serie de variables:

- Anatomía ecográfica del área a explorar.
- Características de las lesiones a estudio y de su curso evolutivo natural.
- Posibles limitaciones de la tecnología ecográfica disponible.

Y de este modo, la adecuada observación de estas premisas ha brindado una serie de interesantes aportaciones:

- Capacidad de detectar la patología y de discriminar los individuos que la desarrollan de los que, por diferentes motivos, no se ven afectados por el proceso nosológico.
- Posibilidad de establecer el diagnóstico diferencial entre diferentes tipos de lesiones: neoplasia intra-hepática, implante extra-hepático y masa inflamatoria.
- Propiciar el estudio evolutivo de los diferentes tipos de lesiones, sobre todo en lo referente a estudios de valoración no invasiva de respuesta a hipotéticas terapias.

2. Utilidad de la Ecografía Dópler hepática

La progresión de un proceso neoplásico requiere del desarrollo de un entorno vascular adecuado que permita el incremento de la masa tumoral. Estos fenómenos de neoangiogénesis aparecen con volúmenes de neoplasia de $1\text{-}2\text{mm}^3$ ^{127,128}.

El modelo experimental del presente estudio, dejado a su progresión natural, evoluciona hacia una profusa infiltración del parénquima hepático. En efecto, en los experimentos ECO-8 y sobre todo en ECO-9, en los que se practicó necropsia respectivamente a los 42 y 70 días de la siembra tumoral, se

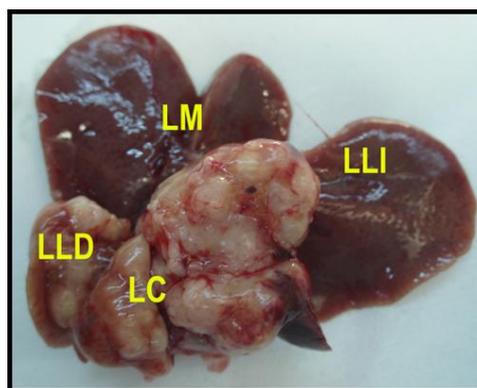


Figura 70. Pieza de Hepatectomía.

Hígado procedente de ECO-9. Peso:19,5g. Práctica sustitución del tejido hepático de los lóbulos lateral derecho (LLD) y de los diferentes segmentos del caudado (LC) por masas neoplásicas.

comprobó un desarrollo neoplásico que invadía extensamente la víscera. En estos

animales, varios lóbulos hepáticos o incluso la totalidad del órgano, exhibían un aspecto megálico y deforme motivado por el gran componente tumoral (figura 70). La observación de esta hepatomegalia tumoral nos indujo a la presunción de que los fenómenos de angiogénesis implicados en su aparición pudieran resultar también de intensidad significativa. Dado que el aporte vascular al tejido neoplásico hepático es arterial en su totalidad^{14,15}, resultaba razonable suponer que el flujo arterial hepático global se encontrase, de algún modo, afectado por la presencia de tejido tumoral en mayor o menor cuantía, y que estas posibles perturbaciones podrían ser además cuantificadas.

La US-Dópler incluye un conjunto de técnicas con un uso restringido al estudio vascular que permiten valorar diferentes parámetros hemodinámicos. Mediante US-Dópler Tríples, es posible determinar velocidades de flujo en el árbol vascular, al mismo tiempo que se visualizan en tiempo real las estructuras evaluadas. Su aplicación en el territorio hepático posibilita la realización de determinaciones a nivel de vena Porta y arteria hepática, e incluso permite establecer valores y rangos de normalidad o patología. En situaciones de patología hepática difusa crónica se han comprobado alteraciones en diferentes índices hemodinámicos obtenidos a partir de las velocidades y flujos arteriales y venosos. En general, en la patología hepática difusa evolucionada, el riego de la víscera se arterializa, y ello supone incrementos objetivados en la velocidad arterial máxima y en índices tales como la razón A/P y el IDP^{77,78}.

Además de estas mediciones realizadas sobre los propios vasos, en la actualidad es posible practicar también estudios de la densidad vascular presente en un determinado territorio o en una lesión tumoral. En general, los trabajos experimentales sobre vascularización tumoral se realizan aplicando la técnica denominada Power-Dópler, una variante de la US-Dópler Color que resulta más sensible a flujos de

baja velocidad. En esta técnica, sobre una imagen ecográfica bidimensional en tiempo real, se rastrea la totalidad del árbol vascular, tanto arterial como venosa (figura 71).

En los estudios de oncología, el Power-Dópler resulta útil para evaluar la mayor o menor vascularización de una lesión neoplásica sólida¹²⁹, pero además, por las propias características de las imágenes que suministra, permite monitorizar la respuesta a diferentes tipos de tratamientos. Esto se hace especialmente evidente en los



Figura 71. Tumor hipervascular, valoración mediante técnica de Power-Doppler.

estudios en los que se valora la disminución de los flujos vasculares tumorales tras la administración de agentes anti-angiogénicos¹³⁰. Además de con Power-Dópler, también es posible evaluar y monitorizar los flujos intra-tumorales y las hipotéticas respuestas a diversos tratamientos, mediante la aplicación de procedimientos aun más novedosas tales como la US realzada con contraste¹³¹ y la US-Dópler de alta frecuencia¹³². En esta última, el empleo de sondas con frecuencia Dópler superior a los 20MHz, permite incrementar de forma muy sustancial la sensibilidad de la técnica a la hora de valorar los flujos procedentes de estructuras vasculares muy pequeñas, y también sus posibles variaciones como respuesta a diferentes situaciones¹³².

En base a todas estas consideraciones y a las limitaciones de nuestro estudio derivadas tanto del modelo experimental como de los recursos técnicos disponibles, nos planteamos evaluar mediante US-Dópler Tríplex las hipotéticas perturbaciones inducidas en los flujos hepáticos arteriales y portales, por una patología hepática difusa de estirpe neoplásica. En los exámenes de US-Dópler que iban a ser practicados se conseguirían unos valores de velocidades arteriales y venosas medidos a nivel del hilio hepático. Estas determinaciones podrían verse afectadas por

factores relacionados con los mecanismos de regulación del flujo esplácnico de los animales, y fundamentalmente por el nivel plasmático de catecolaminas. A este respecto, resulta importante remarcar que los estudios se realizaron procurando minimizar posibles situaciones de estrés y en idénticas condiciones ambientales. Asimismo, dado que las exploraciones debían realizarse bajo anestesia general, en todas las series de US-Dópler se emplearon idénticas pautas anestésicas. En la selección de los agentes anestésicos se consideró especialmente el hecho de que los mismos, o sus combinaciones, no actuasen sobre los sistemas de regulación del flujo vascular visceral, de tal forma que la posible influencia de la pauta anestésica sobre los valores hemodinámicos fuese mínima. Según este criterio, la combinación elegida a base de Diazepam y Ketamina resultaba óptima. La Ketamina es un agente anestésico con leve efecto hipertensivo, pero la asociación de Diazepam anula el efecto presor¹¹¹, de tal forma que su utilización conjunta permite realizar determinaciones hemodinámicas fidedignas.

En un primer momento y previamente a la práctica de las series de US-Dópler en diferentes condiciones experimentales, se llevaron a cabo varios estudios destinados a adecuar la técnica ecográfica. En estos estudios se observó que las evaluaciones hemodinámicas arteriales y venosas, sólo podían practicarse en el primer mes tras la siembra tumoral. La razón de esta circunstancia venía determinada por la predilección de las lesiones neoplásicas a afectar los diferentes segmentos del lóbulo caudado, de tal forma que la deformidad que se generaba en la región hiliar, al progresar la enfermedad, imposibilitaba los estudios arteriales. Esta característica distribución neoplásica quizás venía favorecida por la posición declive que estos segmentos hepáticos presentaban durante el proceso de siembra tumoral.

Dado que en nuestro modelo los animales eran sometidos a diversos procedimientos quirúrgicos además de ser inoculados con células tumorales, era preciso determinar la

influencia de estos procedimientos en los valores hemodinámicos estudiados. Para ello se evaluaron las velocidades arteriales y portales máximas y los índices A/P e IR, en 25 ratas en condiciones basales, y en varias series longitudinales de US-Dópler realizadas en 10 animales hepatectomizados, en seis ratas hepatectomizadas y esplenectomizadas y también en 18 animales con hepatectomía más esplenectomía e inoculación tumoral. Durante la realización de estos procedimientos se produjeron decesos imprevistos de animales en tres series de ratas, y las tasas de mortalidad observadas oscilaron entre el 25% y el 60%. La posible aparición de estos decesos, atribuibles a reacciones adversas al proceso anestésico, debe ser tenida en consideración a la hora de diseñar los estudios experimentales, puesto que la pérdida imprevista de individuos puede posteriormente limitar el manejo de los resultados con fines estadísticos.

En los animales hepatectomizados se observó una caída de las velocidades arteriales y portales en la primera semana tras la cirugía. Estos parámetros se fueron posteriormente normalizando, e incluso en la tercera semana superaban los valores basales, aunque con diferencias no significativas. Este incremento de flujos en la tercera semana puede atribuirse a la aparición y desarrollo de los procesos de regeneración hepáticos. Dado que las velocidades portales y arteriales mostraron un curso similar, los cambios observados en la razón A/P y el IR, no presentaron significación estadística.

En las ratas a las que además de la hepatectomía se les extirpó el bazo, en lo referente a la velocidad portal el comportamiento fue similar al observado en los animales hepatectomizados. Sin embargo, a nivel arterial se apreció, desde las primeras exploraciones, un incremento progresivo en las velocidades que se hizo especialmente significativo en las US-Dópler correspondientes a la tercera semana tras la cirugía. Este comportamiento podría obedecer a dos hechos concomitantes.

Por un lado, al desarrollo, ya comentado, de fenómenos regenerativos hepáticos. Por otra parte, la eliminación del bazo parecía haber inducido una derivación del flujo vascular del tronco celiaco hacia el árbol vascular hepático. Sea como fuere, estos eventos repercutieron en los índices vasculares y pusieron en evidencia con mayor significación los fenómenos desencadenados, de tal forma que tanto el IR como la razón A/P exhibieron incrementos estadísticamente significativas sobre todo en la segunda y tercera semanas tras la cirugía.

Finalmente, en los animales en los que además se procedió a la inoculación de células tumorales, las velocidades arteriales y portales en las dos primeras semanas tras la hepatectomía mostraron un comportamiento similar a los del grupo anterior. Sin embargo, en la tercera semana se desencadenaron cambios reveladores. Por un lado, la velocidad portal máxima persistió en valores bajos respecto a los basales, y no se produjo la recuperación del flujo portal apreciado en los otros grupos. Por otro lado, la velocidad arterial cayó, desvaneciéndose el efecto de la esplenectomía sobre este parámetro, el cual retrocedió hasta quedar en valores semejantes a los determinados en las ratas hepatectomizadas. Estos cambios quedaban magnificados en los índices, de tal forma que al comparar los valores de IR y razón A/P obtenidos en la tercera semana tras la cirugía, correspondientes a los grupos de animales esplenectomizados sin y con siembra tumoral, se encontraron claras diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de ratas. La razón de esta caída en los flujos arteriales y venosos en las ratas que desarrollaron lesiones neoplásicas puede obedecer a varias causas. Por una parte, quizás fuera motivada por el incremento de la masa tumoral, que en nuestro modelo era capaz de entorpecer el flujo vascular al ir adquiriendo un volumen apreciable. De otro lado, el desarrollo de un árbol vascular tumoral anómalo podría favorecer la aparición de fenómenos de éstasis sanguíneo

que dificultasen la aferencia de la sangre portal y sobre todo la de procedencia arterial, responsable fundamental del suministro al tejido neoplásico.

A la luz de estas observaciones puede concluirse en primer lugar, que las modificaciones hemodinámicas desarrolladas en la patología crónica difusa y la patología neoplásica difusa presentan diferente comportamiento. Por otro lado, las determinaciones hemodinámicas no han demostrado un efecto predictivo precoz sobre el posible desarrollo de lesiones neoplásicas en ratas inoculadas, puesto que cuando las diferencias hemodinámicas entre ratas sin y con metástasis se han hecho evidentes, la infiltración tumoral puede ser ya apreciada directamente con técnicas morfológicas de imagen. Sin embargo, de la realización de estos experimentos se deriva una relevante conclusión. Así, de los resultados obtenidos se deduce que para alcanzar los lechos tumorales con mayor eficiencia, la administración por vía intra-arterial de agentes terapéuticos, en nuestro modelo experimental, debe realizarse en la segunda semana posterior a la hepatectomía. La administración de fluidos en este periodo de tiempo evitará el fenómeno posterior de caída de los flujos vasculares hepáticos y permitirá que los fluidos administrados alcancen las metástasis de forma óptima.

En síntesis, la valoración con US-Dópler del modelo experimental ha requerido de la observación de una serie de premisas:

- Conocimiento de la anatomía vascular del área a explorar.
- Selección adecuada de una pauta anestésica y práctica meticulosa de la misma.
- Adecuada planificación de los procesos experimentales longitudinales que permitan posteriormente realizar estudios estadísticos.

En base a estos planteamientos la US-Dópler ha propiciado las siguientes aportaciones:

- Obtención de determinaciones hemodinámicas fidedignas a nivel de vena Porta y de arteria hepática.
- Posibilidad de practicar estudios longitudinales ecográficos en varios grupos de animales.
- Capacidad de revelar los diferentes efectos que sobre los parámetros hemodinámicos evaluados inducen los procesos quirúrgicos y de inoculación tumoral.
- Y finalmente, pero de especial relevancia, ha permitido definir el momento óptimo de administración vascular de un agente potencialmente terapéutico.

3. Evaluación morfológica con Resonancia Magnética

La RM es una técnica de Imagen que cuenta con un alto potencial en todos los ámbitos del diagnóstico no invasivo. En nuestro estudio, y de forma preliminar, se ha evaluado la sensibilidad de un equipo de RM de uso clínico de 1,5 Tesla, en la detección de metástasis hepáticas de adenocarcinoma de colon inducidas en ratas Wag/RijCrl. La definición del poder diagnóstico de la técnica en este modelo oncológico experimental, permitiría *a posteriori* realizar otro tipo de estudios relacionados con la evaluación no invasiva de la distribución de fluidos magnéticos, tanto en tejido hepático sano como en tejido tumoral. En el presente apartado se argumentará, por tanto, sobre el valor de la RM en la caracterización morfológica del modelo animal empleado, de sus limitaciones y de sus posibles nuevas aplicaciones en el entorno experimental.

La realización de un estudio de RM requiere de un periodo de tiempo relativamente prolongado, durante el cual, el organismo a estudio debe mantener una adecuada inmovilidad. La RM es una técnica muy sensible al movimiento, y la presencia de éste, condiciona la obtención de secuencias con imágenes distorsionadas en las que la evaluación morfológica se torna imposible. En función de lo expuesto, resulta obvia la necesidad de llevar a cabo estas exploraciones bajo anestesia general. La mezcla de fármacos empleada en US, a base de Ketamina y Diazepam, también resultó útil a la hora de practicar los estudios de RM, de tal forma que la anestesia y relajación muscular obtenidas, proporcionaron unas condiciones óptimas de exploración. Los efectos beneficiosos de esta combinación, ya quedaron patentes en las imágenes conseguidas durante la primera serie de experimentos, realizada con objeto de definir las características anatómicas del abdomen de la rata. En estos primeros procesos se obtuvieron imágenes morfológicas de calidad en las secuencias potenciadas en T1 y DP, y se consiguió delimitar con claridad el hígado y las diferentes vísceras torácicas y abdominales.

En estudios previamente publicados y practicados sobre modelos animales se ha descrito la eficacia de la RM a la hora de detectar la patología hepática neoplásica¹³³. En estas investigaciones, aplicando secuencias potenciadas en T1 y T2, se logran detectar lesiones tumorales con un tamaño mínimo de 2mm¹³⁴, y además, se comprueba que las características de señal observadas en las lesiones identificadas son similares a las encontradas en la patología humana^{133,135}, lo que permite extrapolar fácilmente los resultados obtenidos a la práctica clínica. En estas publicaciones se apunta también la utilidad de la RM en el control evolutivo de lesiones neoplásicas, en experimentos secuenciales de valoración de respuesta a tratamientos anti-tumorales.

En nuestro modelo se practicaron secuencias de RM en animales afectados por metástasis de adenocarcinoma de colon en diferentes estadios evolutivos. Sin embargo, y a diferencia de lo comunicado en los estudios aludidos, fue en las secuencias STIR de TR corto en las que se consiguió detectar las lesiones de menor tamaño. Las secuencias STIR son muy sensibles a la presencia de tejidos patológicos. Considerando de forma global los experimentos practicados, en estas secuencias se logró detectar más del 60% de los implantes tumorales de entre 1 y 5mm, que fueron posteriormente identificados en los estudios de necropsia. En lo referente a las lesiones de mayor volumen, la tasa de detección resultó próxima al 100%. Estos resultados demuestran la alta sensibilidad de la RM en la detección de alteraciones mínimas en el parénquima hepático, y reportan cifras que resultan superiores a las conseguidas en las exploraciones de US. Sin embargo, los hallazgos apreciados en las secuencias STIR resultan del todo inespecíficos, y así, pequeñas lesiones benignas de tipo quístico, pueden exhibir similar semiología a la demostrada por los implantes tumorales. Es por ello, por lo que estas secuencias altamente sensibles deben complementarse con otro tipo de series de imágenes que incrementen la especificidad de las exploraciones. En este contexto, la obtención de secuencias realizadas con medios de contraste de administración vascular, resulta de gran ayuda en el logro de este objetivo. Diferentes autores coinciden en esta apreciación, y en varios estudios se exponen los excelentes resultados aportados por la RM con contraste, tanto en la detección de lesiones, incluso de tamaño inferior al mm, como en la consecución de un notable incremento en la especificidad del diagnóstico¹³⁶⁻¹³⁹. Sin embargo, en nuestro estudio no han sido utilizados los agentes de contraste, puesto que nuestro objetivo perseguía describir y conocer las características del tejido hepático sano y tumoral, no desarrollar un método de

detección precoz de metástasis. Además la utilización de los medios de contraste encarece las exploraciones y las hace más laboriosas.

En el momento presente, una de las mayores desventajas atribuibles a los estudios de RM es su elevado coste, el cual limita la disponibilidad de la técnica⁹⁴. Este hándicap se hace especialmente patente a nivel experimental. Los equipos de RM no sólo presentan un precio muy elevado, sino que además deben ser manejados por personal técnico entrenado. Por otro lado, las exploraciones son prolongadas y su interpretación debe realizarse por especialistas expertos en patología hepática. Todas estas razones ponen de manifiesto el hecho de que la RM no resulta apta para realizar estudios exclusivamente sobre diagnóstico y control del crecimiento tumoral en modelos animales¹³⁴. En la actualidad, por tanto, los estudios de RM experimental deben perseguir objetivos más ambiciosos que entre otras justificaciones, permitan rentabilizarlos. En patología hepática tumoral las líneas preferentes de investigación se encaminan en el desarrollo de nuevos medios de contraste¹³³, de tal forma que se explore y profundice en la aplicación de los mismos a diferentes aspectos del diagnóstico y del seguimiento no invasivo de la patología. Una de las áreas experimentales es la relacionada con el desarrollo de medios de contraste órgano-específicos. En nuestro ámbito, estos nuevos agentes basados en diferentes combinaciones de gadolinio, manganeso u óxidos de hierro superparamagnéticos¹³⁸⁻¹⁴¹, tras su administración parenteral resultan captados por el hígado sano, pero no por el tejido metastático. Esta especial avidez por el tejido hepático pondría en evidencia los implantes tumorales metastáticos, y proporcionaría un notable incremento tanto en la sensibilidad como en la especificidad de la RM en el diagnóstico de las metástasis hepáticas, uno de los principales desafíos oncológicos que actualmente afronta la RM.

A modo de síntesis, se puede establecer que la valoración morfológica con RM de nuestro modelo experimental ha requerido de:

- Conocimiento preliminar del área anatomía a explorar.
- Selección de una adecuada pauta anestésica.
- Observación de las características de señal de las lesiones a estudio, en diferentes secuencias de imagen.

En base a estas consideraciones, la RM ha propiciado la mayor sensibilidad en el diagnóstico de la patología metastática hepática, y además, en los estadios de infiltración más precoces.

Sin embargo, no debe obviarse el hecho de que la aplicación de la RM al modelo experimental no se ha centrado en este objetivo, sino en su posterior aplicación en la detección y control de la distribución vascular de los magnetofluidos en el hígado sano y en el tumoral.

4. Valoración morfológica con Tomografía Computarizada

La tecnología multi-corte aplicada al TC ha revolucionado el poder diagnóstico de esta técnica de imagen, sin embargo, a la hora de valorar un amplio abanico de patologías se requiere del uso concomitante de medios de contraste de administración parenteral. El uso de agentes de contraste yodados resulta imprescindible cuando se realiza un estudio hepático enfocado a la detección de patología metastática. Durante la realización de estos estudios y tras la inyección del medio de contraste, se practican dos barridos sucesivos del área abdominal superior. Con ello se consiguen imágenes hepáticas bifásicas, es decir, en fase de realce arterial y en fase de realce venoso portal. Dado que las metástasis del carcinoma colo-rectal son hipovasculares respecto

a otro tipo de lesiones tales como el hepatocarcinoma, su presencia se hace especialmente evidente en la fase portal de los estudios de TCMC¹³⁸. La práctica de un estudio hepático bifásico requiere de una perfecta coordinación entre la adquisición de las imágenes y la inyección intravenosa del contraste. La razón de esta exigencia radica en que el periodo de realce hepático en las sucesivas fases, se consigue en lapsos de tiempo muy breves desde la administración del contraste y además, porque los medios de contraste son eliminados con celeridad del árbol vascular por la acción depuradora renal. De lo descrito hasta ahora se deduce que la necesidad de utilizar agentes de contraste encarece los estudios de TCMC, y además dificulta significativamente su realización y su aplicación al ámbito experimental.

En un intento de obviar estas limitaciones y de incrementar la sensibilidad diagnóstica de la TC, se han desarrollado medios de contraste órgano-específicos. Estos compuestos son selectivamente captados por las células hepáticas, y poseen además un tiempo de permanencia en el torrente circulatorio superior al habitualmente mostrado por los contrastes convencionales. En este ámbito cabe destacar que, en estudios experimentales de micro-TC realizado con agentes de contraste selectivos para el hepatocito, se han conseguido detectar metástasis de carcinoma de colon de tamaño ligeramente superior a los 2mm¹⁴². Sin embargo, este tipo de exploraciones de elevada sensibilidad, continúan resultando poco específicas a la hora de discriminar entre pequeñas lesiones hipodensas de estirpe benigna o neoplásica, y en este contexto, el poder diagnóstico de la RM continúa siendo superior al de la TC.

Por todos estos argumentos y considerando además que tanto con US como con RM se consiguen excelentes resultados en la detección y seguimiento de lesiones neoplásicas mínimas, no hemos considerado razonable el empleo de la TCMC en nuestro modelo experimental, como técnica morfológica de valoración de lesiones metastáticas.

Magnetofluido y modelo experimental: caracterizando el proceso de embolización tumoral

En apartados previos ya han sido extensamente establecidas las limitaciones que presentan las diferentes opciones terapéuticas en la enfermedad hepática metastática. Estas limitaciones son las responsables de que se persevere en la búsqueda y desarrollo de nuevas opciones terapéuticas de mayor efectividad local y menor toxicidad sistémica, y es en este contexto, en donde los mediadores electromagnéticos con potencial capacidad de inducción térmica van cobrando relevancia.

El desarrollo de la nanotecnología ha permitido la producción de materiales de tamaño nanométrico que muestran escasa toxicidad y elevada biocompatibilidad con los organismos biológicos^{98,99}. Estos nanomateriales o nanopartículas presentan múltiples utilidades en biomedicina, tanto en el ámbito diagnóstico como terapéutico. Nuestro interés se centra en un tipo específico de nanopartículas que presentan propiedades magnéticas, y cuya utilidad radica en su capacidad de inducir necrosis tisular térmica. Mediante procedimientos de inserción directa de nanopartículas magnéticas, y tanto en patología experimental como a nivel clínico^{14,32,33,102,103}, se ha conseguido provocar necrosis de lesiones tumorales. Sin embargo, en modelos experimentales se ha demostrado que es mediante administración intra-arterial, como se logra una distribución más homogénea de estos mediadores electromagnéticos en los tejidos neoplásicos, circunstancia que hará posible la consecución de un tratamiento más efectivo¹⁴.

La embolización o quimioembolización selectiva trans-catéter de masas tumorales hepáticas por vía arterial, es un procedimiento terapéutico que mantiene su vigencia. En la actualidad se aplica utilizando diferentes combinaciones de micropartículas

embolizantes, quimioterápicos y lipiodol®. Un tipo de procedimiento similar resultaría de interés práctico para localizar los mediadores magnéticos en el interior de los nichos tumorales. Dada la capacidad embolizante del lipiodol®, de su tendencia a quedar retenido en lechos vasculares neoplásicos y a ser captado por las células tumorales^{22,97}, parece razonable aprovechar estas propiedades y utilizarlo como agente vehiculizante de los mediadores magnéticos. En un procedimiento de embolización así planteado, el lipiodol® induciría una hipoxia tisular directa y un incremento en la permeabilidad capilar que favorecería el paso al intersticio de las nanopartículas. Además, el lipiodol® cargado de mediadores magnéticos sería absorbido por las propias células tumorales. Posteriormente, tras someter el organismo a un campo magnético externo, las nanopartículas magnéticas ubicadas en los nichos neoplásicos generarían una hipertermia que produciría una necrosis, tanto de las células malignas como del entramado vascular neoformativo.

Nosotros hemos elaborado un magnetofluido a base de nanopartículas magnéticas suspendidas en lipiodol® para ser administrado por vía intra-arterial, y a fin de conseguir una alta concentración de mediadores magnéticos en metástasis hepáticas de adenocarcinoma de colon. La consecución de un depósito tumoral selectivo de las nanopartículas magnéticas, evitará lesiones en el parénquima hepático sano, y por lo tanto y antes de precisar su hipotética capacidad de inducción térmica, valorar la distribución de las mismas en este modelo de neoplasia diseminada ha resultado de crucial importancia. El logro de este objetivo, evaluado tanto por técnicas de diagnóstico por imágenes como de laboratorio, se expone y desarrolla en los siguientes párrafos. Sin embargo y de forma preliminar, se analizará el proceso desarrollado para adecuar la biocompatibilidad del magnetofluido que finalmente sería utilizado en el modelo experimental.

Biocompatibilidad del magnetofluido

La biocompatibilidad de un fluido magnético se encuentra determinada por dos aspectos: el tiempo de permanencia útil en los tejidos diana en los que debe desarrollar su actividad, y el grado de toxicidad que pueda generar en los organismos sobre los que va a ser aplicado. Estas dos condiciones van a limitar, a priori, la utilidad del magnetofluido, y en nuestro trabajo hacen referencia tanto a las nanopartículas magnéticas, como al medio utilizado en su vehiculización, el lipiodol®.

En estudios publicados se ha establecido la inocuidad de las nanopartículas magnéticas aplicadas en organismos biológicos^{98,99}. Sin embargo, estas sustancias son rápidamente eliminadas del torrente circulatorio, por lo que deben ser asociadas con ligandos o agentes vehiculizantes. La suspensión en lipiodol® permite localizar las nanopartículas en los tejidos diana e incrementar su periodo de permanencia en los mismos, aumentando de esta forma su biocompatibilidad. En este contexto, resulta necesario determinar las concentraciones de nanomateriales que el medio de contraste es capaz de vehiculizar. En nuestro estudio se han producido magnetofluidos con diferentes concentraciones de nanopartículas de Fe₃O₄, en un rango de 3,3-20 mg de hierro por ml de lipiodol®. En general fue posible conseguir suspensiones homogéneas, aunque en las de mayor concentración de metal se observó una mayor tendencia a la aparición de precipitados, y además, la elevada viscosidad del fluido provocó la aparición de algunos fenómenos de trombosis vascular en los animales infundidos.

El lipiodol® no es un fluido inocuo y el grado de toxicidad de la suspensión podría venir condicionado, fundamentalmente, por la volumen infundido del mismo. Para determinar los márgenes de tolerancia al lipiodol® de los animales a estudio, y averiguar las cuantías del contraste susceptibles de ser administradas con seguridad,

se realizaron varios experimentos en ratas con hígados sanos. Aunque el proceso de embolización tumoral debería ser realizado por vía arterial, en los experimentos preliminares y por razones de simplicidad técnica, se empleó la vía venosa. En los experimentos de infusión venosa portal de los fluidos, se suministraron dosis de lipiodol® que oscilaron entre 0,8 y 1,6 ml/kg. En este grupo de ratas se comprobó una tasa de mortalidad del 9% atribuible directamente al proceso quirúrgico, y una mortalidad global en los animales del 20%. Sin embargo, en los animales que recibieron menos de 1ml/kg de magnetofluido, no se produjeron decesos. Por otro lado, en el grupo de experimentos en los que se evaluó la administración por vía arterial, se comprobó un 20% de mortalidad relacionada con el proceso quirúrgico, y un 87% de mortalidad global en los animales en los que se inyectaron dosis de lipiodol® de entre 0,6 y 1ml/kg.

La elevada mortalidad aparecida durante el proceso quirúrgico de infusión intra-arterial del fluido, podría ser secundaria a la constatada complejidad de la técnica, que provocaría un alto grado de estrés en los animales. De hecho, en experimentos con un modelo de isquemia-reperfusión intestinal en nuestro laboratorio, hemos comprobado que la inmovilización del animal (bajo anestesia) durante la primera hora de perfusión para el registro de parámetros se asocia a un incremento significativo de la mortalidad. Y, en ese mismo modelo, la asociación de un tranquilizante (benzodiazepina), reduce significativamente esa mortalidad¹⁴³.

De otro lado, los datos de mortalidad global (per y post-operatoria) también revelaban unas tasas de muerte, relacionadas con la vía de administración intra-arterial, significativamente elevadas. En estudios previamente publicados, se ha comprobado que la administración intra-arterial de lipiodol® a dosis de hasta 0,4ml/kg es bien tolerada por los animales de experimentación²². Esta circunstancia sería concordante con lo apreciado en nuestro trabajo y en los animales infundidos por arteria celiaca, de

tal forma que las elevadas dosis de lipiodol® administradas serían responsables del alto grado de decesos observado. Sin embargo, la cuantía del volumen de contraste suministrado no resultaría ser el único factor implicado en la aparición de una mayor o menor toxicidad, puesto que los animales infundidos por vía portal toleraron dosis de lipiodol® mucho más elevadas. De la conjunción de ambas observaciones se puede inferir, por tanto, que el grado de toxicidad demostrado por el lipiodol® no sólo viene determinado por la mayor o menor dosis infundida del mismo, sino que la vía de administración también juega un papel de importancia crucial.

Las razones de estos hechos pueden estar condicionadas por varias circunstancias:

- Efectividad superior de la vía de infusión arterial. El lipiodol® alcanzaría mayor proporción o ramas más distales del árbol hepático sinusoidal, induciendo un grado más severo de éstasis vascular.
- Embolización arterial de territorios extra-hepáticos. La administración a través del tronco celiaco no conlleva un vehiculización totalmente selectiva del lipiodol® hacia el hígado, de tal forma que ciertas cantidades de fluido alcanzarían el árbol vascular gástrico y pancreático, carente del doble aporte aferente hepático, y menos tolerante a los fenómenos embólicos.

Sea como fuere y considerando el hecho demostrado de que la administración por vía portal no permite alcanzar los nichos tumorales, en la realización de estudios ulteriores, las dosis de magnetofluido fueron adecuadas a rangos de tolerancia de infusión intra-arterial. Así, en los experimentos para evaluar la distribución de los nanomediadores magnéticos en el tejido hepático sano y en el tumoral, se administraron suspensiones con las siguientes características:

- Concentración de metal en la suspensión: 10mg de hierro en 1ml de lipiodol®.
- Dosis máxima a suministrar por vía intra-arterial: 0,5ml/kg.

Mediante la observación de estos criterios fue posible adecuar la biocompatibilidad de los magnetofluidos; las cifras globales de mortalidad, en los procedimientos de infusión intra-arterial desarrollados en el modelo experimental de metástasis hepáticas, no superaron el 25%.

Caracterización por imagen

La distribución intra-tumoral de fluidos magnéticos de administración vascular, se ha estudiado por otros investigadores en modelos de neoplasia hepática inducida por implante directo de células tumorales^{14,34,108}. Sin embargo, nuestro trabajo se ha desarrollado sobre un modelo de metástasis múltiples generadas por diseminación hematológica. La administración de un magnetofluido constituido a base de una suspensión de nanopartículas ferromagnéticas y lipiodol®, ha permitido verificar la distribución tisular del mismo mediante distintas modalidades de imagen.

Aspectos relativos a la TCMC

El empleo del contraste yodado lipiodol® como vehiculizante, posibilita la evaluación inicial de la distribución hepática de los fluidos mediante TC.

En los diferentes procedimientos de administración practicados en ratas sanas, la TCMC permitió comprobar la idoneidad de la infusión al observarse un significativo realce hepático producto de la presencia del lipiodol® en el árbol vascular. Efectivamente, en el 91% de los animales que recibieron lipiodol® por vía portal y en el 60% de las ratas sanas a las que se les administró por vía arterial, se evidenció un adecuado y homogéneo realce que traducía la correcta difusión del contraste en el parénquima hepático. Estos datos corroboran el hecho ya revelado, relativo a la mayor complejidad técnica que entrañaban los procedimientos de infusión intra-arterial respecto a los de infusión intravenosa.

Además, mediante TCMC pudieron también ser evaluados dos aspectos de interés:

- El tiempo de permanencia del magnetofluido en el hígado. En estudios sucesivos practicados en una serie de animales, se comprobó la total eliminación del magnetofluido del parénquima hepático a los 33 días de la infusión venosa.
- La anatomía arterial hepática. En animales infundidos con lipiodol® intra-arterial, fue posible realizar una exhaustiva descripción anatómica de la vascularización arterial lobar y segmentaria intra-hepática.

Por otro lado, en las exploraciones practicadas en animales con metástasis hepáticas, a los que se infundió magnetofluido en diferentes tiempos, también pudo comprobarse la efectividad del procedimiento. Las ratas que recibieron infusión en la segunda semana tras la hepatectomía, grupo de infusión precoz, GIP, mostraron en las imágenes de TCMC una homogénea distribución hepática del contraste. En los estudios de necropsia realizados con posterioridad, se comprobó la presencia de una infiltración tumoral hepática a expensas de masas mínimas, con diámetros inferiores a los 3mm. Esta observación sugería que tanto el hígado sano como las metástasis, presentaban un flujo arterial preservado y patente, que permitía la adecuada distribución vascular de los magnetofluidos. Sin embargo, en aquellos animales en los que se procedió a infundir a los 23 días tras la hepatectomía, grupo de infusión tardía, GIT, los estudios de TCMC evidenciaron áreas en las que el realce se mostraba heterogéneo o ausente. En los ulteriores estudios de necropsia, se comprobó que estas imágenes se correspondían con zonas de profusa afectación neoplásica. Estos hallazgos inducían a sospechar de un compromiso en la vascularización arterial de esos territorios.

A modo de síntesis puede establecerse que la realización de una TCMC tras la infusión del fluido magnético:

- Permite valorar la idoneidad o no del procedimiento quirúrgico de administración vascular.
- Proporciona información sobre la parcial o global perfusión de las lesiones diana por el fluido terapéutico administrado.

Aspectos relativos a la RM

La RM es muy sensible en la detección de depósitos de sustancias magnéticas, y su existencia en los organismos explorados mediante esta técnica, es puesta de manifiesto con elevada fiabilidad.

Esta cualidad de la RM ha sido aprovechada para desarrollar métodos de diagnóstico no invasivo de la patología hepática relacionada con el metabolismo del hierro. En la enfermedad por sobrecarga férrica, la acumulación del metal afecta las características de señal del órgano, de tal forma que el incremento en los depósitos de hierro produce una progresiva hipointensidad hepática en las secuencias de RM. Estas variaciones en la señal pueden ser medidas, y mediante la aplicación de diferentes métodos se consigue el diagnóstico de la patología y la cuantificación del grado de sobrecarga^{83,84,144,145}.

Por otro lado, y en este contexto, la capacidad de detectar depósitos de sustancias magnéticas también ha abierto líneas de investigación sobre hipotéticas aplicaciones terapéuticas. Así, se ha ensayado la posibilidad de monitorizar procedimientos de embolización trans-arterial en diferentes territorios anatómicos, mediante la infusión de óxido de hierro superparamagnético solo o asociado a micropartículas¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. En estos

procesos, la detección de hipointensidades secundarias a depósitos férricos en los territorios embolizados, resultaría indicativo de una correcta realización de la técnica.

En nuestro estudio, según fundamentos similares a los expuestos, se ha evaluado la distribución hepática de un fluido con nanopartículas de óxido de hierro en suspensión.

Para ello, ha resultado preciso considerar previamente dos aspectos:

- Qué secuencias de RM ofrecen un mayor rendimiento en la detección del fluido.
- A partir de qué concentración son identificables las nanopartículas.

Para establecer estas premisas, y antes de aplicar el magnetofluido al modelo experimental de metástasis hepáticas, se realizaron varias series de estudios experimentales *in vitro* e *in vivo*.

Estudios de RM “in vitro”

En los estudios de RM *in vitro* se realizaron observaciones de interés. En las secuencias STIR se percibió un progresivo incremento de la intensidad de la señal en las muestras de fluidos, en relación directa con la mayor concentración de nanopartículas en suspensión. Por otro lado, se comprobó la alta sensibilidad de las secuencias de Eco por Gradiente, EG, a la presencia de sustancias ferromagnéticas. En estas secuencias se puso de manifiesto un progresivo detrimento de la intensidad de la señal en las muestras de magnetofluidos, en relación con el incremento en la concentración de nanopartículas en suspensión y con la prolongación del tiempo de eco, TE, de las diferentes secuencias. Así, en los viales que portaban fluidos con concentraciones de hierro de 3,3mg/ml, se percibieron mínimos cambios de intensidad de señal. Sin embargo, la disminución de señal comenzó a hacerse evidente en los

viales con concentraciones de metal iguales o superiores a 6,6mg/ml, y además, de forma especialmente evidente en las secuencias con TE de 14 y 19ms.

De estas observaciones puede deducirse, que para determinar la presencia de fluidos magnéticos en secuencias de RM, éstos deben portar un volumen mínimo de metal. En las condiciones de nuestro estudio, la concentración mínima de hierro se estableció en 6,6mg por ml de suspensión.

Estudios de RM “in vivo”

Los estudios *in vivo* para adecuar la técnica de RM, se realizaron en varias series de experimentos en los que se inyectaron magnetofluidos por vía portal. En estos estudios se determinaron las características de la señal hepática en ratas de control y en ratas perfundidas con distintos fluidos, en secuencias T1, STIR y EG (TE: 4 y 14ms). En los experimentos se utilizaron diferentes combinaciones de concentraciones de nanopartículas y de dosis de lipiodol®. Las concentraciones de metal usadas oscilaron entre 12mg/ml y 20mg/ml, y las dosis de lipiodol® administradas entre 0,8ml/kg y 1,6ml/kg. En función de la combinación empleada, las cantidades globales de hierro administrado a los animales oscilaron entre 3 y 6mg.

En las secuencias STIR también se percibió un leve incremento en señal procedente de los hígados infundidos con nanopartículas, respecto a los controles. Sin embargo, este hallazgo era sutil y de difícil valoración, y además, fenómenos de éstasis vascular o edema atribuibles a procesos de embolización parcial, podrían inducir la aparición de similares cambios en la intensidad de la señal. La utilidad práctica del mencionado hallazgo resultaba, por tanto, discutible.

En estos experimentos se evaluaron, primordialmente, los cambios en la intensidad de la señal hepática en las secuencias EG. Independientemente del tipo o dosis de fluido administrado, a mayor cuantía global de hierro suministrado, se observó un mayor

detrimento en la intensidad de la señal. Así, fue posible apreciar diferencias cualitativas en la caída de la señal, entre los animales que recibieron 3mg de hierro y las demás ratas. Sin embargo, también se advirtió la aparición de un dintel de saturación, a partir del cual, la intensa pérdida de la señal impedía discernir entre los animales que acumulaban más cantidad de hierro hepático. Esta situación se produjo en las ratas que recibieron entre 4 y 6mg de metal, y fue especialmente evidente, cuando se valoraron las secuencias con TE de 14ms. Por otro lado, la concentración tan elevada de material ferromagnético en el hígado de estos animales, era capaz de provocar la aparición de artefactos por susceptibilidad magnética, que impedían una adecuada evaluación morfológica loco-regional.

De todo lo expuesto referente a la carga metálica aportada por los ferrofluidos, se deduce la necesidad de considerar dos aspectos íntimamente relacionados:

- La adecuada concentración de metal presente en la suspensión a administrar.
- El volumen global de hierro que va a ser aportado. Un volumen bajo no será detectable y una cuantía demasiado elevada provocará severos e indeseables artefactos en las imágenes.

Utilidad del magnetofluido en la caracterización del modelo con RM

De acuerdo con lo expuesto hasta ahora tanto en lo relativo a los apartados de biocompatibilidad como a los de imagen con RM, se estimó adecuado el uso del magnetofluido propuesto (10mg de hierro/ml de lipiodol®) para caracterizar el modelo de metástasis hepáticas, y mediante el cual se suministraría a cada animal un total de 1,5mg de metal. Esta combinación resultaría detectable en las diferentes secuencias de EG y además permitiría correlacionar la anatomía y la patología loco-regional con las secuencias STIR.

En las ratas pertenecientes al experimento GIP, las secuencias STIR permitieron la identificación en el hígado de imágenes hiperintensas que resultaban compatibles con pequeñas masas tumorales. En las secuencias EG se percibió una homogénea disminución de la señal hepática, incluso allá donde se habían sugerido lesiones en STIR. En los estudios de necropsia posteriores, se comprobó que las imágenes observadas en STIR eran, efectivamente, la traducción de una infiltración tumoral hepática constituida por masas mínimas, con diámetros inferiores a los 3mm. De la conjunción de hallazgos observados, se extraía la misma conclusión ya derivada de los estudios con TCMC: en ratas GIP el hígado sano y las metástasis presentaban un flujo arterial que permitía la adecuada distribución vascular de los magnetofluidos.

Por otro lado, en los animales del grupo GIT y en las secuencias STIR, se evidenció la aparición de imágenes concordantes con afectaciones tumorales más profundas. En las secuencias EG, estas lesiones continuaban siendo parcialmente identificables, y además se comprobó que coincidían con las áreas de realce heterogéneo apuntados en los estudios de TCMC, y que en necropsia se correspondieron con lesiones neoplásicas exuberantes. De la conjunción de hallazgos observados, de nuevo se extraía la misma conclusión derivada de los estudios con TCMC: en animales GIT, la afectación neoplásica más profusa presentaba una vascularización arterial comprometida.

A modo de síntesis puede concluirse que la realización de una RM tras la infusión del magnetofluido:

- Proporciona información sobre la idoneidad o no del procedimiento quirúrgico de administración vascular, siempre y cuando se empleen fluidos con la suficiente cantidad de metal en suspensión.

- Permite valorar la parcial o global perfusión de las lesiones diana, en función del grado de alteración de la señal perceptible en las mismas.

Caracterización por espectrometría y correlación con imagen

La espectrometría posibilita valorar de forma indirecta la distribución vascular de las nanopartículas, mediante la determinación de las concentraciones de hierro presentes en los diferentes tejidos.

Hierro endógeno y rendimiento de la infusión hepática con magnetofluido

En diferentes experimentos se ha determinado la cuantía del hierro hepático endógeno. La cuantificación por espectrometría de este parámetro resulta de interés, puesto que debe ser considerado a la hora de valorar la idoneidad de los procedimientos de administración vascular de metal.

En estudios preliminares de infusión intravenosa de los fluidos, la determinación del hierro endógeno ha permitido establecer de modo más veraz, la cantidad de hierro exógeno que queda depositado en el sinusoides hepático, y que en nuestros estudios se ha cifrado en un 60-70% del total del metal administrado. De igual forma, es posible deducir la cantidad de hierro exógeno que queda depositado en el sinusoides tras los procedimientos de infusión intra-arterial. De los resultados obtenidos en los experimentos de administración del magnetofluido en el modelo de metástasis múltiples, y considerando un peso medio de 8g para un hígado estándar de rata macho, se puede inferir que sólo un 23-35% del hierro administrado por la arteria celiaca queda atrapado en la víscera.

Esta significativa diferencia en los depósitos según la vía de administración, muy probablemente, se encuentre en relación con fugas de fluido magnético hacia otros territorios esplácnicos, también irrigados por ramas del tronco celiaco.

Valoración de los resultados en el modelo de metástasis múltiples

En los siguientes apartados se discutirán los resultados obtenidos en los experimentos intra-arteriales practicados en animales con metástasis en diferentes estadios evolutivos. También se establecerán correlaciones con los hallazgos proporcionados por las diferentes técnicas de imagen, y se argumentará sobre la idoneidad de los logros alcanzados.

En el análisis de los resultados provenientes de las muestras de hígado sano, se encontraron diferencias significativas de concentración de hierro entre los animales del experimento GIP y los controles, pero no entre las ratas de los experimentos GIP y GIT. De ello se deduce que la distribución intra-arterial del fluido en el parénquima hepático de las ratas infundidas se produjo adecuadamente.

Por otro lado, en el estudio de los resultados correspondientes al tejido tumoral, se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de hierro presente en metástasis de animales del experimento GIP y la determinada en los otros grupos, pero no así entre el hierro determinado en los animales del experimento GIT y los controles. Estos datos indican que sólo las metástasis en estadio más precoz del desarrollo, presentes en los animales del GIP, acumularon una sustancial cantidad del fluido magnético administrado. La presencia del hierro fisiológico endógeno en las metástasis, también fue contemplada en la valoración de los análisis de espectrometría. En este sentido, los resultados obtenidos al estimar las concentraciones de hierro tras sustraer el endógeno en las ratas de los experimentos GIP y GIT, hicieron más notorias las diferencias entre las cantidades de metal en

tejido tumoral de los dos grupos de animales. Pero además, también se demostró una significativa diferencia entre la cantidad de hierro exógeno del tejido tumoral y del sano de las ratas GIP. La importancia de este hecho radica en que es este metal exógeno el que tendrá capacidad de inducir hipertermia, y la consecución de altas concentraciones de nanopartículas magnéticas en el tejido tumoral respecto del tejido sano, preservarán a este último del daño por calor.

La posibilidad de comparar los resultados obtenidos en modelos experimentales diferentes, viene dificultada por la amplia variabilidad de concentraciones de metal observado en las distintas especies animales estudiadas. Sin embargo, un método comparativo y útil para evaluar la selectividad del depósito tumoral en los diferentes modelos, se basa en establecer la relación entre la concentración de metal presente en el tejido metastático y en el hepático sano, una vez eliminado el hierro endógeno. En estudios publicados se han obtenido mediante infusión vascular, concentraciones de hierro exógeno en tejido tumoral entre 3,5 y 5,3 veces superiores a las encontradas en hígado sano^{14,34,108}. Al analizar nuestro modelo se observaron dos resultados diferentes. De un lado, en las ratas del experimento GIP se consiguió un sustancial depósito de nanopartículas de hierro en tejido tumoral, de tal forma que su concentración respecto al tejido sano fue 2,6 veces superior. Aunque este valor resultó menor al obtenido en otros modelos, las diferencias de concentración de metal conseguidas resultaron evidentes y concordantes con lo previamente publicado. Sin embargo, en las ratas GIT, el análisis de las concentraciones de hierro presentes en las metástasis enucleadas globalmente, demostró una escasa acumulación de metal respecto al obtenido en el hígado sano.

De todo ello se deduce que en nuestro estudio, el depósito de los fluidos magnéticos en el tejido neoplásico no mostró un incremento lineal, acorde con un aumento progresivo de la masa tumoral. Estos resultados eran concordantes con la

observación previamente revelada en los estudios de US-Dópler, en los que ya se apuntó el momento óptimo de administración vascular del fluido, y que en nuestro estudio se acomodó a los animales del experimento GIP. Pero además, estos datos también mostraban una clara correlación con los hallazgos demostrados en TCMC y RM, tanto a la hora de sugerir la adecuada vascularización de las lesiones neoplásicas en estadio precoz de desarrollo presentes en los animales GIP, como en el sentido de indicar los defectos de perfusión en las infiltraciones neoplásicas más profusas, tal es el caso de las lesiones halladas en las ratas GIT.

Nuestro modelo de adenocarcinoma metastático ha mostrado globalmente una capacidad angiogénica inferior a la de otros modelos tumorales, pero además ha puesto de manifiesto importantes diferencias en la vascularización de las lesiones metastáticas, en función del estadio evolutivo de las mismas. Este hecho puede condicionar la hipotética aplicación del fluido diseñado, puesto que si bien en estadios de afectación metastática precoz su difusión en tejido tumoral se ha demostrado homogénea y adecuada, el resultado no fue el mismo en animales en estadios de infiltración más avanzados. Debe contemplarse la posibilidad de que existan sustanciales diferencias de perfusión vascular en lesiones neoplásicas de estirpe similar pero en estadios evolutivos diferentes. El incremento de volumen tumoral no conlleva forzosamente un desarrollo parejo de la vascularización, sino que el aumento de la masa tumoral puede implicar la aparición de regiones con irrigación arterial deficiente que dificulten la aplicación de una terapia trans-arterial, tal y como se ha demostrado en los estudios de espectrometría, TCMC y RM, practicados en nuestro modelo experimental.

CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos es posible establecer las conclusiones expuestas a continuación:

- La Ecografía es una técnica de imagen mediante la cual se detecta con fiabilidad la patología hepática inducida en el modelo experimental murino. Su uso permite determinar el desarrollo de las lesiones fibro-inflamatorias y de las masas neoplásicas intra y extra-hepáticas. Además, los criterios morfológicos de estas lesiones hacen posible establecer el correcto diagnóstico diferencial entre las mismas.
- Mediante la realización de estudios secuenciales en los mismos grupos de animales, los Ultrasonidos resultan de utilidad en la práctica de controles evolutivos no invasivos de la patología hepática.
- El empleo de sondas de alta frecuencia (18MHz) incrementa la sensibilidad de la Ecografía, y posibilita la detección de lesiones metastáticas en estadios evolutivos precoces.
- Con la aplicación de técnicas de Ecografía Dópler, es posible establecer el momento óptimo de administración intra-arterial de los magnetofluidos en los animales con múltiples metástasis hepáticas.
- La Resonancia Magnética es una técnica de imagen que permite la detección de las lesiones metastáticas hepáticas con mayor sensibilidad que la ecografía, detectándose más del 60% de nódulos tumorales entre 1 y 5 mm.
- En nuestro trabajo, la Tomografía Computada no resulta de utilidad práctica en la evaluación morfo-patológica del modelo experimental.

- En el ámbito relativo a los procesos de administración vascular de fluidos con finalidad terapéutica, la vía de infusión intravenosa portal resulta menos agresiva que la vía de administración intra-arterial hepática.
- Para conseguir una fiable infusión intra-arterial de un magnetofluido a base de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 en lipiodol®, deben observarse los siguientes criterios: 10mg de hierro/ml y dosis de suspensión no superior a 0,5ml/kg. Los fluidos así infundidos presentan una aceptable biocompatibilidad y además demuestran un comportamiento idóneo en las secuencias de RM.
- La Tomografía Computada resulta de utilidad a la hora de valorar la correcta realización de los procedimientos de infusión intra-arterial del magnetofluido y además, en esta faceta, su rendimiento es superior al de la Resonancia Magnética.
- La aplicación de secuencias de Eco por Gradiente, hace posible demostrar en Resonancia Magnética la presencia de nanopartículas magnéticas tanto en tejido hepático sano como en tumoral.
- Las metástasis hepáticas en fases precoces del desarrollo, inferiores a 3mm, demuestran una elevada avidéz por los magnetofluidos. Y por ello, tras su administración por vía arterial, concentran cantidades de mediadores con potencial capacidad de inducción térmica superiores a las del tejido hepático sano.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin.* 2003; 53:5-26.
2. Ballantyne GH, Quin J. Surgical treatment of liver metastases in patients with colorectal cancer. *Cancer.* 1993; 71(12 Suppl): 4252-66.
3. Millikan KW, Staren ED, Doolas A. Invasive therapy of metastatic colorectal cancer to the liver. *Surg Clin North Am.* 1997; 77: 27-48.
4. Yoon SS, Tanabe KK. Surgical treatment and other regional treatments for colorectal cancer liver metastases. *Oncologist.* 1999; 4: 197-208.
5. Fernández FG, Drebin JA, Linehan DC, Dehdashti F, Siegel BA, Strasberg SM. Five-year survival after resection of hepatic metastases from colorectal cancer in patients screened by positron emission tomography with F-18 fluorodeoxyglucose (FDG-PET). *Ann Surg.* 2004; 240: 438-47.
6. Silen W. Hepatic resection for metastases from colorectal carcinoma is of dubious value. *Arch Surg.* 1989; 124:1021-2.
7. De Sanctis JT, Goldberg SN, Mueller PR. Percutaneous treatment of hepatic neoplasms: A review of current techniques. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 1998; 21:273-96.
8. Shiina S, Tagawa K, Unuma T, Takanashi R, Yoshiura K, Komatsu Y, et al. Percutaneous ethanol injection therapy for hepatocellular carcinoma. A histopathologic study. *Cancer.* 1991; 68:1524-30.
9. Shiina S, Tagawa K, Niwa Y, Unuma T, Komatsu Y, Yoshiura K, Hamada E, Takahashi M, Shiratori Y, Terano A, et al. Percutaneous ethanol injection therapy for hepatocellular carcinoma: results in 146 patients. *AJR.* 1993; 160:1023-8.
10. Lee MJ, Mueller PR, Dawson SL, Gazelle SG, Hahn PF, Goldberg MA, Boland GW. Percutaneous ethanol injection for the treatment of hepatic tumors: indications, mechanism of action, technique, and efficacy. *AJR.* 1995; 164:215-20.
11. Overgaard K, Overgaard J. Investigations on the possibility of a thermic tumour therapy. I. Short-wave treatment of a transplanted isologous mouse mammary carcinoma. *Eur J Cancer.* 1972; 8: 65-68.
12. Ivkov R, DeNardo SJ, Daum W, Foreman AR, Goldstein RC, Nemkov VS, DeNardo GL. Application of high amplitude alternating magnetic fields for heat induction of nanoparticles localized in cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(19 Pt 2):7093s-7103s.
13. Valls C, Ruiz S, Barrau V, Burdío F, Lladó L, Figueras J, Vilgrain V. Ablación por radiofrecuencia de tumores hepáticos. *Radiología.* 2006; 48:53-69.
14. Moroz P, Jones SK, Gray BN. Tumor response to arterial embolization hyperthermia and direct injection hyperthermia in a rabbit liver tumor model. *J Surg Oncol.* 2002; 80: 149-56.
15. Gonda T, Ishida H, Yoshinaga K, Sugihara K. Microvasculature of small liver metastasis in rats. *J Surg Res.* 2000; 94: 43-8.
16. Patel NH, Jindal RM. The role of chemoembolization in the treatment of colorectal hepatic metastases. *Hepatogastroenterol.* 2001; 48: 448-52.
17. Wallace S, Kan Z, Li C. Hepatic chemoembolization: clinical and experimental correlation. *Acta Gastroenterol Belg.* 2000; 63: 169-73.
18. Bartolozzi C, Crocetti L, Cioni D, Donati FM, Lencioni R. Assessment of therapeutic effect of liver tumor ablation procedures. *Hepatogastroenterology.* 2001; 48: 352-8.
19. Konno T. Targeting cancer chemotherapeutic agents by use of lipiodol contrast medium. *Cancer.* 1990; 66: 1897-903.

20. Egawa H, Maki A, Mori K, et al. Effects of intra-arterial chemotherapy with a new lipophilic anticancer agent, estradiol-chorambucil (KM2210), dissolved in lipiodol on experimental liver tumor in rats. *J Surg Oncol.* 1990; 44: 109-14.
21. Nakakuma K, Uemura K, Kono T, Yanaka N, Yokoyama I. Studies on anticancer treatment with anticancer drug injected into the ligated hepatic artery for liver cancer (preliminary report). *Nichidoku Iho.* 1979; 24: 675-82.
22. Kan Z, Wallace S. Sinusoidal embolization: impact of iodized oil on hepatic microcirculation. *J Vasc Interv Radiol.* 1994; 5: 881-6.
23. Kan Z. Dynamic study of iodized oil in the liver and blood supply to hepatic tumors. An experimental investigation in several animal species. *Acta Radiol.* 1996; 408(suppl): 1-25.
24. Livraghi T, Vettori C, Lazzaroni S. Liver metastasis: results of percutaneous ethanol injection in 14 patients. *Radiology.* 1991; 179: 709-12.
25. Gillams AR, Lees WR. Radiofrequency ablation of colorectal liver metastases. *Abdom Imaging.* 2005; 30: 419-26.
26. Gillams AR, William RL. Five-year survival following radiofrequency ablation of small, solitary, hepatic colorectal metastases. *J Vasc Interv Radiol.* 2008; 19: 712-7.
27. Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C. Altered growth patterns of colorectal liver metastases after thermal ablation. *Surgery.* 2006; 139: 73-81.
28. Sakamoto I, Aso N, Nagaoki K, Matsuoka Y, Uetani M, Ashizawa K, Iwanaga S, Mori M, Morikawa M, Fukuda T, Hayashi K, Matsunaga N. Complications associated with transcatheter arterial embolization for hepatic tumors. *Radiographics.* 1998; 18: 605-19.
29. Vogl TJ, Zangos S, Eichler K, Yakoub D, Nabil M. Colorectal liver metastases: regional chemotherapy via transarterial chemoembolization (TACE) and hepatic chemoperfusion: an update. *Eur Radiol.* 2007; 17: 1025-34.
30. Maataoui A, Qian J, Vossoughi D, Khan MF, Oppermann E, Bechstein WO, Vogl TJ. Transarterial chemoembolization alone and in combination with other therapies: a comparative study in an animal HCC model. *Eur Radiol.* 2005; 15: 127-33.
31. Maataoui A, Qian J, Mack MG, Khan MF, Oppermann E, Roozru M, Schmidt S, Bechstein WO, Vogl TJ. Liver metastases in rats: chemoembolization combined with interstitial laser ablation for treatment. *Radiology.* 2005; 237: 479-84.
32. Johannsen M, Gneveckow U, Thiesen B, Taymoorian K, Cho CH, Waldofner N, Scholz Jordan AR, Loening SA, Wust P. Thermoablation of prostate cancer using magnetic nanoparticles: feasibility, imaging, and three-dimensional temperature distribution. *Eur Urol.* 2007; 52: 1653-62.
33. Hilger I, Hiergeist R, Hergt R, Winnefeld K, Schubert H, Kaiser WA. Thermal ablation of tumors using magnetic nanoparticles: an in vivo feasibility study. *Inv Radiol.* 2002; 37: 580-6.
34. Moroz P, Metcalf C, Gray BN. Histologic analysis of liver tissue following hepatic arterial infusion of ferromagnetic particles in a rabbit tumour model. *BioMetals.* 2003; 16: 455-64.
35. Weiss L. En: Weiss L editor. Principles of metastases. Florida: Academic Press; 1985. p. 200-56.
36. Dingemans KP, Roos E, Van der Bergh W, Van de Pavert IV. Invasión of liver tissue by tumor cells and leukocytes: comparative ultrastructure. *J Natl Cancer Inst.* 1978; 60: 583-90.
37. Menter DG, Harkins C, Onoda J, Riorden W, Sloane BF, Taylor JD, Honn KV. Inhibition of tumor cell induced platelet aggregation by prostacyclin and carbacyclin: An ultrastructural study. *Invasion and metastasis.* 1987; 7: 109-28.

38. Menter DG, Hatfield JS, Harkins C, Sloane BF, Taylor JD, Crissman JD, Honn KV. Tumor cell-platelet interactions in vitro and their relationship to in vivo arrest of hematogenously circulating tumor cells. *Clin Expl Metastases*. 1987; 5: 65-78.
39. Skolnik G, Bagge U, Dahlström A, Ahlman H. The importance of 5-ht for tumor cell lodgement in the liver. *Int J Cancer*. 1984; 33: 519-23.
40. Nakamura K, Kawaguchi T, Asahina S, Sakurai T, Ebina Y, Yokoya S, Morita M. Electronmicroscopic studies on extravasation of tumor cells and early foci of hematogenous metastases. *GANN Monograph on Cancer Research*. 1977; 20: 57-71.
41. Kerbel RS. Immunologic studies of membrane mutants of a highly metastatic murine tumor. *Am Ass Pathologists*. 1979; 97: 609-22.
42. Korach S, Poupon MF, Du Villard JA, Becker M. Differential adhesiveness to rhabdomyosarcoma-derived cloned metastatic cell lines to vascular endothelial monolayers. *Cancer Res*. 1986; 46: 3624-29.
43. Nicolson GL. Cancer metastases. Organ colonization and the cell-surface properties of malignant cells. *Biochem Biophysica Acta*. 1982; 695: 113-176.
44. Nicolson GL, Poste G. Tumor cell heterogeneity and host responses in cancer metastases. *Curr Probl Cancer*. 1982; 7: 4-83.
45. Nicolson GL. Metastatic tumor cell attachment and invasion assay utilizing vascular endothelial cell monolayers. *J Histochem Cytochem*. 1982;30: 214-20.
46. Nicolson GL, Custead SE. Effects of chemotherapeutic drugs on platelet and metastatic tumor cell-endothelial cell interactions as a model for assessing vascular endothelial integrity. *Cancer Res*. 1985; 45: 331-36.
47. Nicolson GL, Dulski K, Basson C, Welch DR. Preferential organ attachment and invasion in vitro by B16 melanoma cells selected for differing metastatic colonization and invasive properties. *Invasion Metastases*. 1985; 5: 144-28.
48. Leung TK, Babai F. Etude ultrastructurale de l'invasion des cultures primaires du foie par des cellules cancéreuses. *Virchows Archiv B Cell Path*. 1973; 29: 267-80.
49. Boghaert ER, Distelmans W, Ginckel R, Mareel MM. Numerical evaluation of the kidney invasion test. *Invasion Metastases*. 1987; 7: 230-241.
50. Tuttle RL, Knick VC, Stopford CR, Weck CJ, Wolberg G. In vitro cytotoxicity expressed by cells active against established tumors in vivo. *Cancer Research*. 1981; 41: 2633-39.
51. Horak E, Darling DL, Tarin D. Analysis of organ-specific effects on metastatic tumor formation by studies in vitro. *J Natl Cancer Inst*. 1986; 76: 913-22.
52. Kramer RH, Nicolson GL. Interactions of tumor cells with vascular endothelial cell monolayers: A model for metastatic invasion. *Proc Natl Acad Sci*. 1979; 76: 5704-8.
53. Naito S, Giavazzi R, Fidler IJ. Corelation between the in vitro interaction of tumor cells with an organ environment and metastatic behaviour in vivo. *Invasion Metastasis*. 1987; 7: 16-29.
54. Schor SL, Schor AM, Allen TD, Winn B. The interaction of melanoma cells with fibroblasts and endothelial cells in three-dimensional macromolecular matrices: A model for tumour cell invasion. *Int J Cancer*. 1985; 36: 93-102.
55. Lamon EW. Stimulation of tumor cell growth in vitro: A critical evaluation of immunologic specificity. *JNCI*. 1977; 59: 769-74.
56. Zvibel I, Raz A. The establishment and characterization of a new balb/c angiosarcoma tumor system. *Int J Cancer*. 1985; 36: 261-272.
57. Kopper L, Hanh TV, Lapis K. Experimental model for liver metastasis formation using lewis lung tumor. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1982; 103: 31-38.

58. Pollack VA, Fidler IJ. Use of young nude mice for selection of subpopulations of cells with increased metastatic potential from nonsyngeneic neoplasms. *JNCI*. 1982; 69: 137-141.
59. Deimann W, Fahimi HD. Hepatic granulomas induced by glucan. An ultrastructural and peroxidase-cytochemical study. *Lab Invest*. 1980; 43: 172-81.
60. Boeryd B. Registration of number and size of tumor metastases in evaluation of treatment. En: Garattini S, Franchi G, editores. *Chemotherapy of cancer dissemination and metastases*. New York: Raven Press; 1973. p. 257-60.
61. Orr FW, Adamson IYR, Young L. Quantification of metastatic tumor growth in bleomycin-injured lungs. *Clin Exp Metastasis*. 1986; 4: 102-16.
62. Lafreniere R, Rosenberg SA. A novel approach to the generation and identification of experimental hepatic metastases in a murine model. *JNCI*. 1986; 76: 309-22.
63. Monfardini S. The development of cancer chemotherapy. En Monfardini S, Brunner K, Crowther D, Eckhardt S, Olive D, Tanneberger S, Veronesi A, Whitehouse JMA, Wittes R, editores. *Manual of adult and pediatric medical oncology*. IUAC. Berlin: Springer-Verlag; 1987. p. 3-10.
64. Mellgren J, Boeryd B, Lundin PM. Registration of tumor metastases. En: Garattini S, Franchi G, editores. *Chemotherapy of cancer dissemination and metastases*. New York: Raven Press; 1973. p. 253-5.
65. Popesko P, Rajtova V, Horak J. *A Colour Atlas of Anatomy of Small Laboratory Animals*. London: Wolfe Publishing Ltd; 1992.
66. Stoopen ME, Barois V, Contreras E. Ultrasonidos. En: Sanchez Alvarez-Pedrosa C, Casanova Gómez R, editores. *Pedrosa. Diagnóstico por Imagen. Tratado de Radiología Clínica. Volumen I, 2ªed*. Aravaca: McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.; 2000. p. 135-55.
67. Segura Cabral JM. *Ultrasonografía abdominal*. Ediciones Norma S.A. Madrid 1981.
68. Zagzebski JA. Physics of diagnostic ultrasound. En: Hagen-Anser SL, ed. *Textbook of diagnostic ultrasonography*, 3rd ed. St. Louis, MO: CV Mosby; 1989. p. 2-16.
69. Marchal, G. Tshibwabwa-Tumba, E. Oyen, R. Pylyser, K. Goddeeris, R. Correlation of sonographic patterns in liver metastases with histology and microangiography. *Invest Radiol*. 1985; 20:79-84.
70. Rubaltelli, L. Del Maschio, A. Candiani, F. Miotto, D. The role of vascularization in the formation of echographic patterns of hepatic metastases: microangiographic and echographic study. *Br J Radiol*. 1980; 53:1166-8.
71. Melki, G. Ultrasonic patterns of tumors of the liver. *J Clin Ultrasound*. 1973; 1:306-14.
72. Scheible, W. Gosink, B B. Leopold, G R. Gray scale echographic patterns of hepatic metastatic disease. *AJR. American Journal of Roentgenology*. 1977; 129:983-7.
73. Rumack CM, Stephanie RW, Charboneaw JW. *Diagnóstico por Ecografía. 2ª edición* Marban Libros S.L. Madrid 2004.
74. Wooten, W B. Green, B. Goldstein, H M. Ultrasonography of necrotic hepatic metastases. *Radiology*. 1978; 128:447-50.
75. Leen E, Goldberg JA, Anderson JR, Robertson J, Moule B, Cooke TG, et al. Hepatic perfusion changes in patients with liver metastases; comparison with those patients with cirrhosis. *Gut*. 1993; 34: 554-557.
76. Moriyasu F, Nishida O, Ban N, Nakamura T, Sakai M, Miyake T, et al. Congestive index of the portal vein. *AJR*. 1986; 146: 735-739.

77. Walsh KM, Leen E, MacSween RN, Morris AJ. Hepatic blood flow changes in chronic hepatitis C measured by duplex Doppler color sonography: relationship to histological features. *Dig Dis Sci*. 1998; 43:2584-90.
78. Hirata M, Akbar SM, Horiike N, Onji M. Noninvasive diagnosis of the degree of hepatic fibrosis using ultrasonography in patients with chronic liver disease due to hepatitis C virus. *Eur J Clin Invest*. 2001. 31:528-35.
79. Sanz M, Sanz P, Cogollos J. Resonancia magnética. En: Sánchez Álvarez-Pedrosa C, Casanova Gómez R, editores. Pedrosa. Diagnóstico por Imagen. Tratado de Radiología Clínica. Volumen I, 2ªed. Aravaca: McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.; 2000. p. 97-122.
80. Pereda N. Campo magnético en resonancia magnética. En: Oleaga Zufiría L, Lafuente Martínez J, editores. Aprendiendo los fundamentos de la Resonancia Magnética. Madrid: Editorial Médica Panamericana, S.A.; 2007: 7-10.
81. Pereda N. Principios básicos. Átomo de hidrógeno. En: Oleaga Zufiría L, Lafuente Martínez J, editores. Aprendiendo los fundamentos de la Resonancia Magnética. Madrid: Editorial Médica Panamericana, S.A.; 2007.p. 1-5.
82. Joseph PM, Atlas SW. Artifacts in MR. En: Atlas SW, editor. Magnetic Resonance Imaging of the brain and spine, 3ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.p. 239-75.
83. Alustiza JM, Castiella A, Echávarri M, Emparanza JI, Artetxe J, Uranga M, Echevarria JJ, Merino M, Calvo MM, Larena JA, Altés A. Diagnóstico y cuantificación de la sobrecarga férrica en el hígado mediante resonancia magnética. *Radiología*. 2008; 50:29-36.
84. Alustiza JM, Artetxe J, Castiella A, Agirre C, Emparanza JI, Otazua P, Garcia-Bengochea M, Barrio J, Mujica F, Recondo JA. Gipuzkoa Hepatic Iron Concentration by MRI Study Group. MR quantification of hepatic iron concentration. *Radiology*. 2004; 230:479-84.
85. Muñoz A. Tomografía computarizada. En: Sánchez Álvarez-Pedrosa C, Casanova Gómez R, editores. Pedrosa. Diagnóstico por Imagen. Tratado de Radiología Clínica. Volumen I, 2ªed. Aravaca: McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.; 2000. p. 83-96.
86. Prokop M. Principles of CT, Spiral CT and Multislice CT. En: Prokop M, Galanski M, editores. Spiral and Multislice Computed Tomography of the Body. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2003. p. 1-43.
87. Boyd DP, Parker DL, Goodsitt MM. Principles of computed tomography. En: Moss AA, editor. Computed tomography of the body with magnetic resonance imaging. Volumen III, 2ªed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1992. p. 1355-83.
88. Sheth S, Fishman EK. Multi-detector row CT of the kidneys and urinary tract: techniques and applications in the diagnosis of benign diseases. *Radiographics* 2004; 24(2): e20. doi: 101148/rg.e20. Published January 16, 2004.
89. Hu H, He HD, Foley WD, Fox SH. Four multi-detector-row helical CT: image quality and volume coverage speed. *Radiology* 2000;215:55-62.
90. Napoli A, Fleischmann D, Chan FP, Catalano C, Hellinger JC, Passariello R, et al. Computed tomography angiography: state-of-the-art imaging using multidetector-row technology. *J Comput Assist Tomogr* 2004;28(Suppl 1):S32-45.
91. Wintersperger BJ, Nikolaou K, Becker CR. Multidetector-row CT angiography of the aorta and visceral arteries. *Semin Ultrasound CT MR* 2004;25:25-40.
92. Pannu HK, Fishman EK. Multidetector computed tomographic evaluation of the renal artery. *Abdom Imaging* 2002; 27: 611-9.

93. Kang PS, Spain JW. Multidetector CT angiography of the abdomen. *Radiol Clin North Am.* 2005; 43: 963-76.
94. Echevarria JJ, Miguélez JL, López-Romero S, Pastor E, Ontoria JM, Alustiza JM, Fernández-Ruanova B. Correlación arteriográfica en 30 pacientes con patología vascular renal diagnosticada mediante TC Multi-Corte. *Radiología.* 2008; 50: 393-400.
95. Lafuente J, Lancharro A, Tirado C. Medios de contraste yodados no iónicos. En: Martí-Bonmatí, Pallardó Y, editores. *Medios de contraste en radiología.* Madrid: Editorial Médica Panamericana, S.A.; 2008.p. 9-20.
96. Fraile E, García del Salto L. Medios de contraste yodados iónicos: moléculas y propiedades. En: Martí-Bonmatí, Pallardó Y, editores. *Medios de contraste en radiología.* Madrid: Editorial Médica Panamericana, S.A.; 2008.p. 3-8.
97. Garin E, Denizot B, Roux J, Noiret N, Lapareur N, Moreau M, et al. Effect of stabilized iodized oil emulsion on experimentally induced hepatocellular carcinoma in rats. *J Vasc Interv Radiol.* 2005; 16: 841-8.
98. Mornet S, Vasseur S, Grasset F, Duguet E. Magnetic nanoparticles design for medical diagnosis and therapy. *J Mater Chem.* 2004; 14: 2161-175.
99. Alexiou C, Jurgons R, Seliger C, Iro H. Medical applications of magnetic nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.* 2006; 6: 2762-8.
100. Pacella CM, Valle D, Bizzarri G, Pacella S, Brunetti M, Maritati R, Osborn J, Stasi R. Percutaneous laser ablation in patients with isolated unresectable liver metastases from colorectal cancer: Results of phase II study. *Acta Oncol.* 2006; 45: 77-83.
101. Moroz P, Jones SK, Gray BN. Magnetically mediated hyperthermia: current status and future directions. *Int J Hyperthermia.* 2002; 18: 267-84.
102. Wust P, Gneveckow U, Johannsen M, Bohmer D, Henkel T, Kahmann F, Sehouli J, Felix R, Rieke J, Jordan A. Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy: feasibility, tolerance and achieved temperatures. *Int J Hyperthermia.* 2006; 22: 673-85.
103. Johannsen M, Gneveckow U, Taymoorian K, Cho CH, Thiesen B, Scholz R, Waldofner N, Loening SA, Wust P, Jordan AR. Termoterapia en cancer de prostate mediante el uso de nanopartículas magnéticas. *Actas Urol Esp.* 2007; 31: 660-7.
104. Pradhan P, Giri J, Samanta G, Sarma HD, Mishra KP, Bellare J, Banerjee R, Bahadur D. Comparative evaluation of heating ability and biocompatibility of different ferrite-based magnetic fluids for hyperthermia application. *J Biomed Mater Res B Appl Biomaterials.* 2007; 81: 12-22.
105. Alexiou C, Arnold W, Klein RJ, Parak FG, Hulin P, Bergemann C, Erhardt W, Wagenpfeil S, Lubbe AS. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res.* 2000; 60: 6641-8.
106. Monfardini C. Veronese FM. Stabilization of substances in circulation. *Bioconjugate Chem.* 1998; 9: 418-50.
107. Sonvico F, Mornet S, Vasseur S, Dubernet C, Jaillard D, Degrouard J, Hoebeke J, Duguet E, Colombo P, Couvreur P. Folate-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles for Solid Tumor Targeting as Potential Specific Magnetic Hyperthermia Mediators: Synthesis, Physicochemical Characterization, and in Vitro Experiments. *Bioconjugate Chem.* 2005; 16: 1181-8.
108. Moroz P, Jones SK, Winter J, Gray BN. Targeting liver tumors with hyperthermia: ferromagnetic embolization in a rabbit liver tumor model. *J Surg Oncol.* 2001; 78: 22-9.
109. Boronzio GF, Hager ED. *Hyperthermia in cancer treatment: A primer.* Berlin:Springer; 2006.

110. Pardoe H, Clark PR, St Pierre TG, Moroz P, Jones SK. A magnetic resonance imaging based method for measurement of tissue iron concentration in liver arterially embolized with ferrimagnetic particles designed for magnetic hyperthermia treatment of tumors. *Magn Reson Imaging*. 2003; 21:483-8.
111. Reyes CF, Linares LM, Viglione PN, Pinto JEB. Activación cardiocirculatoria en ratas anestesiadas con Ketamina: efectos de la premedicación con Diazepam. *Rev Argent Anesthesiol*. 1997; 55: 299-306.
112. García-Alonso I, Palomares T, Alonso A, Portugal V, Castro B, Caramés J, Méndez J. Efecto de la resección hepática sobre el desarrollo de metástasis en el hígado. *Rev Esp Enferm Dig*. 2003; 95: 765-70.
113. Garcia-Alonso I, Palomares T, Alonso A, Echenique-Elizondo M, Carames J, Castro B, Mendez J. Effect of liver resection on the progression and growth of rhabdomyosarcoma metastases in a rat model. *J Surg Res*. 2008; 148(2):185-90.
114. Schindel DT, Grosfeld JL. Hepatic resection enhances growth of residual intrahepatic and subcutaneous hepatoma, which is inhibited by octreotide. *J Pediatr Surg*. 1997; 32: 995-8.
115. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol*. 2000; 32: 19-31.
116. Shimizu H, Miyazaki M, Wakabayashi Y, Mitsuhashi N, Kato A, Ito H, et al. Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell proliferation during regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol*. 2001; 34: 683-9.
117. Nicolson GL. Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 1993; 12: 325-43.
118. Menter DG, Herrmann JL, Nicolson GL. The role of trophic factors and autocrine/paracrine growth factors in brain metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 1995; 13: 67-88.
119. Radinsky R. Paracrine growth regulation of human colon carcinoma organ-specific metastasis. *Cancer & Metastasis Reviews*. 1993; 12: 345-61.
120. Dirix LY, Vermeulen PB, Hubens G, Benoy I, Martin M, De Pooter C, Van Oosterom AT. Serum basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and tumour growth kinetics in advanced colorectal cancer. *Ann Oncol*. 1996; 7: 843-8.
121. Picardo A, Karpoff HM, Ng B, Lee J, Brennan MF, Fong Y. Partial hepatectomy accelerates local tumor growth: Potential roles of local cytokine activation. *Surgery*. 1998; 124: 57-64.
122. Graham KC, Wirtzfeld LA, MacKenzie LT, Postenka CO, Groom AC, MacDonald IV, et al. Three-dimensional high-frequency ultrasound imaging for longitudinal evaluation of liver metastases in preclinical models. *Cancer Res*. 2005; 65: 5231-7.
123. Yang R, Kopecky KK, Rescorla FJ, Galliani CA, Grosfeld JL. Changes of hepatoma echo patterns with tumor growth. A study of the microanatomic basis in a rat model. *Inves Radiol*. 1993; 28: 507-12.
124. Schmitz V, Tirado-Ledo L, Tiemann K, Raskopf E, Heinicke T, Ziske C, et al. Establishment of an orthotopic tumour model for hepatocellular carcinoma and non-invasive in vivo tumour imaging by high resolution ultrasound in mice. *J Hepatol*. 2004; 40: 787-91.
125. Lisi D, Kondili LA, Ramieri MT, Giuseppetti R, Bruni R, Della Rocca C, De Santis A, Rapicetta M. Ultrasonography in the study of hepatocellular carcinoma in woodchucks chronically infected with WHV. *Lab Anim*. 2003; 37: 233-40.
126. Foster FS, Zhang MY, Zhou YQ, Liu G, Mehi J, Cherin E, et al. A new ultrasound instrument for in vivo microimaging of mice. *Ultrasound Med Biol*. 2002; 28: 1165-72.

127. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991; 324: 1-8.
128. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res.* 1985; 43: 175-203.
129. Donnelly EF, Geng L, Wojcicki WE, Fleischer AC, Hallahan DE. Quantified power Doppler US of tumor blood flow correlates with microscopic quantification of tumor blood vessels. *Radiology.* 2001; 219: 166-70.
130. Gee MS, Saunders HM, Lee JC, Sanzo JF, Jenkins WT, Evans SM, Trinchieri G, Sehgal CM, Feldman MD, Lee WM. Doppler ultrasound imaging detects changes in tumor perfusion during antivascular therapy associated with vascular anatomic alterations. *Cancer Res.* 2001; 61: 2974-82.
131. Chomas JE, Pollard RE, Sadlowski AR, Griffey SM, Wisner ER, Ferrara KW. Contrast-enhanced US of microcirculation of superficially implanted tumors in rats. *Radiology.* 2003; 229: 439-46.
132. Goertz DE, Yu JL, Kerbel RS, Burns PN, Foster FS. High-frequency Doppler ultrasound monitors the effects of antivascular therapy on tumor blood flow. *Cancer Res.* 2002; 62: 6371-5.
133. Pavone P, Patrizio G, Pietroletti R, Festuccia C, Stark DD, Elizondo G, Passariello R. Induction of liver metastases in the rat. An experimental model for research on magnetic resonance. *Radiol Med (Torino).* 1989; 77: 94-8.
134. Mook OR, Jonker A, Strang AC, Veltien A, Gambarota G, Frederiks WM, et al. Noninvasive magnetic resonance imaging of the development of individual colon cancer tumors in rat liver. *Biotechniques.* 2008; 44: 529-35.
135. Yang JH, You TG, Li N, Qian QJ, Wang P, Yan ZL, Wu MC. Relationship between the imaging features and pathologic alteration in hepatoma of rats. *World J Gastroenterol.* 2003; 9:69-72.
136. Runge VM, Lee C, Williams NM. Detectability of small liver metastases with gadolinium BOPTA. *Invest Radiol.* 1997; 32(9): 557-65
137. Leander P, Golman K. Liver-specific contrast media for magnetic resonance imaging and computed tomography scanning: importance of contrast media for tumor detection in an experimental liver tumor model. *Acad Radiol.* 1996; 3 Suppl 2: S420-2.
138. Rappeport ED, Loft A. Liver metastases from colorectal cancer: imaging with superparamagnetic iron oxide (SPIO)-enhanced MR imaging, computed tomography and positron emission tomography. *Abdom Imaging.* 2007;32:624-34.
139. Kobayashi H, Saga T, Kawamoto S, Sato N, Hiraga A, Ishimori T, et al. Dynamic micro-magnetic resonance imaging of liver micrometastasis in mice with a novel liver macromolecular magnetic resonance contrast agent DAB-Am64-(1B4M-Gd)(64). *Cancer Res.* 2001; 61:4966-70.
140. Li Z, Li W, Li X, Pei F, Li Y, Lei H. The gadolinium complexes with polyoxometalates as potential MRI contrast agents. *Magn Reson Imaging.* 2007; 25:412-7.
141. Li Z, Li W, Li X, Pei F, Wang X, Lei H. Mn(II)-monosubstituted polyoxometalates as candidates for contrast agents in magnetic resonance imaging. *J Inorg Biochem.* 2007; 101:1036-42.
142. Weber SM, Peterson KA, Durkee B, Qi C, Longino M, Warner T, et al. Imaging of murine liver tumor using microCT with a hepatocyte-selective contrast agent: accuracy is dependent on adequate contrast enhancement. *J Surg Res.* 2004; 119:41-5.
143. Ulibarrena MA, García-Alonso I, Portugal V, García Redondo B, Méndez J. Monitorización hemodinámica en un modelo de shock por reperusión intestinal en rata. *Rev. Esp. Enf. Digest.* 1998; 90: 94-99.

144. Fenzi A, Bortolazzi M, Marzola P. Comparison between signal-to-noise ratio, liver-to-muscle ratio, and $1/T_2$ for the noninvasive assessment of liver iron content by MRI. *J Magn Reson Imaging*. 2003; 17:589-92.
145. Fenzi A, Bortolazzi M, Marzola P, Colombari R. In vivo investigation of hepatic iron overload in rats using T2 maps: quantification at high intensity field (4.7-T). *J Magn Reson Imaging*. 2001; 13: 392-6.
146. Dudeck O, Bogusiewicz K, Pinkernelle J, Gaffke G, Pech M, Wieners G, Bruhn H, Jordan A, Ricke J. Local arterial infusion of superparamagnetic iron oxide particles in hepatocellular carcinoma: A feasibility and 3.0 T MRI study. *Invest Radiol*. 2006; 41: 527-35.
147. Lee KH, Liapi E, Vossen JA, Buijs M, Ventura VP, Georgiades C, Hong K, Kamel I, Torbenson MS, Geschwind JF. Distribution of iron oxide-containing Embosphere particles after transcatheter arterial embolization in an animal model of liver cancer: evaluation with MR imaging and implication for therapy. *J Vasc Interv Radiol*. 2008; 19: 1490-6.
148. Namur J, Chapot R, Pelage JP, Wassef M, Langevin F, Labarre D, Laurent A. MR imaging detection of superparamagnetic iron oxide loaded tris-acryl embolization microspheres. *J Vasc Interv Radiol*. 2007; 18: 1287-95.

ÍNDICES

Índice de contenidos

INTRODUCCIÓN	1
El tratamiento local de las metástasis hepáticas en el cáncer colo-rectal.....	4
Modelos experimentales de metástasis.....	8
1. Modelos experimentales metastáticos “in vitro”	9
2. Sistemas metastáticos experimentales	10
Caracterización por imagen del modelo experimental.....	12
1. Anatomía hepática en la rata	12
2. Técnicas de diagnóstico por imagen.....	15
2.1. Ecografía	15
2.2. Resonancia Magnética.....	21
2.3. Tomografía Computarizada.....	31
Nanopartículas magnéticas: aplicación del fenómeno de histéresis en la terapéutica anti-neoplásica.....	39
1. Estrategias de hipertermia oncológica	40
2. Hipertermia mediada por inducción magnética	40
2.1. Histéresis: fundamento físico de la termoterapia por inducción magnética.....	41
2.2. Modalidades de mediadores magnéticos.....	42

2.3. Nanopartículas magnéticas	43
2.4. Vehiculización de las nanopartículas magnéticas en la patología metastática hepática.....	44
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
MATERIAL Y MÉTODOS	49
Modelo Experimental	51
1. Reactivos biológicos.....	51
1.1. Animales de experimentación	51
1.2. Línea celular	51
2. Pautas anestésicas	52
2.1. Anestesia inhalatoria con éter	52
2.2. Anestesia inhalatoria con Halotano y Óxido Nitroso	54
2.3. Anestesia intra-peritoneal con Ketamina y Diazepam.....	55
3. Técnicas quirúrgicas de inducción tumoral	58
3.1. Inoculación esplénica de células tumorales	58
3.2. Resección hepática	59
3.3. Material empleado	60
Caracterización del modelo experimental mediante imagen	61
1. Estudio ecográfico del hígado de la rata	61
1.1. Equipamiento.....	61
1.2. Técnica de exploración.....	62

1.3. Evaluación morfológica del hígado sano.....	63
1.4. Criterios morfológicos de patología.....	63
1.5. Evaluación de parámetros hemodinámicos (Ecografía Dópler).....	67
2. Resonancia Magnética hepática	72
2.1. Equipamiento	72
2.2. Técnica de exploración	72
2.3. Evaluación anatómica del hígado sano.....	74
2.4. Valoración morfológica de la patología	75
3. Evaluación hepática con Tomografía Computada Multi Corte	78
3.1. Equipamiento	78
3.2. Técnica de exploración	78
3.3. Evaluación morfológica de la patología hepática	80
Desarrollo, monitorización y vehiculización del magnetofluido.	81
1. Desarrollo y monitorización “in vitro” del magnetofluido.....	81
1.1. Nanopartículas magnéticas: obtención y caracterización	81
1.2. Preparación del magnetofluido.....	82
1.3. Monitorización con imagen del magnetofluido	83
2. Vehiculización “in vivo” del magnetofluido	84
2.1. Estudios de administración por vía intravenosa.....	84
2.2. Evaluación de infusión mediante imagen y espectrometría	89
2.3. Estudios de administración por vía intra-arterial	92

Administración intra-arterial del magnetofluido en el modelo experimental de metástasis hepáticas múltiples	95
1. Proceso de inducción tumoral	95
2. Anestesia.....	95
3. Preparación del magnetofluido.....	96
4. Experimento preliminar: vascularización de las metástasis	96
5. Administración intra-arterial en el modelo experimental.....	97
5.1. Procedimiento de infusión	97
5.2. Técnicas de imagen	98
5.3. Valoración de la inducción neoplásica	98
5.4. Determinación del hierro tisular mediante espectrometría	99
Método Estadístico	101
1. Estadística descriptiva.....	101
2. Análisis multivariante.....	101
RESULTADOS.....	103
Monitorización del modelo experimental mediante técnicas de imagen	105
1. Resultados relativos a la Ecografía	106
1.1. Estudios ecográficos anatómicos	106
1.2. Estudios ecográficos morfológicos de la patología	109
1.3. Ecografía Dópler.....	120
2. Resultados en imagen de Resonancia Magnética	137

2.1. Estudios anatómicos	137
2.2. Estudio de la patología en imagen de RM	139
3. Resultados en Tomografía Computada Multi Corte	144
3.1. Aproximación anatómica	145
3.2. Estudio morfológico de la patología en TCMC.....	146
Resultados relativos a elaboración, monitorización y vehiculización del magnetofluido.	147
1. Evaluación del magnetofluido “in vitro”	147
1.1. Nanopartículas magnéticas y suspensión en lipiodol®	147
1.2. Estudios de RM	147
2. Resultados de la vehiculización “in vivo” del magnetofluido	150
2.1. Experimentos de infusión por vía intravenosa	150
2.2. Resultados de la valoración con imagen y espectrometría	156
2.3. Sinopsis de resultados de la administración intravenosa.....	158
2.4. Experimentos de infusión por vía intra-arterial.....	159
Resultados de los experimentos realizados en el modelo experimental de metástasis hepáticas múltiples	163
1. Experimento preliminar: vascularización del hígado metastático.....	163
2. Resultados relativos a la administración intra-arterial del magnetofluido en hígado metastático.....	165
2.1. Técnicas de imagen	166
2.2. Resultados de la determinación del hierro con espectrometría	168

2.3. Análisis de los resultados de espectrometría	172
DISCUSIÓN	175
La monitorización del modelo experimental mediante técnicas de imagen...	179
1. Evaluación morfológica mediante Ecografía	179
2. Utilidad de la Ecografía Dópler hepática	186
3. Evaluación morfológica con Resonancia Magnética	193
4. Valoración morfológica con Tomografía Computarizada	197
Magnetofluido y modelo experimental: caracterizando el proceso de embolización tumoral	199
Biocompatibilidad del magnetofluido	201
Caracterización por imagen.....	204
Aspectos relativos a la TCMC	204
Aspectos relativos a la RM	206
Caracterización por espectrometría y correlación con imagen	211
Hierro endógeno y rendimiento de la infusión hepática con magnetofluido ...	211
Valoración de los resultados en el modelo de metástasis múltiples	212
CONCLUSIONES	215
BIBLIOGRAFÍA	219
ÍNDICES.....	231
Índice de contenidos.....	233

Índice de tablas	241
Índice de figuras.....	245

Índice de tablas

Tabla 1. Valores de TR y TE en las diferentes secuencias SE potenciadas en T1, T2 y DP.....	25
Tabla 2. Distribución global temporal de los diferentes experimentos de US practicados.....	66
Tabla 3. Descripción de las diferentes series Dópler.	70
Tabla 4. Determinación de los parámetros hemodinámicos en función de los diferentes grupos de experimentos.....	71
Tabla 5. Parámetros técnicos de las secuencias de RM.....	74
Tabla 6. Distribución temporal de los diferentes experimentos de RM practicados.....	76
Tabla 7. Parámetros de adquisición de TCMC.....	78
Tabla 8. Parámetros técnicos de las secuencias de RM.....	83
Tabla 9. Características del experimento NanoMag-Portal 1. np: <i>nanopartículas</i>	87
Tabla 10. Características del experimento NanoMag-Portal 2. np: <i>nanopartículas</i>	88
Tabla 11. Características del experimento NanoMag-Portal 3. np: <i>nanopartículas</i>	88
Tabla 12. Características del experimento NanoMag-Portal 4. np: <i>nanopartículas</i>	89
Tabla 13. Experimentos NanoMag-Espectro. np: <i>nanopartículas</i> . Esp: <i>espectrometría</i>	91

Tabla 14. Experimento ECO-6 en ratas sin hepatectomía parcial y con sonda de 10 Mhz. Comparativa entre los hallazgos en US y Necropsia.	111
Tabla 15. Experimentos ECO-7 y ECO-8 en ratas sin hepatectomía parcial y con sonda de 10 Mhz.....	112
Tabla 16. Experimento ECO-9 en ratas sin hepatectomía parcial y con sonda de 10 Mhz. Comparativa entre los hallazgos en US y necropsia.....	113
Tabla 17. Experimentos ECO-10 y ECO-11 en ratas sometidas a hepatectomía parcial y exploradas con sonda de 10 Mhz. Comparativa entre los hallazgos en US y necropsia.....	114
Tabla 18. Experimento ECO-12 en ratas sometidas a hepatectomía parcial y exploradas con sonda de 6-18 Mhz. Comparativa entre los hallazgos en US y necropsia.....	115
Tabla 19. Experimento ECO-7. Determinaciones en US-Dópler y correlación con necropsia.....	121
Tabla 20. Experimento ECO-8. Determinaciones en US-Dópler y correlación con necropsia.....	121
Tabla 21. Experimento ECO-11. Determinaciones en US-Dópler y correlación con necropsia.....	122
Tabla 22. Experimento ECO-13(D). Determinaciones hemodinámicas en ratas sin manipulación quirúrgica.....	123
Tabla 23. Experimento ECO-14(D). Determinaciones hemodinámicas en ratas hepatectomizadas.....	124
Tabla 24. Experimento ECO-15(D). Determinaciones de US-Dópler y correlación con necropsia.	125

Tabla 25. Experimento ECO-16(D). “preQ”: US-Dópler previa a la cirugía, en condiciones basales..... 126

Tabla 26. Experimento ECO-17(D)..... 127

Tabla 27. Valores hemodinámicos, experimentos ECO-13(D), ECO-16(D) y ECO-17(D)..... 128

Tabla 28. Valores hemodinámicos, experimento ECO-14(D)..... 128

Tabla 29. Valores hemodinámicos, experimento ECO-16(D)..... 129

Tabla 30. Valores hemodinámicos, experimentos ECO-11, ECO-15(D) y ECO-17(D)..... 129

Tabla 31. Experimento RM-2. Estudio comparativo entre los hallazgos en imagen y las lesiones descubiertas en la necropsia..... 139

Tabla 32. Experimento RM-3. Estudio comparativo entre los hallazgos en imagen y las lesiones descubiertas en la necropsia..... 141

Tabla 33. Experimentos RM-4. Estudio comparativo entre los hallazgos en imagen y las lesiones descubiertas en la necropsia..... 142

Tabla 34. Resultados del experimento NanoMag-Portal 1..... 151

Tabla 35. Resultados del experimento NanoMag-Portal 2..... 152

Tabla 36. Resultados del experimento NanoMag-Portal 3..... 154

Tabla 37. Resultados del experimento NanoMag-Portal 4..... 155

Tabla 38. Resultados del experimento NanoMag-Espectro 0..... 156

Tabla 39. Resultados del experimento NanoMag-Espectro 1..... 157

Tabla 40. Resultados del experimento NanoMag-Espectro 2..... 158

Tabla 41. Resultados del experimento GIP.	169
Tabla 42. Resultados del experimento GIT.	170
Tabla 43. Resultados del experimento del grupo de ratas de control.....	171

Índice de figuras

Figura 1. Anatomía hepática.	13
Figura 2. Anatomía hepática loco-regional.....	14
Figura 3. Ecografía Tríplex Dópler.	17
Figura 4. Características de señal de diferentes sustancias en secuencia SE T1.....	26
Figura 5. Características de señal de diferentes sustancias en secuencia STIR.	27
Figura 6. Características de señal de diferentes sustancias en secuencia EG.	29
Figura 7. Reconstrucciones multiplanares.	35
Figura 8. MIP de árbol vascular hepático murino.....	36
Figura 9. VRT de tórax y abdomen superior.	36
Figura 10. Punción esplénica de células tumorales.....	59
Figura 11. Equipos de US utilizados. Logiq 7 (a) y MyLab60 XVision (b).....	61
Figura 12. Tren de ondas característico de un vaso arterial.	68
Figura 13. Equipo de RM.	72
Figura 14. A. Animales en cubeta de plástico. B. Sistema en la bobina de cráneo y sobre la mesa de exploración.	73
Figura 15. Escáner Multi Corte.....	78
Figura 16. <i>Imagen de nanopartículas magnéticas en microscopía electrónica de transmisión.....</i>	82
Figura 17. <i>De izquierda a derecha, lipiodol® sólo y con cantidades progresivamente superiores de nanopartículas magnéticas en suspensión.</i>	

<i>El lipiodol®, amarillo pálido, se torna marrón oscuro cuando le son añadidas las nanopartículas.</i>	82
Figura 18. <i>Tras la laparotomía se identifica la vena Porta en el hilio hepático. Cuando se extraen las asas intestinales, la vena ileo-cólica (flecha azul) se aprecia con nitidez.</i>	84
Figura 19. Exposición de tronco celiaco y sus ramas principales.	92
Figura 20. Ejemplar de rata WAG/RijCrl sedado e inmovilizado en posición supino.....	106
Figura 20A. Barrido sagital lateral derecho.	106
Figura 20B. Barrido sagital izquierdo.	106
Figura 20C(1-4). Barridos con diferentes grados de oblicuidad.	107
Figura 20C(A,V). Barridos oblicuos del hilio hepático: Tríplex Dópler.	108
Figura 21. Masas fibro-inflamatorias.	109
Figura 22. Evolución volumétrica de las masas inflamatorias.	110
Figura 23. Detección ecográfica de las metástasis en relación a su localización.	116
Figura 24. Detección ecográfica de las metástasis en relación a su tamaño.....	116
Figura 25. Implantes subcapsulares.....	117
Figura 26. Megalias de lóbulos.....	118
Figura 27. Nódulos intra-hepáticos.....	118
Figura 28. Nódulos intra-hepáticos.....	119
Figura 29. Nódulos intra-hepáticos y masa inflamatoria secundaria a hepatectomía.	119

Figura 30. Implantes extra-hepáticos..... 120

Figura 31. Medidas de pVmax, en animales en los que se realizó hepatectomía parcial..... 130

Figura 32. Evolución de pVmax..... 130

Figura 33. Evolución temporal de los valores de pVmax en animales en los que se inocularon células tumorales, y en relación con las medidas basales..... 131

Figura 34. Evolución de la aVmax en animales sometidos a resección del lóbulo lateral izquierdo del hígado..... 132

Figura 35. Velocidad arterial máxima en animales sometidos a resección del lóbulo lateral izquierdo del hígado y esplenectomía..... 132

Figura 36. Velocidad arterial máxima en animales en los que se inocularon células tumorales al hígado, a través del bazo..... 133

Figura 37. Comparación de los valores de aVmax en los tres modelos quirúrgicos estudiados..... 133

Figura 38. IR en animales a los que se practicó hepatectomía del 40%..... 134

Figura 39. IR en animales con hepatectomía y esplenectomía..... 134

Figura 40. IR en animales en los que se inocularon células tumorales al hígado, a través del bazo..... 135

Figura 41. Razón A/P en animales a los que se practicó hepatectomía..... 135

Figura 42. Razón A/P en animales a los que se practicó hepatectomía y esplenectomía..... 135

Figura 43. Razón A/P en animales a los que se practicó hepatectomía, esplenectomía e inoculación de células tumorales..... 136

Figura 44. Comparación entre las razones A/P de las ratas esplenectomizadas, libres o no de inoculación tumoral. <i>Tercera semana.</i>	136
Figura 45. Secuencia T1 coronal en ratas WAG/RijCrI. Cortes sucesivos de dorsal a ventral (desde A hasta D).....	137
Figura 46. Diferentes secuencias coronales.	138
Figura 47. Correlación de imágenes en RM y necropsia. Masas neoplásicas.....	140
Figura 48. Correlación de imágenes en RM y necropsia. Masas neoplásicas.....	141
Figura 49. Correlación de imágenes en RM y necropsia. Masas fibro-inflamatorias.....	143
Figura 50. Reconstrucciones sagitales VR, de dos ratas sin (A) y con (B) contraste intravenoso.....	144
Figura 51. Reconstrucciones MIP.	145
Figura 52. Reconstrucción MIP sagital.....	146
Figura 53. Secuencia axial potenciada en T1 de viales con muestras de los diferentes fluidos.	148
Figura 54. Secuencia axial potenciada en STIR de viales con muestras de diferentes fluidos.	149
Figura 55. Secuencias axiales potenciadas en EG. A: Secuencia EG con TE: 4ms. B: Secuencia con TE: 14ms. C: Secuencia con TE: 19ms.	149
Figura 56. Reconstrucciones y secuencias en proyección coronal.....	153
Figura 57. Secuencias axiales.....	153
Figura 58. Preparaciones histológicas hepáticas.	155
Figura 59. Secuencias en proyección coronal.....	157

Figura 60. Vascularización arterial hepática. 160

Figura 60 cont. Vascularización arterial hepática. 161

Figura 61. Administración intra-arterial de lipiodol®, TCMC, cortes axiales. 161

Figura 62. Experimento preliminar, administración intravenosa de contraste. 164

Figura 63. Experimento preliminar, administración arterial del contraste. 165

Figura 64. RM del experimento GIP. 166

Figura 65. TCMC del experimento GIT. 167

Figura 66. RM del experimento GIT. 167

Figura 67. Diagrama de Cajas: Concentración de hierro en los diferentes grupos de ratas. 171

Figura 68. US evolutiva de las masas inflamatorias. 180

Figura 69. Secuencia evolutiva ecográfica del desarrollo tumoral en el modelo experimental. 183

Figura 70. Pieza de Hepatectomía. 186

Figura 71. Tumor hipervasculares, valoración mediante técnica de Power-Doppler. 188