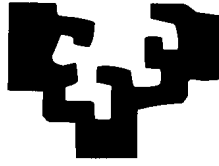


eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

Departamento de Cirugía y Radiología y Medicina Física

Facultad de Medicina y Enfermería

**Hipertermia magnética antitumoral medida por  
nanopartículas magnéticas RGD en el tratamiento de  
metástasis hepáticas en un modelo experimental murino**

Borja Herrero de la Parte

Leioa, 2017

*Directores: Prof. Ignacio García-Alonso Montoya  
Dr. José Javier Echevarria Uruga*







*A mis padres.*



## **Agradecimientos**

Quisiera agradecer a todas las personas que con su desinteresado apoyo y trabajo han posibilitado que esta Tesis Doctoral llegue a buen fin. Y en especial quiero agradecer:

En primer lugar, a Nacho y a Javier (o Javier y Nacho) por la inconmensurable paciencia y dedicación a lo largo de los años de duro trabajo que ha supuesto esta Tesis Doctoral, con sus muchos momentos de desesperación, hartazgo y sus “fracasos” y sus pequeños éxitos que compensaban lo demás. Con ambos descubrí, incluso me atrevo a decir que me lo infundieron, el mundo de la investigación científica y la docencia universitaria.

Como no, a los ya doctores Oihane, Mireia y Eneko y a los que en breve lo serán Irati, Itziar y Jorge. Ellos son los que de verdad sustentan, con su trabajo, esfuerzo y cafés de media mañana, este duro pero apasionante proyecto.

A los profesores Jose Ángel García, Fernando Plazaola, Maite Insausti y Néstor Echevarría, que supisteis atender a mis “exigencias” y condiciones para la realización de los procedimientos en los animales.

A mis alumnos y ex-alumnos, que en alguna de las tardes de quirófano se ofrecieron desinteresadamente a echarme una mano, en el sentido literal de la palabra, cuando con las mías únicamente no era posible.

A todos mis amigos, que habéis sido capaces de aguantar mis ausencias, penas y carácter durante estos años.

Por último y mas importante, a toda mi familia, pero en especial a mis padres Siro y Rosa Sol, que por mucho que les agradezca siempre me quedaré infinitamente corto por todo lo que han hecho y, sin duda, siguen y seguirán haciendo por mi. Han sabido, todos ellos, comprender y perdonar el tiempo que este trabajo les han robado.

Parte de este trabajo de Tesis Doctoral ha podido realizarse gracias a la financiación recibida en las Convocatorias del Programa Saiotek 2011 y 2013 (Proyectos SAIO11-PC11BF004 NanoClick y SAIO13-PC13BF001 NanoTerk), la Convocatoria 2013-2018 de Ayudas para Grupos de Investigación del Sistema Universitario Vasco del Gobierno Vasco (Grupo IT742-13), Convocatoria 2014 del Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad del Ministerio de Economía y Competitividad (Proyecto CTM2014-56628-C3-1-R) y la Convocatoria de Personal Investigador de la UPV/EHU de 10/05/2017 (Proyecto MIMASPEC).



# ÍNDICE



---

|   |             |
|---|-------------|
| <b>ÍNDICE .....</b>   | <b>VII</b>  |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>                                      | <b>XVII</b> |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>                                       | <b>XXXV</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>1</b>    |
| <b>El cáncer colorrectal.....</b>                                   | <b>3</b>    |
| A. Epidemiología.....   | 3           |
| B. Etiopatogenia.....   | 5           |
| 1. Factores genéticos.....  | 5           |
| 2. Edad y sexo .....  | 6           |
| 3. Historial familiar.....  | 7           |
| 4. Patologías previas .....   | 8           |
| 5. Dieta y hábitos de vida .....                                    | 8           |
| <b>Tratamiento de las metástasis hepáticas.....</b>                 | <b>11</b>   |
| A. Terapias locales: .....  | 12          |
| 1. Propósito Curativo.....  | 12          |
| 2. Propósito Paliativo:.....  | 19          |
| B. Terapias sistémicas .....  | 24          |
| 1. Quimioterapia.....   | 24          |
| 2. Terapias biológicas.....   | 26          |
| <b>Nanopartículas magnéticas en el tratamiento del cáncer .....</b> | <b>31</b>   |
| A. Tipos de nanopartículas .....                                    | 33          |

|  |           |
|--|-----------|
| 1. Nanopartículas magnéticas.....  | 33        |
| 2. Nanopartículas metálicas.....   | 33        |
| 3. Nanopartículas bimetálicas.....   | 34        |
| B. Síntesis, recubrimiento y funcionalización de NpM de óxido de hierro (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )..... | 35        |
| C. Tamaño, forma y propiedades magnéticas.....   | 39        |
| 1. Tamaño.....   | 39        |
| 2. Forma.....  | 40        |
| D. Vías de administración.....   | 42        |
| 1. Punción directa.....  | 42        |
| 2. Administración intravascular.....   | 46        |
| <b>Modelos experimentales para el estudio de las metástasis.....</b>   | <b>53</b> |
| A. Modelos <i>in vitro</i> .....   | 53        |
| B. Modelos <i>in vivo</i> .....  | 54        |
| 1. Especies animales en investigación de MHCCR.....  | 55        |
| 2. Inducción tumoral.....  | 59        |
| <b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>  | <b>67</b> |
| <b>Hipótesis de trabajo.....</b>   | <b>69</b> |
| <b>Objetivos.....</b>  | <b>70</b> |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>   | <b>71</b> |
| <b>Materiales.....</b>   | <b>75</b> |
| A. Nanopartículas magnéticas.....  | 75        |
| 1. Nanopartículas de síntesis propia.....  | 75        |

---

|   |           |
|---|-----------|
| 2. Nanopartículas comerciales.....                                    | 82        |
| B. Peptidomiméticos RGD .....   | 83        |
| 1. Peptidomiméticos RGD-fluoresceína .....                            | 83        |
| 2. Peptidomiméticos RGD-yodado .....                                  | 84        |
| C. Reactivos biológicos .....   | 85        |
| 1. Animales de experimentación.....                                   | 85        |
| 2. Cultivos celulares .....   | 86        |
| <b>Equipamiento .....</b>   | <b>87</b> |
| A. Sala de Cultivos .....   | 87        |
| B. Quirófano experimental.....  | 88        |
| C. Inductor de radiofrecuencias.....                                  | 89        |
| 1. Prototipo EM04.....  | 89        |
| 2. Prototipo EM06.....  | 92        |
| D. Tomografía Computerizada Multicorte.....                           | 96        |
| E. Imagen de Resonancia Magnética .....                               | 96        |
| <b>Procedimientos.....</b>  | <b>97</b> |
| A. Técnicas quirúrgicas .....   | 97        |
| 1. Protocolos anestésicos.....  | 97        |
| 2. Inducción de tumores hepáticos.....                                | 98        |
| 3. Obtención de hígado aislado e HT ex vivo .....                     | 100       |
| 4. Inyección y detección mediante TCMC de peptidomiméticos RDG-I..... | 101       |
| 5. Técnica quirúrgica de infusión intrarterial hepática.....          | 102       |
| 6. Hipertermia in vivo .....  | 105       |

|   |            |
|---|------------|
| 7. Toma de muestras.....  | 106        |
| 8. Eutanasia.....   | 107        |
| B. Técnicas <i>in vitro</i> .....   | 107        |
| 1. Expansión y almacenamiento de las células .....  | 107        |
| 2. Recuento celular manual mediante hemocitómetro .....   | 109        |
| 3. Recuento automático mediante NucleoCounter.....  | 110        |
| 4. Preparación de las células para inducción tumoral.....   | 111        |
| 5. Cultivo placas de 24 pocillos.....   | 111        |
| 6. Exposición a RGD-fluoresceína, determinación de la intensidad de fluorescencia y captura de imágenes .....       | 112        |
| 7. Cultivo placas de 96 pocillos.....   | 114        |
| 8. Hipertermia <i>in vitro</i> .....  | 115        |
| 9. Valoración de la viabilidad celular mediante MTT.....  | 116        |
| C. Técnicas analíticas.....   | 117        |
| 1. Análisis Histopatológicos.....   | 117        |
| 2. Análisis elemental mediante Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS)..... | 118        |
| 3. Determinación Enzimática en el plasma sanguíneo .....  | 118        |
| 4. Análisis de metabolómica.....  | 118        |
| D. Cálculos estadísticos .....  | 122        |
| <b>Experiencias realizadas .....</b>  | <b>125</b> |
| A. Inducción de HT mediante NpM en hígado aislado <i>ex vivo</i> .....  | 125        |
| 1. Hígado <i>ex vivo</i> con NpM comerciales en solución acuosa.....  | 125        |
| 2. Hígado <i>ex vivo</i> con NpM comerciales en solución salina.....  | 126        |

|    |  |            |
|----|--|------------|
| 3. | Hígado ex vivo con NpM de síntesis propia en solución acuosa.....                          | 126        |
| B. | Experimentos <i>in vitro</i> sobre células tumorales .....                                 | 127        |
| 1. | Efecto de la hipertermia sobre la proliferación celular .....                              | 127        |
| 2. | Efecto de la quimioterapia sobre la proliferación celular .....                            | 128        |
| 3. | Efecto de la quimioterapia sobre la proliferación de cultivos sometidos a hipertermia..... | 128        |
| 4. | Efecto de la hipertermia sobre cultivos expuestos a quimioterápicos .....                  | 129        |
| C. | Adhesión selectiva de la secuencia RDG a las células y al tejido tumoral                   | 130        |
| 1. | Exposición a RGD-fluoresceína in vitro.....  | 130        |
| D. | Experimentos <i>in vivo</i> .....  | 131        |
| 1. | Ensayo in vivo de adhesión selectiva de RGD-I.....   | 131        |
| 2. | Localización y cuantificación de las NpM-RGD .....   | 132        |
| 3. | Hipertermia mediada por NpM-RGD.....   | 133        |
| 4. | Detección de metabolitos hepáticos y determinación enzimática.....                         | 133        |
|    | <b>RESULTADOS.....</b>   | <b>135</b> |
|    | <b>Inducción de hipertermia hepática <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i> .....</b>            | <b>139</b> |
| A. | Experimentos de hipertermia <i>in vitro</i> sobre células tumorales.....                   | 139        |
| 1. | Efecto de la hipertermia sobre la proliferación celular .....                              | 139        |
| 2. | Efecto de la quimioterapia sobre la proliferación celular .....                            | 143        |
| 3. | Efecto de la quimioterapia sobre la proliferación de cultivos sometidos a hipertermia..... | 147        |
| 4. | Efecto de la hipertermia sobre cultivos expuestos a quimioterápicos .....                  | 151        |
| B. | Experimentos <i>ex vivo</i> de inducción de hipertermia en el hígado .....                 | 155        |

|   |            |
|---|------------|
| 1. Experiencia con nanopartículas de elevado SAR .....  | 155        |
| 2. Experiencia con nanopartículas de síntesis propia.....   | 156        |
| 3. Estudio anatomopatológico de los especímenes.....  | 157        |
| 4. Estudio de los especímenes con TCMC.....   | 161        |
| <b>Adhesión selectiva de la secuencia RDG a las células y al tejido tumoral</b>                             | <b>163</b> |
| A. Experimentos <i>in vitro</i> de adhesión selectiva con RGD-fluoresceína.....                             | 163        |
| 1. Detección de la fluorescencia emitida por RGD-fluoresceína.....  | 163        |
| 2. Adhesión de RGD-fluoresceína a células tumorales CC531 .....   | 164        |
| B. Ensayos de afinidad <i>in vivo</i> de la secuencia RGD-yodada.....                                       | 167        |
| C. Localización y cuantificación de las NpM-RGD en el tejido tumoral y el<br>parénquima hepático sano ..... | 169        |
| 1. Localización y estimación de los depósitos de Fe por medio de estudios de IRM<br>169                     |            |
| 2. Determinación de los depósitos de Fe mediante técnicas de elementales.....                               | 173        |
| 3. Análisis histopatológicos.....   | 174        |
| <b>Hipertermia local selectiva mediante NpM-RGD .....</b>   | <b>177</b> |
| A. Campo magnético aplicado.....  | 177        |
| B. Mortalidad.....  | 179        |
| C. Incremento térmico .....   | 182        |
| <b>Inducción de necrosis tumoral.....</b>   | <b>187</b> |
| A. Depósitos de hierro .....  | 187        |
| B. Daños histológicos .....   | 187        |
| C. Estimación ecográfica de la necrosis tumoral esperada .....  | 189        |



---

|   |            |
|---|------------|
| <b>Determinación de enzimas séricos y metabolitos hepáticos.....</b>  | <b>191</b> |
| A. Cambios enzimáticos .....  | 191        |
| B. Determinación metabolitos hepáticos .....  | 197        |
| <b>DISCUSIÓN .....</b>  | <b>207</b> |
| <b>Respuesta <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i> a la hipertermia .....</b>  | <b>211</b> |
| A. Sensibilidad a la temperatura de las células en cultivo .....  | 211        |
| B. Respuesta del parénquima hepático ante la exposición a un campo<br>magnético externo .....   | 214        |
| <b>Adhesión de la secuencia RGD a las células en cultivo y su utilidad como<br/>        agente de contraste selectivo por el tejido tumoral .....</b> | <b>217</b> |
| <b>Modelo de inducción de metástasis hepáticas .....</b>  | <b>221</b> |
| <b>Abordaje vascular para la infusión de un compuesto teranóstico .....</b>   | <b>223</b> |
| <b>Hipertermia local selectiva mediante NpM-RGD .....</b>   | <b>225</b> |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>  | <b>237</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>   | <b>241</b> |



# ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Proporción de muertes debido al cáncer en los Estados Miembros de la Unión Europea (UE) en 2013. Eurostat, 2016. Still 1 in 4 deaths caused by cancer in the EU. Tomado de: Eurostat <a href="http://ec.europa.eu/eurostat/web/products-press-releases/-/3-03022016-BP">http://ec.europa.eu/eurostat/web/products-press-releases/-/3-03022016-BP</a> ..... | 3  |
| Figura 2. Incidencia estimada en España para mujeres (izquierda) y hombres (derecha) por tipo de cáncer . Tomado de: GLOBOCAN 2012 <a href="http://gco.iarc.fr/">http://gco.iarc.fr/</a> .....   | 4  |
| Figura 3. Mortalidad estimada en España para mujeres (izquierda) y hombres (derecha) por tipo de cáncer. Tomado de: GLOBOCAN 2012 <a href="http://gco.iarc.fr/">http://gco.iarc.fr/</a> .....  | 4  |
| Figura 4. Incidencia estandarizada para la edad por sexo, área y país en Europa en el año 2012. (Ferlay et al., 2013).....   | 6  |
| Figura 5. Diagrama de las causas atribuibles al origen de CCR. (Lynch, Lynch, Lynch, & Attard, 2008) .....   | 7  |
| Figura 6. Riesgo relativo (RR) e intervalo de confianza correspondiente al 95% de la relación dosis-respuesta entre el consumo de alcohol y el riesgo de cáncer colorrectal (izquierda) y de la cavidad oral y faringe (derecha). (Bagnardi, Blangiardo, La Vecchia, & Corrao, 2001).....  | 9  |
| Figura 7. Metástasis hepáticas. <a href="http://histopatologiabasica.blogspot.com.es/">http://histopatologiabasica.blogspot.com.es/</a> (acceso 11 de agosto de 2017).....   | 11 |
| Figura 8. División hepática en ocho segmentos hepáticos. <a href="http://www.radiologyassistant.nl/">http://www.radiologyassistant.nl/</a> (acceso 14 de agosto de 2017).....  | 12 |
| Figura 9. Resección o lobectomía hepática derecha. <a href="http://www.uptodate.az/">http://www.uptodate.az/</a> (acceso 12 de agosto de 2017).....  | 13 |
| Figura 10. Ablación por radiofrecuencias de metástasis hepáticas vía percutánea con guiado mediante ecografía. <a href="http://www.hopkinscoloncancercenter.org/">http://www.hopkinscoloncancercenter.org/</a> (acceso 14 de agosto de 2017).....  | 14 |

- Figura 11. Corte transversal de hígado con MHCCR. Imagen de resonancia magnética nuclear (IRM) preoperatoria de MHCCR (A). Imagen intraoperatoria durante un procedimiento de crioablación guiado por tomografía computerizada multicorte (TCMC). (Niu, Zhou, Xu & Mu, 2013) ..... 15
- Figura 12. Imagen de microscopía electrónica de transmisión donde se muestran los poros (flechas rojas) aparecidos en la membrana celular tras electroporación irreversible (EPI). (Jourabchi, Beroukim, Tafti, Kee & Lee, 2014)..... 17
- Figura 13. Procedimiento de ablación percutánea mediante microondas de implantes tumorales en el pulmón. <https://kanserdeyenitedaviler.com> (acceso 16 de agosto de 2017)..... 18
- Figura 14. Angiografía de la arteria hepática antes (izquierda) y después (derecha) de realizar un procedimiento de QETA para una masa tumoral en el hígado derecho. <http://www.sys-med.de/> (acceso el 16 de agosto de 2017)..... 20
- Figura 15. Secuencia de TCMC en fase arterial donde se observa un implante de CHC hiperdenso por la hipercaptación de yodo (A). Arteriografía con sustracción digital (ASD) pre tratamiento con QETA donde se observa el *blush* tumoral por la captación del contraste yodado (imagen superior) y al finalizar el tratamiento (imagen inferior), donde desaparece el *blush* tumoral por la sustracción de la arteria hepática derecha (B). TCMC 45 días después del tratamiento, donde se observa una masa hiperintensa correspondiente a la captación del Lipiodol por parte del implante tumoral (C). (Revel-Mouroz et al., 2017)..... 21
- Figura 16. Representación esquemática de la administración de microesferas cargadas con citotóxicos mediante QETA-f. <https://www.baltimorevascularcare.com> (acceso el 22 de agosto de 2017)..... 22
- Figura 17. Supervivencia tras la primera sesión de RE. (Damm et al. 2016)..... 24
- Figura 18. Metabolismo del 5-FU. (Longley, Harkin & Johnston, 2003)..... 25

Figura 19. Supervivencia libre de progresión (SLP) media y a lo largo del tiempo de los grupos FOLFIRI (línea negra) y FOLFIRI-BV (línea gris). Hurwitz et al., 2004. 27

Figura 20. Ruta de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr) (Martinelli, De Palma, Orditura, De Vita & Ciardiello, 2009) ..... 28

Figura 21. Comparación gráfica del tamaño y escala de distintos elementos biológicos de tamaño conocido. <http://introtonanotechnology.weebly.com/the-nanoscale.html> (acceso 23 de agosto de 2017). ..... 31

Figura 22. Modo de acción de la terapia mediante radiación ionizante con NPs. <http://www.cam.ac.uk/> (acceso 22 de agosto de 2017). ..... 32

Figura 23. Esquema de la síntesis de NpM mediante el método de descomposición térmica. Patsula et al. 2016. .... 35

Figura 24. Cambio conformacional sufrido por la integrina  $\alpha_v\beta_3$ , tras lo cual se expone el dominio de unión a la secuencia RGD (estrella). Danhier et al., 2012. .... 38

Figura 25. Efecto del tamaño de las NpM sobre el magnetismo y la señal de resonancia magnética. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de NpM de 4, 6, 9 y 12 nm de diámetro (A). SRM de las NpM obtenida en la secuencia T2 a 1,5T (B). Escala a color de la SRM obtenida a partir los valores obtenidos en la secuencia T2. Jun et al., 2005, ..... 40

Figura 26. Efectos de la HTM mediada por NpM . Imágenes de termogramas mediante infrarrojos tomadas durante el primer ciclo de HTM: antes, tras 5 y 30 minutos de exposición (A). Registro térmico de las temperaturas medidas en el tumor con NpM, recto, tumor sin NpM y la piel (B). Incrementos térmicos del tumor inyectado con nanocubos, respecto a la piel, tumor control contralateral o recto (C). Evolución del crecimiento tumoral en los distintos grupos experimentales según el tratamiento: control, doxorubicina, 3 sesiones consecutivas de HTM y doxorubicina + 3 sesiones consecutivas de HTM (D). Kolosnjaj-Tabi et al., 2014 ..... 42

|   |    |
|---|----|
| Figura 27. Incremento térmico registrado durante la exposición a HTM en ratones inyectados intratumoralmente con NpM. Dutz et al., 2011.....  | 43 |
| Figura 28. Incremento térmico registrado en el recto y el tejido tumoral inyectado con magnetosomas, durante la exposición a un ciclo de HTM. Alphanbéry et al., 2011. ....   | 44 |
| Figura 29. Evolución del volumen tumoral normalizado en ratones tratados con HTM (A) y ratones del grupo control sin tratamiento de HTM (B). Alphanbéry et al., 2011. ....  | 45 |
| Figura 30. Microfotografías de secciones histológicas teñidas con Azul de Prusia, de tejido tumoral (A), pulmón (B) e hígado (C) de animales infundidos con NpM vía i.v. Balivada et al. en 2010 .....  | 47 |
| Figura 31. Comparación del volumen tumoral de animales no tratados (barra negra) frente a animales sometidos a EAHT con NpM y sacrificados 14 días después del procedimiento (barra blanca). Moroz et al., 2002. ....   | 49 |
| Figura 32. Comparación del volumen tumoral de animales no tratados (barra negra) frente a animales sometidos a HT con administración de NpM vía i.t., y sacrificados 14 días después del procedimiento (barra blanca). Moroz et al., 2002. ....   | 50 |
| Figura 33. Sección histológica de tejido tumoral expuesto a EAHT (A); se observa una región necrótica (N) con acúmulos de NpM (A y flecha). Tejido hepático sano extraído 7 días después de la exposición a EAHT (B). Yu et al., 2011.....  | 50 |
| Figura 34. Medidas de la IS en la secuencia ecogradiente T2* de IRM. Valores en el tejido tumoral y parénquima hepático sano pre (gris claro) y post-infusión de NpM (gris oscuro) (A). Decaimiento absoluto de la IS en el tejido tumoral y parénquima hepático sano (B) (Sheu et al., 2013). .... | 51 |
| Figura 35. Larva de pez cebra. <a href="http://www.kyb.tuebingen.mpg.de/">http://www.kyb.tuebingen.mpg.de/</a> (acceso 24 de septiembre de 2017).....   | 55 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 36. Porcentaje de animales usados con fines de investigación en los 27 Estados Miembros de la Unión Europea en 2011, clasificados por especies. European Commission, 2013.....   | 56 |
| Figura 37. Ratón desnudo con implante tumoral heterotópico de carcinoma de colon. Mittal et. al, 2015.....  | 57 |
| Figura 38. Análisis histológicos de implantes tumorales espontáneos (A) y heterotópicos (B). Cortes de inmunohistoquímica con Hoechst 33342 (azul, primera columna), con Meca-32 (rojo, segunda columna) y CAIX (verde, tercera columna); tinción con hematoxilina-eosina (cuarta columna). Vilalta et al., 2017.63   | 63 |
| Figura 39. Imágenes ecográficas de la punción ecoguiada de células tumorales en el LLI. Se observa la aguja (flecha) en el extremo distal del LLI antes de la infusión de la suspensión celular (A) y finalizada la punción, puede observarse un nódulo hiperecoico correspondiente a la suspensión celular (entre las flechas, B). García-Alonso et al. 2013 ..... | 64 |
| Figura 40. Métodos de recubrimiento de NpM .....  | 76 |
| Figura 41. Representación esquemática de la fórmula estructural del PMAO (Fuente: Sigma-Aldrich).....   | 76 |
| Figura 42. Microfotografía de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de las NpM sin recubrimiento (A) y con recubrimiento de PMAO (B). .....  | 77 |
| Figura 43. Espectro obtenido mediante Resonancia Magnética Electrónica (EMR) de las NpM.....  | 78 |
| Figura 44. Representación gráfica de los valores de SAR obtenidos tras la exposición a un campo magnético (Happ) a diferentes frecuencias en NpM cubiertas con PMAO y funcionalizadas con RGD.....  | 79 |
| Figura 45. Representación esquemática de la hidrólisis del PMAO con NaOH 0,1M para la formación de grupos carboxilo terminal.....   | 80 |



---

|  |    |
|--|----|
| Figura 46. Representación esquemática de la fórmula estructural del peptidomimético RGD con un grupo azida terminal.....   | 80 |
| Figura 47. Representación esquemática del linker o molécula intermedia. ....   | 81 |
| Figura 48. Resumen esquemático de los pasos dados para la funcionalización de las NpM con peptidomiméticos RGD.....  | 82 |
| Figura 49. Diagrama de barras con la distribución del diámetro (A) y microfotografía de microscopia electrónica de transmisión de las nanopartículas (TEM) (B) NGAP NP FeO-2204. Imágenes tomadas de NpM <a href="http://www.nanogap.es">tp://www.nanogap.es</a> .....         | 83 |
| Figura 50. Fotografía de la biopsia hepática del LLI con implante tumoral en su extremo distal (círculo azul) (A) e imagen obtenida mediante TCMC de la misma pieza tras la administración de contraste yodado Visipaque® (B).....   | 84 |
| Figura 51. Curva de crecimiento para ratas machos (verde) y hembras (negro) de la cepa WAG/RijHsd. Fuente: Charles River .....   | 85 |
| Figura 52. Fotografía de Microscopia de Campo Claro de un cultivo tipo de la línea celular CC531.....  | 86 |
| Figura 53. Detalle de alguno de los aparatos del Laboratorio de Cultivos.....  | 88 |
| Figura 54. Microscopio quirúrgico Leica Wild M651 del quirófano de microcirugía...   | 89 |
| Figura 55. Representación esquemática del circuito eléctrico del IRF EM04. Figura tomada de la Tesis doctoral de Eneko Garaio. ....  | 90 |
| Figura 56. Representación de la intensidad del campo magnético calculada por el método de elementos finitos (FEM). La línea de puntos encierra el espacio donde el campo es homogéneo, con variaciones menores del 4%. Figura tomada de la Tesis doctoral de Eneko Garaio..... | 91 |
| Figura 57. Esquema del banco de condensadores del prototipo EM04. Tomada de la Tesis doctoral del Dr. Garaio.....  | 91 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 58. Circuito eléctrico del modelo EM06. Figura tomada de la Tesis doctoral de Eneko Garaio. ....  | 92  |
| Figura 59. Representación de la intensidad del campo magnético (generado por el EM06) calculada por FEM. La línea de puntos encierra el espacio donde el campo es homogéneo, con variaciones menores del 4%. Figura tomada de la Tesis doctoral de Eneko Garaio. ....  | 93  |
| Figura 60. Representación esquemática del banco de condensadores del modelo EM06. Figura tomada de la Tesis doctoral de Eneko Garaio. ....   | 93  |
| Figura 61. Representación del ratio entre PL/Pav. Figura tomada de la Tesis doctoral de Eneko Garaio. ....   | 95  |
| Figura 62. Esquema completo de todos los componentes que forman el IRF. Figura tomada de la Tesis doctoral de Eneko Garaio. ....   | 96  |
| Figura 63. Imagen del control ecográfico realizado a los animales para evaluar el desarrollo y volumen tumoral, tomando medidas en corte axial (A) y sagital (B). 99   |     |
| Figura 64. Esquema de colocación de las sondas de registro térmico para la exposición a HT ex vivo. La flecha roja señala la sonda emplazada en el LLD, la verde la sonda colocada en el medio de suspensión y la flecha amarilla señala la sonda térmica colocada en el LLI (que fue excluido y no recibió aporte de NpM). .... | 100 |
| Figura 65. Exploración mediante TCMC de las ratas infundidas con RGD-I. ....   | 101 |
| Figura 66. Fotografía del campo quirúrgico previo a la preparación de la arteria esplénica (flecha verde) para la colocación de la microcánula. Se observan también el tronco celiaco (flecha amarilla) y la arteria hepática (flecha negra). ....   | 102 |
| Figura 67. Punción de la arteria esplénica mediante aguja de 30 G. ....  | 103 |
| Figura 68. Microcánula empleada para la cateterización de la arteria esplénica. La escala representa 1 cm. ....  | 103 |
| Figura 69. Arteria esplénica cateterizada con la microcánula (flecha amarilla). ....   | 104 |

---

|  |     |
|--|-----|
| Figura 70. Fotografía de la colocación de las sondas para el registro de las variaciones térmicas durante la exposición al IRF. ....   | 105 |
| Figura 71. Fotografía del panel de control del incubador de CO <sub>2</sub> empleando para la expansión y crecimiento de las células.....  | 108 |
| Figura 72. Fórmula empleada para determinar la concentración de una suspensión celular, donde A es la media del recuento de células del hemocitómetro, d es la dilución realizada para el llevar a cabo el recuento y B es el volumen en que se haya disuelto el pellet de células. .... | 109 |
| Figura 73. Casete que emplea el NucleoCounter para la determinación de la concentración y viabilidad celular.....  | 110 |
| Figura 74. Esquema del procedimiento de lectura de la fluorescencia emitida por diferentes concentraciones de RGD- fluoresceína sobre placas de 96 pocillos sin células.....   | 113 |
| Figura 75. Imagen del panel de control del incubador de CO <sub>2</sub> empleado para los procedimientos de HT in vitro, con la temperatura determinada a 47° C.....   | 115 |
| Figura 76. El enzima succinato deshidrogenasa (SDH) cataliza la reacción que transforma el tetrazolio (de color amarillento) en sales de formazán (de color violáceo). ....  | 116 |
| Figura 77. Esquema temporal de los experimentos realizados para comprobar el efecto de la HT sobre las células en cultivo. ....  | 127 |
| Figura 78. Esquema temporal de los experimentos realizados para comprobar el efecto de los fármacos ATRA y 5-FU, solos o en combinación, sobre las células en cultivo.....   | 128 |
| Figura 79. Esquema temporal de los experimentos realizados para comprobar el efecto de los fármacos ATRA y 5-FU, solos o en combinación, sobre cultivos celulares expuestos previamente a HT.....  | 129 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 80. Esquema temporal de los experimentos realizados para comprobar el efecto de la HT sobre los cultivos pretratados con los fármacos ATRA y 5-FU, solos o en combinación, sobre las células en cultivo. ....                                    | 130 |
| Figura 81. Esquema temporal de los experimentos realizados para medir la fluorescencia emitida por los cultivos celulares expuestos a RGD-fluoresceína, con o sin lavado previo con PBS a la realización las medidas.....                               | 131 |
| Figura 82. Esquema del procedimiento de inyección i.v. de RGD-I y posterior realización de los estudios de imagen mediante TCMC. ....   | 132 |
| Figura 83. Esquema de los procedimientos realizados en las experiencias de detección de NpM-RGD mediante IRM.....   | 132 |
| Figura 84. Esquema de los procedimientos realizados <i>in vivo</i> en las experiencias de inducción de HTM.....   | 133 |
| Figura 85. Esquema de los procedimientos realizados <i>in vivo</i> sobre cada uno de los grupos experimentales de los ensayos de determinación de enzimas séricos y metabolitos hepáticos. ....   | 134 |
| Figura 86. Proliferación de los cultivos (en UAA) control y sometidos a HT tras 24 horas de crecimiento inicial . La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA). ....                                    | 140 |
| Figura 87. Proliferación de los cultivos (en UAA) control y sometidos a HT tras 48 horas de crecimiento inicial. La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA). ....                                     | 140 |
| Figura 88. Proliferación de los cultivos (en UAA) control y sometidos a HT tras 72 horas de crecimiento inicial . La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA). ....                                    | 141 |
| Figura 89. Recuento celular, expresado como porcentaje respecto al control, de los cultivos sometidos a HT tras 24 48 o 72 horas de crecimiento previo al inicio de la experiencia. Lecturas realizadas 24, 48 y 72 horas después del shock térmico. .. | 142 |

---

|   |     |
|---|-----|
| Figura 90. Proliferación de los cultivos (en UAA) controles y tras completar el tratamiento con ATRA durante 24 horas. La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).....                  | 143 |
| Figura 91. Proliferación de los cultivos (en UAA) controles y tras completar el tratamiento con 5-FU durante 24 horas. La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).....                  | 144 |
| Figura 92. Proliferación de los cultivos (en UAA) controles y tras completar el tratamiento con ATRA y 5-FU durante 24 horas. La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).....           | 145 |
| Figura 93. Recuento celular expresado como porcentaje respecto al control en los cultivos tratados con los distintos fármacos o su combinación.....   | 146 |
| Figura 94. Proliferación celular (en UAA) tras completar el tratamiento con ATRA, posterior a la exposición a HT. La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).....                       | 147 |
| Figura 95. Proliferación celular (en UAA) tras completar el tratamiento con 5-FU, posterior a la exposición a HT. La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).....                       | 148 |
| Figura 96. Proliferación celular (en UAA) tras completar el tratamiento con ATRA, posterior a la exposición a HT. La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).....                       | 149 |
| Figura 97. Recuento celular expresado como porcentaje de la viabilidad celular de los cultivos expuestos al tratamiento combinado de HT y quimioterapia, respecto al control tratado únicamente con HT (línea discontinua de puntos)..... | 150 |
| Figura 98. Proliferación celular (en UAA) tras completar el tratamiento con HT, posterior a la exposición a ATRA. La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).....                       | 151 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 99. Proliferación celular (en UAA) tras completar el tratamiento con HT, posterior a la exposición a 5-FU. La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).....   | 152 |
| Figura 100. Proliferación celular (en UAA) tras completar el tratamiento con HT, posterior a la exposición a ATRA+5-FU. La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).....   | 153 |
| Figura 101. Viabilidad de los cultivos expuestos a los fármacos y posteriormente HT, respecto al control (tratado únicamente con los fármacos, línea discontinua de puntos).....  | 154 |
| Figura 102. Sección histológica del LP de la rata G2 teñida con Hematoxilina-Eosina. ....   | 158 |
| Figura 103. Sección histológica del LLI de la rata G2 teñida con Hematoxilina-Eosina. ....  | 158 |
| Figura 104. Sección histológica del LP de la rata G2 teñida con tinción de Perl's.....  | 159 |
| Figura 105. Sección histológica del LLI de la rata G2 teñida con tinción de Perl's. ...   | 159 |
| Figura 106. Sección histológica del LP de la rata E1 teñida con Hematoxilina-Eosina. ....   | 160 |
| Figura 107. Sección histológica del LP de la rata E1 teñida con tinción de Perl's. ....   | 160 |
| Figura 108. Representación gráfica de los valores promedio y desviación estándar de la fluorescencia (UAF) emitida por diferentes concentraciones de RGD-fluoresceína en medio de cultivo. ....   | 164 |
| Figura 109. Representación gráfica del promedio y desviación estándar de la fluorescencia (UAF) emitida por los RGD-fluoresceína a distintos tiempos de exposición, lavados con PBS (línea azul y sin lavar (línea roja) antes de la lectura de la fluorescencia (línea azul). .... | 165 |

- Figura 110. Microfotografías de microscopía de fluorescencia 100x (A) y microscopía de campo claro 200x (B) de células CC531 cultivadas con RGD-fluoresceína. Las flechas señalan la zona de unión de los RGD-fluoresceína a las célula situadas en las periferia de los agregados..... 166
- Figura 111. Secuencia exploratoria mediante TCMC, pre-infusión y 1, 5 y 15 minutos post-infusión. El círculo amarillo indica la zona donde se localiza el implante tumoral..... 168
- Figura 112. Representación de la media y la SD de la concentración de yodo, expresada en microgramos por gramo de tejido tumoral (rojo) y de tejido sano (azul) de hígados de ratas infundidas con RGD-I..... 168
- Figura 113. Plano axial de las secuencias STIR, DP\* y T2\* de IRM de animales no infundidos (A, B y C) e infundidos (D, E y F) con 1 ml de la suspensión de NpM-RGD con 1,5 mg Fe/ml. Los círculos naranjas enmarcan las lesiones tumorales hepáticas. Los puntos señalan las regiones de interés que se midieron para estimar el Fe en el tumor (amarillo), parénquima hepático (rojo) y músculos paravertebrales (azul). ..... 169
- Figura 114. Representación de la media y la SD de los valores de la IS en la secuencia DP\*, en el tejido tumoral y hepático de ratas sin NpM-RGD (rojo) e infundidas con NpM-RGD (azul)..... 171
- Figura 115. Representación de la media y la SD de los valores de la IS en la secuencia T2\*, en el tejido tumoral y hepático de ratas sin NpM-RGD (rojo) e infundidas con NpM-RGD (azul)..... 171
- Figura 116. Representación de la media y la SD de la [Fe] estimada mediante IRM en el tejido tumoral y el parénquima hepático sano de ratas que recibieron una infusión intrarterial de NpM-RGD (azul) o que no la recibieron (rojo)..... 172
- Figura 117. Representación de la media y la SD de la [Fe] determinada por técnicas elementales (ICP-MS) en el tejido tumoral y el parénquima hepático sano de ratas

|  |     |
|--|-----|
| que recibieron una infusión intrarterial de NpM-RGD (azul) o que no la recibieron (rojo). .....  | 174 |
| Figura 118. Cortes histológicos con tinción de azul de Prusia a 4x (A) y 10x (B) del hígado de la rata 5V. Los depósitos de Fe (flecha) en el intersticio fibrovascular circundante a estructuras glandulares tumorales (asterisco) aparecen coloreados en azul. También pueden observarse depósitos de Fe en el espacio sinusoidal del parénquima hepático sano (cabeza de flecha). El recuadro de puntos figura A enmarca el área reflejado en la figura B. .... | 175 |
| Figura 119. Registro representativo del campo aplicado durante la exposición al IRF. La flecha roja señala el momento (18 minutos) en el cual el sistema de control automático de la temperatura entró en funcionamiento y, por tanto, la intensidad de campo fue variable para mantener la temperatura constante- .....   | 178 |
| Figura 120. Comparación de la temperatura hepática máxima alcanzada en cada uno de los dos regímenes de exposición al campo magnético para cada uno de los grupos experimentales. ....   | 178 |
| Figura 121. Mortalidad de los animales del grupo HT, en función del régimen térmico al que fuera expuesto: A o B. En verde el número de animales que sobrevivieron a la HT y en negro los que fallecieron a consecuencia del procedimiento. ....   | 179 |
| Figura 122. Mortalidad de los animales del grupo Salino+HT, en función del régimen al que fuera expuesto A o B. En verde el número de animales que sobrevivieron a la HT y en negro los que fallecieron a consecuencia del procedimiento. ....   | 180 |
| Figura 123. Mortalidad de los animales del grupo NpM+HT, en función del régimen al que fuera expuesto A o B. En verde el número de animales que sobrevivieron a la HT y en negro los que fallecieron a consecuencia del procedimiento. ....  | 180 |
| Figura 124. Representación gráfica de la media y SD del incremento térmico registrado en el hígado sano de cada grupo experimental. En verde el incremento en los animales que sobrevivieron al o los procedimientos y en rojo los que murieron a  |     |



- consecuencia de él. En número dentro de las columnas indica el número de animales..... 181
- Figura 125. Representación gráfica de la media y SD del peso de cada grupo experimental. En verde el incremento en los animales que sobrevivieron al o los procedimientos y en rojo los que murieron a consecuencia de él. En número dentro de las columnas indica el número de animales..... 182
- Figura 126. Representación gráfica del incremento térmico medio y SD de la temperatura registrada durante la exposición al IRF de los animales de las 3 condiciones experimentales en el tejido hepático (rojo), tejido tumoral (azul) y recto (gris)..... 183
- Figura 127. Evolución de la temperatura registrada durante el tiempo que los animales sin NpM-RGD estuvieron sometidos al IRF. En negro (ch1) la temperatura registrada en el tumor, en rojo (ch2) la temperatura del hígado sano, en verde (ch3) la rectal y en azul (ch4) la temperatura ambiente dentro del IRF, en la zona donde el campo es máximo. .... 184
- Figura 128. Evolución del incremento térmico durante el tiempo que los animales sin NpM-RGD estuvieron sometidos al IRF. En negro (ch1) el incremento en el tumor, en rojo (ch2) el incremento del hígado sano, en verde (ch3) el rectal y en azul (ch4) el incremento registrado en la sonda ambiental dentro del IRF, en la zona donde el campo es máximo. .... 185
- Figura 129. Representación gráfica del porcentaje medio de necrosis y SD tras la exposición al IRF de los animales de las 3 condiciones experimentales, en el tejido hepático (rojo) y el tejido tumoral (azul)..... 188
- Figura 130. Representación gráfica de la media y desviación estándar del volumen de los implantes tumorales (azul) y la necrosis estimada en secciones histológicas de los mismos implantes (verde). .... 189
- Figura 131. Análisis y recta de regresión del volumen y la necrosis tumoral..... 190

|   |     |
|---|-----|
| Figura 132. Representación gráfica del valor medio y SD de los niveles del enzima ALT en los diferentes grupos experimentales (datos expresados en Unidades/litro). ..  | 193 |
| Figura 133. Representación gráfica del valor medio y SD de los niveles del enzima AST en los diferentes grupos experimentales (datos expresados en Unidades/litro). ..  | 193 |
| Figura 134. Representación gráfica del valor medio y SD de los niveles del enzima ALP en los diferentes grupos experimentales (datos expresados en Unidades/litro). ..  | 194 |
| Figura 135. Representación gráfica del valor medio y SD de los niveles del enzima amilasa en los diferentes grupos experimentales (datos expresados en Unidades/litro). .....   | 195 |
| Figura 136. Representación gráfica del valor medio y SD de los niveles del enzima CK en los diferentes grupos experimentales (datos expresados en Unidades/litro). ..   | 196 |
| Figura 137. Representación gráfica del valor medio y SD de los niveles del enzima LDH en los diferentes grupos experimentales (datos expresados en Unidades/litro). .....   | 196 |
| Figura 138. Representación gráfica del valor medio y SD de los niveles de Creatinina en los diferentes grupos experimentales (datos expresados en Unidades/litro). .....  | 197 |
| Figura 139. Análisis multivariante mediante PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis) del tejido hepático de ratas sanas (C, rombo rojo), tejido hepático de ratas portadoras de implantes tumorales (H-RT-C, cuadrado verde) y tejido tumoral de ratas control (T-C, triángulo azul). La línea discontinua marca el intervalo de confianza del 95%. ..... | 198 |
| Figura 140. <i>Loadings</i> del primer componente (PC o LV) del análisis multivariante mediante PLS-DA. ....  | 199 |
| Figura 141. <i>Loadings</i> del segundo PC o LV del análisis multivariante mediante PLS-DA. ....  | 200 |

---

|  |     |
|--|-----|
| Figura 142. Análisis multivariante mediante PLS-DA de las distintas muestras de tejido hepático de todos los grupos experimentales. La línea discontinua marca el intervalo de confianza del 95%. .....                | 202 |
| Figura 143. Valores normalizados de glucosa, piruvato, lactato, citrato, fumarato y D-hidroxiacetato de los distintos grupos experimentales, respecto a animales sanos del grupo control (línea discontinua roja)..... | 204 |
| Figura 144. Valores normalizados de glutatión, colina, betaína y asparragina de los distintos grupos experimentales, respecto a animales sanos del grupo control (línea discontinua roja). .....                       | 205 |
| Figura 145. Ratio lactato-piruvato (L:P) obtenido a partir de los valores normalizados de la Tabla 22. La línea de discontinua roja representa el L:P del tejido hepático sano de ratas control.....                   | 206 |



# ÍNDICE DE TABLAS



---

|  |     |
|--|-----|
| Tabla 1. Polímeros o moléculas habitualmente empleadas para el recubrimiento de las NpM con fines biomédicos. Gupta & Gupta, 2005).....  | 36  |
| Tabla 2. Biomoléculas habitualmente empleadas para la funcionalización de NpM con fines biomédicos. Gupta & Gupta, 2005. ....  | 38  |
| Tabla 3. Resumen de publicaciones con administración endovascular de NpM en terapias de HTM. Huang & Hainfeld, 2013).....  | 48  |
| Tabla 4. Rango óptimo de trabajo para el prototipo EM06. Tomado de Tesis Doctoral de Eneko Garaio .....  | 94  |
| Tabla 5. Características de las NpM infundidas y del campo magnético al que fueron expuestos los hígados de la experiencia <i>ex vivo</i> con NpM comerciales en solución acuosa. ....       | 125 |
| Tabla 6. Características de las NpM infundidas y del campo magnético al que fueron expuestos los hígados de la experiencia <i>ex vivo</i> con NpM comerciales en solución salina.....        | 126 |
| Tabla 7. Características de las NpM infundidas y del campo magnético al que fueron expuestos los hígados de la experiencia <i>ex vivo</i> con NpM de síntesis propia en solución acuosa..... | 126 |
| Tabla 8. Pendiente de las gráficas de cultivos en las últimas 24 horas de la experiencia (calculada en grados).....  | 141 |
| Tabla 9. Modificaciones de la temperatura tras estimular las NpM.....  | 155 |
| Tabla 10. Modificaciones de la temperatura tras estimular las NpM suspendidas en suero salino.....   | 156 |
| Tabla 11. Modificaciones de la temperatura (° C) tras estimular las NpM de producción propia, suspendidas en agua destilada. ....  | 157 |

|   |     |
|---|-----|
| Tabla 12. Valores promedio y desviación estándar de la fluorescencia (UAF) emitida por los RGD-fluoresceína: cultivo control no expuesto y tras 1, 2, 3 y horas de exposición.....  | 165 |
| Tabla 13. Rango de valores de atenuación radiológica en Unidades Hounsfield (HU) y concentración de yodo por gramos de tejido fresco determinada por ICP-MS. (*no se detectaron cambios en la cantidad de yodo basal determinada en ambos tejidos) .....  | 167 |
| Tabla 14. Valores de la intensidad de señal (IS) para la secuencias DP* y T2*, registrados tanto en animales no infundidos como infundidos, en el tejido tumoral y el parénquima hepático sano.....   | 170 |
| Tabla 15. Concentración de Fe estimada mediante IRM en los tejidos de animales con o sin infusión de NpM-RGD. ....  | 172 |
| Tabla 16. [Fe] de hierro determinada por ICP-MS en ambos tejidos, tejido hepático y tumoral, tanto en animales que recibieron NpM-RGD como en aquellos que no las recibieron. Los datos se expresan tanto en a en $\mu\text{g/g}$ de tejido fresco como en $\mu\text{mol/g}$ de tejido fresco. .... | 173 |
| Tabla 17. Media y desviación estándar de los animales que sobrevivieron y fallecieron a causa de los procedimientos. ....   | 181 |
| Tabla 18. Incremento térmico medio y SD de la temperatura registrada durante la exposición al IRF de los animales de las 3 condiciones experimentales.....  | 183 |
| Tabla 19. Porcentaje y SD de la necrosis tumoral durante la exposición al IRF de los animales de las 3 condiciones experimentales. ....   | 187 |
| Tabla 20. Valores promedio y SD de los niveles en plasma sanguíneo de los distintos enzimas analizados: ALT, AST, ALP, Amilasa, CK, LDH y Creatinina. Entre paréntesis, las unidades de medida de cada uno de los enzimas. ....   | 192 |
| Tabla 21. Valores VIP normalizados de los metabolitos identificados en los espectros del tejido hepático de ratas portadoras de tumores (Control con tumor) y tejido  |     |



---

tumoral (Tumor), respecto a la cantidad detectada en el tejido hepático sano de los animales del grupo Control. Sombreados en verde los metabolitos detectados en menor cantidad respecto al tejido hepático control y en rojo aquellos metabolitos detectados en mayor cantidad. Se muestran los desplazamientos químicos (ppm) de los metabolitos identificados. .... 201

Tabla 22. Valores normalizados de los metabolitos identificados en los VIPs en el tejido hepático de los diferentes grupos experimentales, respecto al tejido hepático de ratas sanas control. Sombreado en verde aquellos grupos en los que la determinación metabólica fue menor respecto al control (menor cantidad determinada cuando mayor es la intensidad del sombreado verde) y sombreado en rojo aquellos grupos en los que la determinación metabólica fue mayor respecto al control (mayor cantidad determinada cuando mayor es la intensidad del sombreado rojo). .... 203



# INTRODUCCIÓN



## El cáncer colorrectal

### A. Epidemiología

Según datos de la Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer (IARC) se estima que en el 2012, último año del que se tienen datos oficiales, se diagnosticaron 2,7 millones de nuevos casos de cáncer en los países miembros de la Unión Europea (UE)<sup>1</sup>, de los que el 13% correspondieron a cáncer colorrectal (CCR)<sup>2</sup>.

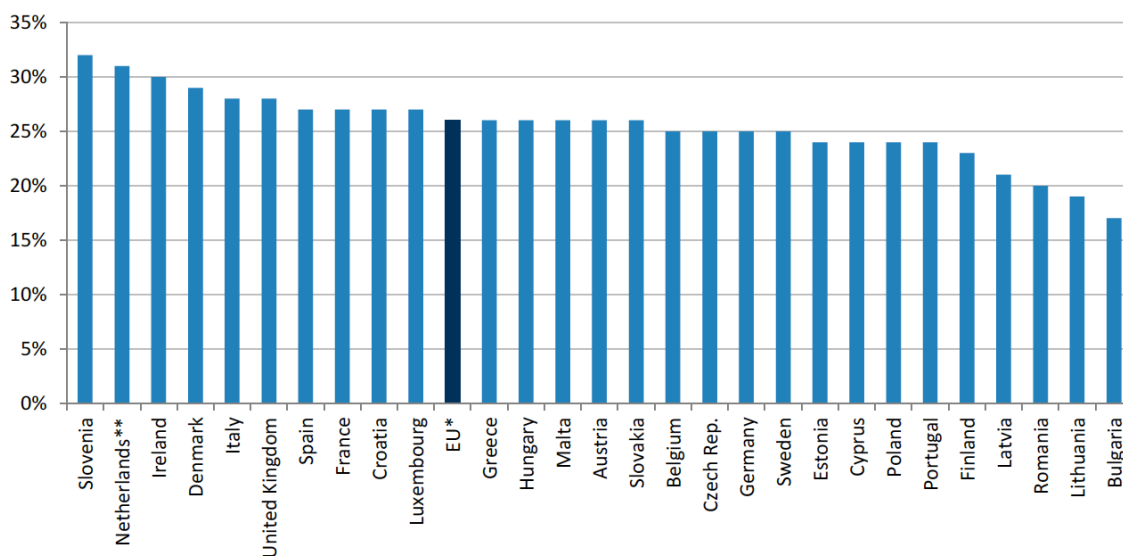


Figura 1. Proporción de muertes debido al cáncer en los Estados Miembros de la Unión Europea (UE) en 2013. Eurostat, 2016. Still 1 in 4 deaths caused by cancer in the EU. Tomado de: Eurostat <http://ec.europa.eu/eurostat/web/products-press-releases/-/3-03022016-BP>

Datos de la Oficina Europea de Estadística (Eurostat) revelan que el cáncer fue la causa de más de un cuarto (26%) de las muertes totales (Figura 1), siendo así la segunda casusa de defunciones en la UE, solo superada por enfermedades cardiovasculares (37%)<sup>3</sup>. De las neoplasias malignas, el CCR causó el 12% del total de muertes debidas al cáncer, sólo por detrás del cáncer de pulmón, lo que significa el 3,1% del total de muertes registradas en la UE.

En España, para ese mismo año, se estima que fueron diagnosticaron 215.534 nuevos casos de cáncer, suponiendo el CCR un 15% aproximadamente (Figura 2); cifra que, según las previsiones poblacionales de las Naciones Unidas, se elevará a casi 246.713 nuevos casos para el año 2020<sup>4</sup>.

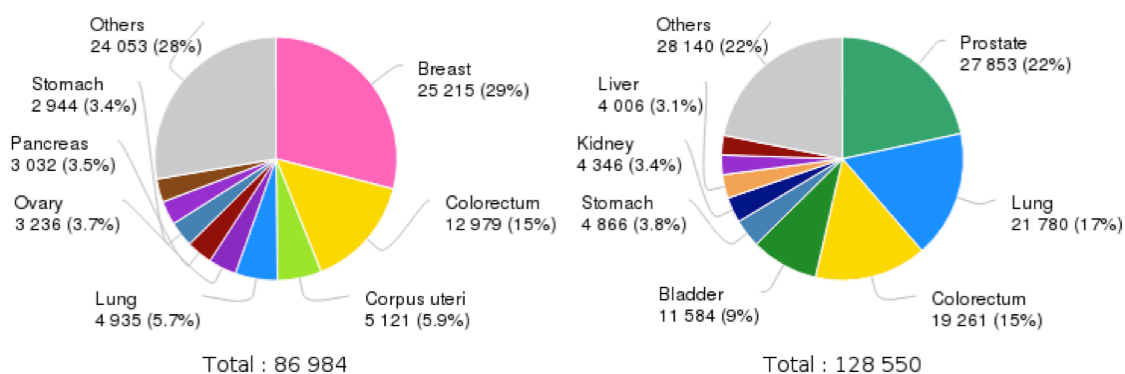


Figura 2. Incidencia estimada en España para mujeres (izquierda) y hombres (derecha) por tipo de cáncer. Tomado de: GLOBOCAN 2012 <http://gco.iarc.fr/>

En cuanto a las cifras de mortalidad, en España, el cáncer fue la causa de 102.762 muertes en 2012, pero a diferencia del conjunto de la UE, el CCR fue el tipo de neoplasia que más muertes causó, un 15% del total de muertes por cáncer<sup>3</sup> (Figura 3).

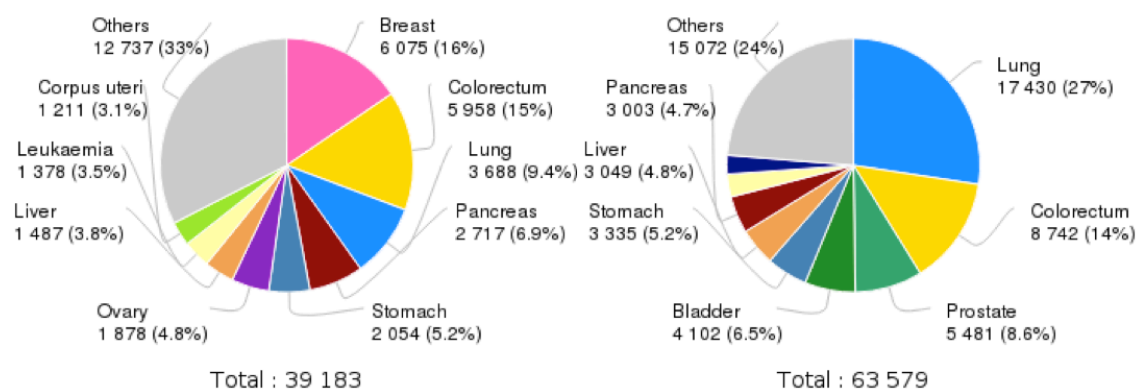


Figura 3. Mortalidad estimada en España para mujeres (izquierda) y hombres (derecha) por tipo de cáncer. Tomado de: GLOBOCAN 2012 <http://gco.iarc.fr/>

## B. Etiopatogenia

Son muchos los factores de riesgo que están asociados al desarrollo de CCR. Algunos son inherentes a cada persona, y por tanto no pueden ser modificados, como el componente genético, edad, patologías previas, antecedentes familiares...; pero además, factores “modificables” como el ambiente o el estilo de vida, pueden tener un papel importante en el desarrollo de neoplasias colorrectales<sup>5</sup>.

### 1. Factores genéticos

Aproximadamente entre un 5-10% de los casos de CCR tienen su origen en condiciones hereditarias conocidas<sup>6-8</sup>.

Una de ellas, el cáncer colorrectal no polipósico hereditario (CCRNPH) o Síndrome de Lynch, se asocia a alteraciones en los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*, implicados en las rutas de reparación del DNA<sup>8</sup>.

Supone entre el 2-6% de los casos de CCR diagnosticados. Aproximadamente un tercio de los afectados por síndrome de Lynch tiene alteraciones en el gen *MLH1*, otro tercio en *MSH2* y otros, en menor medida, en los genes *MSH6* y *PMS2*; además, se cree que otros genes aún no identificados deben tener un papel en el CCRNPH, ya que otro tercio de los enfermos no presentan alteraciones en los genes ya descritos<sup>9</sup>. En personas portadoras de dichas mutaciones, el riesgo de padecer CCRNPH puede aumentar hasta un 70-80%<sup>7</sup>.

Además, los pacientes afectados por el Síndrome de Lynch presentan una edad más temprana de aparición de CCR respecto a pacientes no afectados por dicho síndrome (44 años vs. 65 años)

Otro de los tipos de CCR asociado a factores genéticos, es la poliposis adenomatosa familiar (PAF). Supone menos de 1% de los casos de CCR y está vinculada a mutaciones en el gen supresor de tumores *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*) en *5q21*<sup>10</sup>. Los individuos afectados por PAF sufren la aparición de múltiples adenomas en la adolescencia y, aproximadamente, el 75% de ellos desarrollan CCR antes de los 30

años<sup>11</sup>. Entre el 75-80% de los pacientes afectados por PAF debido a alteraciones del gen APC tiene un familiar afectado<sup>12</sup>.

## 2. Edad y sexo

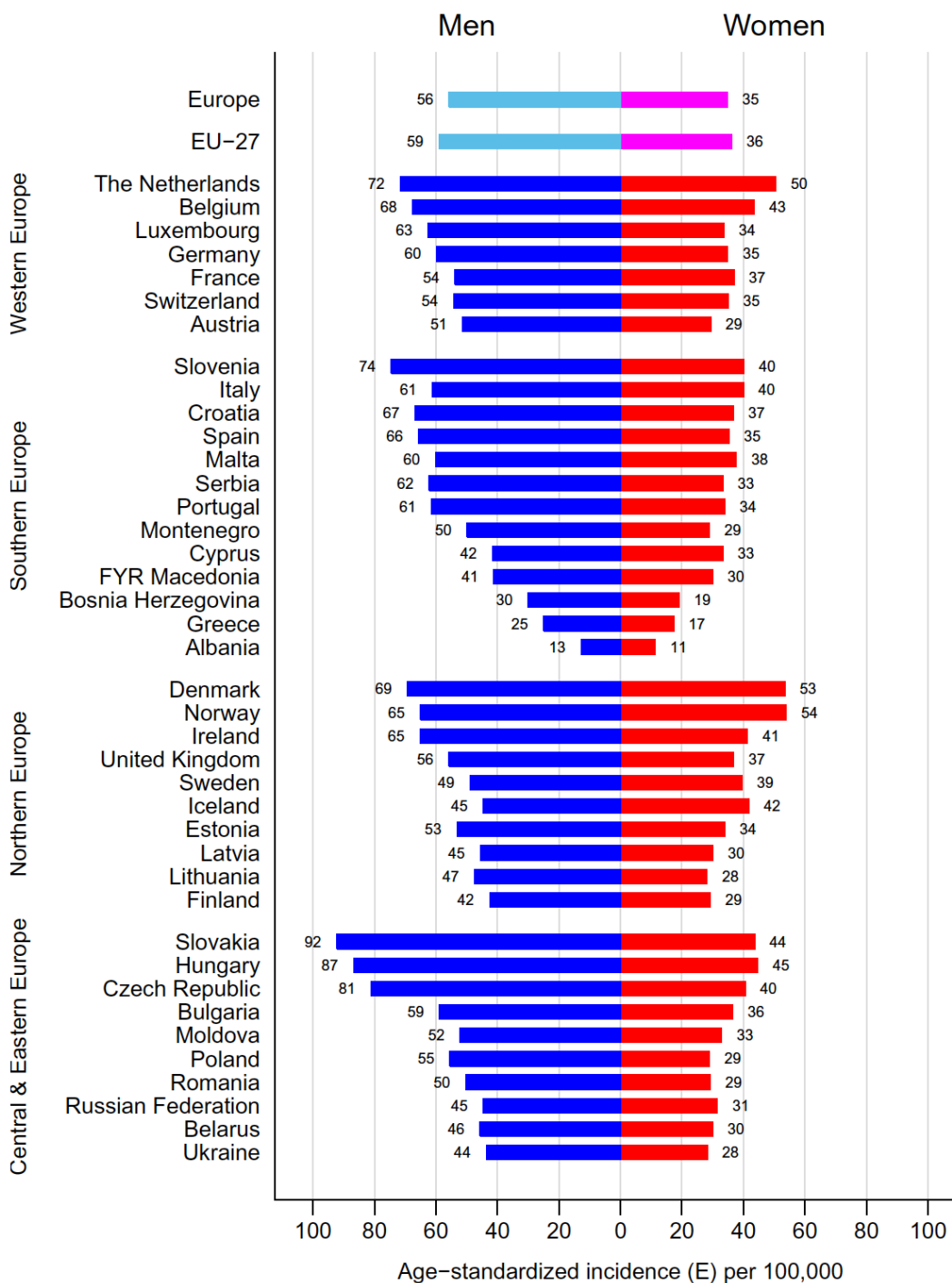


Figura 4. Incidencia estandarizada para la edad por sexo, área y país en Europa en el año 2012. (Ferlay et al., 2013)



El riesgo de padecer CCR se incrementa con la edad. A pesar de la existencia de casos de CCR en personas jóvenes<sup>13,14</sup>, más del 90% de los diagnósticos se realizan en pacientes con más de 55 años<sup>15</sup>; además, el riesgo de padecer CCR es 50 veces superior en pacientes con edades comprendidas entre los 60-79 años que en personas menores de 40<sup>16</sup>.

El sexo de los individuos, pese a no ser un factor determinante para una mayor predisposición o riesgo de padecer neoplasias colorrectales, sí que muestra una incidencia ligeramente superior en hombres que en mujeres<sup>17</sup>. Si bien, ésta incidencia muestra una gran variabilidad en función de la región geográfica (Figura 4).

### 3. Historial familiar

A pesar de que la mayoría de los pacientes con CCR no presentan en su familia antecedentes de esta enfermedad, entre un 15-20% de los individuos con CCR tienen al menos un familiar afectado por la misma enfermedad<sup>18</sup> (Figura 5).

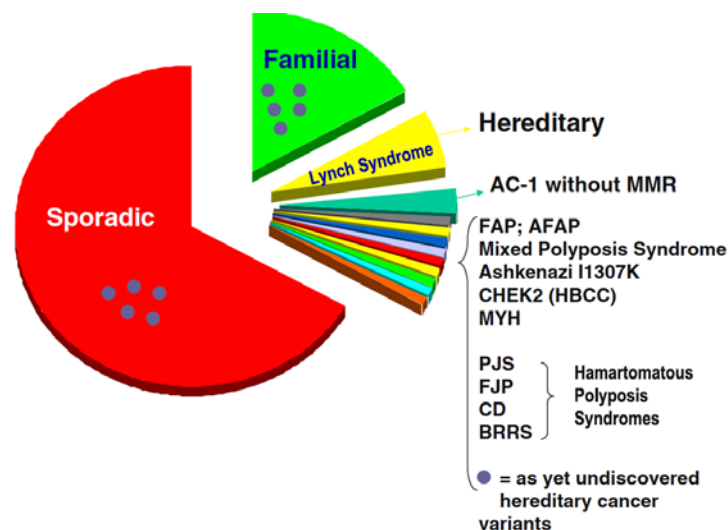


Figura 5. Diagrama de las causas atribuibles al origen de CCR. (Lynch, Lynch, Lynch, & Attard, 2008)

Los individuos con uno o más familiares de primer grado afectados por CCR o pólipos adenomatosos presentan un riesgo elevado de padecer CCR, así como aquellos con al menos un familiar menor de 50 años afectado por CCR o pólipos adenomatosos<sup>19</sup>.

Aunque las causas no son del todo conocidas, se cree que puede estar debido al componente genético familiar (comentado anteriormente), a factores ambientales comunes a ellos, hábitos de vida similar,...

#### *4. Patologías previas*

También se ha descrito en la bibliografía que la existencia de cierta patología previa, se asocia a un mayor riesgo de CCR. Los procesos fisiopatológicos que se desencadenan en la enfermedad inflamatoria intestinal aumentan la incidencia de CCR<sup>20</sup>.

Los cambios moleculares que ocurren en la inflamación crónica parecen ser una contribución importante a los procesos que desencadenan y favorecen la carcinogénesis, ya que crean un microambiente adecuado para el inicio y progresión de la enfermedad. Este estado es común a la enfermedad de Crohn y al CCR, por lo que se asocia a un aumento del riesgo de desarrollo de neoplasias colorrectales<sup>21,22</sup>. Tanto es así, que un meta-análisis de 12 artículos realizado por Canavan en 2006 reveló que, tras el diagnóstico de la enfermedad de Crohn, el riesgo acumulado de desarrollar CCR a los 10 años es del 2,9%, 5,6% a los 20 años y 8,3% a los 30 años<sup>23</sup>.

La aparición de pólipos adenomatosos no cancerosos también predispone al desarrollo de nuevos pólipos, además de CRC<sup>24,25</sup>.

#### *5. Dieta y hábitos de vida*

Aunque la causa no es del todo conocida, ni tampoco el modo en el que influye, los hábitos de vida poco saludables como el consumo de tabaco y alcohol se asocian con un incremento del riesgo relativo (RR) de padecer CCR (Figura 6)<sup>26</sup>; si bien este incremento es mucho menor que en otros tipos de neoplasias de la cavidad oral, tracto respiratorio y segmentos superiores del tracto digestivo, esófago principalmente<sup>27</sup>.

También los hábitos alimenticios y la dieta influyen sobre el RR del CCR. Por un lado, la dieta con alto contenido en fibra y un bajo contenido en grasa parece ser que tiene un efecto reductor sobre el RR del CCR<sup>28-30</sup>. La toma de alimentos ricos en vitaminas A,

C, D y E y en carotenoides también demuestran tener un efecto en la disminución del riesgo de CCR<sup>31,32</sup>

Sin embargo, otros aspectos relacionados con la dieta, como el consumo de carne frita o asada en exceso y la generación de productos pirrólicos, se asocian a un aumento del RR de padecer CCR. La carne roja y la carne pre-procesada presentan una relación directa con un incremento del riesgo<sup>33,34</sup>, no así la carne de pollo o el pescado, que no mostraron relación con el incremento del riesgo<sup>33</sup>. Esta asociación positiva entre el consumo de carne roja y procesada con el riesgo de CCR podría explicarse debido al grupo hemo del hierro, aminas heterocíclicas y el nitrito/nitrato presente en éstos alimento<sup>34</sup>.

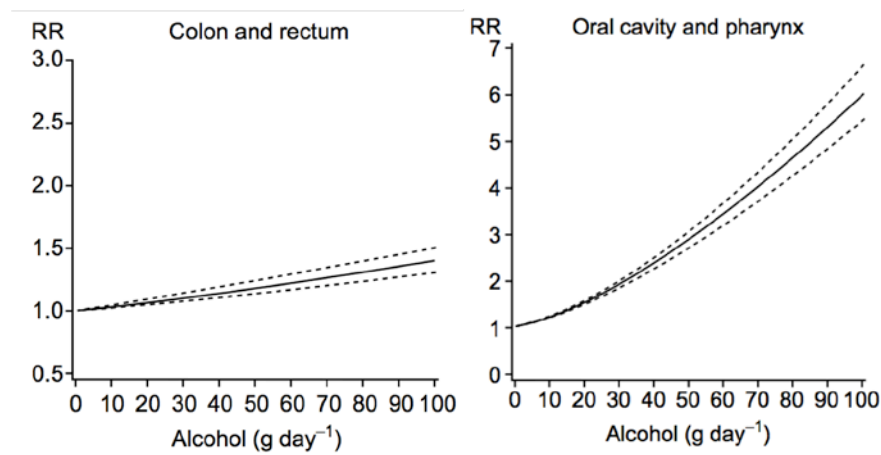


Figura 6. Riesgo relativo (RR) e intervalo de confianza correspondiente al 95% de la relación dosis-respuesta entre el consumo de alcohol y el riesgo de cáncer colorrectal (izquierda) y de la cavidad oral y faringe (derecha). (Bagnardi, Blangiardo, La Vecchia, & Corrao, 2001).



## Tratamiento de las metástasis hepáticas

El hígado es el órgano en el que más comúnmente provocan metástasis (Figura 7) aquellos tumores que drenan a través de la circulación portal, llegando hasta un 70-80% de los casos<sup>35</sup>. Más de la mitad de los pacientes con CCR desarrollarán metástasis hepáticas (MHCCR) durante su vida<sup>35,36</sup>, las cuales pueden estar presentes en el momento del diagnóstico de tumor primario o hasta 12 meses después (metástasis sincrónicas), al menos un 25% de los pacientes según Bengmark & Hafström, 1969; o bien aparecer con posterioridad (metástasis metacrónicas).

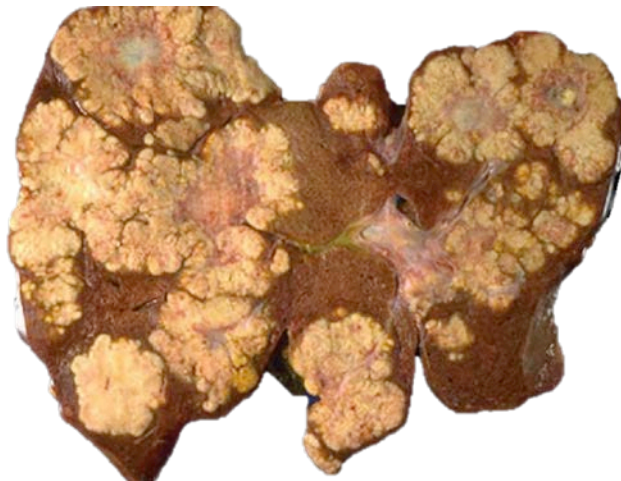


Figura 7. Metástasis hepáticas. <http://histopatologiabasica.blogspot.com.es/> (acceso 11 de agosto de 2017).

Sin tratamiento, el pronóstico para aquellos pacientes diagnosticados con metástasis hepáticas de CCR es pobre. Según las series analizadas, la tasa de supervivencia (TS) al año es del 20-30% de los pacientes, porcentaje que desciende a menos del 5% a los 5 años<sup>38,39</sup>.

Hoy en día, la única opción terapéutica con intención curativa para las MHCCR es el tratamiento quirúrgico, si bien otras alternativas como la ablación térmica por radiofrecuencias o microondas podrían tener también buenos resultados, sobre todo en pacientes clasificados inicialmente como no quirúrgicos. En pacientes donde estos procedimientos no son suficientes, se asocian a tratamientos de quimioterapia sistémica.

## A. Terapias locales:

### 1. *Propósito Curativo*

#### **Cirugía de resección hepática**

La cirugía de resección hepática (RH) se basa en gran medida en la descripción anatómica de los segmentos funcionales, que a su vez se basa en el suministro de sangre del órgano a través de la arteria hepática y la vena porta, su drenaje venoso a través de las venas hepáticas y su drenaje biliar.

La segmentación o división anatómica del hígado mayormente aceptada por los cirujanos hepatobiliares consta de ocho segmentos funcionales<sup>40</sup> (Figura 8). Ésta segmentación está basada en la distribución interna de los vasos sanguíneos que irrigan al hígado: las venas suprahepáticas y los pedículos portales.

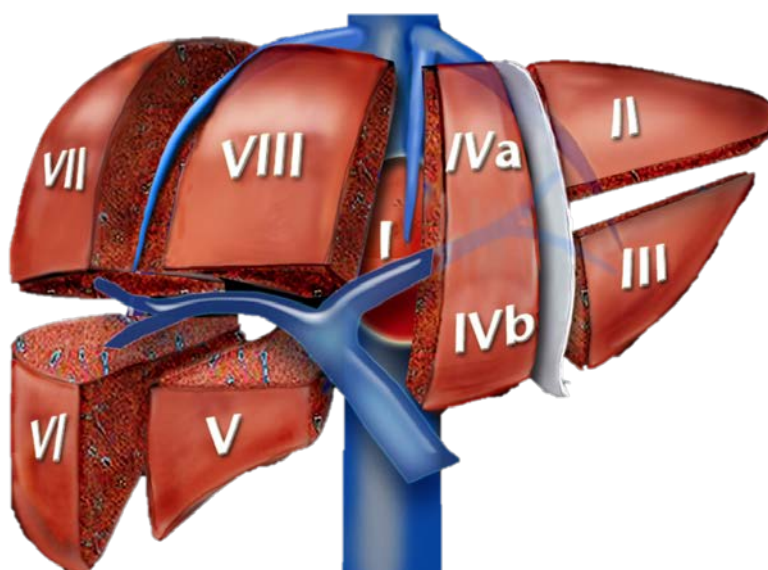


Figura 8. División hepática en ocho segmentos hepáticos. <http://www.radiologyassistant.nl/> (acceso 14 de agosto de 2017).

Así, la tríada portal derecha se bifurca en una rama anterior y otra posterior que, a su vez, se bifurca en una rama superior y otra inferior, que irrigan a cada uno de los segmentos del hígado derecho: segmentos V, VI, VII y VIII. El pedículo izquierdo se

divide en dos ramas anteriores (segmentos III y IV) y una rama posterior (segmento II). El segmento I, que recibe aporte sanguíneo tanto del hígado derecho como del izquierdo, se halla entre las venas porta y cava inferior, por detrás del hilio hepático<sup>41</sup>.

A día de hoy, la RH es el *gold standard* en el tratamiento de las MHCCR (Figura 9). Éste procedimiento requiere que la masa hepática final, tras la resección de las metástasis, sea suficiente como para asegurar un correcto funcionamiento del hígado y que, además, el tejido escindido tenga márgenes libres de tumor.

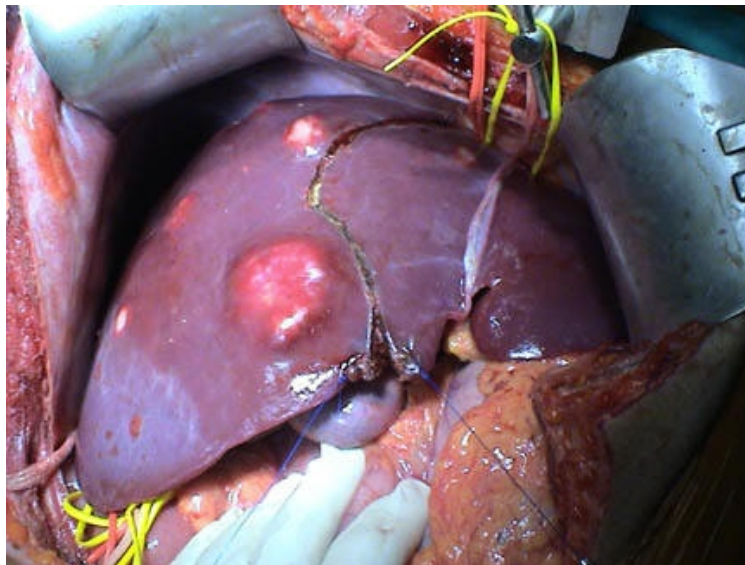


Figura 9. Resección o lobectomía hepática derecha. <http://www.uptodate.az/> (acceso 12 de agosto de 2017).

Varias series con seguimientos a largo plazo muestran que, la supervivencia global (SG) tras la RH va de los 33 a los 46 meses y que la TS a 5 años oscila entre el 20-39%<sup>42-45</sup>.

## **Ablación**

### *a) Ablación por Radiofrecuencias*

La ablación por radiofrecuencias (ARF) (Figura 10) es el tratamiento de elección en MHCCR no resecables o en pacientes con carcinomas hepatocelulares (CHC) en los que el trasplante hepático tiene riesgo de fracaso<sup>46,47</sup>. El procedimiento puede llevarse a cabo bien por vía percutánea, guiado por imagen o bien mediante laparotomía. La

elección del abordaje suele ser operador dependiente, sin que haya ninguna evidencia que apoye una vía sobre otra<sup>48</sup>.

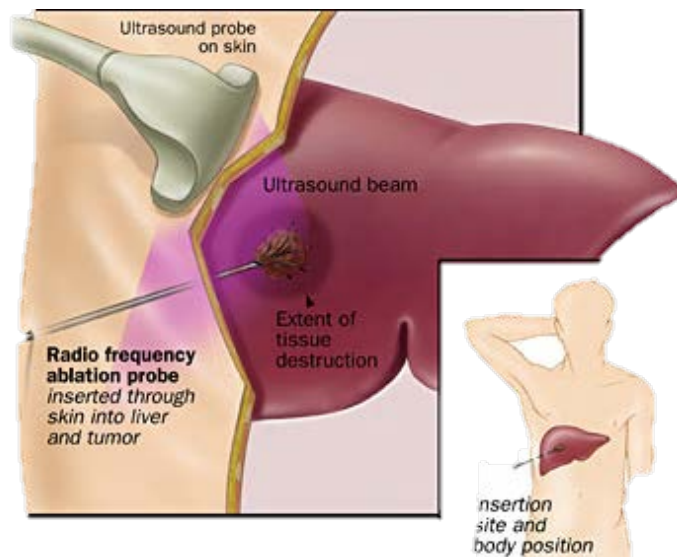


Figura 10. Ablación por radiofrecuencias de metástasis hepáticas vía percutánea con guiado mediante ecografía. <http://www.hopkinscoloncancercenter.org/> (acceso 14 de agosto de 2017)

La ARF utiliza corriente alterna de alta frecuencia para producir calor que destruye los tumores, desnaturalizando las proteínas y destruyendo las membranas celulares mediante la disolución y la fusión de la bicapa lipídica<sup>49</sup>. Menos del 9% de los procedimientos de ARF conlleva complicaciones, entre las que se incluyen: absceso hepático, derrames pleurales, neumotórax, insuficiencia renal aguda e hipoxemia; y una baja mortalidad (0-2%)<sup>50,51</sup>.

Si bien las series de seguimiento presentan buenos datos, las tasas de recurrencia de los pacientes tratados con ARF son 3 veces superiores a la RH<sup>52</sup>, pero 3 veces menor que los tratados mediante crioablación<sup>53</sup>.

Para asegurar el éxito de esta terapia hay que hacer una cuidadosa selección de los pacientes atendiendo al número de focos tumorales y al tamaño del mayor de ellos. En este sentido Solbiati et al. publicaron que la tasa de recurrencia en implantes menores de 2,5 cm apenas llegaba al 20%, pero que aumentaba hasta más del 50% en el caso de focos con tamaños comprendidos entre los 2.6 y 4 cm y al 70% cuando el tamaño



superaba los 4 cm<sup>54</sup>. Además, también es importante en el tratamiento mediante ARF conseguir unos márgenes de seguridad libres de enfermedad que variarán, en función del tamaño de la lesión, entre 5 mm y 15 mm<sup>55</sup>.

### b) Crioablación

La crioablación se fundamenta en la destrucción *in situ* del tejido mediante congelación (Figura 11), lo que induce deshidratación de las células, desnaturalización de las proteínas y destrucción de la vascularización de los tumores, debido al ciclo de congelación-descongelación de los tejidos<sup>56,57</sup>.

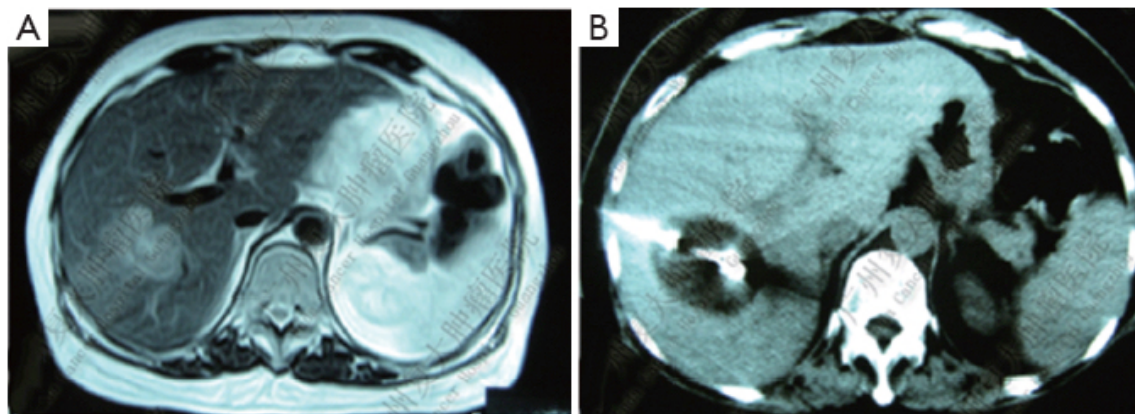


Figura 11. Corte transversal de hígado con MHCCR. Imagen de resonancia magnética nuclear (IRM) preoperatoria de MHCCR (A). Imagen intraoperatoria durante un procedimiento de crioablación guiado por tomografía computerizada multicorte (TCMC). (Niu, Zhou, Xu & Mu, 2013)

Generalmente aplicada vía percutánea, el principal hándicap de la crioablación es la limitación de tamaño de la *ice-ball* que se forma alrededor de la punta de la sonda empleada, es decir, el volumen de tejido que se congela alrededor de la sonda. Aunque ésta *ice-ball* puede ser monitorizada continuamente mediante ecografía intraoperatoria, es difícil predecir su tamaño y comportamiento, ya que depende en gran medida del flujo sanguíneo y del tejido circundante del tumor<sup>58</sup>.

Debido a esto, durante la crioablación, deben conseguirse *ice-ball* de gran tamaño, incluso para implantes tumorales pequeños, ya que sólo algunas partes de los mismos alcanzarían las temperaturas necesarias para su destrucción<sup>59</sup>.

*c) Láser*

Otro tipo de ablación que emplea energía térmica para la destrucción de tejido es la termoablación láser (TAL). Ésta técnica emplea fibra óptica para conducir un haz de luz laser de alta energía que, al ser absorbida por el tejido, consigue incrementos por encima de los 150 °C, lo que induce necrosis coagulativa<sup>60</sup>.

Los resultados en pacientes con MHCCR de hasta 5 cm tratados mediante TAL se asemejan a otros tratados mediante ARF o microondas (MO). Presentan TS que oscilan entre 30-75% a 3 años y entre el 10-40% a 5 años, dependiendo de las series analizadas<sup>61,62</sup>. A pesar de estos resultados, la TAL no suele ser considerada como una técnica de ablación tumoral efectiva y se excluye en revisiones o artículos originales<sup>63,64</sup>.

*d) Electroporación irreversible*

La electroporación (EP) se sirve de energía no térmica para conseguir la desestabilización temporal o permanente de la membrana plasmática de las células sin afectar en mayor medida a otras estructuras del tejido, lo que permite un mejor y más rápido crecimiento celular tras la terapia<sup>65</sup>.

La exposición de las células a estos campos eléctricos causa la permeabilización de la membrana plasmática de las mismas. Si bien no se sabe aún en base a que fenómeno ocurre dicha permeabilización, podría deberse a la aparición de poros en la membrana (de ahí el nombre de electro-poración) (Figura 12)<sup>66</sup>.

La duración o el tiempo que estos “poros” permanecen presentes en la membrana celular depende en gran medida de la intensidad del campo eléctrico aplicado. Campos eléctricos de cientos de voltios provocan, mientras son aplicados, la permeabilización temporal de la membrana plasmática, de ahí que se denomine electroporación reversible (EPR). La EPR, que comenzó a usarse como técnica para transfectar genes en células<sup>67</sup>, tiene un papel importante como técnica de inserción génica<sup>68</sup> y para el envío al interior de las células de fármacos antineoplásicos incapaces de atravesar a la membrana plasmática (electroquimioterapia)<sup>69</sup>.

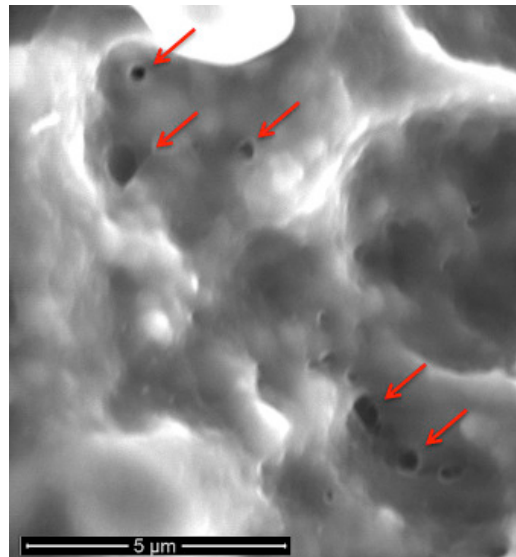


Figura 12. Imagen de microscopía electrónica de transmisión donde se muestran los poros (flechas rojas) aparecidos en la membrana celular tras electroporación irreversible (EPI). (Jourabchi, Beroukim, Tafti, Kee & Lee, 2014).

Si los campos eléctricos a los que se exponen las células son de un orden de magnitud mayor (miles de voltios) ocasiona que los poros formados en la membrana celular no sean temporales, sino permanentes, lo que se conoce como electroporación irreversible (EPI). Entre las ventajas que la EPI aporta frente al resto de técnicas de ablación está la producción de muerte celular sin emplear energía térmica y por consiguiente, sin la inflamación y la inmunorreacción asociada a ella<sup>70</sup>.

En éste sentido, Maor et al. comprobaron que, tras aplicar 10 pulsos de EPI de 3800 V/cm, de 100 μs cada uno, con una frecuencia de 10 pulsos por segundo, directamente en la arteria carótida de ratas, no hubo cambios estructurales en el vaso ni afectación de la supervivencia de los animales<sup>71</sup>.

Estudios llevados a cabo en conejos portadores de implantes hepáticos de carcinomas VX2 (línea celular tumoral de conejo, de origen incierto) han mostrado que aplicaciones múltiples de EPI consiguen la ablación completa del tumor, sin acarrear consecuencias destacables en los animales; siendo, además, un método técnicamente sencillo, rápido y seguro para el tratamiento de CHC<sup>72</sup>.

Kingham et al. realizaron un estudio retrospectivo sobre 28 pacientes sometidos a EPI, con revisiones mediante TCMC e IRM a los tres primeros meses y 6 meses de realizarse el procedimiento. Comprobaron que sólo el 14,2% de los pacientes (4) presentaron recidivas a los 6 meses y que no hubo mortalidad asociada al tratamiento; siendo por tanto un procedimiento seguro para el tratamiento de tumores hepáticos perivasculares<sup>73</sup>.

Adicionalmente, Cannon et al. publicaron una serie de 44 pacientes portadores de tumores hepáticos próximos a estructuras vitales, tanto CHC (14) como MHCCR (20) y otras metástasis (10). Aproximadamente el 60% de los pacientes no presentaron recidivas 12 meses después de la EPI ni tampoco fenómenos adversos ni daño en estructuras vitales<sup>74</sup>.

#### e) *Microondas*

La técnica de ablación tumoral de más reciente desarrollo se basa en el uso de MO, producidas por cualquier dispositivo electromagnético que trabaja con frecuencias entre 900 y 2450 MHz.

Al igual que las técnicas anteriores, permite la aplicación percutánea (Figura 13), laparoscópica o a través del abordaje quirúrgico abierto; el tejido tumoral se localiza mediante cualquiera de las técnicas de imagen disponibles para colocar una sonda de MO en su interior.

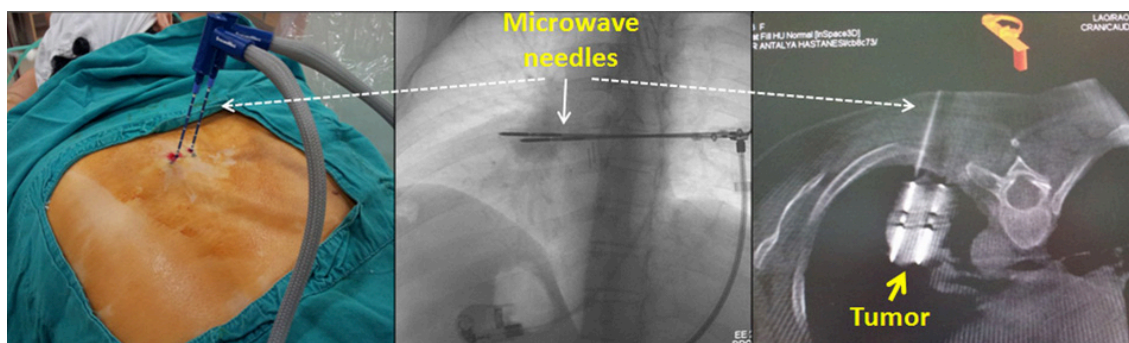


Figura 13. Procedimiento de ablación percutánea mediante microondas de implantes tumorales en el pulmón. <https://kanserdeyenitedaviler.com> (acceso 16 de agosto de 2017)

Los beneficios potenciales de esta terapia incluyen temperaturas intratumorales más altas, mayores volúmenes de ablación tumoral, tiempos de ablación más rápidos, calentamiento óptimo de las masas tumorales y menor dolor durante el procedimiento<sup>75</sup>. En cuanto al tiempo de SG y la TS a 1, 2 y 3 años, Shibata et al. no encontraron diferencias entre la ablación mediante MO y la RH (27 meses y 71%, 57% y 14% vs. 25 meses y 69%, 56% y 23%, respectivamente); si bien, la pérdida de sangre durante el procedimiento de ablación por MO fue 2,5 veces menor que la RH, además de ser un procedimiento menos invasivo<sup>76</sup>.

## ***2. Propósito Paliativo:***

De los pacientes con MHCCR, aproximadamente solo el 30% serán candidatos a una terapia de las descritas anteriormente, con propósito curativo, siendo en la mayoría de los casos la RH el procedimiento de elección.

Los pacientes que no son candidatos a una terapia con intención curativa o que no reciben tratamiento adecuado tiene una SG media de 6 a 12 meses y una TS a los 5 años menor del 10%<sup>37</sup>; sea cual sea la terapia paliativa que se aplique, ésta permitirá el control local y sintomático de las MHCCR y una mejoría relativa, en algunos casos, de la SG.

## **Quimioembolización**

La quimioembolización transarterial (QETA) tiene como objetivo la infusión de compuestos quimioterapéuticos junto con partículas embolizantes. Las partículas embolizantes privan de aporte sanguíneo a la masa tumoral (Figura 14), favoreciendo una zona de hipoxia, lo cual potencia el efecto citotóxico de la quimioterapia.

Los procesos de QETA se llevan a cabo a través de un abordaje arterial periférico, generalmente la arteria femoral, y se basan en el hecho de que el parénquima hepático sano recibe aproximadamente 70-80% de su aporte sanguíneo por vía venosa (el 20-30% restante lo recibe por vía arteria hepática), no así las metástasis hepáticas que son irrigadas por vía arterial<sup>77</sup>. Ésta particularidad, permite que al ascender un catéter desde

la arteria femoral hasta la arteria hepática, las sustancias liberadas queden depositadas en o cerca de las metástasis.



Figura 14. Angiografía de la arteria hepática antes (izquierda) y después (derecha) de realizar un procedimiento de QETA para una masa tumoral en el hígado derecho. <http://www.sys-med.de/> (acceso el 16 de agosto de 2017).

*a) QETA con compuestos grasos:*

En estos procedimientos se usa una mezcla de un fármaco quimioterápico y un aceite etiodizado (comercialmente llamado Lipiodol®). Su alto contenido en yodo hace que sea opaco a imágenes de rayos X, lo que permite realizar una monitorización mediante fluoroscopia durante su administración y observar si se produce reflujo del producto y el grado de captación de la mezcla por parte del tumor (Figura 15)<sup>78</sup>. Éste tipo de QETA se emplea de forma exclusiva en el tratamiento de CHC<sup>79,80</sup>.

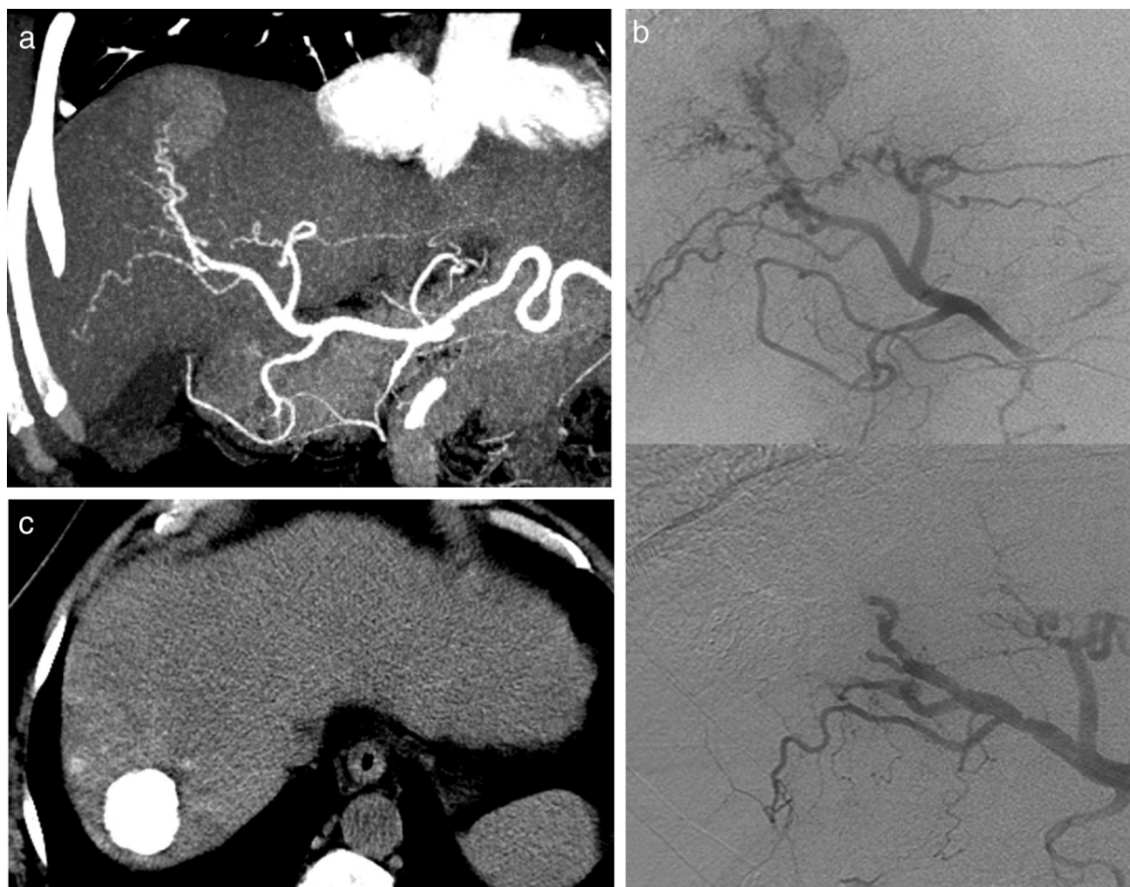


Figura 15. Secuencia de TCMC en fase arterial donde se observa un implante de CHC hiperdenso por la hipercaptación de yodo (A). Arteriografía con sustracción digital (ASD) pre tratamiento con QETA donde se observa el *blush* tumoral por la captación del contraste yodado (imagen superior) y al finalizar el tratamiento (imagen inferior), donde desaparece el *blush* tumoral por la sustracción de la arteria hepática derecha (B). TCMC 45 días después del tratamiento, donde se observa una masa hiperintensa correspondiente a la captación del Lipiodol por parte del implante tumoral (C). (Revel-Mouroz et al., 2017)

#### b) QETA con microesferas cargadas de fármacos

Este tipo de quimioembolización emplea “perlas” o microesferas cargadas con fármacos (QETA-f) como sistema para enviarlos selectivamente al lecho tumoral (Figura 16)<sup>81</sup>.

Estudios realizados por Aliberti et al. en 2006 y Fiorentini et al. en 2007 sobre el uso de QETA-f cargado con irinotecan (comercializado como DEBIRI™), parecen demostrar que éste producto es efectivo en el tratamiento de pacientes con MHCCR no resecables<sup>82,83</sup>.

El irinotecan es un derivado de la camptotecina, compuesto citotóxico extraído del árbol *Camptotheca acuminata*, con propiedades antiproliferativas sobre varias estirpes tumorales. Actúa inhibiendo el enzima topoisomerasa I, con funciones de mantenimiento de la estructura del DNA durante la transcripción y la división celular.

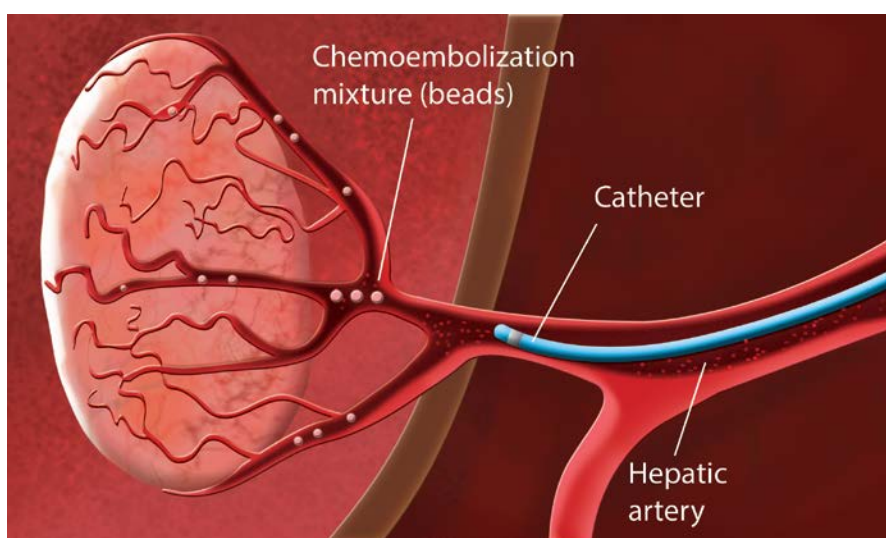


Figura 16. Representación esquemática de la administración de microesferas cargadas con citotóxicos mediante QETA-f. <https://www.baltimorevascularcare.com> (acceso el 22 de agosto de 2017)

También Martin et al. en 2009 estudiaron el empleo de DEBIRI™ en pacientes con MHCCR. Este estudio multicéntrico se realizó sobre 30 pacientes, entre 42 y 75 años y con una media de 5 lesiones (rango entre 1-20), que recibieron un total de 57 sesiones de QETA-f con DEBIRI™. Doce de los procedimientos (21%) provocaron efectos adversos asociados al mismo: la mitad de ellos fueron de tipo síndrome post-embólico, otro infección del puerto de acceso, gastritis, deshidratación, colecistitis, hipertensión y un fracaso hepático que fue finalmente resuelto. Un paciente falleció (3,3%) a consecuencia de un fallo hepático severo que no pudo ser revertido. La tasa de respuesta (TR) a los 3 meses fue del 75%, bajando un 10% al medio año. Además, los niveles de antígeno carcinoembriogénico (CEA) descendieron a la mitad a los 3 meses, manteniéndose estables a los 6 meses<sup>84</sup>.



El estudio clínico en fase II publicado por Iezzi et al. en 2015<sup>85</sup> tubo unos resultados similares al de Martin et al. de 2009. Se realizaron 54 procedimientos de QETA-f con DEBIRI™ en 20 pacientes no respondedores a dos o más tratamientos quimioterápicos previos (con una media de 3 procedimientos por paciente ( rango de 2-4)). La mayoría de los efectos adversos que se registraron fueron de bajo grado (leucopenia, anemia, dolor intra-procedimental, náuseas, vómitos,...) salvo en dos casos (10%): uno de ellos con diarrea en grado 3-4 y otro con angina vasoespástica aguda. Tras los tratamientos hubo 60% de casos de control general de la enfermedad, con una supervivencia libre de progresión (SLP) de 4 meses y una SG ligeramente superior a los 7 meses.

### **Radioembolización**

La radioembolización (RE) con itrio 90 (Y90) , debido a la agresividad del procedimiento, apenas queda recomendada en la guía de ESMO de 2016<sup>86</sup>, relegándose su uso a pacientes con MHCCR refractarias a quimioterapia en los que se han descartado otras opciones terapéuticas posibles<sup>87</sup>.

Al contrario que con los procedimientos de QETA (bien con contrastes yodados o con microesferas cargadas de fármacos), para que los procedimientos de RE sean efectivos, el aporte sanguíneo y la perfusión de los implantes tumorales en el hígado debe ser adecuada.

Éstas condiciones se requieren para la generación de radicales libres mediante la ionización de las moléculas de agua presentes en el tejido, lo que provoca un daño irreparable en una o ambas hebras de la doble hélice de DNA, desencadenando la muerte por apoptosis de la célula. Además, para que la terapia sea óptima, la superficie tumoral debe estar bien y uniformemente cubierta de microesferas radioactivas, para evitar los *cold-spots* o zonas de baja radiación<sup>88</sup>.

Damm et. al en 2016 estudiaron un total de 176 RE sobre 106 pacientes con MHCCR, una media de 2 RE por paciente (rango 1-5), con un total de 12 complicaciones graves en 11 pacientes: úlcera gástrica, derrame pleural, colecistitis, ascitis refractaria o fallo

hepático inducido por la radiación. La mediana de la SLP fue de 3,5 meses y de 6,7 meses para al SG. Aunque no hubo mortalidad asociada directamente a la RE, todos los pacientes fallecieron durante el periodo de seguimiento, con una supervivencia media de 6 meses (rango 1-48 meses) (Figura 17)<sup>87</sup>.

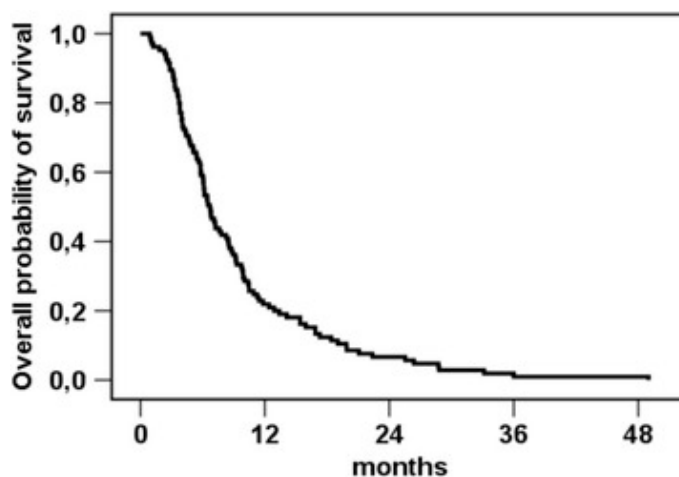


Figura 17. Supervivencia tras la primera sesión de RE. (Damm et al. 2016)

## B. Terapias sistémicas

Para aquellos pacientes que presentan metástasis generalizadas o bien que por las metástasis existentes al momento del diagnóstico no se consideran aptos para resección quirúrgica, la terapia sistémica es el tratamiento de elección<sup>89,90</sup>. Éstos incluyen agentes quimioterápicos como fluoropirimidinas, irinotecan u oxaliplatino o terapias biológicas con anticuerpos monoclonales como

### 1. Quimioterapia

Desde los años 50 hasta principio de los 80, la terapia sistémica indicada para CCR metastásico era el 5-fluorouracilo (5-FU); si bien la TR, según una revisión realizada por Thirion en 2004 en base a 6 ensayos clínicos, apenas alcanzaba el 11% (rango 10-15%) con una SG media de 11 meses<sup>91,92</sup>.

El 5-FU es un fármaco antineoplásico con acción antimetabolitos, ya que interfiere en procesos biosintéticos o se incorpora en macromoléculas esenciales como el DNA o RNA (Figura 18), lo que impide su normal funcionamiento, así como de la inhibición del enzima timidilato sintasa (ETS), requiriendo altas concentraciones intracelulares de folato, siendo un cofactor necesario para su normal funcionamiento<sup>93-95</sup>.

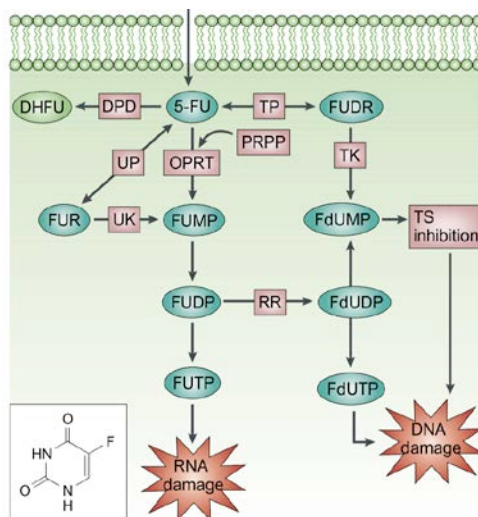


Figura 18. Metabolismo del 5-FU. (Longley, Harkin & Johnston, 2003).

A partir de la década de los 80, el 5-FU comenzó a administrarse combinado con folato (Leucovorina (LV)) (5-FU/LV) como tratamiento de primera línea contra MHCCR. Éste cóctel de fármacos consiguió que la TR mejorase hasta el 21% (rango 19-25%)<sup>91,96</sup>.

Actualmente los regímenes terapéuticos que se emplean en clínica combinan 3 o más agentes quimioterápicos: FOLFOX (Folato-Fluorouracilo-Oxaliplatino) o FOLFIRI (Folato-Fluorouracilo-Irinotecan), por ejemplo.

El trabajo de Saltz et al. llevado a cabo con 631 pacientes demostró que el tratamiento combinado FOLFIRI, al compararlo con 5-FU/LV, incrementaba la SLP (mediana de 7 meses vs. 4,3 meses,  $p < 0,01$ ), la TR (mediana de 39% vs. 21%,  $p < 0,001$ ) y la SG (mediana de 14,8 vs. 12,6 meses,  $p < 0,05$ ), todo ello sin pérdida de calidad de vida para los pacientes<sup>97</sup>. Sin embargo, si la terapia FOLFIRI se emplea como quimioterapia adyuvante tras RH, el ensayo clínico en fase III de Ychou et al. concluyó que no había

diferencias significativas en la SLP y la SG, al compararlo con una quimioterapia adyuvante de 5-FU/LV<sup>98</sup>. Empleado como terapia neoadyuvante, el tratamiento FOLFIRI permitió que el 33% de los paciente con MHCCR no resecables fueran aptos para cirugía<sup>99</sup>.

El régimen de tratamiento FOLFOX difiere en el empleo de oxaliplatino en lugar de irinotecan. El oxaliplatino es un alquilante que previene la replicación y la transcripción del DNA al crear puentes cruzados entre las bases, y como consecuencia bloquea la división celular. Goldberg et al. llevaron a cabo un estudio en 795 pacientes y concluyeron que los datos relativos a la SLP, la SG y la TR son significativamente mejores empleando el tratamiento FOLFOX que con el FOLFIRI. La SLP fue de 9,3 meses con el régimen FOLFOX, 7 meses con el FOLFIRI; la SG también fue mayor, 19,5 meses vs. 15 meses respectivamente; y la TR fue casi 1,5 veces superior con el FOLFOX respecto al FOLFIRI (45% vs 31%, respectivamente). Sin embargo, sólo el 24% de los pacientes tratados con FOLFIRI requirieron del empleo de quimioterápicos de segunda línea, frente al 60% de los tratados con FOLFOX. Además otro dato significativo es que, en el 67% de los casos del tratamiento FOLFIRI hubo que suspenderlo debido a la progresión tumoral o a la muerte del paciente, frente al 42% en el caso del FOLFOX<sup>100</sup>.

## *2. Terapias biológicas*

Los fármacos, o cócteles de ellos, descritos anteriormente han demostrado una buena respuesta en el tratamiento de las MHCCR pero, a pesar de ello, no poseen especificidad por las células tumorales, por lo que en mayor o menor medida, también afectan a células sanas del organismo. Es por ello que se investigan y se han desarrollado terapias más específicas basadas en “compuesto biológicos”. En gran medida, este desarrollo ha sido posible gracias al mayor y mejor conocimiento que se tiene hoy día sobre las rutas moleculares implicadas en el desarrollo y crecimiento de tumores, y en el caso que nos ocupa del CCR y de las MHCCR.

Éstos “agentes o tratamientos biológicos” están centrados o van dirigidos contra factores de crecimiento (FC), receptores de factores de crecimiento (rFC) o antígenos específicos/selectivos tumorales (AT).

La primera de éstas estrategias o tratamientos dirigidos que mostró beneficios en el tratamiento del CRC metastásico fue el Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal recombinante tipo Ig1 dirigido contra el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Esta terapia es ampliamente usada con las MHCCR en combinación con algunos de los citotóxicos anteriormente descritos, con buenas TR, SLP y SG, tal y como demuestran diversos ensayos clínicos realizados<sup>101-103</sup>.

Hurwitz et al. en 2004 realizó, sobre un total de 813 pacientes, un estudio aleatorizado comparando dos grupos de tratamientos: FOLFIRI más Bevacizumab (FOLFIRI-BV) y FOLFIRI más placebo. La SG media fue de 20,3 meses en el grupo FOLFIRI-BV, frente a 15,6 meses del grupo FOLFIRI; también halló diferencias significativas en la SLP (10,6 vs. 6,2, respectivamente; Figura 19).

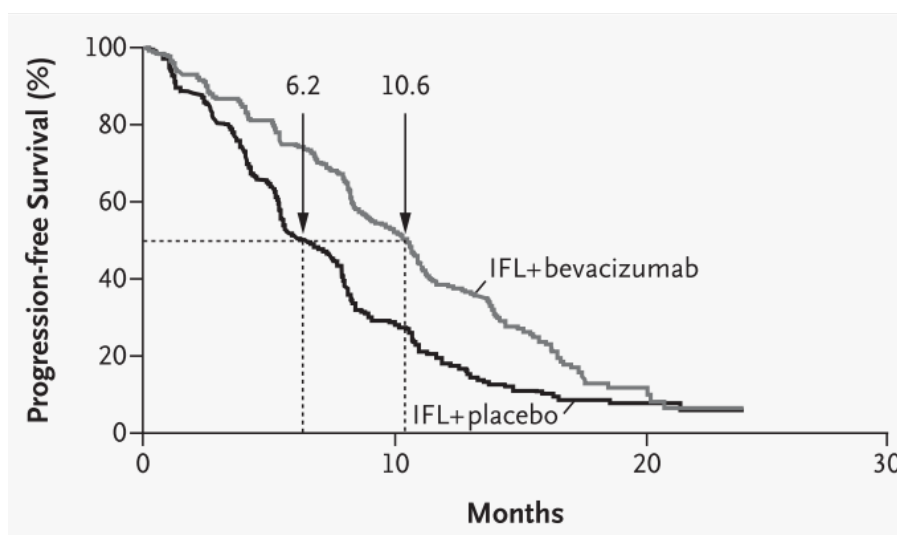


Figura 19. Supervivencia libre de progresión (SLP) media y a lo largo del tiempo de los grupos FOLFIRI (línea negra) y FOLFIRI-BV (línea gris). Hurwitz et al., 2004.

Kabbinavar et al. en 2005 también publicaron un estudio similar en el que se comparaba si la adición de Bevacizumab al tratamiento con 5-FU/LV (5-FU/LV/BV) reportaba beneficios en los pacientes con MHCCR. La SG media mejoró significativamente con el cóctel de 5-FU/LV/BV (17,9 vs. 14,6 meses, respectivamente). Efecto similar tuvo sobre la SLP, que presentó un incremento de tres meses en el grupo 5-FU/LV/BV (8,8 vs. 5,6 meses), y sobre la TR, dónde la adición de Bevacizumab supuso un incremento del 10% (34,1% vs. 24,5%,  $p < 0,05$ )<sup>101</sup>.

Saltz et al. en 2008 también llevaron a cabo un estudio con iguales regímenes terapéuticos que el estudio de Kabbinavar, obteniendo resultados similares<sup>103</sup>.

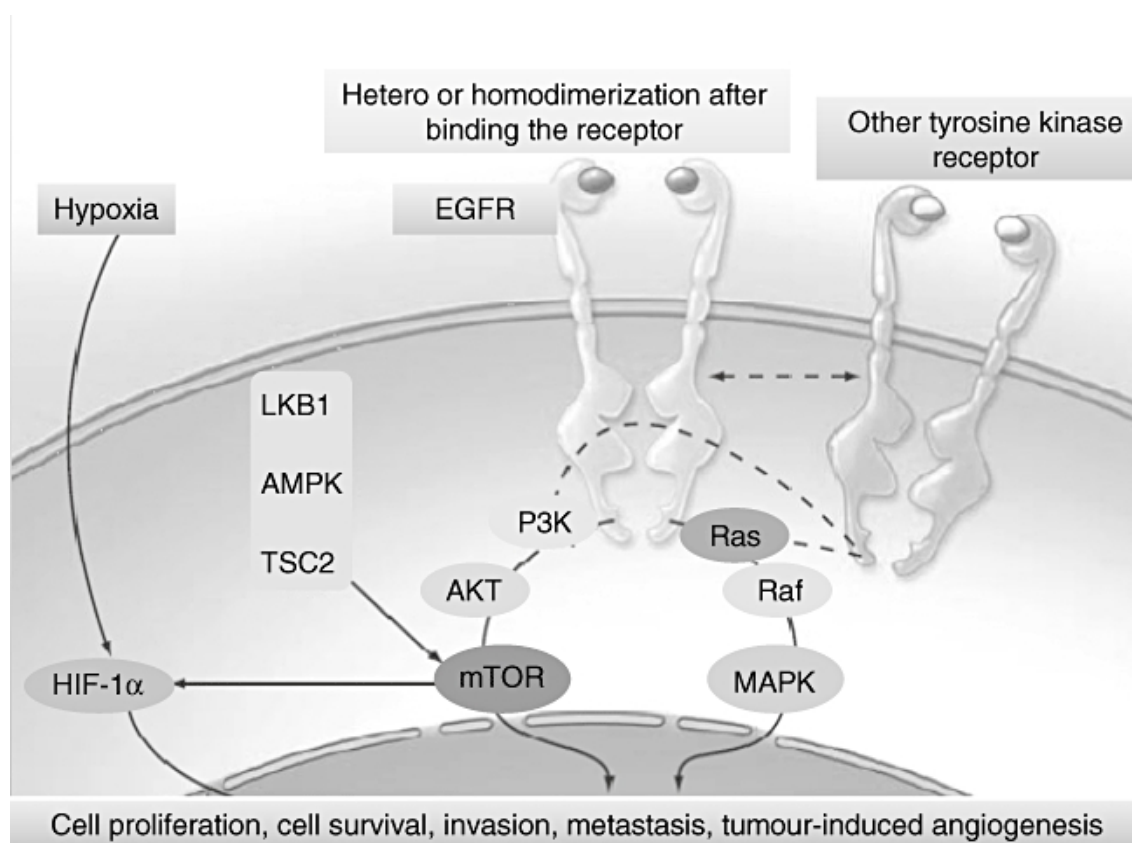


Figura 20. Ruta de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr) (Martinelli, De Palma, Orditura, De Vita & Ciardiello, 2009)

La segunda de las rutas de señalización sobre las que se actúa es la del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr) (Figura 20), que ha sido ampliamente

---

estudiada durante los últimos 10-15 años. Ya en la década de los 90 se conocía que entre el 27-77% de los casos de CRC presentaban niveles elevados de EGFr, determinados mediante Western Blot con anticuerpos anti-EGFr o por inmunocitoquímica<sup>104</sup>, y más del 85% de los pacientes con metástasis debidas a CCR también presentaban sobreexpresión de EGFr<sup>105,106</sup>.

El EGFr es un receptor celular transmembrana con actividad tirosina quinasa (TK), que tiene un papel crucial en el control en las rutas de transducción celular que modulan la proliferación, supervivencia, adhesión, migración y diferenciación celular. Debido al papel que desempeña en tan importantes funciones, su mal funcionamiento o mutación o el de los miembros de ésta cascada de señalización, tienen un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de las células tumorales<sup>107,108</sup>.

Las dos clases de inhibidores del EGFr aprobados para el CRC metastásico son los anticuerpos monoclonales (Cetuximab o Panitumimab) que se unen al dominio extracelular del receptor y pequeñas moléculas inhibitoras de la actividad tirosina quinasa<sup>109-111</sup>. El bloqueo de la ruta de señalización del EGFr resulta en inhibición de las metástasis, crecimiento, proliferación, diferenciación y angiogénesis, lo que provoca la apoptosis de las células tumorales<sup>109</sup>.

Tanto el Cetuximab como el Panitumimab se emplean solos o en combinación con otros fármacos ya descritos como el irinotecan. En algunos estudios clínicos en fase II, la monoterapia con Cetuximab está asociada a TR entre el 9-12%, que alcanzan el 20% cuando el Cetuximab se combina con irinotecan en pacientes no respondedores a monoterapia con irinotecan<sup>112,113</sup>.

En la misma línea, el ensayo clínico en fase III PRIME, demostró que la combinación de Panitumimab y FOLFOX (Panitumimab-FOLFOX) incrementó significativamente la SLP respecto al régimen de FOLFOX (9,6 vs. 8 meses, respectivamente), pero sólo en aquellos pacientes que presentasen el genotipo salvaje del gen KRAS. Ambos grupos de tratamiento presentaron una tasa de muerte o progresión de la enfermedad similar (61% en Panitumimab-FOLFOX y 65% en FOLFOX). Los pacientes que presentaban dicho

gen mutado y fueron tratados con Panitumimab-FOLFOX, no sólo no presentaban una mayor SLP, sino que era significativamente menor a la monoterapia con FOLFOX (7,3 vs. 8,8 meses, respectivamente); tampoco hubo diferencias significativas en la tasa de muerte o progresión de la enfermedad: 76% en el grupo Panitumimab-FOLFOX y 72% en el grupo FOLFOX. Pese a las diferencias existentes en la SLP en todos los casos, la SG no resultó en diferencias significativas entre los tratamientos<sup>114</sup>.

Además de la combinación de distintos regímenes de quimioterápicos descritos hasta ahora, cada vez viene siendo mas habitual en la práctica clínica combinar tratamientos físicos, como puede ser la ARF, con quimioterapia. Por ejemplo, en un reciente estudio de este mismo año, Ruers et al. estudió la SG en pacientes como múltiples MHCCR (n<10) tratados con un tratamiento combinado de ARF y quimioterapia sistémica (ARF+FOLFOX), frente a los tratados únicamente con quimioterapia (FOLFOX). Observó que había significación estadística en la TS a los 3, 5 y 8 años entre pacientes tratados con ARF+FOLFOX frente a FOLFOX sola (56,9%, 43,1% y 35,9% vs. 55,2%, 30,3% y 8,9%, respectivamente), así como en la SG, 45.6 meses vs. 40,5 meses, respectivamente<sup>115</sup>.



## Nanopartículas magnéticas en el tratamiento del cáncer

La nanociencia es la ciencia que estudia los objetos de menor escala, desde unos pocos a los 100 nm (milmillonésima parte de metro,  $10^{-9}$  m) (Figura 21). La nanociencia tiene muchas aplicaciones en disciplinas científicas tan diversas entre sí como la química, la física, la ingeniería de tejidos, la farmacología, ..., así como en otros campos como la industria alimenticia<sup>116-118</sup>.

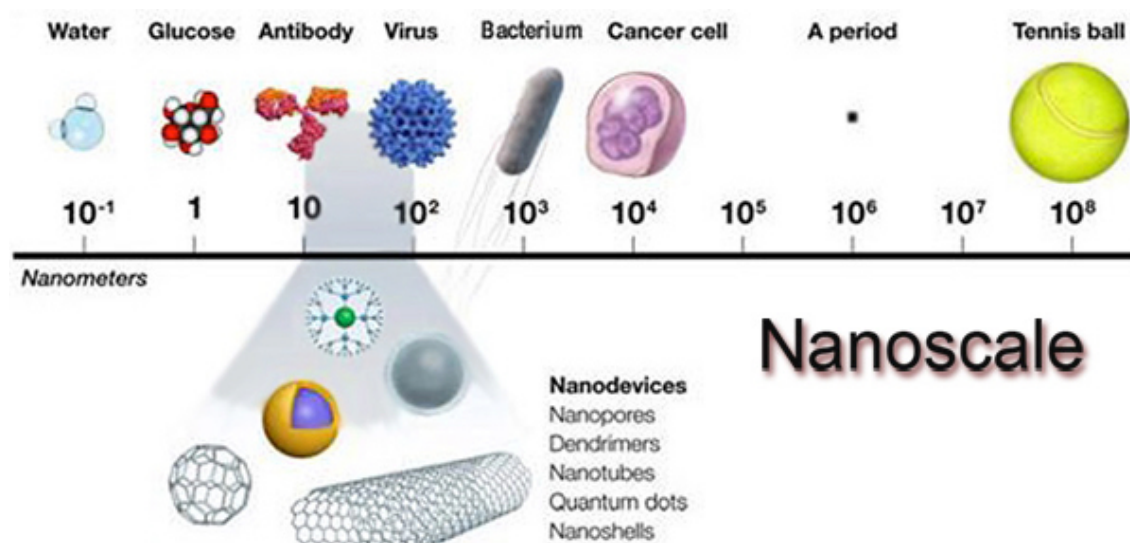


Figura 21. Comparación gráfica del tamaño y escala de distintos elementos biológicos de tamaño conocido. <http://introtonanotechnology.weebly.com/the-nanoscale.html> (acceso 23 de agosto de 2017).

El concepto de nanomedicina, o nanociencia aplicada en medicina, apareció por primera vez a finales de la década de 1960 en la *Ecole Polytechnique Fédérale* en Zúrich. Hoy día, éste término se aplica al uso de compuestos o sistemas sintéticos de tamaño nanométrico, diseñados exclusiva e intencionadamente con fines médicos; por tanto, la nanomedicina no está considerada como una rama de la medicina, sino como una herramienta o aplicación de la nanotecnología o nanociencia en la medicina<sup>119</sup>.

En el ámbito de la medicina o la farmacología, el empleo de la nanociencia ha ido encaminado, principalmente, al diseño de nanofármacos o nanocompuestos empleados como *carriers* o transportadores.

La nanotecnología no se queda sólo en esto, sino que también, trabajos recientes describen el uso de nanopartículas (NPs) con elevado número atómico (plata, lantánidos o más comúnmente oro) como potenciadores o amplificadores de terapias basadas en radiaciones ionizantes sobre las células tumorales (Figura 22)<sup>120-122</sup>.

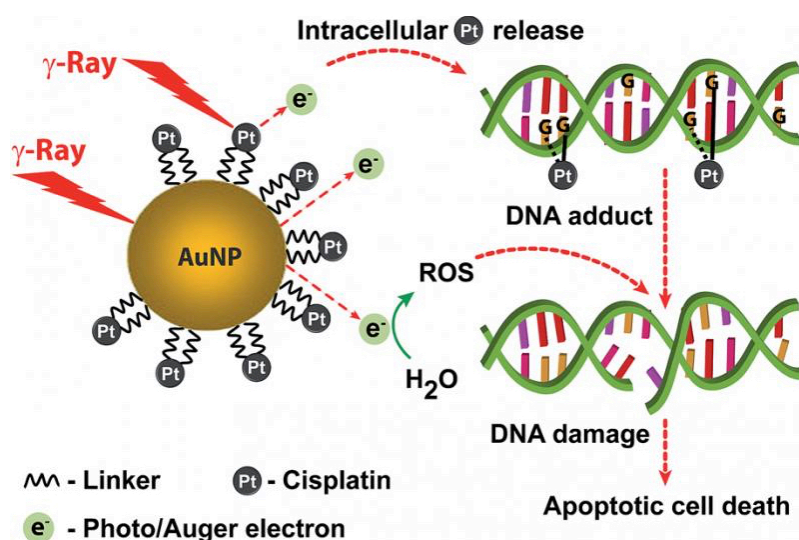


Figura 22. Modo de acción de la terapia mediante radiación ionizante con NPs. <http://www.cam.ac.uk/> (acceso 22 de agosto de 2017).

Además de los tratamientos mediante radiación ionizante, la nanotecnología también puede ayudar a incrementar el potencial terapéutico de otras terapias, como la hipertermia local (HT). La combinación de ambas se basa en la premisa de que al exponer el tejido tumoral infundido con nanopartículas magnéticas (NpM) a un campo magnético, las NpM se convertirán en fuentes locales de calor moderado (41-46° C) con potencial de destruir el tejido tumoral adyacente.

Esta HT ocasiona estrés celular lo que desencadena la activación de diversos procesos extra e intracelulares que conducen a la desnaturalización proteica, incorrecto plegamiento de las mismas, agregación o entrecruzamiento erróneo de las hebras de DNA<sup>123</sup>. Esto acaba generando la muerte celular por apoptosis, a diferencia de otras terapias térmicas como la ARF, que genera temperaturas superiores a los 46 °C y, por tanto, induce necrosis, carbonización o coagulación del tejido<sup>49</sup>. A nivel tisular, la HT

ocasiona cambios en los niveles de pH, en la perfusión y oxigenación del microambiente tumoral, y por tanto del propio tumor<sup>124</sup>.

Los primeros estudios sobre la aplicación de terapias de HT antitumoral mediada por NpM datan de 1957, cuando Gilchrist et al. trataban de encontrar una nueva terapia para la destrucción de las metástasis que quedaban en los nódulos linfáticos tras la extirpación de tumores primarios de CRC. Sus experimentos, realizados en perros, demostraron que tras la administración de 5 mg  $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{g}$  de tejido, los nódulos linfáticos infundidos presentaban un gradiente diferencial de temperatura respecto al resto de tejido<sup>125</sup>.

## A. Tipos de nanopartículas

Las NpM empleadas con fines biomédicos podemos clasificarlas, a grandes rasgos según su composición, en 3 grupos: magnéticas (NpM), metálicas (NpMt) y bimetálicas (NpBM)

### 1. *Nanopartículas magnéticas*

Las NpM son las más ampliamente usadas en investigación contra el cáncer, más concretamente las NpM de magnetita u óxido de hierro (III) ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Su uso generalizado se debe a sus interesantes características como la estabilidad química, baja toxicidad biológica, alta biocompatibilidad, alta susceptibilidad magnética,...<sup>126</sup>. Sin embargo, estas NpM tienen tendencia a oxidarse y a agregarse, por lo que se hace necesario su recubrimiento con polímeros<sup>127-130</sup>, compuestos cerámicos<sup>131</sup> u otros metales<sup>132</sup>.

### 2. *Nanopartículas metálicas*

Las NpMt se empezaron a usar con fines biomédicos a principios de la década de 1970, cuando Faulk y Taylor describieron el uso de NPs de oro como método de inmunomarcaje<sup>133</sup>. Debido a sus propiedades físicas (fácil funcionalización, alta reactividad, elevado ratio superficie/volumen, gran capacidad de carga,...) son

fácilmente manipulables y ajustables a necesidades concretas<sup>134</sup>. Muchas han sido las disciplinas científicas donde se han comenzado a investigar el uso de las NpMt. Una de las aplicaciones más relevantes es en el campo de diagnóstico médico, donde las NpMt han irrumpido con fuerza ya que, debido a su tamaño nano o micrométrico, son capaces de atravesar barreras biológicas y evitar la detección y eliminación por parte de las células del sistema fagocítico mononuclear (SFM) o sistema retículo-endotelial (SRE)<sup>135</sup>.

Haun y colaboradores emplearon NpMt fluorescentes como método de detección de células tumorales en baja concentración en muestras de sangre periférica<sup>134</sup>; pero también otros estudios apuntan a la posibilidad de usar NpMt con potencial terapéutico, no solo diagnóstico, en el tratamiento del cáncer<sup>136,137</sup> y de enfermedades infecciosas<sup>138,139</sup>.

### *3. Nanopartículas bimetálicas*

Al igual que las NpMt, las NpBM ofrecen un gran potencial de uso como agentes para el tratamiento y diagnóstico de distintas patologías, entre ellas el cáncer. Si bien, éstos sistemas bimetálicos pueden lograr catalizar reacciones que los monometálicos son incapaces, debido a que los distintos metales que las componen pueden tener una función particular en la reacción general que origina el sistema<sup>140</sup>.

Estudios recientes como el de Ahmed y colaboradores demuestran que las NpBM de Au-Ag tienen un potencial efecto radiosensibilizador sobre los tejidos tumorales con dosis relativamente bajas de radiación, además de tener una buena biocompatibilidad y una casi nula toxicidad<sup>141</sup>.

También Ghosh y colaboradores obtuvieron buenos resultados al emplear NpBM de Pt-Pd. Comprobaron que, tras exponer células HeLa a NpBM Pt-Pd, éstas provocan una mayor tasa de muerte celular que el empleo de compuestos monometálicos de Pt o Pd (74,25% vs. 12,6% Vs. 33,15%, respectivamente), mostrando un buen comportamiento antitumoral. Así mismo, también observaron que las NpBM Pt-Pd mejoraba la

eliminación del óxido nítrico (NO), y los radicales superóxido ( $O_2^-$ ), 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) e hidroxilo (OH) <sup>142</sup>.

## B. Síntesis, recubrimiento y funcionalización de NpM de óxido de hierro ( $Fe_3O_4$ )

En la literatura son múltiples los métodos descritos para la síntesis de NpM de óxido de hierro (III). Ésta debe hacerse con un elevado control del tamaño, la forma, la composición, la dispersión, la biocompatibilidad y las propiedades magnéticas.

Según su naturaleza, los métodos de síntesis se clasifican o agrupan en métodos químicos, físicos o biológicos <sup>143,144</sup>. La síntesis de NpM mediante métodos físicos presenta el inconveniente de la incapacidad para controlar el tamaño de las NpM con precisión nanométrica <sup>145</sup>. Los métodos químicos son sencillos, replicables y con un mayor control en el tamaño y composición de las NpM, siendo uno de los más ampliamente utilizados (también en la elaboración de las NpM empleadas en este trabajo de Tesis Doctoral) <sup>146</sup>. Por último, los métodos biológicos para la síntesis de NpM se valen de microorganismos para su fabricación <sup>147</sup>.

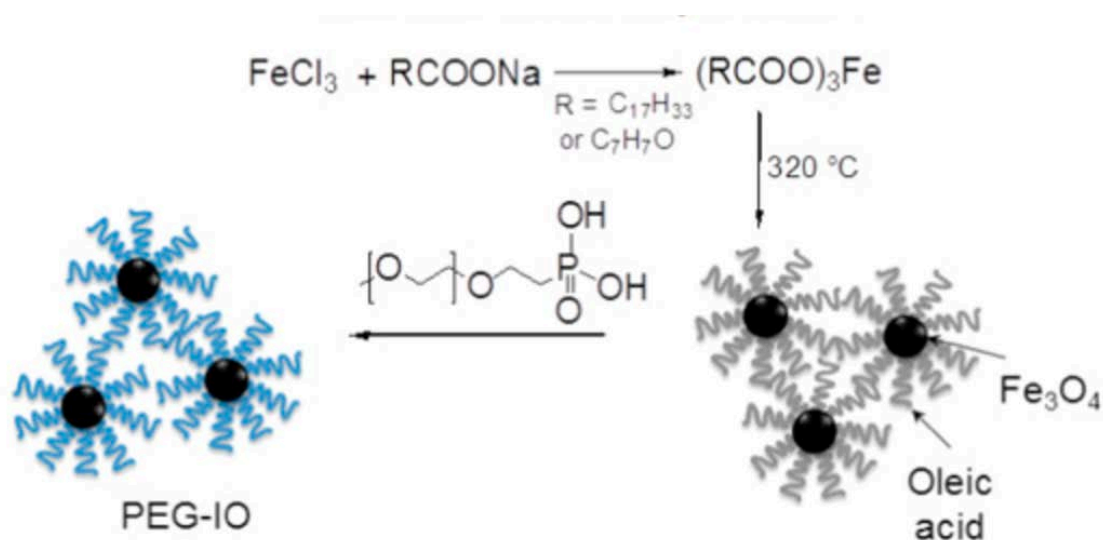


Figura 23. Esquema de la síntesis de NpM mediante el método de descomposición térmica. Patsula et al. 2016.

La descomposición térmica de precursores metal-orgánicos (Figura 23) fue el método seguido para la síntesis de NpM de óxido de hierro empleados en este Trabajo. Entre las ventajas cabe destacar que durante la síntesis, éste método, permite un control preciso del tamaño de las NpM; sin embargo, presenta la gran desventaja de la baja cantidad de producto final que se obtiene tras todo el proceso de síntesis y, además, el producto obtenido generalmente solo es soluble en solventes apolares<sup>148</sup>.

Los precursores metal-orgánicos empleados en la descomposición térmica incluyen acetilacetonatos metálicos (de Fe, Mn, Co, Ni o Cr), cupferronatos metálicos o carbonilos<sup>149-151</sup>; además de usarse surfactantes como el ácido oleico o la hexadecilamina. La proporción en la que se mezclan estos reactivos, precursores metal-orgánicos, surfactantes y solventes, es crucial para el control del tamaño y la forma de las NpM, al igual que la temperatura, el tiempo total de la reacción y el momento en el que se adicionan cada una de las sustancias.

Tabla 1. Polímeros o moléculas habitualmente empleadas para el recubrimiento de las NpM con fines biomédicos. Gupta & Gupta, 2005)

| Polymers/molecules                                | Advantages   |
|---|--|
| Polyethylene glycol (PEG)                         | Non-covalent immobilization of PEG on the surface improves the biocompatibility, blood circulation time and internalization efficiency of the nanoparticles  |
| Dextran   | Enhances the blood circulation time, stabilizes the colloidal solution   |
| Polyvinylpyrrolidone (PVP)                        | Enhances the blood circulation time and stabilizes the colloidal solution  |
| Fatty acids                                       | Colloidal stability, terminal functional carboxyl groups   |
| Polyvinyl alcohol (PVA)                           | Prevents coagulation of particles, giving rise to monodisperse particles   |
| Polyacrylic acid                                  | Increase the stability and biocompatibility of the particles and also helps in bioadhesion   |
| Polypeptides                                      | Good for cell biology, e.g. targeting to cell  |
| Phosphorylcholine                                 | Poorly complement and coagulation activating, colloidal solution stabilizer  |
| Poly (D, L- lactide)                              | Biocompatible, low cytotoxicity  |
| Poly( <i>N</i> -isopropylacrylamide) (PolyNIPAAm) | Thermosensitive drug delivery and cell separation  |
| Chitosan  | A natural cationic linear polymer that is widely used as non-viral gene delivery system, biocompatible, hydrophilic, used in agriculture, food, medicine, biotechnology, textiles, polymers, and water treatment |
| Gelatin   | Used as a gelling agent, emulsifier hydrophilic, biocompatible, natural polymer  |

Como ya se ha mencionado antes, éste método de síntesis genera NpM que no son hidrosolubles, lo cual hace que no sean aptas para administrarse en medios fisiológicos, como puede ser el torrente sanguíneo. Para que esto sea posible, se hace necesario el

---

recubrimiento con ligandos (Tabla 1) que las convierta en partículas hidrofílicas, compatibles con medios y condiciones fisiológicas y funcionalizables<sup>152,153</sup>.

Este recubrimiento para dotarlas de biocompatibilidad, no debe afectar, o hacerlo lo más mínimamente posible, a sus propiedades magnéticas, tamaño y/o forma. Además, la forma en la que se haga, también tendrá consecuencias en la cinética y distribución de las NpM en el organismo<sup>154</sup>. Por todo esto, la elección del compuesto para su recubrimiento debe hacerse con sumo cuidado, valorando sus ventajas e inconvenientes según su destino final (Tabla 2).

Además del recubrimiento para dotar de un comportamiento o carácter hidrofóbico a las NpM, se suelen o pueden emplear moléculas biológicas como anticuerpos, ligandos, proteínas,... para conferir a las NpM de una especificidad mayor. Normalmente, para unir estos ligandos específicos al recubrimiento externo hidrofóbico de la NpM se emplean moléculas intermedias, llamada *linker*, como EDCI<sup>1</sup>, SPDP<sup>2</sup>, NHS<sup>3</sup> o MBA<sup>4</sup>  
155–157.

En el caso concreto de esta Tesis Doctoral, las NpM tendrán como finalidad la inducción de HT antitumoral selectiva en metástasis hepática, tras ser expuestas a un campo magnético alterno. Se ha comprobado que, durante el desarrollo de las metástasis, un factor clave es el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos que surtan de sangre al tumor, fenómeno que se conoce como angiogénesis tumoral, siendo las integrinas familia de moléculas clave en este proceso<sup>158,159</sup>.

Se conocen muchas moléculas que forman parte de esta superfamilia, pero se ha observado que una en concreto, la integrina  $\alpha_v\beta_3$  tiene un papel relevante y se encuentra sobre-expresada en etapas claves de la enfermedad tumoral como son el crecimiento y

---

<sup>1</sup> 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

<sup>2</sup> N-succinimidil-3-(2-piridil-ditio)-propionato

<sup>3</sup> N-hidroxisuccinimida

<sup>4</sup> N, N'-metilenbis(acrilamida)

la invasión tumoral y la aparición y desarrollo de metástasis<sup>160</sup>. Esto hace que sea una molécula muy interesante para ser usada como diana en el tratamiento de las metástasis.

Tabla 2. Biomoléculas habitualmente empleadas para la funcionalización de NpM con fines biomédicos. Gupta & Gupta, 2005.

| Protein/ligand  | Functional activity  |
|---|--|
| Transferrin   | Widely applied as a targeting ligand in the active targeting of anticancer agents, proteins and genes to primary proliferating cells via transferrin receptors                           |
| Lactoferrin   | Structurally similar to transferrin, acts as an anti-infective agent, a modulator of the inflammatory response and iron absorption and an immuno-regulatory protein                      |
| Transforming growth factor- $\alpha$ (TGF- $\alpha$ ) | Promotes proliferation and differentiation of cells and may be important for normal wound healing  |
| Insulin   | A hormone that regulates blood glucose levels, is a small protein  |
| Nerve growth factor (NGF)                             | Promotes neurite outgrowth and neural cell survival  |
| Ceruloplasmin   | Principal carrier of copper in plasma, which plays an important role in iron homeostasis and is also an effective anti-oxidant for a variety of free radicals                            |
| Pullulan  | High water solubility, no toxicity, usefulness as a plasma expander, non-immunogenic, non-antigenic properties. Also, evidences for receptor-mediated hepatic uptake of pullulan in rats |
| Elastin   | A cross-linked protein in the extracellular matrix that provides elasticity for many tissues   |
| Albumin   | The major serum protein, binds a wide variety of lipophilic compounds including steroids etc   |
| Tat-peptide   | Membrane-permeating peptide, enhances intracellular delivery   |
| RGD peptide   | Increases cell spreading, differentiation, and enhances DNA synthesis  |
| Folic acid  | Preferentially target cancer cells, poorly immunogenic, folate receptor facilitates internalization of particles   |

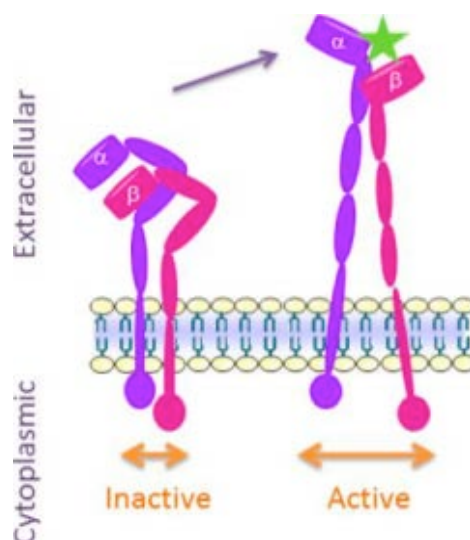


Figura 24. Cambio conformacional sufrido por la integrina  $\alpha_v\beta_3$ , tras lo cual se expone el dominio de unión a la secuencia RGD (estrella). Danhier et al., 2012.



A día de hoy hay múltiples ligandos, como péptidos, anticuerpos o RNA interferente (RNAi), que pueden ser dirigidos contra estas integrinas. La secuencia peptídica tipo RGD (Arginina-Glicina-Ácido Aspártico) es una de las que son reconocidas por el dominio extracelular de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  (Figura 24)<sup>161</sup>.

Por lo tanto, la unión de NpM con péptidos o peptidomiméticos con la secuencia RGD (NpM-RGD) permite un depósito más selectivo de las NpM alrededor del tumor, al unirse el conjunto NpM-RGD a las células endoteliales neoformadas de los vasos tumorales y/o a las propias células tumorales<sup>162</sup>.

### C. Tamaño, forma y propiedades magnéticas

Un aspecto crucial para que las NpM puedan ser utilizadas en una terapia de HT magnética antitumoral son sus propiedades y comportamiento magnético, consecuencia directa del tamaño y la forma de las NpM<sup>163</sup>.

#### 1. *Tamaño*

En términos generales, las NpM de óxido de hierro tienen un comportamiento superparamagnético, a temperatura ambiente, cuando su diámetro es inferior a 20 nm<sup>164,165</sup>.

Chatterjee et al. estudiaron la temperatura de bloqueo ( $T_b$ ) en NpM con diferente tamaño. La  $T_b$  es aquella a partir de la cual las partículas magnéticas adquieren su comportamiento superparamagnético, es decir, por debajo de ella, las NpM tiene un dominio sencillo estable. Vieron que la relación entre el tamaño y la  $T_b$  es directamente proporcional; por tanto NPs con menor tamaño tiene una  $T_b$  menor<sup>166</sup>.

Adicionalmente, el trabajo de Jun et al. también corrobora la importancia del tamaño de la NpM en su comportamiento magnético. Estudiaron el efecto del tamaño en la señal de resonancia magnética (SRM) de NpM de  $Fe_3O_4$  con fines de diagnóstico médico. Concluyeron que el tamaño de las NpM tenía una relación inversamente proporcional con la SRM de las mismas, al incrementar el tamaño la SRM disminuye (Figura 25)<sup>167</sup>.

Esta misma hipótesis sobre la importancia del tamaño de las NpM empleadas como terapia antitumoral se encuentra en el trabajo de Motoyama y colaboradores. En 2008 publicaron un trabajo en el que estudiaron, entre otros parámetros, la tasa de absorción específica (SAR) de nanopartículas de diferente tamaño y ratio superficie/volumen. Concluyeron que aquellas NpM con menor tamaño y ratio superficie/volumen, presentaban un mejor comportamiento magnético y presentaban por tanto un SAR más elevado tras ser expuestas a un campo magnético alterno generado por un inductor externo de radiofrecuencias<sup>168</sup>.

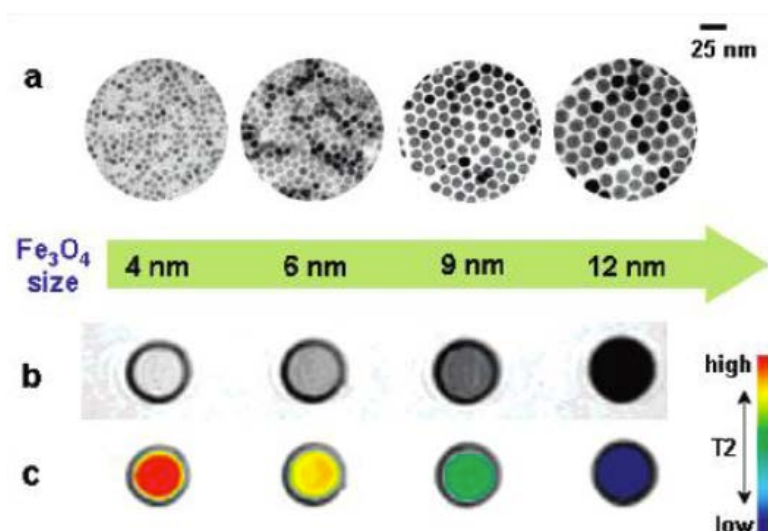


Figura 25. Efecto del tamaño de las NpM sobre el magnetismo y la señal de resonancia magnética. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de NpM de 4, 6, 9 y 12 nm de diámetro (A). SRM de las NpM obtenida en la secuencia T2 a 1,5T (B). Escala a color de la SRM obtenida a partir los valores obtenidos en la secuencia T2. Jun et al., 2005,

## 2. Forma

Como hemos comentado anteriormente, la forma de los compuestos sintetizados es otro parámetro que parece importante y determina las propiedades magnéticas de las NpM.

Zhen et al. constataron que, a igual volumen, las NpM de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> de forma cúbica tienen una mayor magnetización comparado con NpM de forma esférica (40 vs. 31 emu/g);

---

pero las NpM esféricas presentaban una  $T_b$  40 grados Kelvin (K) mayor que las cúbicas (100 vs. 60 K)<sup>169</sup>.

Noh et al. en su trabajo dieron una explicación a por qué a igualdad de volumen entre NpM cúbicas y esféricas, las primeras tienen mayor magnetización (165 vs. 145 emu/g). Encontraron, tras realizar simulaciones, que la cantidad de spines desordenados en las esféricas apenas llegaba al 4%, pero en las cúbicas éstos eran el doble, un 8%<sup>170</sup>.

Al contrario, Montferrand et al., también con NpM  $Fe_3O_4$ , vieron que a igualdad de tamaño (12 nm), que no de volumen ( $V_{cúbicas} > V_{esféricas}$ ), la magnetización de las NpM esféricas era el doble que las NpM cúbicas (80 v. 40 emu/g)<sup>171</sup>.

Sin embargo, hay mucha controversia al respecto y otros autores no tienen tan claro que haya una particular influencia de la forma en el SAR, la magnetización o en la  $T_b$ . El trabajo con NpM  $\gamma-Fe_2O_3$  de Salazar-Álvarez et al. en 2008 describieron una magnetización idéntica, 75 emu/g, para NpM cúbicas y esféricas a igualdad de volumen y distinto tamaño (12 nm de lado y 14,5 nm de diámetro, respectivamente), si bien la  $T_b$  de las NpM esféricas era 1,23 veces superior a la  $T_b$  de las NpM cúbicas (235 K s. 190 K, respectivamente). Sugirieron que ésta mayor  $T_b$  es debida al papel desempeñado por la morfología de las NPs sobre la anisotropía superficial efectiva de las muestras y la pequeña anisotropía intrínseca<sup>172</sup>.

Song et al., con NpM de  $CoFe_2O_4$ , también establecieron que tanto la magnetización como la  $T_b$  de NpM cúbicas y esféricas de igual volumen era la misma, 80 emu/g y 275 K<sup>173</sup>.

## D. Vías de administración

Otro aspecto que genera gran controversia en la aplicación de un terapia de HT antitumoral selectiva mediada por NpM-RGD es la vía de administración.

Si bien depende del modelo tumoral que se estudie, en general, la literatura revisada plantea dos rutas de administración/infusión de NpM para una terapia HT magnética (HTM): punción directa en el tejido tumoral y administración endovascular (vía arterial o venosa).

### 1. Punción directa

De las dos vías de administración, la punción directa es la más sencilla, ya que consiste, únicamente, en la inyección de las NPs en el interior del tumor, puncionándolo directamente sin necesidad de un abordaje quirúrgico complicado.

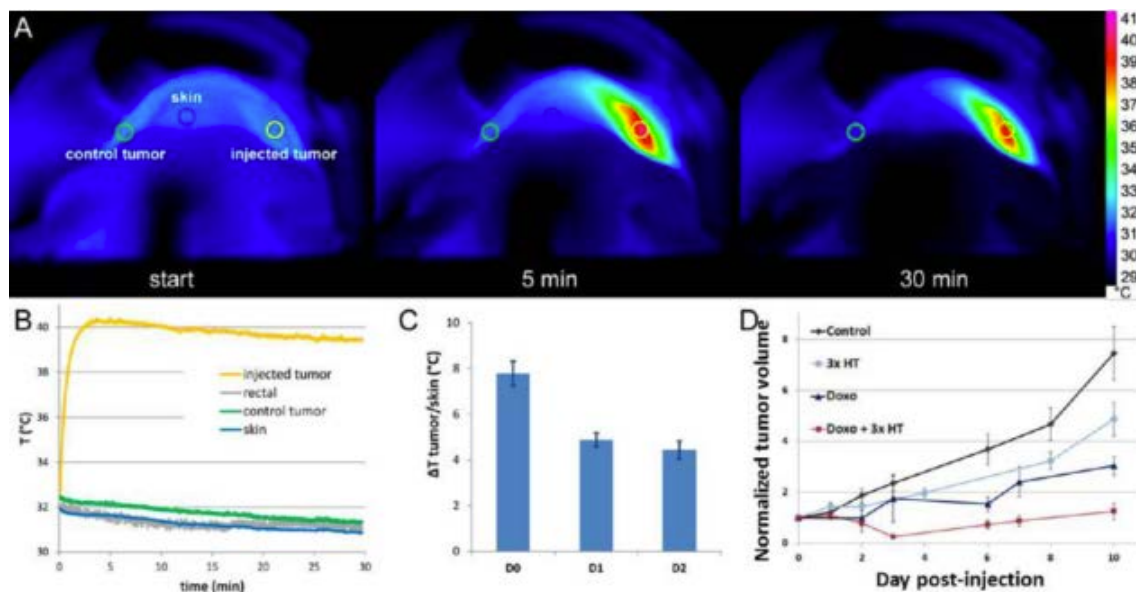


Figura 26. Efectos de la HTM mediada por NpM . Imágenes de termogramas mediante infrarrojos tomadas durante el primer ciclo de HTM: antes, tras 5 y 30 minutos de exposición (A). Registro térmico de las temperaturas medidas en el tumor con NpM, recto, tumor sin NpM y la piel (B). Incrementos térmicos del tumor inyectado con nanocubos, respecto a la piel, tumor control contralateral o recto (C). Evolución del crecimiento tumoral en los distintos grupos experimentales según el tratamiento: control, doxorubicina, 3 sesiones consecutivas de HTM y doxorubicina + 3 sesiones consecutivas de HTM (D). Kolosnjaj-Tabi et al., 2014

En un modelo de carcinoma epidermoide humano de la línea celular A431 con ratones atímicos NMRI, Kolosnjaj-Tabi y colaboradores inyectaron intratumoralmente (i.t.) nanocubos de 19 nm recubiertos con PEG (0,7 mg de Fe por animal) y los expusieron a un campo magnético de 23,8 kA/m y 11 kHz, durante 30 minutos 3 días consecutivos (Figura 26A-B). La temperatura de la superficie tumoral, respecto a la de la piel, al tumor contralateral usado como control o al recto, se incrementó  $7,8 \pm 2,2^\circ \text{C}$  en el primer ciclo de HTM,  $4,9 \pm 1,2^\circ \text{C}$  en el segundo y  $4,5 \pm 1,6^\circ \text{C}$  en el tercero (Figura 26C)<sup>174</sup>.

Estos resultados concuerdan, a pesar de la baja dosis de Fe administrada, con los datos experimentales publicados anteriormente por Attaluri et al., Dutz et al., y Alphandéry et al., todos en 2011.

Attaluri et al. inyectaron 25 mg de NpM esféricas de 10 nm en ratones portadores de tumores protáticos. Lograron elevar la temperatura del tejido tumoral por encima de los  $50^\circ \text{C}$ , al exponerlos a un campo magnético relativamente bajo de  $3 \text{ kA/m}$ <sup>175</sup>.

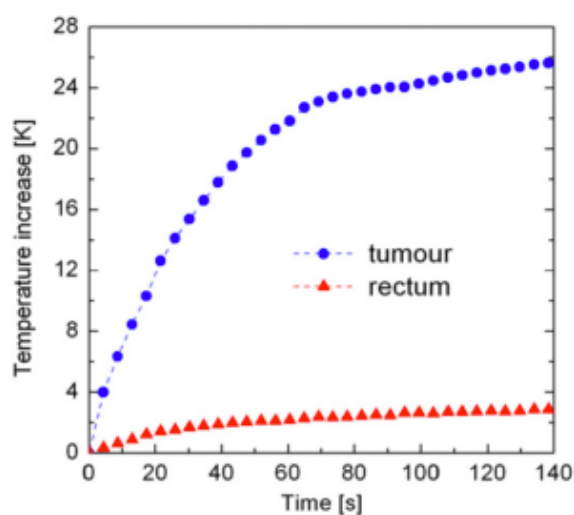


Figura 27. Incremento térmico registrado durante la exposición a HTM en ratones inyectados intratumoralmente con NpM. Dutz et al., 2011.

El grupo de Dutz, administró 7 mg de NpM “multicore” vía i.t. en ratones inmunodeficientes SCID y posteriormente los expuso a un campo magnético alterno de

25 kA/m y 44 kHz, durante 150 segundos. Consiguieron incrementos térmicos de 25 K en el tejido tumoral infundido mientras que la temperatura del recto apenas se incremento 2 K (Figura 27)<sup>176</sup>.

Alphandéry et al. administraron un 1 mg de extracto de magnetosomas a ratones portadores de tumores y posteriormente los expusieron a 3 ciclos de HTM durante 20 minutos, en los cuales, los tumores incrementaron 10° C su temperatura, hasta alcanzar los 43° C (Figura 28).

Además, también realizaron un seguimiento de la evolución del tamaño tumoral tras la exposición a HTM. Una vez normalizado el volumen tumoral medido en el momento de la extracción respecto al volumen tumoral al finalizar el último ciclo de HTM (30 días antes), observaron que, en los ratones control, dicho volumen se incrementó entre un 400 – 800% (Figura 29B); mientras que en aquellos animales que fueron sometidos a HTM mediada por los magnetosomas, el rango del volumen tumoral normalizado, a los 30 días, oscilaba entre el 0 y 400%, dependiendo de los individuos (Figura 29A)<sup>177</sup>.

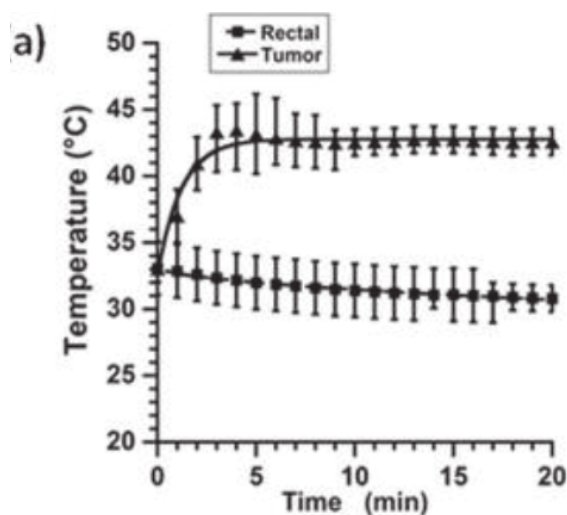


Figura 28. Incremento térmico registrado en el recto y el tejido tumoral inyectado con magnetosomas, durante la exposición a un ciclo de HTM. Alphandéry et al., 2011.

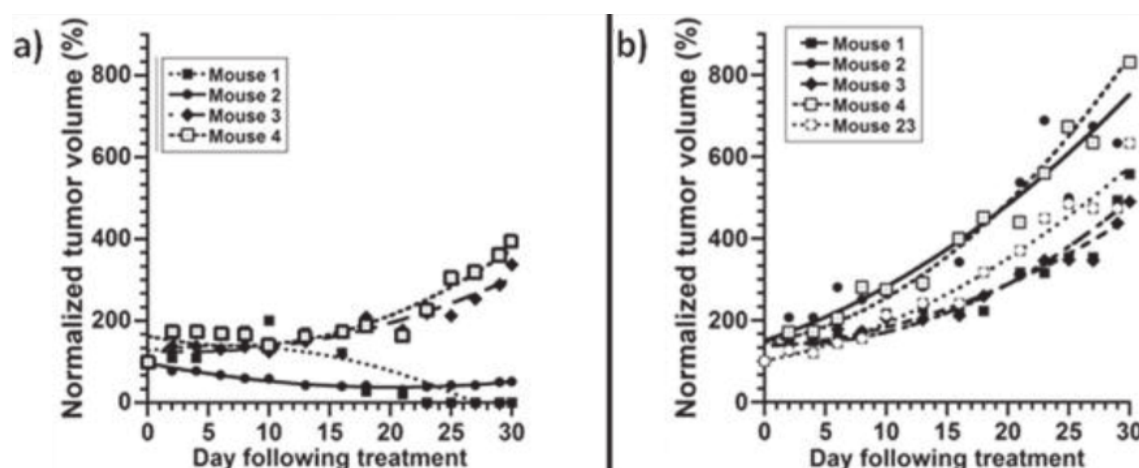


Figura 29. Evolución del volumen tumoral normalizado en ratones tratados con HTM (A) y ratones del grupo control sin tratamiento de HTM (B). Alphandéry et al., 2011.

Resultados similares publicaron Du et al. en 2009, empleando nanocompuestos de óxido de hierro (III) encapsulados en óxido de arsénico (III) ( $As_2O_3/Fe_3O_4$ ). Al exponer a ratones desnudos BALB/C, inyectados i.t. con las NpM, durante 40 minutos a temperaturas entre 42 a 65° C, lograron reducir el peso tumoral en un 88,21% y el volumen en un 91,57<sup>178</sup>.

Cabe destacar, además, que la punción i.t. directa fue usada en el primer ensayo clínico publicado, en el que se emplearon NpM en una terapia de HTM<sup>179</sup>. Johannsen et al. diseñaron un inductor de radiofrecuencias (IRF) específico en el cual, se introdujo a un paciente de 67 años con cáncer de próstata que recibió un inyección transperineal de un magnetofluido terapéutico, y se le sometió a un campo magnético de 100 kHz. Posteriormente Maier-Hauff et al. en 2007 y van Landeghem et al. en 2009, realizaron otros ensayos clínicos, esta vez en pacientes afectados por gliomas<sup>180,181</sup>. Todos ellos demostraron, en mayor o menor medida, ser seguros y reportar beneficios para el paciente.

Sin embargo, a pesar de ser un procedimiento mínimamente tóxico para el organismo en conjunto y conseguir altas concentraciones intratumorales de NpM, en todos estos casos, tanto en los ensayos clínicos como preclínicos, las NpM inyectadas directamente

en el tumor, tienen una distribución irregular, formando agregados en los tejidos y no se dispersan homogéneamente por ellos; además de ser procedimientos invasivos y no aptos para tumores primarios o metástasis de pequeño tamaño<sup>181,182</sup>

## 2. Administración intravascular

La infusión endovascular, menos directa que la i.t., consiste en la infusión o inyección de las NpM en el torrente sanguíneo, a través del cual llegarán al sitio de interés. Esta vía presenta a su vez dos posibles rutas, por vía arterial (infusión intrarterial, i.a.) o por vía venosa (infusión intravenosa, i.v.).

Si bien cada autor defiende una ruta vascular diferente, sí parece claro que, al menos, la administración i.a. evita, o cuanto menos minimiza, la pérdida de NpM por la fagocitosis de las células de SFM presentes en el hígado o el bazo, comparándolo con la infusión i.v.<sup>183</sup>.

A pesar de que la administración endovascular no logra una captación o recubrimiento homogéneo del tumor con NpM, al menos sí permite una cobertura más generalizada del tumor con NpM, si lo comparamos con la punción directa<sup>184</sup>.

El recubrimiento completo y generalizado con NpM para conseguir ablación tumoral no es necesario, ya que el calor generado en las regiones con depósitos de NpM es disipado al tejido circundante, mostrando cierta eficacia en la destrucción, al menos parcial, de los tumores<sup>185-187</sup>.

Hergt & Dutz en 2007 y Samanta et al. en 2008, en sus estudios *in silico* e *in vitro*, concluían que esta captación o cantidad mínima de NpM, que es necesaria en el tumor para lograr un adecuado calentamiento, se estima entre el 0,1-0,4 % del peso tumoral<sup>188,189</sup>. Sin embargo, un problema añadido a la administración i.v. es la toxicidad sistémica que puede generar una infusión de NpM a la concentración necesaria para alcanzar esos valores de intratumorales NpM en relación al peso del tumor.

Balivada et al. en 2010, en el mismo estudio, comparan el efecto de la HTM mediada por NpM recubiertas con porfirinas y administradas i.t. e i.v. en melanomas inducidos



en ratones C57/BL67. En uno de los grupos, administraron tres dosis de NpM vía i.t. (una dosis al día, durante 3 días consecutivos) y acto seguido, cada día, expusieron a los animales a un campo magnético con una intensidad de 5 kA/m y frecuencia de 366 kHz, durante 10 minutos. Otro de grupo experimental, recibió vía i.v. tres dosis de NpM (una al día, cada dos días) y los sometieron a un campo magnético de idénticas condiciones el día posterior a la infusión.

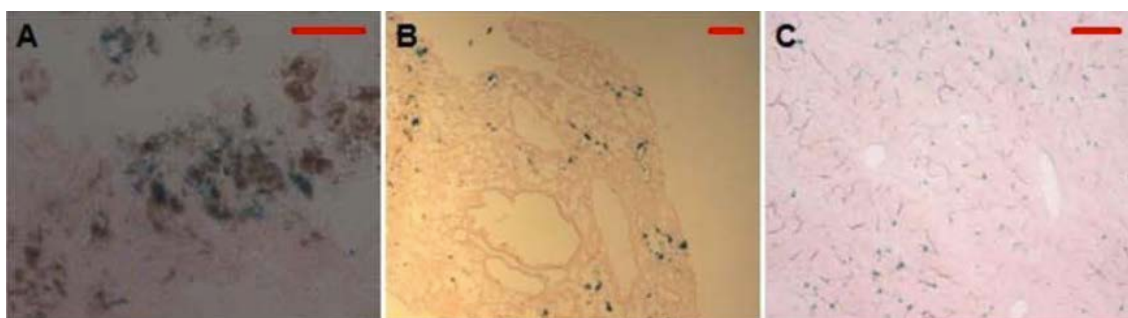


Figura 30. Microfotografías de secciones histológicas teñidas con Azul de Prusia, de tejido tumoral (A), pulmón (B) e hígado (C) de animales infundidos con NpM vía i.v. Balivada et al. en 2010

Concluyeron que, ambas vías de infusión, i.t. e i.v., lograron una disminución del volumen y peso tumoral tras periodos cortos y consecutivos de HTM, sin causar los efectos adversos asociados a la quimioterapia tradicional. En los grupos experimentales que recibieron las NpM por vía sistémica, i.v., encontraron depósitos de NpM tanto en los pulmones (Figura 30B) como en el hígado (Figura 30C), además de hallar acúmulos en el tejido tumoral (Figura 30A), por lo que se hace necesario un recubrimiento y funcionalización con compuestos que mejoren la captación y acumulación selectiva en el tumor, y a la vez sean capaces de evitar la fagocitosis de las células del SFM y su acumulación en otros tejido.

Tabla 3. Resumen de publicaciones con administración endovascular de NpM en terapias de HTM. Huang & Hainfeld, 2013)

| Injection, animal, tumor location                      | NP core size (nm)                   | SLP (W/g) | Amount of Fe | Freq (kHz)/ Field (kA/m) | # Treatments | Heat time (min) | Temp reached (°C) | Result  | Days assayed |
|--|-------------------------------------|-----------|--------------|--------------------------|--------------|-----------------|-------------------|---|--------------|
| IV, m, sc<br><small>DeNardo et al., 2007</small>       | 20                                  | ~75       | ~100 mg/kg   | 153/56                   | 1            | 20              |                   | Doubling time 20 days compared to control<br>11 days, no survivors  | 50           |
| IV, m, sc<br><small>Shinkai et al., 2001</small>       | 10 nm<br>MNPs in antibody-liposomes | 96        | ~100 mg/kg   | 118/31                   | 3            | 30              | 43                | Survival better than untreated but all animals dead by day 75       | 75           |
| IA, r, h<br><small>Moroz et al., 2002</small>          | ~150 nm MNPs in 32 um microspheres  |           | ~54 mg       | 53/45                    | 1            | 20              | 43-50             | Tumors reduced in volume 14 79%; found superior to direct injection | 14           |
| IV, m, sc<br><small>Huang &amp; Hainfeld, 2013</small> | 11                                  | 754       | 1.7 g/kg     | 980/38                   | 1            | 2               | 60                | 7 of 9 (78%) tumor free at 160 days                                 | 160          |

**Abbreviations:** Fe, iron; Freq, frequency; h, hepatic; IV, intravenous; IA, intraarterial; m, mice; MNP, magnetic nanoparticle; NP, nanoparticle; r, rabbit; sc, subcutaneous; SLP, specific loss power.

En la Tabla 3 se presentan, de forma resumida, los resultados de los trabajos de DeNardo et al., Shinkai et al., Moroz et al. y Huang et al. Todos, a excepción de Moroz et al., 2002 usan la administración i.v. Puede verse que la administración sistémica por vía i.v. obtiene unos resultados esperanzadores en términos de SLP o SG de los animales<sup>186,187,190</sup>.

Como se ha comentado antes, las metástasis hepáticas obtienen su aporte sanguíneo vía arteria hepática<sup>77</sup> por lo que, a pesar de los buenos resultados que se obtienen con la administración i.v. de NpM (mucho más sencilla de realizar en términos técnicos y de procedimientos quirúrgicos), es lógico pensar que resulte más conveniente usar un abordaje más directo, como es la infusión i.a.

Moroz et al. de 2002, en un modelo de metástasis hepáticas inducidas en conejos mediante alotrasplante de piezas tumorales de 1 mm de carcinomas VX2, emplearon la vía i.a. para la administración de NpM y posterior inducción de HT, Hipertermia tras Embolización Arterial (EAHT)<sup>191</sup>.

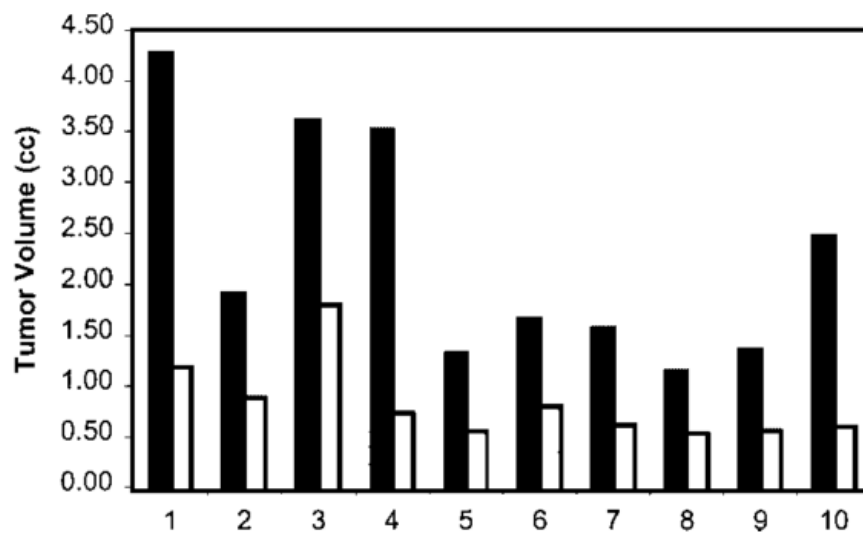


Figura 31. Comparación del volumen tumoral de animales no tratados (barra negra) frente a animales sometidos a EAHT con NpM y sacrificados 14 días después del procedimiento (barra blanca). Moroz et al., 2002.

Los tumores del grupo tratado con EAHT se calentaron hasta los 43 - 50° C durante 20 minutos. Catorce días después del tratamiento, los conejos fueron sacrificados y los tumores extraídos para medir su peso y volumen y llevar a cabo estudios histopatológicos. El volumen tumoral de los animales tratados presentó un descenso significativo de entre un 50 y un 94% (respecto a los no tratados,  $p=0,005$ ) (Figura 31); la mediana de peso de los implantes tumorales fue de 1,73 mg vs. 8,01 mg de los no tratados,  $p<0,001$ . Los tumores de tres de los conejos (30%) presentaron, a los 14 días de la EAHT, una necrosis del 100% y el resto, 7 conejos, una necrosis tumoral de 80 %.

En el otro grupo experimental, al que se administró NpM vía i.t. y posteriormente se incrementó la temperatura de los implantes hasta los mismos valores, 43 – 50° C, el volumen tumoral se elevó al menos un 143% con respecto a los animales no tratados y la mediana del peso tumoral fue de 5,68 mg ( $p>0,05$ ) (Figura 32). Este trabajo demostró, en éste modelo tumoral de EAHT, que la administración i.a. de NpM es más efectiva que la i.t., seguramente debido a una mejor y más extensa distribución de las NpM por todo el tumor.

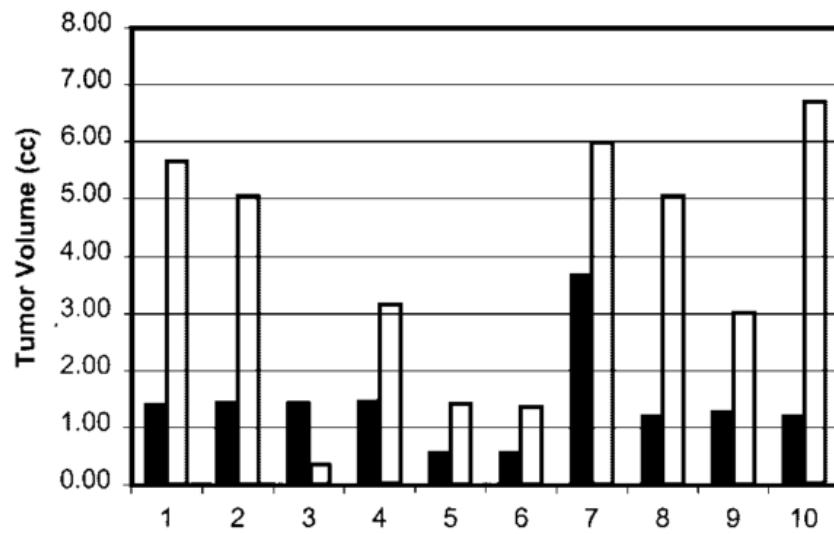


Figura 32. Comparación del volumen tumoral de animales no tratados (barra negra) frente a animales sometidos a HT con administración de NpM vía i.t., y sacrificados 14 días después del procedimiento (barra blanca). Moroz et al., 2002.

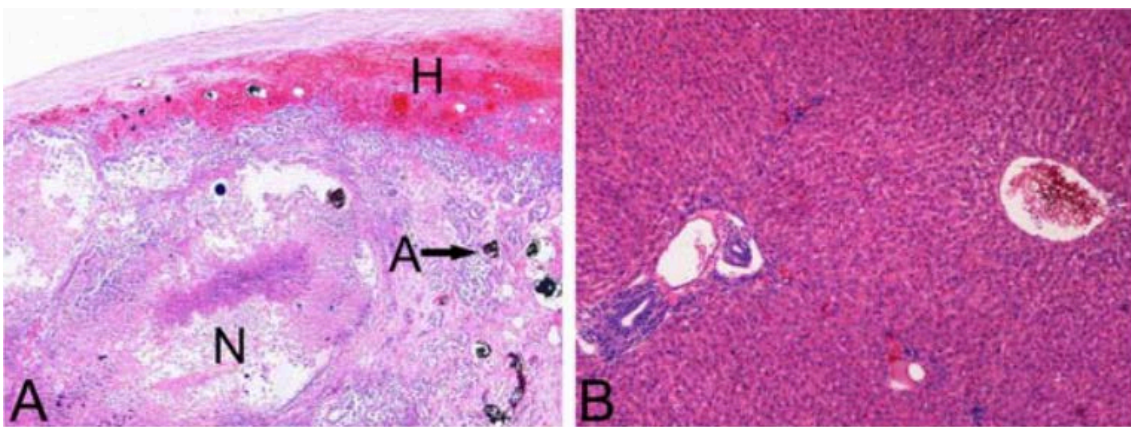


Figura 33. Sección histológica de tejido tumoral expuesto a EAHT (A); se observa una región necrótica (N) con acúmulos de NpM (A y flecha). Tejido hepático sano extraído 7 días después de la exposición a EAHT (B). Yu et al., 2011.

Resultados similares publicaron Yu et al. en 2011, empleando NpM de óxido de arsénico (III) ( $As_2O_3$ ) en tumores hepáticos inducidos con la línea celular VX2. Los animales tratados con EAHT mediada por NpM de óxido de arsénico (III) mostraron un

descenso en el crecimiento tumoral y un aumento en la SG. Además, el procedimiento permitió inducir necrosis en el tumor, sin afectar al tejido hepático sano circundante (Figura 33A). Alrededor del área necrótica se encontró tejido fibrótico y restos de desechos celulares y se originó una respuesta antiinflamatoria; pero 7 días después el parénquima hepático recobró su aspecto histológico normal (Figura 33B)<sup>192</sup>.

Además de su potencial terapéutico, las NpM, sea cual sea su composición, pueden ser usadas como agente para potenciar técnicas diagnósticas actuales como la IRM.

Sheu y colaboradores realizaron ensayos en ratas portadoras de implantes tumorales subscapulares de células de CHC McA-RH7777 en los lóbulos lateral izquierdo (LLI) y paramediano (LPM). Tras la administración de las NpM de óxido de hierro (III), unidas a células *natural killer* (NK), observaron, una disminución de la intensidad de señal (IS) en la secuencia ecogradiante T2\* en ambos tejidos, tumoral ( $18,1 \pm 5$  ms vs.  $13,6 \pm 4,8$  ms, pre y post administración respectivamente) y sano ( $11,5 \pm 0,7$  ms vs.  $8 \pm 1,1$  ms, pre y post administración respectivamente) (Figura 34A); si bien, la caída de IS en el tumor fue mayor que en el parénquima hepático sano ( $9,1 \pm 4,4$  ms vs.  $3,5 \pm 1,2$  ms, respectivamente;  $p < 0,001$ ) (Figura 34B)<sup>193</sup>.

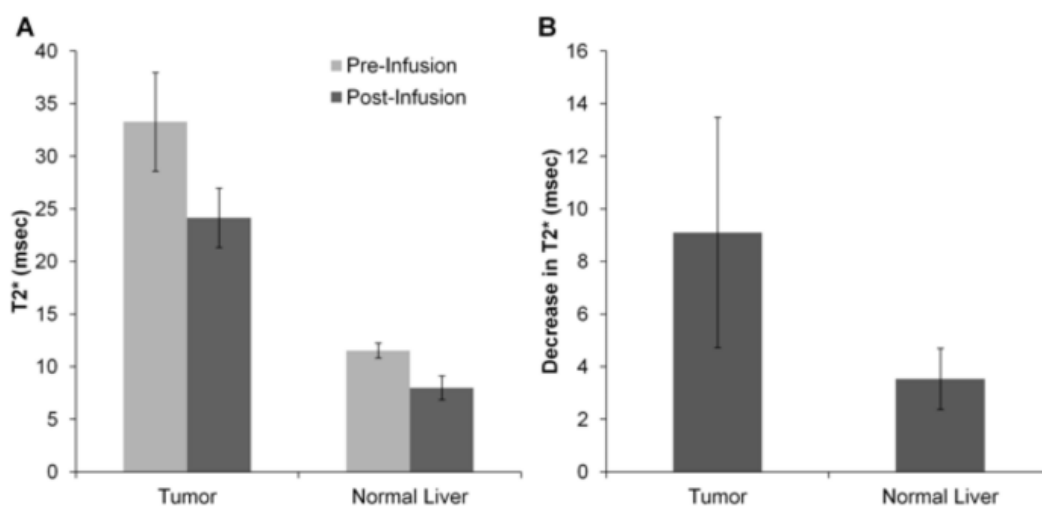


Figura 34. Medidas de la IS en la secuencia ecogradiante T2\* de IRM. Valores en el tejido tumoral y parénquima hepático sano pre (gris claro) y post-infusión de NpM (gris oscuro) (A). Decaimiento absoluto de la IS en el tejido tumoral y parénquima hepático sano (B) (Sheu et al., 2013).



## Modelos experimentales para el estudio de las metástasis

Está claro que el mejor modelo para la investigación de enfermedades que afectan a seres humanos, es el propio ser humano; pero dado que éste extremo no siempre resulta ético y/o legalmente posible, se requiere de estudios preclínicos previos que respalden su ensayo e investigación en clínica.

El estudio de las MHCCR emplea tanto modelos *in vitro*<sup>194,195</sup> como *in vivo*<sup>196-203</sup>, ya sea tanto para conocer más sobre la biología y comportamiento de las mismas, como para la búsqueda de nuevos tratamientos o la mejora de otros ya existentes. Ambos modelos son herramientas importantes y fundamentales en la investigación contra el cáncer.

### A. Modelos *in vitro*

Los ensayos *in vitro* permiten el cultivo y crecimiento de células en ambientes absolutamente controlados, posibilitando estudios muy precisos sobre rutas moleculares, migración celular, respuesta a fármacos o condiciones del ambiente,... en periodos de tiempo reducidos y con una repetitividad alta, haciendo que estos ensayos sean más baratos, tanto económica como temporalmente. Sin embargo, tienen la gran desventaja de que hay una correspondencia limitada entre el comportamiento de células aisladas en cultivo y al de las mismas en un modelo *in vivo*; además, estos estudios, están generalmente limitados al crecimiento de células en monocapa con cultivos puros, de una única línea celular, o a lo sumo dos; pero como bien se sabe, los tumores están formados por múltiples estirpes celulares (no sólo células tumorales, sino también células inflamatorias, endoteliales, ...) que pueden modular, de forma completamente diferente, la respuesta del tumor a la condición experimental a la que es sometido; si bien hoy día, cada vez es mayor la bibliografía referente a modelo tridimensionales y con varias estirpes celulares en el mismo cultivo<sup>204,205</sup>.

Por ejemplo, estudios relacionados con la angiogénesis o procesos metastásicos del tumor no pueden ser replicados en los modelos *in vitro* actuales. En estudios

farmacológicos, los modelos *in vitro* también tienen sus limitaciones, ya que, pese a poder predecir, en mayor o menor medida, la farmacocinética del compuesto, no se pueden estudiar los efectos adversos colaterales que pudiera tener en el organismo.

No se debe olvidar tampoco que los ensayos *in vitro* han sido y son cruciales en lo que se ha dado en llamar el “Principio de las 3R”<sup>206</sup>, que consiste en la reducción, reemplazo y refinamiento en el uso de animales con fines de investigación. Ensayos previos al uso de un modelo animal, permiten afinar y delimitar las condiciones experimentales que a posteriori serán ensayadas *in vivo*.

## **B. Modelos *in vivo***

Los modelos *in vivo*, al contrario que los *in vitro*, tienen como sus principales hándicaps el elevado coste en tiempo y dinero que suponen y la estricta regulación regional, nacional e internacional a la que están sujetos, para garantizar unas buenas prácticas y un trato ético y humano a los animales<sup>207-209</sup>.

Como ventajas, hay que destacar que los modelos *in vivo* de MHCCR preservan la estructura tridimensional del tumor, las interacciones celulares<sup>210,211</sup>, la vascularización<sup>212,213</sup> y el microambiente tumoral<sup>214,215</sup>; todos ellos factores que se ha visto que tiene una importancia fundamental en el los procesos de desarrollo, crecimiento y migración de las células tumorales.

Los factores realmente determinantes en la experimentación con animales son la elección del modelo animal y del modelo de inducción tumoral.



## 1. Especies animales en investigación de MHCCR

En este apartado se recogen las especies animales más ampliamente utilizadas como modelos *in vivo* para el estudio de las MHCCR.

### Pez Cebra

En los últimos 15-20 años, los estudios en materia de cáncer con peces cebra (*Danio rerio*) (Figura 35) se han incrementado exponencialmente, sobre todo en lo relacionado con la implicación de los genes en el cáncer, angiogénesis de los tumores, farmacocinética,... Todo esto potenciado en gran medida por su bajo coste y bajos requerimientos de instalaciones y mantenimiento, rápido desarrollo, cuerpo transparente, fácil manipulación genética,... que permite realizar los primeros estudios en estos modelos antes de pasar a organismos superiores.



Figura 35. Larva de pez cebra. <http://www.kyb.tuebingen.mpg.de/> (acceso 24 de septiembre de 2017).

Sin embargo, su menor desarrollo evolutivo en comparación con los humanos y otros modelos experimentales animales, así como su mayor distancia filogenética con ellos, condicionan las aplicaciones reales que el pez cebra pudiera tener. Actualmente son limitadas las herramientas y reactivos disponibles para su uso y aplicación en este modelo. Por ejemplo, en su código genético presenta muchos genes duplicados, lo cual complica en ocasiones su manipulación; la vida en un medio acuoso también impide el uso de fármacos o compuestos que no sean solubles en el mismo, ya que los solventes

necesarios para su disolución, podrían ser tóxicos para los peces; otra desventaja es la temperatura óptima para el desarrollo y crecimiento de embriones e individuos jóvenes, 28 °C, que dista de la temperatura optima de crecimiento de las células tumorales de mamíferos, 37 °C.

A pesar de todo, son bastantes los modelos tumorales y trabajos publicados empleando el pez cebra como modelo experimental en melanoma, radbomiosarcoma o leucemia 216-219 .

### Ratón

Según el último informe de la Comisión Europea, sobre datos de 2011, el ratón (*Mus musculus*) es el animal más ampliamente usado en investigación en el conjunto de Estados Miembros de la Unión Europea (Figura 36). Supusieron, en 2011, casi el 61% del total absoluto de animales usados (11,5 millones)<sup>220</sup>.

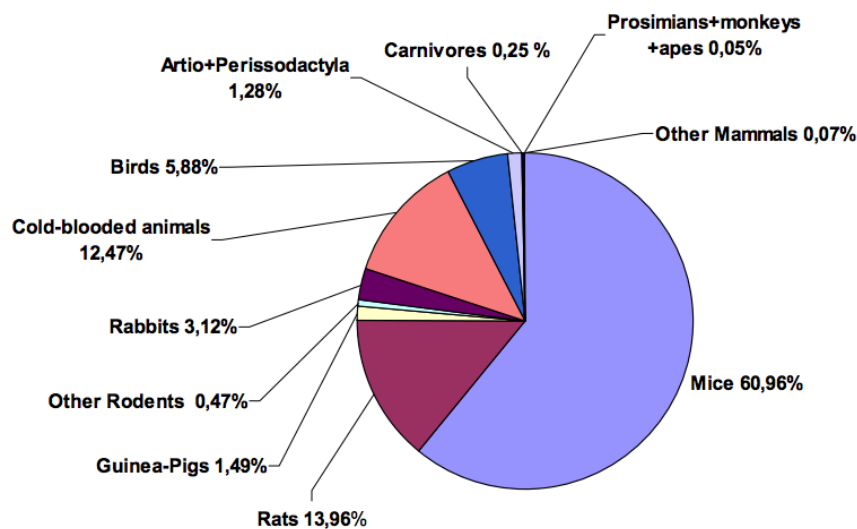


Figura 36. Porcentaje de animales usados con fines de investigación en los 27 Estados Miembros de la Unión Europea en 2011, clasificados por especies. European Commission, 2013.

Éste hecho se puede deber, fundamentalmente, a su pequeño tamaño y coste, en comparación con animales de mayor tamaño, a un ciclo de vida corto, a la existencia de múltiples modelos para diversas patologías y a que comparte con el ser humano una

amplia variedad de características fisiológicas, moleculares y genéticas<sup>221,222</sup>, y más recientemente a la secuenciación completa del genoma del ratón, que permite una manipulación genética a medida.



Figura 37. Ratón desnudo con implante tumoral heterotópico de carcinoma de colon. Mittal et. al, 2015.

Además de emplear ratones en los que inducir tumores singénicos a cada cepa animal<sup>223,224</sup>, una enorme ventaja que presenta éste modelo sobre el resto, es la posibilidad de emplear animales inmunodeficientes en los que realizar xenotrasplantes de especímenes o células tumorales de origen humano, sin causar reacciones de rechazo de injerto contra huésped<sup>225-229</sup> (Figura 37).

## Rata

Las ratas (*Rattus norvegicus*) son el segundo animal más ampliamente usado en la UE. Junto con el ratón suponen aproximadamente, el 75% de los animales empleados en experimentación.

Su uso como modelo experimental en la investigación de las MHCCR no supone mayores o menores ventajas o inconvenientes que el uso de ratones. Si bien es una especie que resulta ligeramente más costosa de mantener y su ciclo de vida es más largo que el de los ratones, también su mayor tamaño y facilidad de manejo permiten

procedimientos y técnicas quirúrgicas que pueden replicar con mayor fidelidad las empleadas en humanos; como por ejemplo el abordaje i.a. de la arteria hepática para la administración más directa de sustancias al lecho tumoral, estudios de imagen y experimentos de HTM<sup>199,230,231</sup>.

La existencia de líneas celulares de CCR de rata bien establecidas y descritas, permite compaginar estudios *in vitro* con experiencias *in vivo* en ratas singénicas, lo cual, ayuda a seguir el Principio de las 3R para el uso de animales de experimentación. Éste hecho también supone un punto en contra de éste modelo de rata como animal de experimentación en MHCCR, ya que no emplea líneas humanas o no posibilita la inducción de tumores de asiento hepático mediante xenotrasplantes de piezas tumorales de origen humano. Aunque existen cepas de ratas inmunodeficientes, por ejemplo las ratas atímicas Rowett (Hsd:RH-*Foxn1*<sup>mu</sup> o CrI:NIH-*Foxn1*<sup>mu</sup>), su elevado precio 4-5 veces superior a otras cepas inmunocompetentes y costoso mantenimiento, hace que existan pocos trabajos publicados empleándolas como modelo experimental<sup>232,233</sup>.

### **Conejos**

En 2011, el 3% de los animales empleados en investigación fueron conejos (*Oryctolagus cuniculus*) (Figura 36)<sup>220</sup>. Éste animal se usa, en la mayoría de los experimentos, como modelo para replicar procedimientos intervencionistas para la administración i.a. de fármacos y otros compuestos, y en estudios de imagen<sup>234-237</sup>.

Un importante inconveniente que presenta el uso de conejos en el estudio de las MHCCR es que no existen líneas tumorales bien definidas y establecidas de CCR con las que poder inducir de una manera controlada y fiable las metástasis. Las alternativas existentes en la literatura para la inducción de metástasis hepáticas pasan por: la inmunosupresión de los conejos con ciclosporina A para xenotrasplantar células o piezas tumorales humanas<sup>238</sup>; o bien, la alternativa más comúnmente empleada, inducir las metástasis mediante la inyección de células de carcinoma VX2<sup>72,234</sup>. Recientemente, se acaba de describir un método para la producción de conejos inmunodeficientes, pero aun está por determinar su utilidad en la investigación biomédica<sup>239</sup>.

## 2. Inducción tumoral

Además de los animales anteriormente descritos, una variante más en relación a los modelos experimentales *in vivo* es el método empleado para inducir del desarrollo tumoral. Entre estos métodos encontramos: la exposición a carcinógenos químicos, animales genéticamente modificados (AGM), transfección con material vírico o trasplante de material biológico tumoral.

### Exposición a agentes carcinogénicos

La exposición de los animales a agentes con efectos carcinogénicos originaría tumores que podríamos denominar “naturales”<sup>240–242</sup>. Debido a este desarrollo “natural”, estos tumores, presenta la gran ventaja de tener una mayor similitud anatómica, histológica y biológica con los tumores que surgen en los seres humanos.

Hay abundante bibliografía que corrobora el uso de compuestos químicos como el 1,2-dimetilhidracina (DMH) y el dimetilnitrosamina (DMN) o el azoximetano (AOM) en la inducción de CCR<sup>243–245</sup> y CHC<sup>246,247</sup>, respectivamente.

Para el estudio de las MHCCR, la inducción química no resulta un método habitual para el desarrollo de los implantes tumorales puesto que se requieren largos periodos de tiempo y las tasas de desarrollo de las mismas son bajas. Por el contrario, este método sí es ampliamente usado para el estudio de lesiones preneoplásicas o neoplásicas debidas a alteraciones genéticas producidas por agentes químicos<sup>248</sup>.

### Animales modificados genéticamente

Los AMG empleados como modelos en ensayos contra el cáncer, presentan alteraciones en su expresión genética, como la inactivación de genes supresores de tumores (GST) o la activación de oncogenes, entre otros.

Estos modelos animales, proporcionan un importante conocimiento sobre la implicación de determinados genes, o de sus mutaciones, en el desarrollo del cáncer con un componente hereditario<sup>221</sup>. Pero también son necesarios modelos con alteraciones en la

línea somática ya que, más del 75% de los casos de CRC se deben a mutaciones espontáneas en líneas celulares no germinales<sup>249</sup>.

La presencia de estas alteraciones genéticas, inducen un desarrollo “natural”, sin manipulación quirúrgica posterior, lo que permite analizar las interacciones de las células tumorales con el microambiente tumoral y los efectos en su desarrollo<sup>250</sup>. Además, también es un modelo ideal para evaluar los cambios o efectos en el sistema inmunitario de los animales debidos al cáncer, ya que éste modelo lo preserva intacto<sup>251</sup>.

Los principales inconvenientes del uso de AMG en el estudio de las MHCCR son que su desarrollo es escaso y la aparición no es predecible<sup>228</sup>, además, en el caso de hacerlo, el tiempo que tarda en ocurrir es muy largo<sup>252</sup> y por tanto hace que estos estudios sean muy costosos en términos económicos y de tiempo<sup>253</sup>.

### **Transfección vírica**

Se sabe que determinados casos de CHC y otros tipos de tumores hepáticos en seres humanos están asociados a la infección de determinados virus como el virus de la hepatitis B (VHB), hepatitis C (VHC) o VIH<sup>254-256</sup>.

Se han desarrollado algunos modelos experimentales que emplean los mecanismos moleculares por los que los virus transfectan a las células para inducir mutaciones puntuales que desencadenen el desarrollo de tumores<sup>257-259</sup>; sin embargo, en la búsqueda bibliográfica realizada, no se encontraron publicaciones en las que se emplease este mecanismo de inducción, para el desarrollo ni de tumores primarios en el hígado, ni en MHCCR.

### **Trasplante**

Todos los anteriores métodos descritos, sin entrar a debatir su eficacia/eficiencia, presentan los mismos inconvenientes, al menos para el estudio de las MHCCR: largos periodos hasta el desarrollo de metástasis de un tamaño adecuado y la incertidumbre del

---

lugar donde se desarrollarán, lo que, en determinados casos, puede condicionar el abordaje posterior del modelo.

Para tener un control más preciso, en la medida de lo posible, del número, tamaño, sitio y tiempo en el que se desarrollan las MHCCR, se recurre al implante de especímenes tumorales o bien al trasplante o inoculación de células tumorales.

*a) Implante de especímenes tumorales*

En estos modelos hay tres cuestiones cruciales a tener en cuenta: el grado de la respuesta inmune que puede o va a generar la pieza implantada, el lugar de la implantación y la vascularización de la misma; todas ellas altamente interrelacionados entre sí.

La respuesta inmune del animal variará según su propio estado inmunitario y/o el origen del implante. En general, la elección de este método de inducción tumoral lleva asociado el uso de animales desnudos, en los que, gracias a la deprivación del sistema inmune, se logra eliminar la reacción de injerto contra huésped y el consiguiente rechazo del implante tumoral. Sin embargo, Rashid et al. en 2014 emplearon ratones desnudos Balb/c en los que indujeron el desarrollo de tumores mamarios y observaron que, pese a ser animales inmunodeprimidos, hubo cierta reacción contra el tumor en los casos de implante subcutáneo, encapsulando el tejido tumoral e impidiendo así un desarrollo normal al compararlo con el implante ortotópico en el propio tejido mamario<sup>260</sup>.

En el caso de emplear tejido de origen humano en animales, lo que se denomina xenotrasplante, hay que ser especialmente cautelosos en la interpretación de los resultados que se puedan derivar de esos experimentos. La reacción que genera un tejido extraño en el cuerpo del receptor puede imitar, camuflar o alterar completamente los efectos del desarrollo tumoral en el huésped<sup>261</sup>.

A modo de ejemplo, la respuesta en la generación de metástasis por parte del tumor primario va a variar del todo a la nada dependiendo del sitio donde se aloja el xenoinjerto. Por ejemplo, xenoinjertos de CRC pueden presentar distinta sensibilidad a

la quimioterapia dependiendo de la localización anatómica de los xenoinjerto en el cuerpo del ratón<sup>262</sup>. Los trasplantes heterotópicos de xenoinjertos, como el implante subcutáneo de tumores de páncreas o mamarios en el flanco de los animales, que conllevan procedimientos quirúrgicos fáciles y un buen control y monitorización del tamaño tumoral, tienen la gran desventaja que nunca o en la mayoría de los casos van a desarrollar metástasis en otros órganos, por lo que no podría comprobarse, por ejemplo, la utilidad de fármacos o tratamientos para impedir la invasión metastásica<sup>263,264</sup>; si bien son muy usados como avatares o “xenopacientes” para predecir la respuesta específica del tumor de cada paciente ante los tratamientos<sup>265</sup>. Por el contrario, los modelos basados en trasplantes ortotópicos de xenoinjertos están considerados como los que más se aproximan o mejor imitan al comportamiento natural de los tumores en el propio paciente, al comparar la histología tumoral y la expresión genética de la muestra; en éstos, el espécimen se trasplanta en su localización anatómica, es decir, en el órgano donde se origina<sup>266</sup>.

Ya se ha hablado con anterioridad de la importancia que tiene la vascularización en los procesos tumorales, sobre todo en relación a la necesidad de un buen aporte vascular alrededor del tumor para su correcto desarrollo, pero también, en éste caso, la vasculatura propia de los especímenes tumorales trasplantados tendrá influencia en el modelo generado y los resultados obtenidos.

En 2010, Graves et al. presentaron un trabajo en el que estudiaron implantes orto o heterotópicos de carcinoma humano de pulmón A549 en ratones desnudos mediante tomografía de emisión de positrones (PET) e inmunohistoquímica para marcadores de hipoxia. En él, se constata que los implantes heterotópicos subcutáneos, en éste modelo, presentan un incremento significativo en los marcadores de hipoxia, respecto a los implantes ortotópicos o los tumores generados espontáneamente<sup>267</sup>.

Un trabajo más reciente de Vilalta y colaboradores estudió las diferencias en la perfusión vascular alrededor de implantes tumorales generados de forma espontánea o bien mediante trasplantes ortotópicos o heterotópicos. Para el seguimiento, formación y localización precisa de los tumores, realizaron pruebas de imagen mediante



microtomografía computarizada de rayos X (micro-TCMC) y estudios dinámicos de IRM tras administración de Gadolinio. Al analizar los datos obtenidos de la IRM dinámica pudieron observar que, tanto los tumores espontáneos como los generados mediante trasplante ortotópico, presentaban una vascularización totalmente funcional, con una buena captación del contraste empleado; sin embargo, los implantes heterotópicos presentaron un menor captación del mismo, indicando alteraciones en la vasculatura del tumor.

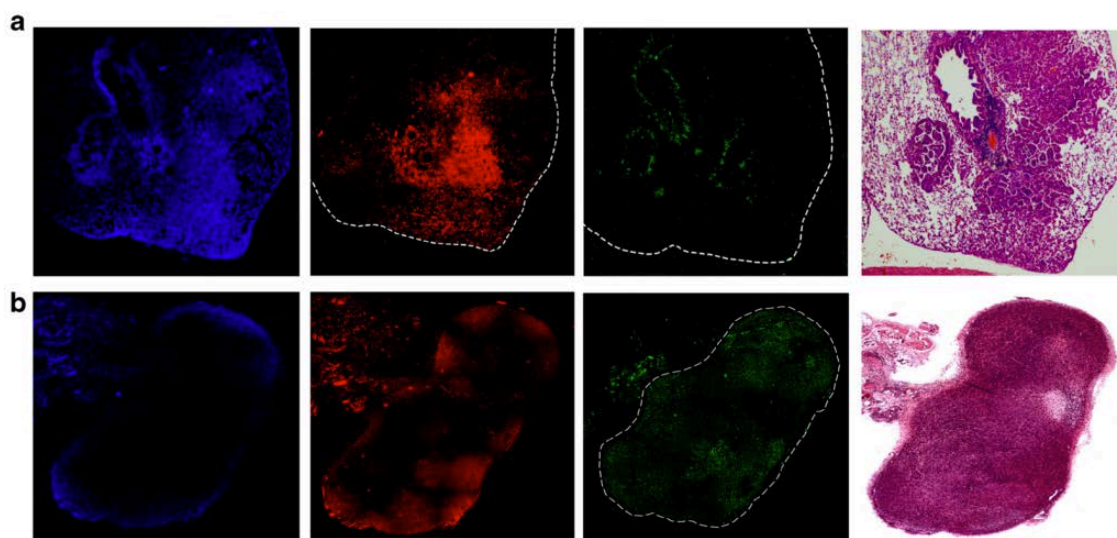


Figura 38. Análisis histológicos de implantes tumorales espontáneos (A) y heterotópicos (B). Cortes de inmunohistoquímica con Hoechst 33342 (azul, primera columna), con Meca-32 (rojo, segunda columna) y CAIX (verde, tercera columna); tinción con hematoxilina-eosina (cuarta columna). Vilalta et al., 2017.

Estos resultados se corroboraron con los obtenidos de los análisis inmunohistoquímicos con Hoechst 33342 (marcando los núcleos de células vivas), Meca-32 (que exclusivamente marca células endoteliales) y CAIX (marcador de hipoxia). Se puede ver en la Figura 38A, cómo los implantes espontáneos aparecen ampliamente marcados para Hoechst 33342 y Meca-32. Es decir, tiene una gran presencia de células vivas o funcionalmente activas y de células endoteliales por todo el implante tumoral; mientras que en la tinción con CAIX apenas aparecen células marcadas. Justo lo contrario ocurre en los implantes heterotópicos subcutáneos, en los que hay pocas células que se marcan con Hoechst 33342, lo indica un mayor número de células apoptóticas, las células

endoteliales solo aparecen marcadas con Meca-32 en la periferia del implante tumoral, mientras que todo ello aparece ampliamente marcado para CAIX (Figura 38B).

### b) Inoculación de células tumorales

El último método para la inducción de tumores en animales de experimentación es la punción directa o infusión al torrente sanguíneo de células tumorales.

Al igual que el trasplante de piezas tumorales, este método, nos permite emplear células tumorales singénicas al animal receptor<sup>200,268-270</sup> o bien procedentes de otra especie distinta, de origen xenogénico<sup>270-272</sup>.

Como se ha visto en el apartado anterior, este método de inducción, reproduce de forma prácticamente idéntica la vasculatura de los tumores generados de forma espontánea<sup>267,273</sup>.

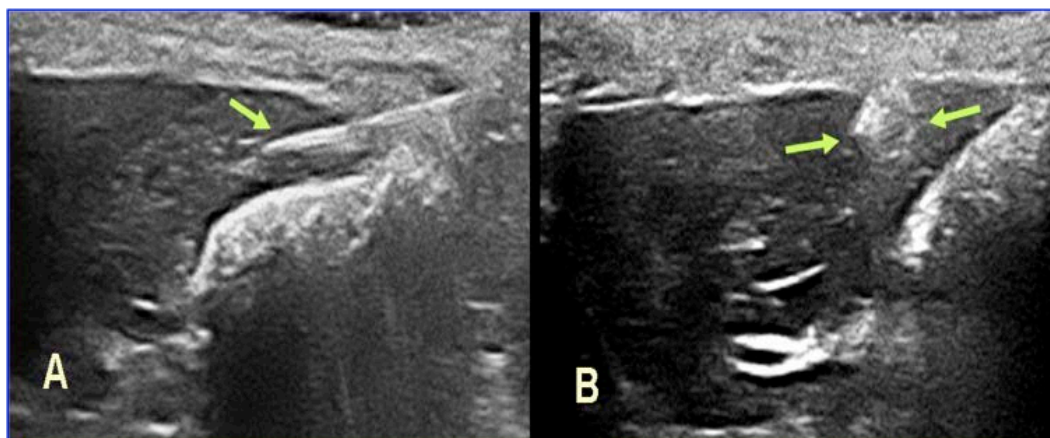


Figura 39. Imágenes ecográficas de la punción ecoguiada de células tumorales en el LLI. Se observa la aguja (flecha) en el extremo distal del LLI antes de la infusión de la suspensión celular (A) y finalizada la punción, puede observarse un nódulo hiperecoico correspondiente a la suspensión celular (entre las flechas, B). García-Alonso et al. 2013

Como ocurre con el implante de piezas tumorales, la inducción de tumores por este método nos permite una buena monitorización del desarrollo del tumor así como la realización pareada de estudios *in vitro*<sup>274</sup> e *in vivo*<sup>275</sup>, forma en la que nuestro Grupo lleva trabajando en los últimos años; pero, al contrario que en el implante de piezas

---

tumorales, la infusión o inyección de células tumorales directamente en el órgano de interés, en nuestro caso el hígado para inducir MHCCR, puede hacerse a partir de un abordaje guiado por ecografía (Figura 39), con lo cual, eliminamos casi en su totalidad la manipulación quirúrgica necesaria para administrar las células, siendo necesaria únicamente una punción<sup>276,277</sup>.



# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



---

## Hipótesis de trabajo

Un magnetofluido de NpM de óxido de hierro (III) funcionalizadas con peptidomiméticos RGD administrado vía arteria hepática en animales portadores de MHCCR debería:

- Adherirse selectivamente a los implantes tumorales debido a que el dominio extracelular de las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  actúa como diana de los peptidomiméticos RGD empleados para la funcionalización de las NpM.
- Actuar como un agente de contraste selectivo de las MHCCR, permitiendo una mejor detección mediante técnicas convencionales de radiodiagnóstico (IRM), incluso de aquellas metástasis que por su pequeño tamaño no sería, en principio, posible detectar.
- Adicionalmente, tras exponer las metástasis con NpM-RGD a un campo magnético alterno de suficiente frecuencia e intensidad, éstas NpM-RGD deberían generar un incremento térmico en el tumor capaz de inducir destrucción selectiva.

Para comprobar estas hipótesis, se plantea un estudio combinando experimentos *in vitro*, *ex vivo* y por último *in vivo* en un modelo murino de MHCCR, capaz de imitar las condiciones clínicas que presentan los pacientes afectados por esta patología.

## Objetivos

Los objetivos de este trabajo, por tanto, son:

- Comprobar que las NpM sintetizadas por el Dpto. de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencia y Tecnología (Dra. Oihane Arriortua) son seguras, biocompatibles y capaces de inducir HT en el parénquima hepático, tras su administración por vía sistémica.
- Demostrar, *in vitro*, el depósito o la adhesión selectiva de dichas NpM a la línea celular CC531 (empleada para la inducción tumoral), tras la funcionalización con peptidomiméticos RGD.
- Desarrollar un modelo quirúrgico experimental, seguro y reproducible, que permita un abordaje vascular similar al empleado en clínica humana para el tratamiento intravascular selectivo de MHCCR.
- Estudiar la biodistribución de las NpM-RGD una vez infundidas a animales portadores de implantes tumorales.
- Valorar la utilidad de las NpM-RGD como método de contraste selectivo para la detección de MHCCR.
- Analizar la capacidad de las NpM-RGD para inducir HT *in vivo* y su utilidad como terapia en el tratamiento de MHCCR en un modelo murino.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



En este apartado se describen sucesivamente los materiales utilizados (nanopartículas, células tumorales y animales), el equipamiento empleado, así como los diferentes procedimientos practicados. Por último se exponen las experiencias diseñadas para el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral.



## **Materiales**

### **A. Nanopartículas magnéticas**

En las diferentes experiencias que componen este trabajo de Tesis Doctoral se han utilizado dos tipos distintos de NpM, con una serie de modificaciones posteriores a su síntesis.

#### *1. Nanopartículas de síntesis propia*

##### **Síntesis de NpM**

La síntesis de nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) superparamagnéticas, fue realizada por la Dra. Oihane Arriortua, del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la UPV/EHU, durante el desarrollo de su trabajo de Tesis Doctoral<sup>278</sup>. El procedimiento elegido para ello fue el método de descomposición térmica de precursores metal-orgánicos<sup>148</sup>. Las NpM resultantes de este método se emplearon como semilla para la síntesis posterior de NpM de mayor tamaño<sup>279</sup>.

Estas NpM son de naturaleza altamente hidrófoba y, puesto que se usarán en un modelo biológico *in vivo*, se hace necesario su adaptación para un medio acuoso. Para producir este cambio hay descritos cuatro protocolos experimentales: la modificación del ligando, su intercambio, la incorporación de un recubrimiento orgánico de polímeros de alto peso molecular o los estabilizadores inorgánicos que generan una capa adicional sobre el núcleo de las NpM mediante enlaces covalentes (Figura 40).

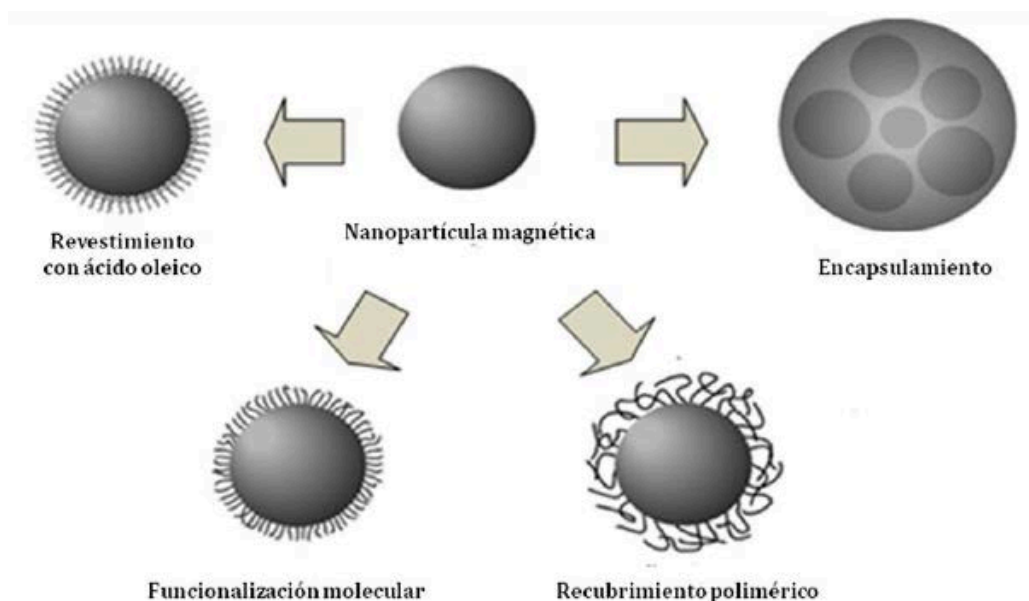


Figura 40. Métodos de recubrimiento de NpM

Para el recubrimiento de las NpM empleadas en este trabajo de Tesis Doctoral, se optó por utilizar polímeros de alto peso molecular; más concretamente, el protocolo experimental se basó en la adición de moléculas anfifílicas que se agregan a los ligandos superficiales de las NpM mediante interacciones hidrofóbicas, dando como resultado la creación de una bicapa orgánica, la cual orienta hacia el exterior de las NpM su región hidrofílica. El polímero anfifílico empleado fue el poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) (PMAO) (Figura 41) ya que presenta un elevado número de terminaciones alifáticas que permiten más sitios de anclaje a la monocapa interior de las NpM<sup>280</sup>.

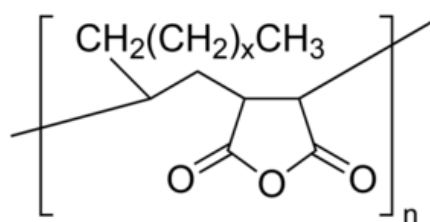


Figura 41. Representación esquemática de la fórmula estructural del PMAO (Fuente: Sigma-Aldrich)

## Caracterización estructural, morfológica y magnética de las NpM

Para conocer las características estructurales y morfológicas y la respuesta magnética de las NpM sintetizadas por nuestro Grupo se emplearon técnicas de:

- Difracción de Rayos X (XRD), que aporta información sobre la estructura, la cristalinidad y el tamaño de partícula.
- Microscopía Electrónica de Trasmisión (TEM).
- Espectroscopia de Infrarrojo (IR), para confirmar la presencia de los ligandos unidos a la superficie de las NpM.
- Difusión Dinámica de la Luz (DLS) y Análisis Termogravimétrico (TGA), para conocer la cantidad de materia orgánica en el producto final.

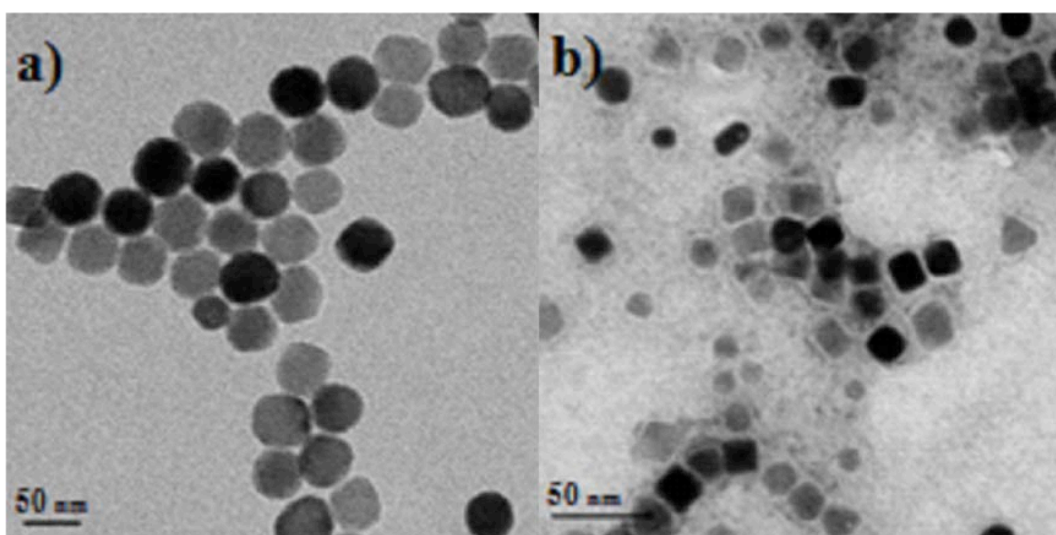


Figura 42. Microfotografía de Microscopía Electrónica de Trasmisión (TEM) de las NpM sin recubrimiento (A) y con recubrimiento de PMAO (B).

La XRD constató la presencia de estructuras nanocristalinas, hecho que se corroboró con análisis de las NpM mediante TEM; técnica que además permitió descartar la presencia de agregados interparticulares y determinar el tamaño de las NpM que resultó de  $19 \pm 2$  nm (Figura 42A). Además, gracias a las imágenes y medidas obtenidas mediante esta técnica, se pudo comprobar que el recubrimiento con PMAO no afectaba a su tamaño ni causa la agregación entre las NpM (Figura 42B).

La caracterización de las propiedades magnéticas de las NpM se realizó mediante Resonancia Magnética Electrónica (EMR) y medidas de imanación frente al campo aplicado y frente a la temperatura. Por los datos derivados del espectro obtenido mediante EMR (Figura 43), era de esperar una alta tasa de absorción (SAR) en las NpM sintetizadas y por tanto una alta capacidad de inducir HTM.

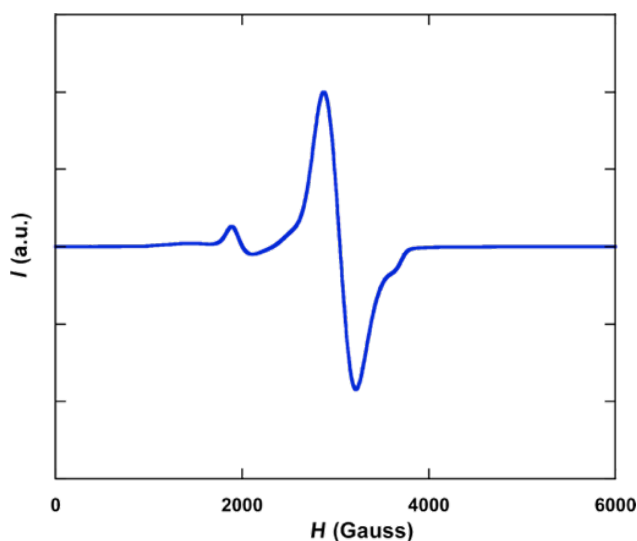


Figura 43. Espectro obtenido mediante Resonancia Magnética Electrónica (EMR) de las NpM.

Estas propiedades se demostraron tras realizarse medidas del SAR en NpM sometidas a campos magnéticos alternos a distintas frecuencias (149, 302, 676 y 1030 kHz) (Figura 44). Para la realización de éstas medidas, las NpM fueron dispersadas en agua. Los mejores valores de SAR obtenidos correspondieron a la exposición al campo de mayor frecuencia (1030 kHz), sin embargo para los experimentos *in vivo* se decidió el empleo de una frecuencia de campo de 606 kHz, ya que a dicha frecuencia, los valores de SAR eran suficientemente altos como para tener capacidad de inducir HT. Además, al someter a las NpM a un campo de 606 kHz de frecuencia y una intensidad de 14 kA/m, la interpolación lineal dio un valor de SAR de 900 W/g en las muestras analizadas.



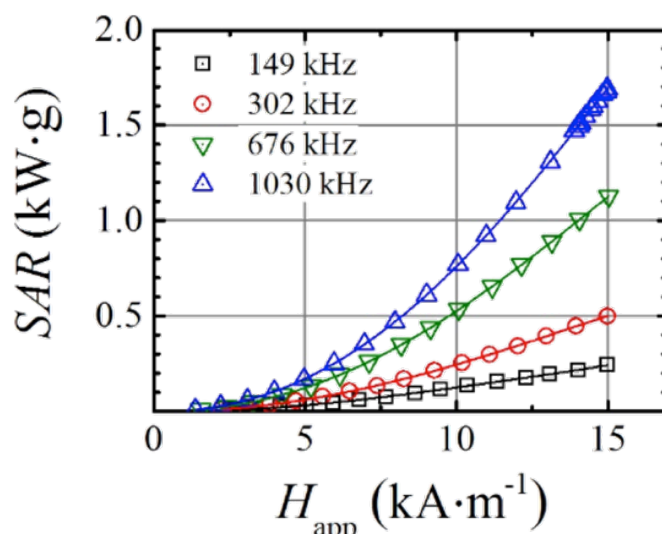


Figura 44. Representación gráfica de los valores de SAR obtenidos tras la exposición a un campo magnético ( $H_{app}$ ) a diferentes frecuencias en NpM cubiertas con PMAO y funcionalizadas con RGD.

### Funcionalización con Peptidomiméticos RDG

Tras la adición del PMAO, se procedió a la hidrólisis de los grupos anhídrido terminales del polímero para formar en su lugar grupos carboxílico terminales (Figura 45), necesarios para la posterior reacción con un grupo amida en el siguiente paso del proceso de síntesis de NpM de adhesión selectiva a la superficie de las células o de los implantes tumorales.

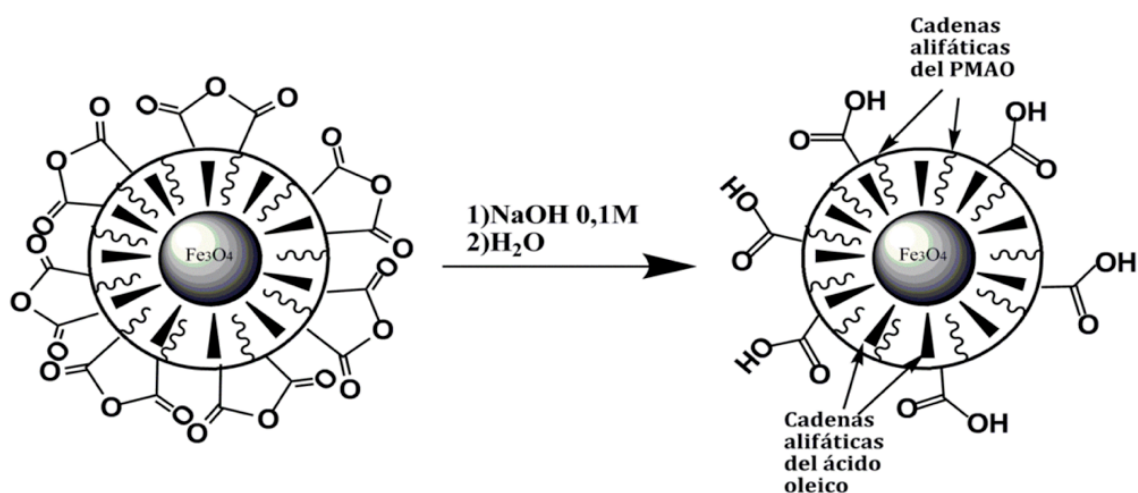


Figura 45. Representación esquemática de la hidrólisis del PMAO con NaOH 0,1M para la formación de grupos carboxilo terminal.

La funcionalización de las NpM se realizó mediante la adición de una secuencia peptídica sintética formada por 3 aminoácidos: arginina, glicina y ácido aspártico o secuencia RGD [Arg-Gly-Asp-NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>] que contiene un grupo azida terminal (Figura 46).

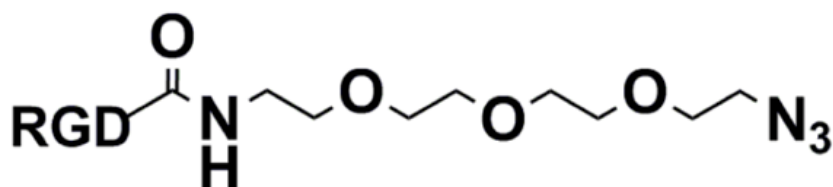


Figura 46. Representación esquemática de la fórmula estructural del peptidomimético RGD con un grupo azida terminal.

Ésta unión se realizó mediante reacciones del tipo “química click”<sup>281–283</sup> por la Dra. Maialen Sagartzazu Aizpurua, la Dra. Zaira Monasterio Peiteado y el Prof. Jesús María Aizpurua del Dpto. de Química Orgánica I de la Facultad de Ciencias Químicas de la UPV/EHU.

Sin embargo, esta unión no pudo hacerse de manera directa ya que el extremo carboxílico terminal de la NpM no reacciona con el grupo azida terminal del peptidomimético RGD, por lo que se hizo necesaria la adición de una molécula intermedia o *linker*. Dicha molécula es un carbamato que además cuenta en su estructura con una alquilamina y un cliclooctino (2-(2ciclooct-2-in-1-iloxi)etoxietil(2-aminoetil) carbamato) (Figura 47), capaz de producir la reacción de química “click” con el grupo azida del peptidomimético RGD.

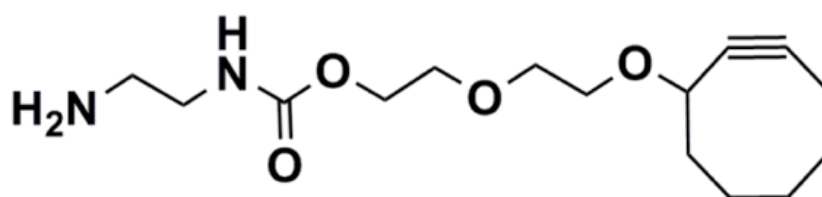


Figura 47. Representación esquemática del linker o molécula intermedia.

A modo resumen, el proceso de funcionalización de las NpM con el peptidomimético RGD consistió en: activación de los grupos carboxílico terminales de las NpM por hidrólisis, formación de amidas entre los extremos carboxílicos y grupo amino terminal del *linker*, bloqueo de las cargas superficiales con TRIS ( $C_4H_{11}O_3N$ ) y, por último, la reacción de química “click” entre el *linker* con las azidas terminales del RGD (Figura 48).

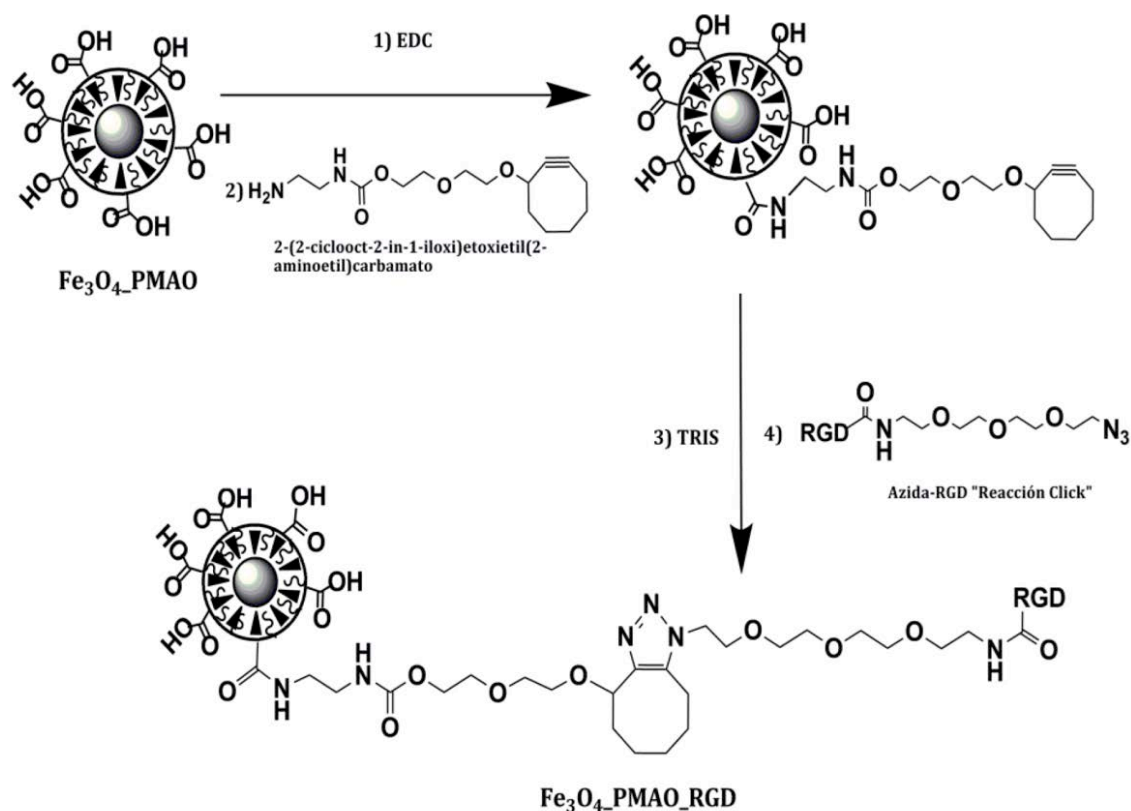


Figura 48. Resumen esquemático de los pasos dados para la funcionalización de las NpM con peptidomiméticos RGD.

## 2. Nanopartículas comerciales

El otro tipo de NpM empleadas en los experimentos *ex vivo* fueron las adquiridas a la empresa Nanogap Sub-Nm-Powder, S.A (A Coruña, España).

Del catálogo de materiales magnéticos con los que cuenta esta compañía, se emplearon las NpM con referencia NGAP NP FeO-2204. Éstas NpM, al igual que las sintetizadas por la Dra. Arriortua, son de mineral de magnetita u óxido ferroso-férrico y están recubiertas con ácido poliacrílico y dispersas en agua. El diámetro de las NpM era de  $10 \pm 2,5$  nm (Figura 49A y B) y con un comportamiento superparamagnético a temperatura ambiente, con una magnetización de saturación de aproximadamente 50 emu/g.

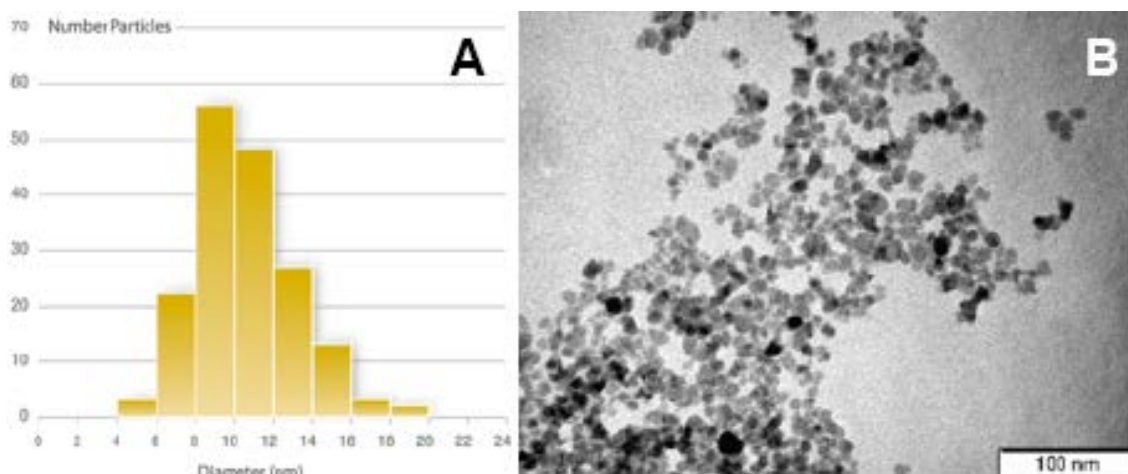


Figura 49. Diagrama de barras con la distribución del diámetro (A) y microfotografía de microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas (TEM) (B) NGAP NP FeO-2204. Imágenes tomadas de NpM [tp://www.nanogap.es](http://www.nanogap.es)

## B. Peptidomiméticos RGD

Los peptidomiméticos que se describen en este apartado, empleado para estudios de captación selectiva por el tejido tumoral, también fueron desarrollados y sintetizados por la Dra. Maialen Sagartzazu Aizpurua, la Dra. Zaira Monasterio Peiteado y el Prof. Jesús María Aizpurua, al igual que los empleados para la funcionalización de las NpM.

### 1. Peptidomiméticos RGD-fluoresceína

El complejo RGD-fluoresceína ha sido usado en esta Tesis Doctoral para analizar la afinidad de la secuencia RGD por la línea tumoral CC531 *in vitro*. Para poder visualizar y realizar una determinación de tipo cuantitativa del RGD presente en los cultivos celulares, mediante técnica “click” se añadió un fluoróforo, la fluoresceína, que pudo ser cuantificado y visualizado empleando un lector de fluorescencia y un microscopio óptico de fluorescencia.

## 2. Peptidomiméticos RGD-yodado

Dentro de las técnicas de radiodiagnóstico, la TCMC es una de las más empleada en la detección de tumores, siendo necesario en la mayoría de los casos el uso de contrastes yodados para obtener imágenes de TCMC de mayor capacidad diagnóstica.

El Visipaque® es un agente de contraste intersticial, yodado, de uso extendido en el ámbito radiológico. Sin embargo, éste y otros contrastes similares no muestran afinidad selectiva por los tejidos tumorales (Figura 50), y con frecuencia no permiten distinguir con claridad el tejido tumoral del sano. Por esto es de gran interés el desarrollo de soluciones de contraste con alta afinidad por los tejidos tumorales.

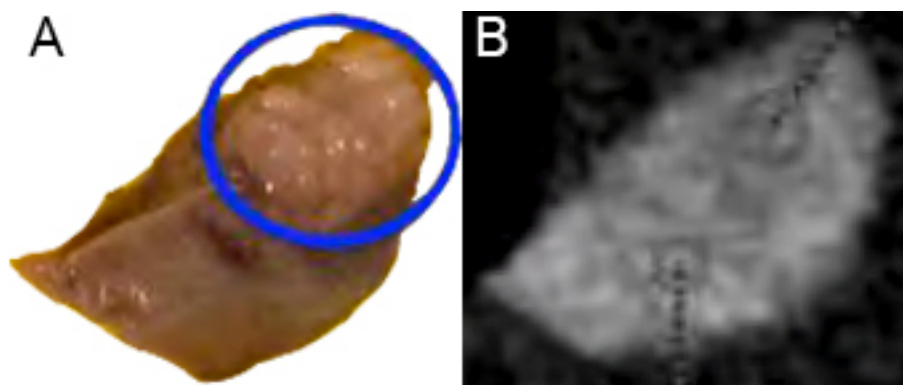


Figura 50. Fotografía de la biopsia hepática del LLI con implante tumoral en su extremo distal (círculo azul) (A) e imagen obtenida mediante TCMC de la misma pieza tras la administración de contraste yodado Visipaque® (B).

En esta línea, la Dra. Maialen Sagartzazu Aizpurua y la Dra. Zaira Monasterio Peiteado del Dpto. de Química Orgánica I de la Facultad de Ciencias Químicas de la UPV/EHU, desarrollaron un contraste yodado adherido a la cadena de peptidomiméticos RGD con alta afinidad por las integrinas  $\alpha_V\beta_3$  que se encuentran sobreexpresadas en el tejido tumoral.

Tras la síntesis del compuesto yodado y de los RGD por separado, ambos componentes se unieron, al igual que en el caso de las NpM y de la fluoresceína, mediante técnica “click”. Finalmente, antes de su uso en animales, los RGD-I se homogeneizaron con un

equivalente molar de (L)-ácido láctico y posteriormente disuelto en suero salino para su inyección en ratas.

## C. Reactivos biológicos

### 1. Animales de experimentación

Las experiencias *in vivo* expuestas en este Trabajo se han llevado a cabo en ratas, tanto sanas como portadoras de implantes tumorales en el LLI del hígado.

Para ello, se han empleados ratas singénicas de la cepa WAG/RijHsd, compradas en 2011 a Harlan Laboratories, Inc. y criadas y estabuladas en el Animalario del Campus de Bizkaia de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU – Sección del Departamento de Cirugía y Radiología y Medicina Física.

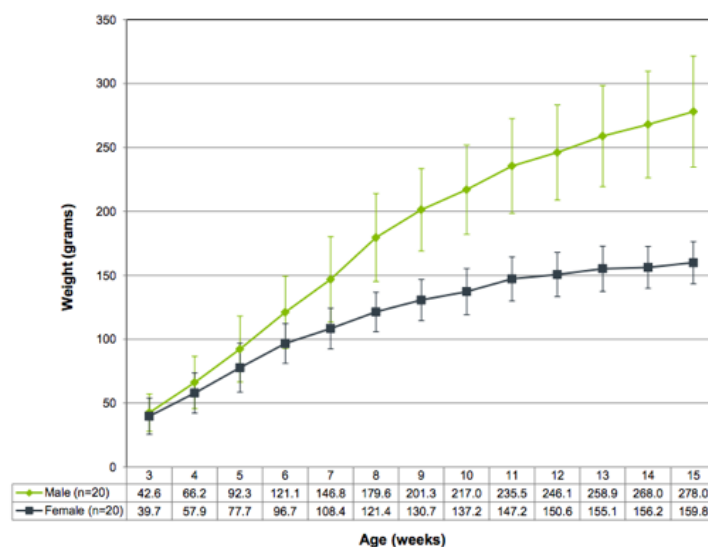


Figura 51. Curva de crecimiento para ratas machos (verde) y hembras (negro) de la cepa WAG/RijHsd. Fuente: Charles River

Todos los animales empleados han sido machos de entre 8 y 10 semanas y un peso aproximado de 270-290 gramos (Figura 51), mantenidos en jaulas de plástico con lecho de Viruta Ultrasorbible Premium Plus (ref.: 33005, Panlab) y alimentadas con pienso

A04 Standard Safe (ref.: SF404, Panlab) y agua *ad libitum*, en un ritmo de luz/oscuridad de 12 horas comenzando a las 7 de la mañana.

## 2. *Cultivos celulares*

Las células empleadas tanto para los experimentos *in vitro* como para el desarrollo de metástasis hepáticas en el modelo murino *in vivo* se corresponden con la línea tumoral de adenocarcinoma de colon (ACC) CC531 (Figura 52) (ref.: 500387; Cell Line Services, Alemania), adquiridas en pase 21 en el año 2008.

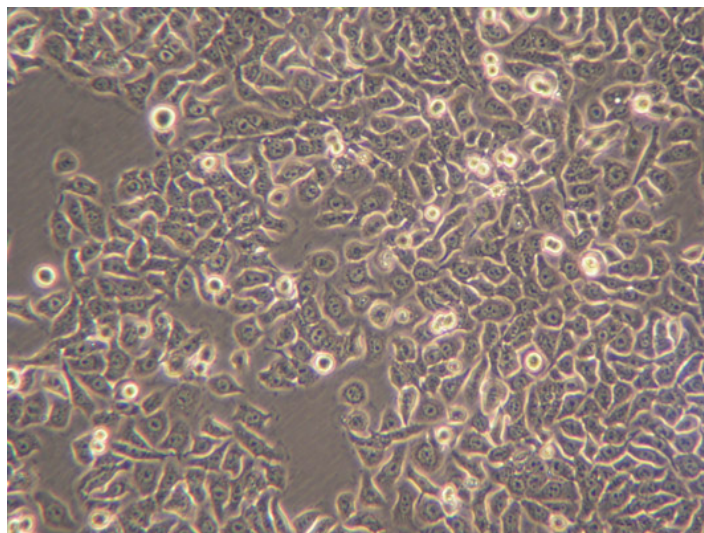


Figura 52. Fotografía de Microscopía de Campo Claro de un cultivo tipo de la línea celular CC531.



---

## Equipamiento

### A. Sala de Cultivos

Los cultivos celulares empleados en las experiencias que más adelante se detallan, se realizaron en el Laboratorio de Cultivos Celulares Animales del Departamento de Cirugía y Radiología y Medicina Física de la UPV/EHU.

Este laboratorio cuenta con los equipos necesarios que el mantenimiento, manipulación, crecimiento y desarrollo de los experimentos requirió:

- Campana de flujo laminar AH-100 (Telstar, España).
- Cabina de seguridad biológica HR1200-II A2 (Haier, China)
- Microscopio invertido de campo claro y contraste de fases CK30 (Olympus, Japón) (Figura 53A).
- Centrifugadora refrigerada Labofuge Primo 400R (Heraeus, Alemania).
- Incubador de CO<sub>2</sub> MCO-15A (Sanyo, Japón).
- Incubador de CO<sub>2</sub> MCO-19AIC UV (Sanyo, Japón).
- Lector Multimodal de placas Multiskan EX (Thermo Scientific, Estado Unidos) (Figura 53B).
- Fluorímetro de placas SynerGy HT (BioTEK, EEUU).
- Contador de células NucleoCounter NC-100 (Chemometec, Dinamarca) (Figura 53C).
- Ultracongelador vertical de -80° C modelo 80 MDF-U53V (Sanyo, Japón).
- Recipiente de nitrógeno líquido autopresurizado TP35 (Air Liquide, Francia).
- Recipiente de nitrógeno líquido Asperge 70 (Air Liquide, Francia).

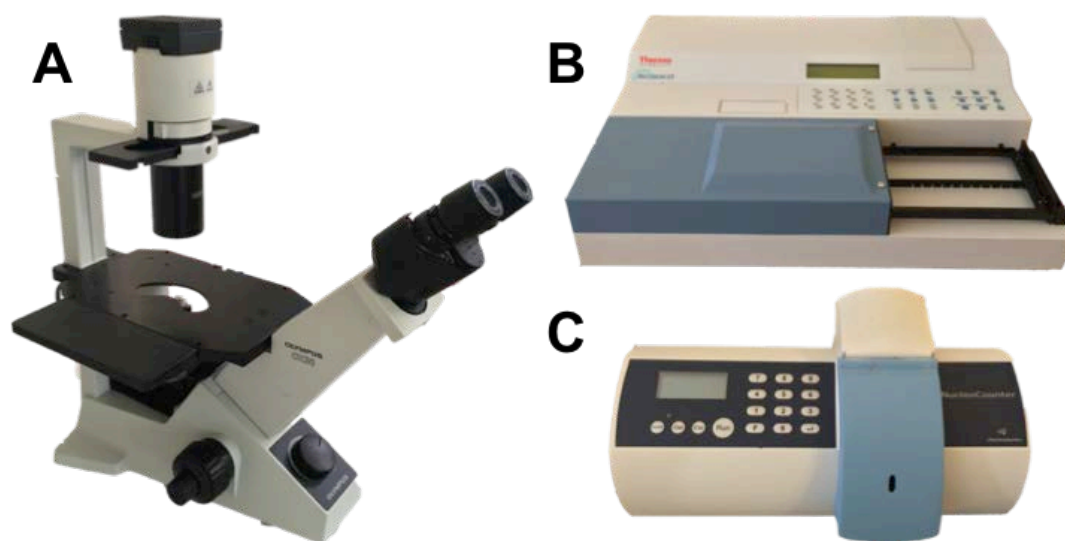


Figura 53. Detalle de alguno de los aparatos del Laboratorio de Cultivos.

Para la adquisición de las imágenes de Microscopía Óptica de Fluorescencia se recurrió a los Servicios Generales de Apoyo a la Investigación (SGIker) de la UPV/EHU, con la ayuda de la Profa. Ana Alonso Varona.

## **B. Quirófano experimental**

El Laboratorio de Cirugía Experimental del Departamento de Cirugía y Radiología y Medicina Física de la UPV/EHU cuenta con dos quirófanos experimentales para la realización de los procedimientos en animales descritos en este trabajo de Tesis Doctoral. Uno de ellos de uso general, y otro con equipamiento de microcirugía para los procedimientos que requieran del empleo de elementos de magnificación. Ambos están dotados con equipos de anestesia inhalatoria con vaporizadores de isoflurano. Además el laboratorio de microcirugía cuenta con un microscopio quirúrgico Wild M651 (Leica, Alemania) dotado de sistema doble de visión para dos investigadores (Figura 54) y un ecógrafo MyLab60 Xvision con una sonda de 6-18 MHz (Esaote, Italia).



Figura 54. Microscopio quirúrgico Leica Wild M651 del quirófano de microcirugía.

## C. Inductor de radiofrecuencias

La aplicación experimental, *ex vivo* e *in vivo*, de la terapia basada en HT requirió del desarrollo de varios prototipos de IRF; en concreto, para este trabajo de Tesis se emplearon los prototipos EM04 y EM06, ambos diseñados y construidos por el Dr. Eneko Garaio y el Prof. Fernando Plazaola del Dpto. de Electricidad y Electrónica y el Prof. Jose Ángel García del Dpto. de Física Aplicada II de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la UPV/EHU.

En este apartado, se recoge las características generales de ambos prototipos, descritos y testados al detalle en la Tesis Doctoral de Dr. Garaio<sup>284</sup>.

### 1. Prototipo EM04

El primero de los prototipos, el EM04, se utilizó para los experimentos de HT sobre hígado aislado. El equipo está basado en un circuito LC resonante en paralelo alimentado por un amplificador (ref.: 1140LA, Bell Electronics NW<sup>Inc</sup>, EEUU), con una potencia disponible ( $P_{AV}$ ) de 1 kW y una impedancia de salida  $Z_S = 50 \Omega$ . En la Figura 55 se muestra el esquema del circuito eléctrico del prototipo EM04.

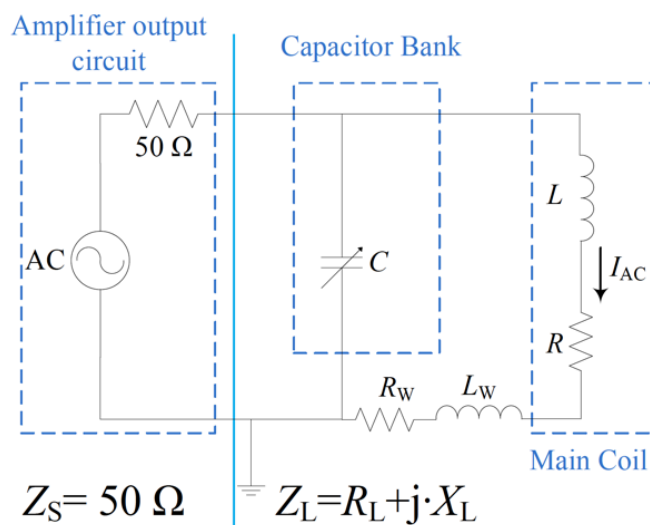


Figura 55. Representación esquemática del circuito eléctrico del IRF EM04. Figura tomada de la Tesis doctoral de Eneko Garaio.

La bobina principal del IRF se construyó con tubo de cobre de 8 mm de diámetro, con una longitud de 6,6 cm de longitud y 5 cm de diámetro y 6 vueltas. La simulación llevada a cabo en 2 dimensiones para determinar la distribución del campo magnético (Figura 56), determinó que las variaciones del campo era menores al 4% y que la bobina del IRF tiene un volumen útil de 36 mm de diámetro y 22 mm de altura.

El banco de condensadores está formado por 7 condensadores de 100 nF (Faradios) (ref.: CHH6010M, High Energy C<sup>o</sup>, EEUU) conectados todos ellos en paralelo, pero con interruptores que permiten cambiar su configuración a todo en serie, con todas las opciones intermedias posibles (Figura 57).

De esta forma, la mínima frecuencia del IRF, obtenida con todos los condensadores en paralelo, es de 125 kHz; y la máxima, con todos los condensadores dispuestos en serie, es de 856 kHz. La máxima intensidad de campo, 18 kA/m, se obtiene con 460 kHz.

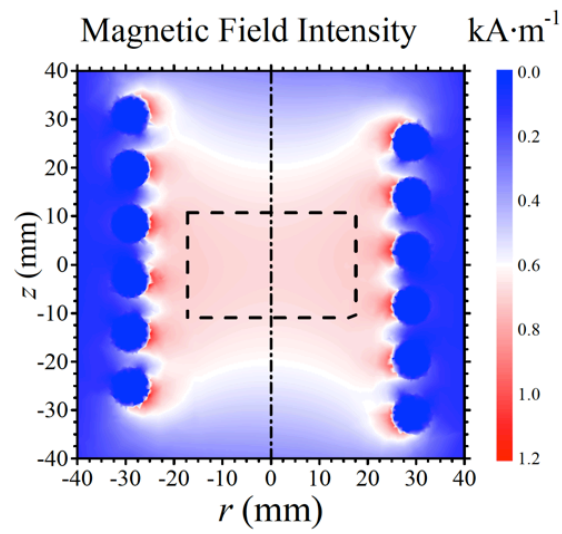


Figura 56. Representación de la intensidad del campo magnético calculada por el método de elementos finitos (FEM). La línea de puntos encierra el espacio donde el campo es homogéneo, con variaciones menores del 4%. Figura tomada de la Tesis doctoral de Eneko Garaio.

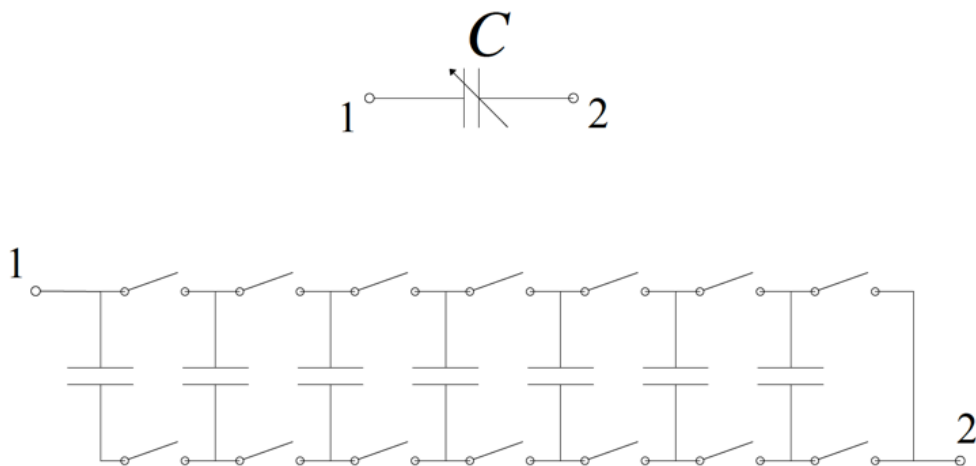


Figura 57. Esquema del banco de condensadores del prototipo EM04. Tomada de la Tesis doctoral del Dr. Garaio.

## 2. Prototipo EM06

Los experimentos de HT *in vivo* se llevaron a cabo en un prototipo similar al anterior, adaptado a las condiciones y tamaño requeridos por los animales de experimentación.

El prototipo EM06 está basado en un circuito LCC resonante en paralelo, alimentado por un amplificador (ref.: 1240LA, Bell Electronics NW<sup>Inc</sup>, EEUU), que genera el doble de  $P_{AV}$  que el usado para el prototipo anterior, 2 kW.

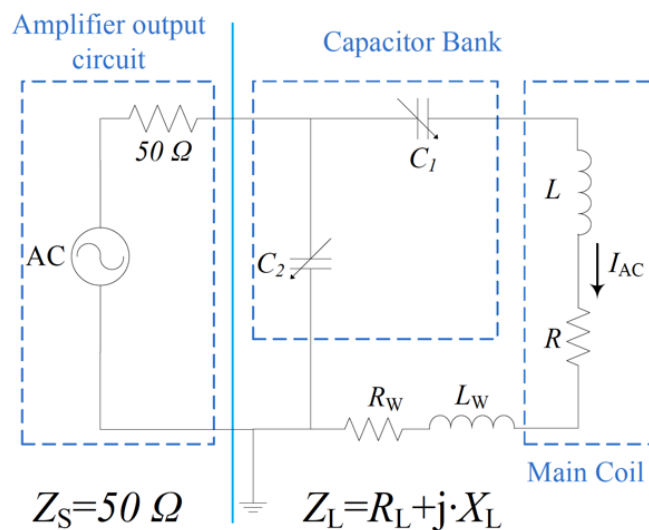


Figura 58. Circuito eléctrico del modelo EM06. Figura tomada de la Tesis doctoral de Eneko Garaio.

El circuito eléctrico del EM06 es el mismo que el del prototipo el EM05 (Figura 58) empleado para la realización de las mediciones *in vitro* del SAR de las NpM empleada en las experiencias de esta Tesis Doctoral.

Debido al tamaño de las ratas, hubo que rediseñar e implementar el tamaño de la bobina del IRF para adaptarlo a volúmenes diez veces mayores. El diámetro y longitud de la bobina se ampliaron hasta los 9 cm, formada por 9 vueltas de tubo de cobre de 6 mm de diámetro. Con todo esto se consiguió volumen útil de 3,1 cm de longitud y 4,6 cm de diámetro, con variaciones menores del 4% en el área marcada (Figura 59).

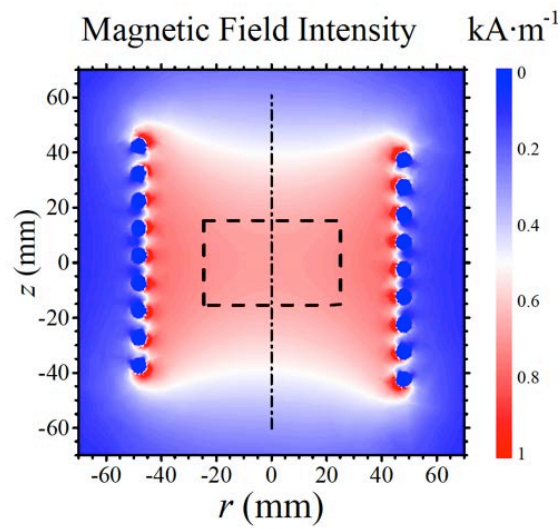


Figura 59. Representación de la intensidad del campo magnético (generado por el EM06) calculada por FEM. La línea de puntos encierra el espacio donde el campo es homogéneo, con variaciones menores del 4%. Figura tomada de la Tesis doctoral de Eneko Garaio.

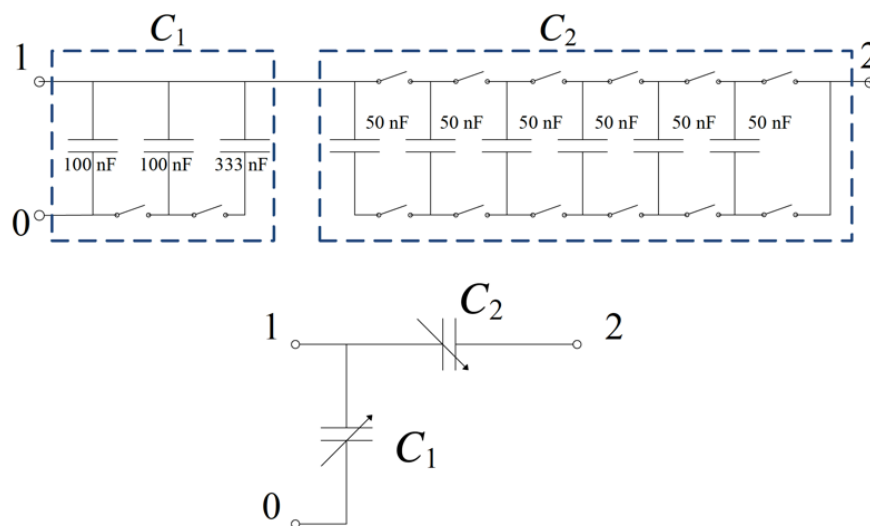


Figura 60. Representación esquemática del banco de condensadores del modelo EM06. Figura tomada de la Tesis doctoral de Eneko Garaio.

En este caso, el IRF cuenta con dos bancos de condensadores (Figura 60). El banco C1 está formado por dos condensadores de 100 nF en paralelo (iguales al prototipo EM04) y uno de 333 nF (ref.: CHN6033M, High Energy C<sup>o</sup>, EEUU); el banco C2 lo componen 6 condensadores de 100 nF en paralelo (ref.: CSP1510400, High Energy C<sup>o</sup>, EEUU). Al igual que el modelo previo, la construcción del IRF permite cambiar la disposición de ambos bancos de condensadores, lo que permitió un rango de frecuencias posibles de 100 – 1000 kHz.

Tabla 4. Rango óptimo de trabajo para el prototipo EM06. Tomado de Tesis Doctoral de Eneko Garaio

|           | <b>C1 (nF)</b> | <b>C2 (nF)</b> | <b>Frecuencia (KHz)</b> | <b>PL/Pav</b> | <b>Intensidad (KA/m)</b> |
|-----------|----------------|----------------|-------------------------|---------------|--------------------------|
| <b>1</b>  | 533            | 300            | 156                     | 0,95          | 18                       |
| <b>2</b>  | 533            | 250            | 165                     | 0,99          | 18                       |
| <b>3</b>  | 533            | 200            | 179                     | 0,98          | 18                       |
| <b>4</b>  | 533            | 150            | 201                     | 0,88          | 18                       |
| <b>5</b>  | 200            | 66,7           | 305                     | 0,92          | 17                       |
| <b>6</b>  | 200            | 60             | 318                     | 0,93          | 17                       |
| <b>7</b>  | 200            | 50             | 343                     | 0,96          | 17                       |
| <b>8</b>  | 200            | 40             | 376                     | 0,98          | 16                       |
| <b>9</b>  | 200            | 37,5           | 387                     | 0,98          | 16                       |
| <b>10</b> | 200            | 33,3           | 405                     | 0,98          | 16                       |
| <b>11</b> | 200            | 25             | 461                     | 0,91          | 15                       |
| <b>12</b> | 100            | 16,7           | 574                     | 0,97          | 14                       |
| <b>13</b> | 100            | 12,5           | 649                     | 1,00          | 14                       |
| <b>14</b> | 100            | 10             | 720                     | 0,97          | 13                       |
| <b>15</b> | 100            | 8,3            | 782                     | 0,83          | 13                       |



A pesar del amplio abanico de frecuencias en que puede trabajar el EM06 (debido a las múltiples combinaciones entre todos los condensadores) el índice entre la potencia del circuito LCC y la potencia del amplificador ( $P_L/P_{av}$ ) solo se acerca a 1 (ideal) en 15 frecuencias (Tabla 4 y Figura 61). Por lo que el rango óptimo de trabajo se sitúa entre 156 – 782 kHz de frecuencia.

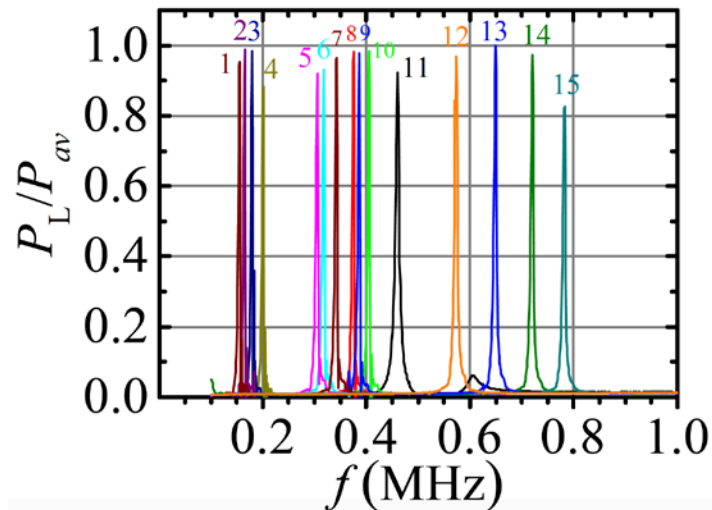


Figura 61. Representación del ratio entre  $P_L/P_{av}$ . Figura tomada de la Tesis doctoral de Eneko Garaio.

Podemos observar también, tanto en la Tabla 4 como en la Figura 61, que el producto  $P_L/P_{av}$  de la frecuencia en la que se realizaron los experimentos *in vivo* alcanza un valor de 1, es decir, que la potencia generada por el circuito de condensadores correspondió con la potencia emitida por el amplificador.

En ambos prototipos de IRF, debido a las altas corrientes que pasan por ellos, es necesario el uso de un sistema de refrigeración conectado a los equipos. Además, como puede verse en la Figura 62, todo estaba controlado a través del software informático LabVIEW desarrollado también por el Dr. Garaio.

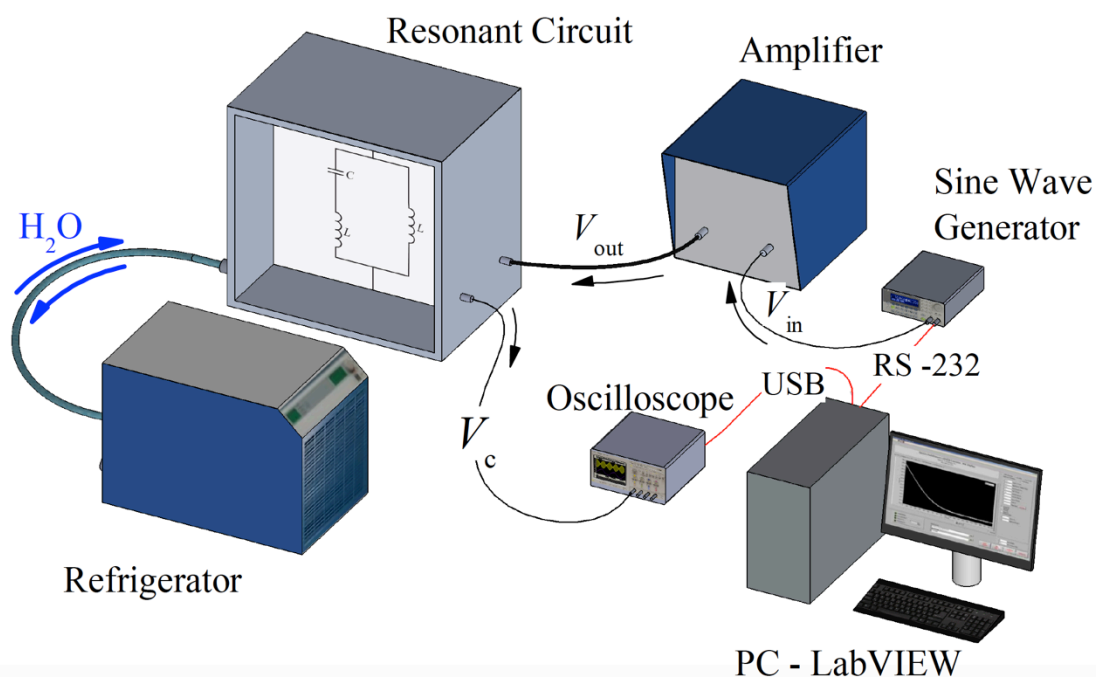


Figura 62. Esquema completo de todos los componentes que forman el IRF. Figura tomada de la Tesis doctoral de Eneko Garaio.

## D. Tomografía Computarizada Multicorte

Las pruebas de imagen mediante TCMC se realizaron en un escáner Toshiba de 64 detectores del Servicio de Radiología del Hospital de Galdakao-Usansolo, bajo la dirección y supervisión del Dr. Jose Javier Echevarría Uruga, radiólogo intervencionista de dicho Servicio.

## E. Imagen de Resonancia Magnética

Las pruebas de IRM se practicaron en las instalaciones de Osatek, S.A. en el Hospital de Galdakao-Usansolo, bajo la dirección y supervisión del Dr. Jose Javier Echevarría Uruga.

Para la localización, visualización y estimación de los depósitos de NpM-RGD en el tejido hepático y/o tumoral, se empleó un equipo Siemens Symphony de 1,5T. Se practicaron las secuencias axial y coronal STIR, DP\* y T2\*, en busca de cambios en la intensidad de señal (IS) compatibles con la presencia de Fe.

---

## Procedimientos

### A. Técnicas quirúrgicas

Los procedimientos experimentales a los que han sido sometidos los animales en este trabajo fueron aprobadas por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de la UPV/EHU con los códigos: CEBA/140/P02-01/2010/ALONSOVARONA, CEEA/407/2015 HERRERO DE LA PARTE y M20\_2016\_023\_HERRERO DE LA PARTE.

Los procedimientos aprobados incluyen técnicas de anestesia, inducción de tumores, obtención de hígado aislado *ex vivo*, desarrollo de una técnica de infusión intrarterial hepática y eutanasia de los animales.

#### 1. Protocolos anestésicos

En función del procedimiento al que fuera sometido el animal se siguió una pauta anestésica y analgésica diferente.

Para la administración inhalatoria, los animales fueron introducidos en primer lugar en una cámara con isoflurano (ref.: 646844.9, Nicholas Piramid Ltd., Reino Unido) al 4% con un flujo de 0,5 l/min de O<sub>2</sub> y 1 l/min de N<sub>2</sub>O para la inducción anestésica durante 2 – 3 minutos. Posteriormente, para el mantenimiento anestésico durante la duración del procedimiento al que fuera sometido el animal, la concentración de isoflurano se redujo a 1,5% manteniendo constantes los flujos de oxígeno y protóxido de nitrógeno.

La otra técnica anestésica, consistió en la administración intraperitoneal de un cóctel de Diazepam, Ketamina y Medetomidina. Los animales fueron pre-anestesiados con Diazepam i.p. (15 mg/kg) y, tras 10 minutos, se les administró Ketamina (80 mg/kg) y Medetomidina (0,5 mg/kg) también por vía i.p.

## *2. Inducción de tumores hepáticos*

El desarrollo de tumores de asiento hepático, se realizó mediante la inyección directa de células de CRC de la línea CC531, singénicas con la cepa de ratas albinas empleadas.

Previo a la inducción tumoral, se preparó una suspensión de células CC531 con una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml en medio Hank's (descrito más adelante). Los animales, anestesiados mediante anestesia inhalatoria, se colocaron en posición decúbito supino, se procedió a rasurar la zona y se aplicó una solución alcohólica para asepticar la zona. Se realizó una laparotomía subxifoidea de aproximadamente 15 mm y, con una ligera presión en la caja torácica, se extrajo y expuso el LLI sujetándolo con los dedos para inyectar 0,05 ml de la suspensión celular (25.000 células) con una aguja de 27 G. Tras retirar la aguja, se mantuvo una ligera presión sobre la zona de la punción con un trozo de espuma hemostática de gelatina Espongostán® Film (ref.: MS0001, Ethicon Inc., EEUU), para evitar posibles hemorragias. Tras devolver al lóbulo a su posición anatómica, se procedió a la sutura de la herida en dos planos mediante puntos simples sueltos, empleando sutura sintética absorbible de ácido poliglicólico (Coated VICRYL®, ref.: J310H Ethicon Inc., EEUU) de 4/0 para el plano muscular y seda trenzada de 3/0 (ref.: 55346, Lorca-Marín S.A., España) para la piel. Una vez suturada la herida quirúrgica, subcutáneamente se administró Meloxicam (2mg/kg) y se dejó al animal hasta su total recuperación bajo una fuente de calor. Tras la recuperación, cada 12 horas durante un máximo de 3 días, los animales recibieron Buprenorfina s.c. (0,05 mg/kg).

### **Seguimiento y estimación del volumen tumoral**

Aproximadamente, 25 días después de la inducción tumoral y bajo anestesia inhalatoria, se realizó un control ecográfico (Figura 63) para comprobar el estado de desarrollo tumoral, calcular su volumen y realizar la distribución aleatoria de los animales en los distintos grupos en cada serie experimental.

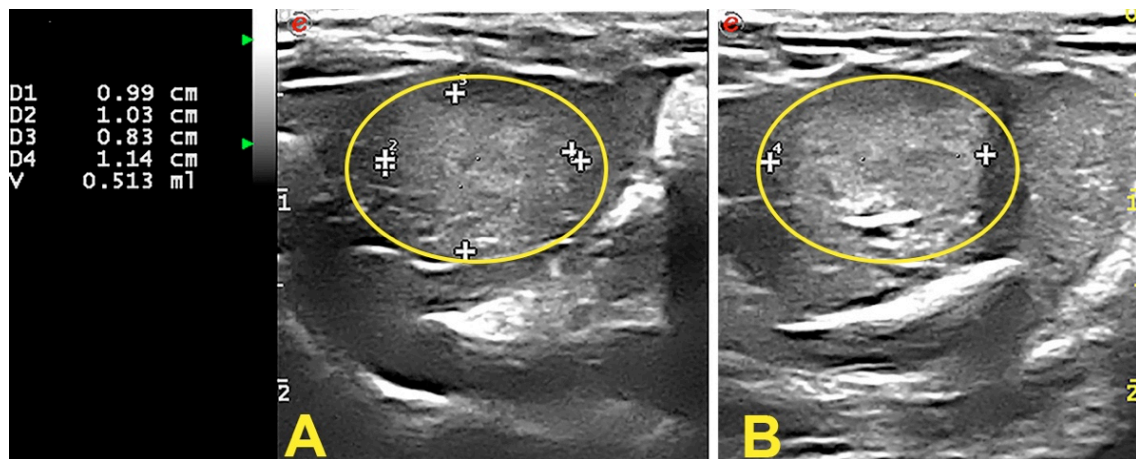


Figura 63. Imagen del control ecográfico realizado a los animales para evaluar el desarrollo y volumen tumoral, tomando medidas en corte axial (A) y sagital (B).

Para permitir una correcta exploración ecográfica, se rasuró el pelo a los animales; primero con una maquinilla eléctrica y, posteriormente, aplicando crema depilatoria Veet® y así conseguir una eliminación completa del pelo, dejando la piel expuesta.

Además de permitir el seguimiento y la valoración del desarrollo de metástasis sin necesidad de realizar una cirugía exploratoria, el análisis de las imágenes ecográficas también puede ser usado para predecir la necrosis tumoral esperada (NTE), debida al tamaño de los implantes.

Para ello, además de la ecografía de control a los 28 días, en algunos animales se realizó otra ecografía inmediatamente antes de extraer las muestras para los análisis histológicos. Se capturó una imagen en corte transversal del animal y, sin desplazar la sonda ecográfica, ésta se rotó sobre su propio eje obteniendo una imagen longitudinal del mismo punto a estudiar y, gracias al propio software del equipo, se determinó el volumen tumoral.

En secciones histológicas de los implantes tumorales de éstos mismos animales, que no fueron expuestos a ningún tratamiento experimental de los descritos en esta Tesis, el patólogo determinó el porcentaje de necrosis tumoral “natural”. Con ambos datos, la necrosis observada y el volumen tumoral, se llevó a cabo un análisis de regresión.

### 3. Obtención de hígado aislado e HT ex vivo

Empleando anestesia inhalatoria, se realiza una laparotomía media y, traccionando del marco duodenal hacia la derecha, se expone el pedículo hepático. Mediante disección roma con una pinza hemostática, se pasan dos hebras de seda 2/0 alrededor de la porta. Tras anudar la ligadura distal, que se utiliza para tracción, se procede a canalizar la vena porta con un catéter de teflón (Abocath® 20G) que se fija utilizando las dos hebras de seda.

Inmediatamente se administran 0,8 ml de heparina sódica para evitar la coagulación de la sangre en el interior del parénquima hepático. Mediante una bomba peristáltica se procede al lavado del hígado con suero fisiológico (hasta clarear completamente el parénquima hepático). Una vez completado el lavado se liga el pedículo del LLI, para excluirlo de la infusión de nanopartículas y disponer de un control interno de la experiencia. Por último, se procede a la ligadura de las venas suprahepáticas y, a continuación, se infunde la solución con NpM y se tapona el catéter portal.

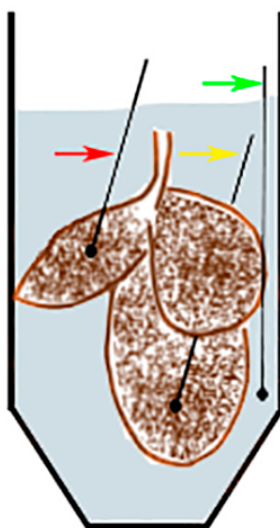


Figura 64. Esquema de colocación de las sondas de registro térmico para la exposición a HT ex vivo. La flecha roja señala la sonda emplazada en el LLD, la verde la sonda colocada en el medio de suspensión y la flecha amarilla señala la sonda térmica colocada en el LLI (que fue excluido y no recibió aporte de NpM).

El hígado infundido con NpM se introduce en un tubo cónico de 50 ml se deja suspendido inmerso en agua destilada o suero salino y con las sondas de control térmico emplazadas como refleja la Figura 64.

#### *4. Inyección y detección mediante TCMC de peptidomiméticos RDG-I*

Mediante el cóctel de fármacos formado por Diazepam/Ketamina/Medetomidina descrito anteriormente, se anestesió a los animales y se colocaron en posición decúbito prono, para realizar una primera secuencia exploratoria mediante TCMC (Figura 65) y obtener así los valores basales de atenuación hepática.



Figura 65. Exploración mediante TCMC de las ratas infundidas con RGD-I.

Una vez finalizado este primer procedimiento, en la base de la cola se colocó un torniquete a fin de dilatar y facilitar el acceso vascular a las venas de la cola. Empleando un catéter de poliuretano Introcan Safety® de 24G (ref.: 4251601-01, B. Braun, Alemania), se cateterizó la vena de la cola y, previa salinización de la vía, se infundió lentamente, 0,2 – 0,4 ml/ml, la suspensión de RGD-I. Una vez infundido, se administró de nuevo suero salino.

Transcurridos 1, 5 y 15 minutos de la infusión del contraste yodado selectivo, se procedió a realizar nuevas exploraciones de los animales mediante TCMC, valorándose la atenuación hepática y tumoral a los 5 minutos.

Finalizadas las secuencias de TCMC, se sacrificaron los animales, tomándose muestras del tejido hepático y tumoral para realizar análisis de ICP-MS e histopatológicos.

### *5. Técnica quirúrgica de infusión intrarterial hepática*

Bajo anestesia inhalatoria, el animal se colocó en posición decúbito supino sobre una manta calefactora y se practicó una laparotomía de 35 – 40 mm aproximadamente. Colocando una gasa humedecida con solución salina atemperada a 37° C, se extrajo el paquete abdominal a la derecha del animal para exponer el tronco celiaco y así localizar la arteria esplénica (Figura 66).

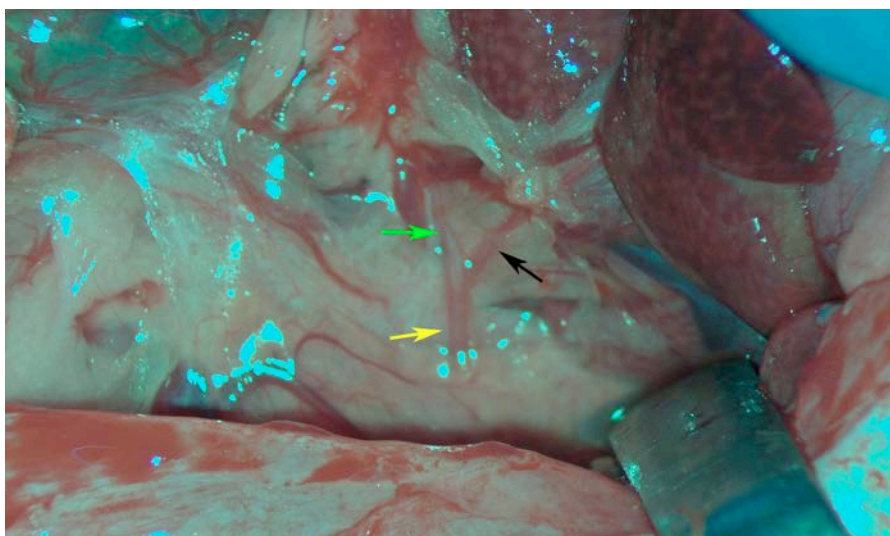


Figura 66. Fotografía del campo quirúrgico previo a la preparación de la arteria esplénica (flecha verde) para la colocación de la microcánula. Se observan también el tronco celiaco (flecha amarilla) y la arteria hepática (flecha negra).

Bajo microscopio quirúrgico, la arteria esplénica fue disecada y se puncionó empleando una aguja de 30G (Figura 67). Posteriormente se procedió al clampaje de forma reversible del tronco celiaco empleando clip de Yasargil para aneurismas cerebrales,



impidiendo así el sangrado por el orificio realizado, por el cual se introdujo un catéter de perfluorocarbono de 0,4 mm de diámetro externo y 0,2 mm de diámetro interno (ref.: 72-9030, Harvard Apparatus, EEUU) (Figura 68), que se guió hasta la bifurcación de la arteria hepática en el tronco celíaco.

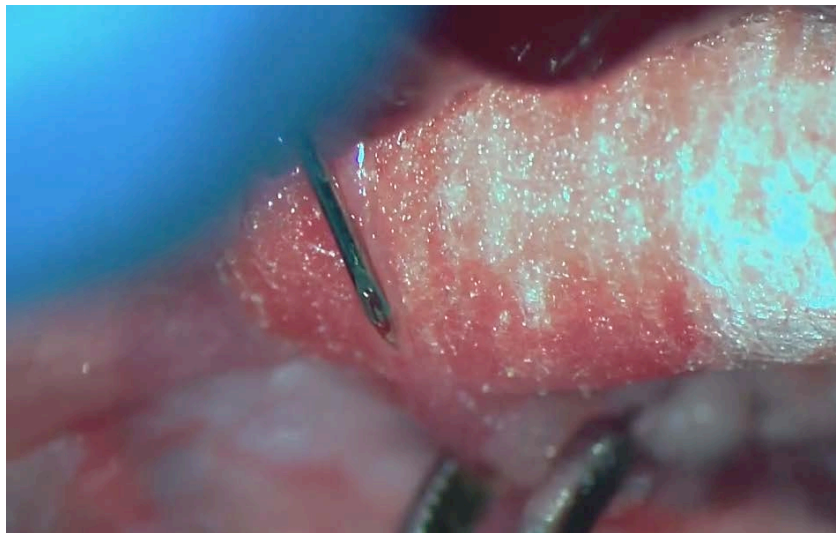


Figura 67. Punción de la arteria esplénica mediante aguja de 30 G.

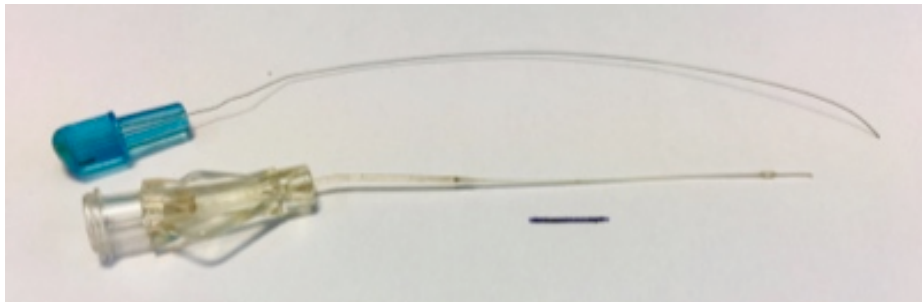


Figura 68. Microcánula empleada para la cateterización de la arteria esplénica. La escala representa 1 cm.

Una vez introducido el catéter (Figura 69), se fijó mediante otro clip de Yasargil a la arteria esplénica, retirándose inmediatamente el clip del tronco celiaco para permitir el flujo sanguíneo y que éste arrastre las NpM o el vehículo hasta el tejido hepático.

Finalizada la infusión, se retiró la cánula y se realizó una compresión directa con la ayuda de un bastoncillo, sujetando un trozo de Espongostán® Film durante 5 minutos

en la zona de punción de la arteria esplénica. Pasado este tiempo se comprobó la ausencia de hemorragias y se retiró el bastoncillo, dejándose el trozo de Espongostán® Film. Finalmente, se reintrodujo el paquete abdominal en su posición anatómica y se procedió al cierre de la herida en dos planos mediante puntos simples sueltos, empleando sutura sintética absorbible de ácido poliglicólico Coated VICRYL® de 4/0 con aguja cilíndrica (ref.: J310H, Ethicon Inc., EEUU) para el plano muscular y seda trenzada de 3/0 con aguja triangular (ref.: 55346, Lorca-Marín S.A., España) para la piel.

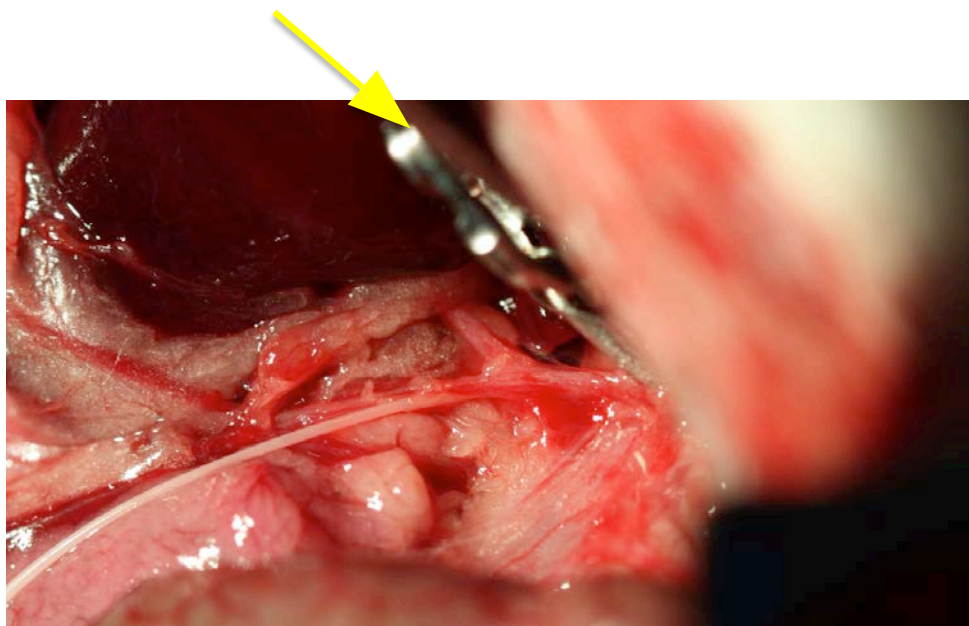


Figura 69. Arteria esplénica cateterizada con la microcánula (flecha amarilla).

Tras suturar la herida quirúrgica, se administró Meloxicam s.c. (2mg/kg) y se dejó al animal hasta su total recuperación bajo una fuente de calor. Una vez recuperados, cada 12 horas durante un máximo de 3 días, los animales recibieron Buprenorfina s.c. (0,05 mg/kg)

## 6. Hipertermia *in vivo*

Para aplicar la terapia de HT en el modelo murino *in vivo*, los animales fueron anestesiados empleando la mezcla de Diazepam/Ketamina/Medetomidina y colocados en posición decúbito supino sobre una superficie especialmente diseñada para introducir a los animales en el IRF.

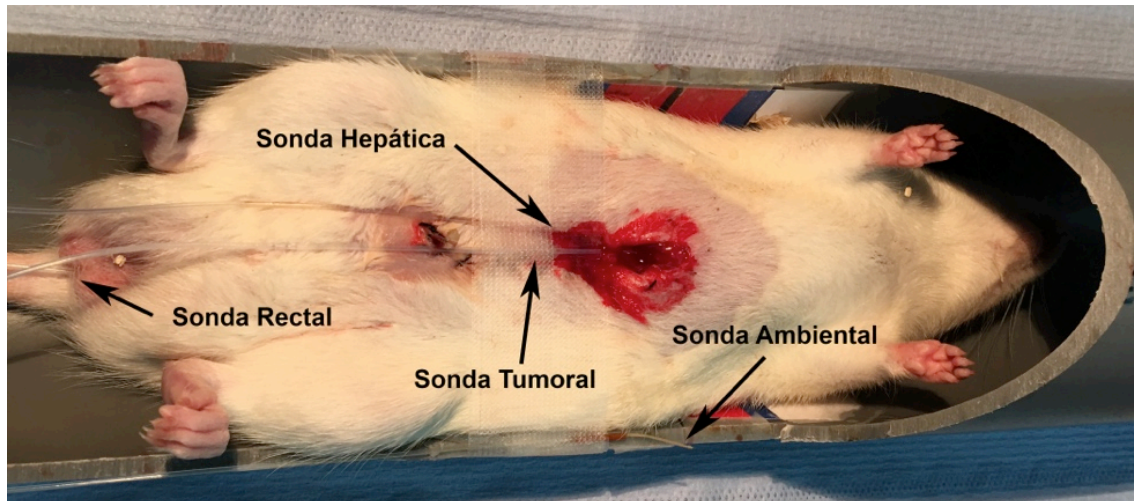


Figura 70. Fotografía de la colocación de las sondas para el registro de las variaciones térmicas durante la exposición al IRF.

Se limpió el área quirúrgica con una solución alcohólica y se les practicó una laparotomía subxifoidea de aproximadamente 1,5 – 2 mm de longitud. A través de ella, se extrajo el LLI portador del implante tumoral (en el caso de que el animal correspondiera a un grupo con metástasis) y se colocó en el interior del implante una sonda de control térmico mediante punción, para tomar datos de la evolución de la temperatura; también se colocó una sonda entre el LLI y el lóbulo lateral derecho (LLD), que permitió la obtención de los datos de temperatura correspondientes al parénquima hepático. Finalmente, otra sonda se colocó en el recto de los animales para registrar la temperatura corporal a lo largo de todo el periodo de exposición al campo magnético. Además, en el interior del anillo generador del campo magnético, también había otra sonda que monitorizó la temperatura ambiente dentro del IRF.

Una vez emplazadas las sondas (Figura 70), cada animal fue expuesto durante 21 minutos a un campo magnético con una frecuencia fija de 606 kHz y una intensidad de 14 kA/m, que se mantendría constante durante todo el procedimiento salvo que la sonda que registra la temperatura hepática llegase a los 43° C, momento en el que el campo oscilaba automáticamente entre los 4 y 14 kA/m para impedir que el hígado sobrepasase ese límite autoimpuesto de 43° C.

### *7. Toma de muestras*

Tras someter a los animales al procedimiento que corresponda según el grupo experimental al que fue asignado, se tomaron biopsias de tejido hepático y/o tumoral y de sangre. Si el animal no se encontraba bajo efectos de anestesia previa, se empleó una anestesia inhalatoria.

Para las biopsias de hígado y tumor, se practicó una laparotomía subxifoidea, se extrajo el LLI y se seccionó la cantidad de tejido necesaria para los diferentes análisis, así como el implante tumoral si lo tuviera.

Según el fin de la muestra de tejido hepático y/o tumoral tomada, se emplearon distintas técnicas de conservación y fijación. Para llevar a cabo los análisis histopatológicos, los fragmentos de tejido se fijaron empleando formaldehído al 10%; en el caso de los análisis por ICP-MS, las biopsias se congelaron a -25° C; y finalmente, para los estudios de metabolómica, los fragmentos de hígado y tumor extraídos, se congelaron rápidamente tras su extracción en nitrógeno líquido y se almacenaron en ultracongelador a -80° C hasta su procesamiento posterior.

Para la toma de muestras sanguíneas, se realizó una laparotomía amplia para exponer la vena cava, y, mediante una aguja de 23G, se extrajo el máximo volumen de sangre posible, que se transfirió a un tubo de analítica con gelatina para la separación del suero de los componentes celulares mediante centrifugación durante 10 minutos a 30 g. El suero obtenido se transfirió a eppendorf de 1,8 ml y se congelaron a -25° C hasta que se analizaron.

## 8. *Eutanasia*

Una vez finalizados los experimentos llevados a cabo en animales, éstos se sacrificaron de acuerdo a las normas y principios éticos establecidos en la legislación vigente.

Los animales que no desarrollaron tumores y que por tanto no fueron empleados en los posteriores procedimientos, se sacrificaron mediante introducción en cámara de CO<sub>2</sub> y posterior comprobación de la muerte por dislocación cervical.

Para el resto de animales que si se emplearon en algún procedimientos, la extracción del volumen total de sangre circulante supuso la muerte por exanguinación, la cual fue comprobada también mediante dislocación cervical.

## B. *Técnicas in vitro*

Los procedimientos realizados en este trabajo en los que se emplean cultivos celulares fueron aprobados por el Comité de Ética para la Investigación con Agentes Biológicos (CEIAB) de la UPV/EHU con el código M30\_2016\_024 HERRERO DE LA PARTE.

### 1. *Expansión y almacenamiento de las células*

Los viales de la línea celular CC531 adquiridos fueron amplificados en las instalaciones de la empresa Histocell hasta pase 24 (p24), a partir de los cuales las células se expandieron a pase 26 (p26) en el Laboratorio de Cultivos Celulares del Dpto. de Cirugía y Radiología y Medicina Física de la UPV/EHU.

Para su descongelación y expansión, un criovial p24, con una concentración de 10<sup>6</sup> células/ml, se atemperó rápidamente en un baño a 37° C, sembrándose a continuación en un frasco de cultivo adherente T-25 (ref.: 430639, Corning Costar Inc., EEUU) en 4 ml de medio de cultivo RMPI-1640 (ref.: 52400-025, Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU) suplementado con Penicilina (100 UI/ml) / Estreptomina (100 µg/ml) / Anfotericina B (0,25 µg/ml) (ref.: 516104, Calbiochem, EEUU) y 1 ml de suero bovino fetal (SBF) (ref.: P30-3302, Pan Biotech, Alemania). Una vez adheridas las células al fondo del frasco de cultivo, a las 4 – 5 horas aproximadamente, se retiró el medio



antibióticos; transfiriéndose a un frasco de cultivo T-75 (ref.: 430641, Corning Costar Inc., EEUU).

El frasco T-75 se mantuvo de 5 a 7 días en el incubador celular, realizándose cambio de medio cada 48 – 72 horas, hasta que el cultivo llegó a confluencia, momento en el que se despegaron las células del frasco mediante Tris-EDTA.

La suspensión celular se centrifugó en las condiciones anteriormente descritas y el pellet celular se resuspendió en un volumen conocido de medio RPMI para calcular el número de células. Se volvió a centrifugar la suspensión de células y el pellet resultante, de número de células determinado previamente, se resuspendió en un volumen conocido de medio de congelación, SFB + 10% dimetilsulfóxido (DMSO) (ref.: 1.02952.1000, MERK, Alemania), para obtener una concentración final de  $10^6$  células/ml.

Entonces, los crioviales fueron congelados durante 2 horas a  $-20^{\circ}$  C y, posteriormente, parte fueron almacenados en un ultracongelador vertical a  $-80^{\circ}$  C para su uso próximo y el resto, para una mejor y más duradera conservación, se almacenó en nitrógeno líquido.

## *2. Recuento celular manual mediante hemocitómetro*

Para el recuento celular mediante esta técnica, se precisa el uso de microscopio invertido de contraste de fases, un hemocitómetro o cámara de Neubauer y colorante vital de azul Tripán (ref.: T8154-20ML, Sigma Aldrich, EEUU) que permite distinguir las células vivas de las muertas, al atravesar la membrana plasmática de estas últimas y teñirse de azul.

$$\text{Concentración celular} = A \times d \times B \times 10^4$$

Figura 72. Fórmula empleada para determinar la concentración de una suspensión celular, donde A es la media del recuento de células del hemocitómetro, d es la dilución realizada para el llevar a cabo el recuento y B es el volumen en que se haya disuelto el pellet de células.

Tras suspender las células en medio de cultivo y homogeneizar la suspensión mediante pipeteos suaves y múltiples, se toma una fracción alícuota de 50  $\mu\text{l}$  que se mezcló con otro 50  $\mu\text{l}$  de azul Tripán. La mezcla se homogeneizó y se colocó en el hemocitómetro para el recuento y la determinación de la concentración celular, empleándose la fórmula reflejada en la Figura 72.

### 3. Recuento automático mediante NucleoCounter

El recuento mediante este aparato sustituye al recuento manual realizado con el hemocitómetro. Se trata de un microscopio de fluorescencia que permite, gracias al software informático que lo controla, distinguir entre células vivas y muertas.

Para ello, con las casetes que emplea el equipo (Figura 73) (ref.: 941-0002, Chemometec, Dinamarca), se tomó una muestra de 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular. Estas casetes contienen yoduro de propidio (IP), que se intercala entre las bases del DNA, si bien debido a sus características solo es permeable en células muertas o con la membrana plasmática dañada. De tal forma que tras introducirse el casete en el NucleoCounter, se obtuvo la concentración celular de las células muertas.

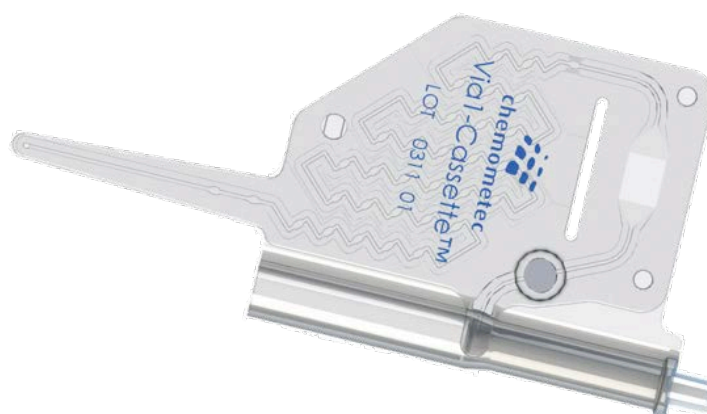


Figura 73. Casete que emplea el NucleoCounter para la determinación de la concentración y viabilidad celular.



---

Seguidamente, se tomó una nueva muestra de 100  $\mu$ l de la suspensión celular y se lisó con el mismo volumen de tampón de lisis (ref.: 910-0003, Chemometec, Dinamarca) y seguidamente se añadió el mismo volumen de tampón de estabilización (ref.: 910-0002, Chemometec, Dinamarca). Con este procesamiento, se consiguió que todas las células tuvieran la membrana plasmática dañada y por tanto permeable al IP. Empleando otro casete, se tomaron 50  $\mu$ l del lisado celular y se repitió el procedimiento de lectura. Tras este segundo recuento, se obtuvo el número total de células presentes en el cultivo, vivas y muertas.

Tras realizar ambas medidas, el software del equipo calcula el número de células (restando la segunda lectura de la primera) y la viabilidad del cultivo.

#### *4. Preparación de las células para inducción tumoral*

La inducción tumoral se realizó mediante punción directa en el LLI de una suspensión de 500.000 células/ml en solución de Hank (ref.: 24020083, Invitrogen, EEUU).

La preparación de las células siguió el mismo protocolo descrito anteriormente para la expansión de los crioviales, hasta que las células alcanzaron la confluencia en un frasco de cultivo T-75. Llegadas a ese estado, las células se despegaron del frasco mediante tripsinización y se centrifugaron en las condiciones antes descritas, 1500 r.p.m. a 6° C durante 5 minutos. El pellet celular obtenido se resuspendió en un volumen conocido de solución de Hank para calcular la concentración celular empleando la fórmula de la Figura 72. Una vez conocida la concentración de la suspensión celular, se tomó el volumen necesario para obtener una concentración final de 500.000 células/ml.

#### *5. Cultivo placas de 24 pocillos*

Con los cultivos en estado de confluencia en los frascos de cultivo T-75, se despegaron las células mediante Tris-EDTA. El pellet celular se resuspendió en un volumen conocido para realizar el recuento celular y determinar la concentración y la viabilidad del cultivo, mediante recuento manual con hemocitómetro y la fórmula de la Figura 72 o bien con el NucleoCounter.

Conocida la concentración, se calculó el volumen de esta suspensión que se debe tomar para obtener una concentración final de 30.000 células/ml en medio de cultivo RPMI + SFB 10%, suplementando con antibióticos.

Para la siembra en placas de 24 pocillos (ref.: 3526, Corning Costar Inc., EEUU), se prepararon 6 pocillos que se emplearon como blanco, 6 pocillos control y el resto de los pocillos se emplearon como problema. Los pocillos “blanco” se rellenaron con 1 ml de medio de cultivo completo; los pocillos control y problemas se sembraron con 500 µl de la suspensión celular preparada previamente y otros 500 µl de medio de cultivo completo, de tal manera que en cada pocillo había 1 ml de suspensión celular con 15.000 células/ml.

Tras la siembra y la comprobación bajo microscopio invertido de que todos los pocillos control y problema tenían células, las placas se introdujeron en el incubador de CO<sub>2</sub>, en las condiciones habituales de cultivo.

#### *6. Exposición a RGD-fluoresceína, determinación de la intensidad de fluorescencia y captura de imágenes*

Debido a la escasa bibliografía previa sobre el uso de análogos RGD, en un primer momento se determinó la concentración idónea de éstos que permita la realización de medidas de fluorescencia en un lector de placas.

Para ello, en placas de 96 pocillos sin cultivos celulares, se depositaron muestras de 100 µl de diferentes concentraciones de peptidomiméticos RGD-fluoresceína para realizar la determinación de la fluorescencia, en Unidades Arbitrarias de Fluorescencia (UAF) (Figura 74). Una vez determinada la concentración de RGD-fluoresceína a emplear, en placas de 24 pocillos se realizaron ensayos para comprobar el tiempo que se debía mantener el RGD-fluoresceína en cultivo con las células antes de la medición, manteniendo los cultivos celulares expuestos al RGD-fluoresceína distintos tiempos.

Para la lectura de las placas, se retiró el medio suplementado con RGD-fluoresceína de cada pocillo. Además, en la mitad de ellos, para retirar el posible exceso de RGD-fluoresceína no adherido a las células, y como paso previo a la adición de medio fresco, se realizó un lavado suave con PBS, sin provocar agitación para no despegar las células adheridas a la placa. Posteriormente, se eliminó el PBS de lavado y se añadió medio fresco de cultivo para realizar la lectura.

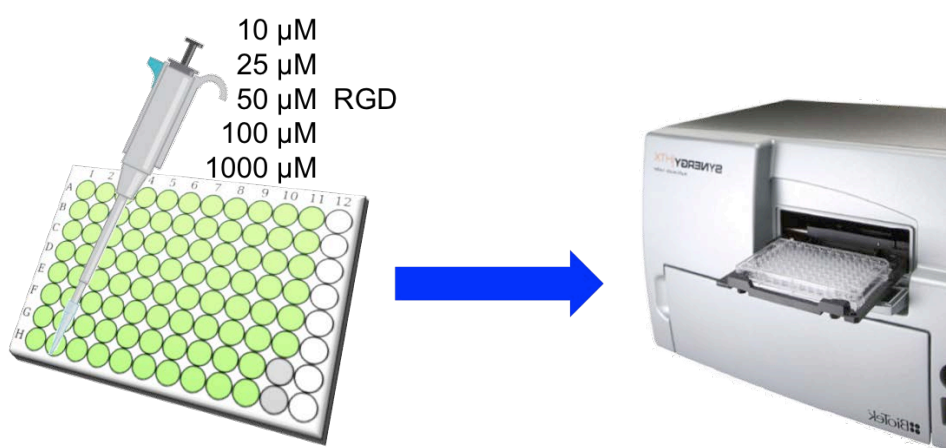


Figura 74. Esquema del procedimiento de lectura de la fluorescencia emitida por diferentes concentraciones de RGD- fluoresceína sobre placas de 96 pocillos sin células.

Todas las mediciones de fluorescencia se realizaron en el fluorímetro SynerGy HT configurado con una longitud de onda de emisión de 521 nm y de absorción de 494 nm.

Complementariamente, para tener comprobación directa y visual de la presencia de los RGD-fluoresceína en la superficie celular, se tomaron microfotografías de los pocillos empleando microscopio de fluorescencia de los SGIker de la UPV/EHU.

## 7. Cultivo placas de 96 pocillos

Para la siembra de las células en placas de 96 pocillos (ref.: 3596, Corning Costar Inc., EEUU) y llevar a cabo los posteriores experimentos de HT *in vitro*, se descongeló un criovial p26 atemperándolo rápidamente en un baño calefactor a 37° C y se siguió el procedimiento explicado anteriormente para la expansión celular, llevando los cultivos a estado de confluencia en un frasco de cultivo T-75. Las células fueron levantadas del fondo del frasco mediante Tris-EDTA y resuspendidas en una concentración de 25.000 células/ml en medio de cultivo RMPI + 10% SFB y suplementado con antibiótico. Adicionalmente, se prepararon también 3 ml de medio de cultivo para emplearse como blanco a la hora de realizar el recuento y la valoración de la proliferación celular.

En la campana de flujo laminar, se prepararon las placas de 96 pocillos necesarias para llevar a cabo las experiencias, rotulándose las mismas con los distintos tiempos de exposición y tratamientos ensayados. En cada placa, además de las variables a estudiar, 6 pocillos fueron llenados con medio de cultivo sin células para tomarse como blanco a la hora de hacer las determinaciones y otros 6 pocillos fueron empleados como controles. Los pocillos blanco se llenaron con 100 µl de medio sin células y el resto de pocillos, los controles y los problema, se llenaron con 100 µl de la suspensión celular anteriormente preparada, de tal forma que en cada pocillo hay una cantidad total de 2.500 células en el momento de la siembra.

Después de comprobar que todos los pocillos fueron correctamente llenados, se introdujeron las placas en el incubador de cultivos durante 48 horas, tras lo cual las placas estuvieron listas para realizar los ensayos.

## 8. Hipertermia in vitro

Los ensayos de HT in vitro se realizaron solos, exponiendo las células a 47° C durante 45 minutos en un incubador con atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub> (Figura 75), o bien en combinación con dos fármacos ampliamente empleados en ensayos con células tumorales, el ácido all-trans-retinoico (ATRA) (ref.: R-2625, Sigma Aldrich, EEUU), un metabolito de la vitamina A, y el 5-Fluorouracilo (5-FU) (ref.: F6627-5G, Sigma Aldrich, EEUU).



Figura 75. Imagen del panel de control del incubador de CO<sub>2</sub> empleado para los procedimientos de HT in vitro, con la temperatura determinada a 47° C.

Para la preparación del ATRA empleado junto al tratamiento de HT, se preparó una solución stock de 10<sup>-2</sup> M, disolviéndose para ello la cantidad necesaria de ATRA en etanol absoluto. Este stock se almacenó a -21° C hasta su posterior utilización.

El 5-FU se preparó disolviéndolo en medio RPMI hasta obtener una solución stock de 0,25 mg/ml, que fue almacenado a -21° C hasta su utilización.

Ambos citostáticos, se añadieron a las placas de 96 pocillos tras 48 horas de crecimiento de las células, reemplazándose el medio de cultivo previo por medio nuevo (RPMI + SBF 10%) suplementado con 10 μM ATRA o bien 0,25 μg/ml 5-FU, dejándose expuestas las células a los tóxicos durante al menos 24 horas. .

## 9. Valoración de la viabilidad celular mediante MTT

Una vez concluidos los tiempos de exposición de cada grupo experimental, la estimación de la viabilidad de los cultivos se realizó mediante el uso del Test Mitocondrial del Tetrazolio (*Mitochondrial Tetrazolium Bromide Test* o MTT).

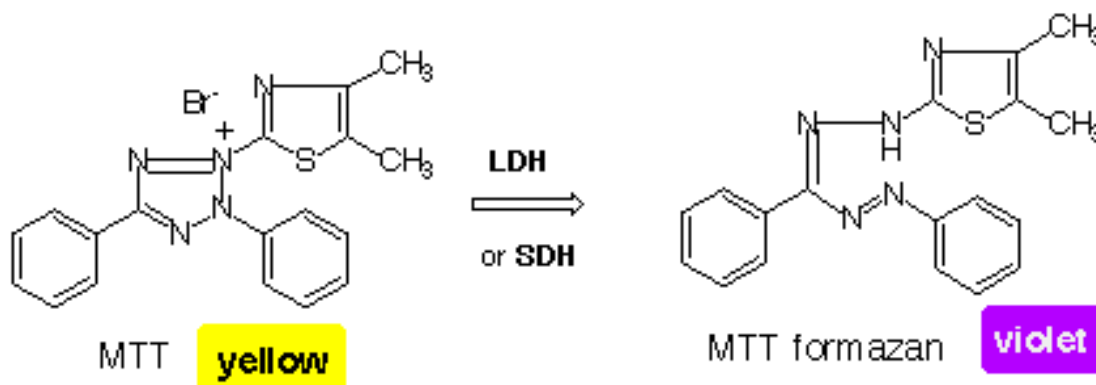


Figura 76. El enzima succinato deshidrogenasa (SDH) cataliza la reacción que transforma el tetrazolio (de color amarillento) en sales de formazán (de color violáceo).

El tetrazolio (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-dipheniltetrazolium), sustrato del enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, es metabolizado por las células metabólicamente activas de los cultivos y transformado en formazán (Figura 76), relacionándose la concentración de éste con el número de células metabólicamente activas presentes en el cultivo.

El stock de tetrazolio (ref.: M2128-5G, Sigma Aldrich, EEUU) se preparó disolviendo 100 mg en 20 ml de PBS atemperado a 37° C y agitándolo en vórtex, tras lo que se esterilizó mediante filtración a través de un filtro con un poro de 0,2 µm. Hasta su empleo, éste stock se almacenó a 4° C.

En las pruebas de viabilidad celular, se añadieron 10 µl del stock a cada pocillo a testar y se incubó a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 horas. Pasado el tiempo, se retiró el medio de cultivo con el tetrazolio, se añadieron 100 µl de DMSO a cada pocillo para lisar las células y, así, disolver los cristales de formazán producidos. Inmediatamente se realizó

una medida de la absorbancia a 540 nm en el lector de placas, obteniéndose los resultados en Unidades Arbitrarias de Absorbancia (UAA).

La determinación de la citoviabilidad se realizó 0, 24, 48 y 72 horas tras la aplicación de HT.

## **C. Técnicas analíticas**

Las muestras tomadas en los ensayos realizados empleando animales de experimentación se sometieron a alguna o varias de las técnicas analíticas descritas en este apartado, según fuera la finalidad de cada ensayo.

### ***1. Análisis Histopatológicos***

Las biopsias hepáticas y de tejido tumoral extraídas, fueron sometidas a una o ambas de las técnicas de tinción que se describen a continuación. Los análisis fueron llevados a cabo a doble ciego por un observador externo, el Dr. Alberto Sainz López, facultativo especialista de área del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Galdakao-Usansolo.

Todas las muestras de tejido obtenidas se tiñeron con Hematoxilina-Eosina. Ésta técnica se empleó para valorar los posibles daños y el grado de afectación del tejido analizado.

Adicionalmente, con algunos especímenes se empleó la Tinción de azul de Prusia de Perl. Empleando esta tinción, que marca los acúmulos de ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), nos permitió la visualización de los depósitos de NpM en el parénquima hepático y/o el lecho tumoral tras la infusión de NpM-RGD.

Para la conservación y fijación del tejido destinado a los análisis histopatológicos, las muestras fueron sumergidas en un solución de formaldehído al 10% durante al menos 24 horas. Tras este tiempo, las muestras se deshidrataron empleando una secuencia de alcoholes de graduación creciente, se incluyeron en parafina y se obtuvieron secciones histológicas de 5  $\mu\text{m}$  de grosor que se tiñeron con las técnicas anteriormente mencionadas.

## *2. Análisis elemental mediante Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS)*

Mediante el uso de ésta técnica de química analítica, la Dra. Mireia Irazola Duñabeitia y el Prof. Néstor Etxebarria Loizate del Dpto. de Química Analítica de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la UPV/EHU, determinaron la cantidad de yodo y hierro presente en el tejido hepático y tumoral tras la administración del RGD-I y de las NpM-RGD, respectivamente. El método analítico empleado para el análisis elemental consta de un primer paso de digestión ácida mediante microondas para el posterior análisis con ICP-MS.

## *3. Determinación Enzimática en el plasma sanguíneo*

El análisis enzimático del suero, obtenido de las muestras sanguíneas de las ratas que fueron sometidas a alguno de los procedimientos quirúrgicos experimentales descritos en esta Tesis Doctoral, se realizó por parte del Dr. Tarik Chaoui El Kaid, del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario de Basurto.

## *4. Análisis de metabolómica*

Los estudios metabólicos son una ciencia *ómica* que integra los efectos de los genes, la expresión génica y las proteínas, así como los efectos provenientes del medioambiente. Dado que el perfil metabólico, o metaboloma, es muy sensible a los cambios, nos proporciona información sobre el estado general del tejido o del organismo completo. Por esta razón, los estudios de metabolómica son cada vez más frecuentes para el diagnóstico y la comprensión de las causas fundamentales de la enfermedad, inclusive para identificar los mecanismos de la enfermedad para identificar nuevas dianas farmacológicas o personalizar los tratamientos farmacológicos y controlar los resultados terapéuticos<sup>285</sup>. Sin embargo, la cantidad de muestras necesarias para observar diferencias significativa y los requisitos para un diseño adecuado de los experimentos, aumentan la complejidad de los mismos.



---

Conjuntamente, el proceso de análisis metabólico de los tejidos tiene, a grandes rasgos, tres pasos: recopilar el perfil metabólico, establecer la huella dactilar metabólica y, finalmente, esclarecer la vía metabólica.

Para el análisis de metabólico hay, principalmente, cuatro técnicas: espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (empleada en este Trabajo), espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), espectrometría de masas acoplado a cromatografía de líquidos (LC-MS) y espectrometría de masas acoplado a cromatografía de gases (GC-MS).

La medición de RMN se basa en la resonancia entre el momento magnético del núcleo atómico y el campo magnético externo. Los núcleos atómicos y su desplazamiento químico sufren el efecto directo de los átomos que lo rodean proporcionando la información necesaria para elucidar la estructura del analito. Al realizar un análisis metabólico basado en mediciones de RMN, podemos analizar cientos de metabolitos simultáneamente y de forma no específica.

Con los datos obtenidos se realiza, posteriormente, un análisis multivariante para poder distinguir las variables que diferencian las clases, para obtener el perfil de cada clase y obtener una clasificación o agrupamiento de las muestras analizadas. El análisis quimiométrico o multivariante permite el análisis de todas las variables que pueden influir en el estudio, revelando las más importantes. A grandes rasgos, los pasos del análisis multivariante son tres<sup>286</sup>:

(i) Análisis de datos. En este proceso de caracterización es muy útil estudiar la correlación entre los datos, las desviaciones y la identificación de variables. El análisis de componentes principales (PCA) es el método más popular para lograr este objetivo.

(ii) Separación y clasificación de datos. Al realizar este tipo de análisis, se analiza la agrupación de datos y se estudia la posibilidad de diferenciación debido a la concentración presentada por cada variable. Se usan dos tipos de clasificación: supervisada o no supervisada. En cuyo caso también se puede utilizar el PCA junto

con el modelado suave independiente de clases análogas (SIMCA, *Soft Independent Modeling of Class Analogy*). En este caso, cada clase se caracteriza por un modelo de PCA y se utiliza para predecir la clase.

(iii) Regresión y pronóstico. Mediante la regresión se relacionan dos grupos de variables: la variable X y la variable Y, donde la variable Y depende de la variable X. Por lo tanto, el propósito de este tipo de análisis es la predicción de los valores Y correspondientes a las nuevas variables X, basadas en un modelo previamente construido. El componente principal de regresión (*Principal Component Regression*, PCR), la regresión multivariante lineal (*Multiple Linear Regression*, MLR) y la regresión parcial de mínimos cuadrados (*Partial Least Squares Regression*, PLS- R) se pueden utilizar como métodos para alcanzar estos objetivos.

El PCA describe los datos multidimensionales y muestra los factores que explican la varianza máxima. Estos factores son los componentes principales (PC). Cada PC es una combinación lineal de las variables originales, y la suma de las PC muestra la varianza máxima (ya que el segundo explica lo que el anterior no explica). Por lo tanto, los *scores* y los *loadings* obtenidos del análisis de PCA facilitan la interpretación de la matriz original.

En la representación gráfica de los *scores*, obtenemos nuevas coordenadas de cada muestra, y cada punto representa un espectro en nuestro caso. Por lo tanto, es un resumen de todos los espectros.

En la representación gráfica de los *loadings*, podemos identificar las variables que son más influyentes en el modelo. Se utilizarán los *scores* para identificar los *loadings*, porque los *loadings* determinan la ubicación de los *scores* y, en consecuencia, la agrupación de las muestras.

El PLS-DA es una técnica quimiométrica supervisada. El PLS es una técnica de regresión que se relaciona la matriz de datos X con la matriz de respuesta Y. En el análisis de PLS-DA tal y como ocurre en el PCA, los datos de la matriz original se

---

muestran mediante variables latentes (PC o LV), que son combinaciones lineales de las variables originales (los datos de la medida analítica).

PLS-DA, es una regresión PLS, pero la respuesta es una variable categórica, la clase de muestra que hemos indicado previamente. Como resultado, los componente PLS obtenidos de las variables medidas deben cumplir dos compromisos: debe ser capaces de predecir las respuestas (clases) y ser capaces de explicar todas las variables medidas en cada muestra de cada clase.

Para lograr un modelo simplificado, se utiliza OPLS-DA, es decir, el análisis de PLS-DA con la corrección ortogonal de la señal (OSC, *Orthogonal Signal Correction*). El OSC excluye las variables que no responden a las respuestas o clases. OPLS-DA es ampliamente utilizado en la metabolómica mediante RMN, por ejemplo, para reducir el impacto de factores como edad, sexo, dieta, etc.

En los análisis de PLS-DA y OPLS-DA se obtienen los VIP (*Variables Importance on Partial Least Squares (PLS) projections*). De hecho, son proyecciones de las variables más importantes en estos análisis. Los valores VIP son la expresión de la varianza explicada en el modelo PLS y el peso de las variables en el modelo. Al analizar los VIP, se tienen en cuenta aquellos que superan el valor 1<sup>287</sup>

Una vez que se realizó el análisis quimiométrico, se llevo a cabo la identificación de las variables o desplazamientos químicos observados partiendo de bases de datos de internet<sup>288-290</sup>. Una vez identificados los metabolitos, se analizó que vías metabólicas se encontraban alteradas. Con la información recibida podemos comprender el diagnóstico de enfermedades, toxicología, estado nutricional y los efectos de los efectos del estrés.

Uno de los problemas que se han planteado en este trabajo, es la escasa información y conocimiento que hay sobre las posibles alteraciones metabólicas que pudieran ocurrir en el hígado o en el organismo al someterse a una terapia de HT como la que es objeto de esta Tesis Doctoral. Es por ello que se planteó realizar estos análisis para determinar los patrones o el perfil metabólico de los grupos experimentales

sometidos a la terapia de HT antitumoral selectiva con NpM-RGD. Estos análisis, al igual que los de ICP-MS, fueron realizados por la Dra. Mireia Irazola Duñabeitia.

Tras someter a los animales a los procedimientos experimentales correspondientes en función de su grupo experimental (detallado en el siguiente apartado de Experiencias Realizadas), se tomaron las muestras de tejido hepático y tumoral como se refleja en el apartado Toma de Muestras de esta Tesis Doctoral.

La metodología empleada, la preparación de las muestras y las condiciones de medida para el análisis metabolómico de ambos tejidos (tumor y parénquima sano) fue la misma, adaptando los protocolos del Prof. Mark Viant y su equipo<sup>291,292</sup>, tal y como los describe la Dra. Irazola en su trabajo de Tesis Doctoral<sup>293</sup>.

La metodología analítica empleada consistió en un primer paso de homogeneización de la muestra tras el cual se extrajo el componente polar y apolar, empleando una mezcla de agua, metanol y cloroformo y manteniendo la cadena de frío durante todo el proceso. Para este trabajo, se analizó la fase polar mediante espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), llevándose a cabo dos tipos de medida: <sup>1</sup>H NMR (espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón, 1D) y JRES (J-resolved spectroscopy, 2D). Finalmente, para realizar el análisis multivariante de los datos obtenidos se utilizó el software Matlab (MATrix LABoratory, MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, EE.UU.) y el PLS Toolbox (Eigenvector Research, Inc., Manson, EE.UU.).

#### **D. Cálculos estadísticos**

Las variables cuantitativas descritas en este trabajo se representaron mediante la media y desviación estándar, a excepción de los valores de atenuación obtenidos mediante TCMC, que se representaron mediante el rango. Gráficamente se representaron como gráfico de barras o de líneas.

El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA). Una vez demostradas las diferencias significativas entre los grupos mediante

---

el test Kruskal-Wallis, las comparaciones de los distintos grupos entre si se efectuaron mediante el test de comparación múltiple de Dunn.

La cantidad de Fe detectado por ICP-MS se presentó como el rango, la media y la desviación estándar y gráficamente mediante un gráfico de columnas con la media y la desviación.

El análisis de correlación entre el volumen tumoral estimado ecográficamente y la necrosis tumoral medida por el especialista en anatomía patológica, se realizó mediante una regresión lineal.

Todos los análisis fueron realizados con el programa *GraphPad Prism 6*, aceptando un nivel mínimo de significación  $p < 0,05$ .



## Experiencias realizadas

### A. Inducción de HT mediante NpM en hígado aislado *ex vivo*.

Para comprobar si las NpM logran aumentar la temperatura hepática, se han realizado, sobre un total de 12 hígados aislados, los siguientes experimentos:

#### 1. Hígado *ex vivo* con NpM comerciales en solución acuosa

Tabla 5. Características de las NpM infundidas y del campo magnético al que fueron expuestos los hígados de la experiencia *ex vivo* con NpM comerciales en solución acuosa.

| NpM infundidas       |          | Campo Magnético utilizado |            |
|----------------------|----------|---------------------------|------------|
| Concentración        | 20 mg/ml | Intensidad                | 699 kHz    |
| Volumen administrado | 0,5 ml   | Frecuencia                | 12 kA/m    |
| Fe total infundido   | 7,5 mg   | Duración                  | 20 minutos |

## 2. *Hígado ex vivo con NpM comerciales en solución salina*

Tabla 6. Características de las NpM infundidas y del campo magnético al que fueron expuestos los hígados de la experiencia *ex vivo* con NpM comerciales en solución salina.

| NpM infundidas       |          | Campo Magnético utilizado |               |
|----------------------|----------|---------------------------|---------------|
|                      |          | 1ª exposición             | 2ª exposición |
| Concentración        | 20 mg/ml | Intensidad                | 699 kHz       |
| Volumen administrado | 0,5 ml   | Frecuencia                | 12 kA/m       |
| Fe total infundido   | 7,5 mg   | Duración                  | 15 minutos    |

## 3. *Hígado ex vivo con NpM de síntesis propia en solución acuosa*

Tabla 7. Características de las NpM infundidas y del campo magnético al que fueron expuestos los hígados de la experiencia *ex vivo* con NpM de síntesis propia en solución acuosa.

| NpM infundidas       |           | Campo Magnético utilizado |               |
|----------------------|-----------|---------------------------|---------------|
|                      |           | 1ª exposición             | 2ª exposición |
| Concentración        | 2,5 mg/ml | Intensidad                | 608 kHz       |
| Volumen administrado | 0,7 ml    | Frecuencia                | 12 kA/m       |
| Fe total infundido   | 1,75 mg   | Duración                  | 15 minutos    |



## B. Experimentos *in vitro* sobre células tumorales

### 1. Efecto de la hipertermia sobre la proliferación celular

Para estudiar el posible efecto de la HT sobre las células tumorales CC531, se han realizado tres experimentos utilizando cultivos con tiempos previos de crecimiento de 24, 48 y 72 horas (Figura 77).

En cada uno de los tres experimentos se utilizaron dos placas de 96 pocillos simultáneamente, de las que una fue sometida a HT, y la otra se usó como control.

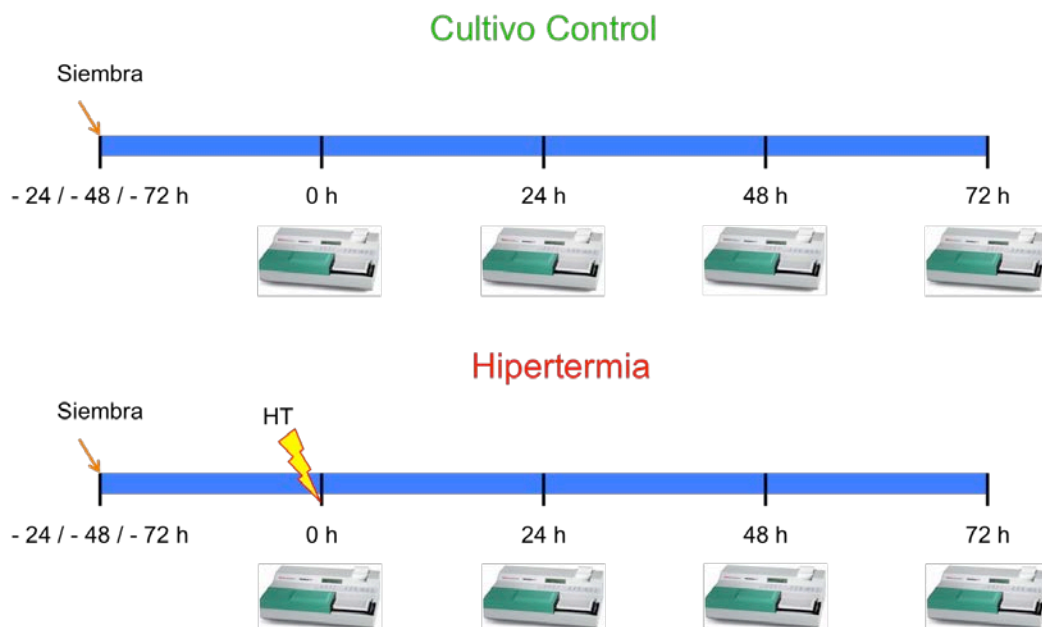


Figura 77. Esquema temporal de los experimentos realizados para comprobar el efecto de la HT sobre las células en cultivo.

## 2. Efecto de la quimioterapia sobre la proliferación celular

Para valorar el efecto del ATRA y el 5-FU, solos o en combinación, se realizó un experimento empleando células en crecimiento durante 24 horas en dos placas de 96 pocillos. Una de ellas fue suplementada con los fármacos, y la otra se usó como control (Figura 78).

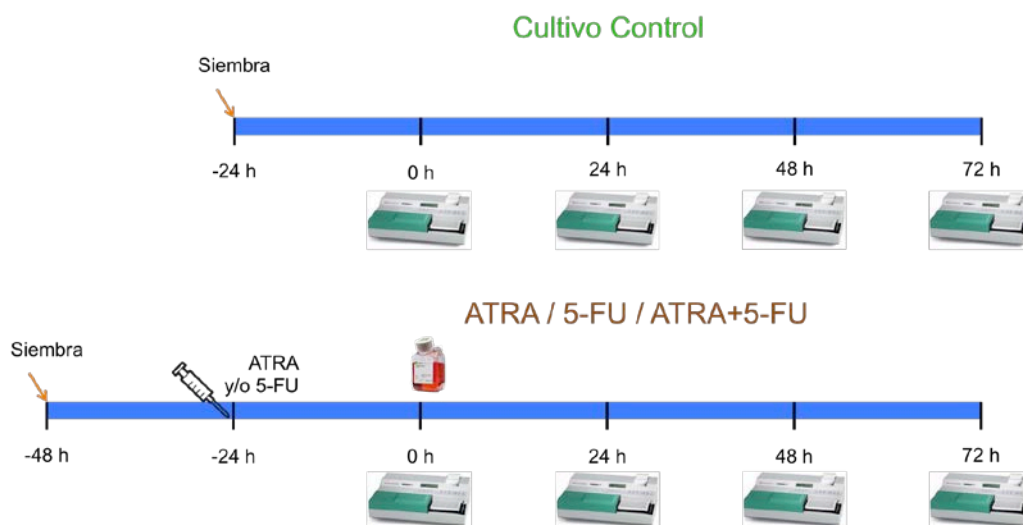


Figura 78. Esquema temporal de los experimentos realizados para comprobar el efecto de los fármacos ATRA y 5-FU, solos o en combinación, sobre las células en cultivo.

## 3. Efecto de la quimioterapia sobre la proliferación de cultivos sometidos a hipertermia

En los experimentos realizados para comprobar el efecto de la quimioterapia sobre pretratamiento con HT, se emplearon cuatro placas de 96 pocillos con células en crecimiento durante 24 horas (Figura 79).

Una de ellas, empleada como control, fue sometida únicamente a HT, mientras que las otras 3, además del tratamiento con HT, fueron suplementadas durante otras 24 horas con ATRA, 5-FU ó ATRA+5-FU..

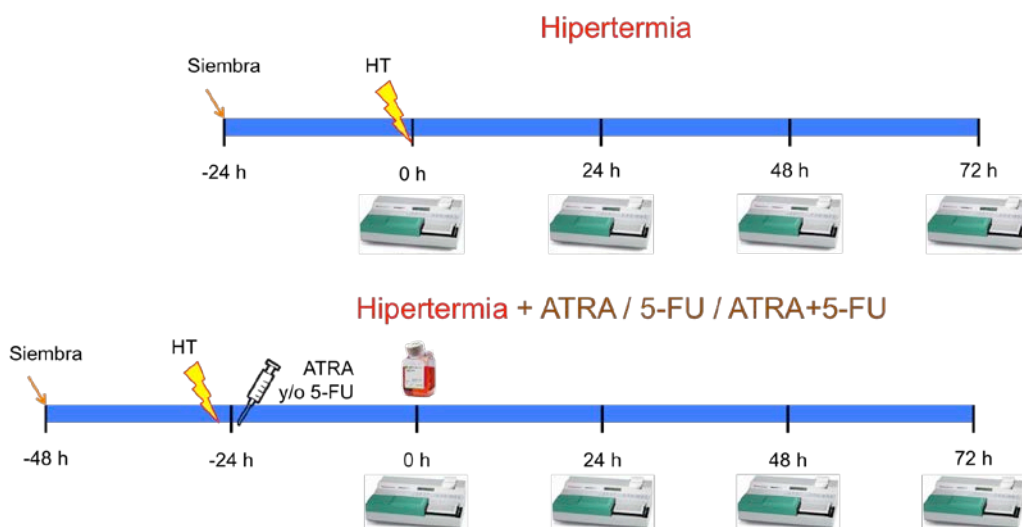


Figura 79. Esquema temporal de los experimentos realizados para comprobar el efecto de los fármacos ATRA y 5-FU, solos o en combinación, sobre cultivos celulares expuestos previamente a HT.

#### 4. Efecto de la hipertermia sobre cultivos expuestos a quimioterápicos

Para la valoración del posible efecto de la HT sobre los cultivos pretratados con los dos fármacos, por separado o en combinación, se emplearon cuatro placas de 96 pocillos.

Las células tratadas únicamente con los fármacos se emplearon como control en esta experiencia. Las otras tres placas, fueron expuestas a HT previamente a la adición del ATRA, 5-FU ó ATRA+5-FU (Figura 80).

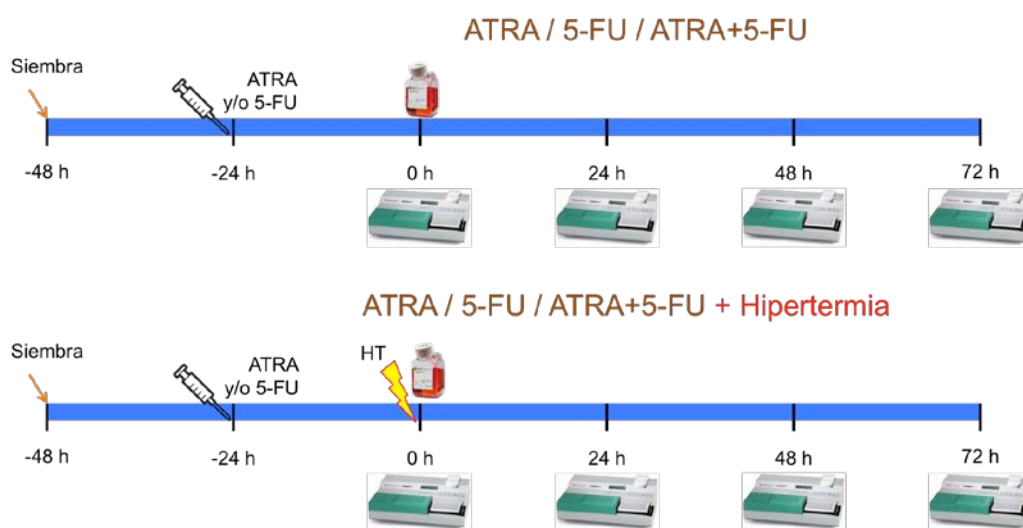


Figura 80. Esquema temporal de los experimentos realizados para comprobar el efecto de la HT sobre los cultivos pretratados con los fármacos ATRA y 5-FU, solos o en combinación, sobre las células en cultivo.

## C. Adhesión selectiva de la secuencia RDG a las células y al tejido tumoral

### 1. Exposición a RGD-fluoresceína *in vitro*

Una vez elegida la concentración óptima de peptidomimético RGD-fluoresceína para emplear *in vitro*, se emplearon nueve placas de 24 pocillos para medir la emisión de fluorescencia. Una placa, sin RGD-fluoresceína, se utilizó como control y las otras 8 se suplementaron con RGD-fluoresceína, con o sin lavado previo a la lectura de la fluorescencia, tal y como se ilustra en la Figura 81.

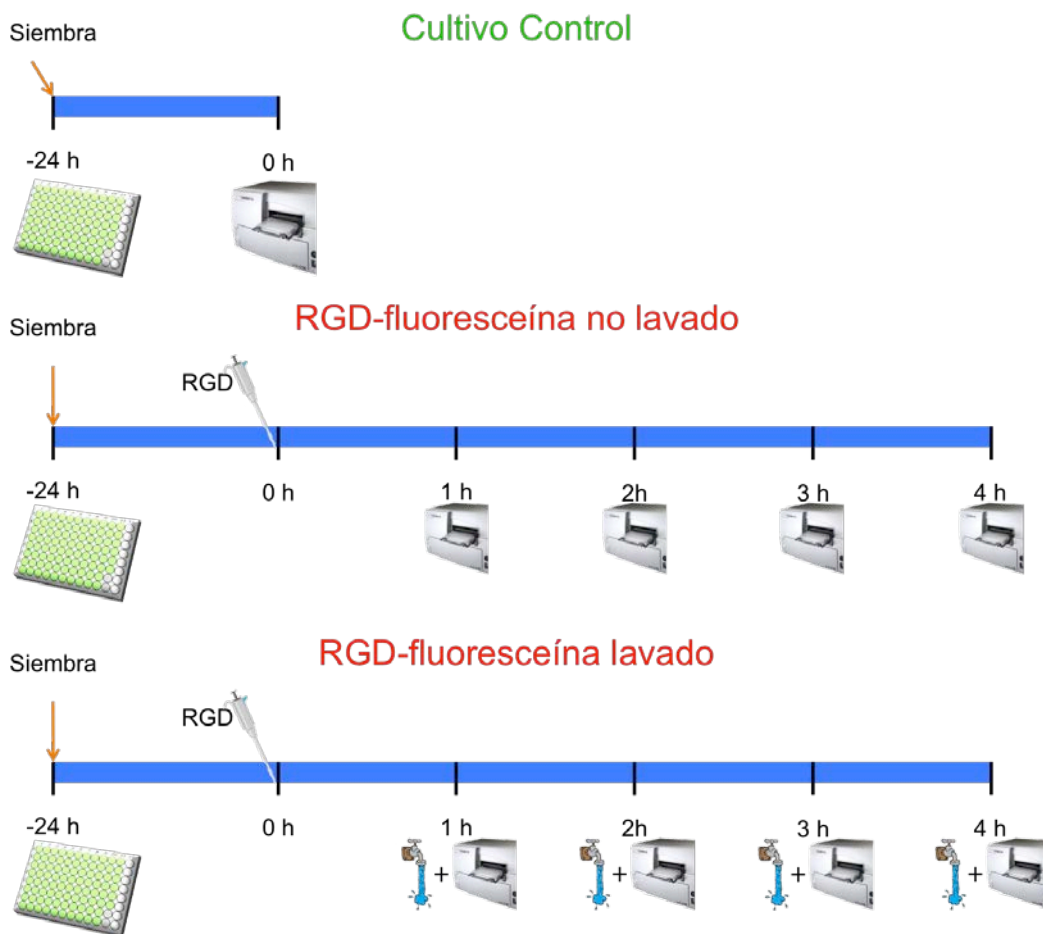


Figura 81. Esquema temporal de los experimentos realizados para medir la fluorescencia emitida por los cultivos celulares expuestos a RGD-fluoresceína, con o sin lavado previo con PBS a la realización las medidas.

## D. Experimentos *in vivo*

### 1. *Ensayo in vivo de adhesión selectiva de RGD-I*

Para comprobar la adhesión *in vivo* de los RGD, se emplearon 16 animales, dos de ellos no recibieron contraste alguno y se emplearon como control, otros dos recibieron Visipaqué® y el resto recibieron diferentes dosis de RGD-I (Tabla 13 y Figura 82).

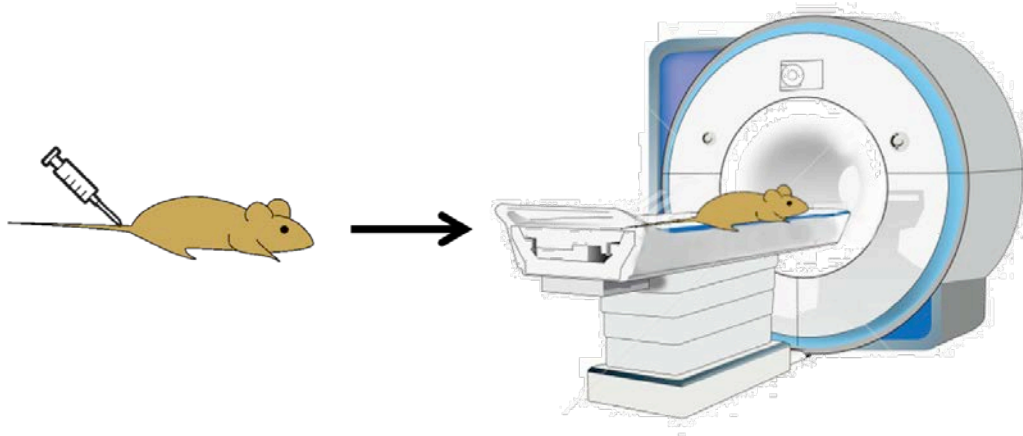


Figura 82. Esquema del procedimiento de inyección i.v. de RGD-I y posterior realización de los estudios de imagen mediante TCMC.

## 2. Localización y cuantificación de las NpM-RGD

A modo de ilustrativo, la Figura 83 refleja la secuencia de procedimientos realizados en los animales que fueron sometidos a pruebas de IRM para la detección *in vivo* de las NpM-RGD.

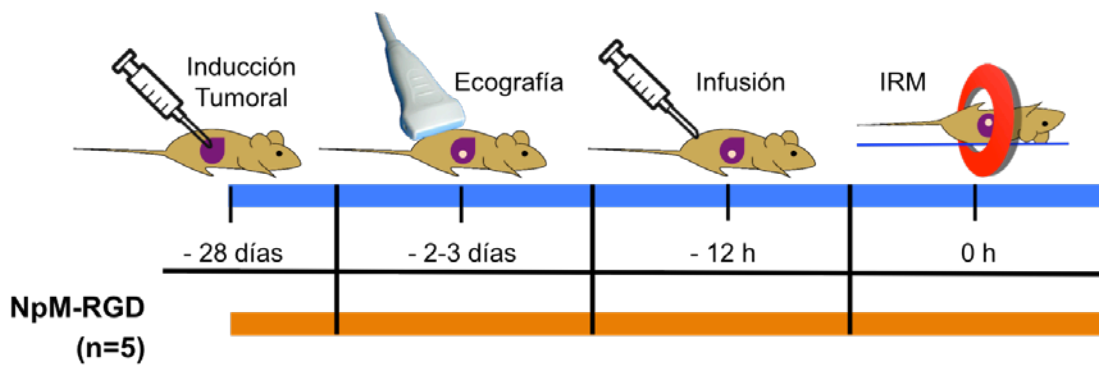


Figura 83. Esquema de los procedimientos realizados en las experiencias de detección de NpM-RGD mediante IRM.

### 3. Hipertermia mediada por NpM-RGD

Para analizar los posibles efectos, sobre el tejido hepático y tumoral, que tienen los diferentes procedimientos implicados en la terapia de HTM, se realizaron 3 experiencias en 3 grupos experimentales de animales (Figura 84):

- Grupo HT (n=6): animales expuestos únicamente a HTM.
- Grupo Salino+HT (n=10): animales sometidos a la intervención quirúrgica necesaria para la administración de un fluido y posterior HTM.
- Grupo NpM-RGD+HT (n=18): animales infundidos con NpM-RGD y sometidos a HTM.

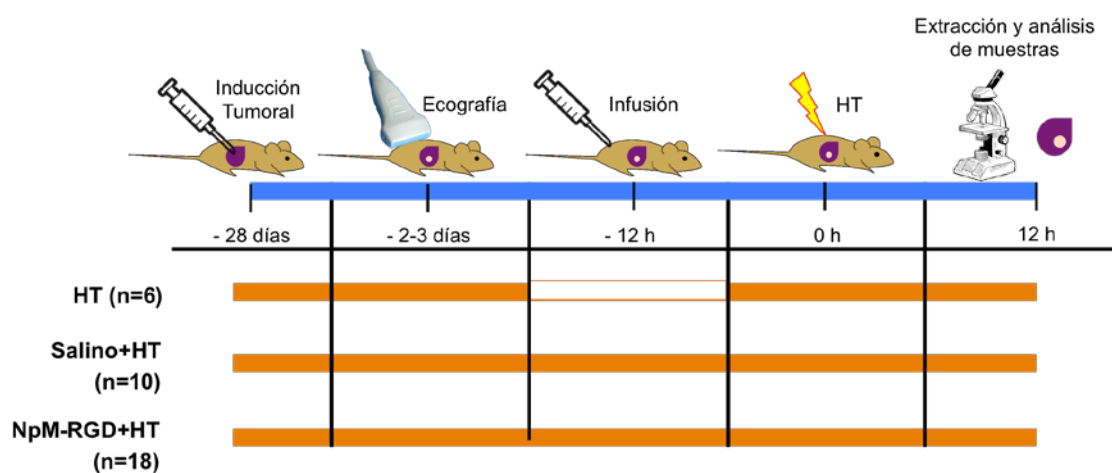


Figura 84. Esquema de los procedimientos realizados *in vivo* en las experiencias de inducción de HTM.

### 4. Detección de metabolitos hepáticos y determinación enzimática

Por último, se estudiaron también los efectos de todos los procedimientos sobre el estado fisiológico y el metabolismo de los animales, siguiendo la secuencia temporal y de procedimientos que se detalla en la Figura 85. Para la determinación del perfil metabolómico hepático y los niveles séricos de enzimas, en cada grupo experimental se analizaron biopsias de tejido hepático y tumoral y muestras de plasma sanguíneo.

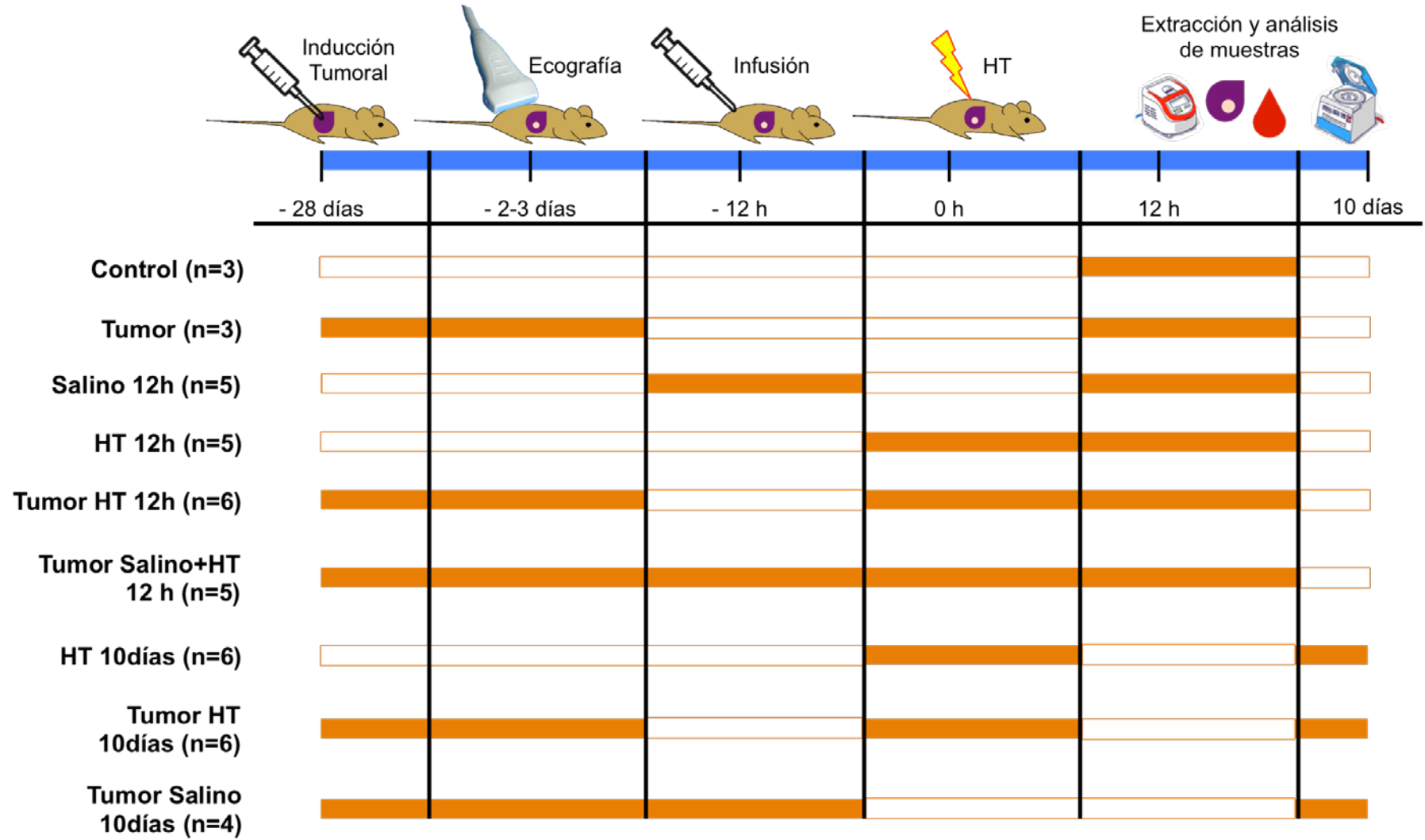


Figura 85. Esquema de los procedimientos realizados *in vivo* sobre cada uno de los grupos experimentales de los ensayos de determinación de enzimas séricos y metabolitos hepáticos.



# RESULTADOS



Para exponer de una manera ordenada y más sencilla de leer, este apartado de lo hemos organizado en cinco epígrafes diferenciados. Comenzamos detallando los resultados obtenidos en las experiencias de inducción de hipertermia “in vitro” y “ex vivo”, previas a los ensayos en animales.

El segundo apartado detalla los resultados de los experimentos llevados a cabo para estudiar la capacidad de la secuencia RGD de adherirse selectivamente a las células tumorales.

Los tres últimos apartados describen nuestros hallazgos al aplicar campos magnéticos a animales con tumor que recibieron infusión de nanopartículas.



## **Inducción de hipertermia hepática *in vitro* y *ex vivo***

El primer objetivo de esta tesis es demostrar la viabilidad técnica de un aumento controlado de la temperatura en el hígado, mediante la estimulación con campos magnéticos variables de NpM inoculadas por vía arterial.

Previamente era necesario averiguar el comportamiento de las células tumorales ante la exposición a HT. Para ello, se expusieron cultivos de células de la línea CC531 a distintas condiciones experimentales.

Comprobada la sensibilidad *in vitro* de las células tumorales a la HT, se procedió a comprobar que ocurría en un modelo *ex vivo* de hígado aislado. Posteriormente, se acometieron las experiencias *in vivo*, con animales portadores de NpM en el parénquima hepático.

### **A. Experimentos de hipertermia *in vitro* sobre células tumorales**

En un primer apartado se recogen los efectos que la exposición durante 45 minutos a 47° C produce sobre los cultivos de las células CC531. A continuación se exponen los resultados obtenidos al tratar los cultivos con los dos quimioterápicos descritos en el epígrafe anterior. En el tercer apartado, se analiza el efecto de la HT sobre cultivos expuestos a los fármacos. Por último, en el cuarto apartado se determina el efecto de los quimioterápicos sobre cultivos expuestos a HT.

#### **1. Efecto de la hipertermia sobre la proliferación celular**

Se ha estudiado el efecto de la HT sobre la proliferación de células tumorales en condiciones normales de cultivo. Para ello, se han realizado tres réplicas de un experimento en el que, tras someter a HT a los cultivos celulares, se midió su viabilidad celular a distintos tiempos de crecimiento previo: 24, 48 y 72 horas.

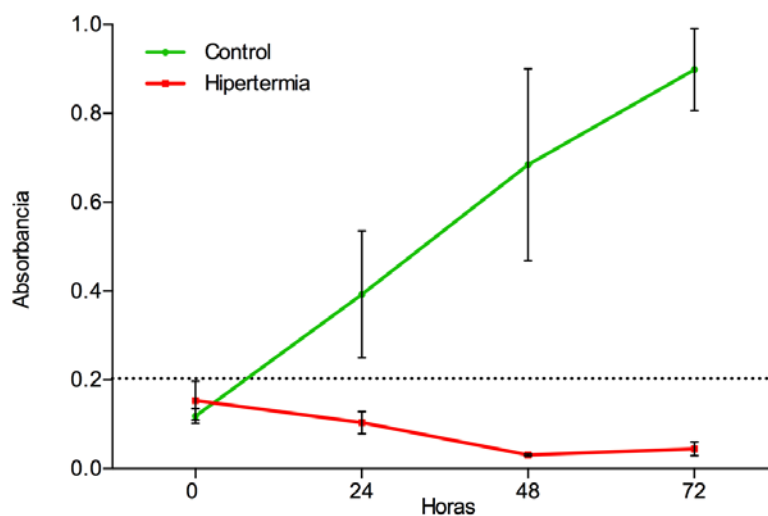


Figura 86. Proliferación de los cultivos (en UAA) control y sometidos a HT tras 24 horas de crecimiento inicial . La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).

Como puede apreciarse en las Figuras 86, 87 y 88, la HT originó un importante declive en la curva de crecimiento, con una disminución progresiva del número de células en el cultivo durante las 48 horas subsiguientes, de tal manera que en ninguna de las tres experiencias pudo recuperarse el nivel de los controles, transcurridas 72 horas.

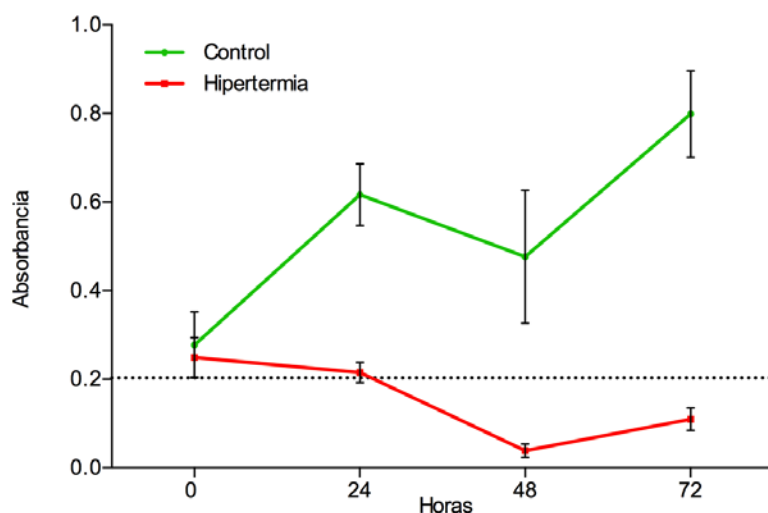


Figura 87. Proliferación de los cultivos (en UAA) control y sometidos a HT tras 48 horas de crecimiento inicial. La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).

El efecto de la HT sobre los cultivos no fue una simple destrucción directa de células por el factor temperatura, sino que en las 24 horas posteriores a la HT continuó habiendo muerte celular (tal como demuestra la progresiva disminución de valores absolutos de células en el cultivo).

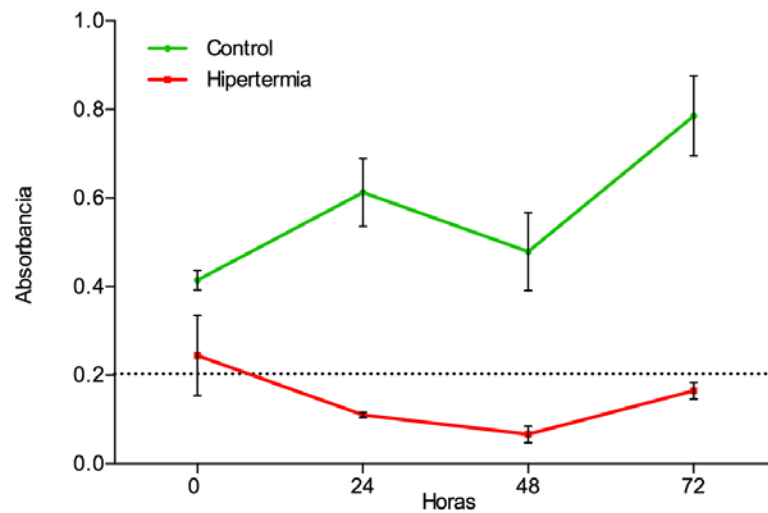


Figura 88. Proliferación de los cultivos (en UAA) control y sometidos a HT tras 72 horas de crecimiento inicial . La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).

Tabla 8. Pendiente de las gráficas de cultivos en las últimas 24 horas de la experiencia (calculada en grados).

| <b>Tiempo previo de cultivo</b> | <b>Control</b> | <b>Hipertermia</b> |
|---------------------------------|----------------|--------------------|
| 24 horas                        | 41,7           | 8,1                |
| 48 horas                        | 53,3           | 16,5               |
| 72 horas                        | 51,9           | 22,3               |
| Media                           | 48,97          | 15,63              |

Sin embargo, las pocas células que logran sobrevivir a las 48 horas, mantienen su capacidad proliferativa, tal como se puede ver por el repunte que ocurre a las 72 horas. Valorando la pendiente de la curva de crecimiento, en lugar de los valores absolutos de absorbancia, se observa que dicho repunte en el crecimiento celular apenas alcanza el 50% respecto al control (Tabla 8).

Por último, al expresar el recuento de células en los cultivos sometidos a HT como porcentaje del correspondiente valor en su cultivo control (Figura 89), se observa que el comportamiento ha sido similar en las tres experiencias realizadas, lo que refuerza la significación de nuestros hallazgos.

Con independencia del tiempo previo de cultivo, 24, 48 o 72 horas, hay una disminución del porcentaje de viabilidad respecto al control hasta 48 horas después de la exposición a HT. Sin embargo, este porcentaje de viabilidad aumenta en las 72 horas.

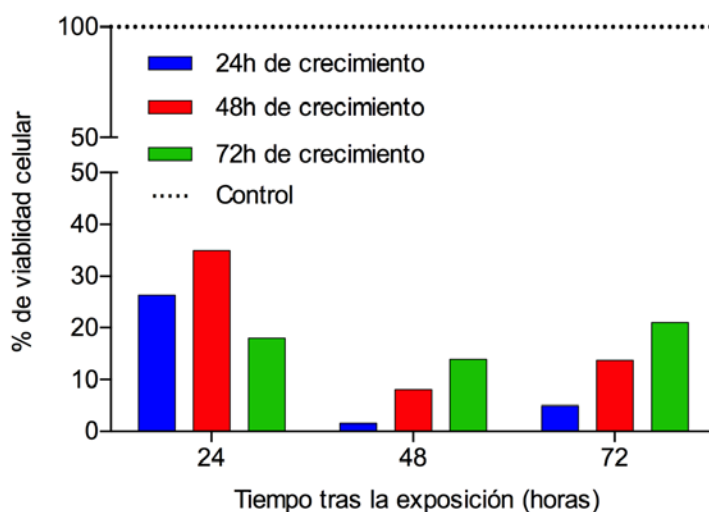


Figura 89. Recuento celular, expresado como porcentaje respecto al control, de los cultivos sometidos a HT tras 24, 48 o 72 horas de crecimiento previo al inicio de la experiencia. Lecturas realizadas 24, 48 y 72 horas después del shock térmico.



## 2. Efecto de la quimioterapia sobre la proliferación celular

En este apartado se presentan los resultados del estudio realizado para valorar el efecto de la adición de los quimioterápicos ATRA y 5-FU, solos o en combinación, sobre la proliferación de las células tumorales.

### Acido All-trans-retinoico

Tal y como se observa en las Figura 90 la adición de 10  $\mu$ M ATRA al cultivo reduce significativamente la proliferación de las células.

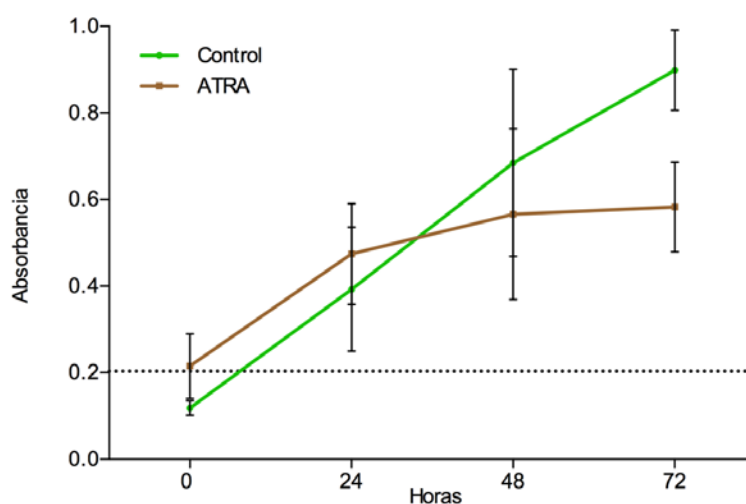


Figura 90. Proliferación de los cultivos (en UAA) controles y tras completar el tratamiento con ATRA durante 24 horas. La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).

Durante las primeras 24 horas, los cultivos expuestos a ATRA tuvieron un curva de proliferación idéntica, con pendientes sin diferencias estadísticas. A las 48 horas, pese a obtenerse valores de absorbancia un 16% menores en los cultivos suplementados con ATRA, respecto al control, tampoco se aprecian diferencias estadísticamente significativas ( $0,566 \pm 0,19$  vs.  $0,684 \pm 0,21$ ;  $p > 0,05$ ). Al finalizar la experiencia, la proliferación media de los cultivos tratados fue un 35% menor que el control ( $0,582 \pm 0,10$  vs.  $0,898 \pm 0,09$ ;  $p < 0,0001$ )

## 5-Fluorouracilo

El segundo apartado de estas experiencias refleja los efectos producidos por la adición de 0,25  $\mu\text{g/ml}$  5-FU a los cultivos.

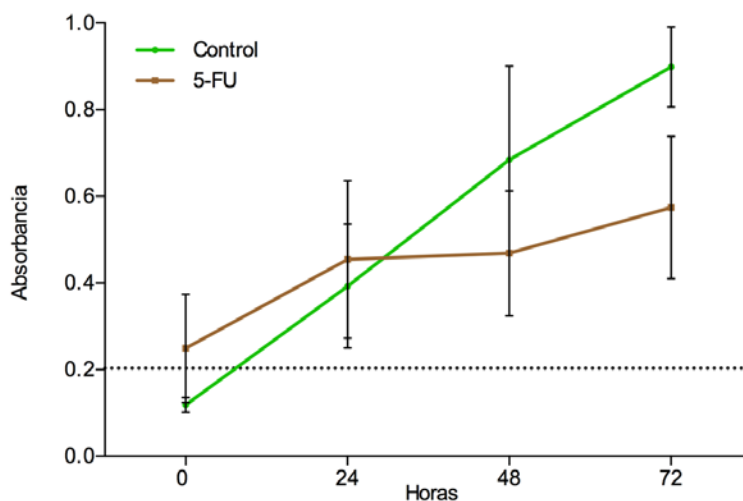


Figura 91. Proliferación de los cultivos (en UAA) controles y tras completar el tratamiento con 5-FU durante 24 horas. La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).

En la Figura 91 se observa cómo, durante las primeras 24 horas tras la exposición, los cultivos suplementados con 5-FU no mostraron diferencias significativas, respecto al control, en los valores de absorbancia medidos ( $0,454 \pm 0,18$  vs  $0,392 \pm 0,14$ ;  $p > 0,05$ ). Sin embargo, entre las 24 y las 48 horas, se produjo un efecto meseta en la curva de crecimiento, durante el cual la proliferación celular se detuvo, de tal manera que al final de dicho periodo, la absorbancia en los cultivos tratados, fue un 30% inferior de la de los controles ( $0,468 \pm 0,14$  vs.  $0,684 \pm 0,22$ ;  $p < 0,05$ ). La diferencia fue ligeramente mayor en términos absolutos al finalizar el experimento, si bien, calculada como porcentaje respecto al control, siguió siendo un 30% menor ( $0,574 \pm 0,16$  vs.  $0,898 \pm 0,09$ ;  $p < 0,001$ ).

### Acido All-trans-retinoico con 5-Fluorouracilo

Por último, se aborda la presentación de los resultados obtenidos al asociar los dos fármacos en los cultivos (10  $\mu$ M ATRA + 0,25  $\mu$ g/ml 5-FU). En términos globales, el resultado de esta experiencia difiere poco de lo observado al utilizar únicamente ATRA.

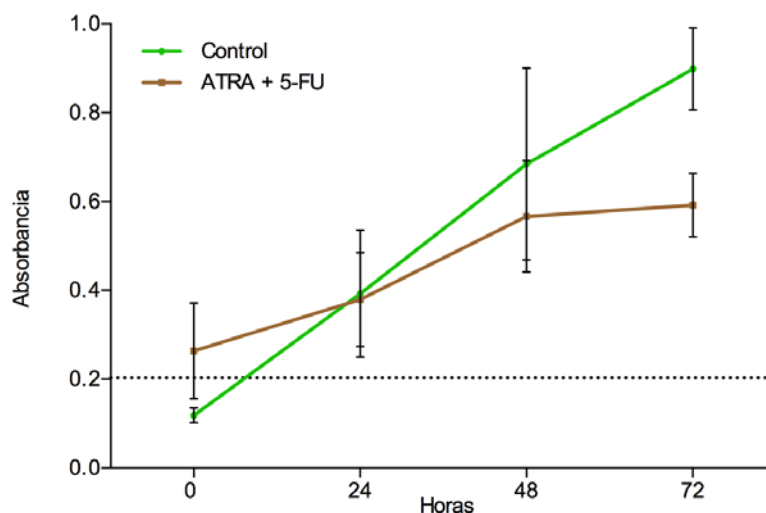


Figura 92. Proliferación de los cultivos (en UAA) controles y tras completar el tratamiento con ATRA y 5-FU durante 24 horas. La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).

Así, en los cultivos tratados, se observa que en las primeras 24 horas no hay diferencia en la proliferación celular, respecto al control ( $0,380 \pm 0,10$  vs  $0,393 \pm 0,14$ ;  $p > 0,05$ ). A las 48 horas ocurre lo mismo, los valores de absorbanza son un 18% menores en los cultivos tratados, pero sin que esto suponga diferencias estadísticamente significativas respecto al control ( $0,566 \pm 0,12$  vs  $0,684 \pm 0,21$ ;  $p > 0,05$ ). En cambio, una vez transcurridas 72 horas, al igual que ocurría al tratar sólo con ATRA, en los cultivos tratados se miden unos niveles medios de absorbanza un 35% inferiores al valor medio de los controles ( $0,592 \pm 0,07$  vs  $0,900 \pm 0,09$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 92).

Finalmente, al representar el número de células viables de los cultivos tratados con los quimioterápicos como porcentaje con respecto al valor correspondiente en el cultivo control (Figura 93), se observa de forma más clara el efecto antiproliferativo de los fármacos estudiados.

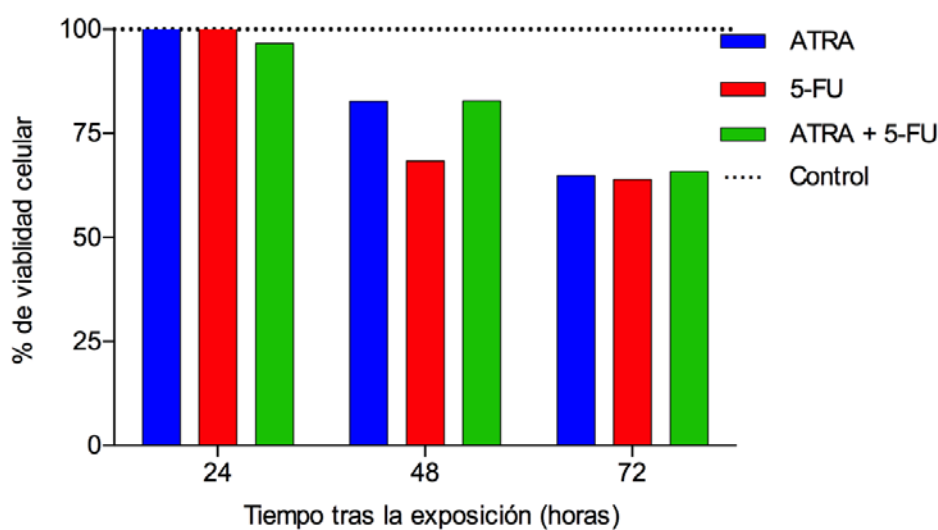


Figura 93. Recuento celular expresado como porcentaje respecto al control en los cultivos tratados con los distintos fármacos o su combinación.

En las tres experiencias realizadas, tanto empelando los fármacos en solitario como combinados, se observa que, a las 72 horas de la exposición a los tóxicos, el porcentaje de células viables respecto a su control es idéntico en las tres situaciones, alrededor del 64-66%. Si bien es cierto que, en nuestras experiencias, el 5-FU es el fármaco que más rápidamente consigue disminuir el porcentaje de células viables; a las 48 horas de la exposición, los cultivos expuestos a 5-FU ya había alcanzado un 68% de viabilidad, mientras que en los cultivos expuestos a ATRA fue de un 82%, al igual que en el caso de la combinación de ATRA+5-FU.

### 3. Efecto de la quimioterapia sobre la proliferación de cultivos sometidos a hipertermia

A continuación, se muestran los resultados de las experiencias llevadas a cabo para conocer el efecto que el tratamiento con HT tiene sobre cultivos celulares sometidos a los dos agentes quimioterapéuticos utilizados, ATRA y 5-FU y a ambos juntos.

#### Ácido All-trans-retinoico

La combinación del tratamiento con ATRA y la HT, mostró una mayor atenuación en la proliferación de los cultivos con respecto a los tratados únicamente con HT.

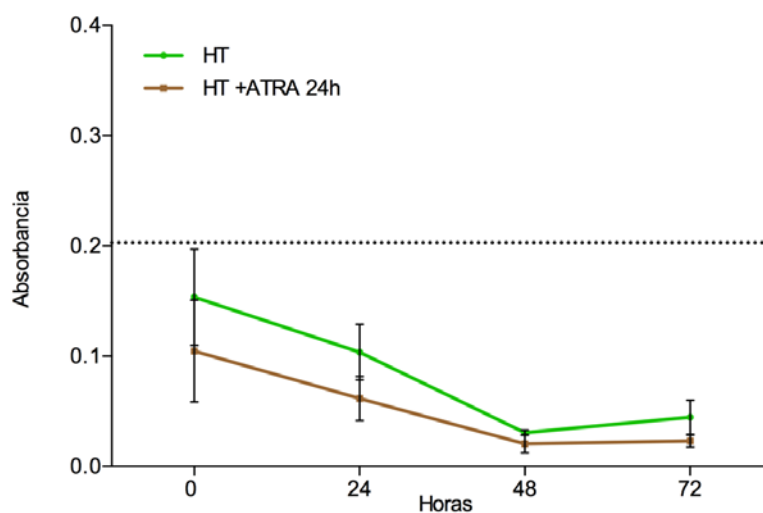


Figura 94. Proliferación celular (en UAA) tras completar el tratamiento con ATRA, posterior a la exposición a HT. La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).

Los cultivos expuestos a HT y tratados además con ATRA durante 24 horas (Figura 94) muestran una curva de crecimiento similar a su control, expuesto únicamente a HT. Se produce un descenso en el recuento de células hasta las 48 horas después de la aplicación de la HT, alcanzando los valores mínimos en tanto en los cultivos tratados con HT+ATRA como los expuestos únicamente a HT ( $0,020 \pm 0,008$  vs  $0,030 \pm 0,002$ ;  $p > 0,05$ ). Veinticuatro horas después, los cultivos expuestos únicamente a HT

experimentan un leve repunte en el recuento celular ( $0,045 \pm 0,015$ ), sin embargo, los cultivos tratados con ATRA permanecen estables y no experimentan variaciones en el número de células ( $0,023 \pm 0,005$ ).

### 5-Fluorouracilo

El tratamiento con  $0,25 \mu\text{g/ml}$  5-FU combinado con HT demostró tener un menor efecto sobre la proliferación celular, respecto al tratamiento de ATRA e HT.

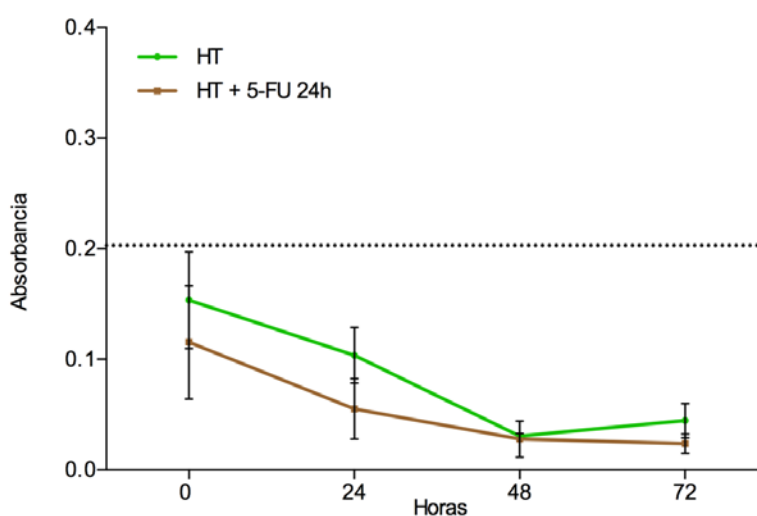


Figura 95. Proliferación celular (en UAA) tras completar el tratamiento con 5-FU, posterior a la exposición a HT. La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).

Los cultivos suplementados durante 24 horas con 5-FU y posteriormente expuestos a HT (Figura 95), muestran un patrón de crecimiento similar al control, expuesto sólo a HT. Ambos sufren una disminución del número de células durante las 48 primeras horas, si bien únicamente presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos a las 24 horas ( $0,055 \pm 0,02$  vs  $0,103 \pm 0,025$ ;  $p < 0,01$ ). A las 48 y 72 horas (no existen diferencias en los cultivos tratados con 5-FU tras la HT respecto al control, sólo expuesto a HT).

A pesar de ello, el cultivo control muestra, al final de la experiencia, una recuperación en su capacidad proliferativa. Así, a las 72 horas, el cultivo tratado con 5-FU tras la HT presenta un 52% menos de viabilidad que el control únicamente sometido a HT ( $0,023 \pm 0,008$  vs  $0,044 \pm 0,015$ ;  $p > 0,05$ ).

### Acido All-trans-retinoico con 5-Fluorouracilo

En la Figura 96 se muestra el efecto que ejerce sobre la proliferación celular el tratamiento combinado de ATRA + 5-FU e HT, el cual ha mostrado tener un mayor efecto antiproliferativo sobre las células.

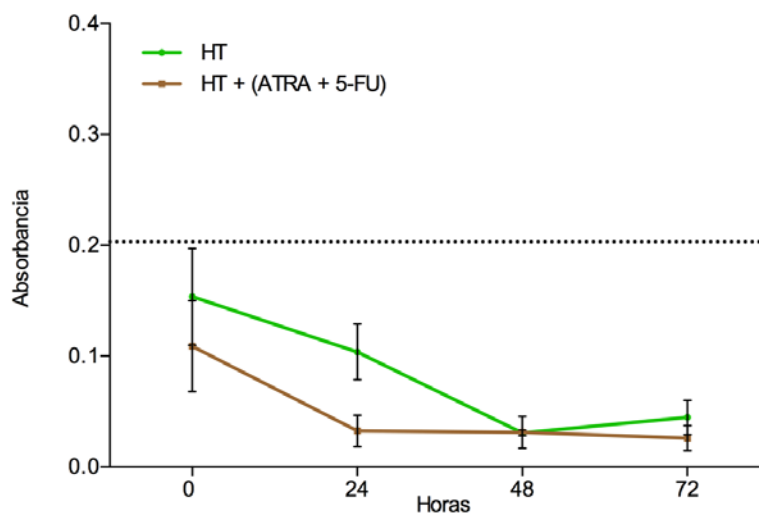


Figura 96. Proliferación celular (en UAA) tras completar el tratamiento con ATRA, posterior a la exposición a HT. La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).

En el experimento realizado con exposición a ambos fármacos (Figura 100) tras el insulto térmico, únicamente se han encontrado diferencias significativas, al igual que con ambos tóxicos por separado, a las 24 horas. Ambos presentaron, a las 24 horas, una disminución progresiva del número de células, con una caída acusada del número de células en el cultivo tratado con ATRA+5-FU e HT, respecto al control ( $0,032 \pm 0,014$  vs  $0,103 \pm 0,025$ ;  $p < 0,0001$ ). El valor medido en los cultivos tratados con HT y los fármacos se mantiene estable hasta las 72 horas ( $0,025 \pm 0,011$ ). En las últimas 24

horas, en el cultivo control, únicamente expuesto a HT, hay un incremento en el número de células, siendo 58 superior ( $0,025 \pm 0,011$  vs  $0,044 \pm 0,015$ ;  $p > 0,05$ ).

Finalmente, al representar el recuento celular de los cultivos tratados con HT y los fármacos como porcentaje de viabilidad respecto a los cultivos únicamente expuestos a HT, se observa como la quimioterapia potencia el efecto de la HT en las primeras 24, reduciendo la viabilidad del cultivo a un 60% (ATRA), 53% (5-FU) y 31% (ATRA+5-FU) (Figura 97).

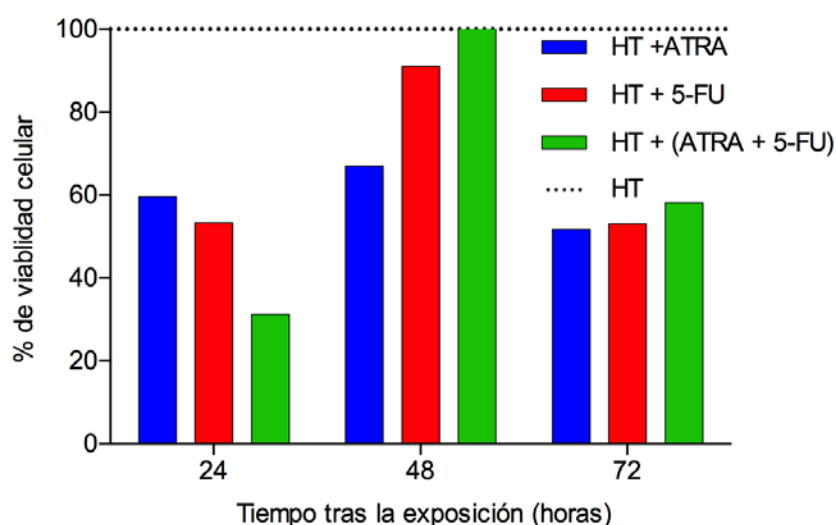


Figura 97. Recuento celular expresado como porcentaje de la viabilidad celular de los cultivos expuestos al tratamiento combinado de HT y quimioterapia, respecto al control tratado únicamente con HT (línea discontinua de puntos).

Sin embargo, 48 horas después de la exposición a los fármacos, sólo el ATRA, y el 5-FU ligeramente, parecen mantener el efecto potenciador mencionado anteriormente, logrando mantener la viabilidad de los cultivos suplementados con ATRA en un 60% y un 90% en el caso del 5-FU, respecto a la HT únicamente.

En el caso del uso combinado de ATRA+5-FU tras la HT, se obtiene un porcentaje de viabilidad del 100%, es decir, el mismo valor medio de absorbancia que la exposición únicamente a HT.



En la medición realizada a las 72 horas, los porcentajes de viabilidad en los tres casos, se sitúan en torno al 52-58%.

#### 4. Efecto de la hipertermia sobre cultivos expuestos a quimioterápicos

Por último, en este apartado se analiza el efecto combinado de la HT junto con la quimioterapia sobre la proliferación celular en cultivo. Las células tratadas con 10  $\mu\text{M}$  ATRA, 0,25  $\mu\text{g/ml}$  5-FU o la combinación de ambas durante distintos periodos de tiempo, se sometieron a HT y se midió la viabilidad celular de los cultivos a distintos tiempos tras el insulto térmico.

#### Ácido All-trans-retinoico

La exposición a HT de los cultivos tratados con ATRA 10  $\mu\text{M}$  tiene un claro efecto negativo sobre la viabilidad celular.

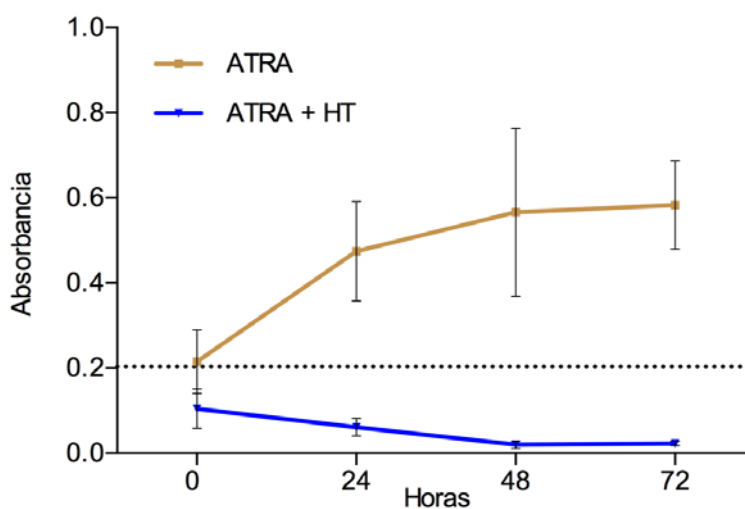


Figura 98. Proliferación celular (en UAA) tras completar el tratamiento con HT, posterior a la exposición a ATRA. La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).

Tras una exposición al ATRA durante 24 horas (Figura 98), se observa que los cultivos sometidos posteriormente a HT sufrieron una reducción significativa de la viabilidad celular inmediatamente después de la finalización del insulto térmico (0 horas), respecto

a los tratados únicamente con ATRA ( $0,104 \pm 0,04$  vs.  $0,215 \pm 0,07$ ;  $p < 0,05$ ). Esta reducción continúa hasta las 48 horas, alzando el mínimo valor de absorbancia recogido ( $0,020 \pm 0,008$  vs.  $0,566 \pm 0,197$ ;  $p < 0,0001$ ).

### 5-Fluorouracilo

Los cultivos tratados con 5-FU ( $0,25 \mu\text{g/ml}$ ) e HT, al igual que el caso anterior, sufren una marcada reducción en el número de células.

Tras la exposición durante 24 horas a 5-FU (Figura 99) y posterior HT, se observan diferencias en los valores de absorbancia inmediatamente después del insulto térmico (0 horas), respecto al control únicamente tratado con 5-FU ( $0,111 \pm 0,05$  vs  $0,249 \pm 0,12$ ;  $p < 0,01$ ). Los cultivos sometidos además a HT muestran una reducción casi lineal en el recuento celular, llegando a las 72 horas a unos valores de absorbancia de  $0,023 \pm 0,005$ , mientras que en ese mismo tiempo, los cultivos sometidos únicamente al fármaco, registran valores de absorbancia de  $0,582 \pm 0,10$  ( $p < 0,0001$ ).

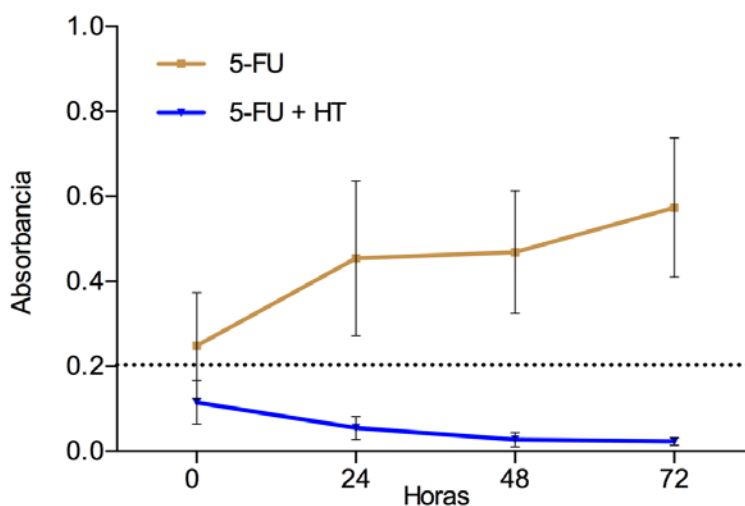


Figura 99. Proliferación celular (en UAA) tras completar el tratamiento con HT, posterior a la exposición a 5-FU. La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).

### All-trans-retinoico con 5-Fluorouracilo

Por último, en éste apartado, se analizan los efectos sobre los cultivos de la exposición combinada a ATRA 10  $\mu$ M y 5-FU 0,25  $\mu$ g/ml y la HT a 47° C.

Tras una exposición durante 24 horas a ambos tóxicos (Figura 100), los cultivos sometidos a HT mostraron, inmediatamente después, una disminución significativa del número de células ( $0,108 \pm 0,041$  vs  $0,264 \pm 0,107$ ;  $p < 0,0001$ ), alcanzándose rápidamente un efecto deletéreo sobre la proliferación celular a las 24 horas y manteniéndose en el tiempo a las 48 y 72 horas ( $0,032 \pm 0,01$ ;  $0,0312 \pm 0,014$ ;  $0,026 \pm 0,011$ , respectivamente). El recuento celular se redujo un 90%, 95% y 97% respectivamente.

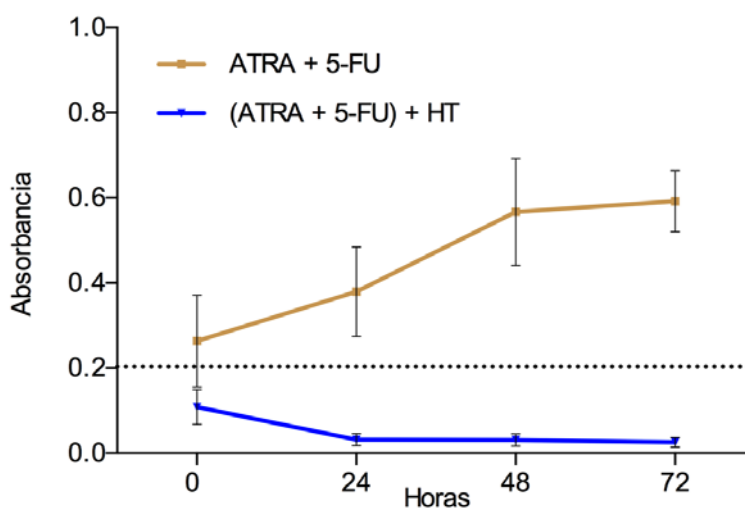


Figura 100. Proliferación celular (en UAA) tras completar el tratamiento con HT, posterior a la exposición a ATRA+5-FU. La línea de puntos muestra el recuento celular previo al inicio de los experimentos (en UAA).

Para poder analizar de forma más detallada el efecto de los tratamientos sobre la proliferación celular, se representa el número de células viables de los cultivos sometidos además HT como porcentaje del correspondiente control tratados únicamente con quimioterapia (Figura 101).

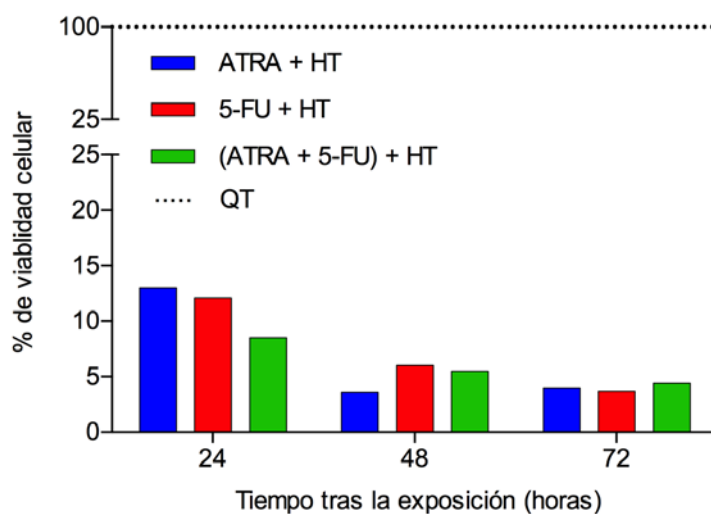


Figura 101. Viabilidad de los cultivos expuestos a los fármacos y posteriormente HT, respecto al control (tratado únicamente con los fármacos, línea discontinua de puntos).

Este análisis confirma las observaciones realizadas previamente y permite ver que los cultivos tratados con la combinación de fármacos e HT pierden capacidad proliferativa respecto al control sometido únicamente a quimioterapia. Éste hecho es prácticamente independiente del quimioterápico empleado; sin embargo, no lo es respecto al tiempo tras la HT, ya que 48 horas después de la agresión térmica se observa aún una disminución en el porcentaje de viabilidad, que se mantiene hasta las 72 horas.

## B. Experimentos *ex vivo* de inducción de hipertermia en el hígado

Para proceder de lo más sencillo a lo más complejo, se realizaron primero experiencias con NpM comerciales, de elevado SAR. Una vez ajustados los parámetros, se procedió a repetir las experiencias ya con NpM de producción propia.

### 1. Experiencia con nanopartículas de elevado SAR

El primer experimento se llevó a cabo con NpM C1, de elevado SAR, suspendidas en agua destilada. Tras 20 minutos de exposición del hígado a 12 KA/m y 699 KHz se registró un incremento de catorce grados en la sonda insertada en uno de los lóbulos perfundidos con la solución de NpM. En cambio, en el LLI, que se excluyó a la hora de realizar la perfusión de las NpM, el incremento térmico fue de menos de tres grados; la sonda externa apenas registró cambios en la temperatura (Tabla 9).

Tabla 9. Modificaciones de la temperatura tras estimular las NpM

|                               | <b>Inicial</b> | <b>Final</b> | $\Delta T^a$ |
|-------------------------------|----------------|--------------|--------------|
| <b>Lóbulo con NpM</b>         | 28,9°          | 43°          | 14,1°        |
| <b>Tejido hepático normal</b> | 28,3°          | 30,9°        | 2,6°         |
| <b>Sonda ambiente</b>         | 28,1°          | 28,4°        | 0,3°         |

A continuación se repitió la experiencia con otro hígado perfundido con las mismas NpM, pero esta vez se suspendieron en suero salino, en lugar de en agua destilada (Tabla 10).

Tras quince minutos de exposición a 12 KA/m y 699 KHz tan solo se observó un incremento de 4° C en el parénquima perfundido, por lo que se procedió a modificar las condiciones del IRF, reduciendo la intensidad a 9 KA/m pero incrementando la frecuencia a 918 MHz. De esta manera se logró aumentar la temperatura otros tres grados en el hígado con NpM.

Tabla 10. Modificaciones de la temperatura tras estimular las NpM suspendidas en suero salino.

|                               | 1ª estimulación |       |              | 2ª estimulación |       |              |
|-------------------------------|-----------------|-------|--------------|-----------------|-------|--------------|
|                               | Inicial         | Final | $\Delta T^a$ | Inicial         | Final | $\Delta T^a$ |
| <b>Lóbulo con NpM</b>         | 26,7°           | 30,7° | 4°           | 29,5°           | 32,5° | 3°           |
| <b>Tejido hepático normal</b> | 27,1°           | 29°   | 1,9°         | 29,7°           | 30,5° | 0,8°         |
| <b>Sonda ambiente</b>         | 26,7°           | 26,7° | 0°           | 29,8°           | 31,8° | 2°           |

## 2. *Experiencia con nanopartículas de síntesis propia*

La tercera experiencia en hígado “ex vivo” se llevó a cabo con las NpM sintetizadas por el Departamento de Química Inorgánica de nuestra Universidad, que tienen una menor concentración de hierro, pero un SAR mayor. Debido a que el descenso de rendimiento observado tras la vehiculización en suero salino se atribuyó a la agregación de las NpM, la experiencia se llevó a cabo utilizando como solvente agua destilada, mientras se estudiaba cómo evitar la agregación en suspensiones salinas.

Se inició la experiencia con una exposición a 12 KA/m y 608 KHz durante 10 minutos, obteniéndose un incremento de algo menos de tres grados en el parénquima sembrado con NpM, mientras que en el hígado normal y en el medio externo apenas se registró calentamiento (Tabla 11). Tras otros veinte minutos de exposición a idéntica intensidad y 699 KHz, se logró otro incremento de casi cuatro grados en el tejido con NpM, frente a sólo un grado en el hígado normal y medio grado en el ambiente.

Así pues, se reprodujeron los resultados de la experiencia anterior, pero con una concentración de óxido férrico ocho veces menor.

Tabla 11. Modificaciones de la temperatura (° C) tras estimular las NpM de producción propia, suspendidas en agua destilada.

|                               | 1ª estimulación |       |              | 2ª estimulación |       |              |
|-------------------------------|-----------------|-------|--------------|-----------------|-------|--------------|
|                               | Inicial         | Final | $\Delta T^a$ | Inicial         | Final | $\Delta T^a$ |
| <b>Lóbulo con NpM</b>         | 27°             | 27,9° | 2,7°         | 27,8°           | 31,8° | 4°           |
| <b>Tejido hepático normal</b> | 26,2°           | 26,5° | 0,3°         | 26,7°           | 27,8° | 1,1°         |
| <b>Sonda ambiente</b>         | 25,9°           | 26,4° | 0,5°         | 26,5°           | 27°   | 0,5°         |

### 3. Estudio anatomopatológico de los especímenes

Con la finalidad principal de constatar la presencia de NpM en los órganos utilizados, se procedió al estudio anatomopatológico de muestras de los hígados perfundidos con NpM suspendidas en medio acuoso.

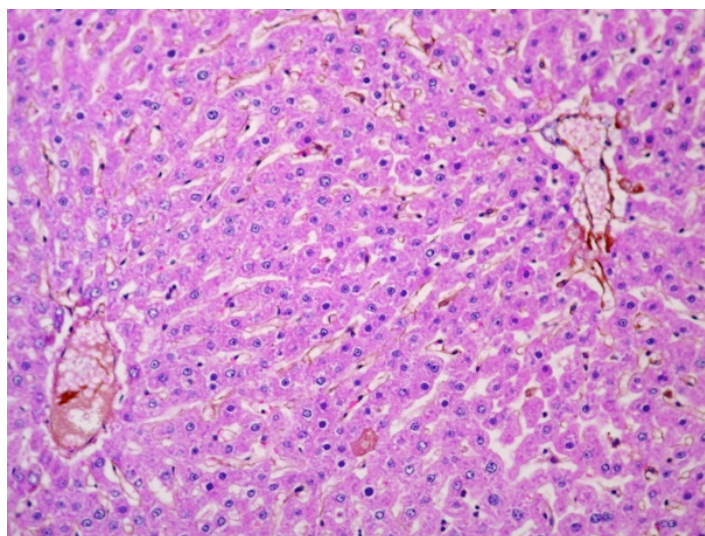


Figura 102. Sección histológica del LP de la rata G2 teñida con Hematoxilina-Eosina.

El hígado de la rata que recibió una infusión de NpM comerciales, que experimentó un incremento térmico de 14° C, presentó, a nivel histológico, un aspecto completamente normal. No mostró afectación celular compatible con termocoagulación, ni afectación alguna atribuible a la infusión acuosa (Figura 102). En el LLI, no infundido con NpM, considerado como control interno del experimento, tampoco se observaron lesiones (Figura 103).

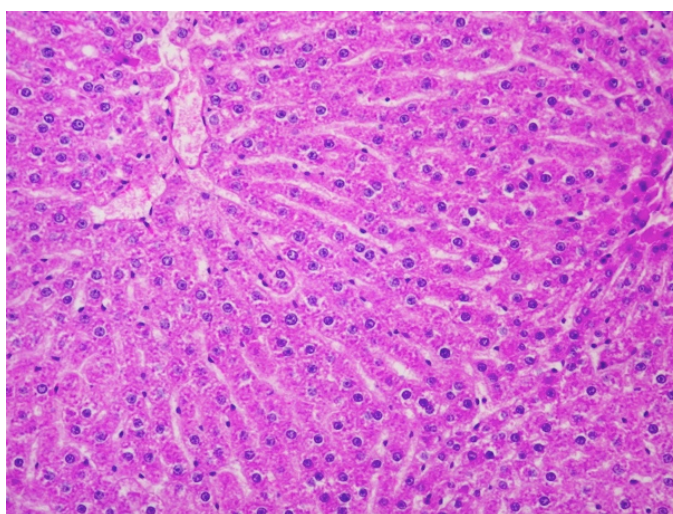


Figura 103. Sección histológica del LLI de la rata G2 teñida con Hematoxilina-Eosina.



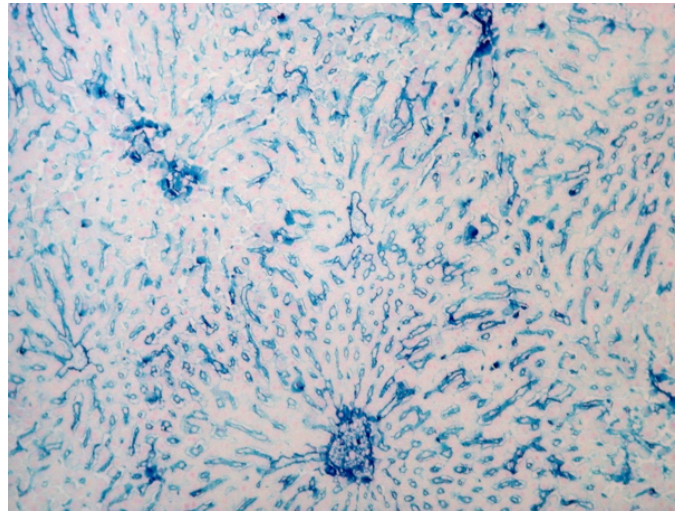


Figura 104. Sección histológica del LP de la rata G2 teñida con tinción de Perl's.

Al estudiar mediante la tinción de Perl's las muestras de hígado perfundido con NpM, se aprecia una importante cantidad de hierro. Los depósitos parecen situarse, sobre todo, a nivel de los sinusoides hepáticos (Figura 104). En cambio, en las muestras de tejido hepático sin NpM no se aprecia apenas coloración (Figura 105).

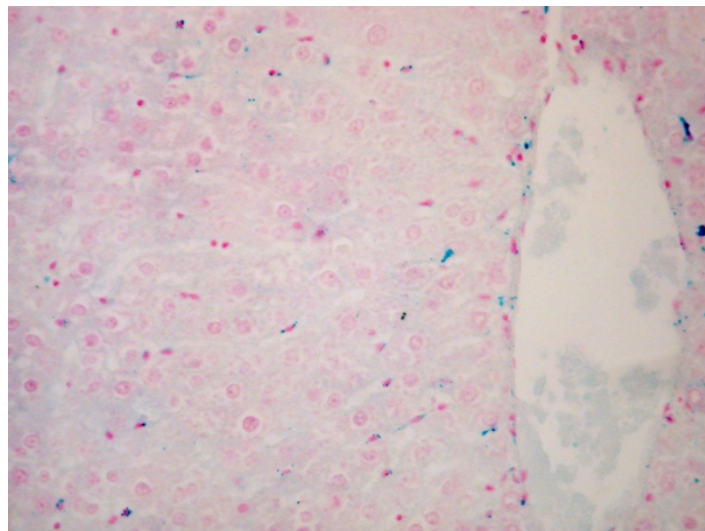


Figura 105. Sección histológica del LLI de la rata G2 teñida con tinción de Perl's.

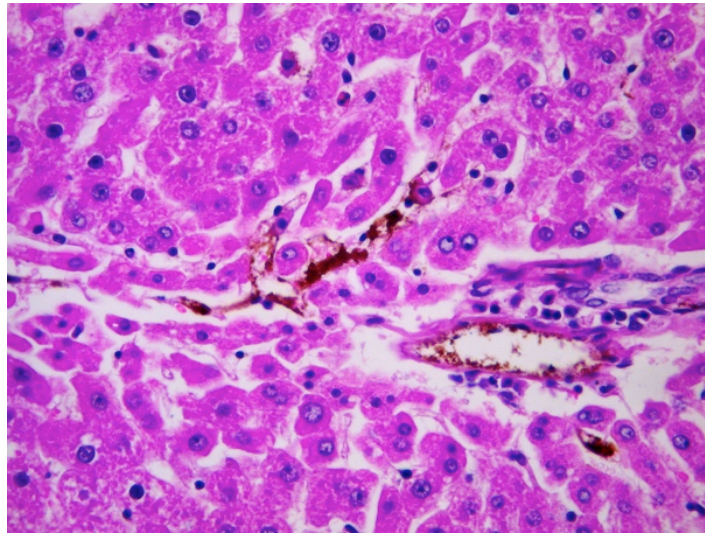


Figura 106. Sección histológica del LP de la rata E1 teñida con Hematoxilina-Eosina.

Por último, las muestras obtenidas del hígado perfundido con NpM P1 mostraron unos hallazgos que son prácticamente superponibles al caso anterior (Figura 106 y Figura 107).

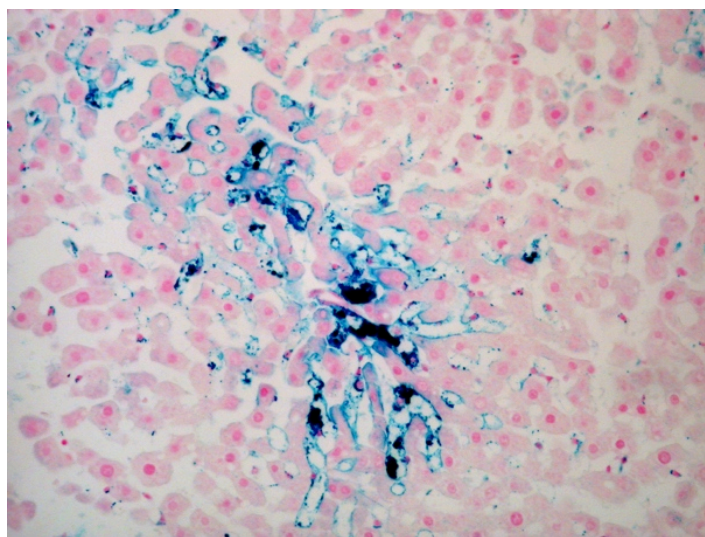


Figura 107. Sección histológica del LP de la rata E1 teñida con tinción de Perl's.

---

#### *4. Estudio de los especímenes con TCMC*

En los estudios realizados con TCMC de los hígados infundidos con NpM, no se ha podido visualizar la mayor concentración de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  que reveló la tinción de Perl's con Azul de Prusia. El equipo utilizado no ha constatado una mayor densidad radiológica en los lóbulos infundidos, comparando con los no infundidos.



## **Adhesión selectiva de la secuencia RDG a las células y al tejido tumoral**

Paralelamente a la comprobación de la eficacia de las NpM como agente capaz de inducir HT antitumoral, se llevaron a cabo estudios para comprobar y verificar la afinidad de la secuencia de peptidomiméticos RGD por la línea celular empleada en esta Tesis Doctoral.

Para ello, se completaron dos experiencias: una *in vitro* en la cual, los cultivos celulares de dicha línea celular anteriormente mencionada, estuvieron expuestos al RGD-fluoresceína; y otra *in vivo* sobre animales de experimentación con metástasis hepáticas, los cuales recibieron RGD-yodado y a los que posteriormente se les realizó pruebas de diagnóstico mediante TCMC.

### **A. Experimentos *in vitro* de adhesión selectiva con RGD-fluoresceína.**

#### ***1. Detección de la fluorescencia emitida por RGD-fluoresceína***

Previamente a iniciar los estudios de adhesión de los peptidomiméticos RGD sobre las células CC531, se determinó la emisión de fluorescencia (UAF) de diferentes concentraciones de los análogos RGD marcados con fluoresceína.

Para ello, en una placa de 96 pocillos, se dispusieron un rango de concentraciones de RGD-fluoresceína (10, 25, 50, 100 y 1000  $\mu\text{M}$ ) y se evaluó la emisión de fluorescencia en un fluorímetro, obteniéndose unos valores de  $9536 \pm 156$ ,  $14783 \pm 1321$ ,  $23542 \pm 2116$ ,  $37852 \pm 4175$  y  $76013 \pm 1704$  UAF, respectivamente (Figura 108).

Se determinó que la concentración de peptidomiméticos RGD óptima a emplear en los posteriores ensayos de adhesión sobre células CC531 es la concentración de 50  $\mu\text{M}$ , ya que dicha concentración permite obtener señal de suficiente intensidad, manteniendo una relación coste-beneficio aceptable.

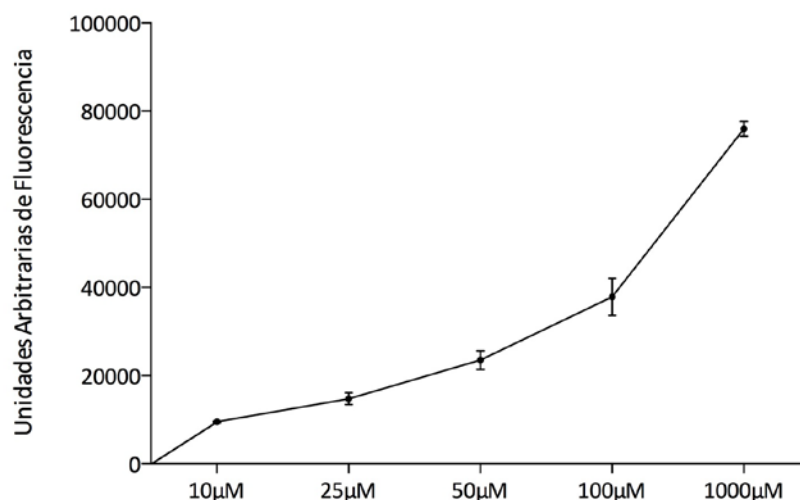


Figura 108. Representación gráfica de los valores promedio y desviación estándar de la fluorescencia (UAF) emitida por diferentes concentraciones de RGD-fluoresceína en medio de cultivo.

## 2. Adhesión de RGD-fluoresceína a células tumorales CC531

Se realizó un ensayo en placas de 24 pocillos para determinar el tiempo y las condiciones óptimas de cultivo. Se pusieron en contacto las células en crecimiento exponencial con los peptidomiméticos y se realizaron medidas de la fluorescencia emitida tras un tiempo de exposición de 1, 2, 3 y 4 horas. Con el objetivo de determinar la fluorescencia emitida por los peptidomiméticos RGD-fluoresceína adheridos específicamente a las células, se analizó la señal emitida por los RGD-fluoresceína de los pocillos lavados con PBS como paso previo a la lectura en el fluorímetro.

Como se observa en la Tabla 12, tras una hora de exposición se detecta fluorescencia emitida por los RGD-fluoresceína en los pocillos de las placas de cultivo. Tras una exposición de 2 horas, la fluorescencia detectada es un 57% mayor respecto a la observada en el tiempo de 1 hora y, además, es el valor máximo alcanzado, ya que la intensidad de fluorescencia decae a las 3 y 4 horas.

Tabla 12. Valores promedio y desviación estándar de la fluorescencia (UAF) emitida por los RGD-fluoresceína: cultivo control no expuesto y tras 1, 2, 3 y horas de exposición

|                          | Control         | 1 hora           | 2 horas           | 3 horas            | 4 horas            |
|--------------------------|-----------------|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| <b>Lavado con PBS</b>    | 59,33 ±<br>2,58 | 1.909 ±<br>201,8 | 3.016 ±<br>479,8  | 2.093,6 ±<br>322,7 | 2.466 ±<br>468     |
| <b>No lavado con PBS</b> |                 | 78.520 ±<br>910  | 86.030 ±<br>859,3 | 73.478 ±<br>1224   | 76.357 ±<br>3237,6 |

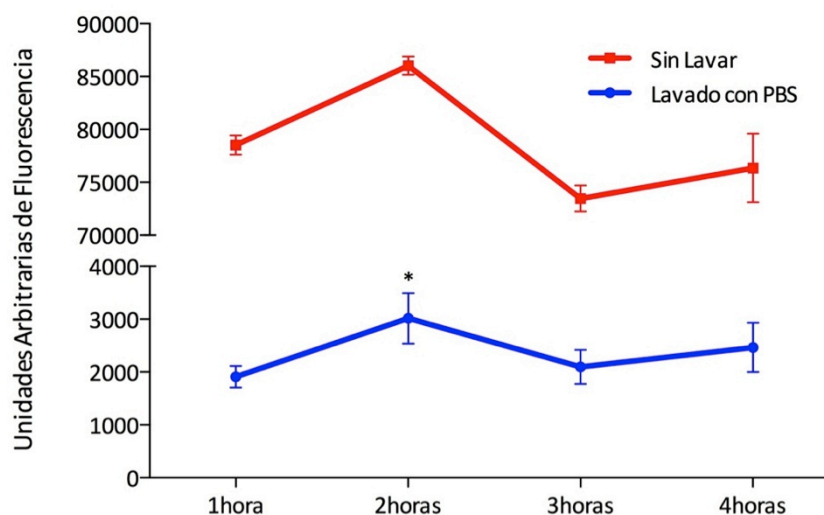


Figura 109. Representación gráfica del promedio y desviación estándar de la fluorescencia (UAF) emitida por los RGD-fluoresceína a distintos tiempos de exposición, lavados con PBS (línea azul y sin lavar (línea roja) antes de la lectura de la fluorescencia (línea azul).

Por otro lado, el lavado de los pocillos de las placas de cultivo con PBS provoca una caída de la señal de fluorescencia detectada, siendo la intensidad de los pocillos lavados entre 30-40 veces menor a la fluorescencia detectada en los pocillos sin lavar (Figura 109).

Adicionalmente, y como evidencia visual de que los RGD-fluoresceína estaban adheridos a las células en cultivo, se tomaron imágenes de microscopía de fluorescencia

(Figura 110A) y microscopía de campo claro (Figura 110B). En ambas imágenes se observa como el RGD-fluoresceína aparece adherido en la superficie de las células aisladas y únicamente en la periferia de aquellas células que habían proliferado formando agregados, sin que difundan al interior de los mismos.

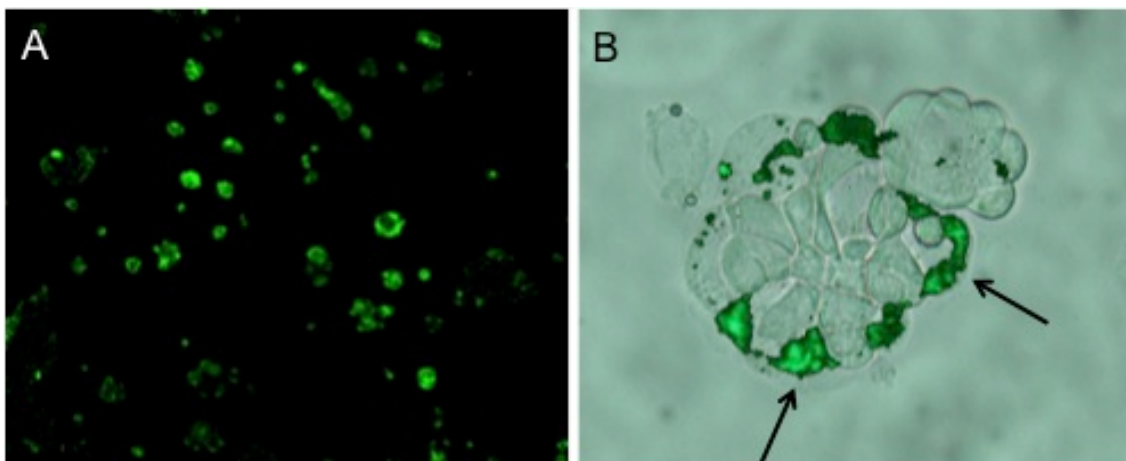


Figura 110. Microfotografías de microscopía de fluorescencia 100x (A) y microscopía de campo claro 200x (B) de células CC531 cultivadas con RGD-fluoresceína. Las flechas señalan la zona de unión de los RGD-fluoresceína a las célula situadas en las periferia de los agregados.

Teniendo en cuenta estos resultados y dado que no se encontraron estudios previos ni protocolos testados para el empleo de análogos de péptidos RGD sobre células tumorales en cultivo, se estableció un tiempo de 2 horas de exposición de las células CC531 a los RGD-fluoresceína, ya que en ese periodo de tiempo los peptidomiméticos se adhieren a la superficie celular. Además, también se estableció, como paso previo a la lectura en el fluorímetro, el lavado de los pocillos con PBS para eliminar toda la fluorescencia que debida a la adhesión inespecífica de los RGD-fluoresceína al fondo de los pocillos de las placas de cultivo.



## B. Ensayos de afinidad *in vivo* de la secuencia RGD-yodada

Una vez comprobada la adhesión en cultivo de la secuencia de peptidomiméticos RGD a células de la línea CC531, se procedió a realizar un ensayo de adhesión *in vivo* de dicha secuencia por las metástasis hepáticas inducidas mediante inyección directa de la línea celular empleada en los ensayos *in vitro*.

La mediana de la atenuación del tejido hepático en los animales que no recibieron la administración de ningún compuesto yodado fue de 92 (82-99) UH, mientras que en el tejido tumoral, dicho valor fue de 55 (36-65) UH (Tabla 13). Además, mediante ICP-MS se determinó la concentración de yodo en ambos tejidos, siendo de 23  $\mu\text{g/g}$  en el tejido hepático sano y 39  $\mu\text{g/g}$  en los implantes tumorales.

Tabla 13. Rango de valores de atenuación radiológica en Unidades Hounsfield (HU) y concentración de yodo por gramos de tejido fresco determinada por ICP-MS. (\*no se detectaron cambios en la cantidad de yodo basal determinada en ambos tejidos)

| Agente de contraste    | I administrado (mg) | Hígado  |                     | Tumor   |                     |
|------------------------|---------------------|---------|---------------------|---------|---------------------|
|                        |                     | HU      | [I] $\mu\text{g/g}$ | HU      | [I] $\mu\text{g/g}$ |
| Visipaque <sup>®</sup> | 30                  | 114-220 | 32                  | 79-87   | 35                  |
| RGD-i 35               | 27                  | 129-137 | 112 $\pm$ 48        | 188-201 | 113 $\pm$ 33        |
| RGD-i 53               | 24                  | 123-152 | *                   | 95-123  | *                   |
| RGD-i 52               | 17                  | 103-133 | *                   | 96-113  | *                   |
| Sin contraste          | 0                   | 82-99   | 23                  | 36-65   | 39                  |

Los animales recibieron tres tipos de agentes de contraste RGD-i con distintas cantidades de yodo cada uno de ellos, como recoge la Tabla 13. Además, también se empleó un compuesto utilizado en clínica como agente de contraste de uso habitual.

Se observa que solo con el RGD-i 35 se consiguió un aumento significativo de la atenuación radiológica selectiva en el tejido tumoral, comparándolo con el tejido hepático (Figura 111). Sin embargo, estos datos no se correlacionaron de igual manera con la cantidad de yodo exógeno cuantificada por ICP-MS, donde no existen diferencias significativas entre el tejido hepático y el tejido tumoral,  $113 \pm 33 \mu\text{g/g}$  y  $112 \pm 48 \mu\text{g/g}$  ( $p > 0,05$ ), respectivamente (Figura 112).

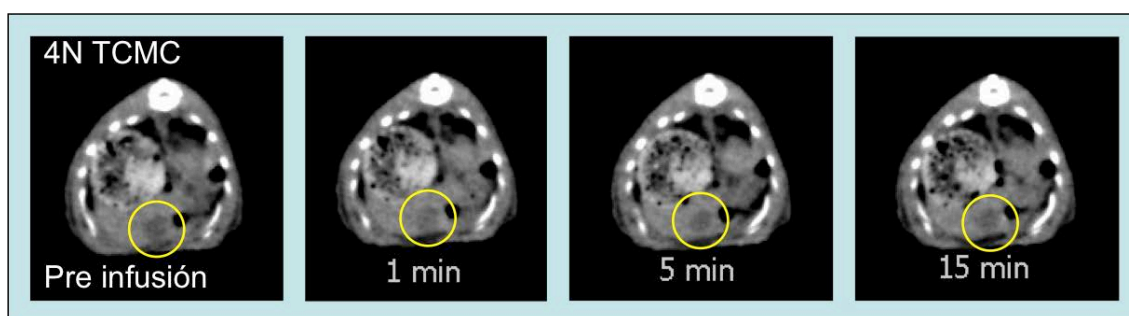


Figura 111. Secuencia exploratoria mediante TCMC, pre-infusión y 1, 5 y 15 minutos post-infusión. El círculo amarillo indica la zona donde se localiza el implante tumoral.

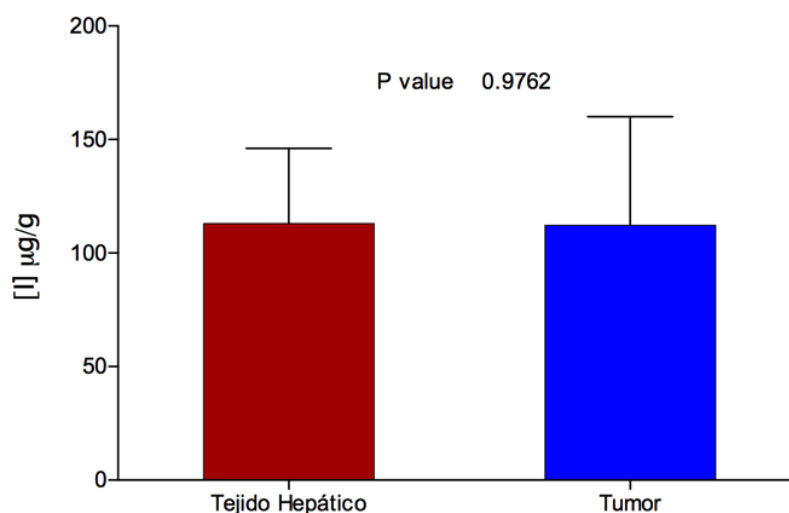


Figura 112. Representación de la media y la SD de la concentración de yodo, expresada en microgramos por gramo de tejido tumoral (rojo) y de tejido sano (azul) de hígados de ratas infundidas con RGD-I.

## C. Localización y cuantificación de las NpM-RGD en el tejido tumoral y el parénquima hepático sano

Con el objetivo de localizar el Fe depositado en el parénquima hepático sano y el tejido tumoral, tras la infusión de NpM funcionalizadas con la secuencia de peptidomiméticos RGD, los animales fueron sometidos a estudios de IRM, determinación de Fe mediante ICP-MS en ambos tejidos y análisis histopatológicos con tinción de Perl's.

### 1. Localización y estimación de los depósitos de Fe por medio de estudios de IRM

En primer lugar, mediante la secuencia STIR se localizaron los implantes tumorales, que aparecieron como masas hipertensas (Figura 113A y D).

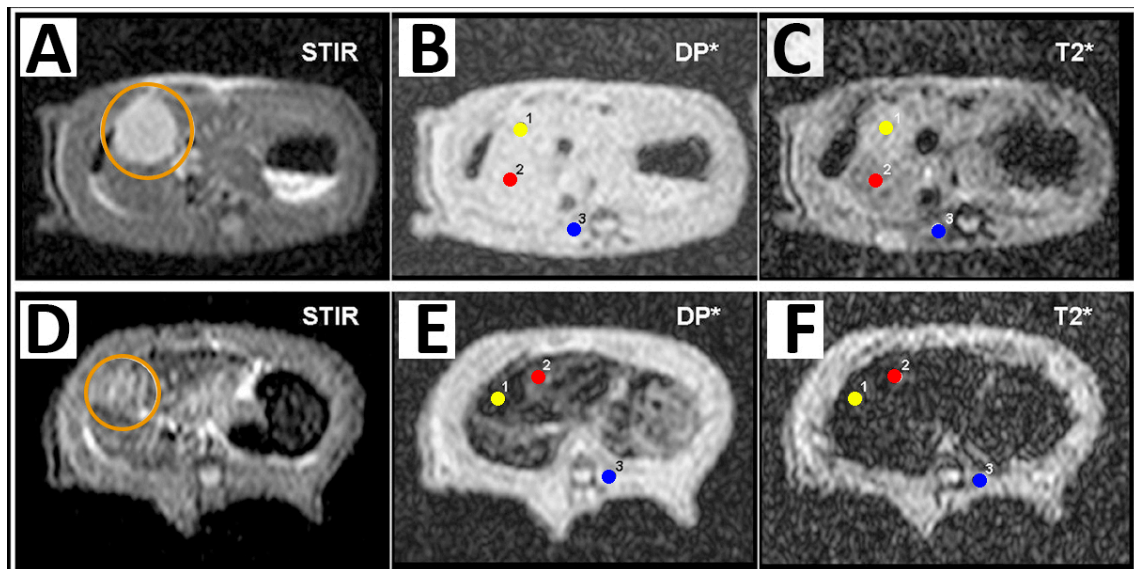


Figura 113. Plano axial de las secuencias STIR, DP\* y T2\* de IRM de animales no infundidos (A, B y C) e infundidos (D, E y F) con 1 ml de la suspensión de NpM-RGD con 1,5 mg Fe/ml. Los círculos naranjas enmarcan las lesiones tumorales hepáticas. Los puntos señalan las regiones de interés que se midieron para estimar el Fe en el tumor (amarillo), parénquima hepático (rojo) y músculos paravertebrales (azul).

Una vez localizados los implantes, con las secuencias eco gradiente DP\* (Figura 113B y E) y T2\* (Figura 113C y F), se pudo observar que en aquellos animales que recibieron la infusión intrarterial de NpM-RGD se pudo medir una caída de la IS en el tejido tumoral, y también en el parénquima hepático, atribuible a los depósitos de Fe de las NpM-RGD. La caída en la IS del tejido hepático sano dificultó la correcta localización de las áreas para realizar las medidas de IS y las estimaciones del contenido de Fe; sin embargo, pudieron usarse las secuencias STIR para su localización.

Tabla 14. Valores de la intensidad de señal (IS) para la secuencias DP\* y T2\*, registrados tanto en animales no infundidos como infundidos, en el tejido tumoral y el parénquima hepático sano.

| Tejido         | Secuencia DP* |             | Secuencia T2* |             |
|----------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
|                | Control       | NpM-RGD     | Control       | NpM-RGD     |
| <b>Hígado</b>  | 1,04 ± 0,07   | 0,41 ± 0,24 | 0,99 ± 0,17   | 0,2 ± 0,1   |
| <b>Tumor</b>   | 1,09 ± 0,07   | 0,27 ± 0,29 | 1,34 ± 0,19   | 0,23 ± 0,14 |
| <i>p valor</i> | 0,5672        | 0,092       | <0,0001       | 0,450       |

En primer lugar, como puede observarse en la Tabla 14 y la Figura 114, la IS medida en la secuencia DP\*, para ambos tejidos en animales control, fue prácticamente idéntica, sin que la diferencia fuera estadísticamente significativa ( $p=0,5672$ ); no así en la IS de la secuencia T2\* (Figura 115), donde vemos que la IS medida en el tejido fue, aproximadamente, 1,3 veces superior, siendo la diferencia estadísticamente significativa ( $p<0,0001$ ).

En el caso de los animales que recibieron NpM-RGD, tampoco se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos tejidos, en ninguna de las dos secuencias eco gradiente.

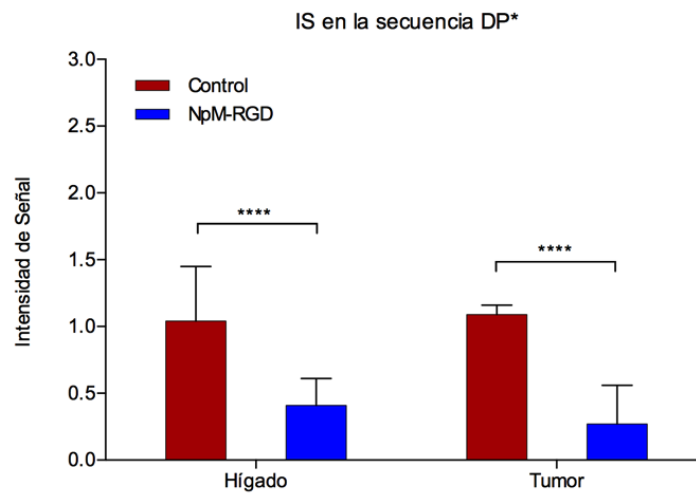


Figura 114. Representación de la media y la SD de los valores de la IS en la secuencia DP\*, en el tejido tumoral y hepático de ratas sin NpM-RGD (rojo) e infundidas con NpM-RGD (azul).

Comparando ambos grupos experimentales, con o sin NpM-RGD, la IS medida en la secuencia DP\* en el tejido hepático sano y tumoral de aquellos animales que recibieron la infusión de NpM-RGD fue un 60% y un 75% inferior, respectivamente; es decir, ambos tejidos presentaban una imagen hipointensa, debido a los depósitos de hierro tanto en el tumor como en el parénquima hepático sano.

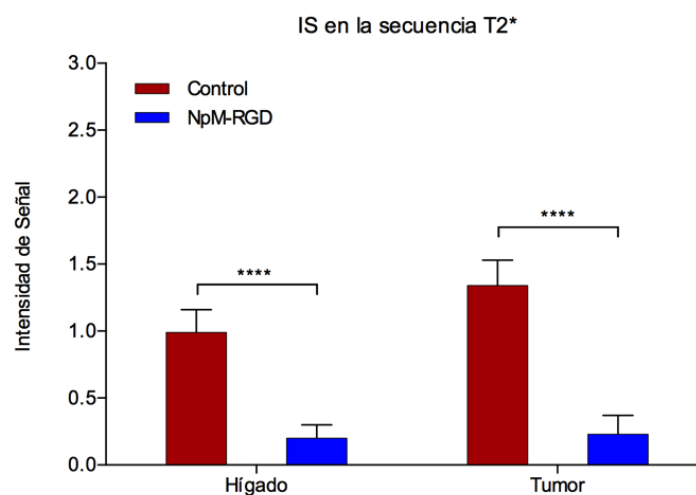


Figura 115. Representación de la media y la SD de los valores de la IS en la secuencia T2\*, en el tejido tumoral y hepático de ratas sin NpM-RGD (rojo) e infundidas con NpM-RGD (azul).

En la secuencia T2\*, los valores de atenuación en ambos tejidos presentaron una disminución aproximada del 80%, al comparar el grupo con NpM-RGD respecto al grupo control.

Tabla 15. Concentración de Fe estimada mediante IRM en los tejidos de animales con o sin infusión de NpM-RGD.

| Tejido         | [Fe] ( $\mu\text{mol/g}$ ) |                   |
|----------------|----------------------------|-------------------|
|                | Control                    | NpM-RGD           |
| <b>Hígado</b>  | 19 $\pm$ 5,2               | 115,3 $\pm$ 43,3  |
| <b>Tumor</b>   | 13,20 $\pm$ 2,8            | 148,9 $\pm$ 55,80 |
| <i>p valor</i> | <0,0001                    | <0,05             |

Además de las mediciones de la IS de cada tejido, el equipo de IRM empleado, también permitió realizar una estimación de la concentración de Fe por gramo de tejido seco ( $\mu\text{mol/g}$ ) (Tabla 15 y Figura 116).

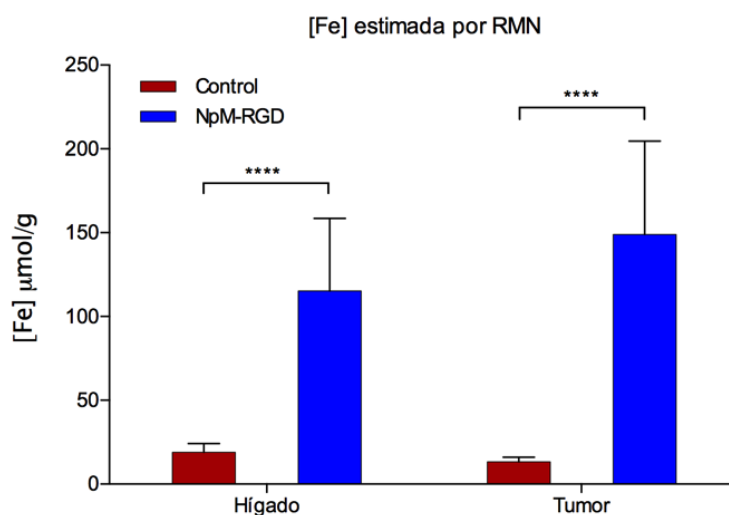


Figura 116. Representación de la media y la SD de la [Fe] estimada mediante IRM en el tejido tumoral y el parénquima hepático sano de ratas que recibieron una infusión intrarterial de NpM-RGD (azul) o que no la recibieron (rojo).

Podemos ver por estos datos que los niveles basales de Fe en el parénquima hepático son significativamente mayores que en el tumor ( $p < 0,0001$ ); y que además, tras la administración de NpM-RGD, ésta diferencia se mantiene pero siendo, esta vez, mayor la cantidad de Fe estimada en el tumor, respecto al hígado sano ( $p < 0,05$ ).

## 2. Determinación de los depósitos de Fe mediante técnicas de elementales

Tras los análisis de ICP-MS, se observa que los valores basales de hierro en el tumor son un 66% inferiores a los registrados en el hígado ( $p < 0,0001$ ), mientras que tras la infusión de NpM-RGD son sólo un 54% menores ( $p < 0,0001$ ) (Tabla 16 y Figura 117).

Comparando los datos de tejido hepático tras la infusión de las NpM-RGD con los niveles basales vemos que no hay aumento significativo en la [Fe] ( $p = 0,897$ ). Sin embargo, al fijarnos en el tejido tumoral de ambos grupos experimentales, aquellos animales que recibieron aporte de Fe, procedente de las NpM-RGD, el valor de la [Fe] es casi 1,6 veces superior, siendo éste aumento altamente significativo ( $p < 0,001$ ).

Tabla 16. [Fe] de hierro determinada por ICP-MS en ambos tejidos, tejido hepático y tumoral, tanto en animales que recibieron NpM-RGD como en aquellos que no las recibieron. Los datos se expresan tanto en  $\mu\text{g/g}$  de tejido fresco como en  $\mu\text{mol/g}$  de tejido fresco.

| Tejido         | [Fe] $\mu\text{g/g}$ |                    | [Fe] $\mu\text{mol/g}$ |                    |
|----------------|----------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
|                | Control              | NpM-RGD            | Control                | NpM-RGD            |
| <b>Hígado</b>  | 196,9 $\pm$ 62,4     | 194,60 $\pm$ 50,30 | 11,70 $\pm$ 3,7        | 11,60 $\pm$ 3      |
| <b>Tumor</b>   | 66,60 $\pm$ 28,70    | 105,60 $\pm$ 36,10 | 5,90 $\pm$ 2,50        | 9,40 $\pm$ 3,20    |
| <i>p valor</i> | <i>&lt;0,0001</i>    | <i>&lt;0,0001</i>  | <i>&lt;0,0001</i>      | <i>p &lt; 0,05</i> |

Los valores de [Fe] obtenidos por ICP-MS también se expresaron como  $\mu\text{mol/g}$  de tejido fresco (Tabla 16), para poder compararlos con la concentración estimada por MRN (Tabla 15); sin embargo, esta comparación no fue posible ya que los datos obtenidos de la IRM están expresados en  $\mu\text{mol/g}$  de tejido seco y para el análisis por ICP-MS se empleó el peso fresco del tejido a analizar.

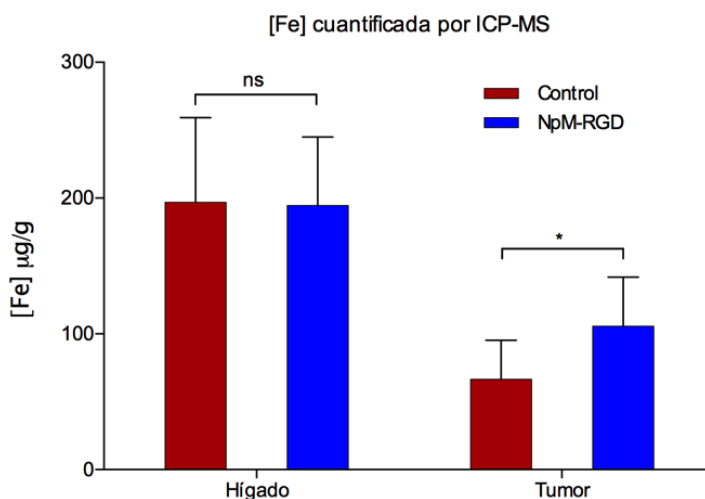


Figura 117. Representación de la media y la SD de la [Fe] determinada por técnicas elementales (ICP-MS) en el tejido tumoral y el parénquima hepático sano de ratas que recibieron una infusión intrarterial de NpM-RGD (azul) o que no la recibieron (rojo).

### 3. Análisis histopatológicos

Una vez examinadas las secciones histológicas de los animales que recibieron NpM-RGD vía arteria hepática, se pueden observar depósitos de Fe en los neovasos formados alrededor de las estructuras tumorales, así como en el estroma fibrovascular que rodea a las metástasis (Figura 118A y B). Sin embargo, no se localizaron depósitos de Fe en el interior de las estructuras glandulares tumorales.



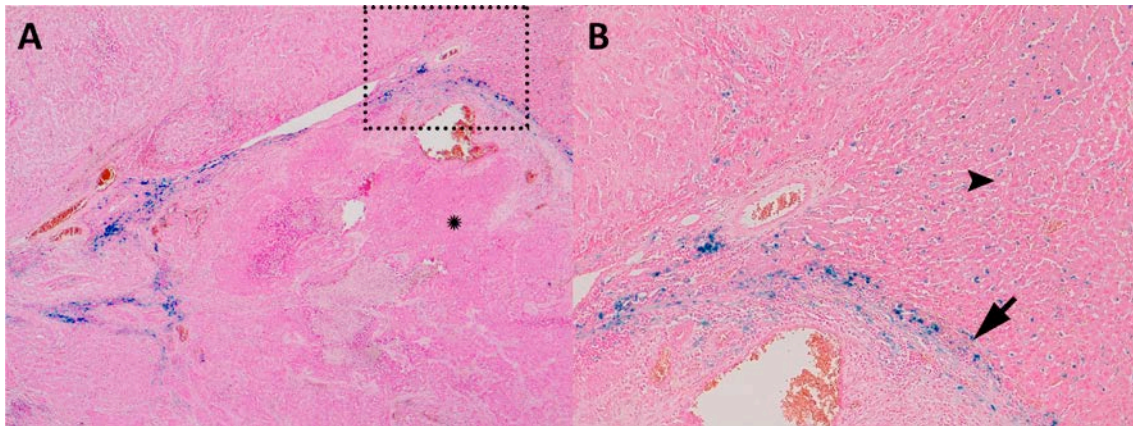


Figura 118. Cortes histológicos con tinción de azul de Prusia a 4x (A) y 10x (B) del hígado de la rata 5V. Los depósitos de Fe (flecha) en el intersticio fibrovascular circundante a estructuras glandulares tumorales (asterisco) aparecen coloreados en azul. También pueden observarse depósitos de Fe en el espacio sinusoidal del parénquima hepático sano (cabeza de flecha). El recuadro de puntos figura A enmarca el área reflejado en la figura B.



## Hipertermia local selectiva mediante NpM-RGD

Una vez realizados los experimentos de adhesión de la secuencia peptídica RGD, se procedieron a llevar a cabo los ensayos de HT local selectiva mediante NpM-RGD.

Se monitorizó la temperatura en varios tejidos en un total de 44 animales repartidos en 3 grupos experimentales: un grupo que sólo fue sometido a HT, otro grupo de animales infundidos con suero salino que fue sometido a HT (Salino+HT) y, finalmente, otro grupo que recibió un 1 ml de la suspensión de NpM-RGD de 1,5 mg Fe/ml y, posteriormente, fue sometido a HT (NpM+HT).

### A. Campo magnético aplicado

Los animales fueron expuestos a uno de los dos protocolos de exposición térmica descritos anteriormente:

- Régimen A: un campo magnético 606 kHz y 14 kA/m durante 16 minutos y 606 kHz y 11 kA/m los 5 minutos restantes, hasta completar un total de 21 minutos.
- Régimen B: un campo magnético alterno con una frecuencia de 606 kHz y 14 kA/m de intensidad, controlada por un sistema on/off automático (Figura 119) para evitar que la temperatura hepática sobrepasase los 43° C durante los 21 minutos de exposición.

En el caso del Régimen A, la media de la temperatura hepática máxima que se alcanzó fue de  $43,12 \pm 2,07^\circ \text{C}$ ; con el Régimen B, esta temperatura alcanzó un máximo de  $41,1 \pm 1,21^\circ \text{C}$ . Podemos observar que la temperatura hepática no presenta diferencias entre ambos regímenes, salvo en el caso del grupo Salino+HT donde la temperatura del Régimen A fue de  $44,63 \pm 3,44^\circ \text{C}$  y del B fue de  $40,31 \pm 1,07^\circ \text{C}$  ( $p < 0,0001$ ) (Figura 120).

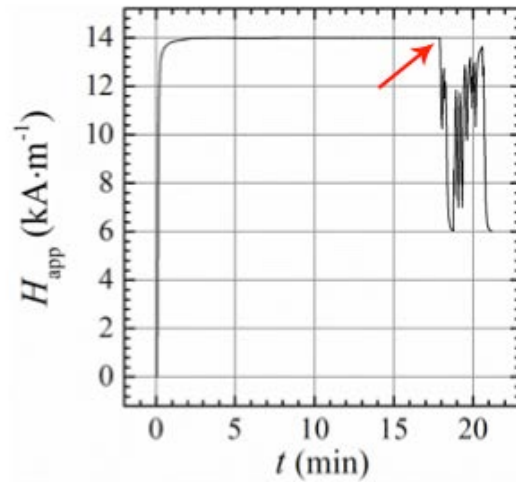


Figura 119. Registro representativo del campo aplicado durante la exposición al IRF. La flecha roja señala el momento (18 minutos) en el cual el sistema de control automático de la temperatura entró en funcionamiento y, por tanto, la intensidad de campo fue variable para mantener la temperatura constante-

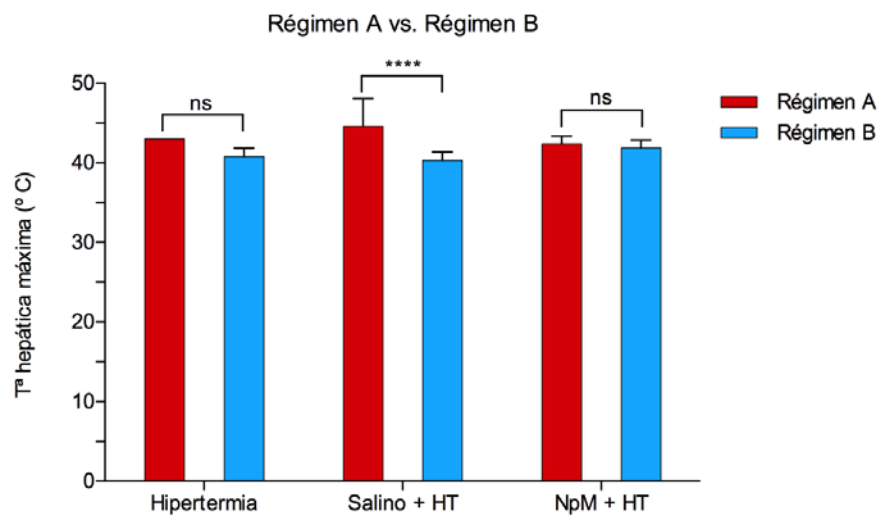


Figura 120. Comparación de la temperatura hepática máxima alcanzada en cada uno de los dos regímenes de exposición al campo magnético para cada uno de los grupos experimentales.

## B. Mortalidad

Analizando la supervivencia en cada grupo experimental (HT, Salino+HT o NpM+HT tras el shock térmico), se observa que fallecen a causa del procedimiento un 22%, un 11% y un 33,3% del total de animales, respectivamente. Estos datos nos llevaron a analizar y comparar: el tipo de régimen al que fueron expuestos, el incremento térmico registrado en el hígado y el peso de los animales que sobrevivieron y fallecieron en cada una de las condiciones experimentales.

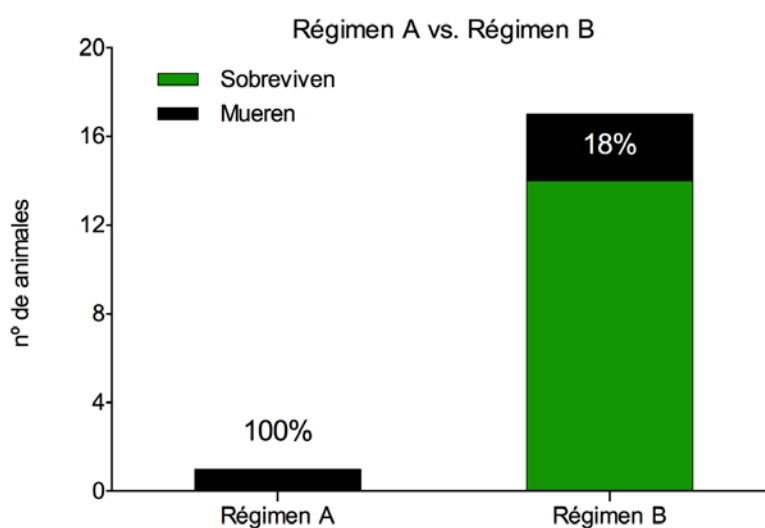


Figura 121. Mortalidad de los animales del grupo HT, en función del régimen térmico al que fuera expuesto: A o B. En verde el número de animales que sobrevivieron a la HT y en negro los que fallecieron a consecuencia del procedimiento.

Diferenciando los animales de grupo HT en función del régimen al que fue sometido, observamos que el 100% de los animales del régimen A fallecieron, mientras que la mortalidad con el régimen B fue de un 18% (Figura 121).

En el grupo que, previo a la HT, recibió una infusión intrarterial de suero salino para simular la operación necesaria para la infusión de las NpM-RGD, se registró una mortalidad del 11% del total de animales del grupo (n=17). En este caso, todos los animales que fallecieron fueron del régimen A, un 66,7% (n=2) (Figura 122).

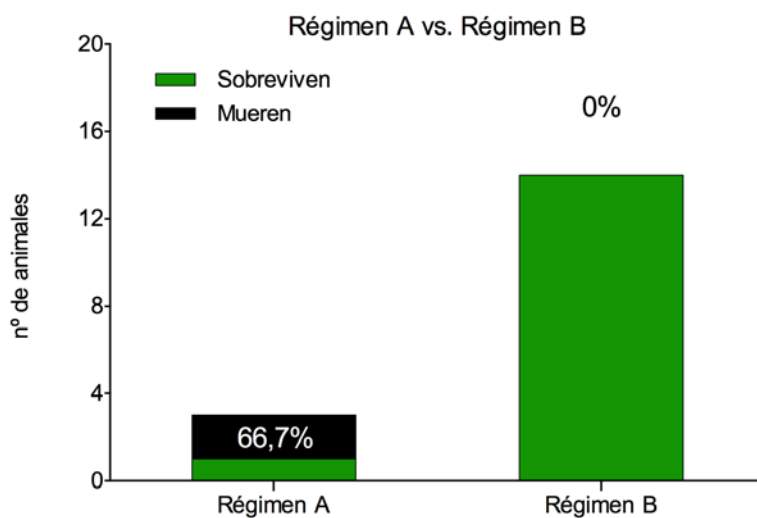


Figura 122. Mortalidad de los animales del grupo Salino+HT, en función del régimen al que fuera expuesto A o B. En verde el número de animales que sobrevivieron a la HT y en negro los que fallecieron a consecuencia del procedimiento.

Finalmente, en el grupo NpM+HT, la mortalidad global fue de un 33,3% (n=6); 2 animales en el caso del régimen A (33,4%) y 5 animales en el régimen B (27,7%) (Figura 123).

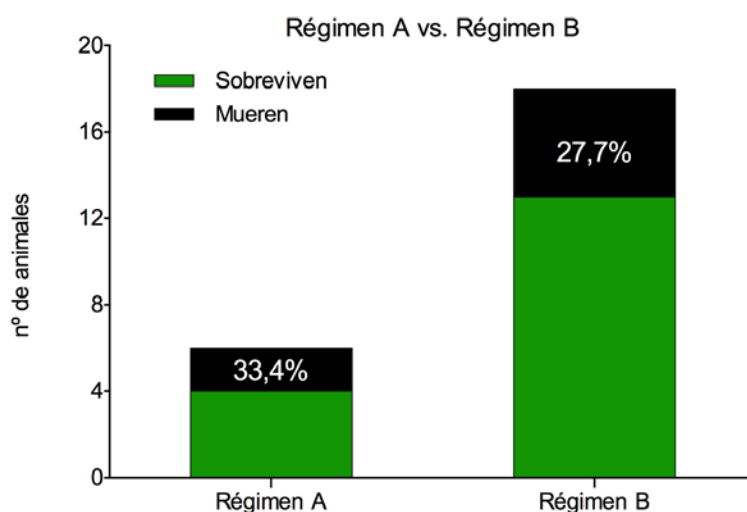


Figura 123. Mortalidad de los animales del grupo NpM+HT, en función del régimen al que fuera expuesto A o B. En verde el número de animales que sobrevivieron a la HT y en negro los que fallecieron a consecuencia del procedimiento.

Como refleja la Figura 124, sólo en el grupo Salino+HT hubo diferencias significativas en el incremento térmico registrado en el hígado entre los animales que sobrevivieron al procedimientos y los que fallecieron a consecuencia de él. Concretamente, esos animales estuvieron expuestos al régimen A, sobrepasando en un 10% la temperatura hepática máxima registrada en los animales del mismo grupo expuestos al régimen B.

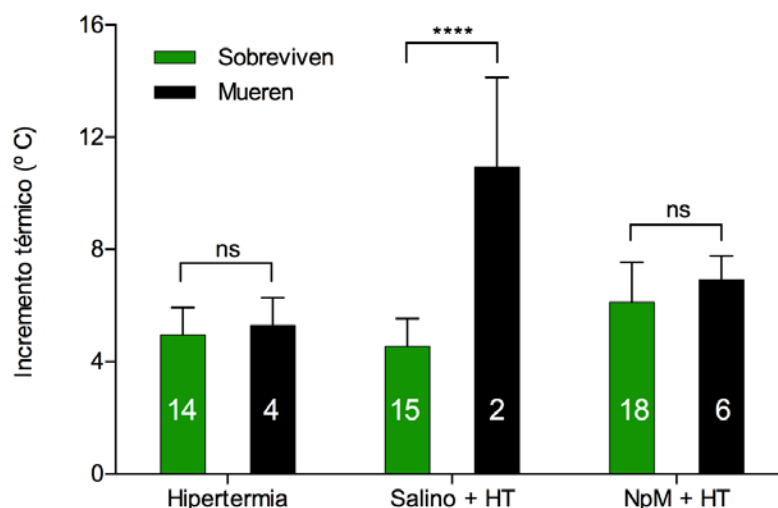


Figura 124. Representación gráfica de la media y SD del incremento térmico registrado en el hígado sano de cada grupo experimental. En verde el incremento en los animales que sobrevivieron al o los procedimientos y en rojo los que murieron a consecuencia de él. En número dentro de las columnas indica el número de animales.

Tabla 17. Media y desviación estándar de los animales que sobrevivieron y fallecieron a causa de los procedimientos.

|                | HT (g)       | Salino+HT (g) | NpM+HT (g)   |
|----------------|--------------|---------------|--------------|
| Sobreviven     | 238,2 ± 17,5 | 235,5 ± 11,07 | 254,8 ± 17,4 |
| Mueren         | 265 ± 16,83  | 375 ± 35,36   | 279,7 ± 9,5  |
| <i>p valor</i> | <0,01        | <0,0001       | <0,01        |

Por último, otra variable que se analizó debido a los datos de mortalidad, fue el peso de los animales de cada serie (Tabla 17). En este caso (Figura 125) sí que se observan diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos experimentales al comparar los animales muertos con los que sobrevivieron.

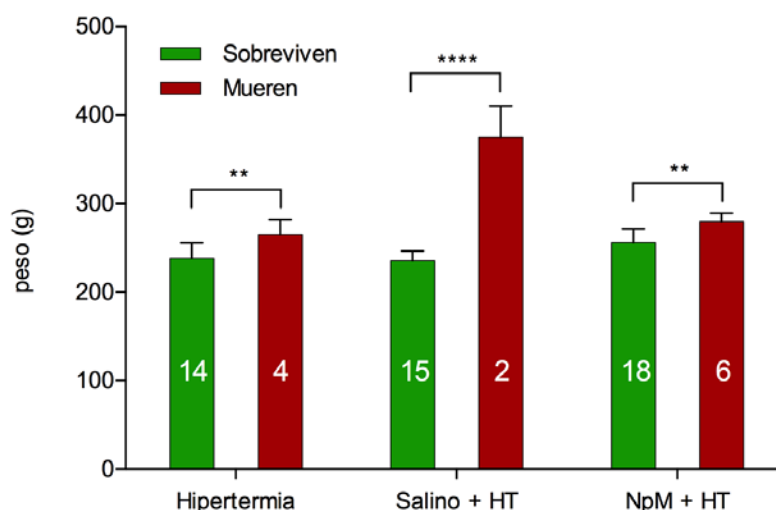


Figura 125. Representación gráfica de la media y SD del peso de cada grupo experimental. En verde el incremento en los animales que sobrevivieron al o los procedimientos y en rojo los que murieron a consecuencia de él. En número dentro de las columnas indica el número de animales.

### C. Incremento térmico

Debido a estos resultados, de aquí en adelante, para valorar el efecto histopatológico y/o sistémico de la HT local selectiva, solo se tendrán en cuenta aquellos animales que fueron expuestos al Régimen B y cuyo peso fue inferior a 280 gramos.

El incremento medio de temperatura hepática de los grupos HT y Salino+HT, que no recibieron infusión de NpM-RGD, fue de  $4,95 \pm 0,98^{\circ} \text{C}$  y  $4,55 \pm 0,99^{\circ} \text{C}$ , respectivamente, sin que hubiera diferencias estadísticamente significativas entre ambos ( $p=0,29$ ). En el caso de los animales del grupo NpM+HT, el incremento medio de temperatura en el hígado de  $6,13 \pm 1,42^{\circ} \text{C}$ , siendo la diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo Salino+HT ( $p<0,01$ ) (Figura 126 y Tabla 18).



Tabla 18. Incremento térmico medio y SD de la temperatura registrada durante la exposición al IRF de los animales de las 3 condiciones experimentales.

|               | HT (° C)    | Salino+HT (° C) | NpM+HT (° C) |
|---------------|-------------|-----------------|--------------|
| <b>Tumor</b>  | 3,15 ± 1,6  | 4,61 ± 0,81     | 6,79 ± 1,63  |
| <b>Hígado</b> | 4,95 ± 0,98 | 4,55 ± 0,99     | 6,13 ± 1,42  |
| <b>Recto</b>  | 1,01 ± 1,37 | 1,19 ± 1,01     | 1,68 ± 1,83  |

Respecto a la temperatura hepática registrada en el tejido tumoral, como se puede ver en la Figura 126, en los grupos HT y Salino+HT la temperatura aumentó  $3,15 \pm 1,6^\circ \text{C}$  y  $4,61 \pm 0,81^\circ \text{C}$ , respectivamente ( $p > 0,05$ ). El grupo de animales que recibió una infusión intrarterial de NpM-RGD incrementó su temperatura, en el tejido tumoral,  $6,79 \pm 1,63^\circ \text{C}$ , siendo este aumento estadísticamente significativo al compararlo con los grupos HT y Salino+HT ( $p < 0,0001$  en ambos casos).

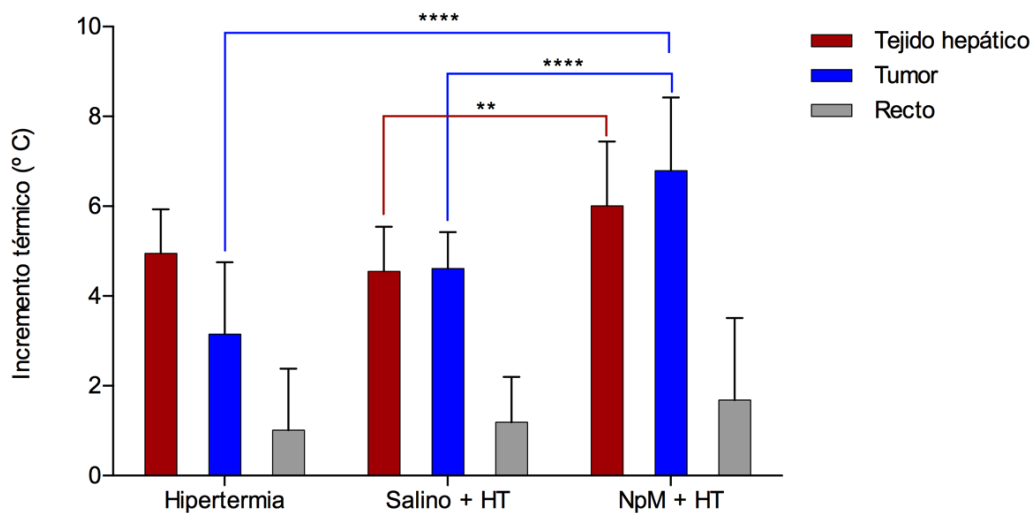


Figura 126. Representación gráfica del incremento térmico medio y SD de la temperatura registrada durante la exposición al IRF de los animales de las 3 condiciones experimentales en el tejido hepático (rojo), tejido tumoral (azul) y recto (gris).

Cabe destacar que en el grupo HT, que no recibió ninguna infusión vía intrarterial, el incremento térmico del hígado fue casi un 60% superior que el incremento registrado en el tejido tumoral.

En el grupo que recibió suero salino la elevación de temperatura en ambos tejidos fue prácticamente idéntica (Figura 127 y 128); sin embargo, la administración de NpM-RGD provocó que, en el grupo NpM+HT, el aumento térmico en el tumor no solo no fuera igual, sino que fue un 10% superior al hígado. La temperatura rectal registrada en los 3 grupos experimentales no presentó variaciones significativas.

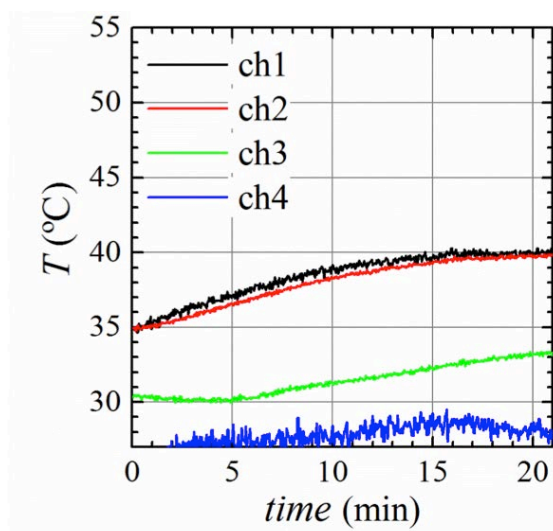


Figura 127. Evolución de la temperatura registrada durante el tiempo que los animales sin NpM-RGD estuvieron sometidos al IRF. En negro (ch1) la temperatura registrada en el tumor, en rojo (ch2) la temperatura del hígado sano, en verde (ch3) la rectal y en azul (ch4) la temperatura ambiente dentro del IRF, en la zona donde el campo es máximo.

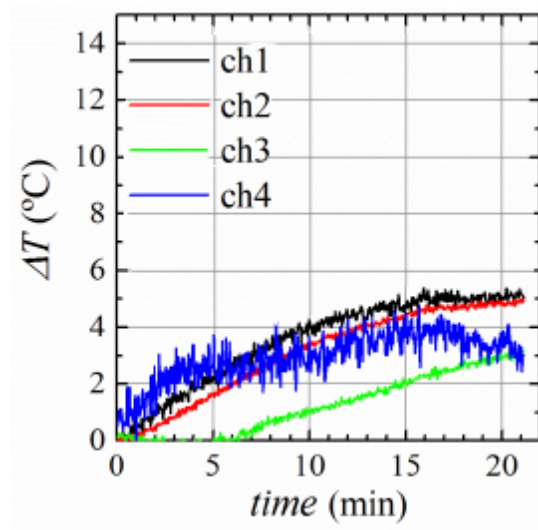


Figura 128. Evolución del incremento térmico durante el tiempo que los animales sin NpM-RGD estuvieron sometidos al IRF. En negro (ch1) el incremento en el tumor, en rojo (ch2) el incremento del hígado sano, en verde (ch3) el rectal y en azul (ch4) el incremento registrado en la sonda ambiental dentro del IRF, en la zona donde el campo es máximo.



## Inducción de necrosis tumoral

Una vez comprobado que mediante la exposición al IRF, la infusión intrarterial de NpM-RGD consigue un incremento significativo de la temperatura de los tumores, el siguiente paso fue analizar las consecuencias tanto a nivel local como sistémico que ello pudo ocasionar. Con este fin, se llevaron a cabo análisis histológicos de biopsias tomadas del tejido hepático y tumoral, así como otros tejidos para visualizar los posibles depósitos y/o daños ocasionado por las NpM-RGD en pulmón y riñones.

### A. Depósitos de hierro

Tal y como se observó con anterioridad (Figura 118), las NpM-RGD quedan depositadas en el estroma peritumoral y adheridas a los neovasos formados alrededor de los implantes tumorales. Sin embargo, estos depósitos no se localizaron en otros órganos como riñones o pulmones.

### B. Daños histológicos

Tras conseguir un incremento térmico significativo en el lecho tumoral (Tabla 18 y Figura 126), se comprobó el grado de la lesión histológica causada por la exposición al IRF, tanto en el tejido tumoral como en el parénquima hepático, analizado 12 horas después del último procedimiento.

Tabla 19. Porcentaje y SD de la necrosis tumoral durante la exposición al IRF de los animales de las 3 condiciones experimentales.

|               | HT         |    | Salino + HT |    | NpM+HT    |    |
|---------------|------------|----|-------------|----|-----------|----|
|               | %necrosis  | n  | %necrosis   | n  | %necrosis | n  |
| <b>Tumor</b>  | 1 ± 2,5    | 6  | 4,9 ± 4,98  | 10 | 19 ± 12,7 | 18 |
| <b>Hígado</b> | 0,23 ± 0,6 | 12 | 0           | 10 | 8,8 ± 3,8 | 18 |

La cuantificación del porcentaje de necrosis en ambos tejidos, tumoral y sano, se realizó a doble ciego por parte del Dr. Alberto Saiz López, F.E.A. de Anatomía Patológica del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Galdakao-Usansolo.

Una vez analizadas las secciones histológicas de ambos tejidos (Tabla 19 y Figura 129), extraídos de los animales de cada uno de los grupos experimentales, pudimos comprobar que aquellos animales sometidos únicamente a HT apenas presentaban necrosis, ni en el parénquima hepático sano circundante al tumor ( $0,23 \pm 0,6\%$ ) ni en el tejido tumoral ( $1 \pm 2,45\%$ ), dónde sólo una de las 12 muestras analizadas presentaba necrosis (8%).

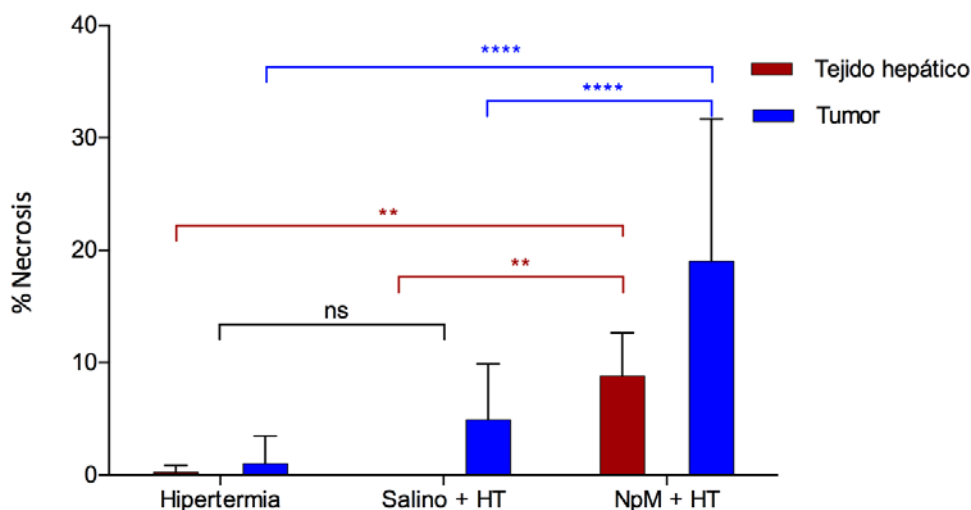


Figura 129. Representación gráfica del porcentaje medio de necrosis y SD tras la exposición al IRF de los animales de las 3 condiciones experimentales, en el tejido hepático (rojo) y el tejido tumoral (azul).

En el grupo Salino + HT, en el que se manipularon la arteria esplénica y hepática para la infusión de suero salino, se observa que, tras someter a las ratas a HT, la necrosis del tejido hepático peritumoral siguió siendo prácticamente nula, y la necrosis del tejido tumoral analizado se elevó, aproximadamente, hasta el 5%, sin que hubiera pese a ello diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en ambos tejidos.

El mayor porcentaje de tejido necrótico se observó en el grupo de animales que recibieron una dosis de NpM-RGD previo a terapia térmica. El porcentaje de tejido

tumoral necrótico se multiplicó, aproximadamente, por 4 respecto al grupo Salino + HT ( $4,9 \pm 4,98\%$  vs.  $19 \pm 12,7\%$ ;  $p < 0,0001$ ). En este grupo, el parénquima hepático sano circundante mostró una necrosis media del  $8,8 \pm 3,8\%$ .

### C. Estimación ecográfica de la necrosis tumoral esperada

Secundariamente a los objetivos principales de esta Tesis Doctoral, quisimos comprobar la utilidad de la ecografía como herramienta predictiva de la NTE de las MHCCR debido a su propio volumen.

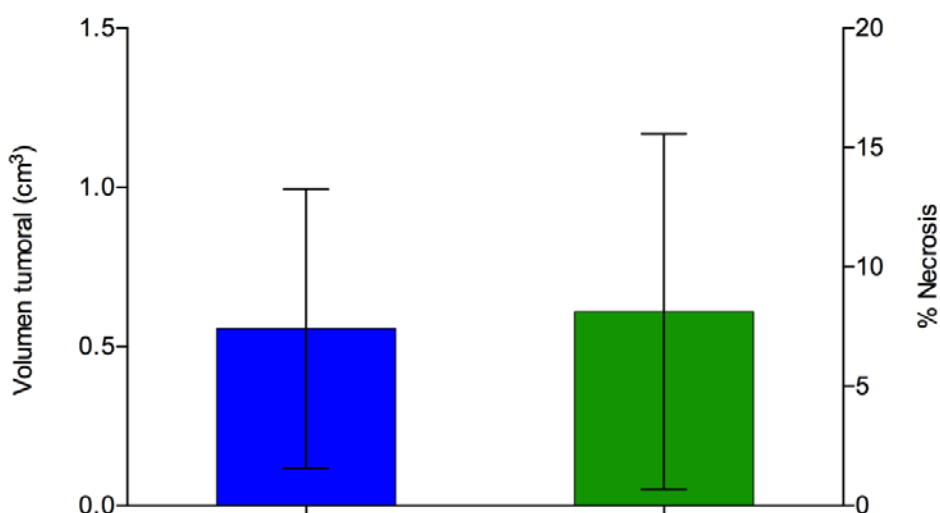


Figura 130. Representación gráfica de la media y desviación estándar del volumen de los implantes tumorales (azul) y la necrosis estimada en secciones histológicas de los mismos implantes (verde).

En 48 animales portadores de MHCCR no infundidos con NpM-GRD ni sometidos a HTM antitumoral, se determinó de forma independiente el volumen de los implantes y se cuantificó el porcentaje de necrosis tumoral (Figura 130). La media del volumen de las MHCCR fue de  $0,56 \pm 0,44 \text{ cm}^3$  y la necrosis determinada por el patólogo fue del  $8,1 \pm 7,4\%$ .

Con éstos datos se realizó un análisis de regresión (Figura 131), obteniendo la fórmula de regresión que nos permite predecir, aproximadamente, la NTE para los implantes en función de su tamaño.

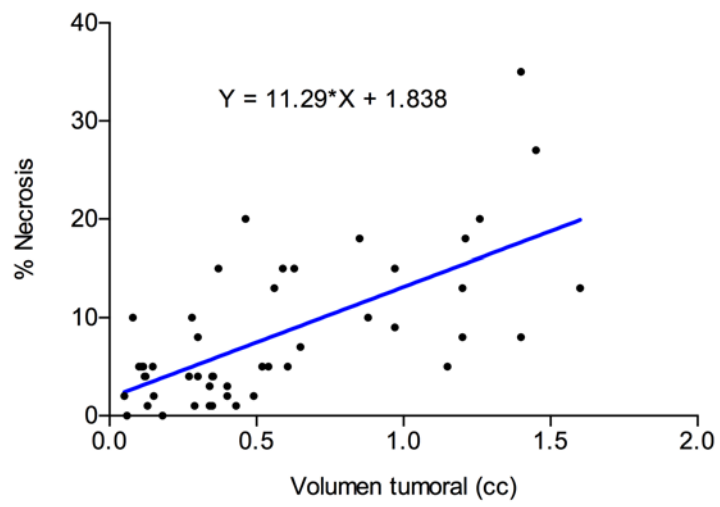


Figura 131. Análisis y recta de regresión del volumen y la necrosis tumoral.



---

## **Determinación de enzimas séricos y metabolitos hepáticos**

Para poder comprobar si la terapia térmica, y los procedimientos necesarios para su aplicación, induce algún tipo de alteración no solo a nivel hepático, más allá de la posible necrosis tumoral, sino también sistémico, se realizaron análisis de los niveles séricos de determinados enzimas y también de los metabolitos hepáticos mediante técnicas de química analítica.

### **A. Cambios enzimáticos**

De las muestras sanguíneas extraídas a las 12 horas o 10 días, según el grupo experimental correspondiente, se analizaron los valores séricos de: alanina aminotransferasa o transaminasa glutámico–pirúvica (ALT o GPT), aspartato aminotransferasa o transaminasa glutámico–oxalacética (AST GOT), fosfatasa alcalina (ALP o FA), amilasa, creatina quinasa (CK), lactato deshidrogenasa (LDH) y creatinina.

Al observar los valores del enzima ALT (Figura 132 y Tabla 20), podemos ver que hay un aumento de sus niveles en plasma sanguíneo 12 horas después de realizar los procedimientos, tanto en ratas portadoras o no de metástasis hepáticas, siendo este aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) al compararlo con los niveles enzimáticos en ratas sanas (no portadoras de metástasis y que no habían sido sometidas a intervención alguna).

Los valores de las muestras extraídas a las 12 horas triplicaban, aproximadamente, los valores de referencia del grupo control ( $42 \pm 4,6$  U/l). Sin embargo, en las muestras obtenidas 10 días después del último procedimiento al que fue sometido el animal, pudimos comprobar como los niveles séricos de ALT no presentaron diferencias estadísticamente significativas al compararlos con las ratas sanas control

Tabla 20. Valores promedio y SD de los niveles en plasma sanguíneo de los distintos enzimas analizados: ALT, AST, ALP, Amilasa, CK, LDH y Creatinina. Entre paréntesis, las unidades de medida de cada uno de los enzimas.

|                            | <b>ALT (U/l)</b> | <b>AST (U/l)</b> | <b>ALP (U/l)</b> | <b>Amilasa (U/l)</b> | <b>CK (U/l)</b> | <b>LDH (U/l)</b> | <b>Creatinina (mg/dl)</b> | <b>n</b> |
|----------------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------|-----------------|------------------|---------------------------|----------|
| <b>Control</b>             | 42 ± 4,6         | 57 ± 3,61        | 158 ± 16,5       | 2361 ± 152           | 98,3 ± 14,2     | 63,7 ± 27,6      | 0,413 ± 0,035             | 3        |
| <b>Tumor</b>               | 46 ± 4           | 94,3 ± 21,9      | 119 ± 8,7        | 2083 ± 140           | 115 ± 8,5       | 72,7 ± 9,3       | 0,397 ± 0,038             | 3        |
| <b>Salino 12h</b>          | 128 ± 38         | 202 ± 45,8       | 128 ± 8,7        | 1349 ± 231           | 180 ± 66,1      | 208 ± 118        | 0,384 ± 0,057             | 5        |
| <b>HT 12h</b>              | 106 ± 34         | 370 ± 73,9       | 194 ± 30,4       | 1410 ± 114           | 191 ± 51,2      | 172 ± 42,7       | 0,454 ± 0,057             | 5        |
| <b>Tumor HT 12h</b>        | 124 ± 77         | 388 ± 119        | 156 ± 26         | 1503 ± 121           | 129 ± 96,4      | 179 ± 58,9       | 0,462 ± 0,091             | 6        |
| <b>Tumor Salino+HT 12h</b> | 129 ± 73         | 331 ± 121        | 124 ± 24,3       | 1928 ± 180           | 265 ± 82,7      | 170 ± 1,53       | 0,462 ± 0,135             | 5        |
| <b>HT 10días</b>           | 41 ± 7           | 61 ± 11,4        | 111 ± 21,9       | 1554 ± 181           | 98,4 ± 11,4     | 61,7 ± 26,1      | 0,385 ± 0,054             | 6        |
| <b>Tumor HT 10días</b>     | 38 ± 5,2         | 89,7 ± 20        | 115 ± 14         | 2303 ± 227           | 100 ± 18,8      | 66,2 ± 11,4      | 0,328 ± 0,053             | 6        |
| <b>Tumor Salino 10días</b> | 42 ± 6,6         | 58,7 ± 14,6      | 95 ± 7,6         | 1692 ± 184           | 93,8 ± 17,2     | 73,8 ± 30,4      | 0,408 ± 0,043             | 4        |

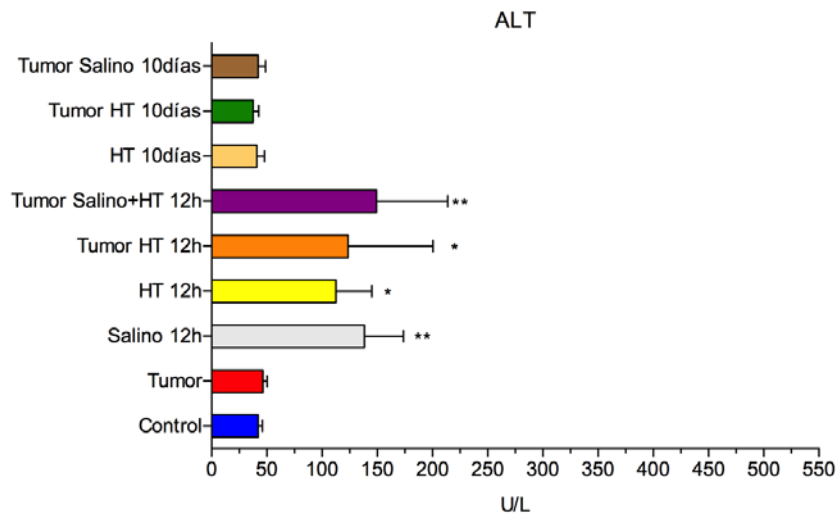


Figura 132. Representación gráfica del valor medio y SD de los niveles del enzima ALT en los diferentes grupos experimentales (datos expresados en Unidades/litro).

Los niveles séricos de AST (Figura 133 y Tabla 20) presentaron un comportamiento similar, al igual que pudimos comprobar con la ALT.

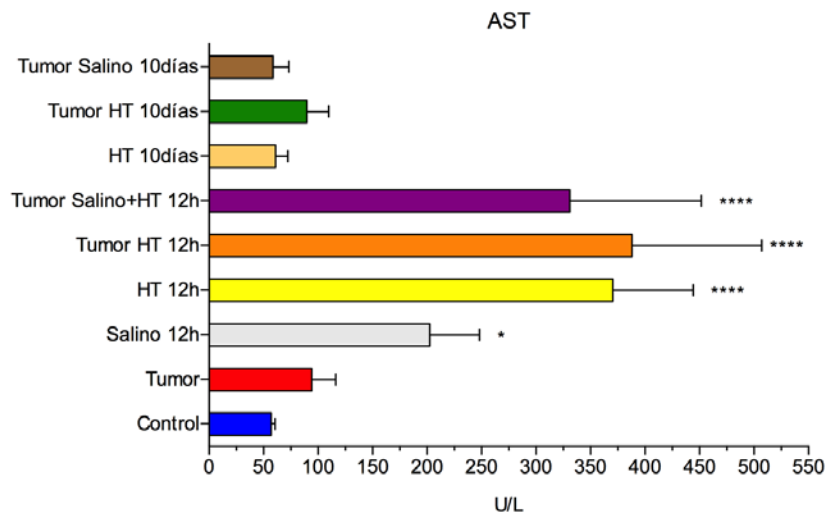


Figura 133. Representación gráfica del valor medio y SD de los niveles del enzima AST en los diferentes grupos experimentales (datos expresados en Unidades/litro).

Cuando se simuló la intervención necesaria para una administración de NpM-RGD (Grupo Salino 12h), los valores de enzima determinados en muestras extraídas 12 horas post-infusión fueron 3,5 veces superiores al control ( $202 \pm 45,8$  vs.  $57 \pm 3,61$  U/l,  $p < 0,05$ ), siendo estadísticamente significativa la diferencia entre ambos.

Lo niveles enzimáticos de los animales que recibieron HT y cuyas muestras fueron extraídas 12 horas después de la misma: HT 12h, Tumor-HT 12h o Tumor-Salino-HT 12h, el incremento de ATL fue de 6 veces aproximadamente, hasta valores de  $370 \pm 73,9$ ,  $388 \pm 119$  y  $331 \pm 121$  U/l, respectivamente, con diferencias altamente significativas respecto al control ( $p < 0,0001$ ).

En las muestras extraídas 10 días después del último procedimiento, comprobamos, como en el caso de la ALT, que los valores medidos del enzima no presentaron diferencias estadísticas respecto al control.

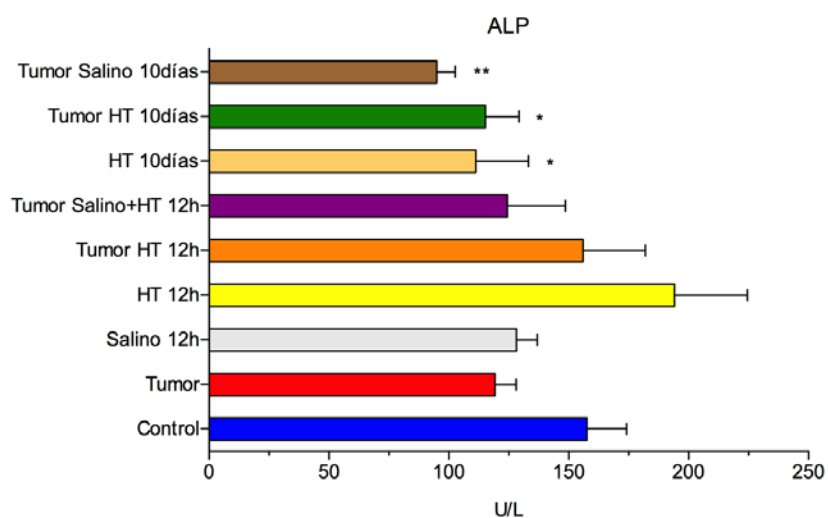


Figura 134. Representación gráfica del valor medio y SD de los niveles del enzima ALP en los diferentes grupos experimentales (datos expresados en Unidades/litro).

En el caso de la ALP (Figura 134 y Tabla 20), observamos un comportamiento diferente que en las transaminasas AST y ALT. Sólo aquellas muestras de sangre extraídas 10 días después del último procedimiento presentaron una diferencia significativa respecto al control.

Los valores medidos en los grupos HT 10días, Tumor-HT 10 días y Tumor-Salino 10 días disminuyeron, aproximadamente, un 30% respecto al control ( $111 \pm 21,9$ ,  $p < 0,05$ ;  $115 \pm 14$ ,  $p < 0,05$ ; y  $95 \pm 7,6$  vs.  $158 \pm 16,5$  U/l,  $p < 0,01$ , respectivamente).

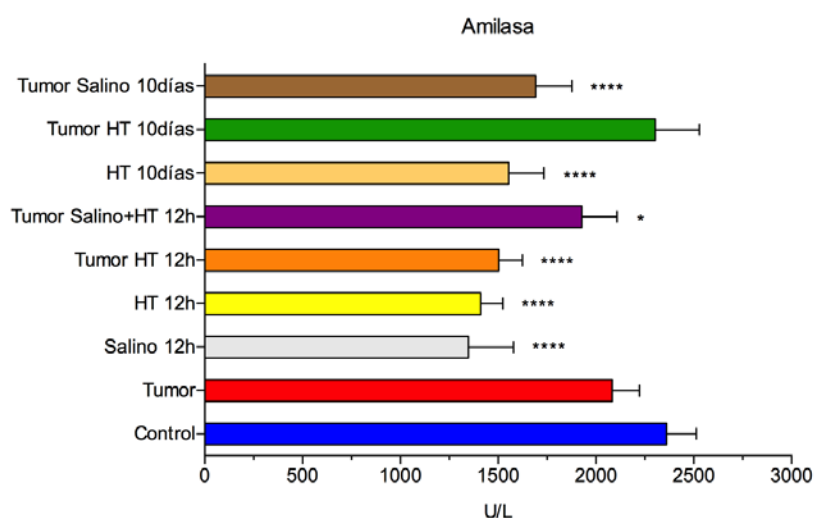


Figura 135. Representación gráfica del valor medio y SD de los niveles del enzima amilasa en los diferentes grupos experimentales (datos expresados en Unidades/litro).

Lo valores cuantificados del enzima Amilasa (Figura 135 y Tabla 20) de prácticamente todos los grupos, excepto los del grupo Tumor ( $2083 \pm 140$  U/l,  $p > 0,05$ ) y los del grupo Tumor-HT 10 días ( $2303 \pm 227$  U/l,  $p > 0,5$ ), presentaron una disminución altamente significativamente de los niveles séricos de éste enzima, comparándolos con el grupo control ( $2361 \pm 152$  U/l).

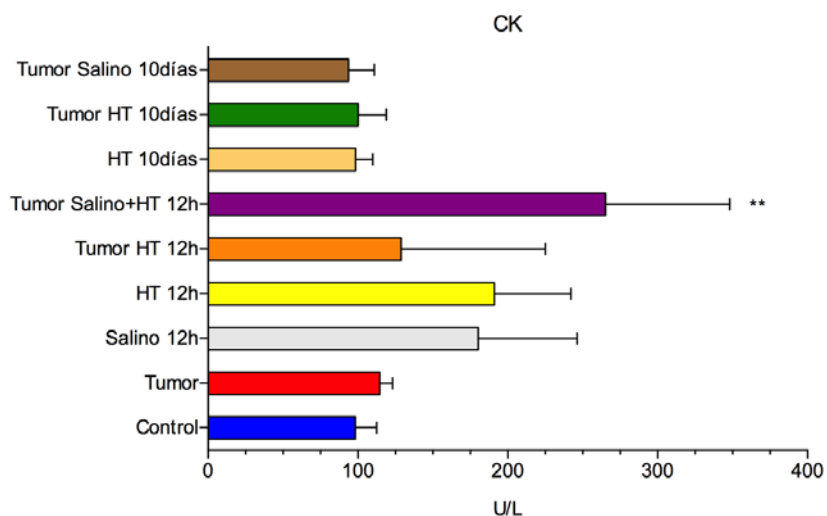


Figura 136. Representación gráfica del valor medio y SD de los niveles del enzima CK en los diferentes grupos experimentales (datos expresados en Unidades/litro).

Con la CK (Figura 136 y Tabla 20) ocurre prácticamente lo contrario, solamente uno de los grupos experimentales, Tumor Salino+HT 12h, presenta valores anormalmente elevados respecto al control (2,7 veces;  $265 \pm 82,7$  vs.  $97 \pm 11,9$ ,  $p < 0,01$ ) y respecto al conjunto de animales analizados.

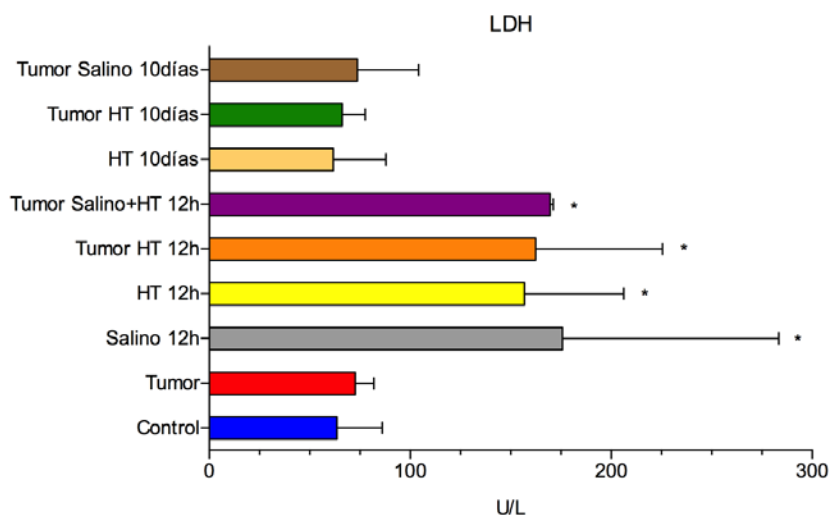


Figura 137. Representación gráfica del valor medio y SD de los niveles del enzima LDH en los diferentes grupos experimentales (datos expresados en Unidades/litro).

De similar modo que ocurría con la ALT y AST, los niveles séricos de LDH (Figura 137 y Tabla 20) se muestran significativamente elevados en aquellos grupos cuyas muestras sanguíneas se extrajeron 12 horas después del último procedimiento (infusión de salino o HT).

Finalmente la Creatinina no mostró variaciones en sus niveles séricos en ninguno de los grupos experimentales analizados (Figura 138 y Tabla 20)

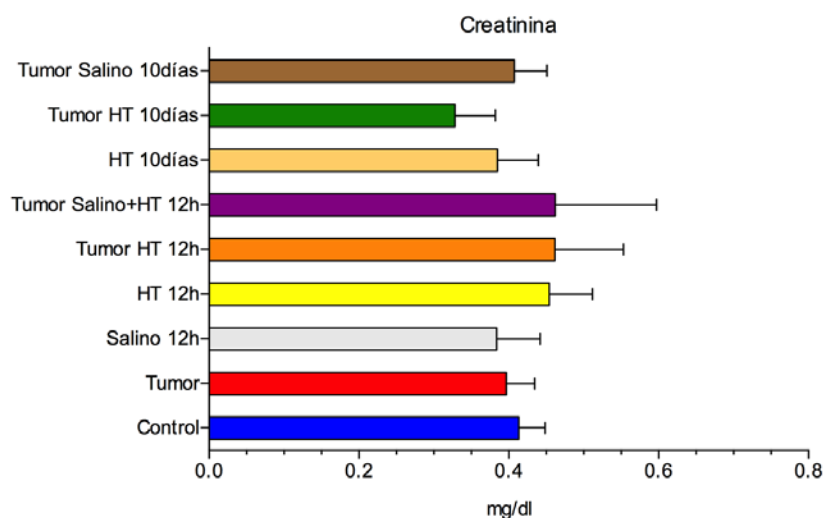


Figura 138. Representación gráfica del valor medio y SD de los niveles de Creatinina en los diferentes grupos experimentales (datos expresados en Unidades/litro).

## B. Determinación metabolitos hepáticos

El primer paso fue analizar muestras de tejido hepático para establecer el perfil metabolómico basal del parénquima sin ser expuesto a HTM o a procedimiento quirúrgico alguno, salvo la inducción tumoral en el grupo Tumor.

Se observa, en el análisis multivariante mediante PLS-DA (Figura 139), un agrupamiento de las muestras en tres grupos diferenciados, quedando bien definidos cada uno de los tejido analizados: tejido hepático de ratas sanas, tejido hepático de ratas portadoras de implantes tumorales y tejido tumoral de ratas control. Empleando las

herramientas quimiométricas necesarias, se trató de identificar las principales variables responsables de estos agrupamientos.

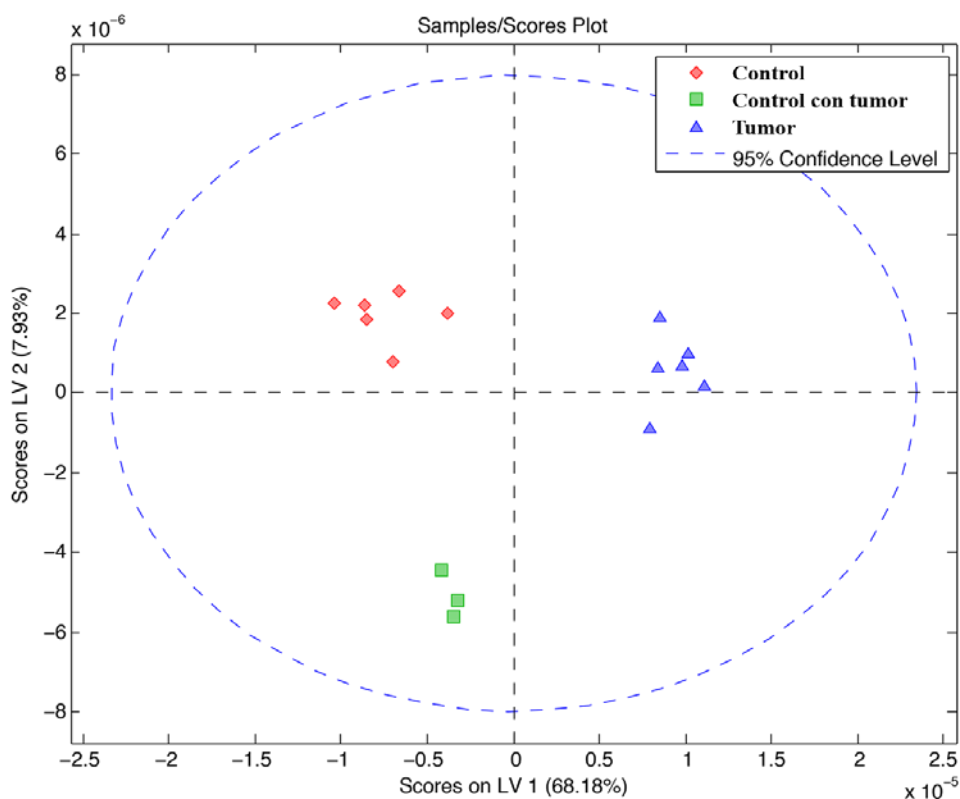


Figura 139. Análisis multivariante mediante PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis) del tejido hepático de ratas sanas (C, rombo rojo), tejido hepático de ratas portadoras de implantes tumorales (H-RT-C, cuadrado verde) y tejido tumoral de ratas control (T-C, triángulo azul). La línea discontinua marca el intervalo de confianza del 95%.

La Figura 140, correspondiente a los *loadings* o variables del primer componente (PC o LV) del análisis de PLS-DA, nos permite diferenciar entre el tejido tumoral y el tejido hepático. Podemos observar un tejido caracterizado por elevadas concentraciones de lactato, leucina, alanina, glutamato, piruvato, colina y creatina, entre otros, que caracterizan el tejido tumoral; mientras que por otro lado, se aprecia un tejido caracterizado por altas concentraciones de acetoacetato, D-hidroxi butirato, glucosa, galactosa y glicógeno, entre otros, previsiblemente el tejido hepático. Éste primer análisis componente explica el 68,28% de la varianza del modelo



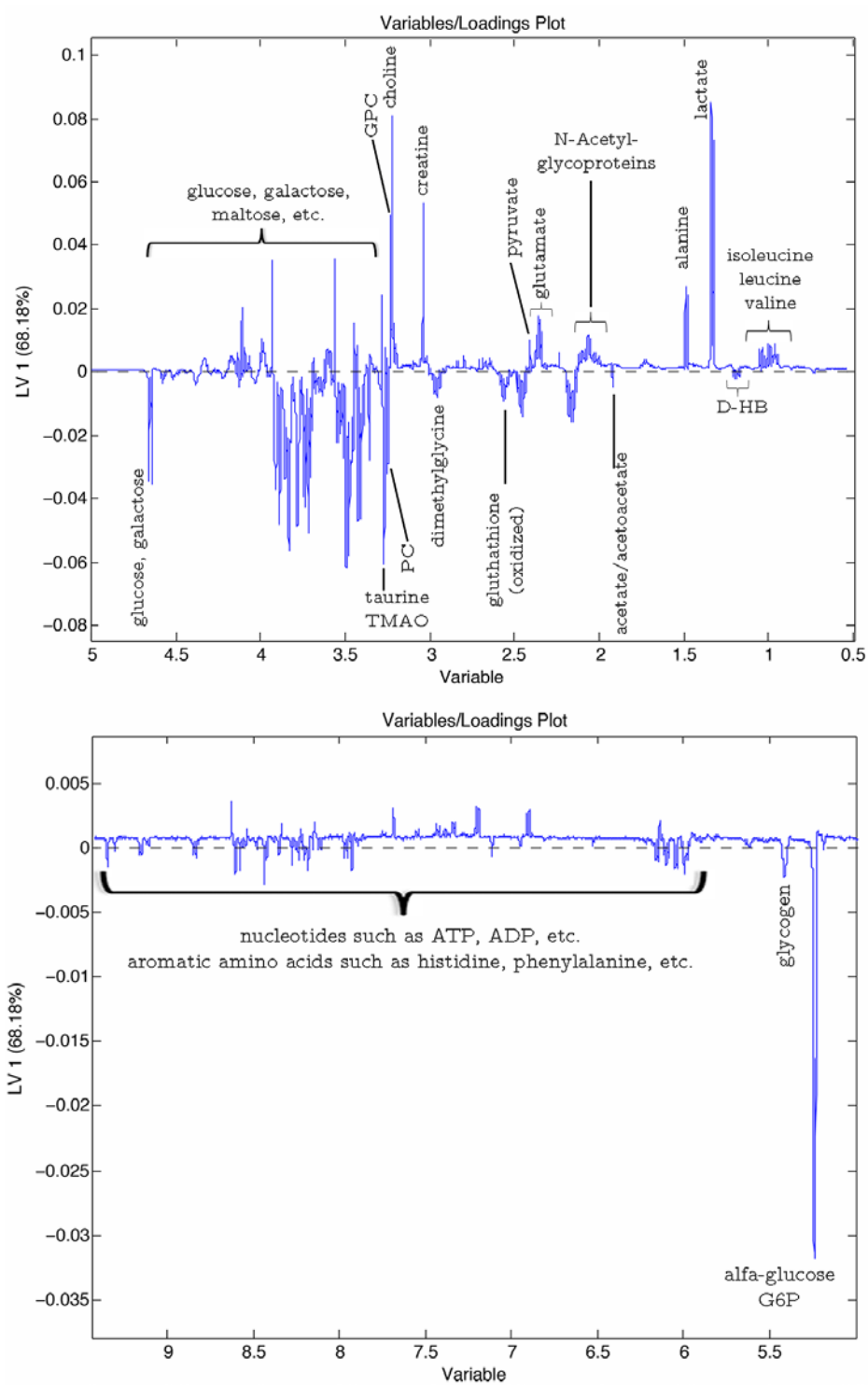


Figura 140. *Loadings* del primer componente (PC o LV) del análisis multivariante mediante PLS-DA.

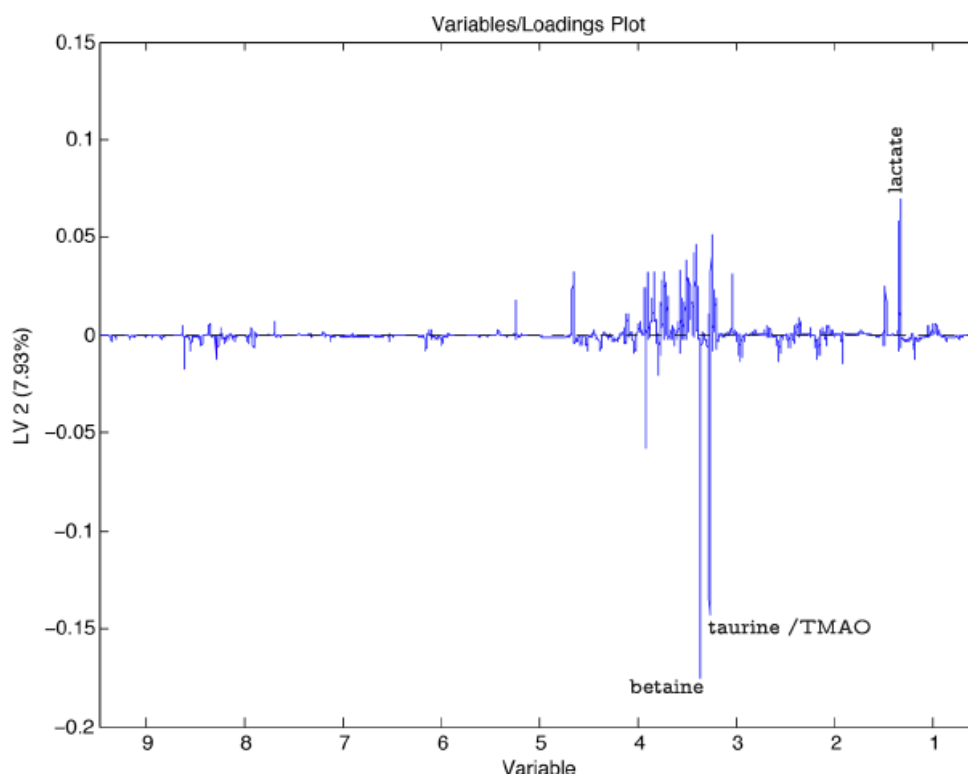


Figura 141. *Loadings* del segundo PC o LV del análisis multivariante mediante PLS-DA.

Los *loadings* del segundo PC (Figura 141), nos diferencian, principalmente, entre el tejido hepático de las ratas sanas y las ratas portadoras de implantes tumorales. En este caso las diferencias las marcan el lactato, en el tejido hepático de ratas sanas, y la betaína, taurina y la N-óxido de Trimetilamina (TMAO), que son características del tejido hepático de ratas portadoras de implantes tumorales.

Además, para poder realizar una valoración mejor, y más visual, de las variaciones de los metabolitos que fuimos capaces de identificar en los *loadings* de las Figuras 140 y 141, los datos obtenidos de los VIP se normalizaron respecto de los valores cuantificados en el tejido hepático del grupo control. Se observa, que los valores relativos de los metabolitos que aparecen sobreexpresados en el tejido hepático sano de ratas portadoras de tumores (Control con tumor) son detectados en menor cantidad en el tejido tumoral de dichos animales (Tumor), y viceversa (Tabla 21).

Tabla 21. Valores VIP normalizados de los metabolitos identificados en los espectros del tejido hepático de ratas portadoras de tumores (Control con tumor) y tejido tumoral (Tumor), respecto a la cantidad detectada en el tejido hepático sano de los animales del grupo Control. Sombreados en verde los metabolitos detectados en menor cantidad respecto al tejido hepático control y en rojo aquellos metabolitos detectados en mayor cantidad. Se muestran los desplazamientos químicos (ppm) de los metabolitos identificados.

| metabolite                         | ppm   | Control | Control con tumor | Tumor |
|------------------------------------|-------|---------|-------------------|-------|
| leucine/isoleucine                 | 0,966 | 1,00    | 0,57              | 1,26  |
| valine                             | 0,984 | 1,00    | 0,12              | 1,53  |
| D-Hydroxybutyrate                  | 1,187 | 1,00    | 2,23              | 0,30  |
| lactate                            | 1,325 | 1,00    | 0,85              | 1,29  |
| alanine                            | 1,492 | 1,00    | 0,99              | 1,09  |
| lysine                             | 1,719 | 1,00    | 0,46              | 1,34  |
| acetate, acetoacetate              | 1,921 | 1,00    | 2,36              | 0,22  |
| N-acetyl functions of glycoprotein | 2,053 | 1,00    | 0,31              | 1,43  |
| glutamine                          | 2,152 | 1,00    | 0,73              | 1,15  |
| glutamate                          | 2,359 | 1,00    | 0,37              | 1,40  |
| pyruvate                           | 2,408 | 1,00    | 0,24              | 1,39  |
| gluthathione (oxidized)            | 2,559 | 1,00    | 1,46              | 0,77  |
| aspartate                          | 2,805 | 1,00    | 0,46              | 1,34  |
| creatine                           | 3,040 | 1,00    | 0,43              | 1,34  |
| choline                            | 3,225 | 1,00    | 0,17              | 1,52  |
| GPC (sn-glycerol-3-phosphocholine) | 3,233 | 1,00    | 0,52              | 1,39  |
| PC (phosphatidylcholine)           | 3,250 | 1,00    | 1,38              | 0,77  |
| taurine, trimethylamine-N-oxide    | 3,271 | 1,00    | 2,04              | 0,40  |
| betaine                            | 3,359 | 1,00    | 2,51              | 0,13  |
| $\alpha$ -glucose                  | 3,424 | 1,00    | 1,18              | 1,34  |
| glycine                            | 3,553 | 1,00    | 0,59              | 1,43  |
| citrate                            | 3,562 | 1,00    | 0,20              | 1,43  |
| threonine                          | 3,609 | 1,00    | 0,22              | 1,46  |
| free glycerol                      | 3,651 | 1,00    | 0,17              | 1,49  |
| ascorbic acid                      | 4,504 | 1,00    | 2,42              | 0,20  |

A continuación, una vez establecidos los niveles basales de los distintos tejidos a analizar, se procedió a realizar otro análisis multivariante mediante PLS-DA únicamente con las biopsias hepáticas obtenidas de cada uno de los grupos experimentales, tanto de ratas sanas, ratas portadoras de implantes tumorales o cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente en el correspondiente apartado de experiencias realizadas (Figura 142).

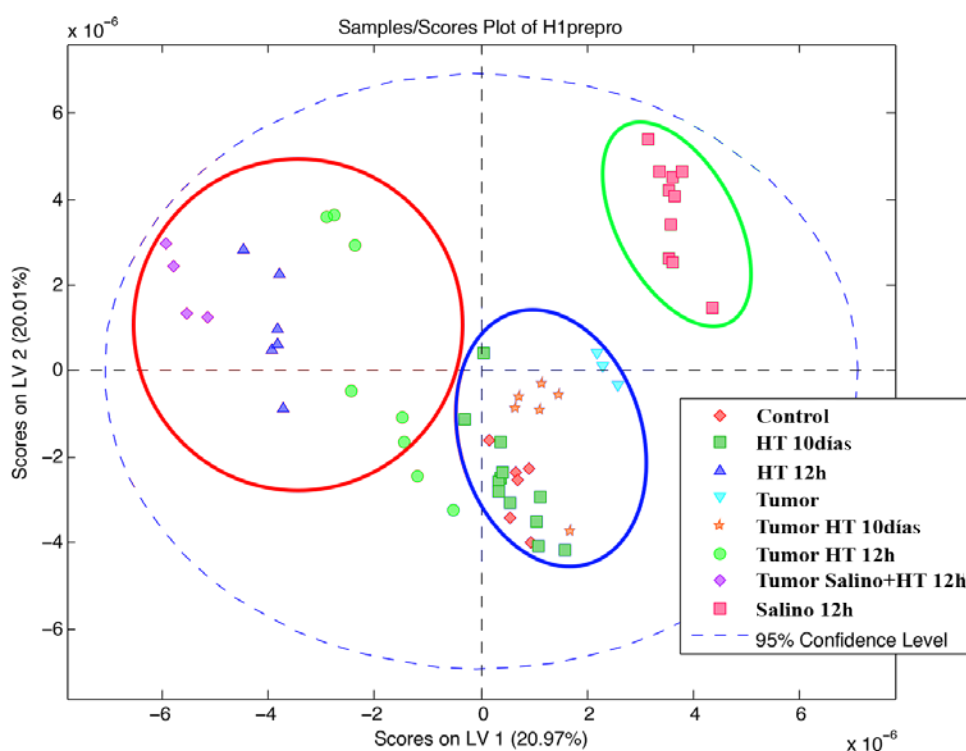


Figura 142. Análisis multivariante mediante PLS-DA de las distintas muestras de tejido hepático de todos los grupos experimentales. La línea discontinua marca el intervalo de confianza del 95%.

A grandes rasgos, se puede observar que obtenemos 3 grupos o clústeres de “perfiles metabolómicos”. En la parte superior derecha se sitúan las muestras de animales en los que se simuló el procedimiento de infusión i.a. (elipse verde), en la zona media se agrupan los grupos control empleados en las determinaciones basales que se muestran en la Figura 139 y aquellas muestras de tejido hepático que fueron tomadas 10 días después del último procedimiento (elipse azul) y, finalmente, en el cuadrante superior izquierdo, quedan agrupadas las muestras procedentes de los animales que fueron expuestos a HTM (elipse roja). El único grupo experimental que no queda claramente definido en alguna de las tres agrupaciones anteriores es el que recibió infusión i.a. de salino, fue expuesto a HTM y cuyas muestras se extrajeron en las 12 horas siguientes (círculo verde).

Tabla 22. Valores normalizados de los metabolitos identificados en los VIPs en el tejido hepático de los diferentes grupos experimentales, respecto al tejido hepático de ratas sanas control. Sombreado en verde aquellos grupos en los que la determinación metabólica fue menor respecto al control (menor cantidad determinada cuando mayor es la intensidad del sombreado verde) y sombreado en rojo aquellos grupos en los que la determinación metabólica fue mayor respecto al control (mayor cantidad determinada cuando mayor es la intensidad del sombreado rojo).

| metabolite                         | ppm   | Control | Control con tumor | HT 12h | Tumor HT 12h | Tumor Salino+HT 12h | Salino 12h | HT 10días | Tumor HT 10días |
|------------------------------------|-------|---------|-------------------|--------|--------------|---------------------|------------|-----------|-----------------|
| leucine/isoleucine                 | 0,966 | 1,00    | 0,30              | 0,46   | 0,34         | 0,50                | 0,81       | 1,18      | 0,47            |
| valine                             | 0,984 | 1,00    | 0,19              | 0,23   | 0,17         | 0,28                | 0,72       | 1,20      | 0,38            |
| D-Hydroxybutyrate                  | 1,187 | 1,00    | 2,24              | 11,39  | 6,54         | 10,84               | 5,39       | 0,95      | 2,62            |
| lactate                            | 1,325 | 1,00    | 0,81              | 3,24   | 1,94         | 3,12                | 1,86       | 1,23      | 0,98            |
| alanine                            | 1,492 | 1,00    | 1,60              | 1,39   | 1,36         | 1,36                | 1,15       | 0,92      | 1,26            |
| lysine                             | 1,719 | 1,00    | 0,20              | 0,21   | 0,17         | 0,27                | 0,71       | 1,20      | 0,39            |
| acetate, acetoacetate              | 1,921 | 1,00    | 1,47              | 0,22   | 0,87         | 0,24                | 0,59       | 0,84      | 1,27            |
| glutamate                          | 2,133 | 1,00    | 0,41              | 1,22   | 0,68         | 1,23                | 1,14       | 1,21      | 0,52            |
| pyruvate                           | 2,408 | 1,00    | 0,26              | 0,49   | 0,33         | 0,53                | 0,83       | 1,19      | 0,44            |
| glutamine                          | 2,480 | 1,00    | 0,21              | 1,43   | 0,74         | 1,42                | 1,23       | 1,23      | 0,48            |
| gluthathione (oxidized)            | 2,565 | 1,00    | 0,91              | 3,91   | 2,06         | 3,77                | 2,24       | 1,17      | 1,04            |
| asparagine                         | 2,960 | 1,00    | 0,46              | 2,86   | 1,53         | 2,78                | 1,84       | 1,21      | 0,75            |
| creatine                           | 3,040 | 1,00    | 0,43              | 0,87   | 0,60         | 0,89                | 0,98       | 1,16      | 0,59            |
| choline                            | 3,225 | 1,00    | 2,75              | 9,24   | 5,83         | 8,78                | 4,43       | 0,84      | 2,82            |
| GPC (sn-glycerol-3-phosphocholine) | 3,233 | 1,00    | 0,37              | 0,55   | 0,42         | 0,59                | 0,85       | 1,17      | 0,52            |
| PC (phosphatidylcholine)           | 3,250 | 1,00    | 1,14              | 3,53   | 1,85         | 1,63                | 2,02       | 3,41      | 2,10            |
| betaine                            | 3,359 | 1,00    | 2,25              | 4,65   | 3,41         | 4,44                | 2,49       | 0,76      | 2,12            |
| $\alpha$ -glucose                  | 3,424 | 1,00    | 3,07              | 4,07   | 2,84         | 3,87                | 1,93       | 0,43      | 2,45            |
| glycine                            | 3,553 | 1,00    | 1,35              | 6,01   | 3,26         | 5,75                | 3,04       | 1,07      | 1,22            |
| citrate                            | 3,562 | 1,00    | 0,53              | 0,25   | 0,31         | 0,30                | 0,73       | 1,22      | 0,53            |
| threonine                          | 3,609 | 1,00    | 1,01              | 0,57   | 0,81         | 0,59                | 0,81       | 1,00      | 0,98            |
| free glycerol                      | 3,651 | 1,00    | 1,77              | 13,50  | 7,19         | 12,83               | 6,07       | 1,12      | 2,29            |
| glucose-1-Phosphate-(Glycogen)     | 4,504 | 1,00    | 0,00              | 0,22   | 0,07         | 0,28                | 0,73       | 1,25      | 0,26            |
| ascorbic acid                      | 4,515 | 1,00    | 0,26              | 0,92   | 0,48         | 0,94                | 1,02       | 1,23      | 0,41            |
| glycogen                           | 5,416 | 1,00    | 0,01              | 0,15   | 0,03         | 0,22                | 0,70       | 1,25      | 0,25            |

Al igual que en el primer análisis multivariante con los tejidos control, se realizó una normalización (Tabla 22) de los valores VIP de aquellos metabolitos que pudieron ser identificados y que era responsables de los clústeres que se observan en la Figura 142, respecto al tejido hepático de ratas sanas (valor basal de referencia). Además, también se realizó una representación gráfica a fin de facilitar la interpretación de los datos reflejados en la Tabla 22, incluyéndose sólo aquellos metabolitos que presentaban mayores implicaciones en el modelo generado en la Figura 142.

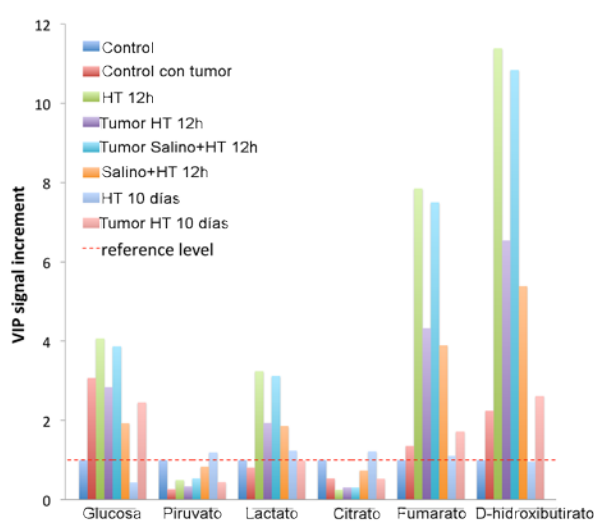


Figura 143. Valores normalizados de glucosa, piruvato, lactato, citrato, fumarato y D-hidroxitirato de los distintos grupos experimentales, respecto a animales sanos del grupo control (línea discontinua roja).

En las Figuras 143 y 144 se observa, con mayor claridad que en la Tabla 22, como hay un patrón en las alteraciones que sufren los distintos grupos experimentales en función del tiempo en el que se realiza el análisis. Las determinaciones que se realizaron en las siguientes 12 horas a la realización del último procedimiento en los animales, bien sea HTM o la infusión de suero salino, muestran una alteración, bien sea elevación o disminución en el caso del piruvato y citrato, en los niveles de los metabolitos; por el contrario, cuando trascurren 10 días entre el último procedimiento y la toma de muestras, los valores se mantiene próximos al nivel basal, o al menos, no sufren modificaciones en gran medida respecto de él.

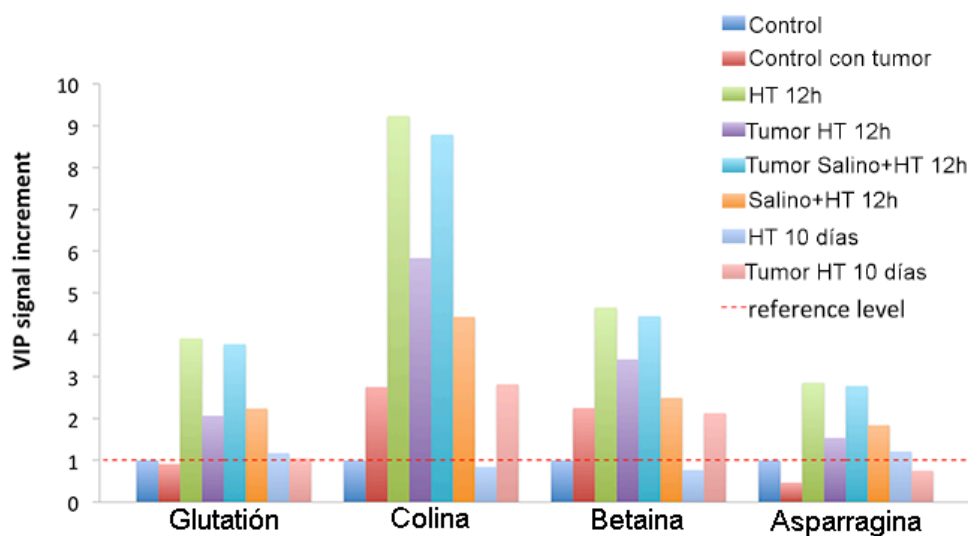


Figura 144. Valores normalizados de glutathión, colina, betaína y asparragina de los distintos grupos experimentales, respecto a animales sanos del grupo control (línea discontinua roja).

El mismo patrón de alteraciones sigue el ratio lactato-piruvato (L:P) (Figura 145). La relación de ambos en ratas portadoras de tumores se situó ligeramente por encima de 3:1. En los grupos analizados a las 12 horas, el L:P se elevó por encima de 6:1. Mientras que, si observamos éste índice a los 10 días, vemos que en los animales sanos que fueron expuestos a HTM el ratio volvió a valores basales, como en el hígado control; sin embargo, permaneció ligeramente por encima de 2:1 en el tejido hepático de ratas portadoras de implantes tumorales.

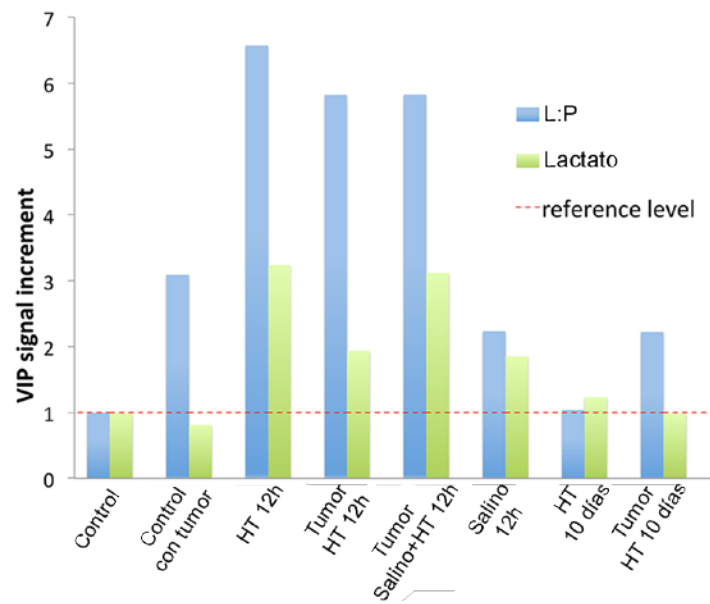


Figura 145. Ratio lactato-piruvato (L:P) obtenido a partir de los valores normalizados de la Tabla 22. La línea de discontinua roja representa el L:P del tejido hepático sano de ratas control.



# DISCUSIÓN



El CCR fue, en 2016, responsable directo del 3,1% de las muertes ocurridas en la UE; siendo el segundo tipo de neoplasia en cuanto al número de muertes ocasionadas<sup>3</sup>. Un elevado porcentaje de pacientes afectados por CCR desarrollarán, en algún momento de la enfermedad, metástasis de asiento hepático. Para estos pacientes, la opción terapéutica clásica, y que aún hoy día presenta mayores SLP y SG, es el abordaje quirúrgico de las MHCCR.

Sin embargo, pese a ser el procedimiento deseado, no siempre es posible de realizar y, otras veces, su eficacia puede ser cuestionada, ya que micrometástasis no detectables en el acto quirúrgico o por técnicas diagnósticas pueden quedar en el hígado restante, produciendo la reaparición o recidiva de la enfermedad.

En este contexto se ha desarrollado este trabajo, orientado a la detección y tratamiento de esas micrometástasis o células tumorales que pudieran quedar circulantes en el organismo, mediante una terapia experimental selectiva basada en la HTM mediada por NpM.

De aquí en adelante, se discutirán los resultados, anteriormente presentados, relativos al uso de la HTM selectiva mediada por NpM en el tratamiento experimental de MHCCR. También, gracias a todas las pruebas realizadas durante el periodo de experimentación, comentaremos la utilidad de la ecografía como elemento predictor de la necrosis tumoral, además de valorar la idoneidad de los análisis de enzimas hepáticas y sistémicas en plasma sanguíneo y el perfil metabólico del parénquima hepático, como evaluadores del daño hepático tras la HTM.



## Respuesta *in vitro* y *ex vivo* a la hipertermia

### A. Sensibilidad a la temperatura de las células en cultivo

La exposición *in vitro* de las células tumorales CC531 al insulto térmico resultó en un descenso brusco de la capacidad de proliferación celular (Figuras 78 – 80), coincidiendo con resultados de otros autores que también comprobaron una mayor sensibilidad de las células tumorales en cultivo a la HT<sup>294,295</sup>.

Esta alta sensibilidad de las células tumorales ante la HT podría explicarse por las diferencias fisiológicas que éstas presentan respecto a las células “normales” o sanas, fundamentalmente en su metabolismo. Entre otras, por ejemplo, las células tumorales tienen unas tasas de producción de ATP, necesario para su crecimiento y proliferación, muy bajas, ya que por cada molécula de glucosa apenas producen 2 moléculas de ATP, frente a las 36 moléculas que obtienen las células sanas; éste hecho se debe a que las primeras emplean la ruta fermentativa, transformando glucosa en ácido láctico, mientras que las células sanas emplean la vía oxidativa del Ciclo de Krebs, mucho más eficiente desde el punto de vista energético<sup>296</sup>.

La determinación de la temperatura usada para la inducción de HT *in vitro* fue, junto al tiempo, un factor crítico en el diseño del protocolo experimental. Diversos trabajos publicados emplean diferentes temperaturas y tiempos de exposición<sup>297–299</sup>. El tiempo y la temperatura a la que son expuestas las células influye en los cambios que éstas manifestarán tras el shock térmico. Mientras que temperaturas superiores a los 43° C (rango entre 43 – 47° C) inhiben la síntesis de DNA y RNA y algunas proteínas<sup>300</sup> y, por tanto, ralentiza o detiene el crecimiento celular, llegando incluso a provocar la muerte de las células, la exposición a temperaturas no superiores a los 41 – 42° C induce, tras volver a temperaturas óptima de cultivo (37° C), la producción de las denominadas *heat shock proteins*, las cuales son capaces de producir termotolerancia en las células, permitiendo su proliferación en condiciones de HT moderada<sup>301–303</sup>; por tanto,

dependiendo de la intensidad, el shock térmico puede inducir o bloquear la proliferación celular.

En pruebas previas llevadas a cabo en nuestro Laboratorio para definir las condiciones experimentales a utilizar en ésta Tesis Doctoral, analizamos la combinación de distintas condiciones experimentales para la HT *in vitro*. Realizamos series experimentales a 43, 45 y 47° C de exposición durante 30, 45 y 60 minutos. Comprobamos que a temperaturas inferiores a las utilizadas en este Trabajo, la recuperación celular era tan rápida que no dejaba tiempo a testar con posterioridad los efectos de una terapia combinada con quimioterápicos usados con el tratamiento del CCR metastásico. Ajustada la temperatura, el tiempo de exposición se definió bajo el mismo criterio, con un tiempo de incubación de 30 minutos a 47° C la recuperación celular era demasiado precoz; sin embargo, cultivando las células a 47° C durante 60 minutos, el efecto sobre la viabilidad y crecimiento celular era tal, que no permitía realizar ninguna medida sobre la proliferación y el estado de las células, ya que provocaba la muerte de prácticamente la totalidad de los cultivos<sup>274</sup>.

Este descenso en la proliferación celular se ve mantenido en el tiempo; incluso hasta 48 horas después de someter a los cultivos a HT, la proliferación celular, estrechamente relacionada con un óptimo estado funcional de las células, sigue descendiendo. Sólo a las 72 horas se aprecia un repunte en el crecimiento celular. Este comportamiento podemos compararlo con lo que podría ocurrir *in vivo* tras una RH, o cualquier otro procedimiento ablativo, que en principio parece exitosa pero que, tras un periodo de tiempo y debido a que no se realizó de forma completa o al *pool* de células tumorales circulantes con capacidad de recidivar, genera la reaparición de la enfermedad metastásica<sup>304,305</sup>. También vemos, comparando los datos según el tiempo de crecimiento de los cultivos previo a la HT, que no existen diferencias significativas entre las células con un tiempo de cultivo previo de 24, 48 o 72 horas.

Esto, nos permite disponer de una buena herramienta para estudiar, *in vitro*, la aplicabilidad clínica de combinaciones terapéuticas basadas en enfoques interdisciplinares en el tratamiento de las MHCCR.

---

En esta línea, analizamos el posible uso combinado de la HT y de dos quimioterápicos usados comúnmente para el tratamiento de las MHCCR, ATRA y 5-FU, tanto por separado como un cóctel formado por ambos.

En el caso concreto de ATRA, comprobamos que el pretratamiento durante 24 con ATRA 10  $\mu$ M resultó ser el de mayor eficacia, bien sólo o combinado con 5-FU 0,25  $\mu$ g/ml. Como ya hemos comentado, tras la HT se observaba un repunte del crecimiento celular a las 72 horas pero, combinado ambos tratamiento se aprecia que la quimioterapia previa bloquea el reinicio de la proliferación celular entre las 48 y las 72 horas (Figuras 82 – 84 y Figuras 88 – 90, respectivamente). Sin embargo, no podemos atribuir al 5-FU en solitario un efecto similar, al contrario de lo que hubiésemos esperado según los resultados recogidos en otros trabajos<sup>306-308</sup>.

El uso combinado del ATRA o 5-FU, o ambos a la vez, al mismo tiempo que la HT dio lugar a un bloqueo más rápido y de mayor entidad del crecimiento celular, mantenido en el tiempo hasta el final de las experiencias llevadas a cabo (Figuras 106 – 114). Así, según nuestros resultados obtenidos *in vitro*, podríamos asumir que al igual que la quimioterapia neoadyuvante usada como complemento a la RH ha demostrado unos buenos resultados y tener gran utilidad clínica<sup>99,309</sup>, la quimioterapia adyuvante en tratamientos de ablación tumoral mediante calor, como la HTM mediante NpM, las MO o la ARF, podría resultar beneficiosa, tal y como se recoge algunos trabajos recientes<sup>310,311</sup>.

## **B. Respuesta del parénquima hepático ante la exposición a un campo magnético externo**

La eficacia del tratamiento y el calentamiento inducido en los tumores sometidos a HTM mediada por NpM está sumamente condicionada por parámetros dependientes del tejido, como su conductividad eléctrica, calor específico o la perfusión sanguínea, y por factores dependientes del inductor de RF (tipo de aplicador, frecuencia, intensidad, etc)<sup>312</sup>.

Ya que los parámetros concernientes al IRF fueron ampliamente analizados y discutidos en el trabajo de Tesis Doctoral del Dr. Eneko Garaio<sup>284</sup>, aquí solo se discutirá lo referente a los parámetros dependientes o relacionados con el tejido en el que se aplique el campo magnético mediante un IRF externo y la relación entre ambos.

En la primera aproximación realizada para la inducción de HTM se emplearon NpM comerciales de elevado SAR suspendidas en agua destilada. Se logró una elevación de 11° C de la temperatura respecto al lóbulo hepático no tratado (Tabla 9). El empleo de este medio como vehiculizante de un magnetofluido con fines terapéuticos, sustentado por abundante literatura<sup>313,314</sup>, permite la óptima dispersión de las NpM, ya que la presencia de iones en el medio ocasiona la agregación de las mismas; sin embargo, a pesar de los buenos resultados logrados en términos de incremento térmico en el modelo *ex vivo* respecto al otro vehículo usado, el suero salino, 11° C vs. 4° C, respectivamente, se descartó su uso. Esta decisión se fundamentó en las indeseables consecuencias fisiológicas asociadas a la administración endovascular de agua destilada en el organismo, como fracaso renal agudo<sup>315</sup>, hemólisis y/o daños en la íntima de los vasos sanguíneos<sup>316</sup>, entre otros.

Los incrementos térmicos totales conseguidos, tanto con NpM comerciales (Tabla 10), como de síntesis propia (Tabla 11), fueron muy similares (6 vs. 5° C, aproximadamente). Sin embargo, hay que destacar que, pese a las buenas medidas de SAR que se obtuvieron de estas muestras, en ambos casos apenas se consiguió alcanzar la mitad de la temperatura conseguida con las NpM comerciales suspendidas en agua



---

destilada; todo ello pese a haber realizado dos insultos térmicos, con una duración total mayor que en la primera experiencia, en los que se expuso al tejido hepático a un mayor campo magnético.

Con todo esto, el vehículo que finalmente se empleó para la suspensión de las NpM resultó en una dilución de PBS que contuviera la cantidad necesaria de sales para no ocasionar daños fisiológicos en el animal, o que éstos fueran de la menor entidad posible, y que además tuviera la concentración mínima posible de iones, sobre todo de cloruro, para que no propiciase la agregación de las NpM<sup>317,318</sup>, y que por tanto redujera su SAR.



## **Adhesión de la secuencia RGD a las células en cultivo y su utilidad como agente de contraste selectivo por el tejido tumoral**

El RGD-fluoresceína usado *in vitro* demostró tener capacidad de adhesión a las células tumorales de la línea CC531. Éste hecho nos permitió corroborar, en parte, nuestra primera hipótesis de trabajo, y es que el RGD quedaba depositado sobre los clústeres de células, tal y como nos permitieron comprobar las imágenes de microscopía óptica de fluorescencia tomadas (Figura 110).

Además, esta adhesión podemos considerarla estable y permanente, al menos durante el tiempo que duraron las experiencias *in vitro*, un máximo de 4 horas (Figura 109); si bien, el máximo de fluorescencia emitido se registró tras dos horas de exposición.

Pese a no haberse encontrado publicaciones similares a esta experiencia, sí que hay trabajos que emplean la secuencia RGD para mejorar o potenciar la adhesión de las células por otros compuestos, como diversos biomateriales. En este sentido, Hansson et al., empleando un biomaterial de quitosano funcionalizado con RGD consiguieron incrementar entre 3 y 5 veces la adhesión inicial de las células por el quitosano, además de incrementar la interacción del biomaterial y el tejido circundante<sup>319</sup>. También Dowling et al. emplearon en sus estudios moléculas de RGD, tanto lineales como cíclicas, para recubrir substratos, consiguiendo incrementar la adhesión celular por ellos<sup>320</sup>. Estos dos trabajos, a modo de ejemplos, junto con nuestros resultados *in vitro* con RGD marcado con fluoresceína, nos permiten demostrar que la secuencia RGD se adhiere a las células tras exposición *in vitro*.

Para completar estos ensayos de afinidad *in vitro* de la secuencia RGD por la línea celular empleada en esta Tesis Doctoral, y comprobar también su utilidad como contraste yodado selectivo, se llevó a cabo un estudio *in vivo* empleando una de las técnicas de diagnóstico por imagen comúnmente empleadas en la práctica clínica, la TCMC. En este caso, para poder localizar las zonas donde queda adherido el RGD, se

empleó una secuencia RGD a los que se adicionó yodo, fácilmente detectable mediante TCMC<sup>321</sup>.

Sin embargo, pese a la buena capacidad de los compuestos yodado como agentes de contraste, su principal hándicap es el limitado tiempo que permanecen en el organismo, ya que en apenas unos minutos desde su administración, resulta lavado y eliminado a través de la orina (el 90% es filtrado y excretado en 20-30 minutos) y la vía biliar<sup>322</sup>.

Ya demostramos, en ensayos preliminares presentados, que el RDG-I diseñado y empleado en este Trabajo presentaba tiempos de permanencia en el lecho tumoral superiores a las 3-4 horas<sup>323</sup>. Ahora, en función de la cantidad de yodo administrado junto con los RGD (Tabla 13), hemos sido capaces de determinar y definir las diferencias de atenuación detectadas mediante TCMC, determinando cuál podría ser la concentración óptima de yodo a administrar.

También vimos que, en todos los compuestos RGD-i empleados, las cantidades de yodo requeridas para lograr valores de atenuación, en el tumor y/o en el hígado, similares o superiores a los agentes tradicionales, como el Visipaque®, eran menores. Éste hecho representa o aporta una ventaja añadida a las ya mencionadas antes, mayor tiempo de permanencia en el cuerpo y a la especificidad por el tejido tumoral del RGD-i, y es que reduce el yodo que se infunde al cuerpo y, por tanto, reduce la toxicidad que podría ocasionar en pacientes con otras patologías, especialmente en enfermos con una función renal y/o hepática comprometida, así como aquellos con hipersensibilidad a los contrastes yodados<sup>324</sup>.

Aunque los compuestos RGD-i con menor cantidad de yodo, RGD-i 52 y RGD-i 53, consiguieron unos valores de atenuación hepática y tumoral mayores que el Visipaque®, esto no se correlacionó con un incremento de la concentración de yodo determinada por gramo de tejido: no se apreciaron diferencias en la cantidad de yodo respecto al Visipaque®. Ni la bibliografía consultada, ni nuestra experiencia nos permite dar una explicación a este hecho o atribuirlo a alguna circunstancia del procedimiento experimental, salvo a la propia estructura y longitud del RGD-i<sup>283</sup>. Las

cadena de los *linkers* de los compuestos RGD-i 52 y RGD-i 53 eran de menor longitud, lo que pudo dar lugar a una menor afinidad de las moléculas RGD por las integrinas  $\alpha_v\beta_3$ ; si bien, esto sigue sin explicar la discordancia entre los valores de atenuación elevados y la baja concentración de yodo detectada en ambos tejidos.

Esta Tesis Doctoral establece como hipótesis de partida que un magnetofluido funcionalizado con RGD podría tener una doble función, por un lado potenciar la sensibilidad diagnóstica de la IRM para la detección de MHCCR de pequeño tamaño y, además, secundariamente ser capaz de inducir HTM al ser expuesto a un IRF externo y provocar la ablación de las lesiones cancerosas; es decir, que las NpM-RGD funcionarían como un agente teranóstico.

Una vez comprobado que los RGD-i se adherían al tejido tumoral y que, mediante TCMC, fuimos capaces de detectar su presencia, se sustituyó el yodo de su estructura química por NpM. Usando la IRM también pudimos observar la presencia de NpM-RGD en el tejido tumoral (Figura 113), donde se detectó una caída de señal del 80% atribuible a la presencia de Fe exógeno tras la infusión de NpM-RGD.

Estos hallazgos concuerdan con la literatura existente, donde también se demuestra que agentes teranósticos basados en NpM potencian la sensibilidad de la IRM<sup>325-327</sup>. Las imágenes de la secuencia T2\* de IRM (Figura 113C y F) y los posteriores estudios histopatológicos con tinción de Perl's (Figura 118) muestran una buena relación, aunque la detección sea mucho más precisa en los análisis histológicos; las secciones histológicas de los implantes tumorales muestran depósitos selectivos de NpM-RGD en el estroma peritumoral y alrededor de las estructuras vasculares, pero sin llegar a penetrar en el interior del implante, al igual que se aprecia en las imágenes de IRM, donde hay una caída en la IS en la periferia del tumor, apenas perceptible en el interior del mismo.

Hecho que también fue descrito en similares términos por Lee en su trabajo<sup>237</sup> con conejos portadores de CHC inducido mediante células VX2; las imágenes histopatológicas evidenciaron que las micropartículas magnéticas embolizantes que

empleó quedaban depositadas en la periferia tumoral y sólo aquellas de muy pequeño tamaño llegaban a penetrar dentro del implante, pero siempre cerca de estructuras vasculares.

A pesar de haber comentado que nuestros resultados en la detección de las NpM-RGD mediante IRM coinciden con la literatura revisada, nuestro éxito es relativo. Para la detección y medida de la IS y posterior estimación de la cantidad de Fe en los tejidos, tuvimos que valernos de la secuencia STIR de la IRM para la localización anatómica inicial de los implantes. Las secuencias DP\* y T2\*, pese a detectar relativamente bien los depósitos de Fe, no sirvieron para realizar el diagnóstico de las lesiones tumorales debido a la captación de NpM-RGD por parte del parénquima hepático sano, que artefactó la imagen y no permitió delimitar la extensión o volumen total de la masa tumoral. Por esto mismo, tampoco se pudo correlacionar la concentración de Fe cuantificada mediante ICP-MS con la determinación realizada por la IRM, ya que el Fe de las NpM provoca tal caída de la IS que impide realizar un cálculo mínimamente aproximado.

En otros trabajos, este problema no es tan evidente, o logran evitarlo, empleando equipos con campos magnéticos más elevados que permitan una detección más precisa<sup>326</sup>, o emplean compuestos magnéticos con otro tipo de cubierta que evite la captación de las NpM por las células del SFM o del SRE<sup>135</sup> o su agregación para conseguir una mejor dispersión por la superficie tumoral<sup>325</sup>.

Todas éstas variables implicadas requieren de estudios mucho más exhaustivos y profundos para poder establecer más detalladamente las condiciones experimentales o los protocolos a seguir dependiendo de las características del tumor al que nos enfrentemos.

## Modelo de inducción de metástasis hepáticas

El desarrollo del modelo animal de metástasis hepáticas para este trabajo no presentó demasiada dificultad, ya que nuestro Grupo tiene amplia experiencia en él y lleva empleándolo, satisfactoriamente, en diversos trabajos en los últimos años<sup>200,308</sup>.

Sí es verdad que nuestro modelo de inducción, comparándolo con otros también propuestos y validados, tiene un rendimiento menor en el desarrollo de metástasis hepáticas; por ejemplo, la infusión intraportal de células tumorales provoca el desarrollo de metástasis hepáticas en aproximadamente el 90% de ratones desnudos que recibieron una dosis de  $10^6$  células de la línea HT-29<sup>328</sup>, un porcentaje que es, aproximadamente, un 20-30% superior al conseguido con el modelo utilizado en este trabajo. A pesar de ser un método que aporta ciertos beneficios, como la reducción del número inicial de animales necesarios para lograr el número deseado de casos positivos, no está exento de desventajas; por ejemplo, en este mismo estudio, Thalheimer et al. constataron que en el 63% de los ratones que desarrollaron MHCCR había presencia de células tumorales en la médula ósea.

La inducción tumoral mediante la administración intraesplénica<sup>197,232,272,329</sup> de las células tumorales es otro de los modelos validados para la inducción tumoral. A través de esta vía de administración, el porcentaje de animales que presentan MHCCR es muy variable, desde apenas el 20% hasta el 100% de los casos, según autores.

A pesar del menor éxito en el desarrollo de tumores, elegimos la punción hepática directa como método de inducción de MHCCR por dos cuestiones cruciales para este trabajo de Tesis Doctoral:

- En primer lugar, era necesario el desarrollo de un único implante tumoral en el hígado para poder realizar un seguimiento ecográfico adecuado del crecimiento y volumen tumoral.
- Y además, el implante debía alcanzar un tamaño suficiente como para permitir la colocación del sensor térmico en su interior durante el tiempo de exposición al

IRF y poder observar así las variaciones de temperatura a lo largo de éste tiempo.

Los dos modelos anteriormente comentados, inyección intraportal e intraesplénica, no cumplían ninguno de estos requisitos; el número de metástasis que se desarrollan no es predecible en ninguno de los modelos, ni tampoco el lugar de aparición de las MHCCR. Además, si en estos modelos se permitiera que las metástasis alcanzasen el tamaño necesario para la introducción en su interior de la sonda de temperatura, el grado de invasión tumoral que presentaría el hígado, haría que no fuese ético el mantenimiento con vida de los animales de experimentación.

Así mismo, nuestro Grupo también presentó y validó en 2011 un modelo de inducción tumoral percutáneo ecoguiado<sup>276</sup>. Ésta técnica es *a priori* menos invasiva y lesiva para el animal, al no requerir un abordaje quirúrgico mediante laparotomía media subxifoidea, y, por lo tanto, agilizando o mejorando el tiempo de recuperación posterior.

Sin embargo, al tratarse de un modelo más costoso en términos de tiempo procedimental, con el consiguiente aumento del tiempo que el animal está bajo anestesia (4 minutos mediante punción directa vs. 10 minutos punción ecoguiada), junto con un dificultad añadida para el control de la hemorragia posterior al pinchazo en el parénquima hepático, hizo que también fuera descartado para la realización de las experiencias que aquí han sido recogidas.



## **Abordaje vascular para la infusión de un compuesto teranóstico**

Sobre el modelo de administración del magnetofluido terapéutico, nos decantamos por un abordaje quirúrgicamente más complejo que otras vías de administración defendidas por otros autores, como la intratumoral<sup>174,175,177</sup> o endovenosa<sup>188-190</sup>. En las fases iniciales del desarrollo de esa Tesis Doctoral, se plantearon y realizaron pruebas piloto para contemplar otras posibles vías de administración, además de la intrarterial finalmente elegida.

Cuando ensayamos la vía administración i.t. resultó ser un procedimiento sumamente sencillo, fácil de replicar y que por tanto nos podría permitir conseguir series experimentales con un número de animales suficientemente amplio; sin embargo, con los análisis histológicos, vimos que los depósitos de NpM en el interior del tumor no eran nada homogéneos, existiendo zonas con una elevada cantidad de NpM y otras en las que apenas había, y siempre condicionada su presencia a los trayectos descritos por la aguja. Al someter estos implantes a HTM se conseguía, al igual que lo descrito por otros autores<sup>174,177</sup>, elevadas temperaturas en el interior del tumor, causando la consecuente necrosis de esa zona; pero la periferia tumoral y el entramado vascular que irriga al tumor seguían intactos y, posiblemente, con capacidad de proliferar y continuar con su crecimiento; por estos motivos rechazamos una punción i.t. directa, pese a poder conseguir con ella mayores concentraciones intratumorales de NpM y evitar la necesidad de funcionalizar las NpM con moléculas que reconozcan dianas para su adhesión celular.

La administración i.v. también resultó ser más sencilla metodológicamente hablando. Bien a través de una pequeña incisión en la zona inguinal del animal, podíamos alcanzar la vena femoral y por ella administrar el magnetofluido, o bien mediante un laparotomía media exponer la vena ileocólica e infundirlas sistémicamente.

En ambos casos, si nos atenemos a los parámetros que anteriormente hemos comentado para rechazar la punción i.t., son vías de administración que, inicialmente, por la vascularización del propio hígado, podrían permitir una llegada más o menos directa de las NpM al territorio hepático, ya que el retorno venoso de la sangre hacia el corazón pasa previamente por el ahí. Sin embargo, durante el crecimiento tumoral, las MHCCR desarrollan su vascularización a partir de ramas arteriales provenientes de la arteria hepática<sup>77</sup>; esta peculiaridad hace que, para que las NpM-RGD lleguen al territorio tumoral, tengan que dar una vuelta completa al sistema circulatorio de la rata con la consiguiente dilución y pérdida de magnetofluido a lo largo del organismo.

Además, atendiendo a lo que ocurre en la práctica clínica, los procedimientos intervencionistas para el abordaje del territorio hepático para el tratamiento de MHCCR se realizan vía arterial y, con nuestro modelo, pretendíamos replicar en la medida de lo posible esta vía de acceso. Pero sin duda, el elemento clave que nos hizo decantarnos por la ruta de administración i.a. fue que mediante ella podemos abordar el tratamiento de micrometástasis de tamaño muy reducido, e inclusive células tumorales aisladas. Para ambos casos, por su reducido tamaño y difícil o imposible detección y localización anatómica, hoy en día no hay tratamiento terapéutico posible, más que la quimioterapia sistémica poco selectiva y con efectos para todo el organismo; el planteamiento aquí presentado permitiría llegar a tratar estas micrometástasis sin causar daños o efectos adversos en el organismo.

Por tanto, hemos podido validar un modelo de administración intrarterial, que ha demostrado ser eficaz para lograr depósitos selectivos de NpM-RGD en el estroma peritumoral y en los neovasos formados para irrigar a los implantes (Figura 118). Estos depósitos y su distribución parecen coincidir con los hallazgos histológicos publicados por otros autores que, al igual que nuestro Trabajo, se decantan por un abordaje arterial más directo para la administración de un magnetofluido terapéutico<sup>191-193</sup>.

## Hipertermia local selectiva mediante NpM-RGD

El objetivo principal, e hilo conductor, de ésta Tesis Doctoral ha sido el desarrollo o ensayo preclínico de una terapia contra las MHCCR basada en NpM-RGD con capacidad de adhesión selectiva por el tejido tumoral.

Gracias a las sondas térmicas que se colocaron en el tejido tumoral, parénquima hepático sano y recto, pudimos registrar y determinar las variaciones de temperatura en cada uno de estos lugares durante la exposición al IRF externo.

El primer paso, debido a que la bibliografía existente para nuestro modelo animal y de infusión de NpM es más bien escasa, fue establecer el campo magnético a aplicar a los animales, de tal forma que fuera seguro para ellos, pero a la vez consiguiese la destrucción tumoral. En éste sentido, quizás los trabajos de referencia son los desarrollados por el Prof. I. A. Brezovich y colaboradores<sup>330,331</sup>, que establecieron teóricamente el campo magnético máximo tolerable, cuando éste se aplica sobre el tórax de un individuo adulto,  $H \cdot f = 4,23 \times 10^8$  A/m·s.

En estudios posteriores sobre individuos adultos que fueron sometidos durante una hora a HT, sin que éstos describieran sensaciones de dolor o malestar, establecieron el *Límite o Criterio de Brezovich*, es decir, el límite del producto de  $H \cdot f$  al que podían ser expuestos los pacientes para una terapia de HT,  $H \cdot f = 4,85 \times 10^8$  A/m·s.

Con posterioridad a los estudios de Brezovich, otros autores han sugerido otros límites para el producto  $H \cdot f$ . Por ejemplo, Bellizzi y colaboradores propusieron que el *Criterio de Brezovich* era muy restrictivo y poco eficaz para el tratamiento de tumores cerebrales y que por tanto, el límite del campo magnético debería aumentarse entre 2 y 4 veces; además, esto permitiría el uso de concentraciones menores de NpM (< 10 mg/ml) y de menor tamaño (<10 nm)<sup>332</sup>. Hergt & Dutz<sup>189</sup>, elevaron el *Límite de Brezovich* en un orden de magnitud,  $5 \times 10^9$  A/m·s, próximo al nuestro, sin que ello reportase problemas de supervivencia o malestar en los individuos.

En nuestro trabajo, el campo magnético empleado *in vivo* ha sido de 606 kHz de frecuencia y una intensidad de 14 kA/m, con un producto  $H \cdot f$  de  $8,489 \times 10^9$  A/m $\cdot$ s, es decir, casi 18 veces superior al *Criterio de Brezovich*.

Para las primeras experiencias *in vivo* realizadas en esta Tesis Doctoral, debido a la escasa bibliografía para usarla como referencia para nuestro modelo animal de HTM, realizamos la comparación entre dos regímenes de exposición de igual frecuencia pero de intensidad variable. En cualquiera de los grupos experimentales expuestos a HTM (HT, Salino+HT o NpM+HT), encontramos que en el régimen A hubo un mayor porcentaje de animales fallecidos (Figura 121-Figura 123).

La diferencia entre ambos regímenes radicó en la intensidad del campo magnético. En el régimen A se mantenía la máxima intensidad (14 kA/m) durante un tiempo prefijado de 16 minutos y, en los últimos 5 minutos, se bajaba a 11 kA/m. En el régimen B la intensidad era variable entre 14 y 4 kA/m para mantener la temperatura hepática en un máximo de 43° C. Ésta temperatura se determinó a raíz de una experiencia en las que fallecieron casi todos los animales sometidos al régimen A y cuya temperatura hepática sobrepasó los 43-44° C (Figura 120 y Figura 124).

Ante estas muertes, quisimos comprobar también si otro parámetro, como es el peso del animal, podría condicionarnos en éste sentido y, por lo tanto, pudiera dar lugar a conclusiones erróneas en este Trabajo.

Efectivamente, pudimos constatar que el peso parecía ser otro factor que debíamos controlar para lograr la supervivencia de lo animales tras la exposición al IRF. Vimos que todos los animales que fallecieron durante o como consecuencia directa de la exposición al IRF, tras las primeras 8-12 horas, presentaban pesos superiores a los 265 gramos (Tabla 17).

No resulta aventurado suponer que a mayores pesos, mayor cantidad de grasa puede acumularse en las ratas<sup>333</sup>, sobre todo cuanto más viejos son los individuos; y, partiendo de esto, una explicación factible a esta elevada mortalidad, podría estaría asociada a la elevada absorción de calor por parte del tejido adiposo de las ratas. La energía absorbida

en forma de calor por el tejido no tumoral durante la exposición a HTM se debe a las *eddy currents* o “corrientes parásitas”, y constituye uno de los principales efectos adversos de la terapia, y el que más significativamente limita la eficacia de estos tratamientos<sup>334</sup>. Sin duda alguna, trabajar en el diseño de IRF más precisos y en métodos para evitar que las *eddy currents* calienten en el tejido no deseado, será una de las líneas a seguir para mejorar las terapias basadas en HTM mediadas por NpM.

Una vez solventados los problemas con el régimen de exposición a HTM y haciendo una rigurosa selección de animales por debajo del “peso letal” comprobamos que, tanto en los grupos infundidos (NpM+HT o Salino+HT) como el grupo no infundido (HT), la exposición al campo magnético no causó un aumento de la temperatura corporal de los animales medida por la sonda emplazada en el recto; el incremento térmico máximo, fue de  $1,68 \pm 1,83^\circ \text{C}$ , medido en animales que recibieron NpM-RGD, sin que hubiera diferencias entre los tres grupos (Tabla 18 y Figura 126).

Sin embargo, donde sí que se observaron diferencias fue en el tejido hepático y tumoral, donde los animales que recibieron NpM-RGD experimentaron un incremento térmico de entre  $3\text{-}3,5^\circ \text{C}$  respecto a los que no recibieron infusión alguna. Es cierto que, comparado con otros autores, en especial con aquellos que realizan la infusión i.t. de NpM<sup>176,182,184</sup>, nuestros incrementos térmicos son mucho menores.

Por ejemplo, Dutz et al.<sup>176</sup>, en un modelo de cáncer de mama con punción i.t. de NpM, consiguió incrementos térmicos en el tejido tumoral de  $26^\circ \text{K}$ , tras la exposición durante 140 s a un campo magnético de 25 kA/m y 400 kHz; la temperatura rectal, en estas condiciones, apenas experimentó un incremento de  $2^\circ \text{K}$ . Este gran incremento de temperatura, entre 6-7 veces mayor que el conseguido en este trabajo, podría explicarse por la mayor cantidad de NpM que quedan depositadas dentro del tumor. En nuestro modelo, con nuestras NpM-RGD administradas vía i.a., apenas un 5% de las NpM (75  $\mu\text{g}$ ) quedan adheridos a la periferia tumoral<sup>293</sup>, mientras que los referidos experimentos de Dutz reflejan depósitos de NpM 11 veces superiores, 0,87 mg de NpM en 96,3 mg de tejido tumoral, lo que supone el 1 % de la masa tumoral.

Similares resultados podemos encontrar en el trabajo de Alphan ery et al. de 2011<sup>177</sup>. En éste caso, el rango de NpM administradas a los animales, entre 1-2 mg de maghemita, estaba próximo a la cantidad empleada para esta Tesis Doctoral (1,5 mg); sin embargo, al administrarse mediante punción i.t., los incrementos térmicos alcanzados en los distintos grupos experimentales de éste trabajo oscilaron entre los 10-15  C. En los ensayos de biodistribución y detección de NpM tras la inyección y la terapia de HTM, Alphan ery y colaboradores comprobaron que tras los tres ciclos de HTM, es decir, 6 días después de la inyección i.t., el porcentaje de NpM remanente en el tejido tumoral rondaba el 30-60%, lo cual representa depósitos de, aproximadamente, 0,7 mg de NpM; una cantidad igual, en términos absolutos, a los depósitos alcanzados por Dutz<sup>176</sup>, pero un orden de magnitud mayor a la conseguida en modelo presentado en ésta Tesis Doctoral.

Parece claro, con esto, que nuestro modelo experimental debe conseguir incrementar la cantidad de NpM-RGD que quedan adheridas a la superficie tumoral; si bien ésta meta se antoja difícil de alcanzar. Por un lado, nos vemos limitados al volumen máximo de fluido que puede administrarse por vía endovascular en las ratas, ya que no se recomienda la administración de más de 1 ml por ésta vía, o 2-3 ml si la administración se realiza en forma lenta (10 minutos)<sup>335,336</sup>; por otra parte, tampoco es posible la preparación de una suspensión con mayor concentración de NpM, al menos en nuestro caso, ya que éstas empiezan a sufrir procesos de agregación<sup>317,318</sup> debido a los iones presentes en el PBS empleado para vehiculizarlas y los iones de la propia sangre.

Una tercera vía para lograr una mayor cantidad de NpM adheridas al tumor sería lograr una mayor cantidad de peptidomiméticos RGD alrededor de cada NpM. En las condiciones descritas en el apartado correspondiente de Material y Métodos, se consiguen funcionalizar un 5-15% de los grupos carboxilos originales de las NpM, preservando al mismo tiempo las propiedades fisicoquímicas y la hidrocompatibilidad de las NpM alqu nicas, gracias a los espaciadores hidrofílicos de oligoetil nglicol<sup>281-283</sup>. Cuando se funcionalizan una mayor cantidad de grupos carboxilos, las propiedades fisicoquímicas de las NpM, en definitiva sus propiedades magnéticas, se ven alteradas,

---

disminuyendo su SAR, y por tanto resultando en partículas con una menor capacidad de inducir HTM.

Con todo ello, pese a lograr depósitos de NpM e incrementos térmicos mucho menores que los descritos en la bibliografía, la administración i.a. de 1,5 mg de Fe en forma de NpM-RGD de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , en nuestro modelo, cumplió con las hipótesis iniciales de este Trabajo, actuando como un agente selectivo de contraste e inductor de HTM tras las exposición a un IRF.

Tras la exploración mediante IRM de los animales que recibieron NpM-RGD, se comprobó que el magnetofluido ocasionó una caída de la IS (Figura 115) y que, además, dicha caída era detectable en implantes de pequeño tamaño. Resultados similares hay descritos en la bibliografía que apoyan el uso de magnetofluidos terapéuticos funcionalizados como agente selectivo de contraste<sup>137,193</sup>; si bien en nuestro modelo experimental, por la mala vascularización de los implantes tumorales, esta captación de NpM-RGD, y la correspondiente caída de la IS, sólo ocurría en la periferia de los implantes y alrededor de los vasos que irrigan al tumor.

En cuanto a la capacidad terapéutica de las NpM-RGD también ha quedado constatada con las experiencias llevadas a cabo en este Trabajo. Doce horas después de la exposición a la terapia de HTM mediada por NpM-RGD, las secciones histológicas de las MHCCR mostraron una necrosis tumoral media cercana al 20% (Tabla 19). Comparándolo con otros trabajos consultados<sup>137,337,338</sup>, y pese a que el análisis de la eficacia del tratamiento con HTM no lo realizan de igual modo que nosotros, podemos comprobar que nuestros resultados siguen la misma línea. El trabajo de Hirsch<sup>337</sup> refleja el éxito de la excitación mediante láser infrarrojo de Np de oro, consiguiendo elevar hasta 37° C la temperatura tumoral de los ratones tratados con Np, frente a incrementos de 9° C en los animales del grupo control; pero lo verdaderamente importante de este trabajo fue que todos los animales del grupo de Np sobrevivieron hasta 90 días sin evidencia de recurrencia o “reactivación” del crecimiento tumoral, mientras que los animales control, tuvieron que ser sacrificados a los 20 días de la exposición al láser debido al crecimiento descontrolado de los tumores. Además como, en los animales

expuestos a la radiación infrarroja, no experimentaron daños en el tejido sano, hecho que se refleja en la misma medida en nuestros experimentos, donde el tejido hepático sano no sufre daños como consecuencia a la exposición a HTM; únicamente el parénquima hepático circundante a los tumores muestra signos de necrosis, algo que podría resultar positivo, ya que nos garantiza que el hígado alrededor del implante tumoral tenga unos márgenes limpios y libres de enfermedad.

Por su parte, Stern llegó a la misma conclusión al usar también Np de oro expuestas a ondas del espectro del infrarrojo cercano<sup>338</sup>. Consiguió la reducción completa de los tumores en el 93% de los animales que fueron expuestos a láser infrarrojo para inducir HT con Np de oro; sin embargo, los tumores del grupo de animales que únicamente fueron expuestos al láser no mostraron efecto alguno.

Hu y colaboradores obtuvieron también resultados en esta línea, con NpM de óxido férrico administradas vía i.v. y un campo magnético de 50kHz y 8 kA/m<sup>339</sup>. Consiguieron reducir aproximadamente un 80% el volumen tumoral al exponer tumores mamarios implantados en el flanco de ratones desnudos a HTM. Sin embargo, los resultados más satisfactorios los consiguieron al combinar la HTM mediada por NpM con un cóctel de quimioterápicos formado por doxorubicina y paclitaxel; hubo una reducción prácticamente del 100% del volumen de los implantes tumorales, 30 días después de la HTM.

En nuestros experimentos, no hemos realizado series de supervivencia a medio o largo plazo como los descritos anteriormente con los que, además de valorar la evolución tumoral, también poder hacer una valoración de la seguridad de la terapia de HTM y sus consecuencias fisiológicas en el conjunto del organismo. Sin embargo, en éste sentido, sí que hemos realizado medidas de los niveles séricos de algunos enzimas y perfil metabólico del tejido hepático, que en cierta medida nos permiten dar información sobre las consecuencias que la exposición al IRF tiene sobre lo animales.

En primer lugar, se observa que la inducción y desarrollo tumoral genera por sí mismo incrementos en los niveles de ciertos metabolitos detectados en el parénquima hepático,



como la betaína, taurina, TMAO o fosfatidilcolina (FC). La elevación de estos metabolitos concuerda con los hallazgos de otros trabajos publicados, donde se asocia la alteración de los niveles séricos de estas moléculas con el CCR<sup>340,341</sup>. Todos estos metabolitos forman parte del metabolismo de la colina, que a tenor de lo observado en la Tabla 21 y la Figura 157, parece estar alterado en el tejido hepático sano de ratas con MHCCR.

El incremento de la betaína, por ejemplo, procedente de la oxidación de la colina (donador de grupos metilo), indica un incremento de reacciones de metilación, importante en los procesos de replicación celular, reacciones de detoxificación en el hígado o de protección contra el daño hepático. También vemos elevado, además, tanto el glutatión como el ácido ascórbico (Tabla 21), ambos con propiedades antioxidantes, lo que nos lleva a pensar que el tejido hepático está sufriendo procesos de estrés oxidativo<sup>342,343</sup>.

Por otro lado, en el tejido tumoral, los niveles de aminoácidos como el aspartato, leucina/isoleucina, valina, alanina, glicina, lisina,...están elevados respecto al tejido hepático de ratas sanas, lo que tiene relación con las altas tasas de proliferación de las células tumorales, para lo que son necesarios éstos aminoácidos<sup>344,345</sup>. Además, en general, las rutas metabólicas implicadas en la obtención de energía también se encuentran alteradas en los procesos relacionados con el cáncer<sup>346</sup>: glicólisis<sup>347,348</sup>, biogénesis mitocondrial<sup>349</sup>, glutaminólisis<sup>348</sup>, etc, hecho que concuerda con la detección de niveles elevados de metabolitos implicados en estas rutas: glucosa, glutamina, piruvato, citrato, compuestos N-acetilados, etc. Es especialmente conocido el *Efecto Warburg* o incremento de la ruta de la glicólisis en las células tumorales; tradicionalmente se pensaba la vía de la glicólisis era empleada para proveer de energía a las células tumorales<sup>346</sup>, pero, sin embargo, cada vez hay más pruebas de que la glicólisis es una adaptación a las condiciones de hipoxia de las células tumorales y que la glicólisis confiere una importante ventaja de crecimiento al producir los metabolitos necesarios para el crecimiento de las células cancerígenas<sup>296</sup>.

Al analizar el tejido hepático del conjunto de grupos experimentales (Figura 142), lo que vemos en nuestro modelo, debido a las diferentes alteraciones que ocurren en el perfil metabólico de cada grupo, es que tenemos 2 patrones de daño en el metabolismo hepático de las ratas (se generan 3 clústeres, pero uno de ellos engloba a los animales control, con lo cual asumimos que es el patrón basal).

No es arriesgado asumir que, uno de dichos clústeres, podemos asociarlo al daño o estrés quirúrgico debido al procedimiento de administración del magnetofluido, puesto que en él se enclavan las muestras del tejido hepático de animales en los que se simuló la operación de infusión de NpM-RGD. Por el contrario, el clúster situado a la izquierda de la figura, podemos relacionarlo, por el mismo argumento, al daño tisular y metabólico generado por las exposición al IRF, ya que engloba a los animales que sufrieron HTM, además de poder haber experimentado otros procedimientos. Desgraciadamente, estas aseveraciones no podemos afirmarlas al 100% debido a la total ausencia de trabajos, salvo los de nuestro propio Grupo, en los que se haya empleado la metabolómica para determinar experimentalmente el daño fisiológico como consecuencia de la exposición a HTM.

Algo que si es posible extraer de nuestras experiencias es que la terapia de HTM, al menos bajo las condiciones experimentales que aquí han quedado descritas, no genera daños crónicos o irreversibles en el metabolismo de los animales empleados. Tras un periodo postoperatorio o post-terapéutico de 10 días, los animales vuelven a presentar un perfil metabólico hepático similar al basal (Figura 142), lo que constituye un claro indicio de una recuperación de la función hepática.

Un claro ejemplo en éste sentido es el L:P, la elevación de los niveles de lactato o de su proporción respecto al piruvato es un marcador del daño hepático, principalmente el daño hepático agudo<sup>350-352</sup>. En los grupos analizados en las 12 horas siguientes al último procedimiento éste ratio se encuentra altamente elevado, siendo 6 veces mayor respecto al tejido hepático sano, o 3 veces respecto al tejido hepático de ratas portadoras de tumores. Puesto que L:P refleja directamente el estado o no de equilibrio entre el producto y el sustrato de la reacción catalizada por el enzima LDH e indirectamente el

---

ratio NADH:NAD<sup>+</sup>, sabemos que el estado rédox del citoplasma de las células hepáticas está alterado, habiendo un exceso de equivalentes reducidos (NADH>>NAD<sup>+</sup>)<sup>353</sup>.

Los clústeres o patrones de respuesta metabólica que hemos observado en función de los diferentes procedimientos pudieron ser reafirmados con los resultados obtenidos a partir del análisis de los niveles séricos de la mayoría de enzimas analizadas (Figuras 132 – 138).

De las siete moléculas analizadas en el plasma sanguíneo, únicamente la creatinina (Figura 138), producto de la degradación de creatina en el metabolismo basal del tejido muscular, no presentó alteraciones en ninguno de los grupos experimentales, ni tampoco respecto a los valores de referencia descritos en la bibliografía consultada al respecto, 0,4-1,5 mg/dl<sup>354,355</sup>, lo cual nos indica que la exposición a HTM y el procedimiento quirúrgico al que son sometidos los animales, no ocasiona lisis del tejido muscular o alteraciones en su metabolismo.

En todas nuestras experiencias, la media de los niveles séricos de CK, medidos 12 horas después del procedimiento, estaban por encima de las 150 UI/L aceptadas como límite superior (rango de normalidad 50-150 UI/L<sup>355</sup>). Ahora bien, ésta elevación solo alcanza diferencias estadísticamente significativas frente a nuestro grupo control en el caso de los animales sometidos a HMT con NpM-RGD y analizados a las 12 horas.

En el caso de la amilasa, todos los grupos presentan valores medios inferiores a nuestro control (2361 ± 152 UI/L), siendo significativamente estadísticos solo en los grupos analizados a los 10 días. Sin embargo, basándonos en el rango consultado en bibliografía publicada (1300-2200 UI/L<sup>356</sup>) la práctica totalidad de los valores obtenidos se sitúan dentro de ese rango, no pudiendo constatar un fallo o mal funcionamiento pancreático.

Los niveles séricos de LDH en las primeras 12 horas evidencian un hecho que ya habíamos constatado con los análisis metabolómicos, vimos como hay un desbalance en el L:P. La enzima LDH es la encargada de catalizar la reacción de conversión de lactato a piruvato, y viceversa, mediante la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup>, y así mantener un

ratio adecuado de L:P y un óptimo estado rédox del citoplasma. Es lógico pensar que ante una descompensación L:P ocurra un exceso de actividad por parte de la LDH y ésta sea detectada en los análisis séricos<sup>352,353</sup>.

Por su parte, en nuestros resultados encontramos que los niveles de ALP, enzima ubicua que puede ser indicador tanto de enfermedades o alteraciones hepáticas, como óseas u otras mas<sup>357</sup>, permanecían dentro de los rangos publicados (82-164 UI/L<sup>358</sup>). Pero a pesar de ello, dentro de nuestras series experimentales, los niveles analizados 10 días después del último procedimiento, presentaban valores disminuidos respecto a nuestros propios controles. Para este descenso no encontramos ninguna explicación plausible, ya que lo referenciado en la bibliografía para los descensos moderados en los niveles de ALP se corresponden con supuestos que no se adecuan en nuestro planteamiento experimental: tratamiento con estrógenos en mujeres con osteoporosis, niños con acondroplasia, tras cirugías cardiacas, hipotiroidismo, leucemia mieloide crónica, enfermedad de Wilson, tratamiento con anticonceptivos, etc<sup>359,360</sup>.

Por último, pero no menos importante, las dos enzimas predominantemente “hepáticas”, la AST (o GOT) y ALT (o GPT), describen el mismo comportamiento aunque en distinta magnitud. Es cierto que ambas aparecen elevadas en los grupos analizados 12 horas después del último procedimiento, pero la elevación de la AST es casi 3 veces mayor, de media, que la ALT. Podemos encontrar una explicación sencilla a este fenómeno atendiendo a la “especificidad” de ambas enzimas. Si bien ambos se describen como enzimas hepáticos<sup>361</sup>, únicamente la ALT merece ese calificativo, pues los estudios nos demuestran que está en elevadas dosis en el hígado y apenas detectable en el resto del organismo. No así la AST que puede ubicarse por igual en el hígado, miocardio, músculo esquelético, riñón o cerebro<sup>355</sup>. Por lo tanto, el incremento en los niveles séricos de la ALT es atribuible únicamente a un daño agudo en el hígado como consecuencia de la realización de alguno de los procedimientos necesarios, o de la combinación de ambos. Sin embargo, el marcado aumento de la AST puede achacarse indistintamente a algún tipo de estrés o daño en cualquiera de los tejidos comentados anteriormente (hígado, miocardio, músculo esquelético, riñón o cerebro) sin que

---

tengamos la capacidad de esclarecer cuál o cuáles de ellas resultan afectadas en mayor medida en el momento posterior al procedimientos. Aunque sin duda, lo importante de éstos resultados, es que, al igual que ocurre con el resto de enzimas, moléculas o metabolitos, los niveles a los 10 días acaban normalizándose o igualándose a los valores basales.



# CONCLUSIONES





A la vista de los resultados obtenidos y presentados en este trabajo de Tesis Doctoral, es posible establecer las siguientes conclusiones:

A. Desde un enfoque técnico y de procedimientos:

- La cateterización de la arteria hepática, a través de un acceso vía arteria esplénica, es un abordaje exitoso y reproducible para la administración de un magnetofluido para el tratamiento de las MHCCR.
- El perfil metabólico del tejido hepático y la determinación enzimática en el plasma sanguíneo, son herramientas útiles para monitorizar los cambios fisiológicos ocurridos durante el proceso experimental en los animales portadores de MHCCR.
- La correlación existente entre el volumen tumoral, evaluado por ecografía, y la necrosis tumoral, determinada por análisis anatomopatológico, permite desarrollar un modelo de regresión para predecir la necrosis esperada debida al tamaño de los focos tumorales.
- En nuestro modelo experimental, los procedimientos realizados para inducir HTM no generan daños a medio-largo plazo en el organismo de los animales y permite reducir la proliferación de las células tumorales de la línea tumoral de adenocarcinoma de colon CC-531

B. Desde un punto de vista terapéutico:

- Las NpM de óxido de hierro (III), sintetizadas por el método de descomposición térmica de precursores metal-orgánicos y vehiculizadas en una solución de PBS 1:10, han demostrado ser seguras y biocompatibles tras su administración intrarterial en un modelo experimental murino.
- La funcionalización de dichas NpM con peptidomiméticos con la secuencia RGD permite dotarlas de selectividad por el tejido tumoral.
- Infundidas en el organismo, las NpM-RGD tienen una distribución limitada exclusivamente al territorio hepático. Sin embargo, no resultan de utilidad como agente selectivo de contraste en IRM, ya que la captación de NpM-RGD por parte de las células del SFM del hígado, artefacta la imagen.
- La aplicación de un campo magnético sobre implantes tumorales con NpM-RGD consigue un incremento térmico suficiente para inducir, al menos, un 20% de necrosis en el tejido tumoral, sin afectar al tejido hepático sano.

# BIBLIOGRAFÍA



1. IARC. Globocan 2012 - Home.
2. OECD/EU. *Health at a Glance: Europe 2016– State of Health in the EU Cycle*. Paris; 2016. doi:10.1787/9789264012639-en.
3. Eurostat. Still 1 in 4 deaths caused by cancer in the EU. *Newsrelease*. 2016.
4. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Las Cifras del Cáncer en España 2014. *Ann Oncol*. 2014. doi:10.1016/j.acuro.2011.09.003.
5. Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ Br Med J*. 2000;321(7264):805. doi:10.1002/bjs.1800581022.
6. Jackson-Thompson J, Ahmed F, German RR, Lai S-M, Friedman C. Descriptive epidemiology of colorectal cancer in the United States, 1998-2001. *Cancer*. 2006;107(SUPPL.):1103-1111. doi:10.1002/cncr.22007.
7. Jeter JM, Kohlmann W, Gruber SB. Genetics of Colorectal Cancer. *Oncology*. 2006;20(3):269-276.
8. Schafmayer C, Buch S, Egberts JH, et al. Genetic investigation of DNA-repair pathway genes PMS2, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, OGG1 and MTH1 in sporadic colon cancer. *Int J Cancer*. 2007;121(3):555-558. doi:10.1002/ijc.22735.
9. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, et al. Lower cancer incidence in amsterdam-i criteria families without mismatch repair deficiency: Familial colorectal cancer type x. *JAMA*. 2005;293(16):1979-1985.
10. Wilmink AB. Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1997;40(4):483-493.
11. Waller A, Findeis S, Lee MJ. Familial adenomatous polyposis. *J Pediatr Genet*. 2016;5:78-83. doi:10.1016/j.bpg.2009.02.010.
12. Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, Attard T. Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam Cancer*. 2008;7(1):27-39. doi:10.1007/s10689-007-9165-5.
13. O'Connell JB, Maggard MA, Livingston EH, Yo CK. Colorectal cancer in the young. *Am J Surg*. 2004;187(3):343-348. doi:10.1016/j.amjsurg.2003.12.020.
14. Bacon HE, Sealy WB. Malignancy of the anus, rectum and sigmoid colon in the young. *Am J Surg*. 1939;45(2):339-347. doi:10.1016/S0002-9610(39)90426-5.
15. Atkin WS, Northover JMA, Cuzick J, Whynes DK. Prevention of colorectal cancer by once-only sigmoidoscopy. *Lancet*. 1993;341(8847):736-740. doi:10.1016/0140-6736(93)90499-7.
16. Haggard FA, Boushey RP. Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival and Risk Factors. *Clin Colon Rectal Surg*. 2009;6(212):191-197. doi:10.1055/s-0029-1242458.
17. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-1403. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027.

18. Lichtenstein P, Holm N V, Verkasalo PK, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer. *N Engl J Med*. 2000;343(3):78-85.
19. Boardman LA, Morlan BW, Rabe KG, et al. Colorectal Cancer Risks in Relatives of Young-Onset Cases: Is Risk the Same Across All First-Degree Relatives? *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5(10):1195-1198. doi:10.1016/j.cgh.2007.06.001.
20. Desai D, Desai N. Colorectal cancer surveillance in inflammatory bowel disease: A critical analysis. *World J Gastrointest Endosc*. 2014;6(11):541-548. doi:10.4253/wjge.v6.i11.541.
21. Freeman HJ. Colorectal cancer risk in Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14(12):1810-1811. doi:10.3748/wjg.14.1810.
22. Dias SC, Ribeiro LE. Crohn's disease: risk factor for colorectal cancer. *J Coloproctology*. 2017;37(1):55-62. doi:10.1016/j.jcol.2016.06.005.
23. Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: Colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;23(8):1097-1104. doi:10.1111/j.1365-2036.2006.02854.x.
24. Conteduca V, Sansonno D, Russi S, Dammacco F. Precancerous colorectal lesions (Review). *Int J Oncol*. 2013;43(4):973-984. doi:10.3892/ijo.2013.2041.
25. Brenner H, Hoffmeister M, Stegmaier C, Brenner G, Altenhofen L, Haug U. Risk of progression of advanced adenomas to colorectal cancer by age and sex: estimates based on 840,149 screening colonoscopies. *Gut*. 2007;56(11):1585-1589. doi:10.1136/gut.2007.122739.
26. Zisman AL, Nickolov A, Brand RE, Gorchow A, Roy HK. Associations Between the Age at Diagnosis and Location of Colorectal Cancer and the Use of Alcohol and Tobacco. *Arch Intern Med*. 2006;166(6):629. doi:10.1001/archinte.166.6.629.
27. Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G. A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer*. 2001;85(11):1700-1705. doi:10.1054/bjoc.2001.2140.
28. Hou N, Huo D, Dignam JJ. Prevention of colorectal cancer and dietary management. *Chinese Clin Oncol*. 2013;2(2):13. doi:10.3978/j.issn.2304-3865.2013.04.03.
29. Scong M, Garrett WS, Chan AT. Nutrients, Foods, and Colorectal Cancer Prevention. *Gastroenterology*. 2015;148(6):1244-1260. doi:10.1053/j.gastro.2014.12.035.Nutrients.
30. Yao Y, Suo T, Andersson R, et al. Dietary fibre for the prevention of colorectal adenomas and carcinomas. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;(1-84). doi:10.1002/14651858.CD003430.pub2.
31. Enger SM, Longnecker MP, Chen M-J, et al. Dietary Intake of Specific Prevalence Carotenoids and Vitamins of Colorectal Adenomas ' A , C , and E , and. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996;5:147-153.
32. Männistö S, Yaun S-S, Hunter DJ, et al. Dietary carotenoids and risk of colorectal cancer in a pooled analysis of 11 cohort studies. *Am J Epidemiol*.

- 2007;165(3):246-255. doi:10.1093/aje/kwk009.
33. English DR, MacInnis RJ, Hodge AM, Hopper JL, Haydon AM, Giles GG. Red Meat, Chicken, and Fish Consumption and Risk of Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(9):1509-1514.
  34. Cross AJ, Ferrucci LM, Risch A, et al. A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: An investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Res.* 2010;70(6):2406-2414. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3929.
  35. Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier A-M. Epidemiology and Management of Liver Metastases From Colorectal Cancer. *Ann Surg.* 2006;244(2):254-259. doi:10.1097/01.sla.0000217629.94941.cf.
  36. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009;59(4):225-249. doi:10.3322/caac.20006.Available.
  37. Bengmark S, Hafström L. The natural history of primary and secondary malignant tumors of the liver. I. The prognosis for patients with hepatic metastases from colonic and rectal carcinoma by laparotomy. *Cancer.* 1969;23(1):198-202.
  38. Stangl R, Altendorf-Hofmann A, Charnley RM, Scheele J. Factors influencing the natural history of colorectal liver metastases. *Lancet.* 1994;343:1405-1410. doi:10.1016/S0140-6736(94)92529-1.
  39. Wang X, Hershman DL, Abrams JA, et al. Predictors of survival after hepatic resection among patients with colorectal liver metastasis. *Br J Cancer.* 2007;97(12):1606-1612. doi:10.1038/sj.bjc.6604093.
  40. Couinaud CL foie. *Études anatomiques et chirurgicales.* Paris: Masson; 1957.
  41. Skandalakis JE, Skandalakis LJ, Skandalakis PN, Mirilas P. Hepatic surgical anatomy. *Surg Clin North Am.* 2004;84(2):413-435. doi:10.1016/j.suc.2003.12.002.
  42. Minagawa M, Makuuchi M, Torzilli G, et al. Extension of the Frontiers of Surgical Indications in the Treatment of Liver Metastases From Colorectal Cancer: Long-Term Results. *Ann Surg.* 2000;231(4):487-499.
  43. Scheele J, Altendorf-Hofmann A. Resection of colorectal liver metastases. *Cancer Control.* 2006;13(1):32-41. doi:93840313.423 [pii].
  44. Garden OJ, Rees M, Poston GJ, et al. Guidelines for resection of colorectal cancer liver metastases. *Gut.* 2006;55(Suppl 3):1-8. doi:10.1136/gut.2006.098053.
  45. Kanas GP, Taylor A, Primrose JN, et al. Survival after liver resection in metastatic colorectal cancer: review and meta-analysis of prognostic factors. *Clin Epidemiol.* 2012;4:283-301. doi:10.2147/CLEP.S34285.
  46. Wong J, Cooper A. Local ablation for solid tumor liver metastases: Techniques and treatment efficacy. *Cancer Control.* 2016;23(1):30-35.
  47. Mayo SC, Pawlik TM. Thermal ablative therapies for secondary hepatic

- malignancies. *Cancer J.* 2010;16(2):111-117. doi:10.1097/PPO.0b013e3181d7ea07.
48. Labori KJ, Schulz A, Drolsum A, Guren MG, Kløw NE, Bjørnbeth BA. Radiofrequency ablation of unresectable colorectal liver metastases: trends in management and outcome during a decade at a single center. *Acta Radiol Open.* 2015;4(7):2058460115580877. doi:10.1177/2058460115580877.
  49. Gillams AR. Liver ablation therapy. *Br J Radiol.* 2004;77(921):713-723. doi:10.1259/bjr/86761907.
  50. Fonseca AZ, Santin S, Gomes LGL, Waisberg J, Ribeiro Jr. MAF. Complications of radiofrequency ablation of hepatic tumors: Frequency and risk factors. *World J Hepatol.* 2014;6(3):107-113. doi:10.4254/wjh.v6.i3.107.
  51. Mulier S, Mulier P, Ni Y, et al. Complications of radiofrequency coagulation of liver tumours. *Br J Surg.* 2002;89(10):1206-1222. doi:10.1046/j.1365-2168.2002.02168.x.
  52. White RR, Avital I, Sofocleous CT, et al. Rates and Patterns of Recurrence for Percutaneous Radiofrequency Ablation and Open Wedge Resection for Solitary Colorectal Liver Metastasis. *J Gastrointest Surg.* 2007;11(3):256-263. doi:10.1007/s11605-007-0100-8.
  53. Adam R, Hagopian EJ, Linhares M, et al. A comparison of percutaneous cryosurgery and percutaneous radiofrequency for unresectable hepatic malignancies. *Arch Surg.* 2002;137(12):1332-1339.
  54. Solbiati L, Ierace T, Tonolini M, Osti V, Cova L. Radiofrequency thermal ablation of hepatic metastases. *Eur J Ultrasound.* 2001;13(2):149-158. doi:10.1016/S0929-8266(01)00127-6.
  55. Minami Y, Kudo M. Radiofrequency Ablation of Liver Metastases from Colorectal Cancer: A Literature Review. *Gut Liver.* 2013;7(1):1-6. doi:10.5009/gnl.2013.7.1.1.
  56. Rubinsky B. Cryosurgery. *Annu Rev Biomed Eng.* 2000;2(1):157-187. doi:10.1146/annurev.bioeng.2.1.157.
  57. Niu L, Zhou L, Xu K, Mu F. Cryosurgery for colorectal liver metastases. *Ann Palliat Med.* 2013;2(3):130-140. doi:10.3978/j.issn.2224-5820.2013.04.01.
  58. Mala T, Edwin B, Tillung T, Kristian Hol P, Søreide O, Gladhaug I. Percutaneous cryoablation of colorectal liver metastases: potentiated by two consecutive freeze-thaw cycles. *Cryobiology.* 2003;46(1):99-102. doi:10.1016/S0011-2240(02)00163-3.
  59. Mala T, Samset E, Aurdal L, Gladhaug I, Edwin B, Søreide O. Magnetic Resonance Imaging-Estimated Three-Dimensional Temperature Distribution in Liver Cryolesions: A Study of Cryolesion Characteristics Assumed Necessary for Tumor Ablation. *Cryobiology.* 2001;43(3):268-275. doi:10.1006/cryo.2001.2351.
  60. Loffroy R, Estivalet L, Favelier S, et al. Interventional radiology therapies for liver cancer. *Hepatoma Res.* 2016;2(1).
  61. Vogl TJ, Farshid P, Naguib NNN, et al. Thermal ablation of liver metastases



- from colorectal cancer: radiofrequency, microwave and laser ablation therapies. *Radiol Med.* 2014;119(7):451-461. doi:10.1007/s11547-014-0415-y.
62. Vogl TJ, Dommermuth A, Heinle B, et al. Colorectal Cancer Liver Metastases: Long-Term Survival and Progression-Free Survival After Thermal Ablation Using Magnetic Resonance-Guided Laser-Induced Interstitial Thermoablation in 594 Patients: Analysis of Prognostic Factors. *Invest Radiol.* 2014;49(1).
  63. Bertot LC, Sato M, Tateishi R, Yoshida H, Koike K. Mortality and complication rates of percutaneous ablative techniques for the treatment of liver tumors: a systematic review. *Eur Radiol.* 2011;21(12):2584-2596. doi:10.1007/s00330-011-2222-3.
  64. Meyer J, Toomay S. Update on Treatment of Liver Metastases: Focus on Ablation Therapies. *Curr Oncol Rep.* 2014;17(1):420. doi:10.1007/s11912-014-0420-2.
  65. Rubinsky B, Onik G, Mikus P. Irreversible Electroporation: A New Ablation Modality — Clinical Implications. *Technol Cancer Res Treat.* 2007;6(1):37-48. doi:10.1177/153303460700600106.
  66. Weaver JC. Electroporation of cells and tissues. *IEEE Trans Plasma Sci.* 2000;28(1):24-33. doi:10.1109/27.842820.
  67. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1982;1(7):841-845.
  68. Gehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand.* 2003;177(4):437-447. doi:10.1046/j.1365-201X.2003.01093.x.
  69. Larkin JO, Collins CG, Aarons S, et al. Electrochemotherapy: Aspects of Preclinical Development and Early Clinical Experience. *Ann Surg.* 2007;245(3):469-479. doi:10.1097/01.sla.0000250419.36053.33.
  70. Zhou W, Xiong Z, Liu Y, Yao C, Li C. Low voltage irreversible electroporation induced apoptosis in HeLa cells. *J Cancer Res Ther.* 2012;8(1):80-85. doi:10.4103/0973-1482.95179.
  71. Maor E, Ivorra A, Leor J, Rubinsky B. The Effect of Irreversible Electroporation on Blood Vessels. *Technol Cancer Res Treat.* 2007;6(4):307-312. doi:10.1177/153303460700600407.
  72. Lee EW, Wong D, Tafti BA, et al. Irreversible Electroporation in Eradication of Rabbit VX2 Liver Tumor. *J Vasc Interv Radiol.* 2012;23(6):833-840. doi:10.1016/j.jvir.2012.02.017.
  73. Kingham TP, Karkar AM, D'Angelica MI, et al. Ablation of perivascular hepatic malignant tumors with irreversible electroporation. *J Am Coll Surg.* 2012;215(3):379-387. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2012.04.029.
  74. Cannon R, Ellis S, Hayes D, Narayanan G, Martin RCG. Safety and early efficacy of irreversible electroporation for hepatic tumors in proximity to vital structures. *J Surg Oncol.* 2013;107(5):544-549. doi:10.1002/jso.23280.

75. Simon CJ, Dupuy DE, Mayo-Smith WW. Microwave ablation: principles and applications. *Radiographics*. 2005;25(Suppl 1):S69-83. doi:10.1148/rg.25si055501.
76. Shibata T, Niinobu T, Ogata N, Takami M. Microwave coagulation therapy for multiple hepatic metastases from colorectal carcinoma. *Cancer*. 2000;89(2):276-284. doi:10.1002/1097-0142(20000715)89:2<276::AID-CNCR11>3.0.CO;2-0 [pii].
77. Taylor I, Bennett R, Sherriff S. The blood supply of colorectal liver metastases. *Br J Cancer*. 1978;38(6):749-756.
78. Tam K, Leung K, Wang Y. Chemoembolization agents for cancer treatment. *Eur J Pharm Sci*. 2011;44(September (1-2)):1-10.
79. Dumortier J, Chapuis F, Borson O, et al. Unresectable hepatocellular carcinoma: Survival and prognostic factors after lipiodol chemoembolisation in 89 patients. *Dig Liver Dis*. enero 2006. doi:10.1016/j.dld.2005.10.025.
80. Revel-Mouroz P, Otal P, Jaffro M, et al. Other non-surgical treatments for liver cancer. *Reports Pract Oncol Radiother*. 2017;22(2):181-192. doi:10.1016/j.rpor.2017.02.007.
81. Tang Y, Taylor RR, Gonzalez MV, Lewis AL, Stratford PW. Evaluation of irinotecan drug-eluting beads: A new drug-device combination product for the chemoembolization of hepatic metastases. *J Control Release*. 2006;116(2):e55-e56. doi:10.1016/j.jconrel.2006.09.047.
82. Fiorentini G, Aliberti C, Turrisi G, et al. Intraarterial hepatic chemoembolization of liver metastases from colorectal cancer adopting irinotecan-eluting beads: results of a phase II clinical study. *In Vivo (Brooklyn)*. 2007;21(6):1085-1091.
83. Aliberti C, Tilli M, Benea G, Fiorentini G. Trans-arterial chemoembolization (TACE) of liver metastases from colorectal cancer using irinotecan-eluting beads: preliminary results. *Anticancer Res*. 2006;26(5B):3793-3795.
84. Martin RCG, Joshi J, Robbins K, Tomalty D, O'Hara R, Tatum C. Transarterial Chemoembolization of Metastatic Colorectal Carcinoma with Drug-Eluting Beads, Irinotecan (DEBIRI): Multi-Institutional Registry. *J Oncol*. 2009;2009:539795. doi:10.1155/2009/539795.
85. Iezzi R, Marsico VA, Guerra A, et al. Trans-Arterial Chemoembolization with Irinotecan-Loaded Drug-Eluting Beads (DEBIRI) and Capecitabine in Refractory Liver Prevalent Colorectal Metastases: A Phase II Single-Center Study. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2015;38(6):1523-1531. doi:10.1007/s00270-015-1080-9.
86. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2016;27(8):1386-1422.
87. Damm R, Seidensticker R, Ulrich G, et al. Y90 Radioembolization in chemo-refractory metastatic, liver dominant colorectal cancer patients: outcome assessment applying a predictive scoring system. *BMC Cancer*. 2016;16:509. doi:10.1186/s12885-016-2549-x.

88. Kennedy AS, Nutting C, Coldwell D, Gaiser J, Drachenberg C. Pathologic response and microdosimetry of 90Y microspheres in man: Review of four explanted whole livers. *Int J Radiat Oncol.* 2004;60(5):1552-1563. doi:10.1016/j.ijrobp.2004.09.004.
89. Zuckerman DS, Clark JW. Systemic therapy for metastatic colorectal cancer. *Cancer.* 2008;112(9):1879-1891. doi:10.1002/cncr.23409.
90. Hess GP, Wang PF, Quach D, Barber B, Zhao Z. Systemic Therapy for Metastatic Colorectal Cancer: Patterns of Chemotherapy and Biologic Therapy Use in US Medical Oncology Practice. *J Oncol Pract.* 2010;6(6):301-307. doi:10.1200/JOP.2010.000072.
91. Thirion P, Michiels S, Pignon JP, et al. Modulation of Fluorouracil by Leucovorin in Patients With Advanced Colorectal Cancer: An Updated Meta-Analysis. *J Clin Oncol.* 2004;22(18):3766-3775. doi:10.1200/JCO.2004.03.104.
92. Johnston PG, Kaye S. Capecitabine: a novel agent for the treatment of solid tumors. *Anticancer Drugs.* 2001;12(8):639-646. doi:10.1097/00001813-200109000-00001.
93. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(May):330-338. doi:10.1038/nrc1074.
94. Kane MA, Roth E, Raptis G, Schreiber C, Waxman S. Effect of Intracellular Folate Concentration on the Modulation of 5-Fluorouracil Cytotoxicity by the Elevation of Phosphoribosylpyrophosphate in Cultured Human KB Cells. *Cancer Res.* 1987;47(24 Part 1):6444 LP-6450.
95. Waxman S, Bruckner H. The enhancement of 5-fluorouracil antimetabolic activity by leucovorin, menadione and  $\alpha$ -tocopherol. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1982;18(7):685-692. doi:10.1016/0277-5379(82)90215-2.
96. Kelly H, Goldberg RM. Systemic Therapy for Metastatic Colorectal Cancer: Current Options, Current Evidence. *J Clin Oncol.* 2005;23(20):4553-4560. doi:10.1200/JCO.2005.17.749.
97. Saltz LB, Cox J V, Blanke C, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2000;343(13):905-914. doi:10.1016/S0140-6736(10)61183-X.
98. Ychou M, Hohenberger W, Thezenas S, et al. A randomized phase III study comparing adjuvant 5-fluorouracil/folinic acid with FOLFIRI in patients following complete resection of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2009;20(12):1964-1970.
99. Barone C, Nuzzo G, Cassano A, et al. Final analysis of colorectal cancer patients treated with irinotecan and 5-fluorouracil plus folinic acid neoadjuvant chemotherapy for unresectable liver metastases. *Br J Cancer.* 2007;97(8):1035-1039. doi:10.1038/sj.bjc.6603988.
100. Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, et al. A Randomized Controlled Trial of Fluorouracil Plus Leucovorin, Irinotecan, and Oxaliplatin Combinations in Patients With Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.*

- 2004;22(1):23-30. doi:10.1200/JCO.2004.09.046.
101. Kabbinavar FF, Hambleton J, Mass RD, Hurwitz HI, Bergsland E. Combined Analysis of Efficacy : The Addition of Bevacizumab to Fluorouracil / Leucovorin Improves Survival for Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(16):3706-3712. doi:10.1200/JCO.2005.00.232.
  102. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2004;350(23):2335-2342. doi:10.1056/NEJMoa032691.
  103. Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, et al. Bevacizumab in Combination With Oxaliplatin-Based Chemotherapy As First-Line Therapy in Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Phase III Study. *J Clin Oncol.* 2008;26(12):2013-2019. doi:10.1200/JCO.2007.14.9930.
  104. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1995;19:183-232.
  105. Lee JJ, Chu E. First-Line Use of Anti – Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2007;6(Suppl. 2):S42-S46. doi:10.3816/CCC.2007.s.001.
  106. Normanno N, Bianco C, De Luca A, Maiello MR, Salomon DS. Target-based agents against ErbB receptors and their ligands : a novel approach to cancer treatment. *Endocr Relat Cancer.* 2003;10:1-21.
  107. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer : signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer.* 2001;37:S3-8.
  108. Martinelli E, De Palma R, Orditura M, De Vita F, Ciardiello F. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clin Exp Immunol.* 2009;158:1-9. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03992.x.
  109. Harari PM, Allen GW, Bonner JA. Biology of Interactions: Antiepidermal Growth Factor Receptor Agents. *J Clin Oncol.* 2007;25(26):4057-4065. doi:10.1200/JCO.2007.11.8984.
  110. Ciardiello F, Tortora G. EGFR Antagonists in Cancer Treatment. *N Engl J Med.* 2008;358:1160-1174.
  111. Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, De Luca A, Van Cutsem E, Ciardiello F. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009;6:519-527. doi:10.1038/nrclinonc.2009.111.
  112. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II Trial of Cetuximab in Patients With Refractory Colorectal Cancer That Expresses the Epidermal Growth Factor Receptor. *J Clin Oncol.* 2004;22(7):1201-1208. doi:10.1200/JCO.2004.10.182.
  113. Lenz H-J, Van Cutsem E, Khambata-Ford S, et al. Multicenter Phase II and Translational Study of Cetuximab in Metastatic Colorectal Carcinoma Refractory to Irinotecan, Oxaliplatin, and Fluoropyrimidines. *J Clin Oncol.* 2006;24(30):4914-4921. doi:10.1200/JCO.2006.06.7595.

114. Douillard J-Y, Siena S, Cassidy J, et al. Randomized, Phase III Trial of Panitumumab With Infusional Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin (FOLFOX4) Versus FOLFOX4 Alone As First-Line Treatment in Patients With Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer: The PRIME Study. *J Clin Oncol*. 2010;28(31):4697-4705. doi:10.1200/JCO.2009.27.4860.
115. Ruers T, Van Coevorden F, Punt CJA, et al. Local Treatment of Unresectable Colorectal Liver Metastases: Results of a Randomized Phase II Trial. *J Natl Cancer Inst*. 2017;109(9):dix015. doi:10.1093/jnci/dix015.
116. Ranjan S, Dasgupta N, Chakraborty AR, et al. Nanoscience and nanotechnologies in food industries: opportunities and research trends. *J Nanoparticle Res*. 2014;16(6):2464. doi:10.1007/s11051-014-2464-5.
117. Danie Kingsley J, Ranjan S, Dasgupta N, Saha P. Nanotechnology for tissue engineering: Need, techniques and applications. *J Pharm Res*. 2013;7(2):200-204. doi:10.1016/j.jopr.2013.02.021.
118. Service RF. Biology Offers Nanotech's a Helping Hand. *Science (80- )*. 2002;298(5602):2322 LP-2323.
119. Boisseau P. Nanomedicine and Nanotechnology for Medicine. En: Lourtioz J-M, Lahmani M, Dupas-Haeberlin C, Hesto P, eds. *Nanosciences and Nanotechnology: Evolution or Revolution?*. Cham: Springer International Publishing; 2016:219-252. doi:10.1007/978-3-319-19360-1\_10.
120. Retif P, Pinel S, Toussaint M, et al. Nanoparticles for Radiation Therapy Enhancement: the Key Parameters. *Theranostics*. 2015;5(9):1030-1044. doi:10.7150/thno.11642.
121. Chen M-H, Hanagata N, Ikoma T, et al. Hafnium-doped hydroxyapatite nanoparticles with ionizing radiation for lung cancer treatment. *Acta Biomater*. 2016;37:165-173. doi:10.1016/j.actbio.2016.04.004.
122. Kwatra D, Venugopal A, Anant S. Nanoparticles in radiation therapy: a summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer. *Transl Cancer Res*. 2013;2(4):330-342. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2013.08.06.
123. Goldstein LS, Dewhirst MW, Repacholi M, Kheifets L. Summary, conclusions and recommendations: adverse temperature levels in the human body. *Int J Hyperth*. 2003;19(3):373-384. doi:10.1080/0265673031000090701.
124. Karino T, Koga S, Maeta M. Experimental studies of the effects of local hyperthermia on blood flow, oxygen pressure and pH in tumors. *Jpn J Surg*. 1988;18(3):276-283.
125. Gilchrist RK, Medal R, Shorey WD, Hanselman RC, Parrott JC, Taylor CB. Selective Inductive Heating of Lymph Nodes. *Ann Surg*. 1957;146(4):596-606.
126. Chen ZP, Zhang Y, Xia JG, Liu JW, Xu K, Gu N. Preparation and characterization of water-soluble monodisperse magnetic iron oxide nanoparticles via surface double-exchange with DMSA. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2008;316:210-216. doi:10.1016/j.colsurfa.2007.09.017.
127. Ding Y, Shen SZ, Sun H, et al. Design and construction of polymerized-chitosan coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles and its application for hydrophobic drug

- delivery. *Mater Sci Eng C*. 2015;48:487-498. doi:10.1016/j.msec.2014.12.036.
128. Zhao G, Wang J, Peng X, Li Y, Yuan X, Ma Y. Facile Solvothermal Synthesis of Mesostructured Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> /Chitosan Nanoparticles as Delivery Vehicles for pH-Responsive Drug Delivery and Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *Chem - An Asian J*. 2014;9(2):546-553. doi:10.1002/asia.201301072.
129. Sahu NK, Gupta J, Bahadur D. PEGylated FePt-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> composite nanoassemblies (CNAs): in vitro hyperthermia, drug delivery and generation of reactive oxygen species (ROS). *Dalt Trans*. 2015;44(19):9103-9113. doi:10.1039/c4dt03470h.
130. Gautier J, Munnier E, Paillard A, et al. A pharmaceutical study of doxorubicin-loaded PEGylated nanoparticles for magnetic drug targeting. *Int J Pharm*. 2012;423(1):16-25. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.06.010.
131. Iqbal MZ, Ma X, Chen T, et al. Silica-coated super-paramagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONPs): a new type contrast agent of T 1 magnetic resonance imaging (MRI). *J Mater Chem B*. 2015;3(26):5172-5181. doi:10.1039/C5TB00300H.
132. Ahmad T, Bae H, Rhee I, Chang Y, Jin S-U, Hong S. Gold-coated iron oxide nanoparticles as a T2 contrast agent in magnetic resonance imaging. *J Nanosci Nanotechnol*. 2012;12(7):5132-5137. doi:10.1166/jnn.2012.6368.
133. Faulk WP, Taylor GM. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*. 1971;8(11):1081-1083. doi:10.1016/0019-2791(71)90496-4.
134. Haun JB, Devaraj NK, Hilderbrand SA, Lee H, Weissleder R. Bioorthogonal chemistry amplifies nanoparticle binding and enhances the sensitivity of cell detection. *Nat Nanotechnol*. 2010;5(9):660-665. doi:10.1038/nnano.2010.148.
135. Giljohann DA, Mirkin CA. Drivers of biodiagnostic development. *Nature*. 2009;462(7272):461-464. doi:10.1038/nature08605.
136. Bhattacharyya S, Kudgus RA, Bhattacharya R, Mukherjee P. Inorganic Nanoparticles in Cancer Therapy. *Pharm Res*. 2011;28(2):237-259. doi:10.1007/s11095-010-0318-0.
137. Jain S, Hirst DG, O'Sullivan JM. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *Br J Radiol*. 2012;85(1010):101-113. doi:10.1259/bjr/59448833.
138. Sundar S, Prajapati VK. Drug targeting to infectious diseases by nanoparticles surface functionalized with special biomolecules. *Curr Med Chem*. 2012;19(19):3196-3202.
139. Zazo H, Colino CI, Lanao JM. Current applications of nanoparticles in infectious diseases. *J Control Release*. 2016;224:86-102. doi:10.1016/j.jconrel.2016.01.008.
140. Kesavan L, Tiruvalam R, Rahim MHA, et al. Solvent-Free Oxidation of Primary Carbon-Hydrogen Bonds in Toluene Using Au-Pd Alloy Nanoparticles. *Science (80- )*. 2011;331(6014):195 LP-199.
141. Ahmed BS, Rao AG, Sankarshan BM, et al. Evaluation of Gold, Silver and Silver-Gold (Bimetallic) Nanoparticles as Radiosensitizers for Radiation Therapy in Cancer Treatment. *Cancer Oncol Res*. 2016;4(3):42-51.

- doi:10.13189/cor.2016.040302.
142. Ghosh S, Nitnavare R, Dewle A, et al. Novel platinum–palladium bimetallic nanoparticles synthesized by *Dioscorea bulbifera*: anticancer and antioxidant activities. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:7477-7490. doi:10.2147/IJN.S91579.
  143. Hasany SF, Ahmed I, Rajan J, Rehman A. Systematic Review of the Preparation Techniques of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles. *Nanosci Nanotechnol*. 2013;2(6):148-158. doi:10.5923/j.nn.20120206.01.
  144. Huber DL. Synthesis, Properties, and Applications of Iron Nanoparticles. *Small*. 2005;1(5):482-501. doi:10.1002/sml.200500006.
  145. Roldan Cuenya B. Synthesis and catalytic properties of metal nanoparticles: Size, shape, support, composition, and oxidation state effects. *Thin Solid Films*. 2010;518(12):3127-3150. doi:10.1016/J.TSF.2010.01.018.
  146. Wu W, He Q, Jiang C. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Res Lett*. 2008;3(11):397-415. doi:10.1007/s11671-008-9174-9.
  147. Narayanan KB, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv Colloid Interface Sci*. 2010;156:1-13. doi:10.1016/J.CIS.2010.02.001.
  148. Park J, Joo J, Soon GK, Jang Y, Hyeon T. Synthesis of monodisperse spherical nanocrystals. *Angew Chemie - Int Ed*. 2007;46(25):4630-4660. doi:10.1002/anie.200603148.
  149. Redl FX, Black CT, Papaefthymiou GC, et al. Magnetic, Electronic, and Structural Characterization of Nonstoichiometric Iron Oxides at the Nanoscale. *J Am Chem Soc*. 2004;126(44):14583-14599. doi:10.1021/ja046808r.
  150. Sun S, Zeng H, Robinson DB, et al. Monodisperse MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = Fe, Co, Mn) Nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2004;126(1):273-279. doi:10.1021/ja0380852.
  151. Park J, An K, Hwang Y, et al. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nat Mater*. 2004;3(12):891-895.
  152. Jain TK, Reddy MK, Morales MA, Leslie-Pelecky DL, Labhasetwar V. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Mol Pharm*. 2008;5(2):316-327. doi:10.1021/mp7001285.
  153. Sheng-Nan S, Chao W, Zan-Zan Z, Yang-Long H, Venkatraman SS, Zhi-Chuan X. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications. *Chinese Phys B*. 2014;23(3):37503. doi:10.1088/1674-1056/23/3/037503.
  154. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005;26:3995-4021. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2004.10.012.
  155. Nickels M, Xie J, Cobb J, Gore JC, Pham W. Functionalization of iron oxide nanoparticles with a versatile epoxy amine linker. *J Mater Chem*. 2010;20(23):4776-4780. doi:10.1039/c0jm00808g.

156. Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(4):459-476. doi:10.1016/S0169-409X(02)00022-4.
157. Park J-H, von Maltzahn G, Zhang L, et al. Magnetic Iron Oxide Nanoworms for Tumor Targeting and Imaging. *Adv Mater.* 2008;20(9):1630-1635. doi:10.1002/adma.200800004.
158. Bolley J, Lalatonne Y, Haddad O, et al. Optimized multimodal nanoplatforms for targeting alpha-v beta-3 integrins. *Nanoscale.* 2013;5(23):11478-11489. doi:10.1039/C3NR03763K.
159. Reinmuth N, Liu W, Ahmad SA, et al.  $\alpha\beta 3$  Integrin Antagonist S247 Decreases Colon Cancer Metastasis and Angiogenesis and Improves Survival in Mice. *Cancer Res.* 2003;63(9):2079 LP-2087.
160. Danhier F, Le Breton A, Pr at V. RGD-Based Strategies To Target Alpha(v) Beta(3) Integrin in Cancer Therapy and Diagnosis. *Mol Pharm.* 2012;9(11):2961-2973. doi:10.1021/mp3002733.
161. Hodivala-Dilke KM, Reynolds AR, Reynolds LE. Integrins in angiogenesis: multitasking molecules in a balancing act. *Cell Tissue Res.* 2003;314(1):131-144. doi:10.1007/s00441-003-0774-5.
162. Byrne JD, Betancourt T, Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(15):1615-1626. doi:10.1016/j.addr.2008.08.005.
163. Levy M, Quarta A, Espinosa A, et al. Correlating Magneto-Structural Properties to Hyperthermia Performance of Highly Monodisperse Iron Oxide Nanoparticles Prepared by a Seeded-Growth Route. *Chem Mater.* 2011;23(18):4170-4180. doi:10.1021/cm201078f.
164. Teja AS, Koh P-Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Prog Cryst Growth Charact Mater.* 2009;55:22-45. doi:10.1016/J.PCRYSGROW.2008.08.003.
165. Patsula V, Moskvina M, Dutz S, Hor ak D. Size-dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *J Phys Chem Solids.* 2016;88:24-30. doi:10.1016/J.JPCS.2015.09.008.
166. Chatterjee J, Haik Y, Chen C-J. Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *J Magn Magn Mater.* 2003;257(1):113-118. doi:10.1016/S0304-8853(02)01066-1.
167. Jun Y, Huh Y-M, Choi J, et al. Nanoscale Size Effect of Magnetic Nanocrystals and Their Utilization for Cancer Diagnosis via Magnetic Resonance Imaging. *J Am Chem Soc.* 2005;127(16):5732-5733. doi:10.1021/ja0422155.
168. Motoyama J, Hakata T, Kato R, et al. Size dependent heat generation of magnetite nanoparticles under AC magnetic field for cancer therapy. *Biomagn Res Technol.* 2008;6:4. doi:10.1186/1477-044X-6-4.
169. Zhen G, Muir BW, Moffat BA, et al. Comparative Study of the Magnetic Behavior of Spherical and Cubic Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *J Phys Chem C.* 2011;115(2):327-334. doi:10.1021/jp104953z.



170. Noh S, Na W, Jang J, et al. Nanoscale Magnetism Control via Surface and Exchange Anisotropy for Optimized Ferrimagnetic Hysteresis. *Nano Lett.* 2012;12(7):3716-3721. doi:10.1021/nl301499u.
171. De Montferrand C, Hu L, Milosevic I, et al. Iron oxide nanoparticles with sizes, shapes and compositions resulting in different magnetization signatures as potential labels for multiparametric detection. *Acta Biomater.* 2013;9(4):6150-6157. doi:10.1016/j.actbio.2012.11.025.
172. Salazar-Alvarez G, Qin J, Šepelák V, et al. Cubic versus Spherical Magnetic Nanoparticles: The Role of Surface Anisotropy. *J Am Chem Soc.* 2008;130(40):13234-13239. doi:10.1021/ja0768744.
173. Song Q, Zhang ZJ. Shape Control and Associated Magnetic Properties of Spinel Cobalt Ferrite Nanocrystals. *J Am Chem Soc.* 2004;126(19):6164-6168. doi:10.1021/ja049931r.
174. Kolosnjaj-Tabi J, Di Corato R, Lartigue L, et al. Heat-Generating Iron Oxide Nanocubes: Subtle «Deconstructors» of the Tumoral Microenvironment. *ACS Nano.* 2014;8(5):4268-4283. doi:10.1021/nn405356r.
175. Attaluri A, Ma R, Qiu Y, Li W, Zhu L. Nanoparticle distribution and temperature elevations in prostatic tumours in mice during magnetic nanoparticle hyperthermia. *Int J Hyperth.* 2011;27(5):491-502. doi:10.3109/02656736.2011.584856.
176. Dutz S, Kettering M, Hilger I, Müller R, Zeisberger M. Magnetic multicore nanoparticles for hyperthermia—influence of particle immobilization in tumour tissue on magnetic properties. *Nanotechnology.* 2011;22(26):265102. doi:10.1088/0957-4484/22/26/265102.
177. Alphantéry E, Faure S, Seksek O, Guyot F, Chebbi I. Chains of Magnetosomes Extracted from AMB-1 Magnetotactic Bacteria for Application in Alternative Magnetic Field Cancer Therapy. *ACS Nano.* 2011;5(8):6279-6296. doi:10.1021/nn201290k.
178. Du Y, Zhang D, Liu H, Lai R. Thermochemotherapy effect of nanosized As(2)O(3)/Fe(3)O(4) complex on experimental mouse tumors and its influence on the expression of CD44v6, VEGF-C and MMP-9. *BMC Biotechnol.* 2009;9:84. doi:10.1186/1472-6750-9-84.
179. Johannsen M, Gneveckow U, Eckelt L, et al. Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: Presentation of a new interstitial technique. *Int J Hyperth.* 2005;21(7):637-647. doi:10.1080/02656730500158360.
180. Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R, et al. Intracranial Thermochemotherapy using Magnetic Nanoparticles Combined with External Beam Radiotherapy: Results of a Feasibility Study on Patients with Glioblastoma Multiforme. *J Neurooncol.* 2007;81(1):53-60. doi:10.1007/s11060-006-9195-0.
181. van Landeghem FKH, Maier-Hauff K, Jordan A, et al. Post-mortem studies in glioblastoma patients treated with thermochemotherapy using magnetic nanoparticles. *Biomaterials.* 2009;30(1):52-57. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.09.044.
182. Hilger I, Hergt R, Kaiser WA. Use of magnetic nanoparticle heating in the

- treatment of breast cancer. *IEE Proc Nanobiotechnology*. 2004;152(1):33-39. doi:10.1049/ip-nbt.
183. Tietze R, Jurgons R, Lyer S, et al. Quantification of drug-loaded magnetic nanoparticles in rabbit liver and tumor after in vivo administration. *J Magn Magn Mater*. 2009;321(10):1465-1468. doi:10.1016/J.JMMM.2009.02.068.
  184. Hilger I, Hiergeist R, Hergt R, Winnefeld K, Schubert H, Kaiser WA. Thermal ablation of tumors using magnetic nanoparticles: an in vivo feasibility study. *Invest Radiol*. 2002;37(10):580-586. doi:10.1097/01.RLI.0000028491.19254.EE.
  185. Balivada S, Rachakatla RS, Wang H, et al. AC magnetic hyperthermia of melanoma mediated by iron(0)/iron oxide core/shell magnetic nanoparticles : a mouse study. *BMC Cancer*. 2010;10:119. doi:10.1186/1471-2407-10-119.
  186. DeNardo SJ, DeNardo GL, Natarajan A, et al. Thermal dosimetry predictive of efficacy of <sup>111</sup>In-ChL6 nanoparticle AMF-induced thermoablative therapy for human breast cancer in mice. *J Nucl Med*. 2007;48(3):437-444.
  187. Shinkai M, Le B, Honda H, et al. Targeting hyperthermia for renal cell carcinoma using human MN antigen-specific magnetoliposomes. *Jpn J Cancer Res*. 2001;92(10):1138-1145. doi:10.1111/j.1349-7006.2001.tb01070.x.
  188. Samanta B, Yan H, Fischer NO, Shi J, Jerry DJ, Rotello VM. Protein-passivated Fe(3)O(4) nanoparticles: low toxicity and rapid heating for thermal therapy. *J Mater Chem*. 2008;18(11):1204-1208. doi:10.1039/b718745a.
  189. Hergt R, Dutz S. Magnetic particle hyperthermia-biophysical limitations of a visionary tumour therapy. *J Magn Magn Mater*. 2007;311(1 SPEC. ISS.):187-192. doi:10.1016/j.jmmm.2006.10.1156.
  190. Huang HS, Hainfeld JF. Intravenous magnetic nanoparticle cancer hyperthermia. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:2521-2532. doi:10.2147/IJN.S43770.
  191. 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(3):149-156. doi:10.1002/jso.10118.
  192. Yu H, Zhu G-Y, Xu R-Z, et al. Arterial Embolization Hyperthermia Using As(2)O(3) Nanoparticles in VX2 Carcinoma-Induced Liver Tumors. *PLoS One*. 2011;6(3):e17926. doi:10.1371/journal.pone.0017926.
  193. Sheu AY, Zhang Z, Omary RA, Larson AC. MRI-monitored transcatheter intraarterial delivery of SPIO-labeled natural killer cells to hepatocellular carcinoma: preclinical studies in a rodent model. *Invest Radiol*. 2013;48(6):492-499. doi:10.1097/RLI.0b013e31827994e5.
  194. Palomares T, Garcia-Alonso I, San Isidro R, Mendez J, Alonso-Varona A. All-trans-retinoic acid counteract the tumor-stimulating effect of hepatectomy and increases survival of rats bearing liver metastases. *J Surg Res*. 2014;188:146-151. doi:10.1016/j.jss.2013.12.020.
  195. Wilson JJ, Leveson SH, Trejdosiewicz LK, Southgate J. An in vitro model of colorectal liver metastases to study candidate factors which influence metastasizing cells. *Cancer Res*. 2014;65(9 Supplement):1335 LP-1335.

196. Abarbanell AM, Herrmann JL, Weil BR, et al. Animal Models of Myocardial and Vascular Injury. *J Surg Res.* 2010;162(2):239-249. doi:10.1016/j.jss.2009.06.021.
197. Robertson JHP, Sarkar S, Yang SY, Seifalian AM, Winslet MC. In vivo models for early development of colorectal liver metastasis. *Int J Exp Pathol.* 2008;89(1):1-12. doi:10.1111/j.1365-2613.2007.00562.x.
198. Hamada K, Monnai M, Kawai K, et al. Liver metastasis models of colon cancer for evaluation of drug efficacy using NOD / Shi- scid IL2R  $\gamma$  null ( NOG ) mice. *Int J Oncol.* 2008;32:153-159.
199. Arriortua OK, Garaio E, Herrero de la Parte B, et al. Antitumor magnetic hyperthermia induced by RGD-functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles, in an experimental model of colorectal liver metastases. *Beilstein J Nanotechnol.* 2016;7:1532-1542. doi:10.3762/bjnano.7.147.
200. Echevarria-Uraga JJ, García-Alonso Montoya I, Díaz Sanz I, et al. Caracterización ecográfica de un modelo experimental de metástasis hepáticas de carcinoma de colon. *Radiologia.* 2010;52(1):37-44. doi:10.1016/j.rx.2009.09.010.
201. Adamson RH, Thorgeirsson UP, Snyderwine EG, et al. Carcinogenicity of 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in Nonhuman Primates: Induction of Tumors in Three Macaques. *Japanese J Cancer Res.* 1990;81(1):10-14. doi:10.1111/j.1349-7006.1990.tb02500.x.
202. Parker SE, Vahlsing HL, Serfilippi LM, et al. Cancer Gene Therapy Using Plasmid DNA: Safety Evaluation in Rodents and Non-Human Primates. *Hum Gene Ther.* 1995;590:575-590. doi:https://doi.org/10.1089/hum.1995.6.5-575.
203. Khanna C, Lindblad-Toh K, Vail D, et al. The dog as a cancer model. *Nat Biotechnol.* 2006;24(9):1065-1066.
204. Vidi P-A, Bissell MJ, Lelièvre SA. Three-Dimensional Culture of Human Breast Epithelial Cells: The How and the Why. *Methods Mol Biol.* 2013;945:193-219. doi:10.1007/978-1-62703-125-7\_13.
205. Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson PC. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(7):512-522. doi:10.1038/nrc3080.
206. National Centre for the Replacement Refinement and Reduction of Animals in Research. The 3Rs. <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>. Accedido septiembre 22, 2017.
207. European Commission. *Directive 2010/63/EU of The European Parliament and of the Council of the European Union of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.* Bélgica; 2010:L 276/33-L 276/79. <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>.
208. Boletín Oficial del Estado. *Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.*; 2013:1-45. <http://www.boe.es/buscar/pdf/2013/BOE-A-2013-1337->

- consolidado.pdf.
209. Boletín Oficial del País Vasco. *Orden de 25 de junio de 1991, sobre protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos.*; 1991. <https://www.euskadi.eus/y22-bopv/es/bopv2/datos/1991/07/9102146a.pdf>.
  210. Strand DW, Franco OE, Basanta D, Anderson ARA, Hayward SW. Perspectives on Tissue Interactions in Development and Disease. *Curr Mol Med.* 2010;10(1):95-112.
  211. Kamińska K, Szczylik C, Bielecka ZF, et al. The role of the cell–cell interactions in cancer progression. *J Cell Mol Med.* 2015;19(2):283-296. doi:10.1111/jcmm.12408.
  212. Hillen F, Griffioen AW. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26(3-4):489-502. doi:10.1007/s10555-007-9094-7.
  213. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in Cancer. *Vasc Health Risk Manag.* 2006;2(3):213-219.
  214. Goubran HA, Kotb RR, Stakiw J, Emara ME, Burnouf T. Regulation of Tumor Growth and Metastasis: The Role of Tumor Microenvironment. *Cancer Growth Metastasis.* 2014;7:9-18. doi:10.4137/CGM.S11285.
  215. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene.* 2008;27:5904-5912. doi:<http://dx.doi.org/10.1038/onc.2008.271>.
  216. Langenau DM, Keefe MD, Storer NY, et al. Effects of RAS on the genesis of embryonal rhabdomyosarcoma. *Genes Dev.* 2007;21(11):1382-1395. doi:10.1101/gad.1545007.
  217. Langenau DM, Traver D, Ferrando AA, et al. Myc-Induced T Cell Leukemia in Transgenic Zebrafish. *Science (80- ).* 2003;299(5608):887 LP-890.
  218. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417(6892):949-954. doi:10.1038/nature00766.
  219. Marques IJ, Weiss FU, Vlecken DH, et al. Metastatic behaviour of primary human tumours in a zebrafish xenotransplantation model. *BMC Cancer.* 2009;9:128. doi:10.1186/1471-2407-9-128.
  220. European Commission. Seventh Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in the Member States of the European Union. 2013.
  221. Taketo MM, Edelmann W. Mouse Models of Colon Cancer. *Gastroenterology.* 2009;136(3):780-798. doi:10.1053/j.gastro.2008.12.049.
  222. Bakiri L, Wagner EF. Mouse models for liver cancer. *Mol Oncol.* 2013;7(2):206-223. doi:10.1016/j.molonc.2013.01.005.
  223. Zhang Y, Davis C, Ryan J, Janney C, Peña MMO. Development and Characterization of a Reliable Mouse Model of Colorectal Cancer Metastasis to the Liver. *Clin Exp Metastasis.* 2013;30(7):10.1007/s10585-013-9591-8.

- doi:10.1007/s10585-013-9591-8.
224. Evans JP, Sutton PA, Winiarski BK, et al. From mice to men: Murine models of colorectal cancer for use in translational research. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;98:94-105. doi:10.1016/j.critrevonc.2015.10.009.
  225. Giavazzi R, Jessup JM, Campbell DE, Walker SM, Fidler IJ. Experimental Nude Mouse Model of Human Colorectal Cancer Liver Metastases2. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 1986;77(6):1303-1308.
  226. Rashidi B, Gamagami R, Sasson A, et al. An Orthotopic Mouse Model of Remetastasis of Human Colon Cancer Liver Metastasis. *Clin Cancer Res*. 2000;6(6):2556 LP-2561.
  227. Fu X, Guadagni F, Hoffman RM. A metastatic nude-mouse model of human pancreatic cancer constructed orthotopically with histologically intact patient specimens. *Proc Natl Acad Sci*. 1992;89(12):5645-5649. doi:10.1073/pnas.89.12.5645.
  228. Tseng W, Leong X, Engleman E. Orthotopic Mouse Model of Colorectal Cancer. *J Vis Exp*. 2007;(10):484. doi:10.3791/484.
  229. Mittal VK, Bhullar JS, Jayant K. Animal models of human colorectal cancer: Current status, uses and limitations. *World J Gastroenterol*. 2015;21(41):11854-11861. doi:10.3748/wjg.v21.i41.11854.
  230. Moroz P, Pardoe H, Jones SK, St Pierre TG, Song S, Gray BN. Arterial embolization hyperthermia: hepatic iron particle distribution and its potential determination by magnetic resonance imaging. *Phys Med Biol*. 2002;47(9):1591-1602.
  231. Echevarria-Uraga JJ, García-Alonso I, Plazaola F, et al. Study of the intra-arterial distribution of Fe(3)O(4) nanoparticles in a model of colorectal neoplasm induced in rat liver by MRI and spectrometry. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:2399-2410. doi:10.2147/IJN.S31302.
  232. Marchal F, Tran N, Marchal S, et al. Development of an HT29 liver metastases model in nude rats. *Oncol Rep*. 2005;14(5):1203-1207. doi:10.3892/or.14.5.1203.
  233. Shirasaka T, Nakano K, Takechi T, et al. Antitumor Activity of 1 m Tegafur-0.4 m 5-Chloro-2,4-dihydropyridine-1 m Potassium Oxonate (S-1) against Human Colon Carcinoma Orthotopically Implanted into Nude Rats. *Cancer Res*. 1996;56(11):2602 LP-2606.
  234. Parvinian A, Casadaban LC, Gaba RC. Development, growth, propagation, and angiographic utilization of the rabbit VX2 model of liver cancer: a pictorial primer and «how to» guide. *Diagnostic Interv Radiol*. 2014;20(4):335-340. doi:10.5152/dir.2014.13415.
  235. Vali M, Vossen JA, Buijs M, et al. Targeting of VX2 Rabbit Liver Tumor by Selective Delivery of 3-Bromopyruvate: A Biodistribution and Survival Study. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;327(1):32-37. doi:10.1124/jpet.108.141093.
  236. Zhou Y, Gao J-B, Xu H, Dong J-Q, Wang M-Y. Evaluation of neovascularization with spectral computed tomography in a rabbit VX2 liver model: a comparison with real-time contrast-enhanced ultrasound and molecular

- biological findings. *Br J Radiol.* 2015;88(1055):20140548. doi:10.1259/bjr.20140548.
237. Lee K-H, Liapi E, Vossen JA, et al. 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(10):1490-1496. doi:10.1016/j.jvir.2008.06.008.
238. Prieto V, Ludwig JM, Farris AB, et al. Establishment of human metastatic colorectal cancer model in rabbit liver: A pilot study. Woloschak GE, ed. *PLoS One.* 2017;12(5):e0177212. doi:10.1371/journal.pone.0177212.
239. Song J, Yang D, Ruan J, Zhang J, Chen YE, Xu J. Production of immunodeficient rabbits by multiplex embryo transfer and multiplex gene targeting. *Sci Rep.* 2017;7(1):12202. doi:10.1038/s41598-017-12201-0.
240. Tokar EJ, Benbrahim-Tallaa L, Ward JM, Lunn R, Sams RL, Waalkes MP. Cancer in Experimental Animals Exposed to Arsenic and Arsenic Compounds. *Crit Rev Toxicol.* 2010;40(10):912-927. doi:10.3109/10408444.2010.506641.
241. Waalkes MP, Ward JM, Diwan BA. Induction of tumors of the liver, lung, ovary and adrenal in adult mice after brief maternal gestational exposure to inorganic arsenic: promotional effects of postnatal phorbol ester exposure on hepatic and pulmonary, but not dermal cancers. *Carcinogenesis.* 2004;25(1):133-141.
242. Shen J, Wanibuchi H, Salim EI, et al. Liver tumorigenicity of trimethylarsine oxide in male Fischer 344 rats—association with oxidative DNA damage and enhanced cell proliferation. *Carcinogenesis.* 2003;24(11):1827-1835. doi:10.1093/carcin/bgg143.
243. Colussi C, Fiumicino S, Giuliani A, et al. 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Colon Carcinoma and Lymphoma in *msh2*<sup>-/-</sup> Mice. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(20):1534-1540. doi:10.1093/jnci/93.20.1534.
244. Karaca O, Ertekin T, Canoz O, Ulger H, Soysal H, Kus I. Effect of endostatin on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumor in mice. *Toxicol Ind Health.* 2011;28(1):21-26. doi:10.1177/0748233711401265.
245. Salim AS. Pilot Study on Alcohol-Induced Chemonecrosis of Hepatic Metastases From Colonic Cancer. *HPB Surg.* 1993;7(1):33-41. doi:10.1155/1993/45467.
246. Chen G, Dai Z-K, Liang R-G, et al. Characterization of diethylnitrosamine-induced liver carcinogenesis in Syrian golden hamsters. *Exp Ther Med.* 2012;3(2):285-292. doi:10.3892/etm.2011.406.
247. Papanikolaou A, Wang QS, Mulherkar R, Bolt A, Rosenberg DW. Expression analysis of the group IIA secretory phospholipase A(2) in mice with differential susceptibility to azoxymethane-induced colon tumorigenesis. *Carcinogenesis.* 2000;21(2):133-138. doi:10.1093/CARCIN/21.2.133.
248. Hoenerhoff MJ, Hong HH, Ton T-V, Lahousse SA, Sills RC. A Review of the Molecular Mechanisms of Chemically-Induced Neoplasia in Rat and Mouse Models in National Toxicology Program Bioassays and Their Relevance to Human Cancer. *Toxicol Pathol.* 2009;37(7):835-848.

- doi:10.1177/0192623309351726.
249. Hung KE, Maricevich MA, Richard LG, et al. Development of a mouse model for sporadic and metastatic colon tumors and its use in assessing drug treatment. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(4):1565-1570. doi:10.1073/pnas.0908682107.
  250. Richmond A, Su Y. Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Dis Model Mech.* 2008;1:78-82. doi:10.1242/dmm.000976.
  251. Firestone B. The challenge of selecting the «right» in vivo oncology pharmacology model. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10(4):391-396. doi:10.1016/j.coph.2010.06.012.
  252. Khanna C, Hunter K. Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis.* 2005;26(3):513-523. doi:10.1093/carcin/bgh261.
  253. Dranoff G. Experimental mouse tumour models: what can be learnt about human cancer immunology? *Nat Rev Immunol.* 2011;12(2012):3129. doi:10.1038/nri3129.
  254. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer.* 2006;118(12):3030-3044. doi:10.1002/ijc.21731.
  255. Chen C, HI Y, Su J, Al E. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis b virus dna level. *JAMA.* 2006;295(1):65-73.
  256. Price JC, Thio CL. Liver Disease in the HIV-Infected Individual. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2010;8(12):1002-1012. doi:10.1016/j.cgh.2010.08.024.
  257. Chiou S-H, Winters IP, Wang J, et al. Pancreatic cancer modeling using retrograde viral vector delivery and in vivo CRISPR/Cas9-mediated somatic genome editing. *Genes Dev.* 2015;29(14):1576-1585. doi:10.1101/gad.264861.115.
  258. Taniguchi H, Yamato E, Tashiro F, Ikegami H, Ogihara T, Miyazaki J. Beta-Cell Neogenesis Induced By Adenovirus-Mediated Gene Delivery of Transcription Factor Pdx-1 Into Mouse Pancreas. *Gene Ther.* 2003;10(1):15-23. doi:10.1038/sj.gt.3301846.
  259. Kirsch DG, Dinulescu DM, Miller JB, et al. A spatially and temporally restricted mouse model of soft tissue sarcoma. *Nat Med.* 2007;13(8):992-997.
  260. Rashid OM, Nagahashi M, Ramachandran S, et al. An Improved Syngeneic Orthotopic Murine Model of Human Breast Cancer Progression. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;147(3):501-512. doi:10.1007/s10549-014-3118-0.
  261. Schuh JCL. Trials, Tribulations, and Trends in Tumor Modeling in Mice. *Toxicol Pathol.* 2004;32(1\_suppl):53-66. doi:10.1080/01926230490424770.
  262. Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A. Murine Models to Evaluate Novel and Conventional Therapeutic Strategies for Cancer. *Am J Pathol.* 2007;170(3):793-804. doi:10.2353/ajpath.2007.060929.
  263. Kim MP, Evans DB, Wang H, Abbruzzese JL, Fleming JB, Gallick GE. Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc Protoc.* 2009;4(11):1670-1680.

264. Garralda E, Paz K, López-Casas PP, et al. Integrated Next-Generation Sequencing and Avatar Mouse Models for Personalized Cancer Treatment. *Clin Cancer Res.* 2014;20(9):2476-2484. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3047.
265. Bertotti A, Migliardi G, Galimi F, et al. A Molecularly Annotated Platform of Patient-Derived Xenografts («Xenopatients») Identifies HER2 as an Effective Therapeutic Target in Cetuximab-Resistant Colorectal Cancer. *Cancer Discov.* 2011;1(6):508 LP-523. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0109.
266. Rubio-Viqueira B, Hidalgo M. Direct In Vivo Xenograft Tumor Model for Predicting Chemotherapeutic Drug Response in Cancer Patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;85(2):217-221. doi:10.1038/clpt.2008.200.
267. Graves EE, Vilalta M, Cecic IK, et al. Hypoxia in models of lung cancer: Implications for targeted therapeutics. *Clin Cancer Res.* 2010;16(19):4843-4852. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1206.
268. Adwan H, Georges R, Pervaiz A, Berger MR. Investigation of Metastasis-Related Genes: A Rat Model Mimicking Liver Metastasis of Colorectal Carcinoma. *Front Oncol.* 2017;7(July):1-8. doi:10.3389/fonc.2017.00152.
269. Robertson JHP, Yang SY, Iga AM, Seifalian AM, Winslet MC. An in vivo rat model for early development of colorectal cancer metastasis to liver. *Int J Exp Pathol.* 2008;89(6):447-457. doi:10.1111/j.1365-2613.2008.00605.x.
270. Kim MP, Evans DB, Wang H, Abbrusceze JL, Fleming JB, Gallick GE. Orthotopic and heterotopic generation of murine pancreatic cancer xenografts. *Nat Protoc.* 2009;4(11):1670-1680. doi:10.1038/nprot.2009.171.
271. Suetsugu A, Osawa Y, Nagaki M, et al. Imaging the recruitment of cancer-associated fibroblasts by liver-metastatic colon cancer. *J Cell Biochem.* 2011;112(3):949-953. doi:10.1002/jcb.23011.
272. Kasuya K, Nagakawa Y, Hosokawa Y, et al. Liver metastasis is established by metastasis of micro cell aggregates but not single cells. *Exp Ther Med.* 2017;14(1):221-227. doi:10.3892/etm.2017.4470.
273. Vilalta M, Hughes NP, Von Eyben R, Giaccia AJ, Graves EE. Patterns of Vasculature in Mouse Models of Lung Cancer Are Dependent on Location. *Mol Imaging Biol.* 2017;19(2):215-224. doi:10.1007/s11307-016-1010-5.
274. Garcia-Alonso I, Herrero de la Parte B, Saenz de Urturi D, Echevarria-Uraga JJ, Acebal Montero C, Santamaría López A. Effect of hyperthermia on the proliferation of cc-531 cells in vitro. Abstracts of the 20th Congress of the Spanish Society for Surgical Research (SEIQ), October 2014, Albacete. En: *British Journal of Surgery.* Vol 102 (S3). ; 2015:7. doi:10.1002/bjs.9779.
275. Herrero de la Parte B, García-Alonso I, Garaio E, et al. RGD-Magnetic-Nanoparticles induced hyperthermia was followed by necrosis of colorectal cancer cells growing in the rat liver. The 50th Congress of the European Society for Surgical Research. June 10-13, 2015, Liverpool, United Kingdom. En: *European Surgical Research.* Vol 55. ; 2015:14.
276. Echevarria-Uraga JJ, García-Alonso Montoya I, Palomares T, et al. Usefulness of ultrasonography in developing and monitoring an experimental model of tumour



- induction in rat. En: *European Congress of Radiology.* ; 2011:1-10. doi:10.1594/ecr2011/C-0592.
277. García-Alonso I, Echevarria-Uraga JJ, Marín H, Herrero de la Parte B, Plazaola F. Perfusion of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Magnetic Nanoparticles into Experimental Liver Metastases. The 2012 European Society for Surgical Research Congress. June 6-9, 2012, Lille, France. En: *European Surgical Research.* Vol 50. ; 2013:200. doi:10.1159/000351963.
278. Arriortua OK. Funcionalización y estudio de nanopartículas de magnetita para su aplicación en terapias de hipertermia magnética. 2015.
279. Castellanos-Rubio I, Insausti M, Garaio E, et al. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles prepared by the seeded-growth route for hyperthermia: electron magnetic resonance as a key tool to evaluate size distribution in magnetic nanoparticles. *Nanoscale.* 2014;12:7542-7552. doi:10.1039/c4nr00646a.
280. Moros M, Pelaz B, López-Larrubia P, García-Martin ML, Grazú V, de la Fuente JM. Engineering biofunctional magnetic nanoparticles for biotechnological applications. *Nanoscale.* 2010;2(9):1746-1755. doi:10.1039/c0nr00104j.
281. Aizpurua JM, Azcune I, Fratila RM, Balentova E, Sagartzazu-Aizpurua M, Miranda JI. «Click» Synthesis of Nonsymmetrical Bis(1,2,3-triazoles). *Org Lett.* 2010;12(7):1584-1587. doi:10.1021/ol1003127.
282. Aizpurua JM, Sagartzazu-Aizpurua M, Azcune I, et al. Click synthesis of nonsymmetrical 4,4'-bis(1,2,3-triazolium) salts. *Synthesis (Stuttg).* 2011;(17):2737-2742. doi:10.1055/s-0030-1260061.
283. Monasterio Z. Synthesis, applications and reactivity of 1,2,3-triazolium salts. 2015.
284. Garaio E. Development of Experimental Techniques for Magnetic Hyperthermia Therapy. 2015.
285. Wishart DS. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15:473-484. doi:10.1038/nrd.2016.32.
286. Esbensen KH, Guyol D, Westad F, Houmøller LP. *An introduction to multivariate data analysis and experimental design.* 5th editio. Oslo: CAMO ASA; 2001.
287. Indahl UG, Liland KH, Næs T. Canonical partial least squares—a unified PLS approach to classification and regression problems. *J Chemom.* 2009;23(9):495-504. doi:10.1002/cem.1243.
288. Madison-Qingdao Metabolomics Consortium Database.
289. Biological Magnetic Resonance Data Bank.
290. The Human metabolome database.
291. Viant MR. Revealing the Metabolome of Animal Tissues Using <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. En: Weckwerth W, ed. *Metabolomics: Methods and Protocols.* Vol 358. Totowa: Humana Press; 2007:229-246.

292. Wu H, Southam AD, Hines A, Viant MR. High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. *Anal Biochem.* 2008;372(2):204-212. doi:10.1016/j.ab.2007.10.002.
293. Irazola M. Analytical and Chemometrical approaches for Bioimaging , Sensing and Metabolomics. 2016.
294. Fajardo L-G LF. Pathological Effects of Hyperthermia in Normal Tissues. *Cancer Res.* 1984;44(10 Supplement):4826s LP-4835s.
295. van der Zee J. Heating the patient: A promising approach? *Ann Oncol.* 2002;13(8):1173-1184. doi:10.1093/annonc/mdf280.
296. Israël M, Schwartz L. The metabolic advantage of tumor cells. *Mol Cancer.* 2011;10(1):70. doi:10.1186/1476-4598-10-70.
297. Gkanas E. In vitro magnetic hyperthermia response of iron oxide MNP's incorporated in DA3, MCF-7 and HeLa cancer cell lines. *Open Chem.* 2013;11(7). doi:10.2478/s11532-013-0246-z.
298. Xie X, Liu R, Chen W, Xu Y, Cheng J. In-vitro hyperthermia studied by cellular impedance sensors. En: *4th International Symposium on Bioelectronics and Bioinformatics, ISBB 2015.* ; 2015:228-231. doi:10.1109/ISBB.2015.7344965.
299. Nielsen OS, Overgaard J. Studies on fractionated hyperthermia in L1A2 tumour cells in vitro: Response to multiple equal heat fractions. *Int J Hyperth.* 1985;1(2):193-203. doi:10.3109/02656738509029285.
300. Laszlo A. The effects of hyperthermia on mammalian cell structure and function. *Cell Prolif.* 1992;25(2):59-87. doi:10.1111/j.1365-2184.1992.tb01482.x.
301. Landry J, Chrétien P. Relationship between hyperthermia-induced heat-shock proteins and thermotolerance in Morris hepatoma cells. *Can J Biochem Cell Biol.* 1983;61(6):428-437. doi:10.1139/o83-058.
302. Li GC, Mivechi NF, Weitzel G. Heat shock proteins, thermotolerance, and their relevance to clinical hyperthermia. *Int J Hyperth.* 1995;11(4):459-488. doi:10.3109/02656739509022483.
303. Kampinga HH, Brunsting JF, Stege GJ, Konings AW, Landry J. Cells overexpressing Hsp27 show accelerated recovery from heat-induced nuclear protein aggregation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;204(3):1170-1177. doi:10.1006/bbrc.1994.2586.
304. Homayounfar K, Bleckmann A, Conradi LC, et al. Metastatic recurrence after complete resection of colorectal liver metastases: impact of surgery and chemotherapy on survival. *Int J Colorectal Dis.* 2013;28(7):1009-1017. doi:10.1007/s00384-013-1648-2.
305. Brecht LC, Rachid AF. Predictors of recurrence after a first hepatectomy for colorectal cancer liver metastases: a retrospective analysis. *World J Surg Oncol.* 2014;12:391. doi:10.1186/1477-7819-12-391.
306. Failli A, Legitimo A, Orsini G, et al. Antiproliferative effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in colon cancer cell lines: comparison of three different cytotoxicity assays. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2013;27(1):275—284.

307. Ma Y-S, Yang I-P, Tsai H-L, Huang C-W, Juo S-HH, Wang J-Y. High Glucose Modulates Antiproliferative Effect and Cytotoxicity of 5-Fluorouracil in Human Colon Cancer Cells. *DNA Cell Biol.* 2014;33(2):64-72. doi:10.1089/dna.2013.2161.
308. Diaz Sanz I. Efecto de la resección hepática sobre el comportamiento de las células tumorales residuales y utilidad del ATRA para controlar dicho efecto en un modelo experimental. 2011.
309. Sheth KR, Clary BM. Management of Hepatic Metastases from Colorectal Cancer. *Clin Colon Rectal Surg.* 2005;18(3):215-223. doi:10.1055/s-2005-916282.
310. Tanis E, Nordlinger B, Mauer M, et al. Local recurrence rates after radiofrequency ablation or resection of colorectal liver metastases. Analysis of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer #40004 and #40983. *Eur J Cancer.* 2014;50(5):912-919. doi:10.1016/j.ejca.2013.12.008.
311. Brouquet A, Andreou A, Vauthey JN. The management of solitary colorectal liver metastases. *Surgeon.* 2011;9(5):265-272. doi:10.1016/j.surge.2010.12.005.
312. Cavagnaro M, Amabile C, Cassarino S, Tosoratti N, Pinto R, Lopresto V. Influence of the target tissue size on the shape of ex vivo microwave ablation zones. *Int J Hyperth.* 2015;31(1):48-57. doi:10.3109/02656736.2014.997312.
313. Pamies R, Cifre JGH, Espín VF, Collado-González M, Baños FGD, De La Torre JG. Aggregation behaviour of gold nanoparticles in saline aqueous media. *J Nanoparticle Res.* 2014;16(4). doi:10.1007/s11051-014-2376-4.
314. Du S, Kendall K, Toloueinia P, Mehrabadi Y, Gupta G, Newton J. Aggregation and adhesion of gold nanoparticles in phosphate buffered saline. *J Nanoparticle Res.* 2012;14(3):758. doi:10.1007/s11051-012-0758-z.
315. Marszalek M, Ponholzer A, Pusman M, Berger I, Madersbacher S. Transurethral Resection of the Prostate. *Anesth Analg.* 1997;84:438-446. doi:10.1016/j.eursup.2009.02.003.
316. Tanimura A, Tanaka S, Kitazono M. Superficial intimal injury of the rabbit carotid artery induced by distilled water. *Virchows Arch (Cell Pathol).* 1986;51:197-205.
317. Pfeiffer C, Rehbock C, Hühn D, et al. Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles. *J R Soc Interface.* 2014;11(96):20130931. doi:10.1098/rsif.2013.0931.
318. Etheridge ML, Hurley KR, Zhang J, et al. Accounting for biological aggregation in heating and imaging of magnetic nanoparticles. *Technology.* 2014;2(3):214-228. doi:10.1142/S2339547814500198.
319. Hansson A, Hashom N, Falson F, Rousselle P, Jordan O, Borchard G. In vitro evaluation of an RGD-functionalized chitosan derivative for enhanced cell adhesion. *Carbohydr Polym.* 2012;90(4):1494-1500. doi:10.1016/j.carbpol.2012.07.020.

320. Dowling RP, Pendegrass CJ, Blunn GW. A Comparison of Fibronectin and RGD Peptide Coatings for Improving Dermal Fibroblast Attachment to Intraosseous Transcutaneous Amputation Prostheses In Vitro. En: *Orthopaedic Research Society 2012 Annual Meeting.* ; 2012.
321. Cai Q-Y, Kim SH, Choi KS, et al. Colloidal gold nanoparticles as a blood-pool contrast agent for X-ray computed tomography in mice. *Invest Radiol.* 2007;42(12):797-806. doi:10.1097/RLI.0b013e31811ecdcd.
322. Lusic H, Grinstaff MW. X-Ray Computed Tomography Contrast Agents. *Chem Rev.* 2013;113(3):10.1021/cr200358s. doi:10.1021/cr200358s.
323. García-Alonso I, Aizpurua JM, Sagartzazu-Aizpurua M, Herrero de la Parte B, Echevarría-Uraga JJ. AlphaV Beta3 integrin-targeted iodinated-RGD peptide, as a molecular contrast agent. A preliminary study in rat model. Th 48th Congress of the ESSR, Istanbul, Turkey. En: *European Surgical Research.* ; 2013:50(Suppl 1):1-162.
324. Hasebroock KM, Serkova NJ. Toxicity of MRI and CT contrast agents. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009;5(4):403-416. doi:10.1517/17425250902873796.
325. Duan H, Kuang M, Wang X, Wang YA, Mao H, Nie S. Reexamining the Effects of Particle Size and Surface Chemistry on the Magnetic Properties of Iron Oxide Nanocrystals: New Insights into Spin Disorder and Proton Relaxivity. *J Phys Chem C.* 2008;112(22):8127-8131. doi:10.1021/jp8029083.
326. Tromsdorf UI, Bigall NC, Kaul MG, et al. Size and surface effects on the MRI relaxivity of manganese ferrite nanoparticle contrast agents. *Nano Lett.* 2007;7(8):2422-2427. doi:10.1021/nl071099b.
327. Ren X, Chen H, Yang V, Sun D. Iron oxide nanoparticle-based theranostics for cancer imaging and therapy. *Front Chem Sci Eng.* 2014;8(3):253-264. doi:10.1007/s11705-014-1425-y.
328. Thalheimer A, Otto C, Bueter M, et al. The intraportal injection model: A practical animal model for hepatic metastases and tumor cell dissemination in human colon cancer. *BMC Cancer.* 2009;9:29. doi:10.1186/1471-2407-9-29.
329. Oh BY, Hong HK, Lee WY, Cho YB. Animal models of colorectal cancer with liver metastasis. *Cancer Lett.* 2017;387:114-120. doi:10.1016/j.canlet.2016.01.048.
330. Brezovich IA. Low frequency hyperthermia: capacitive and ferromagnetic thermoseed methods. En: Paliwal B, Hetzel FW, Dewhirst MW, eds. *Biological, Physical and Clinical Aspects of Hyperthermia.* New York: American Institute of Physics; 1988:82-110.
331. Atkinson WJ, Brezovich IA, Chakraborty DP. Usable Frequencies in Hyperthermia with Thermal Seeds. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1984;BME-31(1):70-75. doi:10.1109/TBME.1984.325372.
332. Bellizzi G, Bucci OM, Chirico G. Numerical assessment of a criterion for the optimal choice of the operative conditions in magnetic nanoparticle hyperthermia on a realistic model of the human head. *Int J Hyperth.* 2016;32(6):688-703.

- doi:10.3109/02656736.2016.1167258.
333. Reed DR, Duke FF, Ellis HK, et al. Body fat distribution and organ weights of 14 common strains and a 22-strain consomic panel of rats. *Physiol Behav.* 2011;103(5):523-529. doi:10.1016/j.physbeh.2011.04.006.
334. Stigliano R V, Shubitidze F, Petryk JD, Shoshiashvili L, Petryk AA, Hoopes PJ. Mitigation of eddy current heating during magnetic nanoparticle hyperthermia therapy. *Int J Hyperth.* 2016;32(7):735-748. doi:10.1080/02656736.2016.1195018.
335. Nebendahl K. Routes of Administration. En: Krinke GJ, ed. *The Laboratory Rat.* Elsevier; 2000:463-483. doi:10.1016/B978-012426400-7.50063-7.
336. Diehl K-H, Hull R, Morton D, et al. A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. *J Appl Toxicol.* 2001;21:15-23. doi:10.1002/jat.727.
337. Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA, et al. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(23):13549-13554. doi:10.1073/pnas.2232479100.
338. Stern JM, Cadeddu JA. Emerging use of nanoparticles for the therapeutic ablation of urologic malignancies. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2008;26(1):93-96. doi:10.1016/j.urolonc.2007.03.019.
339. Hu S, Liao B, Chiang C, Chen P, Chen I, Chen S. Core- Shell Nanocapsules Stabilized by Single- Component Polymer and Nanoparticles for Magneto-Chemotherapy/Hyperthermia with Multiple Drugs. *Adv Mater.* 2012;24(27):3627-3632. doi:10.1002/adma.201201251.
340. Bae S, Ulrich CM, Neuhaus ML, et al. Plasma choline metabolites and colorectal cancer risk in the Women's Health Initiative Observational Study. *Cancer Res.* 2014;74(24):7442-7452. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1835.
341. Toriola AT, Cheng T-YD, Neuhaus ML, et al. Biomarkers of inflammation are associated with colorectal cancer risk in women but are not suitable as early detection markers. *Int J Cancer.* 2013;132(11):2648-2658. doi:10.1002/ijc.27942.
342. Abdelmalek MF, Sanderson SO, Angulo P, et al. Betaine for nonalcoholic fatty liver disease: Results of a randomized placebo- controlled trial. *Hepatology.* 2009;50(6):1818-1826. doi:10.1002/hep.23239.
343. García-Ruiz C, Morales A, Colell A, et al. Feeding S-adenosyl-l-methionine attenuates both ethanol-induced depletion of mitochondrial glutathione and mitochondrial dysfunction in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Hepatology.* 1995;21(1):207-214. doi:10.1002/hep.1840210133.
344. Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(9):671-684.
345. Kim J, Dang C V. Cancer's Molecular Sweet Tooth and the Warburg Effect. *Cancer Res.* 2006;66(18):8927 LP-8930.
346. Seyfried TN, Shelton LM. Cancer as a metabolic disease. *Nutr Metab (Lond).*

- 2010;7:7. doi:10.1186/1743-7075-7-7.
347. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? 2004;4:891.
348. Li C, Zhang G, Zhao L, Ma Z, Chen H. Metabolic reprogramming in cancer cells : glycolysis , glutaminolysis , and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer. *World J Surg Oncol*. 2016;14(15):1-7. doi:10.1186/s12957-016-0769-9.
349. Martinez-Outschoorn UE, Pavlides S, Sotgia F, Lisanti MP. Mitochondrial Biogenesis Drives Tumor Cell Proliferation. *Am J Pathol*. 2011;178(5):1949-1952. doi:10.1016/j.ajpath.2011.03.002.
350. Heinig RE, Clarke EF, Waterhouse C. Lactic acidosis and liver disease. *Arch Intern Med*. 1979;139(11):1229-1232.
351. Panackel C, Thomas R, Sebastian B, Mathai SK. Recent advances in management of acute liver failure. *Indian J Crit Care Med*. 2015;19(1):27-33. doi:10.4103/0972-5229.148636.
352. Feldman AG, Sokol RJ, Hardison RM, Alonso EM, Squires RH, Narkewicz MR. Lactate and Lactate: Pyruvate Ratio in the Diagnosis and Outcomes of Pediatric Acute Liver Failure. *J Pediatr*. 2017;182:217-222. doi:10.1016/j.jpeds.2016.12.031.
353. Debray F-G, Mitchell GA, Allard P, Robinson BH, Hanley JA, Lambert M. Diagnostic Accuracy of Blood Lactate-to-Pyruvate Molar Ratio in the Differential Diagnosis of Congenital Lactic Acidosis. *Clin Chem*. 2007;53(5):916 LP-921.
354. Bolant Hernandez B, Calvo Bermudez MA, Cejalvo Lapeña D, Gimeno Forner O, Gimeno Forner L, Lloris Carsi JM. Hematología y bioquímica clínica de la rata. Parte 1. *Res Surg*. 1989;(3):29-36.
355. Bolant Hernandez B, Calvo Bermudez MA, Cejalvo Lapeña D, Gimeno Forner O, Gimeno Forner L, Lloris Carsi JM. Hematología y bioquímica clínica de la rata. Parte 2. *Res Surg*. 1990;(4):12-20.
356. Qiu LEI, Yin G, Cheng LI, et al. Astragaloside IV ameliorates acute pancreatitis in rats by inhibiting the activation of nuclear factor-  $\kappa$  B. *Int J Mol Med*. 2015;35:625-636. doi:10.3892/ijmm.2015.2070.
357. Epstein E, Kiechle FL, Artiss JD, Zak B. The clinical use of alkaline phosphatase enzymes. *Clin Lab Med*. 1986;6(3):491-505.
358. Cearra I. Caracterización y tratamiento experimental del síndrome de isquemia -reperfusión en extremidades inferiores en la rata. 2016.
359. Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline Phosphatase: An Overview. *Indian J Clin Biochem*. 2014;29(3):269-278. doi:10.1007/s12291-013-0408-y.
360. Schiele F, Vincent-Viry M, Fournier B, Starck M, Siest G. Biological Effects of Eleven Combined Oral Contraceptives on Serum Triglycerides,  $\gamma$ -Glutamyltransferase, Alkaline Phosphatase, Bilirubin and other Biochemical Variables. *Clin Chem Lab Med*. 1998;36(11):871-878.

doi:10.1515/CCLM.1998.153.

361. McGovern AJ, Vitkovitsky I V, Jones DL, Mullins ME. Can AST/ALT ratio indicate recovery after acute paracetamol poisoning? *Clin Toxicol.* 2015;53(3):164-167. doi:10.3109/15563650.2015.1006399.