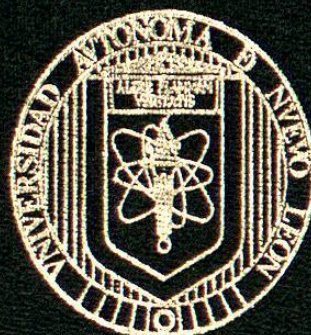


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



PARTICULAS DE OXIDO DE HIERRO COMO PROTOTIPO  
DE AGENTE DE CONTRASTE SUPERPARAMAGNETICO  
PARA LAS IMAGENES HEPATICAS OBTENIDAS CON LA  
TECNICA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

POR

DR. GUILLERMO ELIZONDO RIOJAS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ORIENTACION TERMINAL EN MORFOLOGIA

MARZO 2006

**MARZO**

**DR. GUILLERMO ELIZONDO RIOJAS**

TD  
RC78  
.7  
.N83  
E4  
2006  
c.1



1080128593

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



PARTICULAS DE OXIDO DE HIERRO COMO PROTOTIPO  
DE AGENTE DE CONTRASTE SUPERPARAMAGNETICO  
PARA LAS IMAGENES HEPATICAS OBTENIDAS CON LA  
TECNICA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

POR

DR. GUILLERMO ELIZONDO RIOJAS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ORIENTACION TERMINAL EN MORFOLOGIA

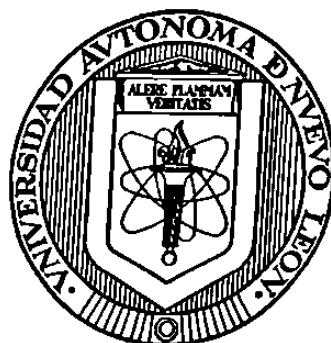
MARZO 2006

TO  
RC78  
.7  
.N83  
E4  
2006



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



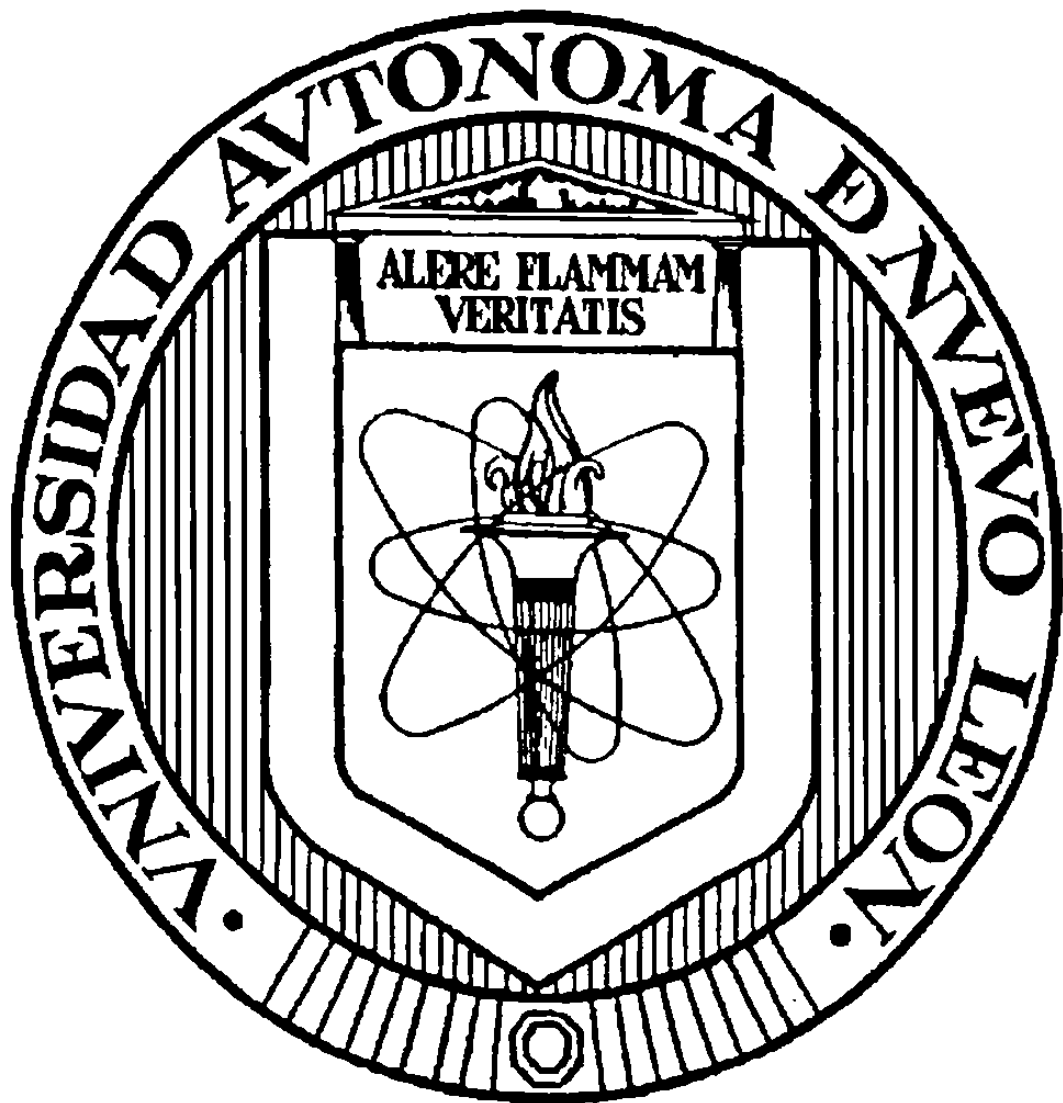
**Partículas de Oxido de Hierro como Prototipo de Agente de Contraste  
Superparamagnético para las Imágenes Hepáticas obtenidas con la  
Técnica de Resonancia Magnética Nuclear**

**Por:**

**Dr. Guillermo Elizondo Riojas**


**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación Terminal en Morfología**

**Marzo 2006**



**PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO COMO PROTOTIPO DE AGENTE DE CONTRASTE SUPERPARAMAGNÉTICO PARA LAS IMÁGENES HEPÁTICAS OBTENIDAS CON LA TÉCNICA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**DRA. LINDA ELSA MÉNDEZ ESPINOSA**  
Director de Tesis



---

**DR. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA**  
Comisión de Tesis



---

**DR. MED. SANTOS GUZMAN LOPEZ**  
Comisión de Tesis



---

**DR. MED. OSCAR DE LA GARZA CASTRO**  
Comisión de Tesis



---

**DR. MED. MARIO ALBERTO GARZA ELIZONDO**  
Comisión de Tesis



---

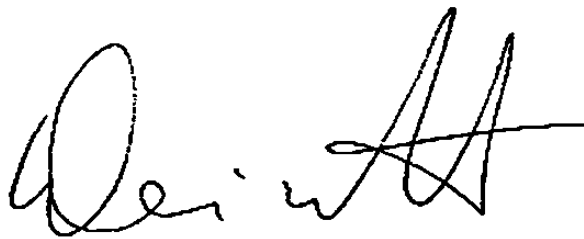
**DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO**  
Subdirector  
de Estudios de Posgrado



**Partículas de Oxido de Hierro como Prototipo de Agente de Contraste  
Superparamagnético para las Imágenes Hepáticas obtenidas con la  
Técnica de Resonancia Magnética Nuclear**

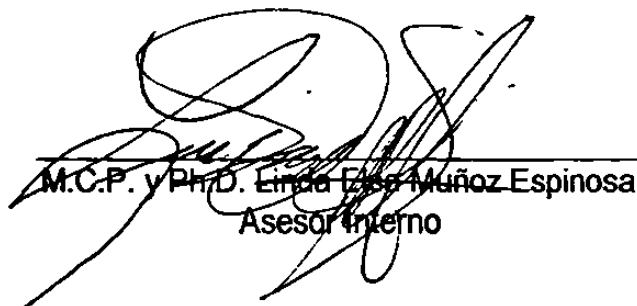
Presentado por M.C.P. Guillermo Elizondo Riojas

Este trabajo se realizó en el Departamento de Radiología del Massachussets General Hospital de la Universidad de Harvard, en Boston Massachussets, E.U.A. y en el Departamento de Radiología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría externa del Dr. Ralph Weissleder, y supervisada por la asesora interna Dra. Linda Elsa Muñoz Espinosa del la Unidad de Hígado del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León y co-asesor el Dr. Julio Sepúlveda Saavedra del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.



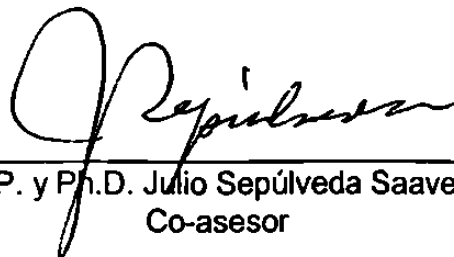
---

M.D., Ph.D. Ralph Weissleder  
Asesor Externo



---

M.C.P. y Ph.D. Linda Elsa Muñoz Espinosa  
Asesor Interno



---

M.C.P. y Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra  
Co-asesor

# TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO	PAGINA
<b>1. INTRODUCCION.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Antecedentes Históricos.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Factibilidad de que el oxido de hierro superparamagnético pueda ser utilizado como agente de contraste para IRM.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3 Hipótesis.....</b>	<b>15</b>
<b>1.4 Importancia y Justificación.....</b>	<b>15</b>
<b>1.5 Objetivo General.....</b>	<b>15</b>
<b>1.6 Objetivos Específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>2. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Oxido de Hierro Superparamagnético.....</b>	<b>17</b>
2.1.1 Farmacodinamia y Toxicidad.....	17
2.1.2 Estudios Específicos de Toxicidad Hepática.....	25
<b>2.2 Evaluación Experimental de la Utilidad del Oxido de Hierro Superparamagnético en la detección de lesiones Focales Hepáticas.....</b>	<b>30</b>
2.2.1 Partículas de Ferrita.....	30
2.2.2 Espectroscopía por Resonancia Magnética.....	32
2.2.3 Imagen por Resonancia Magnética.....	33
2.2.4 Análisis de las Imágenes.....	35
2.2.5 Análisis de los Tejidos.....	36
<b>2.3 Aplicaciones Clínicas del Oxido de Hierro Superparamagnético como Agente de Contraste para la Imagen Por Resonancia Magnética del Hígado.....</b>	<b>37</b>
2.3.1 Oxido de Hierro.....	37
2.3.2 Pacientes.....	37
2.3.3 Imagen por Resonancia Magnética.....	38
2.3.4 Aclaramiento Sanguíneo.....	41
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1 Oxido de Hierro Superparamagnético.....</b>	<b>42</b>
3.1.1 Farmacocinética.....	42
3.1.2 Toxicidad.....	51
3.1.3 Estudios Específicos de Toxicidad Hepática.....	52
<b>3.2 Evaluación Experimental de la Utilidad del Oxido de Hierro Superparamagnético en la detección de lesiones Focales Hepáticas.....</b>	<b>61</b>
<b>3.3 Aplicaciones Clínicas del Oxido de Hierro Superparamagnético como Agente de Contraste para la Imagen Por Resonancia Magnética del Hígado.....</b>	<b>68</b>
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
<b>4.1 Oxido de Hierro Superparamagnético.....</b>	<b>77</b>
4.1.1 Farmacodinamia y Toxicidad.....	77
4.1.2 Toxicidad Hepática.....	81

<b>4.2 Evaluación Experimental de la Utilidad del Oxido de Hierro Superparamagnético en la detección de lesiones Focales Hepáticas .....</b>	<b>86</b>
<b>4.3 Aplicaciones Clínicas del Oxido de Hierro Superparamagnético como Agente de Contraste para la Imagen Por Resonancia Magnética del Hígado.....</b>	<b>91</b>
<b>4.4 Evolución y Aplicaciones Clínicas Actuales .....</b>	<b>94</b>
<b>5. REFERENCIAS .....</b>	<b>96</b>
<b>6. APENDICE .....</b>	<b>110</b>
<b>6.1 Publicaciones Recientes sobre la Utilidad del OHSP en Investigación Básica y Clínica y en Aplicaciones Diagnósticas.....</b>	<b>110</b>
<b>6.2 Artículos Generados como Autor o Coautor por estas Investigaciones .....</b>	<b>134</b>

## RESUMEN

Guillermo Elizondo Riojas

Fecha de Graduación: Marzo 2006

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Título del Estudio:

**Partículas de Oxido de Hierro como  
Prototipo de Agente de Contraste  
Superparamagnético para las Imágenes  
obtenidas con la Técnica de Resonancia  
Magnética Nuclear**

Número de páginas: 153

**Candidato para el grado de Doctor en  
Ciencias con orientación en Morfología**

**Área de Estudio: Morfología**

**Propósito y Método del Estudio:** Las partículas de óxido de hierro superparamagnético (OHSP) tienen en teoría dos características físicas, i.e. su tamaño y su profundo efecto en el tiempo de relajación T2, que las harían medios de contraste ideales para estudiar la patología de órganos que contienen células del Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), y que pudieran ser visualizadas por medio de las Imágenes por Resonancia Magnética. En el presente trabajo, caracterizamos las partículas de OHSP desde el punto de vista químico y físico, realizamos estudios preclínicos de eficacia, farmacodinamia, metabolismo, y toxicología, Se estudiaron en animales de laboratorio los efectos *in vitro* en la espectroscopía de RM e *in vivo* en las IRM. Posteriormente, se realizó una investigación preclínica en animales con lesiones focales del hígado, y finalmente se realizó la investigación en humanos sobre la utilidad del OHSP en la detección de neoplasias primaria y metastásica del hígado.

**Conclusiones y Contribuciones:** El secuestro de las partículas de OHSP en el SFM se confirmó por medio de microscopía de luz y electrónica. A pesar de la gran concentración de hierro en el hígado, no se encontró evidencia de alteración de la función de organelos, ni de peroxidación lipídica mitocondrial o microsomal. Debido a que las partículas de OHSP son fagocitadas por el SRE, la función hepatocelular no se ve afectada, y no se presentó la lesión hepática inducida por hierro. Se demostró el acortamiento importante en el T2 en los órganos que contienen SFM. En los estudios preclínicos en animales, se demostró una diferencia estadísticamente significativa en la capacidad de identificar lesiones focales y difusas del hígado. En los humanos, también se demostró el efecto importante en el T2 de los tejidos normales y por lo tanto la diferenciación con lesiones focales de órganos que contienen SFM. Consideramos que estos estudios demuestran que el OHSP es un agente de contraste potencial para el estudio de las patologías de los órganos que contienen SFM, que a diferencia de los contrastes intravenosos actuales, que no son selectivos, pueden ser utilizados para mejorar la sensibilidad y especificidad de la IRM como método de imagen diagnóstica en las patologías focales del hígado.

FIRMA DE LA DIRECTORA DE TESIS

DRA. LINDA ELSA MUÑOZ ESPINOSA

# **1. INTRODUCCION**

## **1.1. Antecedentes Históricos**

La imagen por resonancia magnética (IRM) proporciona un excelente contraste de los tejidos blandos en imágenes simples, y originalmente parecía que esto obviaría la necesidad de utilizar agentes de contraste para esta modalidad de imagen. Sin embargo, la experiencia clínica inicial con las IRM simples reveló que en ciertas situaciones, la tomografía computada (TC) con contraste era superior. Por ejemplo, en el sistema nervioso central, los meningiomas desafortunadamente tenían unos tiempos de relajación T1 y T2 similares a los del cerebro normal, lo cual resultaba en un pobre contraste y diferenciación tisular, y por lo tanto menor detección de esta patología con este método, en comparación con la TC contrastada. Las lesiones metastásicas pequeñas con muy poco o nulo edema también escapaban a la detección en las IRM simples. Ya que estos tumores usualmente producen disrupción de la barrera hematoencefálica en forma temprana en su evolución, resulta fácil su visualización en la TC con contraste. El uso generalizado de los agentes de contraste yodados en radiología general y en TC resultaba en una mejor certeza diagnóstica.

Por consiguiente, para mejorar la utilidad clínica de la resonancia magnética en estas situaciones y en muchas otras, el desarrollo de los agentes de contraste para las IRM se empezó prácticamente desde el inicio de esta tecnología.

El primer trabajo *in vitro* de resonancia magnética nuclear (RMN) en 1946 por Bloch, Hansen, y Packard [1] reveló que el tiempo de relajación nuclear T1 de los protones de agua podía ser acortado por la adición de agentes paramagnéticos tales como los nitratos férricos. Solomon en 1955 [2], describió el uso de los iones metálicos de transición en solución para reducir los tiempos de relajación T1 de los iones de hidrógeno, por lo cual él desarrolló una descripción matemática que fue modificada en 1957 por Bloembergen [3]. El uso de agentes de contraste paramagnéticos en animales experimentales fue descrito por Lauterbur [4] y Mendoca-Diez [5]. El primer uso del agente de contraste paramagnético parenteral en el hombre, Gadolinio-DTPA, ocurrió a principios de los 80's. Desde entonces, múltiples estudios clínicos y experimentales con ese tipo de agentes de contraste han mostrado que es seguro y que aumenta la sensibilidad y en algunas ocasiones la especificidad de lesiones, principalmente en el sistema nervioso central.

La habilidad del hierro para causar alteraciones profundas en la intensidad de la señal de resonancia magnética ha sido ampliamente reconocida [6]. Por ejemplo, se conocen artefactos importantes en la imagen que resultan de la presencia de cantidades muy pequeñas de óxido

ferromagnético dentro de varios implantes metálicos [7]. En la hemocromatosis, el hierro paramagnético causa una pérdida importante de la señal en los tejidos sobrecargados con hierro tales como el hígado, el bazo y el páncreas [8, 9]. Se han formulado numerosos agentes de contraste para resonancia magnética conteniendo hierro paramagnético con la finalidad de alterar la intensidad de la señal del sistema gastrointestinal, renal y hepatobiliar [10, 11, 12].

Las ferritas son óxidos de hierro cristalinos cuyas propiedades magnéticas fueron reconocidas por su importancia comercial desde 1933 [13]. Las ferritas tienen la fórmula general de  $\text{Fe}^{+3} \text{ }_2\text{O}_3 \text{ M}^{+2}\text{O}$ , donde M es un metal divalente como el manganeso, níquel, hierro, cobalto o magnesio. La magnetita es la ferrita de origen natural cuyo ión metálico (M) es el hierro ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ).

Los cristales de magnetita también son manufacturados comercialmente y pueden ser cubiertos con una variedad de sustancias hidrofílicas, las cuales permiten la formulación acuosa de las partículas con un rango de tamaño preestablecido [14].

Las propiedades magnéticas de las ferritas se describen como superparamagnéticas, lo cual se refiere a unos momentos magnéticos extremadamente largos, que se adquieren en la presencia de campos magnéticos externos [13]. Esta propiedad de las ferritas ha sido explotada en la cromatografía por afinidad magnética, donde las biomoléculas unidas a magnetita pueden ser fácilmente extraídas de una solución simplemente

colocando la mezcla en un campo magnético [14]. Debido a que se conoce que los tiempos de relajación de los protones son alterados en la presencia de momentos magnéticos locales inducidos, se ha propuesto recientemente que las partículas de ferrita pueden utilizarse para la manipulación farmacéutica de la intensidad de la señal de resonancia magnética [15, 16, 17].

Emprendimos el presente estudio para determinar el potencial de las partículas de ferrita como agente de contraste de resonancia magnética. La magnetita, como una partícula de ferrita prototipo, se administró intravenosamente a animales de laboratorio para espectroscopía de resonancia magnética *in vitro* y para analizar las alteraciones en los tiempos de relajación tisulares y los cambios en la intensidad de la señal en la imagen por resonancia magnética *in vivo*.



## **1.2 Factibilidad de que el óxido de hierro superparamagnético pueda ser utilizado como agente de contraste para IRM**

Los agentes de contraste en resonancia magnética aumentan la velocidad de los tiempos de relajación y por consiguiente alteran la intensidad de la señal en las imágenes de resonancia magnética. Esta capacidad es fuertemente dependiente de la magnitud de los momentos magnéticos que esos materiales adquieren (susceptibilidad magnética, expresada en unidades electromagnéticas (UEM)/gramo) cuando se aplica un campo magnético externo. Por ejemplo, los materiales diamagnéticos, tales como el potasio o el hierro ferroso en su estado  $S=0$ , no alteran significativamente la intensidad debido a que su magnetización inducida es insignificante aún en presencia de campos magnéticos extremadamente grandes. En comparación, los materiales paramagnéticos, tales como el hierro férrico, tienen una susceptibilidad magnética mucho mayor, y se sabe que alteran la intensidad de la señal de resonancia magnética eficientemente (3, 4).

Con los compuestos paramagnéticos, el incremento de la señal de los tejidos usualmente ocurre debido al efecto de acortamiento del T1 que es causado por la interacción dipolo-dipolo entre los protones y los iones paramagnéticos (2).

Los momentos magnéticos adquiridos por los materiales ferromagnéticos y superparamagnéticos son extremadamente grandes, aún en campos

magnéticos débiles. Esta sensibilidad única a los campos magnéticos es el resultado de su matriz cristalina, la cual facilita el alineamiento de los espines hacia el campo magnético aplicado. De hecho, este alineamiento es tan eficiente que aún a campos magnéticos bajos, todos los espines pueden ser reclutados, y no se obtiene una ganancia en la magnetización al aumentar la fuerza o la magnitud del campo magnético aplicado (3). Los materiales superparamagnéticos difieren de las sustancias ferromagnéticas debido a que, semejantes a los materiales diamagnéticos y paramagnéticos, ellos no retienen ninguna magnetización una vez que el campo magnético externo es removido. En contraste, una vez magnetizados, los materiales ferromagnéticos muestran una remanencia (ie, permanecen parcialmente magnetizados aún en la ausencia del campo magnético aplicado) y son por lo tanto utilizados para la fabricación de imanes permanentes y materiales magnéticos para grabación (cintas, disquetes, etc.) (18, 19).

En los tejidos, los momentos magnéticos grandes asociados con las partículas de hierro superparamagnéticos se cree que resultan de las inhomogeneidades locales del campo magnético. La difusión de agua a través de estas distorsiones en el campo local produce un desfase rápido de los protones, lo cual resulta en un acortamiento del T2 (20). Presumiblemente, el desfase de los protones (efecto T2\*) es tan rápido que aún el reenfaseamiento del pulso de 180° no puede recuperar la pérdida de la señal. Recientemente, se ha observado un incremento idéntico en la relajación del T2 y en la pérdida de la señal de las secuencias de pulso dependientes de T2 a

causa de los depósitos de hierro férrico en los ganglios basales de individuos normales. La razón para el pequeño cambio en la relajación de T1 no es bien entendida. Puede ser posible, sin embargo, que los grandes cristales de ferrita no posean una frecuencia de resonancia que se sincronice con la de los protones, y por consiguiente, el incremento en la relajación en la dirección longitudinal no ocurre (no hay acortamiento del T1) (19).

En los estudios piloto en animales, los cambios inducidos por la ferrita en los tiempos de relajación y la intensidad de la señal se vieron únicamente en el hígado, bazo y médula ósea, tejidos que tienen una cantidad significativa de células fagocítico mononucleares. Las células del sistema fagocítico mononuclear tienen una función de fagocitosis, la cual efectivamente remueve materiales particulados de la circulación (20).

Ya que las partículas de ferrita (80nm) son más pequeñas que los eritrocitos (los cuales son de aproximadamente 5-7  $\mu\text{m}$ ), ellas pasan fácilmente los capilares pulmonares, por lo tanto evitando la toxicidad respiratoria aguda, y son rápidamente secuestrados por el sistema fagocítico mononuclear (21).

El sistema fagocítico mononuclear es particularmente susceptible para ser marcado por agentes de contraste debido a que las células constituyentes del mismo son altamente resistentes a las lesiones, y las técnicas de imagen que usan agentes de contraste específicos para el sistema fagocítico mononuclear son bien conocidas por los radiólogos. Ya que los tejidos

patológicos tales como los nódulos neoplásicos no poseen células fagocíticas mononucleares y por consiguiente no pueden atrapar materiales particulados pequeños, las ferritas podrían servir para aumentar el contraste de las lesiones focales que se originan en el hígado, bazo o médula ósea por medio de imágenes de resonancia magnética (21).

Las secuencias de pulso que enfatizan el contraste dependiente de T2 (TR largo-TE largo) son las óptimas para la imagen por resonancia magnética con ferrita debido a la disminución de la señal de los tejidos normales que es de hecho más baja que la intensidad de la señal de los tejidos patológicos (ej., metástasis hepática). Los resultados preliminares muestran que estos beneficios pueden ser obtenidos con dosis extremadamente pequeñas de partículas de ferrita (22).

Una ventaja importante de las partículas de ferrita es su efecto monofásico en la intensidad de la señal de los tejidos. Dosis progresivamente mayores de ferrita pueden únicamente reducir la intensidad de la señal hasta el nivel del "ruido" de fondo, y por lo tanto no se puede obtener mayor disminución en la intensidad de la señal. Esta propiedad es más simple y más fácilmente predecible que el efecto bifásico que los agentes de contraste paramagnéticos, tales como el gadolinio DTPA, tienen sobre la intensidad de la señal de los tejidos (23). Con tales compuestos paramagnéticos, el incremento en la señal ocurre a bajas dosis en donde predomina el efecto de T1. Sin embargo, a dosis altas (o quizá debido a consecuencias de hiperconcentración, como en la

médula renal) los efectos de T2 pueden predominar y de hecho disminuir la intensidad de la señal (24).

Debido a la presencia natural en los tejidos vivos, el hierro es un candidato ideal para la manipulación de la intensidad de la señal por resonancia magnética. De hecho, la magnetita ferrita es particularmente óptima debido a que el óxido de hierro ha sido aislado en ciertos pájaros, peces y bacterias donde su interacción con los campos magnéticos de la tierra se ha encontrado que juegan un papel crítico en su navegación, por ejemplo [18]. Los resultados preliminares sugieren que las partículas de ferrita pueden también jugar un papel importante en la manipulación farmacéutica de la intensidad de la señal de resonancia magnética para estudiar el hígado, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos (23).

Las partículas de ferrita tienen un efecto extremadamente poderoso en la relajación de los protones, y esto es fácilmente comprobable, ya que aún con una pequeña dosis, localizada en una porción muy pequeña (aproximadamente 2%) del volumen celular hepático (i.e. células de Kupffer), influye la intensidad de la señal de todo el hígado (25).

### **1.3 Hipótesis**

El óxido de hierro superparamagnético (OHSP) es un material particulado, con profundos efectos sobre el T2, que podría ser utilizado como agente de contraste específico para el Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), y observar su efecto en las Imágenes por Resonancia Magnética (IRM).

### **1.4 Importancia y Justificación**

Si el OHSP es fagocitado por el SFM, su efecto podría ser visto por IRM en órganos como el hígado, bazo, médula ósea, y ganglios linfáticos.

Las patologías específicas de estos órganos, como neoplasias o metástasis, al no contener SFM, no cambiarán su T2, i.e. la intensidad de su señal, y podrían ser detectadas por medio de las IRM.

### **1.5 Objetivo General**

Evaluar el OHSP para ser utilizado como agente de contraste superparamagnético específico para las IRM.

## **1.6 Objetivos Específicos**

Investigar los efectos *in vitro* sobre el T2 por medio de espectroscopía de RMN, e *in vivo* sobre la intensidad de la señal por medio de la IRM.

Estudiar los efectos del OHSP en modelos experimentales de lesiones focales del hígado.

Llevar al cabo estudios clínicos para demostrar la utilidad del OHSP como agente de contraste T2 específico para el SFM hepático.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Oxido de Hierro Superparamagnético

#### 2.1.1 Farmacodinamia y Toxicidad

##### 2.1.1.1 Oxido de Hierro

El óxido de hierro superparamagnético (AMI-25), preparado por la modificación del método de Whitehead et. al [26] fue sintetizado por Advanced Magnetics, Inc., Cambridge, MA. El material se proporcionó como un coloide acuoso estable con una concentración de 200  $\mu$ moles de Fe/ml. (11.2 mg. Fe/ml.). El diámetro volumétrico medio de las partículas fue de 80 nm medido por la dispersión de luz láser (Brookhaven BI-90 medidor de partículas, Brookhaven, N.Y.). La relajación de esta preparación fue de  $3 \times 10^4 \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$  para  $1/T_1$  y  $1 \times 10^5 \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$  para  $1/T_2$  en agua (20 MHz, 37°C). Las propiedades magnéticas de la preparación han sido reportadas previamente [27].

El AMI-25 radioactivo fue sintetizado al incorporar  $^{59}\text{Fe}$  dentro de la porción central del óxido de hierro superparamagnético. La actividad específica fue de 8,460  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$  (313,020 kBq/ $\mu\text{mol}$ ) de Fe al momento de la calibración. Las partículas radiomarcadas fueron mezcladas con las partículas no marcadas para dar una actividad específica de 36  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$  (1332 kBq/ $\mu\text{mol}$ ) de Fe. Los



estudios farmacocinéticos fueron llevados al cabo a una dosis de 18  $\mu\text{mol}$  de Fe/kg (equivalente a 1 mg de Fe/kg), similar a la dosis proporcionada para los estudios clínicos ulteriores de resonancia magnética de 20  $\mu\text{mol}$  Fe/kg. [28].

#### 2.1.1.2 Animales

Ratas Sprague Dawley (Charles River Laboratories, Wilmington, MA.) fueron anestesiadas vía intraperitoneal de 30-50 mg/kg de pentobarbital sódico. 55 ratas Sprague Dawley macho (300-350 grs) fueron utilizadas para los estudios de radio trazadores (4 para estudios de eliminación corporal total, 48 para la biodistribución de órganos, y 3 para la incorporación a los eritrocitos), 39 para las mediciones de tiempo de relajación, y 7 para histología. Los estudios toxicológicos fueron llevados al cabo en 32 ratas Sprague Dawley machos y 32 hembras.

La deficiencia de hierro fue producida al alimentar 30 ratas Sprague Dawley (50-70 grs) (Zivic-Miller Allison Park, PA) con una dieta deficiente de hierro (low iron diet, ICN Nutritional Bioquímica, Cleveland, OH.). Ocho animales controles recibieron una dieta estándar (Purina Rat chow, Ralston Purina, St. Louis, MO.). Los animales fueron conservados en cajas de polietileno con tapas de acero inoxidable.

Un total de 30 perros Beagle (15 machos, 15 hembras de 4 meses de edad) se utilizaron para los estudios de toxicología (Hazleton Research Animals, Cumberland, VA).

### 2.1.1.3 Estudios con radiotrazadores de $^{59}\text{Fe}$

La biodistribución en los órganos fue determinada al inyectar  $^{59}\text{Fe}$ -AMI-25 a una dosis de 18  $\mu\text{mol}$  de Fe/kg. (2  $\mu\text{Ci/kg}$ . (64 kBq/kg)). Los animales fueron sacrificados antes de la inyección y varios intervalos después de la inyección (7.5, 15 y 30 minutos; 1, 2, 4, 8 y 16 hrs.; y 2, 4, 7, 14, 36, 60 y 90 días; 3 animales en cada punto). Los órganos obtenidos para estudio fueron hígado, bazo, sangre, pulmón, riñón, y cerebro, y la radioactividad fue medida junto con los estándares de  $^{59}\text{Fe}$ . La radioactividad fue corregida para cada punto de tiempo para el decaimiento de  $^{59}\text{Fe}$ , y los resultados se expresan como el porcentaje de la dosis inyectada por órgano o gramo de tejido. Los valores fueron expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar.

La incorporación a las células rojas del óxido de hierro fue determinada después de la administración intravenosa de  $^{59}\text{Fe}$ -AMI-25 (18  $\mu\text{mol}$  Fe/kg.) en 3 ratas. Se obtuvieron múltiples muestreos seriados de 0.2 ml de sangre después de 1, 2, 4, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 días. Después de que las muestras de sangre fueron centrifugadas y lavadas, se contaron 0.05 ml de eritrocitos. Al día 21, el volumen sanguíneo total fue determinado por la técnica

de dilución del radioisótopo  $^{51}\text{Cr}$ . El volumen de células rojas fue calculado como el volumen sanguíneo total multiplicado por el hematocrito.

Los estudios de eliminación corporal total se realizaron en cuatro ratas, que fueron inyectadas con  $^{59}\text{Fe}$ -AMI-25 a  $18\ \mu\text{mol Fe/kg}$ . ( $2\ \mu\text{Ci/kg}$  ( $64\ \text{kBq/kg}$ )).

Las cuentas para cada rata se obtuvieron inmediatamente en una cámara de conteo (Tobor Nuclear Chicago, II.), y entonces las ratas fueron colocadas en una caja metabólica. El conteo seriado fue llevado al cabo por dos horas, y a 2, 4, 7, 14 y 28 días. Las muestras separadas de heces y orina y la muestra estándar de  $^{59}\text{Fe}$  fueron contadas a puntos idénticos en el tiempo.

#### 2.1.1.4 Estudios de Deficiencia de Hierro

Las ratas pequeñas fueron divididas en cuatro grupos de cinco animales cada uno. El Grupo I recibió una dieta estándar (control normal), y los Grupos II al IV recibieron dietas de deficiencia de hierro. Después de cuatro semanas, las ratas en el Grupo I (control normal) y Grupo II (deficiencia de hierro) fueron sacrificadas para confirmar la presencia de deficiencia de hierro. Los animales en el Grupo III recibieron una inyección única intravenosa de hierro dextrán como un control positivo (Imferón, Merrel Dow Pharmaceuticals;  $30\ \text{mg Fe/kg}$ ), y el Grupo IV recibió una inyección única de óxido de hierro

superparamagnético (AMI-25; 537  $\mu\text{mol Fe/kg}$  correspondiendo a 30 mg Fe/kg.). A los días 1, 3, 5, y 7 después de la administración de imferón y AMI-25, las ratas del Grupo III y del Grupo IV fueron sacrificadas por exanguinación vía punción cardiaca. El hematocrito [29], la hemoglobina [29], el hierro sérico [30], y la capacidad total de unión del hierro [31], fueron determinados usando métodos estándar. Las concentraciones de hierro del hígado fueron determinadas utilizando el método químico de Torrance y Bothwell [32].

Para evaluar el efecto de dosis en aliviar la anemia, llevamos al cabo un estudio separado. Se administraron a ratas anémicas varias dosis de AMI-25 (18, 89, 179, 357, Y 356  $\mu\text{mol Fe/kg}$  correspondiendo a 1, 5, 10, 20 y 30 mg de Fe/kg (N=3 para cada dosis). En este grupo de animales, únicamente el hematocrito y las concentraciones hepáticas de hierro fueron determinadas 7 días después de la administración.

#### 2.1.1.5 Medición de los Tiempos de Relajación

Los tiempos de relajación del hígado, bazo, pulmón, riñón, y músculo fueron determinados para medir el efecto de AMI-25 en cada tejido. El AMI-25 fue inyectado a una dosis de 18  $\mu\text{mol Fe/kg}$  en grupos (N=3) de animales sacrificándolos a los 7.5, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos y al 1, 2, 4, 7, 14, 28 y 91 días después de la inyección. Los animales fueron sacrificados por exanguinación, y los órganos fueron removidos inmediatamente. Los tiempos

de relajación fueron medidos a 37°C en un lapso de una hora después del sacrificio. Los valores de T2 fueron obtenidos usando un espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear (PC20 Minispech IBM) operando a 0.47T correspondiendo a una frecuencia de resonancia de 20 MHz. Después de la calibración, el T2 fue obtenido del análisis de 10 puntos de datos generados con la secuencia de pulso de Carr-Purcell-Meiboom-Gill. Los valores de T2 fueron graficados como los valores recíprocos (1/T2)/tiempo.

#### 2.1.1.6 Estudios Patológicos

El examen histológico del hígado fue llevado al cabo para documentar la desaparición del hierro teñible después de la administración de AMI-25. Las revisiones histológicas fueron llevadas al cabo antes, a las 3 hrs., y a los 1, 2, 9, 16, y 30 días después de la administración de AMI-25 (18  $\mu\text{mol Fe/kg}$ ; 1 mg Fe/kg). Las muestras de los hígados fueron fijadas en 10% de formalina, embebidas en parafina y teñidas con una tinción para hierro con el azul de Prusia de Perls. En este método histoquímico, el hierro férrico es disuelto de los complejos orgánicos (hemosiderina, ferritina, hierro dextrán, AMI-25, etc.) por el ácido clorhídrico, y entonces reacciona con el ferrocianuro de potasio ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{Cn})_6$ ) para formar el precipitado azul, el ferrocianuro férrico ( $\text{Fe}_4(\text{Fe}(\text{Cn})_6)_3$ ) [33]. Las secciones teñidas con azul de Prusia fueron codificadas al azar y posteriormente evaluadas para su contenido de hierro por un patólogo.

### 2.1.1.7 Toxicidad

Los estudios de toxicidad aguda fueron llevados al cabo en 18 ratas y en 12 perros Beagle. Los animales fueron inyectados con 500  $\mu\text{mol Fe/kg}$  (28 mg Fe/kg) o 3000  $\mu\text{mol Fe/kg}$  (168 mg Fe/kg de AMI-25). Los animales controles fueron manejados e inyectados en una manera similar pero no recibieron AMI-25. Los animales fueron observados por 14 días, sacrificados, y se les realizó autopsia.

Los estudios de toxicidad subaguda fueron llevados al cabo en 60 ratas y en 18 perros Beagle. Sobre un período de 3 semanas cada animal recibió un total de 9 inyecciones ya sea con 0.50  $\mu\text{mol Fe/kg}$  (2.8 mg Fe/kg), o 250  $\mu\text{mol Fe/kg}$  (14 mg Fe/kg) de AMI-25 por inyección. Todos los animales fueron revisados 2 veces al día para mortalidad y morbilidad, y se realizó un examen físico detallado antes del inicio del experimento y semanalmente posteriormente. Se examinaron muestras de sangre (hematocrito, hemoglobina, conteo de eritrocitos, conteo de leucocitos, diferencial, y plaquetas), suero (Na, K, Cl, Ca, albúmina, globulina, fosfatasa alcalina, bilirrubina, nitrógeno de la urea, glucosa, deshidrogenasa láctica, aminotransferasa de aspartato, aminotransferasa de alanina, colesterol y hierro sérico) y de orina, antes del estudio y en el último día de éste. Después de 3 semanas los animales fueron sacrificados y autopsiados. El examen macroscópico fue llevado al cabo en 41 muestras de tejido. La histología se realizó en los siguientes tejidos: hígado, bazo, pulmón, médula ósea, ganglios linfáticos, riñón, cerebro, médula espinal,

corazón, aorta, glándulas, testículos, ovarios, útero, intestino, páncreas, vejiga, músculo, y en el sitio de la inyección.

La mutagenicidad fue estudiada por el ensayo de mutación de la reversa microsomal de la *salmonella* de Ames, la cual mide la mutación que condiciona un regreso a la dependencia a la histidina en los mutantes de *salmonella typhimurium* [34]. Esta prueba es ampliamente utilizada y ha sido desarrollada para probar productos químicos en su capacidad para interactuar con el DNA o la mutagenicidad [35].

Se utilizaron cinco diferentes cepas de salmonella (TA-1535, TA-1537, TA-1538, TA-90 y TA-100) (B. Ames, University of California at Berkeley, Berkeley, CA) y fueron almacenadas como cultivos congelados. Diferentes dosis de óxido de hierro, con una concentración desde 0.143 a 214  $\mu\text{mol}$  Fe/platina (0.008 a 12 mg Fe/platina) de AML-25, fueron incubadas con colonias ( $10^9$  bacterias) a 37°C por dos días. Posteriormente, se cuantificó el número de colonias por platina.

## **2.1.2 Estudios Específicos de Toxicidad Hepática**

### **2.1.2.1 Animales y Dietas**

Ratas macho (150-300 gr) de la cepa Sprague-Dawley fueron conservadas en un bioterio en cajas de polietileno con tapas de acero inoxidable. Se les permitió a las ratas el libre acceso al alimento (alimento para rata de Purina) y agua.

### **2.1.2.2 Partículas de ferrita**

Las partículas de ferrita (4125; Advanced Magnetics Inc.) usadas en estos experimentos fueron  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Magnetita) con un tamaño promedio entre 0.5 a 1 micra en diámetro (incluyendo la cubierta de polímero). La partícula de polímero magnetita es 60% de hierro por peso.

### **2.1.2.3 Toxicidad Aguda**

Para los estudios de toxicidad aguda, las ratas (N=9) fueron inyectadas intravenosamente (6 ml en dosis divididas sobre un período de 24 horas en la vena de la cola) con una suspensión de partículas de ferrita, recibiendo un total de 250 mg Fe/kg. (10 mg Fe/ml). Las ratas control (N=10) recibieron un volumen equivalente de solución salina. Las ratas experimentales y los



controles fueron manejados idénticamente. 48 horas después de la inyección de ferrita, las ratas fueron sacrificadas por exanguinación vía una punción cardiaca bajo el efecto de ligera anestesia con éter. Un grupo de las ratas inyectadas con ferrita (N=4), y sus controles respectivos (N=5), fueron usados para estudios de peroxidación lípida mitocondrial y metabolismo oxidativo mitocondrial (ver abajo). Las restantes ratas inyectadas con ferrita (N=5) y sus respectivos controles (N=5) fueron usados para estudios de peroxidación lípida microsomal y varios parámetros de función microsomal (ver abajo).

#### 2.1.2.4 Toxicidad Crónica

Para los estudios de toxicidad crónica, las ratas (N=8) (peso medio:163 grs.) fueron inyectadas intravenosamente (a través de la vena de la cola) con una inyección única de 0.5 ml de la suspensión de partículas de ferrita (10 mg Fe/ml), recibiendo 30 mg Fe/kg. Las ratas usadas como controles no fueron tratadas pero fueron aproximadamente de la misma edad y peso al tiempo del sacrificio. Las ratas experimentales y de control fueron manejadas en forma idéntica. Un grupo de las ratas inyectadas con ferrita (N=4) y sus respectivos controles (N=4) fueron sacrificados (como se describió arriba) 10 semanas después de la inyección. Estas ratas fueron usadas para estudios de peroxidación lípida mitocondrial y metabolismo oxidativo mitocondrial (ver abajo). El resto de las ratas inyectadas con ferrita (N=4) y sus controles respectivos (N=4) fueron sacrificados 11 semanas después de la inyección y

fueron usadas para estudios de peroxidación lípida microsomal y varios parámetros de la función microsomal (ver abajo).

#### 2.1.2.5 Estudios Bioquímicos

La evidencia de la peroxidación lípida mitocondrial y microsomal fue determinada por ensayos de dienes de lípidos conjugados como se ha descrito previamente [36].

La peroxidación lípida fue cuantificada por la diferencia en la absorción a 230 Nm-Mg del lípido extraído de las fracciones de los organelos entre las ratas experimentales y los controles, debido a la formación de dienes de lípidos conjugados. La función mitocondrial hepática fue evaluada al estudiar el metabolismo oxidativo (estado 3 y estado 4 de los ritmos respiratorios, relación del control respiratorio y relaciones de adenosina difosfato entre oxígeno) con glutamato y succinato como substratos [37]. La función microsomal hepática fue evaluada por la medición de la concentración de citocromo P 450 y de la demetilasa de aminopirina y la actividad de la glucosa 6 fosfatasa con métodos que han sido descritos previamente. Estos estudios bioquímicos fueron elegidos debido a que se ha probado que son indicadores sensitivos de la disfunción de los organelos hepatocelulares asociados con sobrecarga de hierro [36-38].

Las concentraciones de hierro no unidas a Hem fueron medidas en muestras de hígado, bazo, riñón y tejido pulmonar por el método de Torrance y Bothwell [32]. Los resultados son expresados como microgramos de Fe por gramo de tejido (peso húmedo). Las concentraciones de alaninaminotransferasa plasmática fueron medidas de acuerdo al método de Henry y cols. [39] en ratas tanto de los experimentos a corto como a largo plazo.

#### 2.1.2.6 Microscopía de Luz

Los bloques de tejido se fijaron en formalina al 10%, deshidratados con series graduales de alcohol etílico, y posteriormente embebidos en parafina. Se prepararon secciones de 5µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se utilizó la tinción de azul de Prusia de Perls para hierro trivalente para evaluar el contenido de hierro.

#### 2.1.2.7 Microscopía de Electrónica

Se fijaron fragmentos de hígado de 1 mm<sup>3</sup> (tomados de una rata 24 horas después de la administración de 4 mg de Fe/kg de ferrita) con 1.25% de glutaraldeido y 1% de paraformaldeido en una solución buffer de 0.1 mol/L de cocodilato sódico a un pH de 7.4 con 0.05% de CaCl<sub>2</sub> por una hora, postfijado con 1% de tetraóxido de osmium en buffer por 1 hora. Las muestras fueron teñidas en bloque con acetato de uranil por una hora, deshidratadas con series graduadas de etanoles, infiltradas con óxido de propileno y una resina epóxica

Poly-Bed 812/Araldita, y curada por 48 horas a 60°C. Se cortaron secciones de 1 µm usando un ultramicrotomo LKB III y teñidas con azul de toluidina al 1%. Las secciones fueron cortadas aproximadamente a 70 nm, teñidas con acetato de uranil y citrato de plomo, y examinada con un microscopio electrónico de transmisión Philips 410 a un voltaje de aceleración de 80 kV.

#### 2.1.2.8 Estudios Serológicos

Un tercer grupo de experimentos se llevó al cabo en el cual tres grupos de ratas (N=5, cada grupo) recibieron una inyección única intravenosa de partículas de ferrita (4 mg de Fe/kg, por la vena de la cola). La sangre fue obtenida antes de la inyección de las partículas de la ferrita y a los días 1 y 7 (Grupo 1), días 4 y 12 (Grupo 2), y días 7 y 25 (Grupo 3). Las muestras de suero fueron analizadas usando un analizador Technicon SMA 20 y fueron evaluadas para las concentraciones de sodio, potasio, cloro, CO<sub>2</sub>, calcio, fósforo inorgánico, hierro, glucosa, nitrógeno de la urea, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicéridos, proteínas totales, albúmina, bilirrubina total, fosfatasa alcalina, alaninaminotransferasa, asparato de aminotransferasa y deshidrogenasa láctica.

#### 2.1.2.9 Métodos Estadísticos

Los resultados son presentados como la media ± una desviación o un error estándar de la media. La significancia de las diferencias fue evaluada al usar la prueba de T de Student comparando las medias de los grupos.

## **2.2 Evaluación Experimental de la Utilidad del Oxido de Hierro Superparamagnético en la detección de lesiones Focales Hepáticas**

### **2.2.1 Partículas de Ferrita**

Los cristales de ferrita superparamagnéticos ( $\text{Fe}^{+3}_2\text{O}_3 \cdot \text{Fe}^{+2}\text{O}$ ) de 100-200 Å en tamaño, fueron cubiertos ya sea con un material hidrofílico para producir partículas de 0.2-1.0  $\mu\text{m}$  (Advanced Magnetics, Cambridge, Massachusetts) o partículas de albúmina de 2-5  $\mu\text{m}$  (Molecular Biosystems, San Diego). El recubrimiento previene la agregación de los cristales y permite un control sintético del tamaño de las partículas, así como de la formulación de la suspensión acuosa que permite ser utilizada para inyección intravenosa. Las características físicas de estas partículas han sido descritas anteriormente.

Las partículas de ferrita fueron inyectadas dentro de la vena de la cola de las ratas en un bolo de 1 ml. Ya que las partículas tienden a sedimentarse en la solución, fueron suspendidas inmediatamente antes de la inyección por una agitación vigorosa. Para los estudios in vitro de ratas, utilizamos una dosis de 50  $\mu\text{moles}$  de Fe/kg, que es la dosis efectiva (DE 50) reportada para los agentes de contraste. La DE 50 se define como la dosis del agente de contraste de RM que reduce el tiempo de relajación T1 o T2 en un 50% [40].

Ya que la intensidad de la señal en las imágenes de resonancia magnética en vivo es aún más sensible a la dosis administrada, las imágenes

de resonancia magnética se realizaron con una dosis de 20  $\mu$ moles de Fe/kg en las ratas y en el conejo y de 10  $\mu$ m/kg en los experimentos en monos.

Inicialmente, empleamos un modelo de rata de cáncer hepático en el cual nódulos de tumor intrahepático fueron producidos por una implantación quirúrgica de un trocar con células de adenocarcinoma mamario de rata (R 3230 AC, Tumor Bank of the National Cancer Institute and EG&G Mason Research Institute, Worcester, MA.) en ratas Fisher 344 adultas femeninas (Charles River Riders, Wilmington, MA.) [41].

Esta línea tumoral es un modelo de laboratorio ideal, ya que el adenocarcinoma es la variedad histológica más común de metástasis hepáticas (ej. colon, páncreas, mama) y debido a que las masas tumorales crecen como nódulos solitarios completamente dentro del hígado y no metastatizan local o distalmente. La caracterización in vitro del crecimiento tumoral y los tiempos de relajación se han realizado en más de 100 ratas. Los nódulos tumorales se originan en más del 90% de las ratas que reciben los implantes y crecen a un ritmo uniforme. Las ratas fueron sacrificadas a los 7, 14, 21 y 28 días después de la implantación y tenían nódulos que eran de 0.5, 0.5-1.0, 1.0-1.5, y mayores de 2 cms en tamaño, respectivamente.

Únicamente las masas tumorales mayores de 2 cms. mostraron una variación considerable en sus tiempos de relajación T1 y T2 debido al desarrollo de necrosis central. Por consiguiente, nuestros experimentos se

condujeron 14 días después de la implantación tumoral, cuando los nódulos tumorales fueron de aproximadamente 0.5-1.0 cm. y no habían desarrollado liquefacción necrótica central.

Para los experimentos con las especies de un orden mayor, utilizamos conejos blancos de Nueva Zelanda de 1 Kg, 21 días después de una implantación intrahepática similar del carcinoma VX2, y monos Cynomologous de 2 a 3 Kg, 17 días después de la implantación intrahepática de células de fibrosarcoma.

### **2.2.2 Espectroscopía por Resonancia Magnética**

La determinación espectroscópica por resonancia magnética de los tiempos de relajación tisulares se realizó en un Multispec PC-20 (IBM, Danbury, Connecticut). Esta magneto permanente opera con una fuerza de campo magnético de 0.47T (20 MHz). El T1 fue medido por un cálculo no lineal de los últimos cuadrados de 8 puntos de datos, generado con una secuencia de pulso de recuperación de la inversión (RI) estándar. El T2 fue determinado por 10 puntos de datos, generados con una secuencia de Carr-Purcell-Meiboon-Gill. Todos los valores representan un promedio de 3 medidas consecutivas.

Los rangos normales de tiempos de relajación de T1 y T2 para el hígado y los tumores fueron determinados en 6 ratas controles que no recibieron

ferrita. Después de la administración intravenosa de 50 $\mu$ mol. Fe/Kg., los tiempos de relajación del hígado y del tumor fueron medidos en cuatro ratas. Los tiempos de relajación de los tejidos fueron determinados tres horas después de la inyección para asegurar un aclaramiento completo de la sangre debido a que las partículas secuestradas no son degradadas o eliminadas del hígado por al menos 21 días después de su administración, como se describió en la sección de farmacodinamia.

La significancia estadística se determinó por una prueba de *t* de Student.

### **2.2.3 Imagen por Resonancia Magnética**

La imagen por resonancia magnética, tanto de las ratas como de los conejos fue practicada con una magneto superconductor (Technicare, Solom, Ohio) operando a una fuerza de 1.4T (61.4MHz). La técnica utilizada fue de una sola sección con un solo eco y las imágenes fueron obtenidas utilizando 128 niveles de gradientes de codificación de fase. Las imágenes reconstruidas tenían un grosor de sección de 3mm y una resolución submilimétrica en el mismo plano.

Las secuencias de pulso utilizadas fueron EE 250/15/6 (tiempo de repetición en milisegundos (TR), tiempo de eco en milisegundos (TE), adquisiciones (NEX)) y técnica de recuperación de la inversión de



1500/450/15/2 (TR, tiempo de inversión en milisegundos (TI), TE, NEX) para las dependientes de T1, EE de 1500/60/2 para las dependientes de T2 y EE 500/30/3 para las de densidad de protones. Cinco ratas (anestesiadas con 35 mg/kg de pentobarbital sódico inyectado en la cavidad peritoneal), y dos conejos (anestesiados con 10 mg/kg de ketamina inyectada intramuscularmente), fueron llevados a la magneto para practicárseles imagen de resonancia magnética antes de la administración de ferrita y se localizaron los tumores hepáticos. Sin mover los animales, las imágenes fueron obtenidas seriadamente 60 minutos después de la inyección de un bolo de 20  $\mu$ moles de Fe/kg. En una rata, se utilizó una dosis de 50  $\mu$ moles de Fe/kg. La presencia del tumor fue confirmada por necropsia en todos los animales.

La imagen por resonancia magnética se practicó en dos monos (anestesiados con ketamina-acepromasina inyectada intramuscularmente) con una antena de superficie (de cuello) en un sistema superconductor de cuerpo entero (Technicare), operando a una fuerza de campo magnético de 0.6T (24 MHz). Se utilizó una técnica de eco del espín con múltiples secciones y múltiples ecos, con un grosor de sección de 5 mm. y también con 128 pasos en la codificación de fase.

Se utilizaron secuencias dependientes de T2 (EE 1500/45, 90/2 y de densidad de protones (EE 500/30/6) para obtener las imágenes antes y 30 minutos después de la administración de 10  $\mu$ mol. Fe/g. Después de las

imágenes, los animales fueron sacrificados para obtener la correlación anatómica.

#### **2.2.4 Análisis de las Imágenes**

Las imágenes de las ratas fueron analizadas utilizando una región de interés seleccionada por el operador, y la media de la intensidad de la señal fue medida en el hígado, tumor, y en el ruido de fondo. El ruido de fondo intrínseco fue determinado al utilizar una región grande, elíptica, que excluía las imágenes fantasmas (artefacto por movimiento). El ruido de fondo total (i.e., ruido intrínseco + ruido fantasma) fue determinado al colocar una región redonda de interés directamente sobre las imágenes fantasmas. El ruido intrínseco fue sustraído del ruido de fondo total para calcular el ruido causado por el movimiento fisiológico. Debido a que las ratas estaban sujetas con cinta adhesiva para asegurar que no se movieran durante la imagen, y además fueron reanestesiadas antes de cada secuencia de pulso, todos los movimientos voluntarios resultantes de las diferencias en la profundidad de anestesia fueron minimizados.

La relación de las diferencias en la intensidad de la señal (IS) entre el tumor y el hígado con respecto al ruido de fondo (la relación de diferencia de la intensidad de la señal con el ruido fue medida utilizando la siguiente fórmula:  $\text{contraste} = (\text{IS del tumor} - \text{IS del hígado}) - \text{IS del ruido}$ ). El contraste fue calculado separadamente para el ruido intrínseco y para el ruido de fondo total.

El contraste para las diferentes secuencias de pulso fue comparado después de corregir las variaciones en sus tiempos de estudio como sigue:  $\text{contraste corregido} = a \text{ contraste} \times ((\text{tiempo de estudio estándar} - \text{tiempo de estudio actual})^{1/2})$ . Esto permite una comparación de las secuencias de pulso con diferentes tiempo de estudio que resulta por las variaciones de los tiempos de repetición o el número de adquisición de datos [42, 43].

Las imágenes obtenidas antes y después de la administración de ferrita fueron reproducidas con un brillo y contraste óptimos para cada secuencia.

### **2.2.5 Análisis de los Tejidos**

Los tejidos del hígado y del tumor fueron analizados para identificar la localización celular de las partículas de ferrita y para identificar cualquier evidencia de lesión celular. Se realizó microscopía electrónica de transmisión y la microscopía de luz (con tinción de azul de Prusia para hierro) en los especímenes de dos ratas tres horas después de la inyección de 330  $\mu\text{mol Fe/kg}$  y de un mono 24 horas después de la administración de 10  $\mu\text{mol Fe/kg}$ . En las ratas, se utilizó una dosis seis veces mayor que la reportada para la DE 50 del hígado in vitro, con la finalidad de identificar una captación aún mínima si existiera por parte de las células no fagocítico mononucleares.

## **2.3 Aplicaciones Clínicas del Óxido de Hierro Superparamagnético como Agente de Contraste para la Imagen Por Resonancia Magnética del Hígado**

### **2.3.1 Óxido de Hierro**

El óxido de hierro superparamagnético cristalino preparado con una modificación del método de Whitehead et.al. [26], fue obtenido como AMI-25 de la Compañía Advanced Magnetics de Cambridge, Massachusetts. Como se mencionará en las secciones de toxicología y farmacodinamia de la Investigación Preclínica, estas partículas y partículas semejantes de hierro no han mostrado toxicidad y han sido efectivas como agentes de contraste en estudios animales. El diámetro medio de las partículas utilizadas en el presente estudio fue de 80 nm (con un rango de 50 a 100 nm) medido por el método de dispersión de luz láser, y en agua destilada las partículas forman un coloide estable. La concentración de hierro fue de 0.2 M.

### **2.3.2 Pacientes**

El protocolo de estudio fue aprobado por los Subcomités Éticos de investigación en estudios humanos del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" y del Massachusetts General Hospital. Todos los pacientes firmaron una hoja de consentimiento en donde se explicaban las características, posibles riesgos y ventajas del presente estudio.

Se seleccionaron 15 pacientes (8 hombres, 7 mujeres) entre 26 y 68 años de edad para este estudio. Todos los pacientes tenían metástasis hepáticas probadas por biopsia hepática o por biopsia del cáncer primario (6 tenían adenocarcinoma de colon, 3 tenían carcinoma de células de los islotes, 2 tenían melanomas, 1 tenía carcinoide, 1 tumor renal, 1 adrenal y 1 adenocarcinoma de mama) y se demostraron múltiples lesiones hepáticas ya sea con tomografía computada o ecografía. Todos los pacientes fueron observados por 2 horas después de la administración de la droga y fueron reexaminados un día después. Entrevistas de seguimiento, exámenes físicos, estudios rutinarios de laboratorio, y revisión de los expedientes médicos 3 a 6 meses después de la inyección fueron practicados en los 15 pacientes.

### **2.3.3 Imagen por Resonancia Magnética**

Las imágenes fueron llevadas al cabo con una magneto permanente (Fonar  $\beta$  3000) operando a 0.3 Tesla (13.3 MHz.), y en una magneto superconductor (Technicare) operando a 0.6 Tesla (25.1 MHz.). Las imágenes cuyo contraste dependía del T1 de los tejidos fueron obtenidas con la secuencia de pulso de eco del espín con un tiempo de repetición (TR) de 250 o 260 mseg, y con un tiempo de eco (TE) de 14 a 16 mseg. También se obtuvo una secuencia con un TR de 500 mseg y un TE de 28 mseg. Las imágenes cuyo contraste básicamente dependía del T2 de los tejidos fueron obtenidas con la misma secuencia de eco del espín pero con un TR de 1500 mseg y un

TE de 40 y 80 mseg. El tiempo de la imagen fue estandarizado a 7 minutos por secuencia, y cada secuencia produjo de 7 a 11 cortes axiales simultáneos.

Las imágenes de base sin contraste fueron obtenidas antes de la inyección intravenosa, la cual se llevó al cabo en un período de 90 segundos, y se administraron de 10 a 50  $\mu\text{mol/kg}$ . de coloide sin diluir de la ferrita (10 pacientes recibieron 20  $\mu\text{mol/kg}$ ., 2 recibieron 30  $\mu\text{mol/kg}$ ., y dosis de 10, 40 y 50  $\mu\text{mol/kg}$ . fueron administradas a 1 paciente cada una de ellas). Las imágenes contrastadas con ferrita fueron obtenidas 1 a 2 horas después, repitiendo las secuencias de base de 500 y 1500 mseg de TR.

Las imágenes fuertemente dependientes de T1 de 260 mseg no fueron utilizadas después de la administración de ferrita debido a que la teoría indica que esta sería una técnica muy poco sensible, ya que el agente de contraste básicamente altera el T2 de los tejidos como se demostró en la investigación preclínica. Se obtuvieron imágenes adicionales de 1 a 72 horas después de la administración de la droga en algunos pacientes. Sólo los datos de las imágenes que se obtuvieron 1 a 2 horas después de la administración de contraste en los 10 pacientes que recibieron los 20  $\mu\text{mol/kg}$  fueron incluidos en el análisis cuantitativo de este trabajo.

El análisis de las imágenes postcontraste de 1 a 2 horas después de la administración de AMI-25 fue realizado con el uso de técnicas cuantitativas bien estandarizadas. La medición de la intensidad de la señal se obtuvo en el

tumor, hígado, bazo, músculo, grasa, médula ósea, riñón, páncreas y ruido térmico de fondo. Las intensidades de los tejidos, en escala a la relación del ruido de fondo de la misma imagen, se expresan como la relación señal / ruido (S/R). La relación contraste / ruido (C/R) fue calculada como la diferencia entre la intensidad de la señal de la lesión menos el hígado escalada al ruido de la imagen, en donde se incluían también los artefactos por movimiento. La C/R es usada como una medida del desempeño del sistema de imagen y correlaciona con el valor diagnóstico de las diferentes técnicas de imagen por resonancia magnética [42, 44, 45].

El análisis subjetivo de las imágenes se realizó contando el número de metástasis visibles dentro de un grupo de imágenes con múltiples secciones y midiendo el tamaño de la lesión mas pequeña visualizada con cada secuencia de pulso. Para la mayoría de las lesiones la confirmación se basó en la visualización de la misma estructura en mas de una imagen, de una manera altamente subjetiva. Esta poca certeza es inevitable para la prueba de lesiones hepáticas individuales y ha sido bien discutida previamente en la literatura [44]. Los datos de las imágenes antes y después de la administración del contraste, (específicamente la S/R y C/R, los grados de detección de las lesiones, los tamaños mínimos para la detección de las lesiones), fueron analizados para los pacientes individuales con la prueba para muestras pares de Wilcoxon [46]. Específicamente, las imágenes antes y después de la administración de contraste fueron ordenadas en términos de estos valores, y la estadística fue aplicada a estos rangos.

### **2.3.4 Aclaramiento Sanguíneo**

Se obtuvieron muestras de sangre antes de la administración de AMI-25 y seriadamente a intervalos que variaron de 2 minutos a 24 horas para los primeros cinco pacientes. Cada paciente tuvo al menos 7 muestras tomadas en los primeros 300 minutos. Las muestras fueron anticoaguladas con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Los tiempos de relajación, T1 y T2 de las muestras sanguíneas fueron medidos a 37°C con un espectrómetro Bruker PC 20 operando a 0.47 Tesla (20 MHz.)

La vida media de la ferrita superparamagnética en 5 pacientes fue calculada de las constantes de eliminación de primer orden para un modelo abierto uni o bicompartamental [47]. Estas constantes fueron determinadas por la fórmula del último cuadrado de los promedios ( $1/T$ ) de  $1/T_1$  y  $1/T_2$ , cada uno normalizado a valor preinyección. El promedio de  $1/T$  fue graficado contra tiempo y calculado en forma tanto mono como biexponencial para la evaluación de lo bueno de la correlación. Se utilizó el modelo más simple que resultó en el coeficiente de correlación mayor de 0.95 para cada sujeto.



## 3. RESULTADOS

### 3.1 Oxido de Hierro Superparamagnético

#### 3.1.1 Farmacocinética

##### 3.1.1.1 Distribución

Una hora después de la inyección de  $^{59}\text{Fe}$ -AMI-25, se encontró una alta concentración de  $^{59}\text{Fe}$  en el hígado ( $82.6\pm 0.26\%$  de la dosis inyectada) y en bazo ( $6.2\pm 7.31\%$  de la dosis inyectada). Cuando se expresó la biodistribución por órganos como el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido, el hígado ( $6.3\pm 0.52\%/g$ ) y el bazo ( $10.9\pm 7.56\%/g$ ) mostraron la mayor concentración (Figura 1). Únicamente se detectaron cantidades mínimas de  $^{59}\text{Fe}$  en otros tejidos tales como el riñón, pulmón y cerebro.

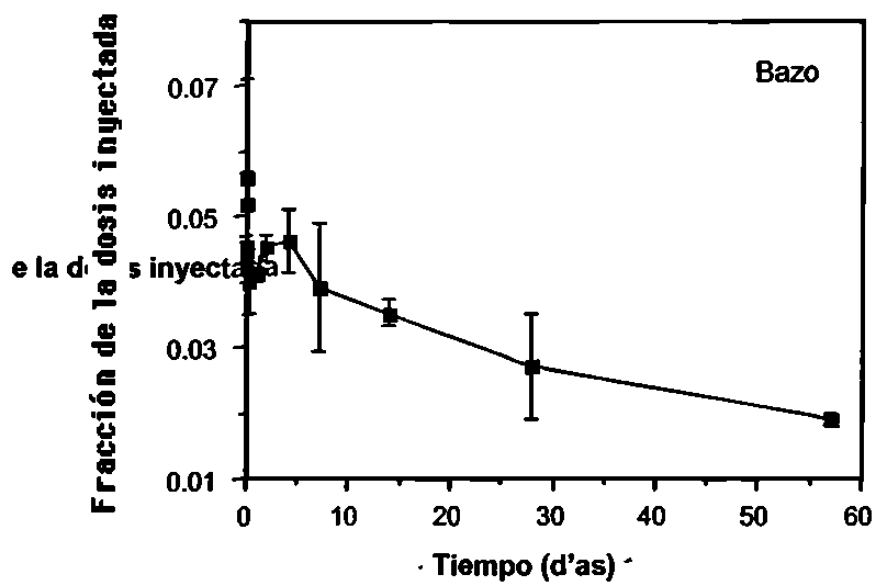
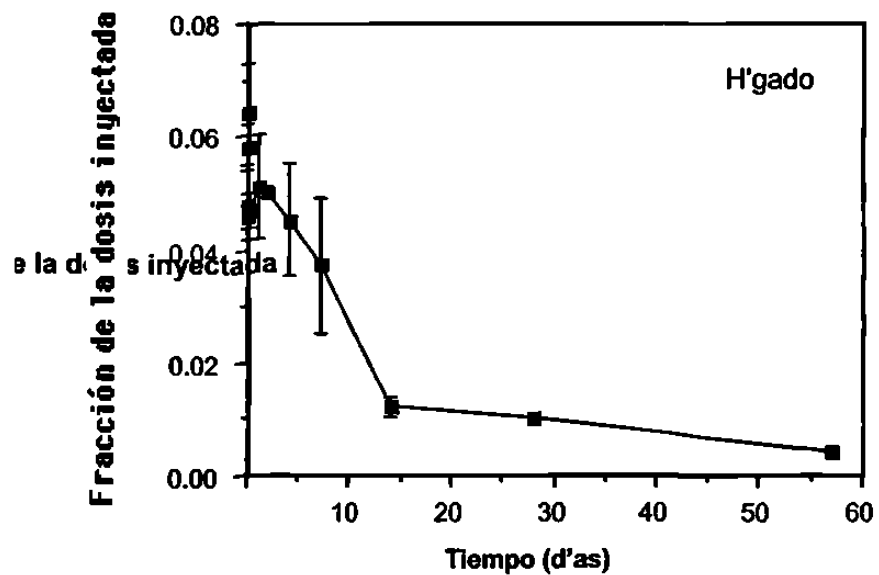


Figura 1. Las gráficas muestran el aclaramiento de  $^{59}\text{Fe}$  del AMI-25 en el hígado (arriba) y en el bazo (abajo).

Las determinaciones de los tiempos de relajación T2 mostraron una distribución tejido-específica similar en el sistema fagocítico mononuclear (Tabla I). Una hora después de la administración, el  $1/T_2$  del hígado aumentó de  $27.1 \pm 1.6 \text{ mseg}^{-1}$  a  $58.4 \pm 1.7 \text{ mseg}^{-1}$  (215%) y el del bazo incrementó de  $16.1 \pm 0.9 \text{ mseg}^{-1}$  a  $52.6 \pm 7.6 \text{ mseg}^{-1}$  (327%). Los cambios en el  $1/T_2$  del pulmón, riñón y músculo fueron mínimos.

$1/T_2 \text{ (seg.}^{-1}\text{)}$			
Órgano	Antes	Después	Relación*
Hígado	$27.1 \pm 1.6$	$58.4 \pm 1.7$	0.54
Bazo	$16.1 \pm 0.9$	$52.6 \pm 7.6$	0.69
Pulmón	$13.2 \pm 0.8$	$14.9 \pm 0.9$	0.11
Riñón	$18.7 \pm 1.2$	$19.4 \pm 1.0$	0.04
Músculo	$23.1 \pm 1.8$	$25.2 \pm 1.2$	0.08

**Tabla I.** Relaciones de relajación ( $1/T_2$ ) antes y 1 hora después de administrar AMI-25.

\*  $(T_2\text{post} - T_2\text{pre})/T_2\text{pre}$ . Una relación de cero indica no captación. A mayor relación, mayor captación.

### 3.1.1.2 Metabolismo

El aclaramiento orgánico se determinó al medir la desaparición orgánica del  $^{59}\text{Fe}$  (Figura 1) y por determinaciones seriadas de los tiempos de relajación T2 (Figura 2). Se logró una concentración máxima de  $^{59}\text{Fe}$  en el hígado a las 2 horas ( $88.6\pm 3.4\%$  de la dosis inyectada). En el bazo, la concentración máxima ( $18.9\pm 2.8\%$  de la dosis inyectada), fue observada 4 horas después de la inyección, indicando una redistribución del hierro. La vida media observada del  $^{59}\text{Fe}$  fue de 3 días en el hígado y de 4 días en el bazo.

Las mediciones de los tiempos de relajación (Figura 2) mostraron un incremento máximo del  $1/T_2$  del hígado y del bazo dentro de las primeras 4 hrs. después de la administración del AMI-25. Posteriormente, el  $1/T_2$  disminuyó consistentemente. El tiempo medio del hígado y el bazo del efecto  $1/T_2$  fue más corto que el del aclaramiento de órganos medidos por los estudios de  $^{59}\text{Fe}$ . En ambos, el hígado y el bazo, la vida media del efecto  $1/T_2$  ocurrió dentro de las primeras 24-48 hrs.

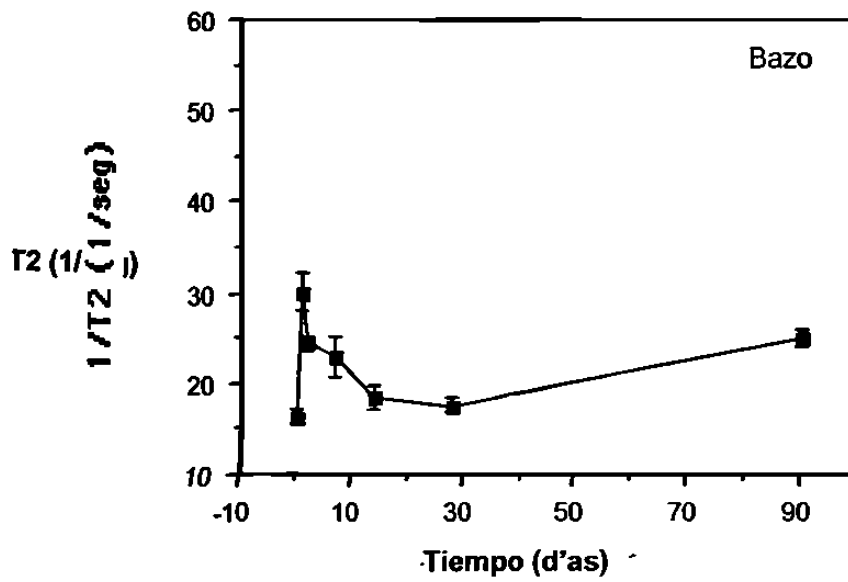
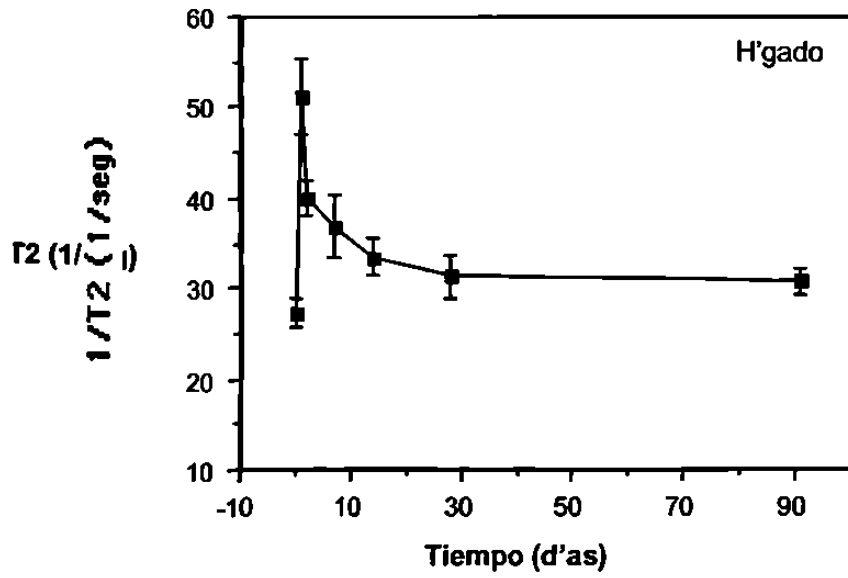


Figura 2. Las gráficas muestran los cambios en los tiempos de relajación  $1/T_2$  para el hígado (arriba) y el bazo (abajo), después de la administración de  $18 \mu\text{gr. Fe/kg}$  de AMI-25.

### 3.1.1.3 Biodisponibilidad

El hierro molecular del  $^{59}\text{Fe}$ -AMI-25 fue incorporado a la hemoglobina de las ratas normales en una forma dependiente de tiempo (Figura 3). El 1% de la dosis inyectada estaba asociada con los eritrocitos en el día 2, 14% en el día 7, y el 20% en el día 49.

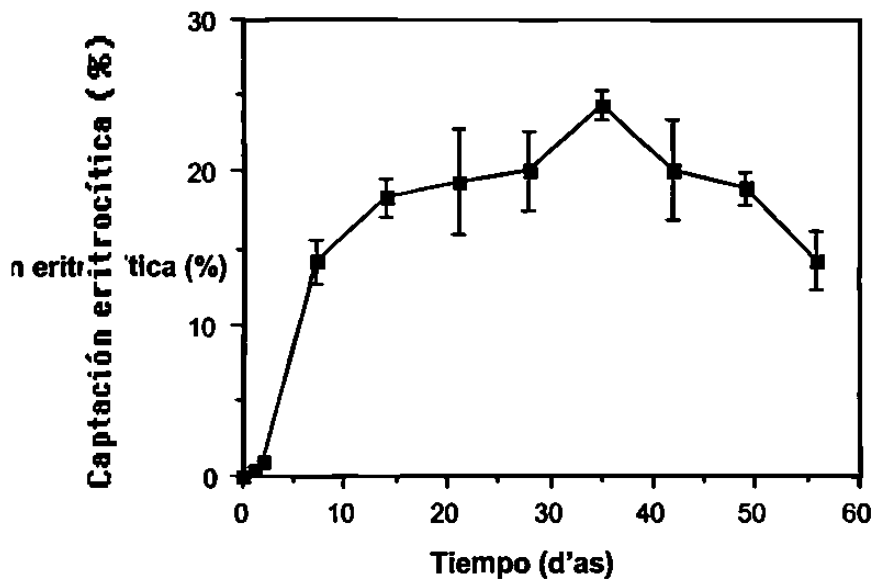


Figura 3. La gráfica muestra la incorporación del hierro de AMI-25 hacia la hemoglobina de los eritrocitos con un pico entre 5-40 días después de su administración y un decaimiento posterior.

La anemia inducida por dieta en deficiencia de hierro se confirmó después de 4 semanas por la reducción de los niveles de hemoglobina ( $7.9 \pm 0.9$  g/dl) y hierro sérico ( $49 \pm 11 \mu\text{gr/dl}$ ). La capacidad de unión total de hierro estaba normal ( $547 \pm 25 \mu\text{gr/dl}$ ), pero la saturación con hierro molecular estaba reducida en los animales anémicos ( $8.9 \pm 1.8\%$ ) pero no en los controles ( $36.1 \pm 6.1\%$ ).

Después de una dosis única de Imferon (30 mg Fe/kg) la hemoglobina, hierro sérico, y la capacidad de saturación del hierro unido gradualmente regresaron a lo normal dentro de 7 días. La administración única de AMI-25 invirtió el estado de anemia similarmente, indicando una incorporación del óxido de hierro hacia la hemoglobina. Las determinaciones seriadas de hematocritos llevadas al cabo después de un día ( $28.6 \pm 2.7\%$ ), 3 días ( $35.7 \pm 3.7\%$ ) 5 días ( $39.4 \pm 1.96\%$ ) y 7 días ( $42.2 \pm 0.42\%$ ) mostraron un incremento gradual hacia los niveles normales ( $43.5 \pm 0.83\%$ ).

La administración de dosis variables de AMI-25 a animales anémicos resultó en una situación similar al aliviar el estado de anemia. Los niveles de hierro hepático se elevaron en los animales que habían recibido 178  $\mu\text{mol Fe/kg}$  ( $192 \pm 22.2 \mu\text{gr/gr}$  de hígado en peso húmedo), 357  $\mu\text{mol Fe-Kg}$ . ( $391 \pm 50.6 \mu\text{gr/gr}$  de hígado en peso húmedo), o 536  $\mu\text{mol Fe/kg}$  ( $563 \pm 51.6 \mu\text{gr/gr}$  de hígado en peso húmedo) de AMI-25. Los animales que recibieron 90  $\mu\text{mol Fe/kg}$  ( $104.8 \pm 13.4 \mu\text{gr/gr}$  de hígado en peso húmedo) tuvieron una concentración de hierro similar a los animales controles ( $97 \pm 10.4 \mu\text{gr/gr}$  de hígado en peso húmedo).

A las tres horas, las células de Kupffer de todos los lóbulos estaban llenas con grandes cantidades de hierro teñible. A las 24 hrs., las zonas centrilobulares estaban depletadas de hierro, pero las células de Kupffer medioacinares y periportales todavía contenían cantidades significativas de hierro, aunque estas cantidades eran cualitativamente menores comparadas

con las cantidades encontradas a las 3 horas. A los 2 días, los macrófagos que contenían hierro empezaron a aparecer en los tractos portales, y la cantidad de hierro vista en las porciones medioacinar y periportal de las células de Kupffer se redujo. A los 9 días, únicamente se vio una pequeña cantidad de hierro en las células de Kupffer aisladamente en la región periportal y medioacinar, y el número de macrófagos que tenían hierro a nivel portal estaba incrementado. A los 16 y 30 días, no se pudo observar hierro teñible en el hígado, y la apariencia fue indistinguible de los especímenes de hígado de los animales controles no inyectados. No hubo cambios patológicos hepatocelulares encontrados en ninguno de los especímenes estudiados.

#### 3.1.1.4 Excreción

El aclaramiento corporal total del  $^{59}\text{Fe}$  fue de 20% después de 14 días y 35% después de 28 días (Figura 4). Graficando 8 puntos de los datos a una función de clarificación monoexponencial, la clarificación (C) puede expresarse como  $C=1.002 \times 10^{(-0.0067 \times T)}$ , donde T es el tiempo después de la inyección en días y -0.0067 es la constante de eliminación [48].

El coeficiente de correlación de los datos graficados para el uso del método de las últimas cuadradas fue de 1.0 (Cricket Graff, Cricket Software, Philadelphia, PA). El tiempo medio ( $T_{1/2}$ ) extrapolado de la clarificación corporal total de  $^{59}\text{Fe}$  fue entonces de 44.9 días; el  $T_{1/4}$  fue de 18.7 días y el  $T_{3/4}$  fue de



89.9 días. La excreción de  $^{59}\text{Fe}$  en la orina y heces fue de 1.1% después de 2 días y 10.1% después de 7 días.

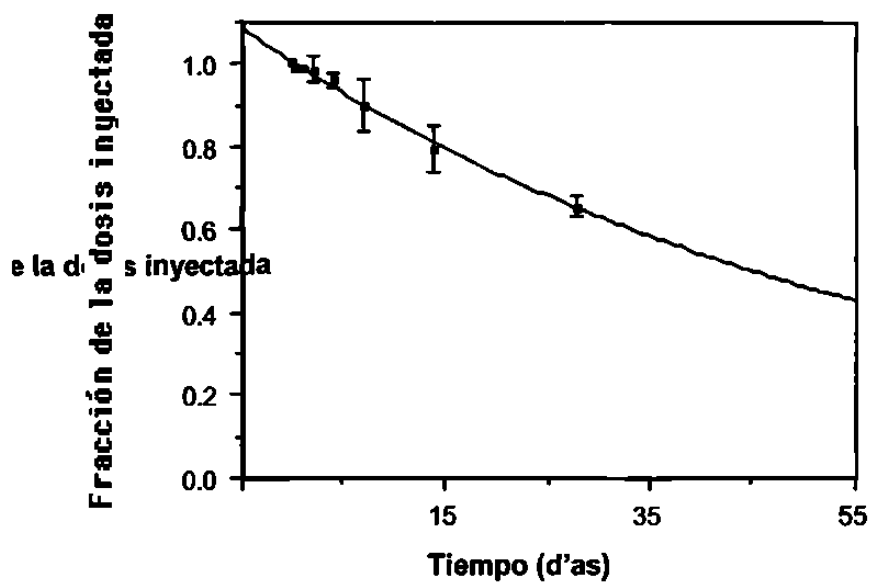


Figura 4. La gráfica muestra el aclaramiento corporal total de  $^{59}\text{Fe}$ , administrado como AMI-25, y que fue del 25% después de 19 días.

### **3.1.2 Toxicidad**

#### **3.1.2.1 Toxicidad aguda**

Los estudios de toxicidad aguda revelaron que el AMI-25 no tenía efecto letal en los animales a la dosis más alta inyectada (300  $\mu\text{mol Fe/kg}$ ). Inmediatamente después de la inyección, los animales mostraron una discoloración reversible de la mucosa que fue atribuida a la coloración negra del agente. Durante los 14 días de observación, no se pudieron observar efectos adversos en el peso corporal o en el consumo de alimento.

#### **3.1.2.2 Toxicidad subaguda**

Los estudios de toxicidad subaguda revelaron que la inyección de AMI-25 no tenía efectos de mortalidad, morbilidad, en el peso corporal, o en el consumo de alimento, y los valores de laboratorio estaban todos dentro del rango normal. Los niveles de hematocrito, hierro sérico y hemoglobina se incrementaron, pero todavía dentro de límites normales. Los estudios histológicos mostraron cantidades incrementadas de pigmento en las células fagocítico mononucleares del hígado, bazo, y ganglios linfáticos, y en los macrófagos en el sitio de la inyección. No hubo evidencia de daño tisular en ninguno de los animales.

### 3.1.2.3 Mutagenicidad

La prueba de Ames no reveló un incremento en el número de colonias que se hicieron dependientes de histidina después de la incubación, con o sin activación metabólica. El AMI-25 no fue tóxico para ninguno de los organismos indicadores a las concentraciones más altas estudiadas de 214  $\mu\text{molFe/platina}$  (200 mg Fe/platina).

### **3.1.3 Estudios Específicos de Toxicidad Hepática**

#### 3.1.3.1 Concentraciones Tisulares de Hierro

Las concentraciones tisulares de hierro de los diferentes órganos muestreados para los experimentos de toxicidad aguda y crónica se muestran en la Tabla II de esta sección. En el grupo crónico se observó un incremento leve en los niveles de hierro tisular en el hígado y en el bazo, mientras que en el grupo agudamente cargado hubo un marcado incremento en los niveles de hierro tisulares en el hígado, bazo y pulmones, con un moderado (pero no significativo) incremento en el riñón.

#### 3.1.3.2 Estudios de Microscopía de Luz y Electrónica

En los animales agudamente cargados con las partículas de ferrita existió un incremento marcado en la deposición de hierro en las células

fagocítico mononucleares del hígado (células de Kupffer) (Figura 5 A), en el pulmón (macrófagos alveolares), y en el bazo (macrófagos en la pulpa roja). No hubo virtualmente deposición de hierro en las células del parénquima hepático (Figura 5 B), y no existieron depósitos obvios de hierro en el riñón. No existieron cambios morfológicos significativos en ninguno de los otros tejidos estudiados.

Tabla II. Mediciones de la concentración de hierro después de la inyección de OHSP.

Grupo Experimental	n	Concentraciones de hierro tisular ( $\mu\text{g Fe/gm tejido}$ )					
		Hierro Hepático Total (mg)	Hierro Esplénico Total (mg)	Hígado	Bazo	Pulmón	Riñón
<b>Agudo</b>							
Control	10	$0.94 \pm 0.12$	$0.26 \pm 0.13$	$102 \pm 9$	$424 \pm 196$	$40 \pm 10$	$37 \pm 1$
Inyectado OHSP (P)	9	$37.2 \pm 5.8$ ( $<0.001$ )	$3.6 \pm 0.8$ ( $<0.01$ )	$3630 \pm 530$ ( $<0.001$ )	$3370 \pm 545$ ( $<0.005$ )	$2660 \pm 590$ ( $<0.005$ )	$145 \pm 52$ (NS)
<b>Crónico</b>							
Control	8	$149 \pm 0.15$	$0.19 \pm 0.02$	$98 \pm 7$	$209 \pm 22$	$45 \pm 8$	$65 \pm 22$
Inyectado OHSP (P)	8	$2.51 \pm 0.15$ ( $<0.001$ )	$0.67 \pm 0.12$ ( $<0.05$ )	$147 \pm 8$ ( $<0.001$ )	$632 \pm 79$ ( $0.001$ )	$104 \pm 33$ (NS)	$56 \pm 4$ (NS)

Los valores están expresados como media  $\pm$ DE. NS, No significativo.

Los estudios de microscopía electrónica mostraron los cristales de ferrita en los lisosomas secundarios de las células fagocítico mononucleares (Figura 6). Ocasionalmente se observaron cristales de hierro libres en el citoplasma de las células fagocítico mononucleares, pero nunca en el citoplasma de los hepatocitos. Todas las células y organelos subcelulares mostraron hallazgos morfológicos normales sin ninguna evidencia de respuesta a las partículas fagocitadas.

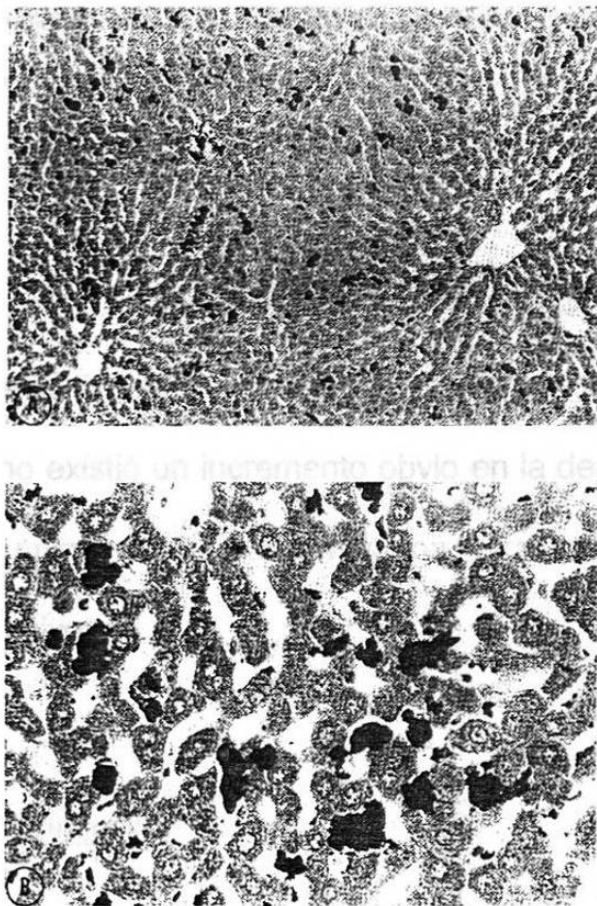


Figura 5. Microscopía de luz del hígado después de la administración IV de 250 mg de ferrita/ Kg, 48 hrs. antes de la muerte. En (A) se ve el hierro distribuido uniformemente en los lobulillos hepáticos (x 190). En (B), a mayor aumento (x 470), el hierro sólo se ve en las células de Kupffer, y no en los hepatocitos.

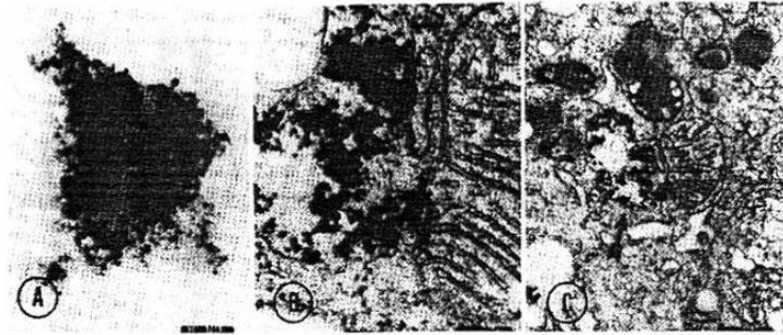


Figura 6. Microscopía electrónica por transmisión del hígado después de administración de ferrita (4 mg/kg; 24 hrs. después de la inyección). En (A) se muestra una vista por ME de las partículas de ferrita en solución. En (B), a la misma magnificación, se ven las partículas dentro de las células de Kupffer. No se observa lesión de organelos. En (C) se muestran algunas partículas (a menor aumento) en el citoplasma de una célula de Kupffer.

En el grupo cargado crónicamente, la microscopía de luz mostró ligero incremento en los depósitos de hierro en el sistema fagocítico mononuclear del hígado y el bazo y no existió un incremento obvio en la deposición de hierro en el riñón o en el pulmón. No hubo ninguna otra evidencia de cambios morfológicos significativos.

### 3.1.3.3 Estudios Bioquímicos

No se observó ninguna evidencia de alteración en la función de peroxidación lípida mitocondrial o microsomal tanto en los grupos cargados agudamente como crónicamente (Tabla III). Similarmente, no hubo cambios en el metabolismo oxidativo mitocondrial hepático o la función microsomal en ninguno de los grupos estudiados (Tablas IV y V). No se encontraron

**Tabla III. Peroxidación lipídica Hepática después de la inyección de OHSP**

Fracción	n	Concentración de Hierro hepático (µg Fe/gm hígado)	Hierro hepático Total (mg)	Absorción a 230 nm/mg lípido
<b>Agudo</b>				
Mitocondrial Control	5	103 ± 7	0.99 ± 0.17	0.564 ± 0.053
Inyectado OHSP (P)	4	3380 ± 870 (<0.01)	32.8 ± 8.5 (<0.01)	0.579 ± 0.28 (NS)
Microsomal Control	5	101 ± 21	0.88 ± 0.20	0.311 ± 0.018
Inyectado OHSP (P)	5	3830 ± 730 (<0.001)	40.6 ± 8.3 (<0.01)	0.359 ± 0.023 (NS)
<b>Crónico</b>				
Mitocondrial Control	4	90 ± 10	1.28 ± 0.12	0.504 ± 0.029
Inyectado OHSP (P)	4	146 ± 11 (<0.01)	2.47 ± 0.15 (<0.001)	0.547 ± 0.020 (NS)
Microsomal Control	4	105 ± 11	1.70 ± 0.25	0.350 ± 0.016
Inyectado OHSP (P)	4	147 ± 13 (<0.05)	2.54 ± 0.28 (NS)	0.336 ± 0.018 (NS)

Los valores están expresados como media ± DE

La peroxidación lipídica se determinó por el ensayo de dienes de lípidos conjugados con el método descrito. Para todos los grupos experimentales, tanto en las fracciones mitocondriales como microsomales, no hubo incrementos significativos en la absorción a 230 nm/mg de lípido entre los animales controles y los inyectados con OHSP



Tabla IV. Metabolismo oxidativo mitocondrial hepático después de la inyección de OHSP.

Grupo Experimental	n	Consumo de oxígeno (ng átomos O/min/mg proteína)				RCR	ADP/O
		Estado 3	Estado 4	Estado 4	Estado 4		
Glutamato							
Agudo							
Control	5	48.4 ± 6.4	11.8 ± 1.8	4.5 ± 0.9	2.60 ± 0.13		
Inyectado OHSP	4	56.3 ± 7.5	17.0 ± 4.1	3.8 ± 0.6	2.50 ± 0.14		
Crónico							
Control	4	48.1 ± 2.1	10.6 ± 0.5	4.7 ± 0.6	2.79 ± 0.06		
Inyectado OHSP	4	48.2 ± 2.6	10.9 ± 0.7	4.5 ± 0.5	2.80 ± 0.04		
Succinato							
Agudo							
Control	5	82.6 ± 6.1	22.2 ± 1.3	3.8 ± 0.5	1.82 ± 0.06		
Inyectado OHSP	4	91.0 ± 4.0	27.5 ± 2.3	3.4 ± 0.2	1.72 ± 0.07		
Crónico							
Control	4	84.5 ± 2.3	18.5 ± 0.8	4.6 ± 0.3	1.89 ± 0.01		
Inyectado OHSP	4	86.1 ± 1.5	20.8 ± 0.3	4.1 ± 0.1	1.89 ± 0.03		

Los valores están expresados como media ± DE.

El metabolismo oxidativo mitocondrial usando glutamato y succinato como sustratos se midieron como indicadores de la función mitocondrial hepática. No hubo cambios significativos en el estado 3 (ADP-estimulado) o en el estado 4 (ADP-limitado) de los ritmos respiratorios, en las razones de control respiratorio (RCR) (estado 3/estado 4), o en la razón adenosín difosfato/oxígeno (ADP/O). Las concentraciones de hierro en estas ratas son las mostradas en la Tabla II.

Tabla V. Función microsomal hepática después de la inyección de OHSP.

Grupo Experimental	n	Concentración de Citocromo P450 (nmol/mg proteína)	Actividad de Desmetilasa de aminopirina (nmol HCHO/min/mg/proteína)	Actividad de Glucosa-6-fosfatasa (nmol Pi/min/ mg/proteína)
Agudo				
Control	5	1.01 ± 0.03	7.52 ± 0.46	53.8 ± 3.4
Inyectado OHSP	4	0.96 ± 0.08	6.40 ± 0.81	54.4 ± 3.3
Crónico				
Control	4	0.84 ± 0.09	5.33 ± 0.70	42.8 ± 7.4
Inyectado HHSP	4	0.89 ± 0.11	6.47 ± 0.90	39.4 ± 6.7

Los valores están expresados como media ± DE.

Las concentraciones microsomales de citocromo P450 y la actividad de la demetilasa de aminopirina y la glucosa-6-fosfatasa, se midieron como indicadores de la función microsomal hepática. No hubo cambios significativos entre las ratas controles y las inyectadas con OHSP. Las concentraciones de hierro en estas ratas son las mostradas en la Tabla II. HCHO: formaldehído; P: fosfato inorgánico

diferencias en la concentración de alaninaminotransferasa plasmática (indicativo de necrosis hepatocelular) entre los dos grupos experimentales y sus respectivos controles (Tabla VI). Finalmente, en los grupos de ratas en los cuales se realizaron múltiples estudios serológicos en un período de 25 días no hubo anomalías en ninguno de los parámetros medidos en ningún tiempo.

### 3.2 Evaluación Experimental de la Utilidad del Oxido de Hierro Superparamagnético en la detección de lesiones Focales Hepáticas

Los estudios in vitro de espectroscopía por resonancia magnética demostraron que la administración intravenosa de partículas de ferrita alteraron los tiempos de relajación en el hígado normal pero no en el tejido tumoral (Tabla VII). Como se muestra, los tiempos de relajación T1 y T2 de los tumores fueron similares antes y después de la inyección de ferrita (la diferencia no fue significativa  $p < 0.2$ ). Sin embargo, en el hígado normal hubo una disminución del 62% en el T2 y de un 8.2% en el T1. Esta reducción en el T2 del hígado fue altamente significativa ( $p < .001$ ), pero los cambios en el T1 del hígado no fueron significativos ( $p < 0.1$ ). Consecuentemente, las diferencias entre los valores de T2 del hígado y del tumor fueron aumentadas importantemente después de la administración de ferrita, y esta diferencia, se expresó como un porcentaje del T2 del hígado normal, aumentando de un 49% a un 280%.

Tabla VII. Tiempos de relajación tisular (hígado y tumor) antes y después de la administración de ferrita.

	Hígado (mseg)	Tumor (mseg)
<b>Ratas Control (n=6)</b>		
T1	317 ± 23	540 ± 82
T2	33.3 ± 2.9	49.7 ± 8.8
<b>Ratas con ferrita (n=4)</b>		
T1	291 ± 28	580 ± 56
T2	12.7 ± 2.8	48.2 ± 7.1

La imagen por resonancia magnética mostró que las partículas de ferrita disminuyeron la intensidad del hígado normal pero no de los nódulos tumorales. Los nódulos tumorales tuvieron una alta intensidad de la señal en las diferentes secuencias de pulso (Figura 7). Por ejemplo, las imágenes de las ratas obtenidas después de la inyección de ferrita mostraron una diferencia máxima en la intensidad de la señal entre el tumor y el hígado con la secuencia de pulso más dependiente de T2 (EE 1500/60). Con esta misma secuencia de pulso, antes de la administración de la ferrita, la intensidad de la señal del tumor fue mayor que la del hígado. Las partículas de ferrita disminuyeron la intensidad del hígado pero no produjeron cambio en la intensidad de la señal de los nódulos tumorales. Por consiguiente, la diferencia de intensidad de la señal entre el tumor y el hígado se incrementó importantemente. La secuencia de pulso EE 500/30 fue de menor utilidad para la detección de los tumores en las imágenes obtenidas sin el contraste debido a que el tumor y el hígado aparecían isointensos. Sin embargo, después de la administración de la ferrita, los nódulos tumorales fueron fácilmente distinguibles aún con esta secuencia de pulso (Figura 8).

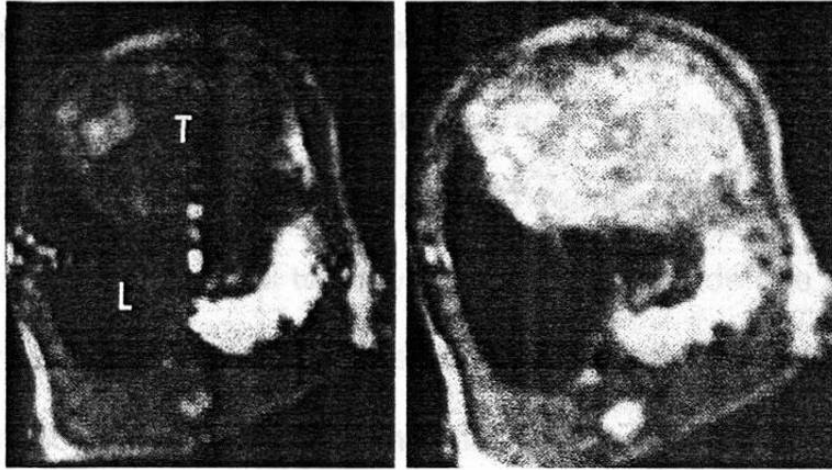


Figura 7. Incremento en el contraste entre el hígado (L) y el tumor (T) después de la administración de ferrita. EE 1500/60 antes (a) y después (b) de la inyección.

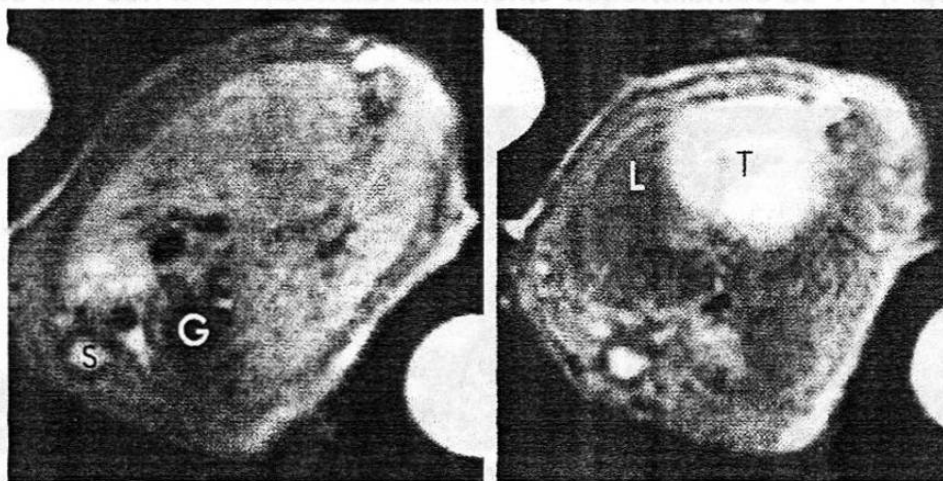


Figura 8. Mejoramiento en la detección del tumor después de la inyección de ferrita. Secuencia de pulso EE 500/30, relativamente dependiente de T1, que muestra una muy pobre diferenciación entre el tumor y el hígado antes de la administración de ferrita (a). Después de la administración de 20  $\mu\text{mol Fe/kg}$ , el tumor se puede diferenciar fácilmente (b).

Debido al importante acortamiento del T2, la pérdida de la señal del hígado también ocurrió en las imágenes dependientes de T1 (tanto en las secuencias de eco del espín como de recuperación de inversión). Sin embargo, las secuencias de pulso dependientes de T1 redujeron las diferencias en la intensidad de la señal entre el tumor y el hígado a causa de que la pérdida de la señal del hígado normal hizo que los nódulos tumorales (los cuales de hecho ya son de menor intensidad que el hígado), fueran más difíciles de ver. Sin embargo, cuando se dio una dosis suficientemente grande de partículas de ferrita (50  $\mu\text{mol Fe/kg}$ ), hubo una ausencia prácticamente completa de la intensidad de la señal del hígado, y los nódulos del tumor fueron fácilmente detectados aún con las secuencias altamente dependientes de T1 (Figura 9).

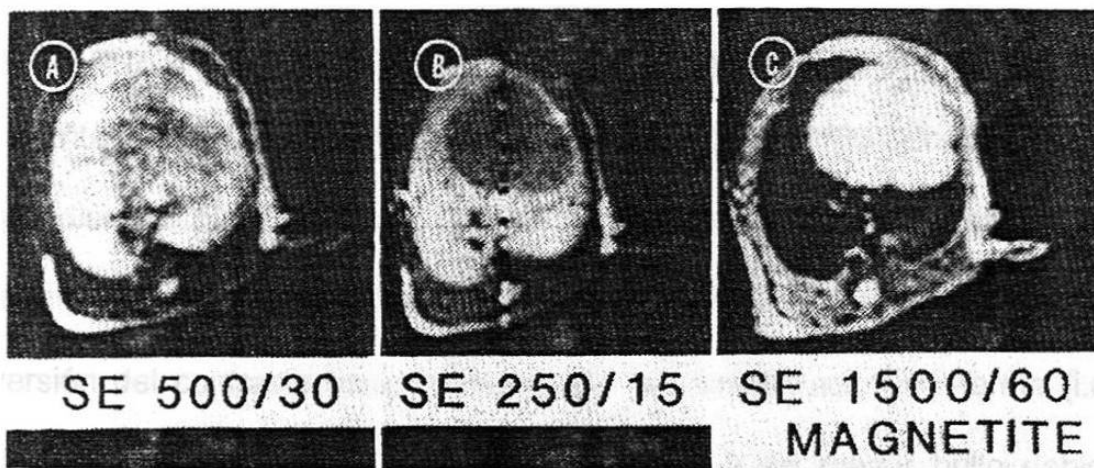


Figura 9. La detección de la lesión después de la administración de ferrita es relativamente independiente de la secuencia de pulso utilizada. En estas imágenes axiales del abdomen de una rata, después de administrar 50 $\mu\text{mol Fe/kg}$ , se puede identificar el tumor (T) con una secuencia dependiente de T1 (EE 250/15) (a); una intermedia (EE 500/30) (b); y una dependiente de T2 (1500/60)(c).

Las imágenes por resonancia magnética de los conejos y de los monos confirmaron estos resultados. Como en las ratas, la pérdida de la señal del hígado no fue acompañada por una disminución en la intensidad de la señal de las masas tumorales, produciéndose un aumento en el contraste entre estos dos tejidos.

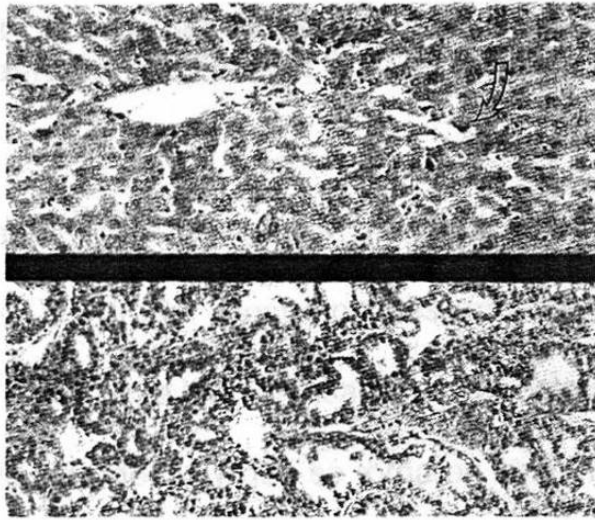
La medición cuantitativa de la señal y del ruido confirmaron las observaciones visuales en las imágenes. La disminución máxima de la intensidad de la señal del hígado (60%) ocurrió en la secuencia más dependiente de T2 (EE 1500/60).

Aunque ocurrió un incremento en el contraste con la secuencia de EE 500/30, el mayor contraste en las imágenes obtenidas después de la inyección de ferrita se obtuvo con las secuencias de EE 1500/60. En las imágenes dependientes de T1 (RI y EE), el contraste disminuyó después de la administración de ferrita. Aún más, con la secuencia de EE 250/15, hubo una inversión del contraste tisular después de la administración de ferrita (i.e., el tumor que normalmente es más oscuro aparecía de mayor brillo debido al oscurecimiento del hígado). De hecho, se podrían utilizar dosis mayores de ferrita ya que, según estas mediciones, llegaría un momento en que la intensidad de la señal del hígado se acercará a la del ruido de fondo, y los nódulos tumorales tendrán una intensidad de la señal relativamente mayor, independientemente de las secuencias de pulso o parámetros de tiempo utilizados.



El uso de partículas de ferrita también redujo el ruido fantasma y los artefactos de movimiento tanto en las secuencias dependientes de T1 como de T2, ya que hubo menor intensidad de la señal del hígado que pudiera haberse registrado mal en la dirección de codificación de fase. Esto fue también más aparente en las imágenes de EE 1500/60. Un beneficio mucho menor estuvo presente en las imágenes dependientes de T1 debido a la disminución correspondientemente menor en la señal inducida por la ferrita en las secuencias de RI 1500/450/15 y también debido a los niveles de hecho ya más bajos de ruido en la secuencia de pulso de EE 250/15.

El análisis tisular después de la necropsia por medio de microscopía electrónica y de luz demostraron que las partículas de ferrita fueron identificadas únicamente en las células hepáticas de Kupffer y no en los hepatocitos o en el tejido tumoral (Figura 10). Aún más, la microscopía electrónica confirmó que aún con la dosis excesivamente mayor de ferrita, no hubo evidencia histológica de involucro mitocondrial o de destrucción del retículo endoplásmico liso, cambios que son manifestaciones tempranas de lesión celular.



**Figura 10. Secuestro fagocítico mononuclear de las partículas de ferrita administradas intravenosamente (330  $\mu\text{mol Fe/kg}$ ). En esta microscopía de luz, las secciones se tiñeron para hierro (azul de Prusia), mostrando el hígado no involucrado con tumor con las partículas en las células de Kupffer (arriba), mientras que no se pueden identificar en el tumor (abajo).**

### **3.3 Aplicaciones Clínicas del Oxido de Hierro Superparamagnético como Agente de Contraste para la Imagen Por Resonancia Magnética del Hígado**

Las imágenes de resonancia magnética obtenidas antes de la administración de la droga mostraron lesiones hepáticas focales como anomalías relativamente hipointensas con respecto al hígado vecino en las imágenes dependientes de T1 y que se tornaron hiperintensas con respecto al hígado en las imágenes dependientes de T2.

En la evaluación cualitativa, las imágenes (Figura 11) presentaron una resolución anatómica y contraste entre el tumor y el hígado comparables a las que se han logrado en estudios grandes con sistemas de resonancia magnética de campos magnéticos bajos a medios [44, 49, 51]. El análisis cuantitativo de las imágenes, esto es, la relación C/R (Tabla VIII) demostró el desempeño de las diferentes secuencias de pulso de acuerdo con los datos publicados para imágenes de resonancia sin contraste [42].

Tabla VIII. Análisis cuantitativo de las imágenes de RM : C/R y S/R

Secuencia de Pulso	Cáncer S/R	Hígado S/R	Bazo S/R	Cáncer/Hígado C/R
<b>Sin Contraste</b>				
SE 260/14	28.7 ± 17.5	39.5 ± 12.5	27.4 ± 11.4	-10.8 ± 9.6
SE 500/28	28.1 ± 10.7	31.4 ± 9.4	26.2 ± 9.4	-3.3 ± 4.4
SE 1500/40	24.6 ± 10.9	23.9 ± 9.3	25.6 ± 13.3	0.6 ± 4.9
SE 1500/80	19.4 ± 6.3	14.9 ± 3.9	21.3 ± 6.4	3.4 ± 3.8
<b>Con Contraste (1 -2 horas posterior a la administración de OHSP)</b>				
SE 500/28	37.3 ± 14	21.8 ± 10.6*	28.5 ± 11.3	15.9 ± 7.6*
SE 1500/40	24.4 ± 11.6	8.1 ± 3.7*	11.6 ± 4.9*	16.3 ± 9.6*
SE 1500/80	18.9 ± 10.8	4.3 ± 3.1*	4.8 ± 2.3*	14.5 ± 9.8*

\* P < 0.01; Los valores posteriores a la administración de OHSP son significativamente diferentes a los valores sin contraste.



(a)

(b)

Figura 11. Imágenes de RM de un paciente con metástasis de carcinoma renal antes de la administración de ferrita. (a) Imagen dependiente de T1 (EE 500/28) muestra una zona mal definida de hipointensidad en el lóbulo caudado del hígado. (b) La imagen dependiente de T2 (EE 1500/42) al mismo nivel es prácticamente normal.

La ferrita disminuyó profundamente la intensidad de la señal de resonancia magnética del hígado y del bazo normales en dos pacientes que fueron estudiados dentro de los primeros cinco minutos de la administración. 15 minutos después de la administración del agente de contraste, los cambios en la intensidad de la señal fueron casi máximos. El tejido neoplásico, páncreas, riñones, músculo y tejido adiposo no fueron afectados. Las mediciones cuantitativas de señal-ruido de las imágenes obtenidas 1 a 2 horas después de la administración de la droga confirmaron la alteración órgano específica de la intensidad de la señal de resonancia magnética por el agente de contraste (Tabla VIII) (Figura 12).