



Universidad
de Alcalá

Programa de Doctorado en Química Médica

*NUEVOS MEDIOS DE CONTRASTE MULTIMODALES PARA
DIAGNÓSTICO POR IMAGEN*

Tesis Doctoral presentada por:

ÁLVARO GARCÍA RAMOS

Directores:

Dr. Félix Ramón Martín Martín

Dr. Ignacio Jesús Alonso Silva

Alcalá de Henares, Febrero [2021]

*“Crees que sabes todas tus posibilidades.
Entonces, otras personas llegan a tu vida y de repente hay muchas más.”*

David Levithan
(El reino de la posibilidad)

AGRADECIMIENTOS

En este punto en el que se acerca el final de una dura pero satisfactoria etapa, es inevitable recordar a cada una de las personas que han hecho posible este momento. Me gustaría agradecer cada segundo utilizado en ayudarme, cada frase de ánimo que he recibido, así como cada consejo que se me ha transmitido y cada conocimiento que he adquirido.

Me gustaría expresar mi agradecimiento a Juan José Vaquero, por haber aceptado ser el Tutor de esta Tesis Doctoral, por su disposición y la resolución de los trámites necesarios en todo momento con gran agilidad.

Como se puede ver en los capítulos posteriores, esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible sin el excelente trabajo, el tiempo y los conocimientos aportados por diferentes centros de investigación. De esta manera, me parece importante agradecer:

A todas y cada una de las personas de la Unidad de Aplicaciones Biomédicas y Farmacocinética del Departamento de Medio Ambiente del CIEMAT. A Miguel Ángel, Eduardo, Marta, Alfonso, Víctor y Jorge, muchas gracias por hacerme descubrir en vuestras instalaciones el mundo de la radioquímica y por transmitirme tantos y tantos conocimientos.

A Marina, responsable del Laboratorio de Resonancia Magnética de Investigación en Animales del Hospital de Paraplégicos de Toledo, muchísimas gracias por tu paciencia, por tu esfuerzo, por tu compromiso; te dije que todo iba a salir genial y aquí tienes la demostración.

A todo el personal del Grupo de Investigación de Reactividad Química y Fotorreactividad del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de la Coruña. Muchas gracias en especial a Carlos y a David, por vuestro trabajo e implicación. Vuestra experiencia en este campo es envidiable y he podido aprender muchísimo leyendo cada artículo y libro en el que habéis participado.

Mi agradecimiento más especial, y que nunca me cansaré de repetir, es para el GRUPO JUSTE (concretamente a Justesa Imagen S.A.U.); que no sólo ha hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral, sino que desde mi incorporación allá por el año 2015 me ha dado la oportunidad de desarrollar mi carrera en la industria farmacéutica, de aprender, de demostrar mi valía y, en definitiva, de crecer como profesional y como persona. Dicen que el que la sigue la consigue y puedo asegurar que es una suerte que consiguiera formar parte de esta familia de profesionales.

No quiero olvidarme de todos y cada uno de los departamentos por su labor envidiable en el día a día. Si algo caracteriza al GRUPO JUSTE es su carácter humano, y eso me ha enseñado que trabajando en equipo es posible alcanzar cualquier meta.

Es imprescindible para mí agradecer al Departamento de I+D+i, por ser las personas con las que comparto cada día y con las que paso tantos y tantos buenos momentos. Gracias a Ignacio, Félix, Roberto, Irene, Eugenia, Mónica y Eli, porque os habéis convertido en una gran familia para mí y hacéis que de gusto ir a trabajar cada día. Además, me gustaría agradecer particularmente a Juan Andrés por todos los momentos y conocimientos que no sólo a mí, sino a toda la empresa, nos ha transmitido durante toda su longeva y exitosa trayectoria en esta compañía. También me quería acordar de todos los que en un momento u otro de vuestra vida habéis invertido un tiempo para empaparos de ciencia con nosotros, Íñigo, Sara, Vanesa, Paloma, Patricia, Pepa, ...

Dos menciones particularmente especiales para mí son para los Directores de esta Tesis Doctoral, Félix e Ignacio, porque realmente pienso que soy muy afortunado de haber dado en mi vida con vosotros. Os habéis convertido en mis referentes desde el primer día en el que llegué a esta empresa y siempre habéis luchado y apostado por mí; sois una fuente inagotable de información, de experiencias y sabiduría, y pienso aprovechar cada segundo para seguir aprendiendo de vosotros. Lo que tiene la vida... que este 2021 será un año muy importante para los tres porque vosotros vais a cerrar una de las etapas más importantes de vuestra vida y yo, en cambio, estoy empezando una que ojalá sea al menos tan fructífera y duradera como la vuestra. Cuando llegue el día en el que la cuenta atrás de vuestro móvil marque 0 días laborables, lo celebraremos y, aunque tengamos claro que vais a seguir estando siempre ahí, os vamos a echar muchísimo de menos.

Además de las personas que están en nuestra vida profesional, no somos nadie sin los nuestros, los que siempre han estado ahí y seguirán estando incondicionalmente.

Por eso quiero agradecer a mis amigos de toda la vida, del colegio, a EL GRUPO; porque a pesar de la distancia y de tener que separarnos para crecer profesionalmente y encontrar nuestro lugar, sé que nuestros caminos siempre se juntarán. Estoy muy orgulloso de poder contar con vosotros y saber que estáis ahí.

A las personas a las que debo todo, mi familia. Gracias por haberme inculcado día a día los valores más importantes que una persona puede tener, la educación, el respeto, la constancia, la superación, la humildad, el sacrificio...que me han permitido llegar a ser quien soy. Tengo la suerte de haber tenido muy cerca los mejores ejemplos, vosotros; pero especialmente quiero agradecer a mis padres y a mi hermana por apoyarme y acompañarme siempre y por ser, en definitiva, las personas más importantes de mi vida; todo lo que soy y tengo os lo debo a vosotros.

No podría faltar esa persona especial que con una sonrisa es capaz de mover el mundo y dar fuerza para seguir adelante cada día, tengo la suerte de tener a mi lado a esa persona, la que me aguanta en mis buenos y en mis malos momentos y la que ha sido, es y será mi mejor apoyo. Ha sido una etapa muy difícil, pero entre los dos la hemos conseguido terminar con mucho éxito; María, pienso devolverte cada segundo de sacrificio, esfuerzo y dedicación.

“Son las cosas sencillas de la vida las que importan.”

Andy Weir
(El Marciano)

RESUMEN

La idea de realizar este trabajo de investigación surgió de la necesidad de solventar algunas de las principales limitaciones existentes en el mercado actual de los medios de contraste utilizados en el campo del diagnóstico por imagen. Entre ellas, se encuentra la escasez de medios de contraste multimodales que puedan ser utilizados tanto de manera independiente en diferentes técnicas de este campo, como en una combinación de ellas. Además, se busca que estos medios permitan mejorar la visualización de ciertas partes del cuerpo, como por ejemplo el hígado, para las que actualmente no se han desarrollado un gran número de medios de contraste realmente efectivos. La extensa experiencia en el campo del diagnóstico por imagen de la empresa Justesa Imagen S.A.U. (Grupo Juste), en la que se ha llevado a cabo la presente Tesis Doctoral, ha servido para dar respuesta y soporte a la problemática planteada.

La investigación realizada se podría considerar como multidisciplinar debido a que se han utilizado aplicaciones y conocimientos de diversos campos científicos, como son la química analítica, química orgánica, química inorgánica, química médica, biología, radioquímica, farmacología o farmacocinética.

Una búsqueda bibliográfica exhaustiva y un planteamiento claro de los objetivos a llevar a cabo, ha conducido a la síntesis de unos compuestos con unas características que posibilitan su uso como medios de contraste en el campo del diagnóstico por imagen. Analíticamente se ha verificado que tienen una pureza adecuada y, la caracterización espectroscópica por medio de diferentes técnicas como ^1H RMN, ^{13}C RMN, COSY, HMQC y HMBC, espectro infrarrojo, punto de fusión, análisis de masas y análisis elemental (microanálisis) ha permitido confirmar su identidad.

Con la posterior evaluación de diversos parámetros fisicoquímicos como la osmolalidad, solubilidad, coeficiente de reparto, afinidad por seroalbúmina bovina, relajatividad y número de aguas de coordinación ha sido posible predecir el comportamiento de los compuestos sintetizados como medios de contraste para diferentes técnicas de diagnóstico por imagen. También se ha demostrado la seguridad de dichos productos, para lo que se han llevado a cabo estudios *in silico* e *in vitro* de estabilidad metabólica, citotoxicidad, mutagenicidad y biodegradabilidad; estableciendo como prioridad la reducción de la investigación con animales.

Los buenos resultados de correlación obtenidos en el estudio de calibrador (*Phantom*) para las técnicas de imagen por resonancia magnética (iRM) y tomografía axial computarizada (TAC) de rayos X, han mostrado la validez de los productos sintetizados para su uso en dichas técnicas de diagnóstico por imagen. De esta forma, se han podido realizar una serie de estudios *in vivo* en iRM, TAC y PET/TAC para evaluar la aplicabilidad de los compuestos como medios de contraste en estas técnicas. Después del tratamiento de las imágenes obtenidas, se ha podido confirmar el uso de los compuestos sintetizados como medios de contraste multimodales para la visualización de diferentes órganos como el corazón, el hígado, los riñones y la vejiga.

Índice

I.	INTRODUCCIÓN.....	3
	<i>Diagnóstico por imagen.....</i>	<i>5</i>
	Datos históricos.....	5
	Clasificación de las técnicas.....	8
	Mecanismos de interacción radiación electromagnética-materia.....	10
	Clasificación de los medios de contraste.....	12
	Imagen por rayos X.....	18
	Imagen por resonancia magnética nuclear (iRM).....	36
	Imagen en medicina nuclear.....	61
	Imagen por ultrasonidos.....	72
	Imagen óptica.....	77
	<i>Combinación de técnicas de diagnóstico por imagen.....</i>	<i>79</i>
	Medicina nuclear-TAC.....	81
	Medicina nuclear-iRM.....	81
	Imagen óptica-TAC.....	81
	Imagen óptica-iRM.....	82
	TAC-iRM.....	82
	<i>Estudio de mercado.....</i>	<i>83</i>
	Medios de contraste.....	83
	Técnicas de diagnóstico por imagen.....	87
	Afecciones de mayor aplicación.....	92
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	93
	<i>Hipótesis.....</i>	<i>95</i>
	<i>Objetivos.....</i>	<i>104</i>
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	107
	<i>Aspectos éticos y legales.....</i>	<i>109</i>
	<i>Instalaciones.....</i>	<i>110</i>
	<i>Metodología.....</i>	<i>111</i>
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	147
	<i>Desarrollo analítico.....</i>	<i>149</i>
	<i>Síntesis, purificación y caracterización espectroscópica.....</i>	<i>165</i>
	<i>Parámetros Físicoquímicos.....</i>	<i>184</i>
	<i>Parámetros relacionados con la seguridad.....</i>	<i>206</i>
	<i>Marcaje radiactivo.....</i>	<i>209</i>
	<i>Caracterización biológica.....</i>	<i>212</i>
	Imagen <i>in vivo</i> en iRM.....	212
	Imagen <i>in vivo</i> en PET/TAC.....	226
	Imagen <i>in vivo</i> en rayos X (TAC).....	240
V.	CONCLUSIONES.....	243
VI.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	247
VII.	ÍNDICE DE TABLAS.....	263
VIII.	ÍNDICE DE ECUACIONES.....	267
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	273

*“Solo el que sabe es libre,
y más libre el que más sabe.”*

Miguel de Unamuno

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen

El diagnóstico por imagen es el campo que permite a los especialistas observar el cuerpo humano, o alguna parte de él, a partir de imágenes macroscópicas. Estas pruebas médicas sirven para detectar enfermedades o comportamientos anómalos en el cuerpo humano y, de esta forma, es posible establecer tratamientos personalizados para cada paciente.

Los especialistas pueden utilizar diferentes técnicas, dependiendo de los síntomas y de la zona del cuerpo humano de interés, entre las que se encuentran los rayos X, la imagen por resonancia magnética (iRM), la medicina nuclear, los ultrasonidos o la imagen óptica. Posteriormente, se realizará una descripción detallada de las técnicas mencionadas.

Datos históricos

En 1896 Roentgen ⁽¹⁾ publicó un artículo en el que se mostraban los primeros huesos humanos vistos con la técnica de rayos X (Fig. 1), lo que supuso el descubrimiento de la técnica y el comienzo de una revolución en el campo de la medicina. Los grandes avances científicos en diferentes áreas (física, química, ingeniería y matemáticas) permitieron dar respuesta a la necesidad de estudiar el interior del cuerpo humano; surgiendo así un nuevo campo de aplicación en medicina: El diagnóstico por imagen.



Figura 1: Primera radiografía de un hueso humano.

Desde ese momento, el diagnóstico por imagen ha sido un campo en continua evolución en el que se han realizado multitud de descubrimientos y en el que, aún en la actualidad, se siguen llevando a cabo importantes estudios tanto a nivel de investigación como relacionados con una posterior aplicabilidad.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Datos históricos

En 1911, Rutherford descubrió, ⁽²⁾ investigando con partículas alfa de una lámina de oro, la estructura del átomo. Este estaba formado por una pequeña, pesada y positivamente cargada parte denominada núcleo, y una difusa nube con electrones cargados negativamente alrededor.

También en 1911 se registró la primera aplicación con un radioisótopo natural como trazador, de la mano de G. de Hevesy. Posteriormente, en 1924, de Hevesy utilizó radioisótopos en estudios del cuerpo humano ⁽³⁾.

La producción de isótopos inestables se comenzó a realizar en 1932, coincidiendo con la invención del ciclotrón por E. Lawrence ⁽⁴⁾. El ciclotrón consiste en un acelerador de partículas cargadas con gran energía que permite bombardear núcleos de elementos y así producir los isótopos inestables.

El 16 de noviembre de 1942, E. Fermi construyó el primer reactor de fisión nuclear debajo de las gradas de un estadio de fútbol americano abandonado en Chicago (Fig. 2). Estaba hecho de ladrillos de grafito y no tenía refrigeración ni protegía a los operarios de la radiación. El 2 de diciembre se finalizó su construcción y se llevó a cabo la primera reacción nuclear. Este descubrimiento estaba inmerso en el proyecto Manhattan, diseñado para la creación de una bomba atómica. Con la invención del reactor nuclear se aumentó la posibilidad de producir isótopos inestables al poder generar gran cantidad de neutrones.

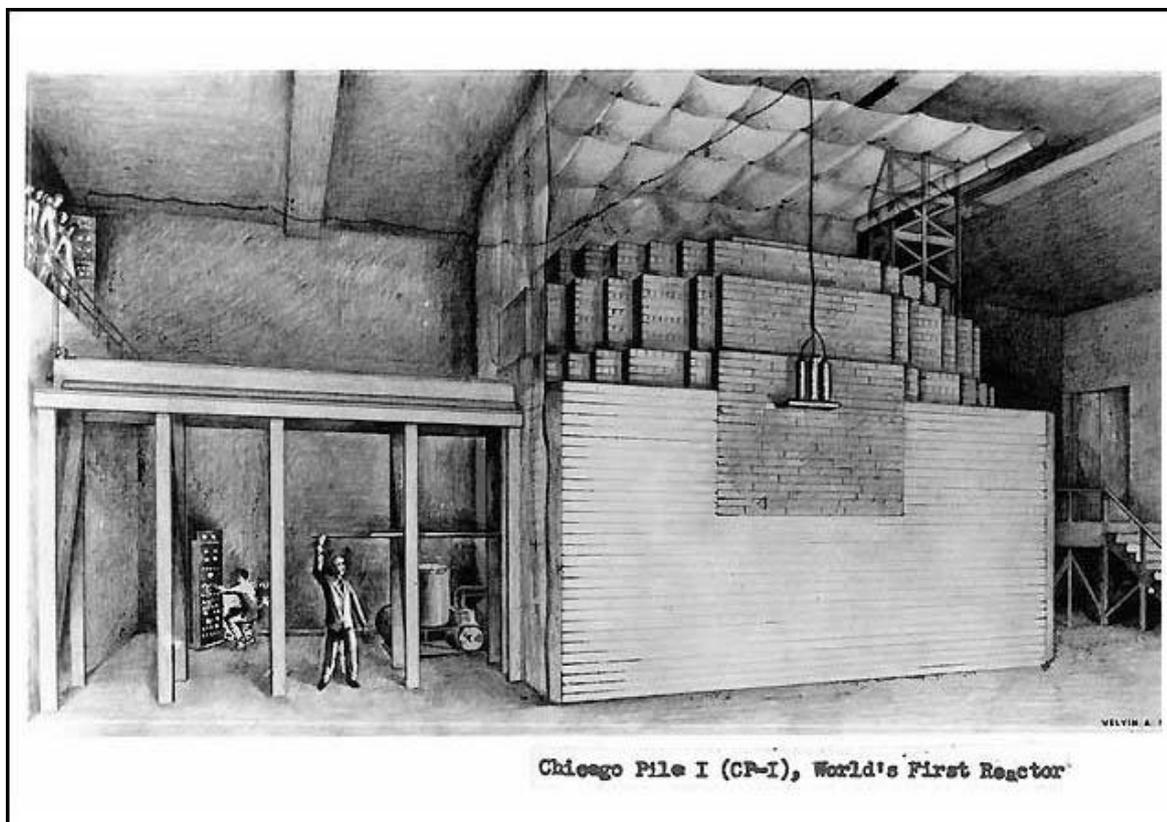


Figura 2: Primer reactor de fisión nuclear.

Durante la segunda guerra mundial se consiguieron grandes logros en el campo de la física, convirtiendo ideas teóricas y experimentaciones en nuevas tecnologías que cambiarían el mundo. Entre ellas cabe destacar la ingeniería nuclear o la ingeniería de radiofrecuencia, que llegó a su máximo apogeo con la bomba atómica y el radar. Después de la guerra, los investigadores que habían trabajado bajo órdenes militares continuaron trabajando en las mismas líneas de investigación tanto en universidades como en empresas, obteniendo resultados que fueron aplicados a la vida civil y a la medicina.

En 1955, E. Odeblad y G. Lindstrom obtuvieron las primeras resonancias de protón de eritrocitos, músculos, hígado de ratas y fluidos humanos ⁽⁵⁾. Entre 1963 y 1971, J. Mallard, PD. Cook, M. Kent y J. Hutchison mostraron las diferencias entre los espectros de resonancia de los electrones que había entre tumores del hígado y riñón ⁽⁶⁾.

Hal O. Anger inventó en 1958 un sistema de detección de radiación gamma, que posteriormente pasó a denominarse cámara de Anger o gammacámara ⁽⁷⁾.

Más tarde, en 1971, R. Damadian demostró la posibilidad de detectar enfermedades utilizando la resonancia magnética basándose en que los diferentes tejidos emitían señales que se modificaban con el tiempo y con el campo magnético aplicado. Este descubrimiento fue publicado en un artículo en la revista científica Science ⁽⁸⁾. En 1972 construyó el primer equipo y elaboró la primera patente de resonancia magnética con título "*Apparatus and method for detecting cancer in tissue*", que fue aceptada en 1974 en Estados Unidos.

En 1973, P. Lauterbur consiguió las primeras imágenes similares a la tomografía computarizada en dos y tres dimensiones aplicando varios campos magnéticos además del campo principal y lo plasmó en un artículo en *Nature* ⁽⁹⁾.

Ese mismo año, P. Mansfield descubrió paralelamente que, aplicando gradientes de campos magnéticos se podían obtener señales capaces de dar información espacial de la zona de estudio. Así creó el concepto de "espacio K" y posteriormente, en 1976, propuso la secuencia de Imagen eco-planar (EPI, del inglés *Eco-planar Imaging*) ⁽¹⁰⁾.

P.Mansfield y P. Lauterbur fueron galardonados con el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2003 por estas invenciones, y han sido considerados los padres de la técnica; sin olvidar a R. Damadian aunque no recibiera ese galardón ⁽¹¹⁾.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Clasificación de las técnicas

Clasificación de las técnicas

El campo del diagnóstico por imagen utiliza señales físicas producidas en el interior del cuerpo humano (más concretamente en las zonas de interés de los estudios a realizar), que son indetectables para los humanos y que se procesan para obtener una serie de imágenes. Dependiendo de la técnica utilizada se generan imágenes con un tipo u otro de información, pudiendo ser anatómica o funcional.

Una de las diferentes maneras en las que se pueden clasificar las técnicas de diagnóstico por imagen es según la fuente que se utiliza para obtener las señales, pudiendo ser:

- Radiación ionizante. Se ioniza la zona donde se aplica modificando el número de electrones. Las técnicas que utilizan estas radiaciones son:

- Imagen por rayos X. Se utiliza una fuente de rayos X y lo que produce la señal es la cantidad de estos rayos X que atraviesan la zona de estudio. Dentro de esta se pueden obtener imágenes planares con equipos convencionales o tridimensionales con la técnica conocida como Tomografía Axial Computarizada (TAC o TC).
- Imagen por medicina nuclear. Se utiliza una radiación ionizante emitida por un radioisótopo (trazador) que se distribuye dentro del cuerpo humano en la zona de interés. Se pueden encontrar las siguientes técnicas:
 - Tomografía Computarizada de Emisión Monofotónica (SPECT, del inglés *Single-Photon Emission Computed Tomography*). Utiliza por lo menos una gammacámara para detectar la distribución de los trazadores en la zona de estudio, produciendo imágenes tridimensionales de la distribución del radioisótopo en la zona de interés.
 - Tomografía por Emisión de Positrones (PET, del inglés *Positron Emission Tomography*). El radioisótopo emite positrones que se aniquilan cuando entran en contacto con un electrón y desde la posición central de la zona estudiada, se emiten dos rayos gamma con la misma dirección y energía, pero en sentido opuesto. De esta manera, se detecta la señal producida por los rayos gamma coincidentes en dos detectores opuestos, produciendo imágenes tridimensionales de la distribución del radioisótopo en la zona de interés.
 - Terapia. También se puede introducir una radiación gamma de alta energía desde el exterior, capaz de producir la muerte celular en la zona de interés. Esto es lo que comúnmente se denomina radioterapia (con aceleradores o fuentes de cobalto, por ejemplo). Cuando se introduce una fuente radiactiva en el interior del cuerpo, se denomina braquiterapia.

- Radiación no ionizante. Se utilizan ondas o partículas que no son capaces de modificar el número de electrones de la zona donde se aplica la radiación. Las técnicas que utilizan estas radiaciones son:
 - iRM. Utiliza las propiedades magnéticas de los átomos. Aplicando un campo magnético fuerte, los electrones se alinean comportándose como imanes orientándose en la misma dirección. Posteriormente, se crea un campo magnético con una intensidad más baja, la dirección de polarización varía y, una vez se deja de aplicar el campo la polarización, los electrones vuelven a alinearse con el campo magnético inicial. Si se aplica un pulso de radiofrecuencia (RF), se genera una señal en función de los cambios de polarización de los átomos en la zona de estudio que puede ser detectada y transformada en una imagen.
 - Ultrasonidos. Utiliza las propiedades del sonido, ya que al aplicar unas ondas de alta frecuencia (ultrasonidos) sobre los medios de interés, se obtiene una respuesta (eco) con una intensidad variable en función de la densidad de la zona que se pretende estudiar. La señal se recibe en un ordenador, pudiendo transformarse posteriormente en una imagen.
 - Imagen óptica. Aquella que utiliza luz visible, ultravioleta e infrarroja. Las propiedades de los fotones pueden llegar a interactuar de diferente manera según la zona de estudio deseada, ya sea en órganos, tejidos o en estructuras más pequeñas como células o moléculas.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Mecanismos de interacción radiación electromagnética-materia

Mecanismos de interacción radiación electromagnética-materia

Las técnicas como rayos X, iRM o medicina nuclear que utilizan unas ondas electromagnéticas incidentes sobre los átomos para modificar su estado de equilibrio, aceleran las cargas eléctricas de estos favoreciendo una rápida propagación en todas las direcciones del medio cuando los electrones absorben la energía de la onda incidente. De esta manera, se pueden llegar a producir dos fenómenos como son la dispersión elástica (Fig. 3) y la dispersión inelástica (Fig. 4). El primero está relacionado con el principio de la conservación de la energía, puesto que la radiación producida por los electrones dispersados se incrementa linealmente en función del número de electrones según el número atómico.

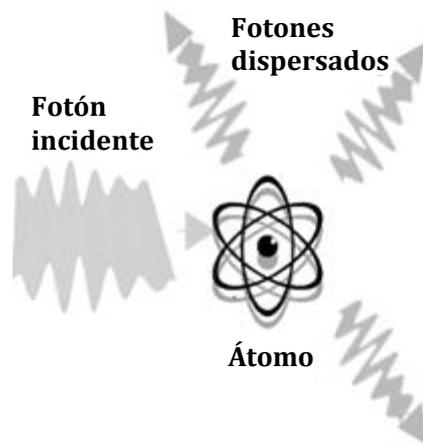


Figura 3: Dispersión elástica. C. Guy, D. Ffytche.

En cuanto al segundo, se puede producir cuando los átomos absorben parte de la energía de la radiación incidente, liberándose electrones libres que son capaces de ionizar otros átomos. De esta manera se puede generar una cascada de electrones, ya que cada electrón libre se convierte en una radiación incidente para otro átomo. Este segundo fenómeno se genera con los rayos X o rayos gamma (utilizados en medicina nuclear) y se conoce como efecto fotoeléctrico.

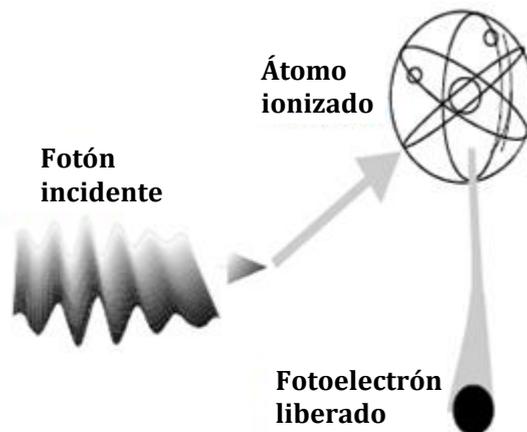


Figura 4: Dispersión inelástica (Efecto fotoeléctrico).

Existe una ecuación (Ec. 1), que expresa la relación entre la absorción de la energía por parte de un átomo, el número atómico y la energía incidente. Como se puede ver, la eficiencia de la absorción (coeficiente de absorción: σ) es inversamente proporcional a la energía del fotoelectrón arrancado (E) y directamente proporcional a la quinta potencia del número atómico (Z), de ahí la importancia de números atómicos altos.

$$\sigma = \frac{Z^5}{E^2} \quad (1)$$

Un ejemplo práctico de esta ecuación es el uso de elementos con elevado peso molecular en las medidas de rayos X, como el yodo ($Z=53$), que se administra en la corriente sanguínea para aumentar la absorción frente a los rayos X y de esta manera poder ver con detalle ciertas imágenes de las zonas de interés a estudiar. Por la misma razón, los blindajes de tubos, detectores y el personal que se encarga de la realización de estas pruebas médicas llevan elementos como el plomo ($Z=82$) para protegerse de la radiación ionizante con la que se trabaja. Aun así, los trabajadores llevan un monitor de exposición para tener un control en todo momento de la cantidad de radiación ionizante a la que están expuestos.

En el caso de los ultrasonidos e iRM, al no utilizar radiación ionizante, no existen estos problemas de exposición. Es teóricamente imposible que estas técnicas produzcan daños en los pacientes porque la radiación que se administra no tiene energía suficiente para producir efectos lesivos en la materia biológica.

Anteriormente se ha comentado el efecto en los átomos cuando se aplica una energía incidente sobre estos, pero en el diagnóstico por imagen también son importantes las propiedades de los núcleos. Entre estas destacan la radiactividad, que se utiliza en medicina nuclear, y los momentos magnéticos nucleares permanentes en iRM. La radiactividad se produce por la inestabilidad de los núcleos, que da lugar a la liberación de energía (en forma de radiación electromagnética o partículas) para alcanzar un estado más estable.

Cada elemento químico tiene un número atómico (Z) formado por un número de protones fijos y un número variable N de neutrones. Los isótopos tienen el mismo Z y diferente N , pueden ser estables o inestables, pero son químicamente indistinguibles. A los isótopos inestables se les puede denominar radionúclidos. A la hora de identificar estos isótopos se utiliza la forma AX , donde X es el elemento químico y A es la masa del elemento, siendo esta la suma de Z y N . Algunos elementos presentan un único isótopo estable, como el ${}^{19}\text{F}$, pero la mayoría tienen varios. El zinc tiene cinco isótopos estables como son ${}^{64}\text{Zn}$, ${}^{66}\text{Zn}$, ${}^{67}\text{Zn}$, ${}^{68}\text{Zn}$ y ${}^{70}\text{Zn}$, con abundancias de 49%, 28%, 4%, 19% y 0,6%, respectivamente.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Clasificación de los medios de contraste

Clasificación de los medios de contraste

En todas las técnicas de diagnóstico por imagen mencionadas anteriormente es muy común el uso de agentes de contraste, cuya función es resaltar determinadas estructuras o procesos para mejorar la visualización de la zona de interés. De esta forma es posible llegar a diferenciar órganos, tejidos o tumores que no serían tan visibles si se utilizase la misma técnica, pero en ausencia de dichos agentes. Los medios de contraste utilizados en el diagnóstico por imagen se pueden clasificar según el siguiente esquema (Fig. 5):

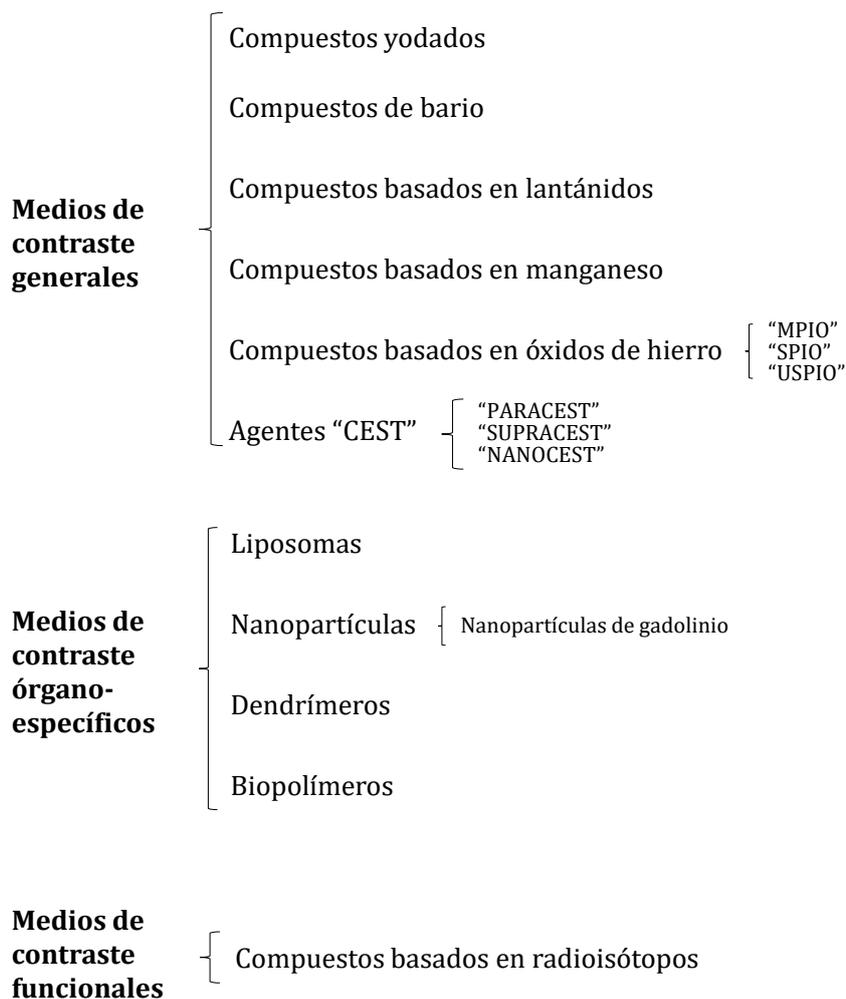


Figura 5: Clasificación de los medios de contraste

- MC generales. Aquellos medios de contraste que se pueden utilizar para diferentes tipos de pruebas, como por ejemplo estudios renales, cardíacos, de esqueleto, etc. Se administran por vía oral o intravenosa y se utilizan para la visualización de huesos, vísceras o tumores.
 - o Compuestos yodados. Son muy utilizados en técnicas como rayos X porque son portadores de elementos con un número atómico elevado y, de esta manera, son opacos para los rayos X. Su estructura se basa generalmente en la presencia de al menos un anillo aromático triyodado. Debido a la elevada toxicidad de los átomos de yodo cuando se encuentran en su forma elemental, deben ir incorporados en alguna molécula orgánica que disminuya su toxicidad y favorezca su eliminación del cuerpo humano. Pueden ser administrados por vía intraarterial, intratecal e intraabdominal, pero una de sus desventajas es la necesidad de una elevada dosis. Se pueden clasificar en diferentes categorías como iónicos y no iónicos, o monómeros y dímeros.

Los monómeros iónicos presentan una mayor toxicidad debido a su elevada osmolalidad, mientras que los monómeros no iónicos, los dímeros iónicos y los no iónicos tienen una osmolaridad inferior, llegando a ser iso-osmolares con la sangre disminuyendo así las posibles reacciones adversas tras su administración.

- o Compuestos de bario. Son medios de contraste radiopacos que, generalmente, utilizan sulfato de bario en su formulación. Se utilizan para estudios del tubo digestivo, habitualmente mediante rayos X o TAC. Su función es recubrir los órganos objeto de estudio con un material que no es absorbido por el cuerpo. Su administración es oral.
- o Compuestos basados en lantánidos. Son los medios de contraste más utilizados en iRM y se basan en las variaciones de los valores de T_1 (parámetro de relajación longitudinal que se definirá posteriormente con mayor detalle). Debido a la elevada toxicidad de los lantánidos (como cationes inorgánicos), deben ir incorporados en alguna molécula orgánica que disminuya su toxicidad y favorezca su eliminación del cuerpo humano. Al tener elementos con electrones desapareados en un entorno acuoso, el tiempo necesario para que los espines vuelvan al estado de equilibrio disminuye y, de esta manera se reducen los valores de T_1 de las moléculas de agua vecinas. Esto también provoca una reducción de T_R (tiempo que transcurre entre sucesivos pulsos, del que se hablará con más detalle posteriormente), lo que da lugar a una mayor acumulación de pulsos en un menor tiempo y de esta manera favorecer la obtención de una mayor relación de la señal por unidad de tiempo. Debido a sus características, los lantánidos son los elementos idóneos para ser utilizados en esta técnica; y entre ellos, merece la pena destacar el gadolinio debido a su carácter paramagnético y la presencia de siete electrones desapareados

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Clasificación de los medios de contraste

(Fig. 6 y 7). Se produce una señal intensa (contraste positivo) de la zona de interés ⁽¹²⁾. Estos compuestos se pueden clasificar según su carga como iónicos y no iónicos, o según su estructura como lineales o macrocíclicos. Como alternativa, también existen complejos de metales como el disprosio y el iterbio.

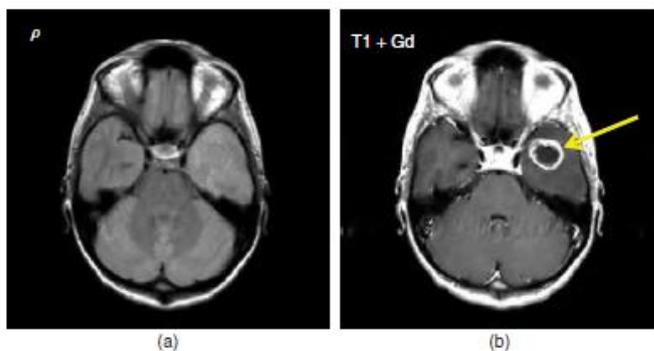


Figura 6: iRM de un tumor cerebral en ausencia (a) y en presencia (b) de un medio de contraste basado en gadolinio.

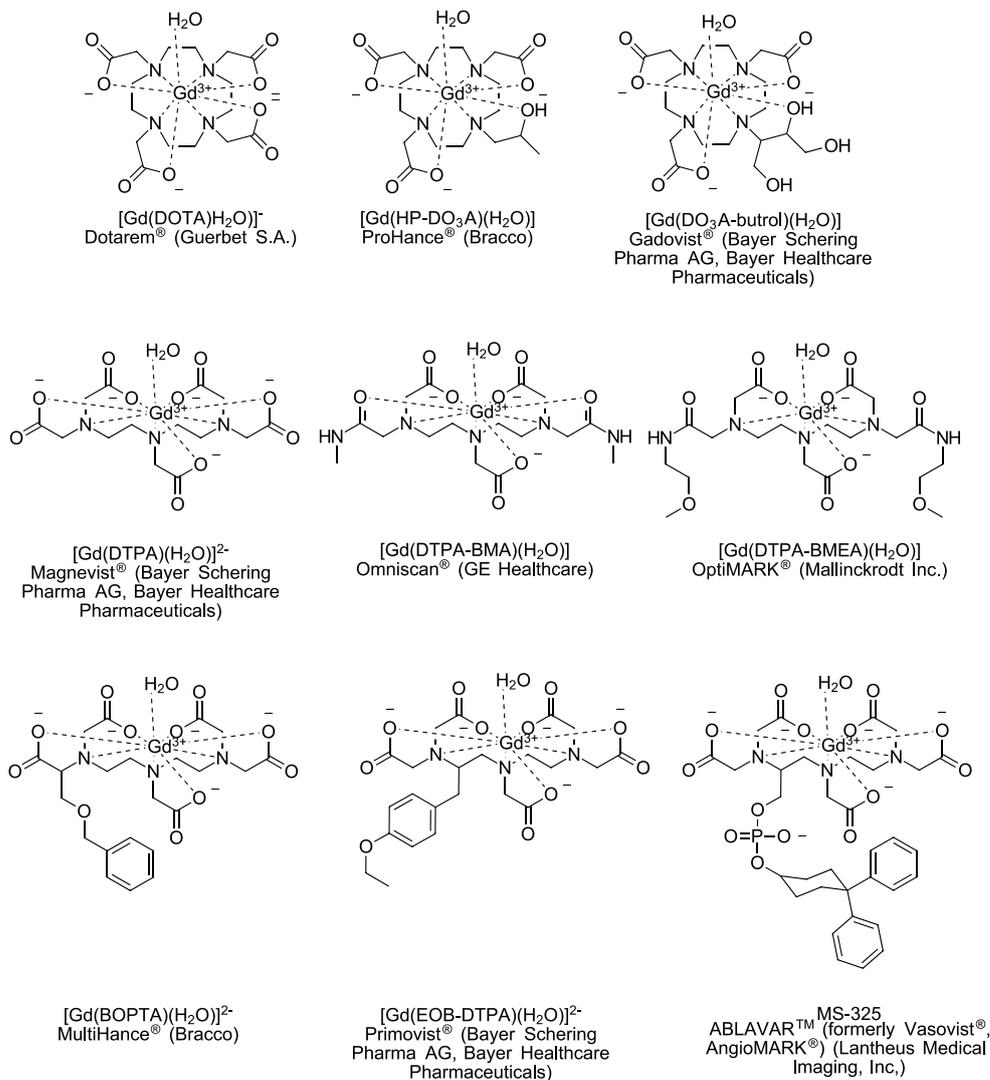


Figura 7: Medios de contraste basados en gadolinio utilizados en clínica.

- Compuestos basados en manganeso. Su estudio comenzó con el objetivo de buscar una alternativa a los compuestos de gadolinio tras el descubrimiento de la fibrosis sistémica nefrogénica (NSF del inglés *Nephrogenic Systematic Fibrosis*), una enfermedad relacionada con la liberación de este elemento. El manganeso es un metal con una menor toxicidad a bajas dosis y además es paramagnético, característica que le aporta la capacidad de alterar los espines de las moléculas de agua y así poder producir una señal ⁽¹³⁾. Sus características como agente de iRM son “más limitadas” que las del gadolinio porque tiene cinco electrones desapareados (d^5) frente a siete del gadolinio y su momento magnético es menor, por lo que los compuestos basados en quelatos de manganeso tienen tiempos menores de relajación. El único medio de contraste basado en manganeso en el mercado es el mangafodipir ($Mn(DPDP)^{2-}$), que se utiliza como contraste para imágenes del hígado y en aplicaciones basadas en la transmetalación lenta de complejos con metales presentes en líquidos corporales como son Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} y Mg^{2+} ⁽¹⁴⁾. Otra desventaja que tiene el manganeso es que una exposición a dosis elevadas puede estar relacionada con una acumulación en el cerebro originando neurotoxicidad con síntomas similares al Parkinson ⁽¹⁵⁾.
- Compuestos basados en óxidos de hierro. Más concretamente, se trata de compuestos basados en micro o nanopartículas de óxido de hierro. Estas nanopartículas funcionan como pequeños imanes móviles dentro del cuerpo, creando campos magnéticos fuertes y reduciendo considerablemente los valores de T_2 de los protones de las moléculas de agua próximas. Se produce un contraste negativo de la zona de interés ⁽¹⁶⁾.
 - Óxidos de hierro de tamaño de micras (MPIO)
 - Óxidos superparamagnéticos de hierro (SPIO): Tienen un diámetro que varía desde los 50 nm hasta varias micras.
 - Ultra pequeños óxidos superparamagnéticos de hierro (USPIO): Tienen un diámetro menor de 50 nm.

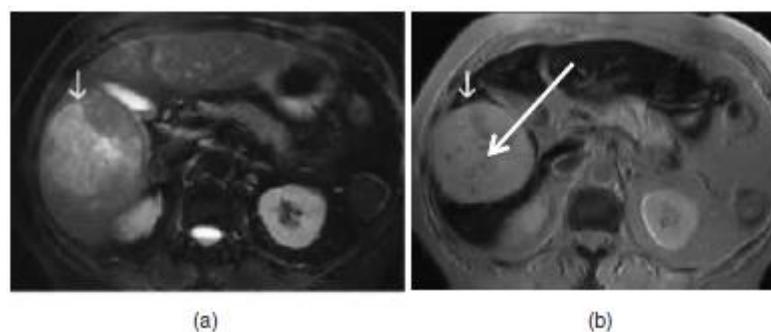


Figura 8: iRM de hígado en ausencia (a) y en presencia (b) de partículas de óxidos de hierro.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Clasificación de los medios de contraste

- Agentes de transferencia de saturación por intercambio químico (CEST) (Fig. 9). Son moléculas que poseen protones (grupos -NH u -OH) que se pueden intercambiar con otros protones del agua de manera selectiva y así disminuir la señal producida por el medio acuoso de la zona de interés, provocando efectos localizados visibles en iRM. Se utilizan pulsos selectivos para que sólo afecte a los protones intercambiados sin afectar al resto de protones de la zona de interés ⁽¹⁷⁾. Un ejemplo descrito es el iopamidol (Isovue), que además de ser un compuesto utilizado en rayos X, se puede utilizar en iRM porque tiene protones de amidas y grupos hidroxilos que favorecen un intercambio de estos con el medio en función del pH de trabajo ⁽¹⁸⁾.

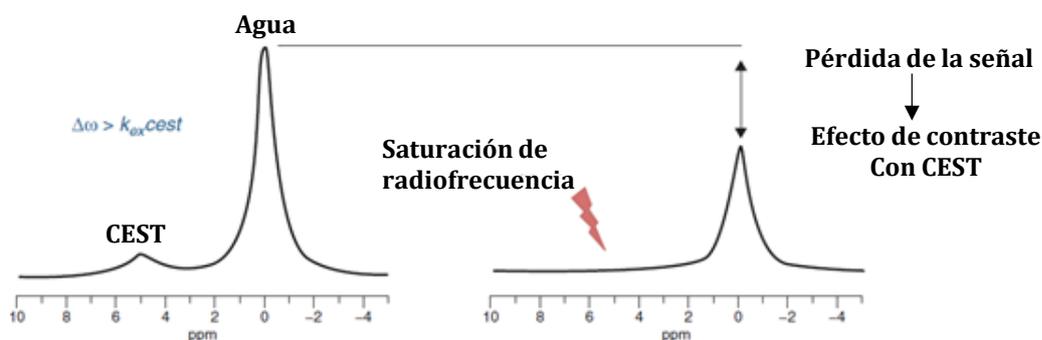


Figura 9: Comportamiento de Agentes CEST.

- Agentes de transferencia de saturación por intercambio químico con elementos paramagnéticos (PARACEST) ⁽¹⁹⁾.
- Agentes de transferencia de saturación por intercambio químico con un sustrato que se une mediante un enlace covalente a un elemento encargado del desplazamiento paramagnético (SUPRACEST) ⁽²⁰⁾.
- Agentes de transferencia de saturación por intercambio químico con nanopartículas (NANOCEST) ⁽²¹⁾.

- MC órgano-específicos. Aquellos medios de contraste que se utilizan para pruebas destinadas al estudio de un órgano en concreto. El caso más habitual es el hígado, para el que se utilizan medios de contraste que se eliminan mayoritariamente por vía hepática, de manera que se puede observar el hígado y las zonas cercanas a este.
 - Liposomas. Esferas microscópicas de grasa que envuelven a un medio de contraste, lo que permite alcanzar órganos como hígado, bazo y ganglios linfáticos. Estos órganos captan los liposomas por los fagocitos y de esta manera son capaces de permanecer un tiempo hasta que los liposomas desaparecen y el medio de contraste se elimina ⁽²²⁾.
 - Nanopartículas. Partículas con un tamaño de 100 nm o menos. Tanto el mecanismo de captación como su distribución son similares a los de los liposomas.
 - Nanopartículas basadas en gadolinio ⁽²³⁾.
 - Dendrimeros. Polímeros esféricos con estructura de ramas que tienen unas propiedades similares a nanopartículas ⁽²⁴⁾. Presentan un número de iteraciones (generaciones) definido por un monómero que está en el centro de la estructura polimérica. Presenta muchos puntos reactivos de unión, utilizados para dar una especificidad a los compuestos.
 - Biopolímeros. Están formados por proteínas y/o ADN que tienen quelatos de gadolinio conjugados. Estas macromoléculas mejoran su funcionalidad porque aumenta el número de iones de gadolinio unidos a cada molécula ⁽²⁵⁾.
- MC funcionales (*Molecular Imaging*). Son sustancias capaces de marcar un proceso bioquímico o fisiológico determinado y hacerlo visible mediante la técnica de imagen adecuada, debido a la incorporación de algún elemento que proporciona contraste.
 - Compuestos basados en radioisótopos. Estos compuestos se generan marcando con ciertos elementos químicos (radioisótopos) una serie de sustancias que se introducen en el interior del organismo produciendo una emisión de radiación. El compuesto final obtenido debe ser químicamente igual, debe tener la misma actividad y comportamiento farmacocinético que el predecesor y debe ser metabólicamente estable. La distribución de éste en el organismo da información de su localización y metabolismo. Estos compuestos se utilizan tanto en diagnóstico como en terapia y se caracterizan por tener una gran actividad específica, además de una gran selectividad para procesos biológicos específicos ⁽²⁶⁾.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por rayos X

Imagen por rayos X

1. *Historia y fundamento teórico*

Esta técnica tuvo sus orígenes, como se ha comentado anteriormente, cuando Roentgen descubrió los rayos X en 1896. Pero no fue hasta 1960 cuando se consiguió un dominio completo de su uso en el campo del diagnóstico y en terapia.

Posteriormente, en 1972, Hounsfield desarrolló el primer escáner TAC. De esta manera, se solucionaron algunos problemas que tenía la técnica convencional de rayos X relacionados con la obtención de imágenes en dos dimensiones en una película fotográfica. Se consiguieron imágenes en tres dimensiones haciendo uso de detectores electrónicos, y a través de la eliminación de la superposición de tejidos con una densidad parecida, lo que da lugar a una gran diferenciación de estos (Fig. 10).

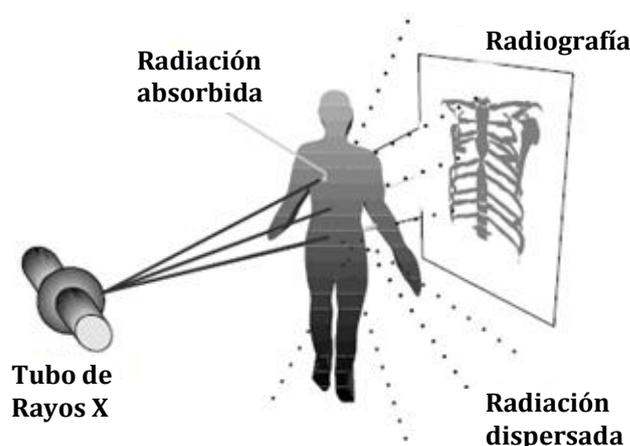


Figura 10: Técnica convencional de rayos X (radiografía 2D).

La base de esta técnica son los rayos X, una radiación electromagnética que tiene una gran energía capaz de ionizar los átomos sobre los que se incide. Al ser un tema relacionado con la fotografía, es necesario optimizar la cantidad de radiación empleada sobre la zona de interés; ya que una sobreexposición o una exposición baja podría originar imágenes que no tuvieran una buena resolución, como se puede ver en la figura 11.

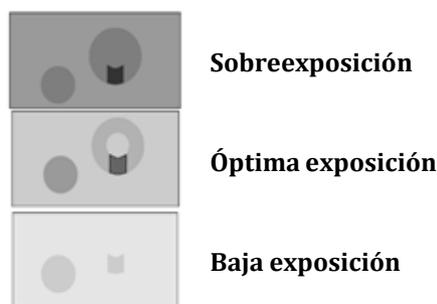


Figura 11: Efecto de la exposición en una película fotográfica.

Las imágenes obtenidas con esta técnica dependen de una serie de factores como son el contraste utilizado, la resolución necesaria y la dosis administrada. En cuanto al primer factor, los medios de contraste son por definición sustancias que producen cambios en la intensidad relativa de la radiación incidente aplicada, produciendo una mejora de la visualización de ciertos tejidos o regiones que los seres humanos no serían capaces de observar sin su utilización.

Para el procesado de las imágenes se utiliza una transformación matemática que describió Radón en 1917 ⁽²⁷⁾, las transformadas de Fourier. Esto permite generar una imagen a partir de datos obtenidos de la visualización de una zona de interés (Fig. 12). Como se puede ver en la siguiente figura, en este proceso se analizan secciones transversales obtenidas desde diferentes ángulos y así se genera una matriz de datos conocida como “espacio k”. De esta manera, se pueden obtener imágenes en varias dimensiones de la zona del cuerpo humano que se quiere estudiar, con una resolución que mejora con el número de secciones analizadas.

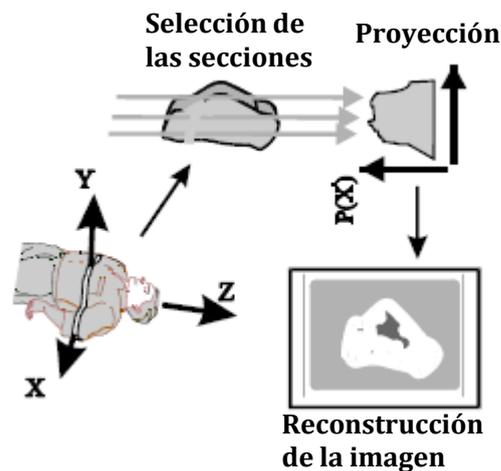


Figura 12: Proceso de tomografía.

El segundo factor que se mencionó anteriormente es la resolución necesaria, que se puede conseguir modificando parámetros como el número de proyecciones utilizado para formar el “espacio k”. Como se puede ver en la figura 13, es posible conseguir una mayor resolución del objeto de estudio visualizado, variando el número de proyecciones, de forma que se incremente la matriz de datos resultante, teniendo una información más compleja. Cuanto más delgadas y localizadas sean las secciones, se consigue una mayor diferenciación de tejidos, huesos u órganos, que podrían estar superpuestos si se utilizara una única sección como en los orígenes de la técnica. Una limitación que tiene la técnica es la generación de interferencias producidas por los movimientos involuntarios de los pacientes durante las exploraciones médicas, ya que pueden alterar las posiciones relativas de las secciones estudiadas y distorsionar los resultados obtenidos.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por rayos X

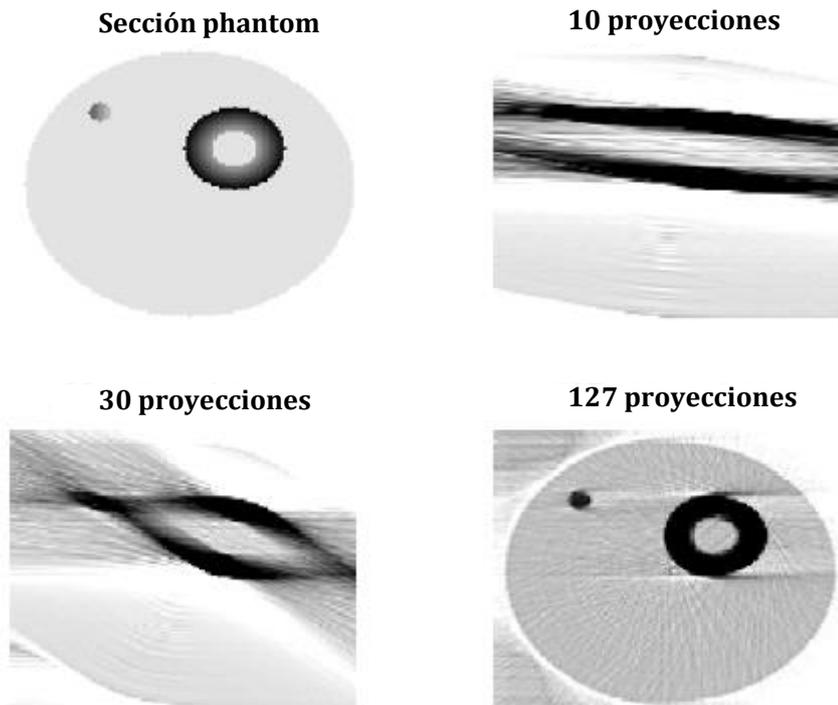


Figura 13: Reconstrucción tomográfica.

El tercer factor corresponde a la dosis administrada al paciente. Esta es una gran limitación de la técnica debido a la necesidad de una elevada dosis de radiación ionizante en cada prueba médica. Por el contrario, tanta cantidad de fotones hace que sea la técnica de diagnóstico por imagen con una mejor relación señal/ruido.

En términos de energía, si un fotón visible tiene una energía de 2 eV, los fotones de los rayos X aplicados en medicina tienen una energía en torno a 80 keV. Debido a esta elevada energía, existe una interacción débil con los tejidos biológicos y la radiación afecta únicamente a los átomos hacia los que se dirige, pero sin afectar a los estados moleculares ni a los celulares. Esta es la explicación del por qué algunos tejidos y órganos, como el hígado o el riñón, no se aprecian realmente bien. Aun así, es importante intentar reducir la cantidad de radiación utilizada con el objetivo de minimizar el riesgo para el paciente.

Con el paso del tiempo, se ha ido mejorando la técnica consiguiendo grandes progresos basados en un aumento de la resolución, una disminución del tiempo de análisis y, sobre todo una mayor seguridad para el paciente. Esto se consiguió entre otras invenciones, gracias a la digitalización de la técnica, lo que permite a los radiólogos determinar las zonas exactas donde focalizar los rayos X en terapia de células tumorales sin afectar a los tejidos circundantes.

Con la optimización de los equipos se consiguieron unas reducciones de los tiempos para obtener las imágenes de las zonas de interés, llegando a tardar 0,2 segundos por sección analizada.

En cuanto a la protección del paciente y de los especialistas que realizan los estudios, se ha conseguido una reducción de la dosis de radiación ionizante utilizada, se ha aumentado el conocimiento de la técnica y, desde 1928 es obligatorio llevar a cabo una evaluación de la necesidad de la realización de la prueba de estudio. Fue en este año cuando se creó la Comisión Internacional de Protección Radiológica (ICRP, del inglés *The International Commission on Radiological Protection*) para evaluar los riesgos de la radiación ionizante en los humanos y establecer los límites de exposición permitidos ⁽²⁸⁾.

Al final de la Segunda Guerra Mundial se pudo estudiar el efecto de la exposición de personas a grandes dosis de radiación ionizante en los supervivientes de las explosiones atómicas de Hiroshima y Nagasaki. Después de esta catástrofe, se pudo observar que la exposición de una persona a dosis elevadas durante semanas o meses podía causar su muerte y/o tener efectos biológicos agudos. Años después también se concluyó que exposiciones a dosis mucho menores podría producir daños genéticos, un acortamiento de la vida o carcinogénesis.

La "ICRP" elaboró tres normas de utilización de la radiación ionizante para este tipo de exploraciones que consistían en la evaluación del beneficio de utilizar la radiación ionizante, aplicar el término "ALARA" (tan bajo como sea razonablemente alcanzable, del inglés *As Low As Reasonably Achievable*) y que, en circunstancias especiales en las que se necesitara aumentar la dosis administrada, dicha decisión fuera supervisada y aprobada por la "ICRP".

Aunque es una técnica segura para los pacientes y el personal encargado de llevar a cabo estas exploraciones, hay que aceptar que hay un mínimo riesgo asociado a la utilización de esta radiación ionizante.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por rayos X

2. Equipamiento

La radiación ionizante dispersada es uno de los mayores problemas de seguridad para la salud y el bienestar de los pacientes y los especialistas, por lo que existen diferentes medidas para reducirla. Sin embargo, estas medidas conllevan un aumento del tiempo de exposición y de la dosis para compensar la dispersión existente, ya que solamente un 1 % de la energía incidente se convierte en energía útil. Como se puede ver en la figura 14, existen diferentes mejoras en los equipamientos como el uso de un diafragma que limita el paso del haz de luz con el fin de exponer únicamente la zona de interés y no otras partes del cuerpo humano (a). Otra opción es la deformación de la zona de estudio para reducir la longitud del trayecto de la radiación (b); utilizada en mamografía. También se utiliza una rejilla anti-dispersión, que está hecha de plomo y permite reducir la radiación primaria y así parar los rayos dispersados (c). La última de las opciones es aumentar el espacio de aire con el fin de disminuir el flujo de la radiación y de esta manera reducir la cantidad de rayos dispersados (d).

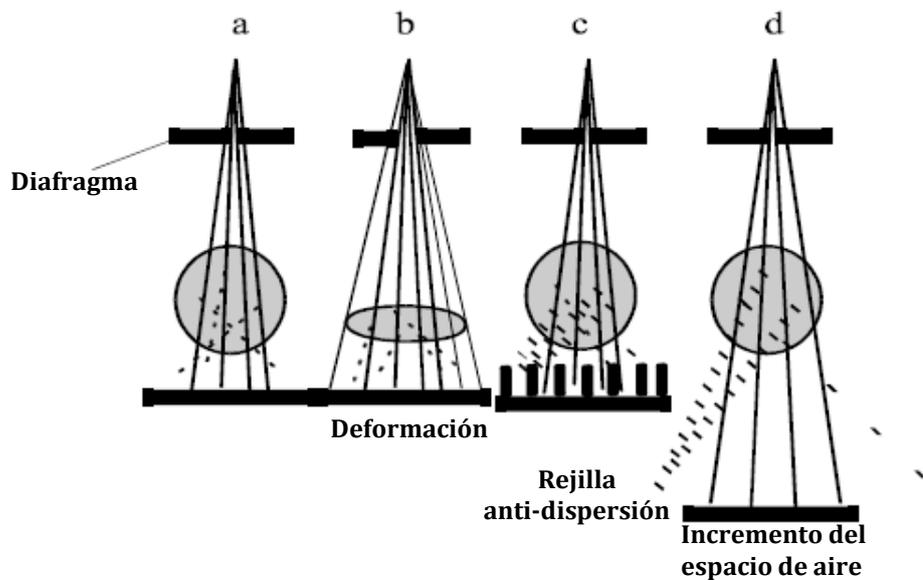


Figura 14: Formas de corregir la dispersión de radiación.

De forma resumida, los equipos de rayos X están formados por un tubo de rayos X que actúa de fuente de la radiación y un detector que recibe los fotones que han pasado a través de la zona de estudio de la técnica.

Los tubos de rayos X producen electrones con un voltaje entre 30 y 150 kV, haciendo que estos adquieran una energía cinética de la misma magnitud en keV, además de una generación de calor y un espectro de radiación electromagnética. El consumo eléctrico de los tubos suele ser de unos 10 kW y, debido a esto, existe un gran problema con el calor producido. Por ello, y también por la posibilidad de girar el ánodo entre 2000 y 3000 rpm, es necesario el uso de una refrigeración con agua, aceite o un enfriamiento radiativo. Por estas razones, el material del que está formado el ánodo debe ser de elementos con elevado punto de fusión como tungsteno y rutenio.

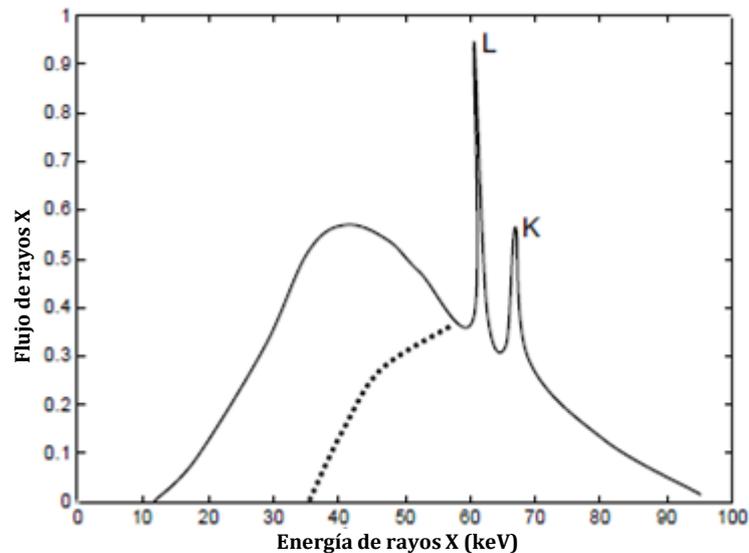


Figura 15: Espectro de energía de rayos X.

Al utilizar un tubo de rayos X con tungsteno como ánodo y un voltaje de 100 keV, se pueden observar los picos característicos en el espectro de energía. *K* es el pico característico de la emisión y *L* es la línea de transición atómica causada por la pérdida del electrón por parte del átomo. La línea discontinua corresponde al efecto del filtro de aluminio en el espectro del rayo dispersado (Fig. 15).

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por rayos X

A continuación, se puede apreciar un esquema de la formación de radiación en un tubo de rayos X con un ánodo giratorio (Fig. 16).

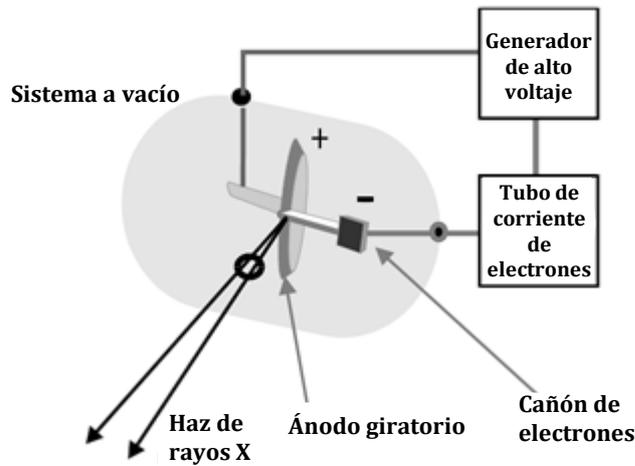


Figura 16: Generación de radiación en tubo de rayos X con ánodo giratorio.

Se puede conseguir un aumento de la resolución si la fuente de radiación fuera lo más delgada posible y continua, para evitar así una emisión de rayos en varias direcciones que puedan interferir en la medida. En la figura 17 se muestra una comparativa del uso de una fuente delgada y una más gruesa, y se aprecia que la imagen de la delgada no presenta tantas distorsiones en la forma como la otra. Una excepción relacionada con las fuentes de radiación es su aplicación en la odontología, ya que se requiere una radiación menos potente porque la zona de interés es más estrecha y el tubo no necesita giro durante el análisis, por lo que no hay tanta dispersión de la radiación.

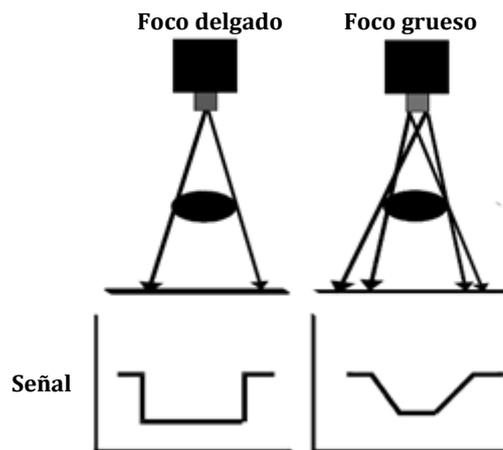


Figura 17: Incremento de la resolución. Foco de radiación delgado (izq.) y foco de radiación grueso (der.).

En cuanto a los tipos de detectores utilizados en la técnica de rayos X, se pueden destacar los detectores electrónicos, detectores de fotones, detectores de ionización, detectores de centelleo y detectores de semiconductor (o de estado sólido).

Los detectores electrónicos son aquellos que utilizan el sumatorio de los fotones emitidos como pares de electrón-ion generados y su posición en el momento de recepción de los datos. La gammacámara utiliza este tipo de detector.

Los detectores de fotones utilizan una fuente de radiación de rayos X, que emite fotones capaces de provocar una liberación de electrones de los átomos sobre los que se aplica la radiación, emitiendo una energía que se puede medir y cuantificar. Se puede amplificar la señal por medio de intensificadores (Fig. 18), que son láminas de elementos pesados de titanato de bario o sulfuro de zinc entre otros, que utilizan la energía de los fotones para formar estados inestables de los átomos pesados al perder un electrón y así conseguir una emisión de un espectro de fotones visibles que son fluorescentes o fosforescentes. Estos electrones se pueden reemitir hacia otros átomos y así provocar una lluvia de entre 100 y 1000 fotones con energías entre 2 o 3 eV (fotones de luz azul), produciendo una amplificación de la señal obtenida. Como se comentó anteriormente, se suele utilizar una pantalla anti-dispersión para reducir las interferencias.

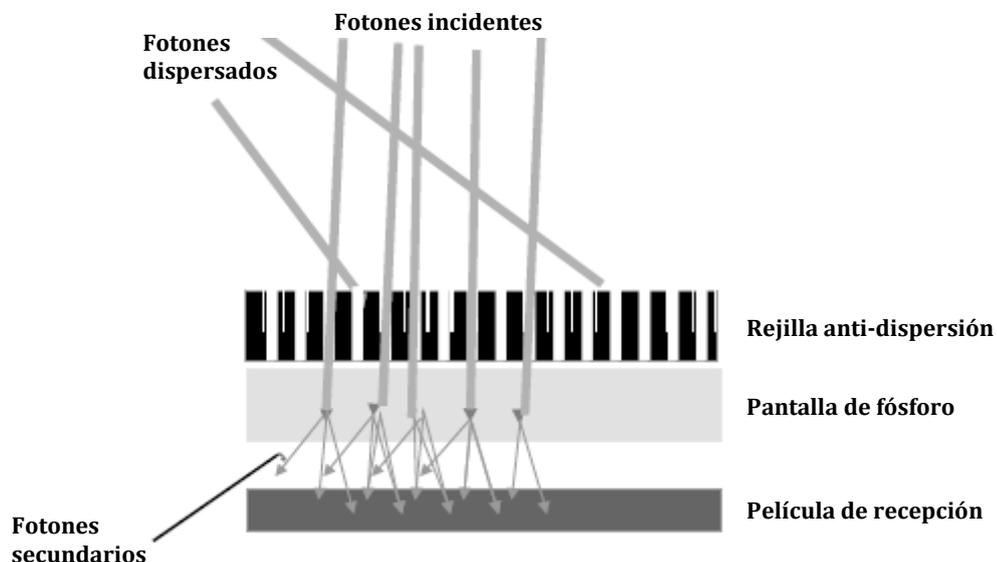


Figura 18: Esquema de pantalla intensificadora.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por rayos X

Los detectores de ionización (Fig. 19) se basan en la capacidad de los rayos X para producir pares de electrón-ion, con la posibilidad de generar reacciones de ionización por parte de los electrones liberados sobre otros átomos. Recolectando las cargas secundarias generadas y su intensidad se podría registrar la intensidad de la radiación ionizante incidente. Estos detectores tienen en su interior una cámara llena de un gas con elevado número atómico, como xenón o criptón, con la finalidad de poderse ionizar al aplicar un campo eléctrico entre el electrodo y una pared metálica de la cámara. Los electrones liberados se aceleran con un campo eléctrico hacia el ánodo y los átomos cargados positivamente se desplazan hacia el cátodo; de esta manera se genera un pulso que se puede medir en forma de corriente eléctrica que se percibe en un circuito externo. Una opción para aumentar la eficiencia de la técnica es utilizar la ionización de filamentos metálicos con alto número atómico y así comenzar a formar los pares de electrón-ion del gas del interior de la cámara. Este tipo de detectores se puede utilizar en técnicas de rayos X convencionales, TAC y en cámaras de PET.

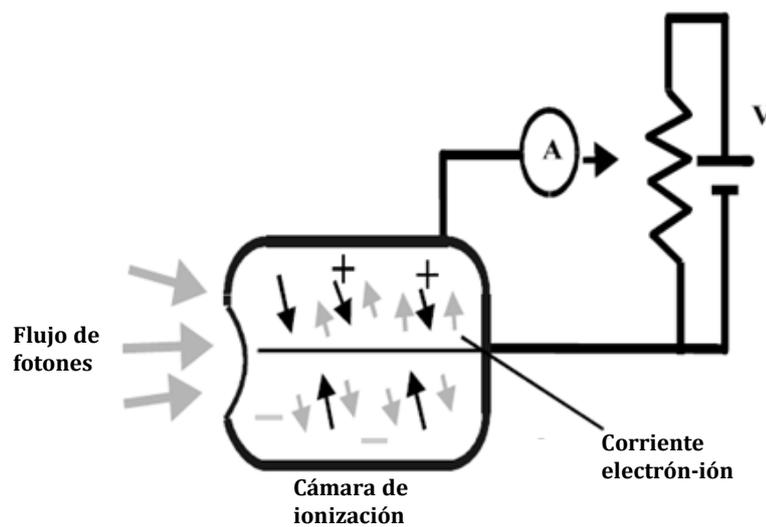


Figura 19: Detector por ionización de fotones.

Los detectores de centelleo (Fig. 20) cuentan con un cristal de centelleo que convierte la radiación incidente en luz visible y medible; este cristal suele ser inorgánico, de yoduro sódico dopado con talio u otro compuesto orgánico como antraceno o tolueno. Otro componente que tienen estos detectores son los fotomultiplicadores, que son fotocátodos (dispositivos que tienen como función la descarga de electrones cuando se expone ante una señal luminiscente). Según avanza la señal luminosa en el detector, los fotocátodos están cada vez más cargados que sus predecesores y de esta manera se genera una lluvia en forma de cascada de fotones visibles de 2 eV. Esto se traduce en una corriente eléctrica amplificada que se puede medir. Un problema de este tipo de detectores es su baja sensibilidad. Una aplicación de estos detectores es en las gammacámaras.

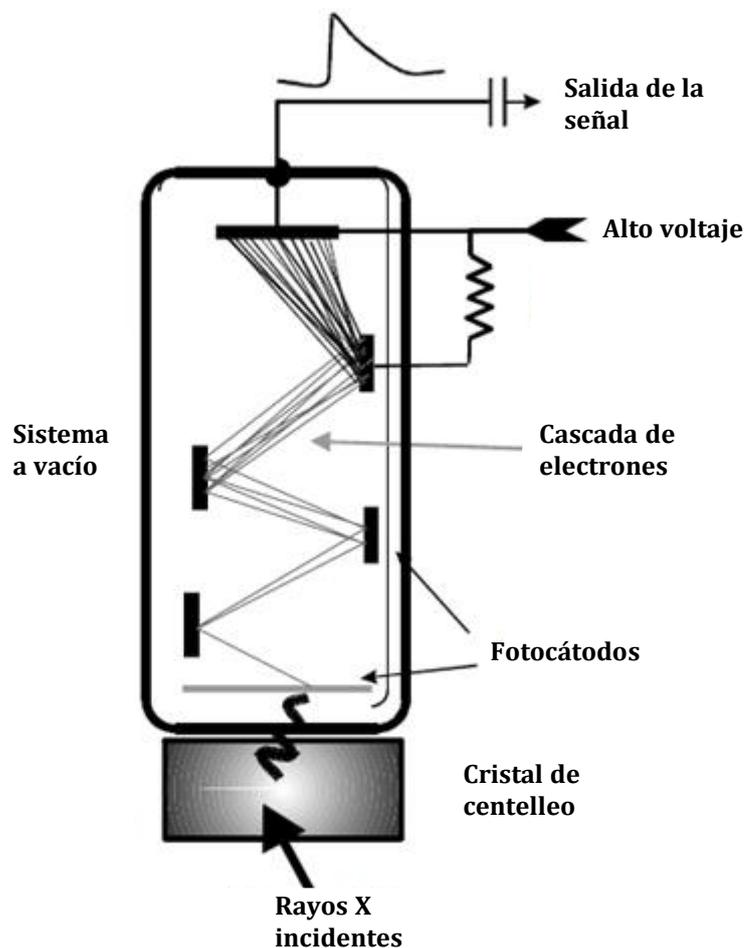


Figura 20: Detector de centelleo.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por rayos X

Los detectores de semiconductores (o de estado sólido) (Fig. 21 y 22) utilizan una combinación de los detectores comentados con anterioridad, ya que utiliza la radiación ionizante incidente sobre un elemento semiconductor que está hecho de silicio o germanio con la finalidad de generar las uniones electrón-ion que se aceleran con unos componentes eléctricos, produciendo una amplificación observable en forma de una corriente de pulsos. Los fotones que son emitidos desde la zona de estudio del paciente llegan a una pantalla fluorescente de entrada que actúa de fotocátodo, amplificando la señal y orientando los fotones hacia una ventana de titanio que no permite su dispersión. Posteriormente, los fotones chocan con una fina pantalla fluorescente de yoduro de cesio y se crea una cascada de fotones visibles de 25 kV hacia una pantalla fluorescente de salida, que tiene un diámetro pequeño y actúa como una cámara de televisión. Está diseñado para eliminar la dispersión de los electrones y por esta razón, el equipo tiene que estar a vacío y protegido de interferencias magnéticas. Las imágenes que se obtienen son de buena calidad, consiguiendo una reducción en la exposición de radiación sobre el paciente.

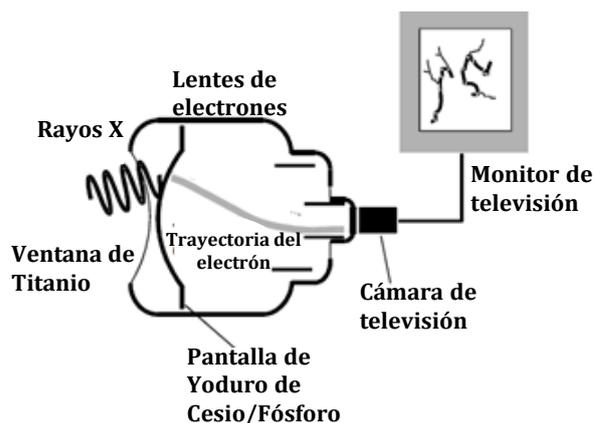


Figura 21: Esquema de un detector de semiconductores.



Figura 22: Equipo moderno con detector de semiconductores de estado sólido con amplificador y tubo de rayos X montado en estructura con forma de C.

Los escáneres que se utilizan en el diagnóstico por imagen han tenido una evolución histórica, pudiéndose distinguir claramente varias generaciones de estos.

En la primera generación, el EMI CT1000 fue el primero en comercializarse. Únicamente utilizaba una proyección almacenada después de incidir los rayos X hacia el paciente. Tenía la desventaja de no tener capacidad de rotación sobre el paciente, por lo tanto, necesitaba una gran cantidad de tiempo para conseguir realizar diferentes proyecciones y conseguir una mejor imagen.

Posteriormente, en la segunda generación, se crearon escáneres con capacidad rotatoria mecánica sobre el paciente, pero, aun así, tardaban unos cinco minutos en obtener la imagen de cada sección. Se requería más de una hora para un análisis completo de la zona estudiada debido a la necesidad de estudiar muchas secciones y la existencia de artefactos generados por el movimiento de los pacientes, como la respiración o movimientos involuntarios.

En la tercera generación, se consiguieron escáneres capaces de conseguir imágenes simultáneas de todo el cuerpo humano utilizando unas fuentes de rayos X giratorias alrededor del paciente y unos detectores pequeños que están colocados unos a continuación de otros. Estos detectores permiten conseguir una resolución del orden de un milímetro y pueden ser de xenón, teniendo una baja eficiencia, pero alta estabilidad; tubos de yoduro de sodio alternados con componentes eléctricos PN, siendo muy eficientes, pero con una menor vida útil; o detectores semiconductores de germanio y bismuto, que son poco estables. Una limitación que tienen estos escáneres es la incapacidad de generar imágenes en tres dimensiones ya que se limita a la generación de imágenes bidimensionales (Fig. 23).

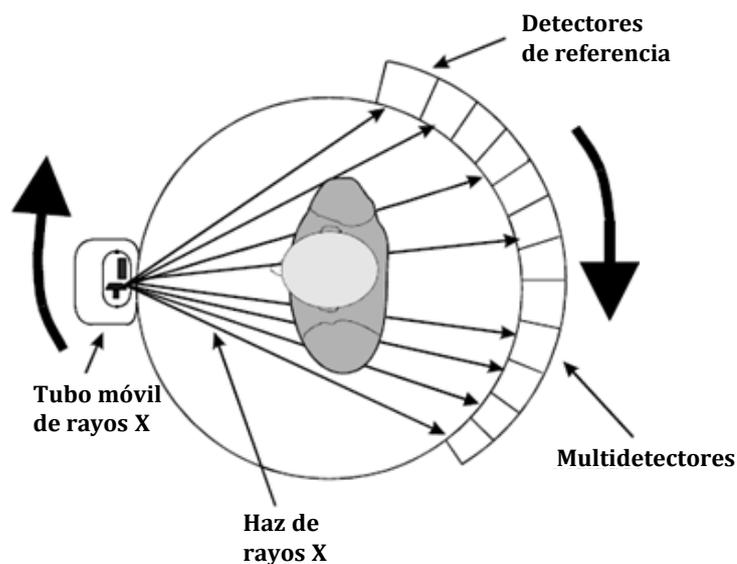


Figura 23: Escáner de rayos X-TAC de tercera generación.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por rayos X

Posteriormente, apareció la tomografía axial computarizada helicoidal, que mejoró la tecnología anterior, ya que además de tener una fuente de rayos X giratoria, los pacientes se mueven también en el eje longitudinal, haciendo que se puedan obtener imágenes en tres dimensiones en un tiempo menor que los escáneres anteriores. Otra ventaja de estos escáneres es la posibilidad de eliminar los artefactos producidos durante el análisis, generalmente debidos a movimientos involuntarios del paciente (Fig. 24).

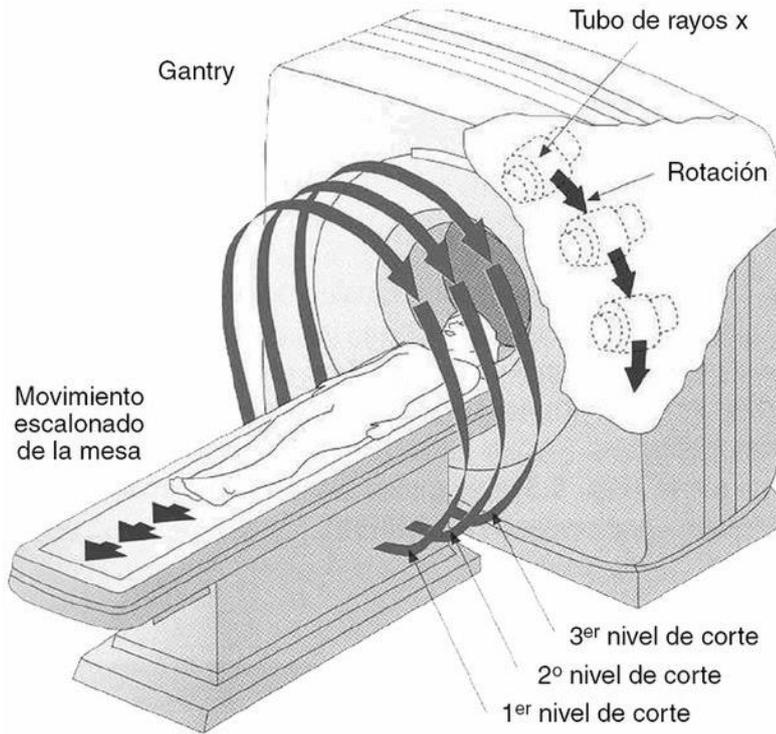


Figura 24: Tomografía axial computarizada helicoidal.

3. Medios de contraste en Rayos X

El uso de medios de contraste en el campo del diagnóstico por imagen con rayos X tiene el objetivo de mejorar la visualización de diferentes tipos de tejidos blandos como la médula espinal, el hígado, la vejiga, el intestino o vasos sanguíneos, modificando la atenuación de los rayos X cuando se incide sobre la zona que se pretende estudiar. Esto es debido a que la absorción fotoeléctrica producida por los rayos X crece favorablemente cuando aumenta el número atómico (Z) y, de la misma manera, se consigue una mayor atenuación de la imagen en la zona donde se acumula el medio de contraste administrado.

Un ejemplo de este comportamiento es el de los medios de contraste que tienen átomos de yodo, ya que estos se introducen en la corriente sanguínea antes de la aplicación de los rayos X y de esta manera aumenta la atenuación de la sangre y se pueden obtener mejores imágenes de tejidos blandos. Como el número atómico promedio de los tejidos blandos y de la sangre es 7 y el yodo tiene un número atómico de 53, si se administra una disolución de 1% de yodo se conseguiría un aumento del contraste de 250 veces, según la ecuación del efecto fotoeléctrico comentada anteriormente (Ecuación 1), en la que Z es la relación de los números atómicos ($53/7$) y E es la energía del fotón arrancado (10 keV).

Otro ejemplo es la aplicación de compuestos de bario en pruebas de diagnóstico por imagen de intestino.

Históricamente, se comenzaron a utilizar los medios de contraste en la técnica de rayos X desde que se estudió el tracto urinario ⁽²⁹⁾. Posteriormente, en 1917, D. Cameron recomendó el uso de yoduro sódico y potásico para estudios de pielografía ⁽³⁰⁾. En 1923 se comenzó a estudiar la administración oral e intravenosa de yoduro sódico para visualizar el tracto urinario ⁽³¹⁾.

Más tarde, se estudiaron los anillos de piridina yodados por su selectiva excreción por el hígado y riñón; por esta razón los llamaron "*Selectans*" y fueron utilizados para el tratamiento de infecciones de riñón y vesícula biliar. También se consideró su valor para poder visualizar las vías urinarias por rayos X al tener átomos de yodo.

El primer medio de contraste no iónico con administración intravenosa utilizado con éxito para urografía fue el derivado de *N*-metil-5-yodo-2-piridona (*selectan*); pero se prefirió utilizar un medio de contraste con menor toxicidad y mayor solubilidad como fue la sal sódica del derivado 5-yodo-5-piridona-*N*-acetato (*Uroselectan*), cuya patente fue publicada en mayo de 1927 por R  th.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por rayos X

Dos años después, Brinz y R ath modificaron el anillo de piridina añadiéndole dos átomos de yodo sintetizando diodrast (Diodone) y neo-ipax (Uroselectan B, Iodoxy). Schering Kahlbaum se convirtió en el principal fabricante mundial de medios de contraste intravasculares con estos medios de contraste que fueron utilizados en urograffa durante veinte años.

Intentando reducir la toxicidad, se sintetizó el acetrisoato de sodio (Urokon, Diaginol), que se us  en clínica desde 1952 por Mallinckrodt, siendo el primer medio de triyodado ⁽³²⁾.

Posteriormente, en 1956, se demostró que con un segundo grupo acetilo añadido a un anillo aromático totalmente sustituido con los tres átomos de yodo se reducía la toxicidad ⁽³³⁾. De esta manera surgió el diatrizoato sódico, que se introdujo en el mercado a mediados de los años 50 como Urografin (Schering AG), Renogarfin (Squibb) y Hypaque (Sterling Drug), convirtiéndose en el principal medio de contraste intravascular hasta el desarrollo de los medios de contraste de baja osmolaridad y los no iónicos en los años 70.

T. Alm n demostró que una alta osmolaridad está directamente relacionada con la toxicidad de los compuestos, por lo que a partir de ahí comenzó a realizarse el estudio de una serie de compuestos con una menor osmolaridad sustituyendo para ello los grupos ionizables por grupos no ionizables como amida ⁽³⁴⁾. De esta manera, se consiguió un aumento de la solubilidad en agua a la vez que la hidrofilia, reduciendo los valores de viscosidad. En 1969, después de pruebas biológicas y farmacológicas, se comenzó a comercializar el primer medio de contraste de baja osmolaridad, el Amipaque (metrizamida) ⁽³⁵⁾. Este tenía un gran inconveniente y es que era inestable en disolución, por lo que no podía ser autoclavado. Para solucionar este inconveniente se aisló por liofilización y se utilizó como medio de contraste para mielografía.

Su elevado coste de fabricación y su incompatibilidad para estudios vasculares trajeron consigo el descubrimiento a mediados de los años 70 de los medios de contraste de baja osmolaridad de segunda generación. Entre estos cabe destacar el iohexol (Omnipaque) y el iopamidol (Niopam), que son más fáciles de producir y más baratos ⁽³⁶⁾ al no tener el radical de glucosa y ser estables en disolución.

Posteriormente, para reducir más la osmolaridad, se tuvo la idea de unir dos moléculas no iónicas (monómeros) por medio de un enlace covalente para producir un dímero con seis átomos de yodo. Entre estos compuestos están el iodixanol (Visipaque) y el iotrolan (Isovist), que tienen una osmolaridad similar al plasma a cualquier concentración ⁽³⁷⁾, lo que hace que sean menos nefrotóxicos ⁽³⁸⁾.

4. Pruebas médicas

Para la técnica de diagnóstico por imagen de rayos X existe una gran cantidad de pruebas médicas. Algunas de las más utilizadas son las que se describen a continuación:

- Radiografía estándar. Es aquel estudio de diagnóstico por imagen del interior de un ser humano en el que se aplica una radiación de rayos X a un paciente para obtener una imagen de la zona de estudio deseada. La gran ventaja es que es una técnica rápida. Algunos ejemplos de imágenes obtenidas con esta técnica son las siguientes (Fig. 25-27).



Figura 25: Imagen obtenida en una radiografía de manos.



Figura 26: Imagen obtenida en una radiografía dental.



Figura 27: Imagen obtenida de una radiografía de columna vertebral.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por rayos X

- Angiografía. Es aquel estudio de diagnóstico por imagen de los vasos sanguíneos de un ser humano en el que se utiliza un medio de contraste para aumentar la resolución y así poder detectar problemas relacionados con enfermedades del corazón. Las especialidades más frecuentes de esta técnica son la arteriografía (imágenes de arterias) y venografía (imágenes de venas). Algunas imágenes obtenidas con esta técnica son las siguientes (Fig. 28 y 29).



Figura 28: Imagen obtenida en una angiografía con contraste.

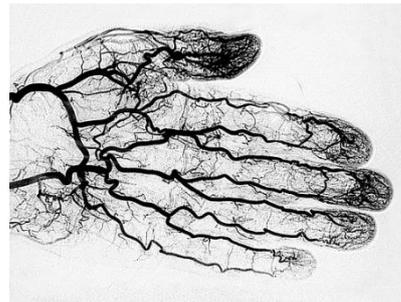


Figura 29: Imagen obtenida en una angiografía con contraste de una mano.

- Cistografía. (Fig. 30). Es aquel estudio de diagnóstico por imagen de la vejiga utilizando una inserción en esta de un catéter para administrar un medio de contraste y posteriormente irradiar con rayos X. Se realiza este estudio para determinar causas de infecciones y para realizar una exploración de la existencia o no de tumores o cálculos.



Figura 30: Imagen obtenida en una cistografía.

- **Colecistografía.** Es aquel estudio de diagnóstico por imagen de la vesícula biliar (Fig. 31). Se administra un medio de contraste que se elimina selectivamente por vía hepática para mejorar su imagen. Esta técnica fue desarrollada por Graham, Cole y Copher en 1924.



Figura 31: Imagen obtenida en una colecistografía.

- **Colangiografía.** Es aquel estudio de diagnóstico por imagen de las vías biliares, que transportan la bilis desde el hígado hasta la vesícula biliar y el intestino delgado (Fig. 32). Se administra un medio de contraste con la finalidad de mejorar la calidad de la imagen de la zona de interés estudiada.



Figura 32: Imagen obtenida en una colangiografía.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por resonancia magnética nuclear (iRM)

Imagen por resonancia magnética nuclear (iRM)

1. *Historia y fundamento teórico*

La técnica de diagnóstico por imagen conocida como imagen por resonancia magnética es una técnica no invasiva en la que el paciente no es sometido a una radiación ionizante. Sus inicios datan de 1946, cuando varios grupos de investigación liderados por Bloch y Purcell descubrieron este fenómeno durante el estudio de las propiedades magnéticas del núcleo de los átomos. Observaron que los momentos magnéticos nucleares en estado líquido o sólido de los átomos se modificaban variando las propiedades físicas y químicas de los átomos colindantes; un hallazgo que los llevó a compartir el Premio Nobel de física en 1952 ⁽³⁹⁾⁽⁴⁰⁾.

Inicialmente, esta técnica se denominó resonancia magnética nuclear espacialmente localizada, pero con objeto de acortar el término pasó a denominarse técnica de imagen por resonancia magnética.

En 1952 Hahn descubrió la técnica espín-eco, un gran avance que se basa en el uso de la resonancia magnética pulsada ⁽⁴¹⁾. Su funcionamiento se describirá más adelante con mayor detalle.

Entre los años 1950 y 1972 se desarrolló y mejoró la técnica de espectroscopía de resonancia magnética nuclear, pero no fue hasta principios de los años 70 cuando se comenzó a utilizar la técnica de iRM en grupos de investigación de Europa y América.

R. Damadian, en 1972, presentó una patente donde reivindicaba el concepto de iRM para la detección del cáncer ⁽⁴²⁾.

En 1973 Lauterbur publicó las primeras imágenes de un dedo humano en *Nature*, aunque los evaluadores la descartaron inicialmente por falta de utilidad. Más tarde, en 1977, Damadian publicó imágenes de un cuerpo humano entero por primera vez en la historia ⁽⁴³⁾.

Hasta ese momento, la gran limitación de la técnica consistía en el tiempo necesario para obtener una imagen; pero con las técnicas conocidas como turbo espín-eco (TSE) y la imagen eco-planar (EPI) se consiguió disminuir considerablemente el tiempo necesario para adquirir la imagen de cada sección.

Desde 1990 la técnica se ha convertido en una de las técnicas más utilizadas por los especialistas por su reducido riesgo para el paciente y la capacidad de obtención de imágenes con gran calidad. Las principales ventajas que tiene esta técnica frente al resto son la posibilidad de obtener imágenes en dos y tres dimensiones a tiempo real de tejidos blandos con una mejor resolución espacial ⁽⁴⁴⁾, junto con la flexibilidad de elección de la zona del paciente a estudiar ⁽⁴⁵⁾. En la actualidad existen en el mundo unos 20000 escáneres de iRM y se realizan unos 50 millones de pruebas de resonancia; de todas ellas, en un tercio se utilizan medios de contraste para mejorar las imágenes obtenidas y poder diferenciar tejidos y órganos.

A la hora de estudiar realmente el funcionamiento de iRM, no se puede tratar a los átomos individualmente, ya que cada parte de un tejido tiene muchos núcleos polarizados; por ello, el conjunto de momentos magnéticos nucleares por unidad de volumen de tejido (M) es característico de cada tejido ⁽⁴⁶⁾.

La técnica de iRM estudia los diferentes parámetros de relajación para la formación de las imágenes; uno de ellos es el tiempo de relajación longitudinal o espín-red (T_1), que se define como el tiempo que tarda M en volver al 63% del estado de equilibrio desde el momento en el que se deja de aplicar el pulso de RF. Otro parámetro importante es la relajación transversal o espín-espín (T_2), que es el tiempo que tarda la magnetización transversal en reducirse al 63% de su fuerza máxima.

Los valores de T_1 dependen de la temperatura, la naturaleza del tejido y del campo magnético aplicado (B); ya que cuanto mayor sea el campo B , los espines estarán sometidos a una energía mayor y se necesitará más tiempo para regresar al estado de equilibrio. En cambio, los valores de T_2 son independientes del campo B aplicado.

Otro parámetro que se utiliza en iRM para la diferenciación de los tejidos u órganos estudiados es la relación de densidades entre los medios, siempre teniendo como referencia el agua debido a que en medio acuoso la señal medida tiene unos valores próximos a 2 segundos. En cambio, para núcleos de hidrógeno en objetos sólidos como los huesos, la señal de RF medida tiene unos valores cercanos a 1 μ s. De esta manera se definen los límites más extremos de lo que puede ocurrir en el interior del cuerpo humano de un paciente. Esto supone una alternativa al resto de técnicas de diagnóstico por imagen para poder diferenciar con buena resolución el hígado y riñón.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por resonancia magnética nuclear (iRM)

En la tabla 1 se pueden observar las relaciones entre los parámetros y la tonalidad observada para diferentes zonas estudiadas del cuerpo:

Tabla 1: Escala de grises en iRM

	T_1	T_2
Aire	Negro	Negro
Hueso	Negro	Negro
Interior de los vasos con alto flujo	Negro	Negro
Calcificaciones	Negro	Negro
Sangre	Negro	Negro
Agua	Gris muy oscuro	Blanco
Fluido cerebrospinal	Gris muy oscuro	Blanco
Sustancia gris	Gris oscuro	Gris claro
Riñón	Gris	Blanco
Hígado	Gris	Blanco
Bazo	Gris	Blanco
Músculo	Gris	Negro
Sustancia blanca	Gris claro	Gris oscuro
Grasa	Blanco	Gris oscuro
Tumor	Blanco	Blanco

El fundamento teórico de la técnica de diagnóstico por imagen iRM se basa en la variación de los momentos magnéticos de los núcleos de hidrógeno en las moléculas de agua, ya que cada uno de estos presenta un momento magnético con la capacidad de modificarse al aplicar una fuente magnética externa y una RF, generando así una señal que se puede detectar y medir con la ayuda de detectores que se encuentran fuera del cuerpo humano. Por esta razón, los momentos magnéticos de tejidos y órganos son susceptibles de sufrir cambios al aplicar campos externos variables.

Cualquier átomo puede crear un campo magnético externo por el que circulan electrones produciendo una corriente eléctrica; de esta manera, se forma un dipolo con otras partículas de carga opuesta. Este dipolo tiene un momento dipolar que depende de la atracción o repulsión de los átomos que lo forman, y una dirección perpendicular a la órbita de Bohr. Este momento dipolar se define en la ecuación 2:

$$\mu_{Bohr} = -\frac{e}{2m} \times L \quad (2)$$

Donde μ_{Bohr} es el momento magnético de los electrones, e es la carga del electrón, m es la masa del electrón y L es el momento angular. Se puede deducir que la fuerza del campo magnético generado es proporcional a e/m . La relación $e/2m$, se conoce como la relación giromagnética de Larmor (γ), y es la relación entre μ_{Bohr} y L . Este valor regula la frecuencia de resonancia en iRM y es característico de cada isótopo, ya que refleja los movimientos electrónicos atómicos. El momento angular de cada electrón está cuantizado y varía en función de fracciones enteras de la constante de Planck (h) (Ec. 3).

$$\mu_{Bohr} = \gamma \times L = \gamma \times nh \quad (3)$$

Donde n es un número entero.

Con esto se podría concluir que un átomo de hidrógeno no tiene un momento atómico permanente, ya que su configuración es $1s^1$ y $L=0$, lo que demostraría que no está en una órbita circular bien definida. Sin embargo, esta teoría no es aplicable en el caso del átomo de hidrógeno, ya que tiene el momento magnético de su espín intrínseco $\frac{1}{2} (h/2\pi)$ por el único electrón que posee.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por resonancia magnética nuclear (iRM)

En la tabla 2, se incluyen algunos parámetros de diferentes isótopos. Se puede observar que el núcleo que más se utiliza en iRM es el de hidrógeno porque es el que tiene mayor relación giromagnética, produciendo imágenes con una mayor sensibilidad relativa. Otra conclusión que se puede sacar de la tabla es que, en el caso de existir un mismo elemento con varios isótopos como es el caso del carbono, estos tienen diferentes momentos magnéticos nucleares debido al diferente número de neutrones. Es muy posible que en el futuro se puedan llegar a utilizar otros elementos en iRM que no sean hidrógeno; pero al tener una masa mayor que la del hidrógeno, su relajación giromagnética será menor y se necesitará una mejora de la sensibilidad de los equipos utilizados para obtener imágenes de buena calidad.

Tabla 2: Datos isótopos en iRM

Núcleo	Abundancia (%)	Espín ($h/2\pi$)	(Relación giromagnética) $\gamma/2\pi$ (Mhz/T)	Sensibilidad relativa de imagen
^1H	100	$\frac{1}{2}$	42,58	1
^{12}C	98	0	-	-
^{13}C	1,1	$\frac{1}{2}$	10,71	$1,8 \times 10^{-4}$
^{17}O	0,04	$\frac{5}{2}$	-5,77	2×10^{-4}
^{14}N	99,63	1	3,08	1×10^{-3}
^{23}Na	100	$\frac{1}{2}$	11,26	$9,3 \times 10^{-2}$
^{31}P	100	$\frac{1}{2}$	17,23	$6,6 \times 10^{-2}$

El proceso de iRM comienza con la aplicación de un fuerte campo magnético externo (B) para alinear los spines y posteriormente, estos vuelven al estado inicial creando una señal que se observa por la variación de energía generada en esta relajación (ΔE). En función de la fuerza de los enlaces, la energía liberada será mayor o menor. La energía que se libera se puede expresar con la siguiente ecuación, donde h es la constante de Planck (Ec. 4):

$$\Delta E = \gamma \left(\frac{h}{2\pi} \right) B \quad (4)$$

Los cambios en la dirección de los espines requieren una pérdida o ganancia de energía que se explica como una variación en la frecuencia resonante (ν) de la siguiente manera (Ec. 5):

$$\nu = \Delta E/h \quad (5)$$

Al aplicar un campo magnético B sobre un tejido, los protones se alinean en la misma dirección que el campo magnético B llegando a un estado de equilibrio. Si después se aplica una fuente externa de RF por pulsos, se produce una variación de la polarización de los protones. En este tiempo hay un intercambio de fotones entre los átomos del medio debido a las variaciones de la polaridad de los momentos magnéticos de estos hasta que se llega al estado de equilibrio. Con estos cambios se puede apreciar una variación en la energía medible, que utilizando transformadas de Fourier permite obtener imágenes de la zona de estudio deseada (Fig. 33).

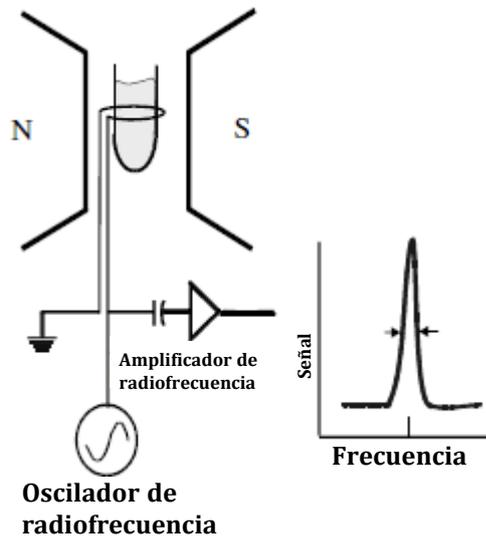


Figura 33: Esquema iRM.

En la siguiente imagen (Fig. 34) se observa que los pulsos de RF aplicados generan ondas sinusoidales con un comportamiento resonante. El comportamiento sinusoidal es debido a la variación de la polaridad de M con una frecuencia de Larmor (f_L) (Ec. 6). En función de la frecuencia de Larmor característica de cada isótopo y la fuerza del campo magnético aplicado se produce una señal FID (del inglés *Free Induction Decay*) generada por la variación de los momentos magnéticos de M .

$$f_L = \frac{\gamma B}{2\pi} \quad (6)$$

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por resonancia magnética nuclear (iRM)

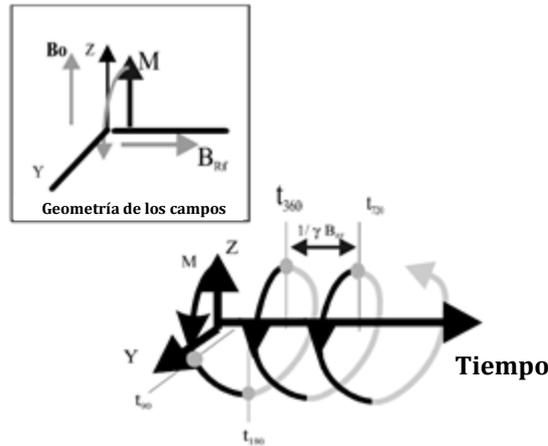


Figura 34: Comportamiento resonante en iRM.

El tiempo que tarda M en tener una inversión completa (360°) equivale a la ecuación 7. A tiempo de $T_{\text{vuelta}}/4$, M habría sido expuesto a 90° . En la técnica de iRM los pulsos utilizados son de 90° y 180° para crear las condiciones iniciales.

$$T_{\text{vuelta}} = \frac{1}{\gamma B_{RF}} \quad (7)$$

Cuando finaliza la aplicación del pulso de RF, la frecuencia de Larmor para M (F_L) se explica como la ecuación 8, con un comportamiento circular en el plano XY. Utilizando esta rotación de la polaridad por medio de una bobina de captación, se produce una diferencia de potencial que es la señal FID observada. La intensidad de la señal observada debida a la polarización va decreciendo exponencialmente con el tiempo teniendo una pendiente de $e^{-t/T}$ una vez que se deja de aplicar el pulso de RF. De la misma manera, la amplitud de la señal es directamente proporcional a la duración del pulso de RF aplicado (Fig. 35 y 36).

$$F_L = \gamma B \quad (8)$$

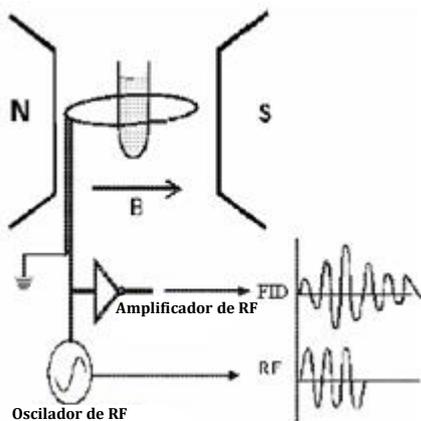


Figura 35: Señal FID de iRM.

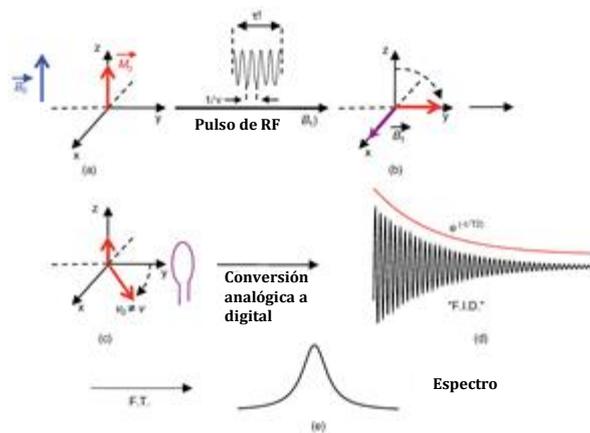


Figura 36: Obtención de la señal en iRM.

2. Técnicas de medida

A continuación, se pasará a comentar una serie de técnicas que se pueden utilizar en función de los requerimientos del estudio. Todas ellas son modificaciones y variaciones que tienen en común el estudio de los parámetros de relajación de T_1 y T_2 . Entre ellas se encuentran la recuperación de fase, inversión-recuperación, espín-eco, gradiente-eco, turbo espín-eco, eco de gradientes, secuencia eco-planar y GRASE (del inglés *Gradient- and Spin-Echo*).

Las técnicas más simples utilizadas en T_1 se conocen como recuperación de fase e inversión-recuperación. La primera de estas, la técnica de **recuperación de fase** utiliza un pulso inicial de RF de 90° y posteriormente, a un tiempo T_R (tiempo que transcurre entre diferentes pulsos) que es inferior a $5T_1$ se aplica otro pulso de 90° (es importante que sea antes de que los espines regresen al estado de equilibrio). La señal FID obtenida que se observa se puede describir por la ecuación 9, siendo esta dependiente de T_1 y T_R .

$$S = M_0 \left(1 - e^{-\frac{T_R}{T_1}}\right) \quad (9)$$

La técnica de **inversión-recuperación** (IR) coincide con la primera en la dependencia de T_1 , pero el primer pulso aplicado es de 180° en vez de 90° . Posteriormente, mientras los espines vuelven a las condiciones de equilibrio, se aplica otro pulso de 90° para obtener una inversión de la magnetización y en ese momento se analiza la señal obtenida. El tiempo transcurrido entre los dos pulsos se conoce como tiempo de inversión. Esta técnica, al ser dependiente de T_1 , permite elegir un T_1 de trabajo específico o eliminar las señales que no interesan con el fin de reducir artefactos de la imagen; y de esta manera, por ejemplo, se podría compensar la señal producida por la grasa ⁽⁴⁷⁾. Su inconveniente principal es la necesidad de aplicar tiempos de repetición largos para que la relajación se complete (Fig. 37 y 38).

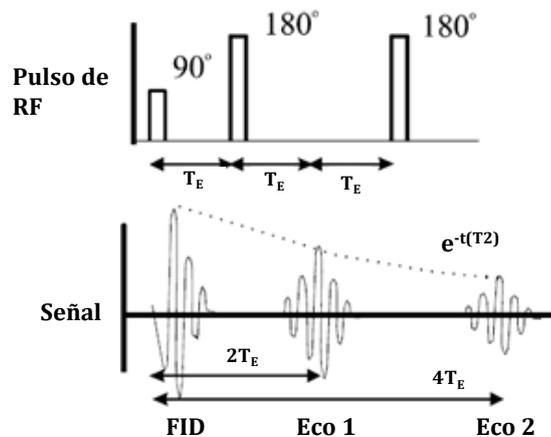


Figura 37: Técnicas sensibles a T_1 .

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por resonancia magnética nuclear (IRM)



Figura 38: Imagen IRM con gradiente-eco sin (a) y con (b) inversión-recuperación.

En cambio, si lo que interesa es focalizar los estudios con técnicas dependientes de los valores de T_2 , se utiliza la técnica de **espín-eco** (SE, del inglés *Spin-Echo*) (Fig. 39) en la que a un tiempo de eco (T_E) después de aplicar un pulso de RF de 90° , se aplica un pulso de 180° capaz de invertir por completo la polaridad de M . Posteriormente, se puede observar que a un tiempo $2T_E$ la polaridad ha vuelto a condiciones iniciales y la señal que se observa tiene un comportamiento de eco. Si a un tiempo T_E después de $2T_E$ se aplica otro pulso de 180° invirtiendo otra vez la polaridad, a $4T_E$ se observaría otro eco de la señal inicial con una intensidad decreciente exponencialmente según la ecuación 10 ⁽⁴⁸⁾. Esta técnica se utiliza para corregir el efecto de variaciones en el campo magnético aplicado a M producidas por el propio campo creado, por tejidos heterogéneos o por la presencia de impurezas o partículas que tengan una carga magnética. Las imágenes tienen la separación deseada mediante una variación T_R y T_E ⁽⁴⁹⁾. Esta técnica es la más sencilla y conocida, así como la más utilizada en la actualidad.

$$S = M_0(1 - e^{-\frac{t}{T_2}}) \tag{10}$$

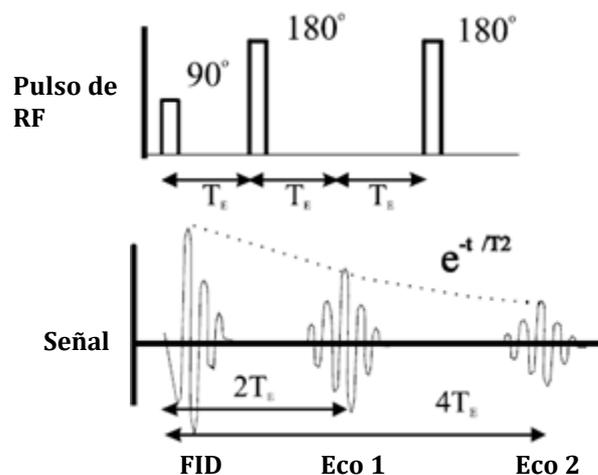


Figura 39: Técnica de espín-eco.

En la técnica de iRM, al igual que en rayos X, se analizan varias secciones de la zona estudiada para obtener una imagen en dos y tres dimensiones. En este caso, los especialistas tienen la capacidad de elegir secciones entre 1 y 20 mm dependiendo del pulso que interese aplicar. Una limitación que tiene la técnica de iRM y que se debe al uso de ondas de alta frecuencia, es la propagación indeseada de la señal de RF que se aplica sobre la sección de interés ya que puede llegar a producir artefactos en la imagen generada distorsionando el resultado.

Existen técnicas que son capaces de corregir esta propagación indeseada, entre las que se encuentra la técnica de **eco de gradiente** (EG) (Fig. 40) ⁽⁵⁰⁾, que se basa en la obtención del eco mediante una aplicación de un campo magnético en forma de gradiente. El procedimiento consiste en una inversión de la dirección del campo magnético del gradiente una vez que se deja de aplicar el pulso de RF; de esta manera, se produce una inversión de la polaridad de la magnetización durante un tiempo suficiente para que la inversión sea completa. Si no se utiliza un pulso de RF, se pueden utilizar ángulos de excitación inferiores a 90° para la inversión de polaridad, que permiten la utilización de tiempos de repetición cortos y así conseguir disminuir el tiempo de análisis.

Otra opción consiste en la aplicación de pulsos cortos, alternando entre positivos y negativos y manteniendo el campo magnético en forma de gradiente hasta que todos los espines estén orientados de la misma manera que el campo magnético. En ese momento, se invierte la polaridad del campo magnético para generar un eco cuando los momentos de los espines vuelven a las condiciones iniciales de estabilidad. El principal efecto observable en este proceso es que los componentes que tienen una frecuencia de Larmor ligeramente superior pasan a tener una frecuencia ligeramente inferior; y posteriormente, cuando se finaliza la aplicación del gradiente, la frecuencia de Larmor de cada componente vuelve a ser la del equilibrio. De esta manera se puede sustraer la mayor parte de la dispersión indeseada generada por la señal RF. En este caso se pueden obtener las imágenes con una separación deseada mediante variación del ángulo de inclinación (F_A , del inglés *flap angle*) y de T_E . Los tiempos del análisis son menores que en SE pero la señal es más baja y existe más ruido en las imágenes, lo que se traduce en un aumento de las adquisiciones.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por resonancia magnética nuclear (IRM)

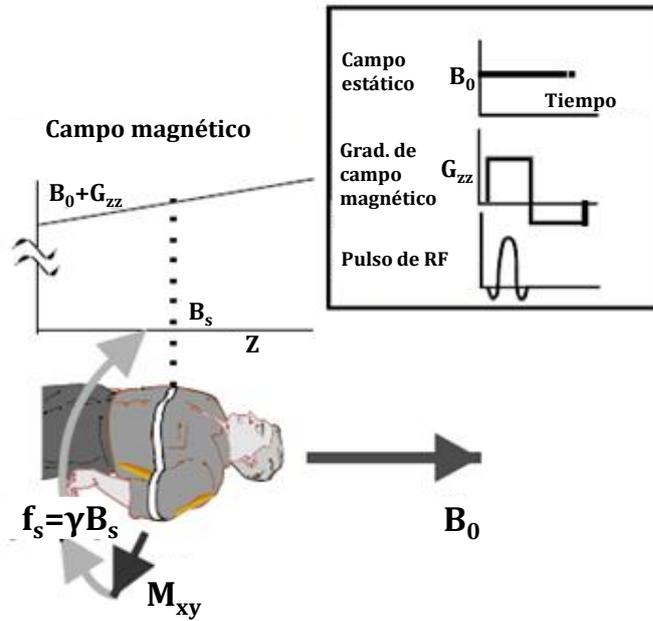


Figura 40: Efecto gradiente-eco.

Como se ha comentado anteriormente, existen técnicas que se pueden utilizar cuando se pretende estudiar un parámetro en concreto, ya sea T_1 o T_2 ; pero también existe la posibilidad de obtener diferentes imágenes de una misma zona de estudio. Para ello se varían parámetros como T_E y T_R , con el objetivo de producir una mayor diferenciación entre diferentes tejidos u órganos y poder realizar una ponderación de las señales de T_1 y T_2 .

- Ponderación de la densidad de protones: Para valores de T_R elevados, los espines completan la recuperación total de la polarización llegando al estado de equilibrio antes del siguiente pulso de RF. Si la magnetización de dos zonas estudiadas es parecida, la señal observada sólo depende de la densidad de protones de cada zona (Fig. 41).

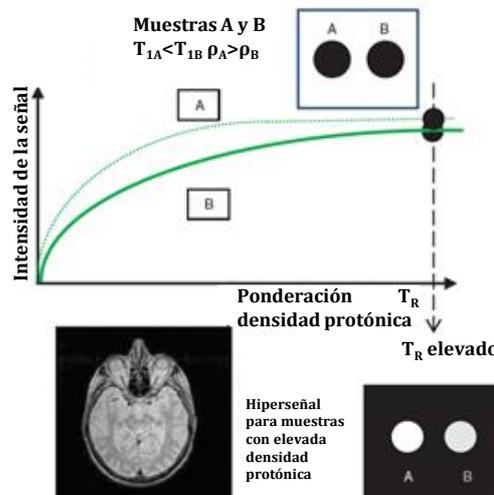


Figura 41: Ponderación de la densidad de protones.

- Ponderación de T_1 : Para valores de T_R pequeños, el pulso siguiente se aplica pronto y no hay tiempo suficiente como para que la polarización vuelva al estado de equilibrio. De esta manera, en la situación A tiene un menor T_1 y una mayor intensidad de magnetización que en B, por lo que se obtiene una mayor diferenciación de la señal observada entre las dos zonas de estudio (Fig. 42).

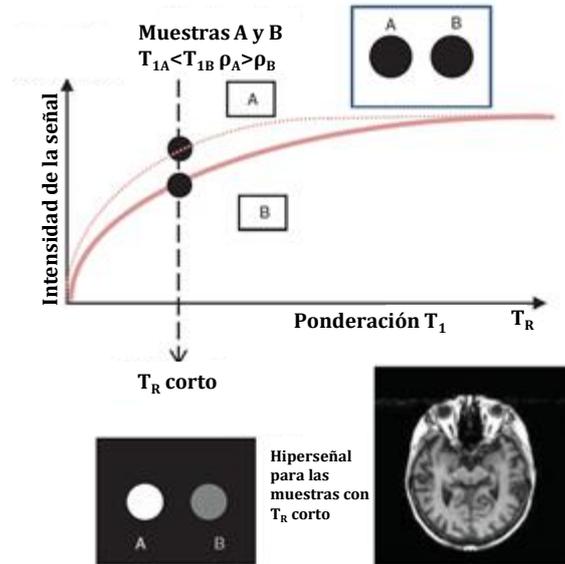


Figura 42: Ponderación de valores de T_1 .

- Ponderación de T_2 : Si T_R es elevado, para eliminar la dependencia de la señal con T_1 se utiliza un T_E elevado. Se obtiene una mayor diferenciación de la señal observada debido a que únicamente depende de los valores de T_2 de las zonas de estudio observadas (Fig. 43).

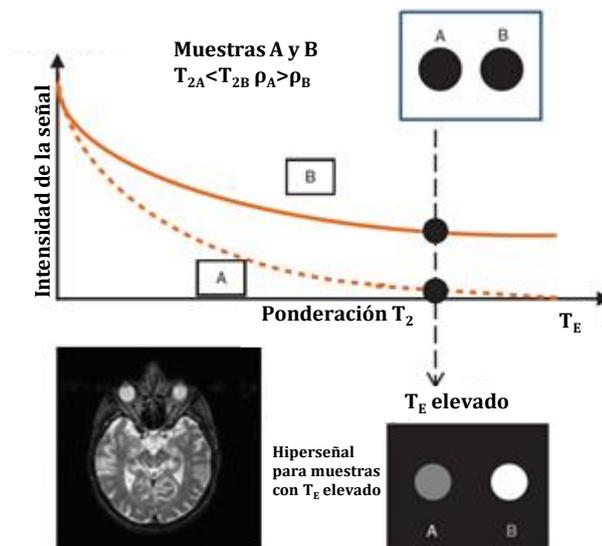


Figura 43: Ponderación de valores de T_2 .

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por resonancia magnética nuclear (IRM)

En la siguiente figura (Fig. 44 y 45) ilustrativa se relacionan las dependencias de los valores de T_1 , T_2 y la densidad de protones en relación de T_E y T_R .

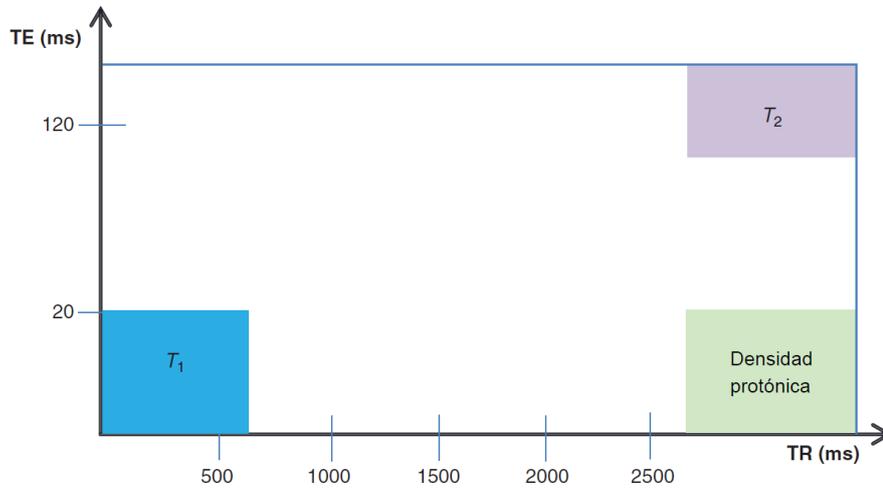


Figura 44: Relación de T_1 , T_2 y densidad de protones en función de T_R y T_E .

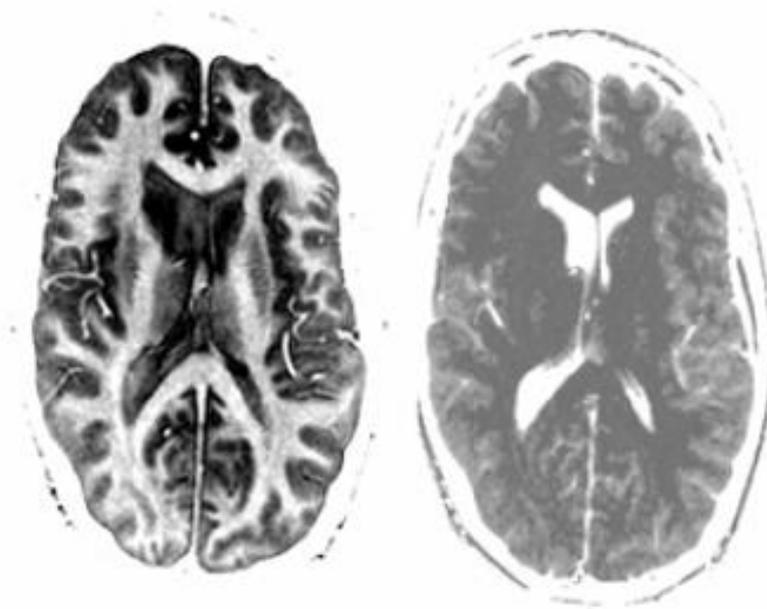


Figura 45: Ponderación de T_1 (izq.) y T_2 (der.) en imágenes IRM.

Con el paso del tiempo se han ido resolviendo problemas que han permitido la mejora de la técnica; de hecho, en 1986 Henning describió la técnica conocida como **turbo espín-eco** (TSE, del inglés *Turbo Spin-Echo*) (Fig. 46) ⁽⁵¹⁾, que llegó para solucionar una gran desventaja como era la necesidad de un elevado tiempo de análisis. Hay que tener en cuenta que cuando se utilizan tiempos de eco largos pueden aparecer artefactos y se puede producir una reducción espacial por continuos movimientos incontrolables de los pacientes como la acción del corazón, la respiración o el flujo de la sangre.

La técnica de TSE se caracteriza por ser una técnica “rápida” que utiliza la aplicación de un pulso de excitación de 90° y sucesivos pulsos de RF de 180° , pudiendo estar acompañados por pre-pulsos que invierten la polaridad a lo largo de un eje para que la magnetización transversal vuelva a condiciones iniciales antes del siguiente pulso de RF (IR-TSE). Cuantos más pulsos de RF se apliquen, más ecos se producen. Este fenómeno se conoce como longitud del tren de ecos y permite la codificación de una fase distinta, por lo que se define mejor el “espacio k” y se consigue una imagen cada vez más detallada. En el uso convencional se adquieren entre 4 y 32 ecos. El contraste obtenido es similar al de la técnica de SE aunque tiene un incremento en el brillo de la grasa en las imágenes potenciadas en T_2 ; que se puede corregir con técnicas de supresión de grasa.

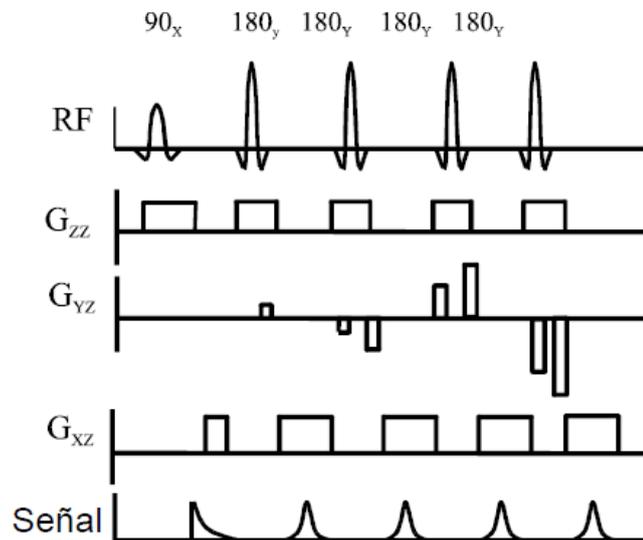


Figura 46: Turbo espín-eco.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por resonancia magnética nuclear (IRM)

La **imagen eco-planar** (EPI, del inglés *Echo-Planar Imaging*) es la técnica de adquisición de datos más rápida con tiempos menores de 100 ms/sección. Fue desarrollada por Mansfield en 1977, pero hasta mediados de los noventa no ha tenido aplicaciones clínicas ⁽⁵²⁾.

En esta técnica se utilizan casi todas las anteriores, ya que para obtener los ecos se aplican campos magnéticos en forma de gradiente invirtiendo la polaridad (EG-EPI). De esta manera, se obtiene una gran diferenciación de los artefactos generados en el análisis por su susceptibilidad magnética, un desplazamiento químico mayor que en las otras técnicas y una baja relación señal ruido.

La técnica ofrece la posibilidad de aplicar un solo pulso de RF y gradientes intensos y rápidos (del inglés *single-shot*) ⁽⁵³⁾, o varios pulsos (del inglés *multi-shot*) ⁽⁵⁴⁾. La primera posibilidad permite realizar estudios funcionales globales, de perfusión cerebrales, cardiacos y cinemáticos articulares generando secuencias de 10-12 imágenes por segundo. Como se puede ver en la siguiente figura, en una dirección espacial K_x se aplican campos magnéticos en forma de gradientes invirtiendo la polaridad y en cada inversión de la polaridad, en otra dirección espacial K_y , se aplica un pulso del campo magnético que es el causante del eco observado en la señal (Fig. 47).

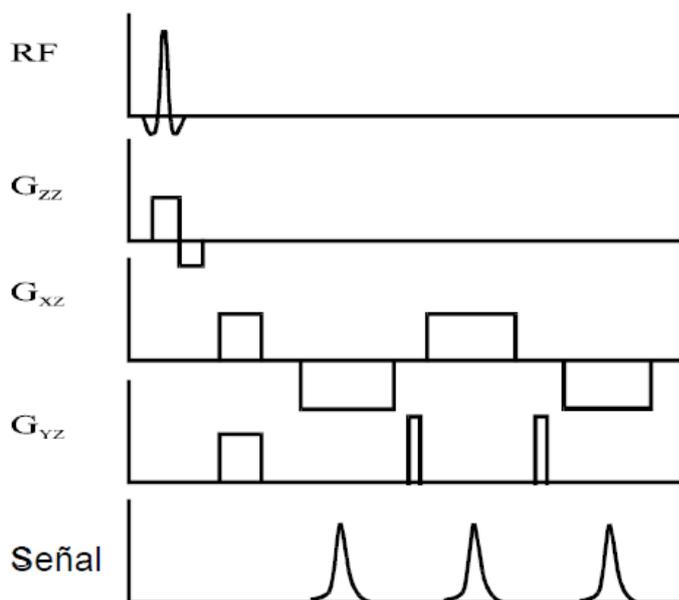


Figura 47: Esquema eco-planar (EPI) por *single-shot*.

Debido a que las técnicas más rápidas generan imágenes de peor calidad, la más utilizada es la denominada multi-shot. Aunque no tenga tan definido el “espacio k ” permite tener una gran resolución espacial amplificando detalles.

Otra posibilidad de combinación de esta técnica es la obtención de imágenes a partir de SE para potenciar T_2 (SE-EPI) (Fig. 48). Si lo que interesa es aumentar el contraste de la imagen, se puede solapar a su vez con IR (SE-IR-EPI).

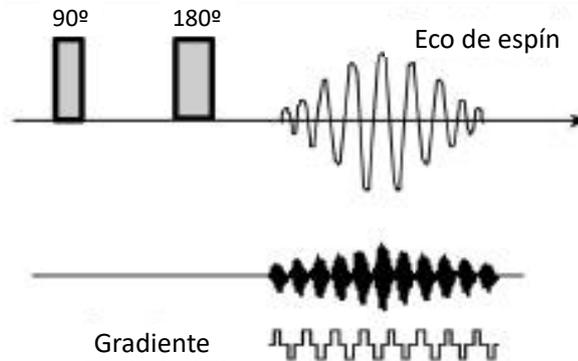


Figura 48: Esquema SE-EPI.

La última técnica que comentar es la denominada **GRASE** (Fig. 49), que es una de las técnicas más rápidas, novedosas y complejas de las utilizadas en iRM. Consiste en una combinación de las técnicas de TSE y EPI. Comienza con un pulso de excitación de RF de 90° , seguido de múltiples pulsos de RF de 180° que dan lugar al mismo número de ecos (factor turbo). En cada eco observado se generan múltiples ecos a partir de gradientes de un campo magnético externo que invierte la polaridad rápidamente. Esta segunda contribución se conoce como factor EPI. Las imágenes obtenidas con esta técnica presentan una alta resolución en análisis muy rápidos ⁽⁵⁵⁾.

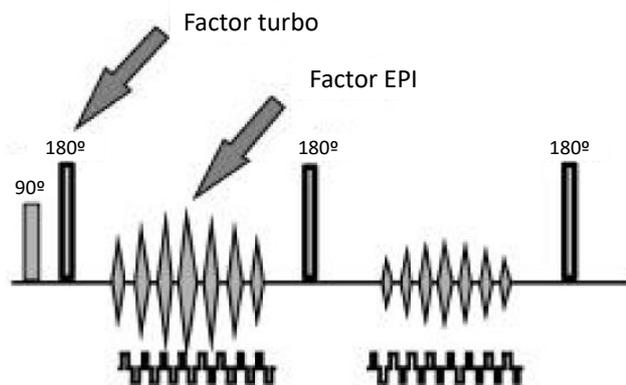


Figura 49: Esquema de la técnica GRASE.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por resonancia magnética nuclear (IRM)

Una parte fundamental de la técnica es la reconstrucción de la imagen, para lo que se utilizan dos métodos de estudio de la matriz de datos obtenida, como son la codificación de frecuencia y de fase.

La **codificación de frecuencia** (Fig. 50) permite separar una de las coordenadas de la matriz (principalmente las columnas de datos) aplicando un campo magnético en forma de gradiente mientras se realiza la lectura del eco y de esta manera, los espines se someten a una frecuencia diferente según el campo magnético en cada momento puntual. En el centro del eco el desfase del gradiente es cero. El muestreo se realiza con una única frecuencia y posteriormente, se descomponen sus frecuencias por la aplicación de transformadas de Fourier en las correspondientes intensidades.

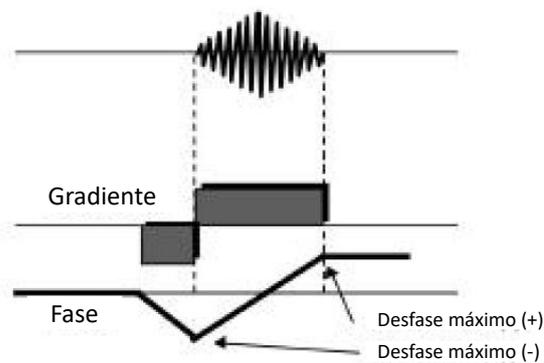


Figura 50: Codificación de frecuencia.

Otro método para estudiar la matriz de datos obtenida se conoce como **codificación de fase** (Fig. 51 y 52), es el más utilizado en IR, SE y EG y consiste en la aplicación de un campo magnético en forma de gradiente, además del inicial, en un eje concreto. Uno de los campos aplicados se mantiene constante en el tiempo (G_{xz} o gradiente de codificación de frecuencia) y el otro varía con el tiempo (G_{yz} o gradiente de codificación de fase). Cuando se repite esta secuencia entre 128 y 256 veces, se puede completar el “espacio k” y de esta manera, utilizando transformadas de Fourier se consiguen imágenes en dos o tres dimensiones de la zona de estudio.

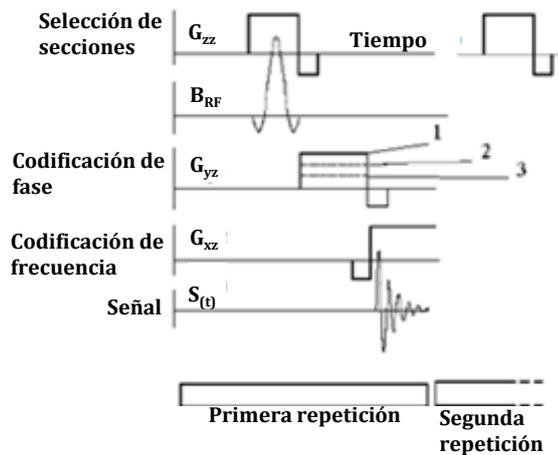


Figura 51: Esquema de codificación de fase.

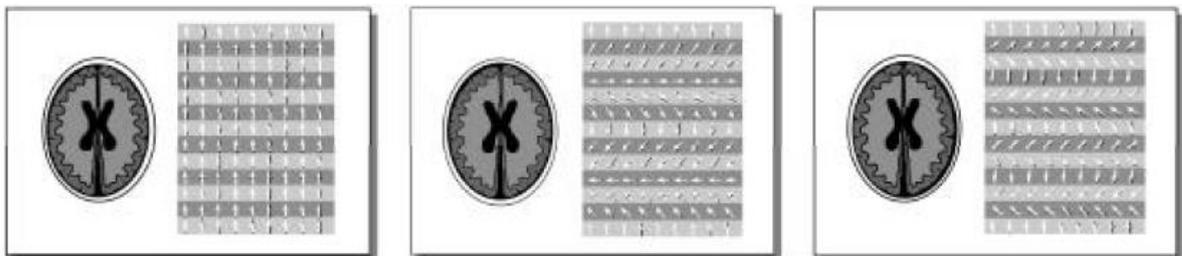


Figura 52: Codificación de fase 0, 1 y 2.

Para obtener imágenes de iRM en 3D hay que aplicar las técnicas descritas anteriormente en los 3 ejes espaciales, de forma que cada sección seleccionada tenga imágenes generadas al utilizar transformada de Fourier de “espacios k” de las 3 dimensiones. La iRM es sensible al movimiento, por lo que las imágenes obtenidas pueden degradarse por movimientos no deseados, pero también se pueden utilizar para mostrar el movimiento.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por resonancia magnética nuclear (IRM)

Una técnica empleada para esta finalidad es la conocida como **tiempo de vuelo** (TOF, del inglés *Time of Flight*) ⁽⁵⁶⁾. Esta técnica intenta solucionar el problema de estudiar sustancias que tienen un flujo, como la sangre; ya que si se intenta cambiar la polaridad de los espines de protones en un flujo, los que se hayan excitado al inicio, pasado un tiempo ya no estarán en el mismo lugar. La técnica se basa en la aplicación de un pulso de RF de 90° sobre una sección inicial y, después de un tiempo T_E se aplica un pulso de RF de 180° en otra sección por la que podrían estar llegando los espines excitados inicialmente. ΔZ es la distancia que separa las dos secciones. A un tiempo $2T_E$ se producirá un eco generado en la zona de estudio (por eso se llama también método dentro del flujo) (Fig. 53).

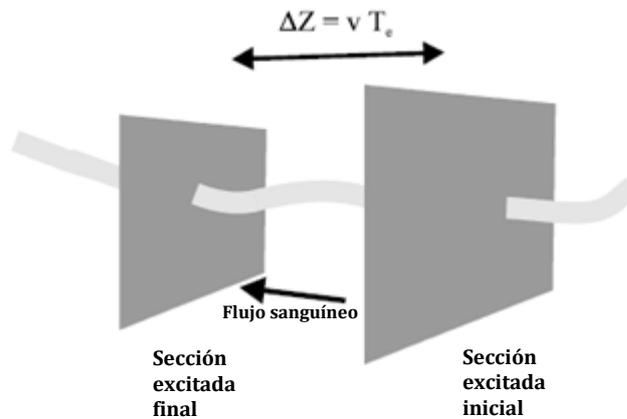


Figura 53: Método tiempo de vuelo (TOF).

El resultado sería más preciso si se seleccionara una zona por la que pasa ese flujo y se dividiera en multitud de secciones (Fig. 54). Si se aplica el primer pulso de RF de 90° al inicio y posteriormente se va analizando cada sección, se podría determinar al cabo de un tiempo cuáles son las secciones con mayor intensidad de señal. Así se podría determinar el tiempo que han tardado los espines de los protones en llegar desde la sección inicial hasta la sección de recepción de la señal, pudiendo calcular su flujo. Esta es una técnica que se utiliza en angiografía (MRA, del inglés *Magnetic Resonance Angiography*), que es una técnica en la que se suelen adquirir imágenes en 3D.

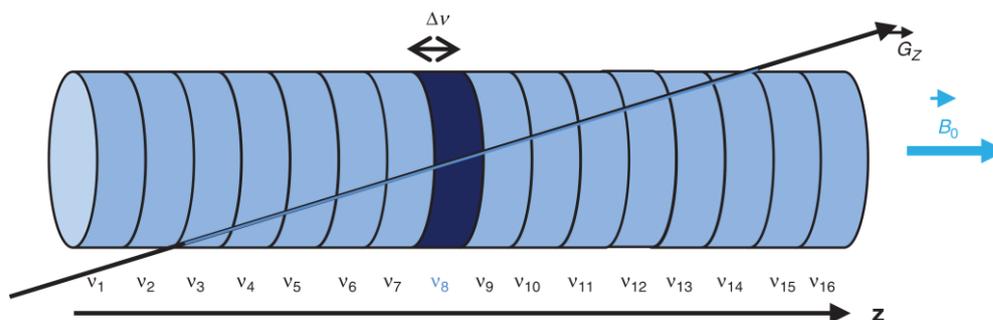


Figura 54: Aplicación de un gradiente a una zona dividida en secciones.

El método de **Contraste de fase** también se utiliza para el estudio de flujos. Consiste en la diferencia del comportamiento que tiene de un campo magnético en forma de gradiente, para lo que se invierte la polaridad en sustancias con flujo y se compara con objetos estáticos o artefactos. Los objetos estáticos y artefactos no presentan un cambio de fase después de una inversión de polaridad de un gradiente de campo magnético, pero los objetos con flujo tienen un cambio del campo magnético promovido por la velocidad y el tiempo como se puede ver en la figura 55:

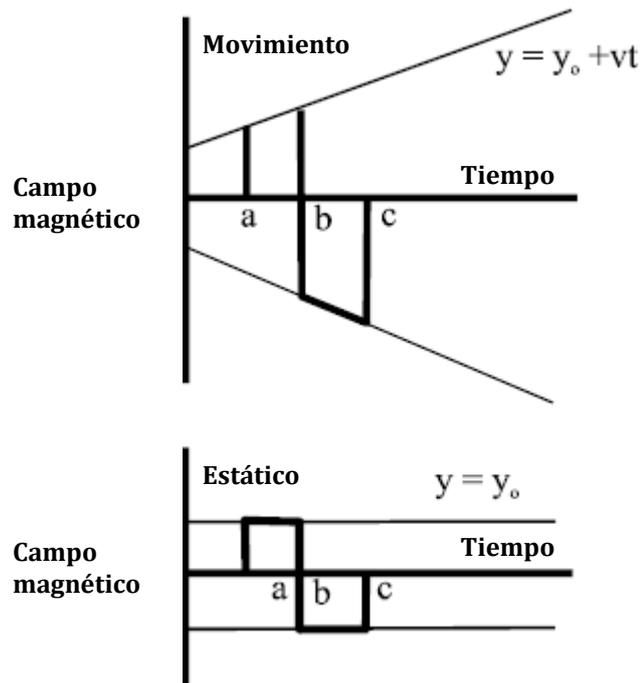


Figura 55: Comportamiento del campo magnético en forma de gradiente según la movilidad de sustancias.

En las arterias, por ejemplo, la sangre presenta mayor velocidad que en las venas; por lo que, al aplicar un campo magnético en forma de gradiente con inversión de la polaridad, la señal de las arterias cambia más que la de las venas. En angiografía se comparan varias imágenes para calcular el flujo de la zona de estudio. De esta manera, se puede diferenciar entre dos tipos de imágenes, las independientes de la velocidad, que permiten localizar los vasos estudiados, y las dependientes de la velocidad, que posibilitan el cálculo de flujos de las sustancias móviles. Así, se obtienen las imágenes utilizando campos magnéticos en forma de gradientes en varias direcciones. Si se compara la diferencia de fase entre estas velocidades se podría estudiar la relación que existe entre la señal de la zona de estudio con respecto a la velocidad de la sustancia que fluye por dicha zona.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por resonancia magnética nuclear (iRM)

3. *Equipamiento*

En cuanto al equipamiento que se utiliza en iRM, las partes diferenciadoras son las fuentes de energía no ionizante capaces de producir tres tipos de campos: un campo magnético estático, un campo magnético en forma de gradiente y un campo de RF; y los detectores que recogen la señal producida.

El campo magnético estático que se utiliza suele ser de 1,5 T o 3,0 T, aunque actualmente a niveles de investigación ya existen instalados equipos de 7 T. Este campo magnético se produce por un imán superconductor, generando el campo por el paso de una corriente continua por un solenoide. Esto implica una ventaja económica porque elimina la disipación de la energía y evita un coste eléctrico al no necesitar un gran voltaje ni un generador de corriente. El imán típico es de 2,2 metros de largo y el hueco para el paciente de 0,8 metros. En el imán se incorporan bobinas que miden y eliminan las variaciones locales del campo; además, una coraza de hierro protege a los imanes para reducir la dispersión espacial del campo externo.

En la actualidad existen sistemas de imán abiertos (Fig. 56), que tienen imanes permanentes o electroimanes en lugar de bobinas superconductoras para producir el campo magnético utilizado. La fuerza del campo utilizado es de 0,2 T pero ofrece imágenes de gran calidad. Entre las ventajas más destacadas se encuentran, el posible uso en un quirófano de manera segura permite que los pacientes nerviosos o niños estén más cómodos y se reduce considerablemente el nivel de ruidos de las bobinas cuando se encienden y apagan para generar los gradientes. Existen equipos más pequeños de iRM que utilizan 0,1 T pero no tienen uso médico a gran escala, salvo que su uso para adquirir imágenes de extremidades. Esto puede suponer el inicio de una segunda fase de equipos de iRM, en la que se buscan equipos más pequeños con la posibilidad de que lleguen a ser prácticamente portátiles.



Figura 56: Sistema de imán abierto.

La generación de campos magnéticos en forma de gradientes se realiza normalmente con bobinas de cobre y se requieren pulsos cortos entre 1 y 5 mT/m en milisegundos. Para que los pulsos puedan ser activados y finalizados rápidamente, la relación entre la inductancia de la bobina y su resistencia debe ser baja. Las fuerzas magnéticas que se generan pueden afectar a los cables de la bobina y llegar a deformarse produciendo un ruido elevado que puede ser molesto para los pacientes.

El tercer campo utilizado en iRM es el campo de RF, que se genera en un circuito de RF. En los modelos actuales se utilizan las mismas bobinas para la transmisión de la energía RF y para la recepción de la señal, pero es importante que la energía aplicada no llegue a la zona de detección de la señal de RF. Por ello, los diodos producen cortocircuitos en los amplificadores de señal mientras se realizan los pulsos. Los sistemas utilizados (Fig. 57) emplean diferentes bobinas de RF en función de la zona de interés para conseguir la mejor relación señal-ruido; varios ejemplos concretos son el de cuerpo completo (izq.) o “jaula de pájaro” (der.).

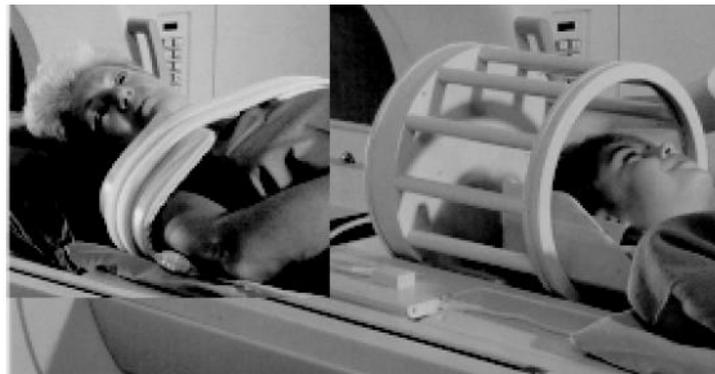


Figura 57: Tipos de transmisor/receptor usados en IRM.

En el detector se suele llevar a cabo una amplificación de la señal con un mínimo ruido electrónico generado; esta debe ser demodulada, filtrada y finalmente convertida desde una señal analógica a una digital antes de recogerla en un ordenador. La señal obtenida puede ser considerada como una señal de radio con frecuencia modulada.

En cuanto a la seguridad que presenta la técnica de iRM para el paciente y los especialistas, el mayor riesgo es el uso del campo de RF al que se expone la zona de estudio y para el que se define un límite de aumento de temperatura de 1°C. También es importante que en el interior del escáner no haya ninguna pieza metálica y que el paciente no tenga ninguna prótesis dentro del cuerpo para que no absorba energía de RF.

Sin duda la principal limitación que tiene la técnica es el elevado coste, mayor que el diagnóstico por imagen con rayos X.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por resonancia magnética nuclear (iRM)

4. Medios de contraste en iRM

En 1978, se descubrió que administrando una sustancia paramagnética a animales o humanos podían aumentarse los tiempos de relajación de los protones de las moléculas de agua de las zonas de estudio ⁽⁵⁷⁾. Los primeros estudios se realizaron con Mn^{2+} y Fe^{3+} , y compuestos que tenían varias moléculas de hidratación para el estudio de arterias coronarias. Debido a que el manganeso y el hierro son iones que están en el interior del cuerpo humano, se continuaron los estudios utilizando el ion gadolinio debido a sus propiedades magnéticas.

Schering AG mostró interés en el estudio de los medios de contraste paramagnéticos desde 1980 ⁽⁵⁸⁾. En 1981 H.J. Weinmann y su equipo consiguieron solucionar los problemas de toxicidad utilizando quelatos de manganeso o gadolinio ⁽⁵⁹⁾.

Ese mismo año, Schering comercializó el primer medio de contraste con gadolinio, el Gd-DTPA (gadopentetato, Magnevist), en forma de sal de dimeglumina.

Posteriormente se comercializaron otros medios de contraste basados en gadolinio como son el gadoterato de meglumina (Dotarem) de Guerbet, el gadoteridol (Prohance) de Bracco y el gadobutrol (Gadovist) de Bayer AG.

La función de estos medios de contraste es utilizar sus propiedades magnéticas y su capacidad de acumularse selectivamente para alterar los valores de T_1 , T_2 o ambos. Para ello se utilizan iones paramagnéticos, que tienen electrones desapareados y un momento atómico neto, o pequeñas partículas ferromagnéticas con diámetro de pocas micras que tienen un momento magnético permanente 10^8 veces más grande que un momento atómico. Estas sustancias se introducen en el interior del cuerpo humano y consiguen afectar a la relajación local de los protones del medio.

Si se utiliza un ion paramagnético con una frecuencia de Larmor similar a la zona de estudio, T_1 va a reducirse. Si en cambio se utiliza un medio de contraste que presenta una unión a biomoléculas, se pueden producir cambios en los campos estáticos y por consiguiente reducirse los valores de T_2 . Además, si se utilizan sustancias inertes de bajo peso molecular, puede variar la relajación de los espines cuando están próximos a la frecuencia de Larmor de los protones y de esta manera producir grandes reducciones de T_1 . El estudio de las variaciones de los valores de T_1 y T_2 se encuadra dentro de la relaxometría.

En vez de trabajar con los valores de T_1 y T_2 , se suele trabajar con sus valores inversos $1/T_1$ y $1/T_2$, que son los índices de relajación longitudinal y transversal respectivamente.

En una primera aproximación sencilla, teniendo un campo magnético externo conocido a una temperatura definida, el incremento de los índices de relajación es directamente proporcional a la concentración del medio de contraste. La constante de proporcionalidad se conoce como relajatividad r_1 y r_2 . Este parámetro tiene unidades de $\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$. Cuanto mayor sea el valor de “ r ”, mayor es la influencia del medio de contraste utilizado.

Más adelante se comentarán algunos de los principales parámetros de estos medios de contraste relacionados con la funcionalidad de estos, como son el número de moléculas de hidratación, la relajatividad o la geometría.

Como iones paramagnéticos que se podrían utilizar están los metales de transición cromo, hierro y manganeso, o bien tierras raras como el gadolinio o el disprosio. La mayoría de estos metales por sí solos no podrían utilizarse por su posible toxicidad, pero para solucionar este problema se incorporan en moléculas en forma de macrociclos, evitando la liberación de estos al interior del organismo.

Otros medios de contraste que se utilizan en esta técnica son los agentes superparamagnéticos, formados especialmente por óxidos de hierro que pueden estar compuestos por nanopartículas magnéticamente ordenadas. Estos comparten su campo eléctrico para modificar el momento magnético externo que se aplica sobre un tejido. De esta manera, provocan una disminución de la señal T_2 .

Una tercera clase de medios de contraste que se utilizan en iRM son los denominados “CEST”, que son moléculas que tienen protones químicamente intercambiables por hidrógenos de agua. Se busca saturar el medio durante el intercambio y de esta manera, hacer que la intensidad de la señal de las moléculas de agua de la zona de estudio decrezca, observando un efecto negativo en iRM. Esto se consigue aplicando un pulso que sólo afecte a los protones intercambiados sin afectar a las moléculas de agua del medio, mejorando así la selectividad. Dentro de estos medios de contraste se encuentran los “PARACEST”, que presentan iones de lantánidos que favorecen la variación de la señal.

En comparación con los medios de contraste utilizados en rayos X, los utilizados en iRM presentan reacciones alérgicas menos fuertes e impredecibles y requieren una menor dosis para la realización del estudio deseado.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por resonancia magnética nuclear (iRM)

5. *Pruebas médicas*

En las siguientes figuras se muestran algunas aplicaciones de estudios en la técnica de iRM.

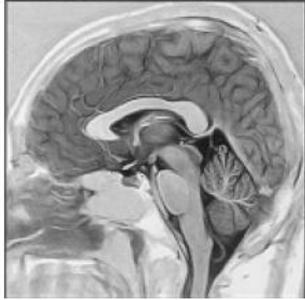


Figura 58: Imagen iRM de cerebro.



Figura 59: Imagen iRM de cerebro donde se ve gran contraste entre tejido gris y blanco.



Figura 60: Imagen iRM de columna vertebral.



Figura 61: Imagen iRM de rodilla.



Figura 62: Imagen iRM de tobillo.



Figura 63: Imagen iRM del círculo de Willis (Unión de varias arterias en la parte inferior del cerebro).

Imagen en medicina nuclear

1. Historia y fundamento teórico

La técnica de diagnóstico en medicina nuclear empleando radioisótopos comenzó a utilizarse en los años 50, pero no fue hasta los años 60 cuando aumentó el conocimiento de los radioisótopos utilizados y su producción como objetivos secundarios de programas de investigación relacionados con la energía nuclear de la época. El número de partículas emitidas por un radioisótopo se conoce como actividad y la unidad utilizada es el Becquerelio (Bq), que es el número de desintegraciones nucleares que tienen lugar en un segundo y cada desintegración conlleva la emisión de energía en forma de partículas (alfa o beta) y/o radiación gamma. Equivale a $2,7 \times 10^{-11}$ Ci (Curios), que es la actividad de un gramo de ^{226}Ra .

En esta técnica de diagnóstico por imagen se inyecta una sustancia marcada radiactivamente que actúa como transportador. La dosis administrada en esta técnica es en varias órdenes de magnitud inferior a la utilizada en otras como es el caso de rayos X e iRM. El radiotrazador inyectado se distribuye por todo el cuerpo utilizando la circulación sanguínea concentrándose en la zona de interés del estudio o alrededor de ella. Posteriormente, los fotones de los rayos gamma producidos en las desintegraciones radiactivas salen del cuerpo humano y se recogen en un detector electrónico de fotones (un ejemplo es la denominada cámara de Anger o gammacámara). El trazador emite rayos γ con energías entre 60 y 510 keV.

Un ejemplo es la 2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa (FDG) ⁽⁶⁰⁾, que entra en la glucólisis debido a su analogía con la glucosa, pero no avanza más allá de la segunda reacción (formación del FDG 6-fosfato), por lo que se acumula en la célula adquiriendo el papel de marcador de actividad metabólica. Una vez allí, manda una señal al exterior del cuerpo en forma de rayos γ , localizando la acumulación de FDG y con ello la presencia de tumores.

Otra de las primeras aplicaciones de esta técnica fue el análisis de imagen de tiroides con yodo ⁽⁶¹⁾, ya que la glándula de tiroides concentra el 90% del yodo del cuerpo humano; por esto para detectar tumores y alteraciones metabólicas se utiliza yodo radiactivo ^{123}I , que es un emisor gamma con emisión de 159 keV y una semivida ($t_{1/2}$) de 15 horas.

Otra aplicación de las partículas radiactivas es la posibilidad de ser utilizadas en terapia. Se puede administrar una elevada dosis de radiación ionizante, letal para las células tumorales, emitiendo partículas cargadas que son focalizadas hacia las zonas de interés con gran precisión.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen en medicina nuclear

2. *Técnicas de medida*

La imagen más sencilla utilizada en esta técnica es la imagen planar (proyección única en dos dimensiones); pero desde 1975 se utilizan otras dos técnicas que permiten reconstruir imágenes en tres dimensiones como son SPECT y PET, siendo esta última la que tiene una mayor resolución espacial.

Estas técnicas presentan algunos inconvenientes como son la existencia de fluctuaciones en la recepción de fotones en el detector, debido a la reducida dosis de radiactividad administrada, y su consecuente flujo de fotones bajo. Esto conlleva una pérdida de resolución espacial y una baja relación señal/ruido. Otro inconveniente, similar al existente en la técnica de rayos X, es la dispersión de los fotones hasta llegar al detector.

La técnica de **imagen planar** consiste en un recuento de fotones gamma utilizando una gammacámara en una posición fija orientada hacia el paciente. La imagen en dos dimensiones utiliza dos gammacámaras fijas. Esta técnica se utiliza para investigaciones preliminares por su simplicidad y rapidez.

La técnica de **SPECT** (Tomografía de Emisión Monofotónica, del inglés *Single Photon Emission Computed Tomography*) ⁽⁶²⁾ se caracteriza por ser una modificación de la imagen planar en la que se reduce la absorción y la dispersión de los rayos gamma modificando la geometría del colector, para lo que se utilizan varios colectores en 180° con el objetivo de compensar los efectos que se van a reducir. Se diferencia de la técnica anterior de imagen planar en el uso de varias gammacámaras que rotan independientemente unas de las otras. Las imágenes en esta técnica son obtenidas por reconstrucción de cada píxel que tiene la contribución de cada proyección analizada.

La técnica más utilizada en medicina nuclear se conoce como **PET** (Tomografía por emisión de positrones, del inglés *Positron Emission Tomography*) ⁽⁶³⁾. Los trazadores utilizados en esta técnica son emisores de positrones con gran energía cinética (los positrones generados son capaces de viajar menos de 5 mm en tejidos biológicos desde el punto de emisión), emitiendo un amplio espectro de energías y una lluvia de fotoelectrones. En este caso, al incidir la radiación ionizante sobre la zona de interés, se producen dos rayos gamma de 511 keV emitidos simultáneamente; de manera que se respeta la conservación de la masa (Fig. 64 y 65).

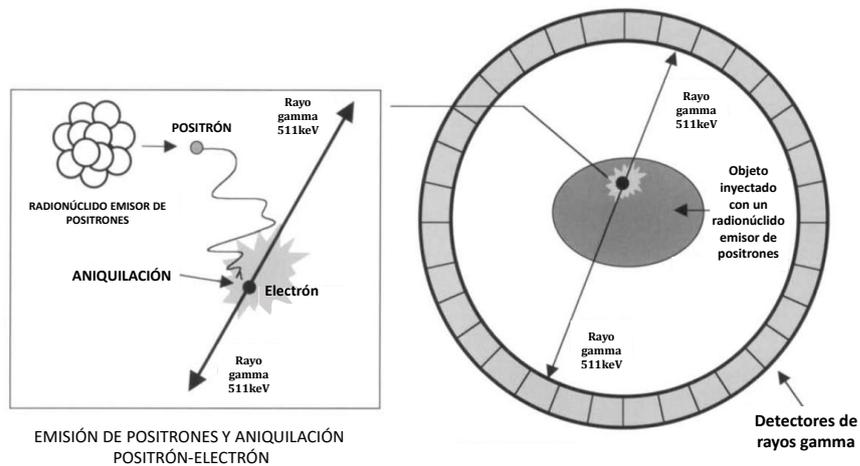


Figura 64: Esquema PET.

Estos rayos gamma escapan del sitio de aniquilación positrón-electrón en sentidos opuestos para conservar el momento lineal, y así se define una línea que delimita el punto de emisión de los positrones. La energía generada por los rayos gamma hace que se minimice la absorción fotoeléctrica en los tejidos. Los detectores utilizados en PET son circulares en 360° y no necesitan tener colectores de los rayos generados para obtener varias proyecciones de la zona de interés y así poder reconstruir las imágenes de la concentración de isótopos observada; de esta manera, aumenta la eficacia de la técnica teniendo una buena resolución espacial.

El hecho de que los anillos del detector sean móviles permite la creación de imágenes en tres dimensiones.

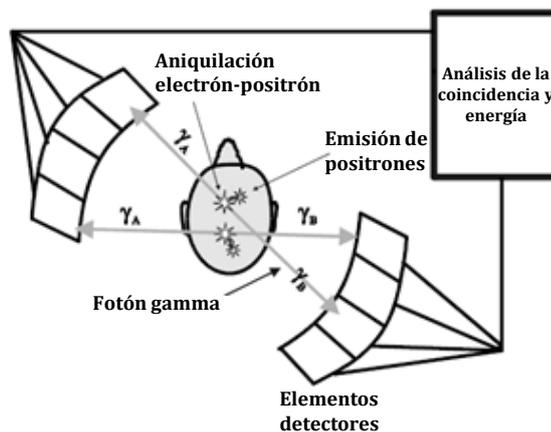


Figura 65: Técnica de PET.

Por estas razones, estas técnicas de medicina nuclear producen imágenes funcionales con gran sensibilidad, pero no con tanta resolución espacial como las obtenidas con el resto de las técnicas comentadas anteriormente. Aunque su resolución conseguida es del orden de 1 milímetro, son técnicas muy útiles por su capacidad de dar la respuesta de imagen que otras técnicas no pueden dar.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen en medicina nuclear

3. Equipamiento

Los equipos utilizados en las técnicas de diagnóstico por imagen en medicina nuclear pueden tener una o más gammacámaras, con la posibilidad de mantenerse fijas como en la técnica de imagen planar o pueden tener movimiento como en SPECT. Estas gammacámaras (Fig. 66 y 67) son multi-detectores que constan de tres partes: el colector, el cristal de centelleo de yoduro sódico y los tubos fotomultiplicadores.

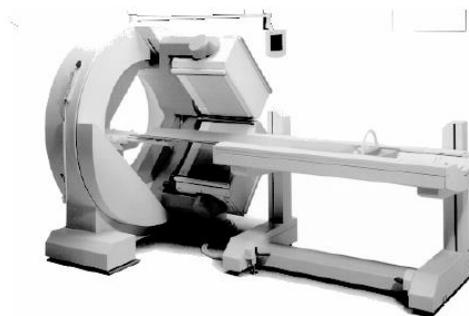


Figura 66: Equipo de imagen por medicina nuclear con dos gammacámaras.

Tanto en la imagen planar como en SPECT, el colector es una placa de plomo de un centímetro de espesor que tiene tubos en su interior cuya función es focalizar los fotones que salen del cuerpo humano. Se transmite menos del 0,1% de los fotones recogidos por el colector; siendo esta la razón por la que la eficiencia de las gammacámaras es tan pequeña.

El cristal de centelleo es el encargado de asegurar que los rayos gamma incidentes del colector lleguen con suficiente intensidad a los tubos fotomultiplicadores. Suelen estar hechos de yoduro sódico activado con talio.

En la última parte del esquema hay un dispositivo que es capaz de realizar el recuento de los fotones de las diferentes zonas estudiadas, y su posterior análisis de energías.

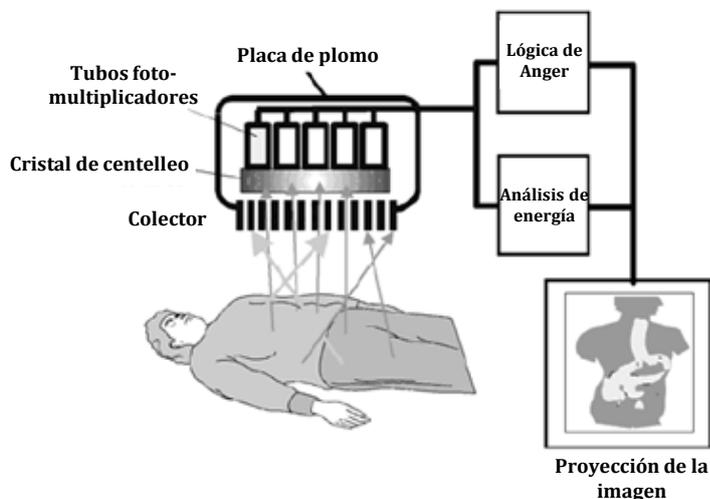


Figura 67: Gammacámara.

Las diferencias entre el equipamiento de estas técnicas con respecto a PET es que en esta última no se necesita el componente del colector porque tiene un detector de 360°, y que el cristal de centelleo es de germanato de bismuto (BGO).

La resolución espacial y la sensibilidad de las gammacámaras dependen de la dispersión de los fotones. Por esta razón, es necesario hacer una discriminación entre los primeros rayos gamma, para lo que se utilizan unos circuitos electrónicos que se basan en la lógica de Anger (Fig. 68); y los rayos gamma de baja energía, por medio de análisis de la energía de los fotones. De esta manera, se obtienen las coordenadas de los fotones que pasan por los fotomultiplicadores en una dirección correcta; lo que permite la obtención de una buena señal en función de la ventana de energía que se seleccione, como se puede ver en la siguiente figura. Esto tiene una desventaja, ya que el 99,9% de los fotones incidentes se rechazan.

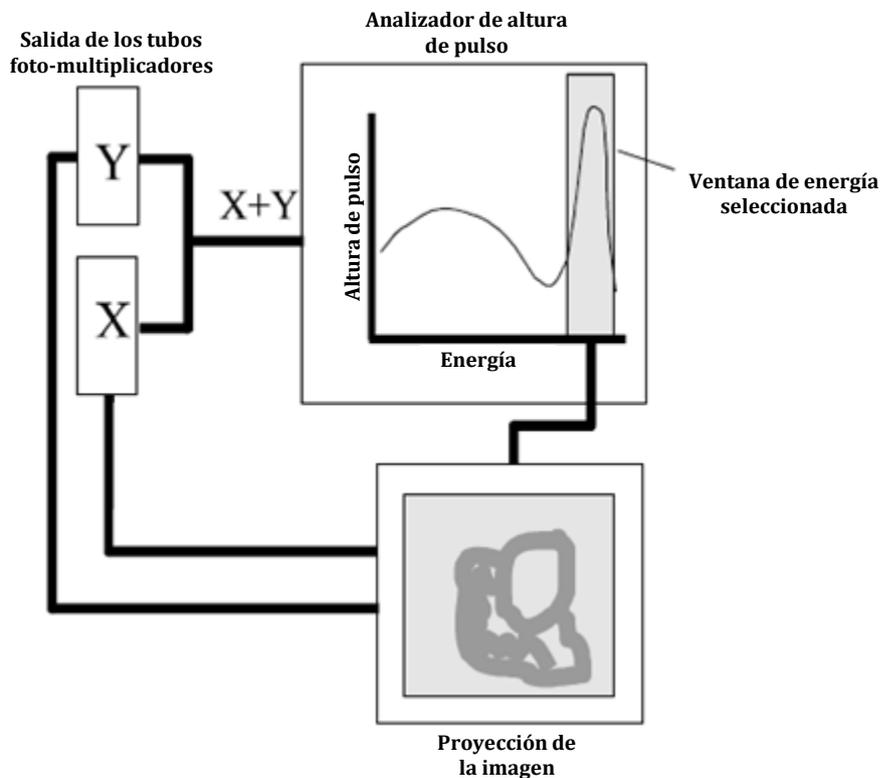


Figura 68: Optimización de la señal observada.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen en medicina nuclear

4. Radioisótopos

El fundamento de la técnica de imagen por medicina nuclear, como se ha comentado anteriormente, se basa en el comportamiento de los núcleos inestables. Estos pueden producir a su vez otros isótopos que se dividen en 4 categorías:

- Enriquecidos en neutrones- Por emisión de electrones (Un neutrón se transforma en un protón y la masa A es constante)

$$Z \rightarrow Z + 1$$

$$N \rightarrow N - 1$$

- Enriquecidos en protones- Por emisión de positrones (Un protón se transforma en un neutrón y la masa A es constante)

$$Z \rightarrow Z - 1$$

$$N \rightarrow N + 1$$

- Pérdida de masa- Por emisión alfa

$$Z \rightarrow Z - 2$$

$$N \rightarrow N - 2$$

$$A \rightarrow A - 4$$

- Estado temporal de excitación por emisión gamma donde el número de protones, neutrones y la masa permanecen constantes. Son los isótopos radiactivos más utilizados en diagnóstico por imagen porque se libera el fotón electromagnético más penetrante, los rayos gamma.

La producción de radioisótopos se realiza por diferentes métodos como pueden ser con el uso de un generador químico por separación de radioisótopos, por captura de neutrones, fisión nuclear o bombardeo con partículas cargadas entre los más utilizados.

El método de generador químico por separación de radioisótopos consiste en una separación con columna, que se cambia periódicamente, con precursores de larga vida. Un ejemplo de este método es la producción de ^{68}Ga a partir del generador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (⁶⁴); de forma que se utiliza el ^{68}Ge que tiene una semivida de 271 días para producir ^{68}Ga , que tiene una semivida de 68 minutos. Se suele usar ácido clorhídrico 0,1M para eluir este radiotrazador y se puede utilizar en multitud de aplicaciones. En este caso, el generador es una columna de vidrio con un relleno de dióxido de titanio modificado, donde está unido el germanio. Esta forma de producir radionucleidos necesita una inversión económica más baja que la fisión nuclear o el bombardeo con partículas cargadas. De esta manera, se pueden producir radionucleidos que se pueden utilizar en PET. Otros ejemplos de generadores son el $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$, el $^{52}\text{F}/^{52\text{m}}\text{Mn}$ para PET o $^{113}\text{Sn}/^{113\text{m}}\text{In}$ para terapia.

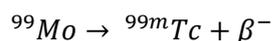
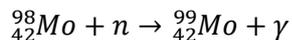
Los métodos de captura de neutrones y fisión nuclear se llevan a cabo en un reactor nuclear y sus productos son radisótopos de semivida larga. En el caso de la captura de neutrones, se ralentiza una corriente de neutrones con energías entre 0,02 y 100 eV por colisión con agua, ya que los neutrones tienen una elevada probabilidad para ser capturados por los núcleos. Los radioisótopos se generan en el núcleo del reactor transformando los núcleos por captura de neutrones. Algunos inconvenientes del método son que únicamente una parte de la carga del núcleo se transforma en el radioisótopo buscado; y que tienen una baja actividad específica, razón por la que se utilizan precursores con semividas largas.

En la técnica de la fisión nuclear (Fig. 69), los isótopos aislados se caracterizan por tener una elevada actividad y ser ricos en neutrones, por lo que decaen por emisión de electrones. Por esta razón, los radioisótopos generados se utilizan en terapia o como precursores de otros isótopos que emiten rayos gamma para uso de imagen médica.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen en medicina nuclear

La producción del isótopo de ^{99m}Tc , que es un emisor de rayos gamma con una semivida de 6 horas, se lleva a cabo en un proceso con varias etapas, como son la formación del isótopo precursor ^{99}Mo (con un periodo de semidesintegración de 66 horas) a partir de ^{98}Mo (el exceso de la energía de unión se transforma en radiación gamma) y su posterior transformación con una emisión beta a ^{99m}Tc (65).



El tecnecio producido se extrae del generador como pertecnetato sódico (NaTcO_4) bajo demanda y posteriormente se utiliza para marcar diferentes compuestos (generalmente en forma de quelatos para disminuir la posibilidad de liberación de este metal). Entre los quelatos utilizados están el Tc-DTPA para imagen renal, Tc-fosfonato para imagen ósea, Tc-propileno-amino-oxima para imagen cerebral y Tc-isonitrilo para imagen cardíaca.

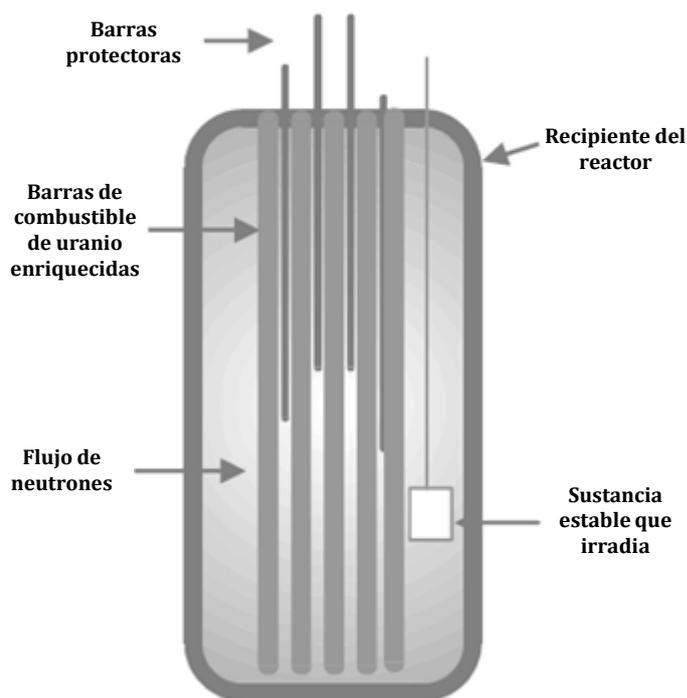


Figura 69: Reactor de fusión.

El método de bombardeo con partículas cargadas utiliza un acelerador, como por ejemplo un ciclotrón (Fig. 70), con la finalidad de producir protones de alta energía y partículas alfa. En el centro del ciclotrón hay partículas cargadas que son aceleradas por un campo eléctrico de alta frecuencia y confinadas por un fuerte campo magnético para moverse en una espiral expandiéndose. Esta técnica se utiliza para producir isótopos que tienen una semivida corta, y suelen producirse directamente con un ciclotrón en los hospitales para permitir el uso de los isótopos antes de que dejen de ser efectivos. Un ejemplo es el ^{15}O , que tiene una semivida de 2 minutos ⁽⁶⁶⁾. Estos radisótopos se utilizan en PET, donde se necesita una emisión de positrones de semivida corta. El isótopo ^{18}F ⁽⁶⁷⁾ es emisor de positrones con semivida de 110 minutos y es uno de los más utilizados en PET, unido a la FDG.

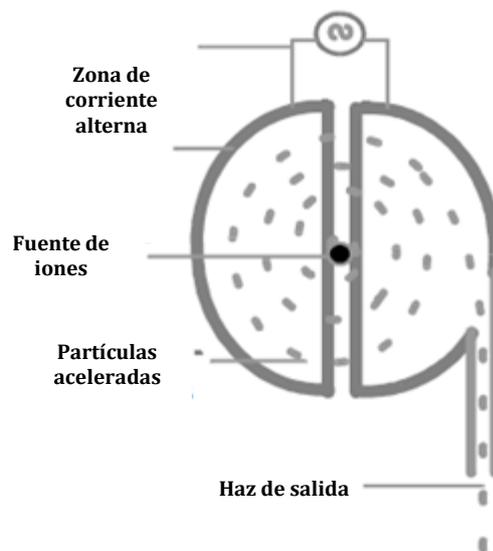


Figura 70: Ciclotrón.

Existen isótopos que se pueden producir por varios métodos como son ^{99}Tc y ^{131}I , pero el ^{131}I tiene un proceso de desintegración con emisión de electrones beta haciendo que sea limitado su uso en imagen médica.

Los radionúclidos que se utilizan en PET son emisores de positrones, lo que quiere decir que producen dos fotones de 511 keV y tienen una semivida más corta (ej ^{11}C $t_{1/2}$ 20 min, ^{18}F $t_{1/2}$ 110 min) que para SPECT (^{123}I $t_{1/2}$ 13 h). Los radionúclidos utilizados en SPECT se caracterizan por tener unas energías fotónicas entre 100 y 400 keV y son emisores gamma.

A continuación, se adjunta una tabla con algunos ejemplos de isótopos generados por las diversas técnicas comentadas anteriormente y su aplicación (Tabla 3).

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen en medicina nuclear

Tabla 3: Datos de radioisótopos

Isótopo	Semivida	Energía (keV)	Método de producción	Técnica
¹²⁵ I	59,9 días	35,5 γ	Captura de neutrones	SPECT/ Terapia
¹⁷⁷ Lu	6,71 días	208 γ	Captura de neutrones	SPECT/ Terapia
¹⁸⁸ Re	17,02 horas	155 γ	Captura de neutrones	SPECT/ Terapia
⁹⁹ Mo	66 horas	740 γ	Captura de neutrones/ Fisión	Producción de ^{99m} Tc
¹³¹ I	8,07 días	364 γ	Captura de neutrones/ Fisión	SPECT/ Terapia
¹³³ Xe	5,27 días	81 γ	Fisión	SPECT
¹³⁷ Cs	30 años	662 γ	Fisión	Terapia
⁹⁰ Y	2,67 días	2180 β^-	Fisión	Terapia
¹¹ C	20,4 min	511 β^+	Ciclotrón	PET
¹³ N	9,96 min	511 β^+	Ciclotrón	PET
¹⁵ O	2,07 min	511 β^+	Ciclotrón	PET
¹²⁴ I	4,18 días	511, 602, 722 β^+	Ciclotrón	PET
¹⁸ F	109 min	511 β^+	Ciclotrón	PET
¹¹¹ In	67,9 horas	159, 171, 245 γ	Ciclotrón	SPECT
¹²³ I	13 horas	159 γ	Ciclotrón	SPECT/ Terapia
⁶⁷ Ga	3,26 días	93, 185, 300, 394 γ	Ciclotrón	SPECT
⁶⁸ Ga	68 min	511 β^+	Generador químico	PET
^{99m} Tc	6 horas	140 γ	Generador químico	SPECT
¹²² I	3,63 min	511 β^+	Generador químico	PET
²⁰¹ Tl	3,04 días	135, 167 γ	Generador químico	SPECT

5. Pruebas médicas

A continuación, se muestran algunas imágenes obtenidas por la técnica de imagen por medicina nuclear:

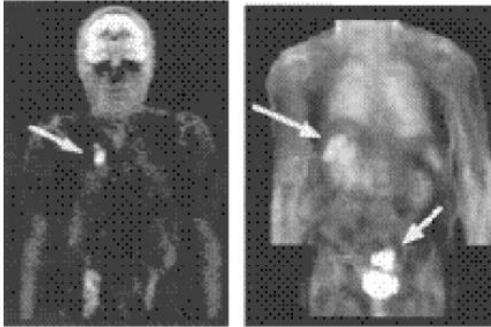


Figura 71: Imagen por SPECT (Siemens).



Figura 72: Estudio de huesos por SPECT (Philips).

Se puede observar la acumulación de los compuestos alrededor de los tumores de pulmón y colon.

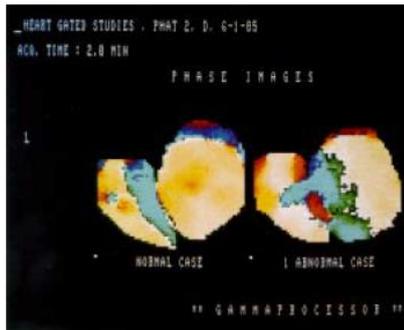


Figura 73: Perfusión de la sangre en el corazón (Philips).



Figura 74: Estudio de absorción de anfetamina (Philips).

Se puede observar el efecto de una perfusión normal (izq.) frente a una perfusión que no es normal (der.).

Se puede observar el deterioro del cerebro causado por la absorción de anfetamina.

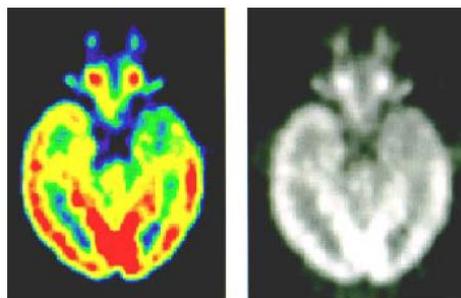


Figura 75: Estudio PET de FDG en cerebro (Centro de PET St Thomas).

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por ultrasonidos

Imagen por ultrasonidos

La imagen por ultrasonidos es una técnica que se comenzó a estudiar en los años 30, a partir de la detección accidental de burbujas de aire en el torrente sanguíneo después de la administración de una disolución agitada ⁽⁶⁸⁾. Esta técnica se utiliza para el estudio de estructuras macroscópicas como tejidos blandos y órganos. El fundamento de la técnica se basa en el cambio de la velocidad del sonido al moverse de unas zonas a otras del interior del cuerpo humano.

Es una técnica simple, más económica que el resto de las técnicas anteriores; con una resolución espacial de menos de 0,05 milímetros y tiempos de análisis inferiores a diez milisegundos. La respuesta obtenida se puede grabar continuamente durante el proceso de escaneado de las imágenes por un sonógrafo. Existe la posibilidad de generar imágenes en varias dimensiones dependiendo del equipamiento utilizado.

Entre las aplicaciones más destacadas de esta técnica se encuentran la medición del flujo sanguíneo utilizando el efecto Doppler ⁽⁶⁹⁾ y la visualización de órganos y estructuras internas del cuerpo humano por medio de la técnica conocida como ecografía o sonografía (Fig. 76).



Figura 76: Imagen fetal por ultrasonidos.

Sin embargo, una gran desventaja de esta técnica es la presencia de artefactos en las imágenes. Para la corrección de este efecto involuntario se utilizan los medios de contraste.

Los medios de contraste utilizados en ultrasonidos se administran en una dosis muy pequeña y generalmente por vía intravenosa. Se obtienen de materiales naturales que no son tóxicos o de materiales sintéticos biodegradables (lípidos o proteínas), en cuyo interior hay una pequeña cantidad de un gas inerte de baja solubilidad que no es reactivo y que hace que estos agentes de contraste no sean nocivos para los pacientes.

Los primeros medios de contraste consistían en soluciones salinas que se agitaban y generaban microburbujas ⁽⁷⁰⁾. Posteriormente, se utilizaron otros medios de contraste en los que se diferenciaba una fase superior de microburbujas y una fase acuosa formada por una disolución de un azúcar. El primer agente de contraste fue el Ecovist (SHU) de Schering ⁽⁷¹⁾.

Para mejorar la estabilidad de estas microburbujas, *in vitro* e *in vivo*, se añadió un surfactante como es el ácido palmítico a la formulación de Ecovist y, de esta manera, se produjo el Levovist (SHU 508) de Shering ⁽⁷²⁾. Con este medio de contraste se inició la primera generación de estos medios de contraste.

Posteriormente, se comenzaron a estudiar los medios de contraste con una capa de proteínas, siendo la más utilizada la albúmina de suero humana. Este medio de contraste se denomina Albumex ⁽⁷³⁾ y fue desarrollado por Molecular Biosystems. Se trata de un medio de contraste estable, con capacidad de almacenaje durante meses sin detectarse ninguna degradación significativa. La principal desventaja que tiene este medio de contraste es su inestabilidad en el torrente sanguíneo; lo que puede provocar una pérdida de aire y disminuir su eficacia por la disolución en los alrededores de la zona de acción. Este medio de contraste fue el primero utilizado para oscurecer el miocardio después de una administración intravenosa ⁽⁷⁴⁾, pero se necesitaba una dosis elevada y los resultados no fueron totalmente satisfactorios ya que la opacidad conseguida era limitada en el ventrículo izquierdo.

Otra alternativa que se investigó fue el uso de surfactantes o capas de microburbujas estabilizadas con lípidos, formadas por una parte hidrofóbica y otra hidrofílica. De esta manera, empleando surfactantes monocapa con microburbujas, se obtuvieron medios de contraste estables con la posibilidad de ser almacenados y parcialmente estables en el torrente sanguíneo. En ningún caso se obtuvieron resultados satisfactorios en estudios *in vivo* ⁽⁷⁵⁾.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por ultrasonidos

Durante los años 90, se descubrieron nuevos medios de contraste para su uso en ultrasonidos, dando lugar a la segunda generación. El objetivo era conseguir un aumento en el tiempo de residencia de varios minutos en el torrente sanguíneo. Para ello, se utilizaron gases de baja solubilidad, sobre todo fluorados como SF₆ ⁽⁷⁶⁾, C₃F₈ ⁽⁷⁷⁾, C₄F₁₀ ⁽⁷⁸⁾ y vapor de C₅F₁₂ ⁽⁷⁹⁾ o C₆F₁₄ ⁽⁸⁰⁾ en un medio con nitrógeno. Estos medios de contraste poseen una gruesa capa que hace que la fase gaseosa sea impermeable ⁽⁸¹⁾.

El éxito de la técnica en cuanto a la visualización de la imagen deseada depende de la concentración del medio de contraste utilizado. En este caso, se administran mililitros que tienen billones de microburbujas que permiten, en segundos, dar un contraste para mejorar las imágenes obtenidas; especialmente en la sangre o en el hígado. Estas microburbujas se desinflan rápidamente perdiendo el aire en el torrente sanguíneo.

En el proceso de estudio de la zona de interés por medio de ultrasonidos con contraste, se utilizan varios tipos de potencia de transmisión. Al inicio, se utiliza una potencia de transmisión de baja intensidad para no romper las microburbujas y que se dirijan a la zona de interés. Para mejorar la calidad de la imagen se utiliza la potencia de transmisión de alta intensidad con la finalidad de destruir las microburbujas una vez llegan a una zona insonificada (donde se han generado ondas sonoras que son transmitidas y recibidas dentro de un haz bien definido por la zona de estudio) y así tener una diferenciación mayor con la señal de los propios tejidos (Fig. 77) ⁽⁸²⁾.

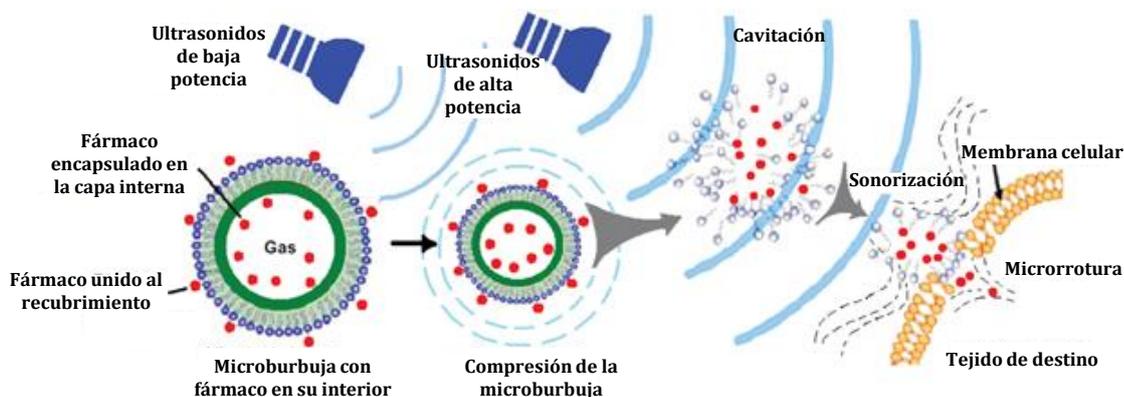


Figura 77: Uso de microburbujas con ultrasonidos.

Con el uso de los agentes de contraste de segunda generación se mejoró el tiempo de permanencia de estos en la sangre, pudiendo permanecer de segundos a minutos, de manera que se necesitaba una dosis de 10⁸ microburbujas para conseguir un buen contraste en imágenes de corazón o hígado.

Los equipos de ultrasonidos se basan en el efecto Doppler para conseguir una selectividad en la imagen de las burbujas, ya que estas pueden emitir ultrasonidos a una frecuencia que es diferente de la transmitida, especialmente en su destrucción. Esta modificación de la frecuencia se puede detectar por ultrasonidos Doppler, que consiste en el efecto las ondas de ultrasonidos emitidas por el transductor que hace que reboten en los glóbulos rojos en movimiento presentes en la circulación sanguínea y se genere un cambio de frecuencia⁽⁸³⁾. Puesto que las microburbujas no presentan una respuesta lineal, pueden generar un segundo y tercer armónico de las ondas sonoras que se encuentran en la franja de frecuencias de ultrasonidos. Esta señal se detecta en los sistemas de ultrasonidos y se diferencia fácilmente de la generada por los tejidos de la zona de estudio.

Puesto que algunos tejidos podrían generar un segundo armónico y confundirse con los generados por las microburbujas, una mejora de la técnica consiste en el uso de inversión de pulso (también denominada inversión de fase o contraste armónico) (Fig. 78 y 79), que mejora la relación señal-ruido minimizando la señal producida por los tejidos de los alrededores de la zona de estudio. En este método se aplican a la vez un pulso de ultrasonidos normal y otro con inversión de fase. La respuesta de los tejidos será lineal, por lo que cuando llegan al transductor las señales de ambos pulsos se genera una imagen espejo cancelando su contribución con una señal neta de cero. De distinta manera se comportan las microburbujas, ya que, al no tener una respuesta lineal a los pulsos de ultrasonidos, tampoco tienen una respuesta neta cero y se puede diferenciar la señal del tejido normal con respecto a la obtenida por microburbujas.

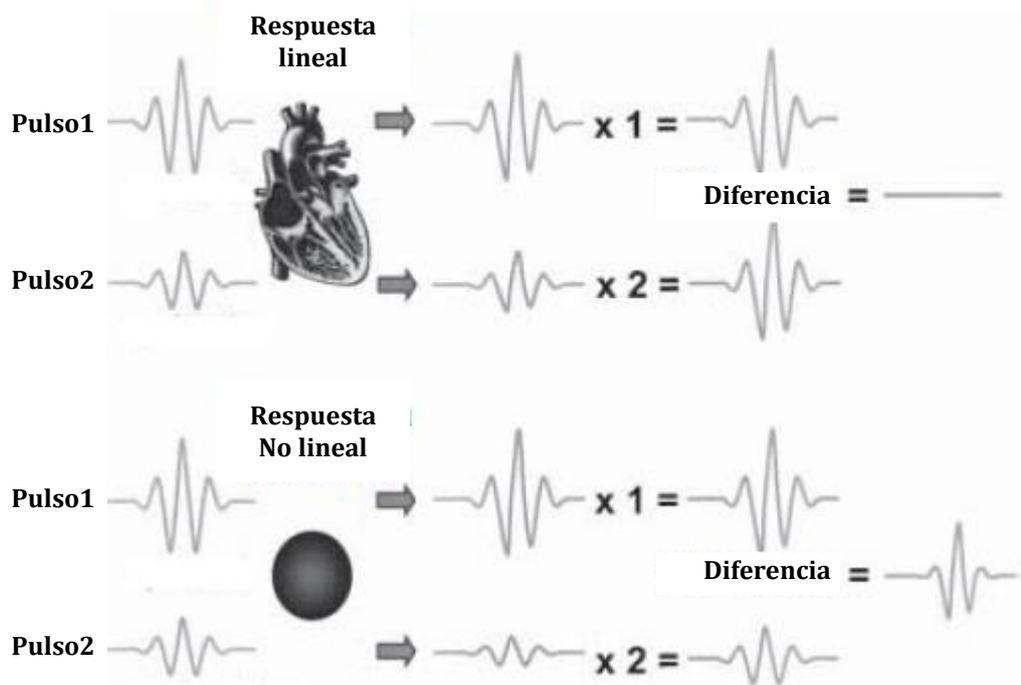


Figura 78: Inversión de pulso o inversión de fase.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen por ultrasonidos

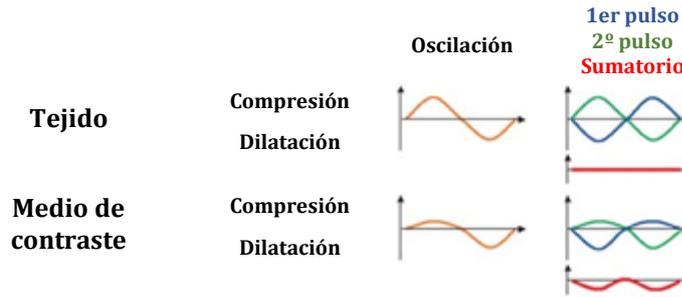


Figura 79: Inversión de pulso o inversión de fase.

La señal obtenida con este método no es siempre directamente proporcional a la concentración de las microburbujas. Si se administra una concentración elevada del medio de contraste podría llegar a existir una atenuación de la señal. Este problema se puede corregir administrando una baja concentración del medio de contraste o con una administración continúa utilizando un caudal no muy elevado en los casos en los que sea necesaria una mayor concentración.

Este método mejora la sensibilidad de la técnica, permite detectar microburbujas individuales en la zona de estudio y observar partículas del tamaño de micras por ultrasonidos. La dosis administrada del medio de contraste es inferior a un microgramo por gramo de sangre o tejido a observar. Esta es una gran ventaja respecto a otras técnicas de diagnóstico por imagen como rayos X o iRM que hace que la técnica de ultrasonidos sea comparable al uso de trazadores en medicina nuclear.

Una importante aplicación que está en continuo desarrollo es la funcionalización de estas microburbujas, con objeto de convertirlas en selectivas a través de uniones a receptores específicos ⁽⁸⁴⁾ para el posterior estudio de órganos y tejidos. De esta manera se aumenta considerablemente la eficacia del medio de contraste utilizado obteniendo una mejor señal de la zona estudiada (Fig. 80).

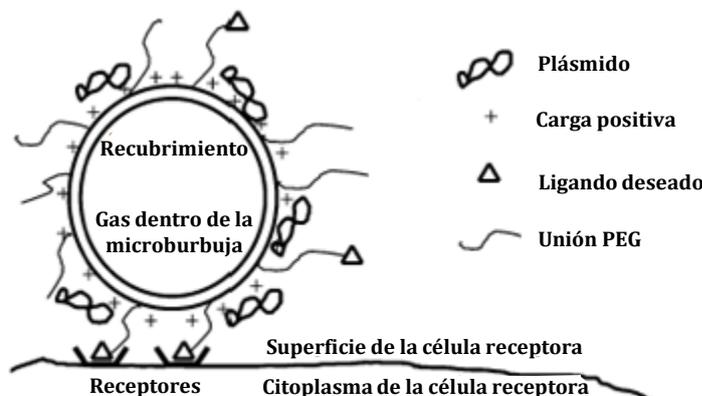


Figura 80: Técnica de funcionalización para microburbujas

Imagen óptica

La presente técnica utilizada en diagnóstico por imagen se basa en la propiedad del cuerpo humano de ser transparente a algunas longitudes de onda; de esta manera se puede detectar la luz emitida por fluoróforos orgánicos, un *quantum dot*, una proteína fluorescente o una molécula en un estado excitado. Los fotones son visibles en zonas del infrarrojo cercano y pueden penetrar unos 20 milímetros dentro de los tejidos. Las principales ventajas de esta técnica son la mejora de la seguridad del paciente al no ser sometido a una radiación ionizante y el uso de concentraciones muy bajas del medio de contraste. Por otra parte, como principales desventajas hay que señalar la baja resolución y la dificultad en la cuantificación.

A la hora de obtener imágenes de las zonas de interés se pueden usar algunas de las propiedades utilizadas también en la espectroscopía; como son la absorción, dispersión, imagen por movimiento de fotones, fluorescencia o bioluminiscencia entre otras.

Entre las técnicas de imagen óptica más utilizadas se encuentran las siguientes:

- Endoscopia: Consiste en un tubo flexible con una cámara que se introduce en el interior del cuerpo humano permitiendo la visualización de órganos o tejidos ⁽⁸⁵⁾. Se trata de una de las exploraciones más utilizadas en la actualidad. En la siguiente figura se puede visualizar la sección media del estómago mirando hacia atrás, ya que el endoscopio está en forma de U y permite observar la parte superior del estómago y el instrumento que entra en él desde el esófago.

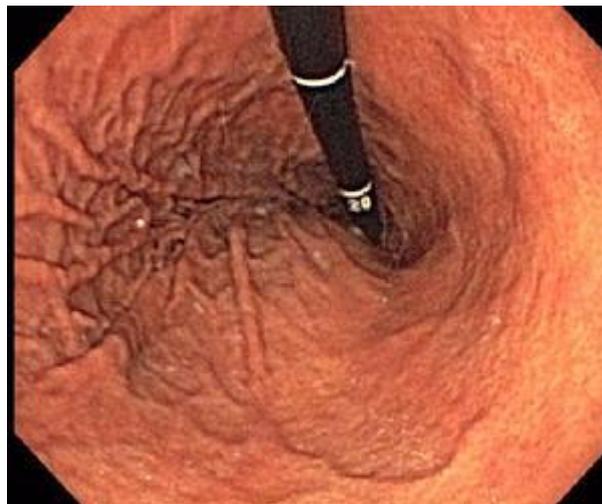


Figura 81: Imagen de la sección media del estómago obtenida por una endoscopia.

I. INTRODUCCIÓN

Diagnóstico por imagen: Imagen óptica

- Imágenes foto acústicas: Se emiten pulsos láser a los tejidos objeto de estudio y, con el calor generado se consigue una expansión de los tejidos para poder obtener imágenes más detalladas de estos.
- Tomografía de Coherencia Óptica (TCO): Permite obtener imágenes subsuperficiales. Es una técnica similar a la ecografía, pero se utiliza la luz en vez de ondas acústicas. Se utiliza una luz infrarroja que penetra en los tejidos y se divide en dos haces de luz, uno de ellos penetra la zona de estudio y otro es captado por un espejo como referencia. Cuando regresan, ambos haces chocan y se genera una interferencia en forma de imagen en color que representa el grosor de los tejidos estudiados.
- Tomografía Óptica Difusa (TOD): Se utilizan ondas de luz de la región cercana al infrarrojo para crear imágenes en tres dimensiones de tejidos del interior del cuerpo. Se analiza la luz que difunde a través de los tejidos.
- Espectroscopía Raman: Se emplea un láser para generar una dispersión Raman de luz visible. Esta luz generada interactúa con vibraciones moleculares de la zona de estudio y se miden los cambios de energía generados.
- Microscopía de Super-Resolución: Esta técnica permite obtener imágenes de alta resolución de células individuales.
- Tomografía Terahercios: Obtiene imágenes tomando diferentes secciones en las que se aplica radiación de frecuencia en el rango de los terahercios, que son ondas electromagnéticas que están en la zona del espectro entre las microondas y las ondas de luz infrarrojas.

Combinación de técnicas de diagnóstico por imagen

Todas las técnicas utilizadas en diagnóstico por imagen que se han desarrollado a lo largo de la sección de INTRODUCCIÓN son complementarias entre sí, de forma que existe la posibilidad de combinar dos o más de ellas para proporcionar a los expertos un conocimiento mayor y más robusto del estado de los pacientes. Cada técnica por separado tiene sus ventajas, pero también sus limitaciones, no existiendo una única técnica que pueda facilitar toda la información necesaria en cuanto a resolución espacial, resolución temporal, sensibilidad, visualización de tejidos, relación señal-ruido, ... ⁽⁸⁶⁾. En la tabla 4 se incluye un resumen de las diferentes técnicas de diagnóstico por imagen para su uso en animales, incluyendo las ventajas y desventajas que posibilitan las distintas combinaciones de estas con el objetivo de obtener la máxima información posible con una mejor calidad.

I. INTRODUCCIÓN

Combinación de técnicas de diagnóstico por imagen

Tabla 4: Comparación de técnicas de diagnóstico por imagen relativas al uso de animales

Técnica	Resolución	Tiempo	Coste (\$)	Ventajas	Desventajas
iRM	10-100 μ m	Min-h	>300 000	Contraste de tejidos blandos	Coste elevado
				No ionizante	Requiere elevado conocimiento técnico
				Información fisiológica anatómica y molecular	Sensibilidad baja
CT	50 μ m	Min	100-300000	Coste intermedio	Rayos-X
				Información fisiológica anatómica y molecular	Baja sensibilidad para imagen molecular
PET	1-2 mm	Min	>300 000	Mejor para farmacocinética y farmacodinámica	Coste elevado
				Elevada sensibilidad	Requiere elevado conocimiento técnico
				Cuantificación de parámetros cinéticos	Radiación ionizante
				Información fisiológica y molecular	Limitada resolución espacial
SPECT	1-2 mm	Min	100-300000	Coste intermedio	Menor sensibilidad que PET
				Técnica simple	Menos adecuado para medicamentos marcados que PET e IRM
				Imagen de péptidos marcados	Radiación ionizante
				Información fisiológica y molecular	
BLI (Técnica de imagen bioluminiscente)	Algunos mm	Min	100-300000	Coste intermedio	Baja resolución
				Elevado rendimiento	
				Técnica simple	Profundidad limitada
Expresión genética, seguimiento celular y bacteriano					

Entre las combinaciones más comunes están PET-TAC, SPECT-TAC, PET-iRM, imagen óptica-iRM ⁽⁸⁷⁾.

Medicina nuclear-TAC

Las combinaciones de PET-TAC y SPECT-TAC utilizan la técnica de TAC como fuente de la información anatómica, mientras que usan PET o SPECT para obtener la información funcional. Un ejemplo es la aplicación de esta combinación de técnicas en pacientes con cáncer, en la que se utiliza la técnica de TAC que permite localizar los tumores y PET puede identificar la actividad metabólica ⁽⁸⁸⁾.

Medicina nuclear-iRM

Esta combinación utiliza iRM para aportar la información anatómica y PET para aportar la información funcional. Se consigue un aumento de la resolución espacial, una gran diferenciación de tejidos, un aumento de la sensibilidad y una mejora de la relación señal/ruido.

Actualmente existen estudios para la optimización de esta técnica que se basan en la modificación del tamaño de los detectores de PET para mantener la forma abierta de iRM y, de esta manera, no causar modificaciones en el campo magnético aplicado ⁽⁸⁹⁾.

Imagen óptica-TAC

Es una combinación de técnicas que se basa en la posibilidad de acoplar los componentes utilizados en la imagen óptica en el interior de los equipos utilizados para TAC. Su investigación no ha llegado a utilizarse más lejos que a nivel de investigación y no se han obtenido demasiados resultados exitosos ⁽⁹⁰⁾.

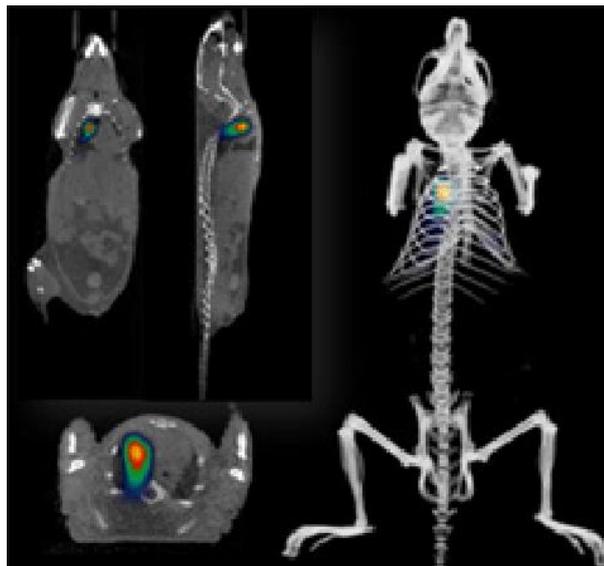


Figura 82: Imagen obtenida con la combinación de luminiscencia y TAC.

I. INTRODUCCIÓN

Combinación de técnicas de diagnóstico por imagen

Imagen óptica-iRM

Debido a la limitada accesibilidad de equipos para PET en preclínica y clínica, esta combinación de técnicas para diagnóstico por imagen sustituye el PET por una técnica de imagen óptica, de forma que se compensa la baja sensibilidad de la resonancia magnética con una técnica como la imagen óptica ⁽⁹¹⁾.

Actualmente se ha combinado la técnica de iRM con la tomografía óptica difusa (TOD, del inglés *Difusse Optical Tomography*), que es una técnica que utiliza las ondas de luz para crear imágenes en tres dimensiones de tejidos del interior del cuerpo. Esta combinación permite examinar tejidos blandos y como su aplicación más destacada es su uso en humanos para el estudio del cáncer de mama ⁽⁹²⁾.

TAC-iRM

Esta es la combinación de las dos técnicas más utilizadas en el campo del diagnóstico por imagen y se emplea para detectar tumores en estado muy avanzado que requieren quimiorradiación. Concentrando la dosis en el tumor y reduciendo al mínimo la dosis en los tejidos circundantes, los técnicos consiguen tener una información mayor a la hora de decidir el mejor tratamiento a utilizar. Esta técnica es conocida como radioterapia de intensidad modulada (IMRT, del inglés *Intensity Modulated Radiation Therapy*) ⁽⁹³⁾.

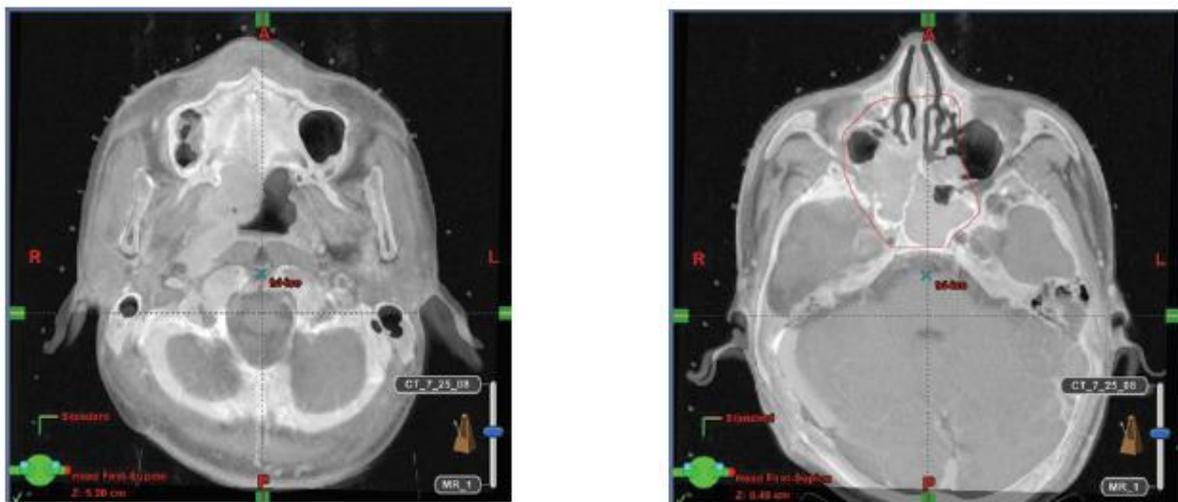


Figura 83: IRM de carcinoma nasofaríngeo (izq). TAC-iRM de carcinoma nasofaríngeo (der.). La línea roja delimita la zona de aplicación de radioterapia (Der).

Estudio de mercado

Tomando como referencia el estudio de mercado realizado en noviembre de 2019 por la empresa *MarketsandMarkets™*, se hará una evaluación de la situación actual del campo del diagnóstico por imagen en el mercado; diferenciando para ello entre las técnicas de diagnóstico, los medios de contraste y las afecciones de mayor aplicación en este campo.

Medios de contraste

Se puede observar en la figura 84 que América del Norte es la zona donde se administran más medios de contraste, suponiendo un 38% del mercado mundial con un crecimiento anual esperado del 3,71%. En Asia se espera un mayor crecimiento por el incremento de la inversión de I+D, el aumento demográfico debido a una mayor esperanza de vida de la población y el auge de las inversiones del mercado de radiología en la India.

A nivel mundial, se pronostica que el mercado de los medios de contraste tenga un crecimiento de un 3,8% desde 2019 a 2024 debido al aumento de los agentes de contraste aprobados por las autoridades, el incremento de exploraciones, sobre para las técnicas de TAC e iRM; y la continua y cada más frecuente aparición de afecciones como el cáncer o enfermedades cardiovasculares.



Figura 84: Previsión de crecimiento de los mercados en el mundo.

I. INTRODUCCIÓN

Estudio de mercado

Dentro de los medios de contraste que se pueden encontrar en el mercado del diagnóstico por imagen, existen diferentes tipos en función de su naturaleza. Se puede observar en la figura 85 que los más utilizados, con gran diferencia, son los agentes de contraste yodados, ya que son los que se usan generalmente en la técnica más utilizada que es la de rayos X/TAC. Aun así, la tendencia de estos medios de contraste coincide con la de la técnica de los rayos X/TAC, por lo que se espera una reducción en la cuota de mercado con respecto al crecimiento del resto de medios de contraste.

En el otro extremo encontramos los medios de contraste basados en bario, puesto que en 2024 tendrán un mercado menor que en 2019 suponiendo una reducción de 64,6 millones de \$ a 58,0 en 2024.

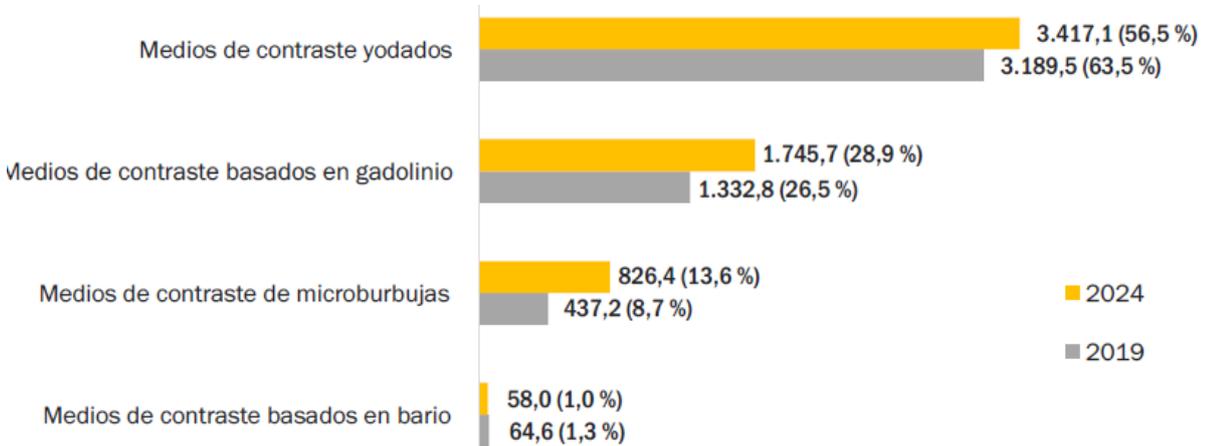


Figura 85: Mercado en millones de dólares por tipos de medios de contraste.

A continuación, se estudia el mercado de cada tipo de medios de contraste utilizado en las técnicas de diagnóstico por imagen de manera individual y en función de las diferentes regiones geográficas.

En el caso de los medios de contraste yodados, la tendencia regional se explica en la siguiente tabla (Tabla 5):

Tabla 5: Mercado de los medios de contraste yodados.

Región	2017	2018	2019	2024	Tasa de crecimiento anual (2019-2024)
América del Norte	1.078,3	1.096,7	1.113,5	1.159,5	0,8%
Europa	1.029,9	1.065,7	1.078,3	1.163,1	1,5%
Asia y Pacífico	791,5	816,2	837,0	924,9	2,0%
Resto del mundo	154,9	158,2	160,8	169,6	1,1%
Total	3.054,7	3.129,8	3.189,5	3.417,1	1,4%

En el caso de los medios de contraste basados en gadolinio, la tendencia regional se explica en la siguiente tabla (Tabla 6):

Tabla 6: Mercado de los medios de contraste basados en gadolinio.

Región	2017	2018	2019	2024	Tasa de crecimiento anual (2019-2024)
América del Norte	454,8	477,8	499,1	605,8	3,9%
Europa	409,9	440,1	469,8	637,2	6,3%
Asia y Pacífico	278,7	301,8	324,8	457,9	7,1%
Resto del mundo	36,2	37,7	39,0	44,9	2,8%
Total	1.179,7	1.257,4	1.332,8	1.745,7	5,5%

I. INTRODUCCIÓN

Estudio de mercado

En el caso de los medios de contraste de microburbujas, la tendencia regional se explica en la siguiente tabla (Tabla 7):

Tabla 7: Mercado de los medios de contraste de microburbujas.

Región	2017	2018	2019	2024	Tasa de crecimiento anual (2019-2024)
América del Norte	192,8	230,5	270,0	500,2	13,1%
Europa	72,8	87,7	103,7	200,4	14,1%
Asia y Pacífico	34,3	41,8	49,9	101,1	15,2%
Resto del mundo	9,9	11,7	13,7	24,6	12,5%
Total	309,8	371,8	437,2	826,4	13,6%

En el caso de los medios de contraste baritados, la tendencia regional se explica en la siguiente tabla (Tabla 8):

Tabla 8: Mercado de los medios de contraste basados en bario.

Región	2017	2018	2019	2024	Tasa de crecimiento anual (2019-2024)
América del Norte	22,06	21,83	21,46	18,92	-2,5%
Europa	21,82	21,71	21,48	19,49	-1,9%
Asia y Pacífico	19,13	19,07	18,88	17,21	-1,8%
Resto del mundo	2,84	2,81	2,76	2,42	-2,6%
Total	65,9	65,4	64,6	58,0	-2,1%

Técnicas de diagnóstico por imagen

De todas las técnicas del campo de diagnóstico por imagen, las tres que más se utilizan son los rayos X/TAC, iRM y los ultrasonidos. Aunque se espera un importante crecimiento en el uso de esta última debido a la optimización de la técnica, se prevé que en 2024 la técnica más utilizada en diagnóstico por imagen siga siendo la de rayos X/TAC (Fig. 86).

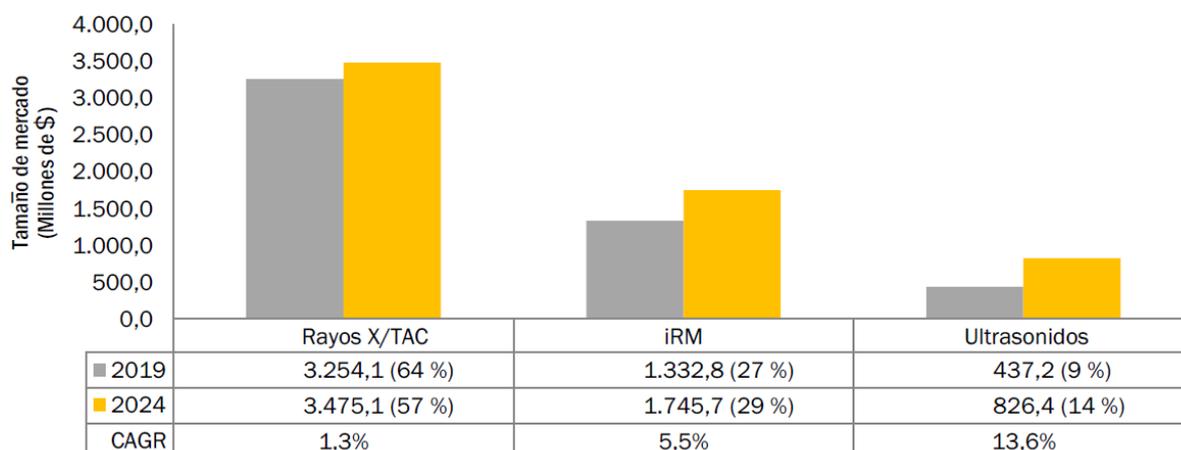


Figura 86: Mercado en millones de dólares de las principales técnicas en diagnóstico por imagen.

Según los datos recogidos en la figura 87, Europa confirma la tendencia observada a nivel mundial en la que la técnica de diagnóstico por imagen más utilizada es la de rayos X. Además, Alemania, Francia y Reino Unido son los tres países con mayor uso de medios de contraste de Europa.

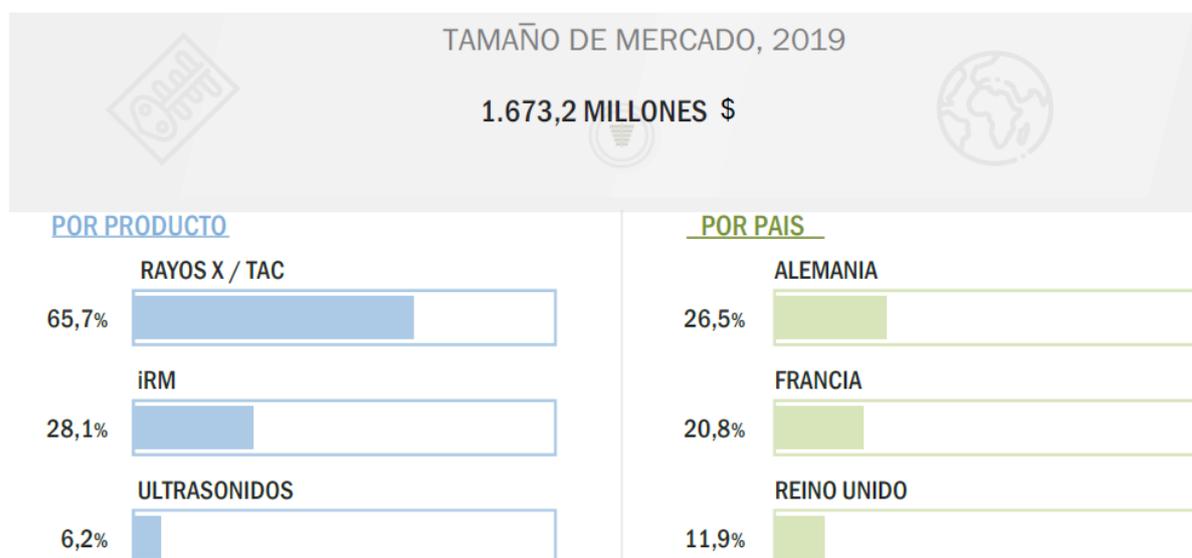


Figura 87: Evaluación del mercado en Europa de las técnicas y su uso en los tres países con mayor cuota de mercado.

I. INTRODUCCIÓN

Estudio de mercado

Según el informe, en 2018 España contaba con el 10,8 % del mercado mundial de medios de contraste. Es uno de los países que tiene los equipos más antiguos de Europa, de hecho, únicamente el 35 % del equipamiento de TAC y el 26% del equipamiento de iRM tiene menos de cinco años de antigüedad según *Healthcare-in-europe.com*. Además, indica que habrá un aumento de radiólogos y físicos cualificados en el mercado español.

En la tabla 9 se puede observar que, en los próximos años, en España se espera conseguir un mayor crecimiento para las técnicas de iRM y ultrasonidos que para rayos X/TAC.

Tabla 9: Mercado en \$ por técnica en España.

Técnica	2017	2018	2019 estimado	2024 predicho	Tasa de crecimiento anual (2019-2024)
Rayos X/TAC	106,1	107,8	110,1	118,9	1,5%
iRM	44,8	48,4	52,0	72,3	6,8%
Ultrasonidos	9,3	11,2	13,2	25,2	13,9%
Total	159,2	167,2	175,2	216,4	4,3%

En la página web del Ministerio de Sanidad, se puede encontrar la relación de equipos para cada técnica de diagnóstico por imagen con los que cuenta cada comunidad autónoma en España (Tabla 10). Según la terminología se podría dividir en:

TAC: Tomografía axial computarizada

iRM: Imagen por resonancia magnética

GAM: Gammacámara

ASD: Angiografía por sustracción digital

ALI: Acelerador de partículas

SPECT: Tomografía por emisión de fotones

PET: Tomografía por emisión de positrones

MAMOS: Mamógrafos

DO: Densitómetros óseos

Tabla 10: Equipos de Alta Tecnología disponibles por Comunidad Autónoma. _

Comunidad Autónoma	TAC	iRM	GAM	ASD	ALI	SPECT	PET	MAMOS	DO
Andalucía	135	78	33	20	29	9	6	119	46
Aragón	24	20	3	6	5	4	1	25	4
PPDO. De Asturias	19	17	4	5	7	4	3	20	6
Islas Baleares	23	21	6	8	4	1	2	21	12
Canarias	36	34	14	18	12	14	3	33	16
Cantabria	9	6	0	3	4	3	1	6	0
Castilla y León	47	33	10	12	12	3	1	44	19
Castilla la Mancha	39	22	3	4	4	4	1	28	9
Cataluña	104	90	39	28	32	0	8	55	32
Comunidad Valenciana	78	49	22	34	24	11	10	58	38
Extremadura	27	16	1	2	5	4	1	23	5
Galicia	52	41	13	17	15	13	4	35	15
Madrid	107	129	30	47	45	26	18	85	45
Región de Murcia	27	20	2	10	5	5	2	20	8
C. Foral de Navarra	16	8	2	2	6	4	2	8	3
País Vasco	39	24	12	14	15	3	5	28	12
La Rioja	5	4	2	2	2	2	1	4	3
Ceuta	1	1	0	0	0	0	0	1	1
Melilla	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Total Nacional	789	613	196	232	226	110	69	614	274

I. INTRODUCCIÓN

Estudio de mercado

En torno al 55-65 % de los estudios de diagnóstico por imagen utilizan agentes de contraste. En la siguiente tabla se indica el número de equipos instalados en diferentes regiones en 2017 y 2018, de lo que se deduce un crecimiento esperado del mercado de los exámenes de TAC (Tabla 11).

Tabla 11: Escáneres de TAC instalados.

Región	2017	2018
América del Norte	14.411	15.098
Europa	12.213	12.418
Asia y Pacífico	44.139	46.492

La técnica de rayos X/TAC tiene un menor impacto económico que la iRM, lo que conllevaría un aumento del mercado de los rayos X/TAC. En cambio, los medios de contraste utilizados tanto en iRM como en ultrasonidos se encuentran bajo un proceso de optimización y actualmente son capaces de ver con mayor resolución órganos y tejidos que con la técnica de rayos X/TAC no es posible, por lo que está creciendo su mercado en comparación con el de rayos X/TAC. Dentro de cada zona estudiada existe el mismo comportamiento que el observado a nivel mundial y que se mencionó anteriormente, en la descripción de la figura 85, donde se muestra que la técnica de rayos X/TAC pasaría de tener un 65% del mercado en 2019 a un 57% en 2024 (Tabla 12).

Tabla 12: Mercado de los rayos X/TAC en el mundo.

Región	2017	2018	2019 estimado	2024 predicho	Tasa de crecimiento anual (2019-2024)
América del Norte	1.100,4	1.120,6	1.134,9	1.178,4	0,8%
Europa	1.051,7	1.078,4	1.099,8	1.182,6	1,5%
Asia y Pacífico	810,7	835,2	855,9	942,1	1,9%
Resto del mundo	157,7	161,0	163,5	172,0	1,0%
Total	3.120,5	3.195,2	3.254,1	3.475,1	1,3%

La técnica de iRM se ha convertido en una buena alternativa para distinguir tejidos blandos y órganos que con la técnica de rayos X/TAC no se pueden distinguir, además de ser una de las técnicas más seguras porque no se somete a los pacientes a ninguna radiación ionizante (Tabla 13 y 14). A pesar de esto, dos inconvenientes importantes que tiene la técnica son su elevado coste y el tiempo de análisis.

Tabla 13: Equipos de iRM instalados.

Región	2017	2018
América del Norte	12.590	13.167
Europa	9.476	9.783
Asia y Pacífico	20.288	21.703

Tabla 14: Mercado de iRM en \$ en el mundo.

Región	2017	2018	2019 estimado	2024 predicho	Tasa de crecimiento anual (2019-2024)
América del Norte	454,3	477,8	499,1	605,8	3,9%
Europa	410,2	440,1	469,8	637,2	6,3%
Asia y Pacífico	279,0	301,8	324,8	457,9	7,1%
Resto del mundo	36,2	37,7	39,0	44,9	2,8%
Total	1.179,7	1.257,4	1.332,8	1.745,7	5,5%

I. INTRODUCCIÓN

Estudio de mercado

Con respecto a las técnicas de diagnóstico por imagen con ultrasonidos, los agentes de contraste se administran en un 20% de los estudios. Esto se explica porque es una técnica segura, flexible y de bajo coste, convirtiéndose en una alternativa a los rayos X/TAC e iRM. En los próximos años, se espera un importante crecimiento de la técnica de ultrasonidos en comparación con el resto de las técnicas de diagnóstico por imagen (Tabla 15).

Tabla 15: Mercado de los ultrasonidos en el mundo.

Región	2017	2018	2019 estimado	2024 predicho	Tasa de crecimiento anual (2019-2024)
América del Norte	192,83	230,49	270,01	500,20	13,1%
Europa	72,78	87,73	103,66	200,39	14,1%
Asia y Pacífico	32,30	41,78	49,87	101,15	15,2%
Resto del mundo	9,88	11,75	13,69	24,63	12,5%
Total	309,79	371,75	437,23	826,37	13,6%

Afecciones de mayor aplicación

El informe muestra que los problemas de salud para los que más se utilizan medios de contraste en diagnóstico por imagen son las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Fig. 88), esperando una subida importante de estas exploraciones en el 2024; esto es debido a la aparición cada vez más común de estas enfermedades, pero sobre todo a la optimización de la técnica de iRM para el diagnóstico cardiovascular, así como a la mejora de la infraestructura médica en países desarrollados.

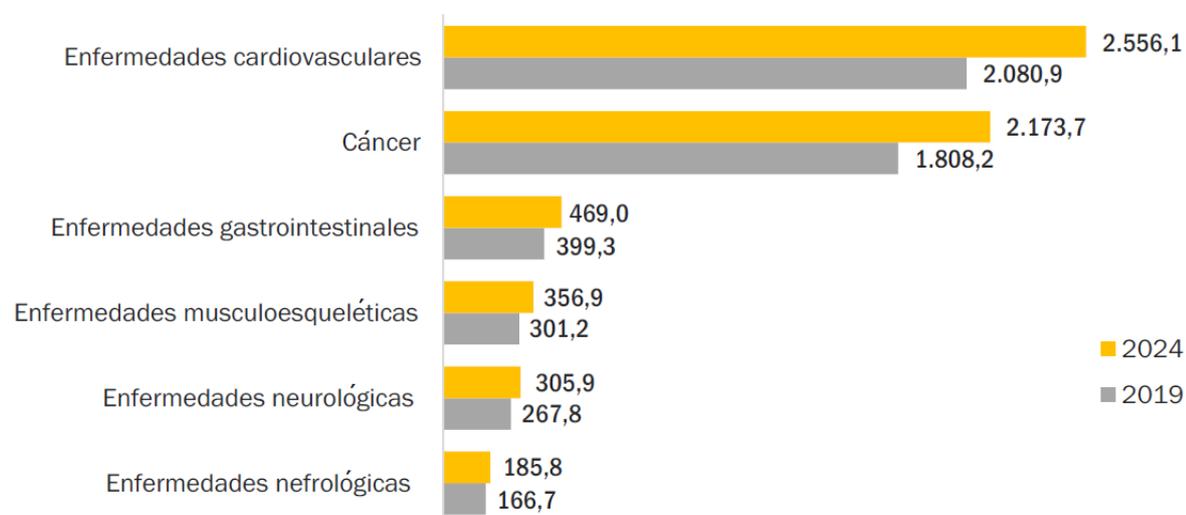


Figura 88: Mercado en millones de dólares de los medios de contraste según la afección estudiada.

*“Lo que conduce y arrastra al mundo
no son las máquinas sino las ideas.”*

Víctor Hugo

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Los compuestos utilizados como medios de contraste poseen una estructura característica que determina su aplicación en las diferentes técnicas de diagnóstico por imagen. Además, dicha estructura permite que se puedan visualizar determinadas partes del cuerpo como por ejemplo el corazón, el hígado, la vesícula biliar, el cerebro, los riñones o la vejiga.

La mayoría de los medios de contraste disponibles actualmente en el mercado están diseñados para ser utilizados en una única técnica de diagnóstico por imagen, ya sea rayos X, iRM, medicina nuclear, ultrasonidos o imagen óptica. Sin embargo, existe un número limitado que se pueden llegar a utilizar en una combinación de las técnicas de diagnóstico por imagen mencionadas.

Es fundamental tener en cuenta estos factores a la hora de plantear el objetivo general de este trabajo: la síntesis de nuevos compuestos que puedan ser utilizados como medios de contraste tanto en una de las técnicas comentadas anteriormente (iRM, rayos X, TAC, PET, SPECT, ...), como en una combinación de ellas (PET-TAC, SPECT-TAC, PET-iRM, CT-iRM, ...); y que permitan conseguir buenas imágenes de ciertas zonas del cuerpo humano, como el hígado y la vesícula biliar, que no resultan de fácil visualización en la actualidad debido a la escasez de medios de contraste destinados a ese fin.

Se busca que este tipo de compuestos tengan una cierta afinidad con las macromoléculas que están en el espacio intravascular, especialmente con la albúmina plasmática. Al ser administrados por vía intravenosa, se conseguiría formar un complejo de elevado peso molecular capaz de permanecer un elevado tiempo en el espacio intravascular, evitando así una rápida eliminación por la vía renal y favoreciendo la eliminación por la vía biliar. Por esta razón, se estudiará la aplicabilidad de los compuestos sintetizados como medios de contraste para el espacio intravascular (*Blood Pool Agents*).

Los compuestos que tienen una cierta afinidad por la albúmina plasmática se caracterizan por tener una eliminación preferente por las vías hepáticas, lo que favorecería su acumulación en el hígado en una concentración suficiente para permitir su visualización. Además, una eliminación significativa por vía biliar también posibilitaría el uso de estos compuestos para obtener imágenes de la vesícula y las vías biliares, lo que solucionaría el problema de escasez de medios de contraste disponibles para estas zonas.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Una vez definida la zona de aplicación en la que se va a enfocar este estudio, es importante diseñar la estructura de los compuestos que se van a sintetizar. Una de las técnicas de diagnóstico por imagen en la que se utilizarán estos medios de contraste es la de rayos X, por lo que se necesita algún elemento que sea opaco ante esta fuente de radiación. Debido a su elevado peso atómico, el yodo es una de las mejores opciones para formar parte de la estructura a sintetizar, por lo que los nuevos compuestos tendrán una parte formada por una estructura bencénica con tres átomos de yodo. Además, se tendrá en cuenta que los compuestos que tienen libre la posición 5 del anillo aromático, tienen una alta afinidad por la albúmina plasmática ⁽⁹⁴⁾.

Como se ha comentado anteriormente, se busca que los compuestos sintetizados tengan posibilidad de utilizarse en otras técnicas de diagnóstico por imagen además de los rayos X, por lo que la estructura debe tener una parte que aporte la funcionalidad deseada en función de la técnica de diagnóstico en la que se pretenda aplicar. Por esta razón, la estructura de los compuestos cuenta con una parte macrocíclica que posibilita la formación de quelatos con diferentes metales. Si se quiere utilizar en iRM, se puede formar un quelato con un metal de transición como gadolinio, europio o disprosio entre otros. Si la técnica deseada es la medicina nuclear, se puede utilizar un metal que sea un radioisótopo, como el galio; pudiendo estar en forma de galio-67 si se utiliza en SPECT o galio-68 si se utiliza en PET.

A continuación, se muestra un esquema (Fig. 89) que resume de una manera muy sencilla la estructura que tendrán los compuestos sintetizados durante la presente Tesis Doctoral:

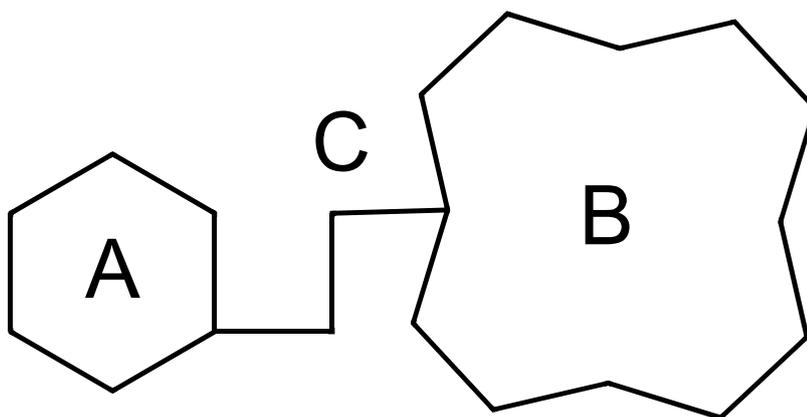
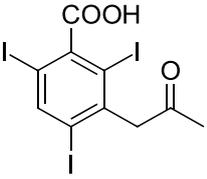
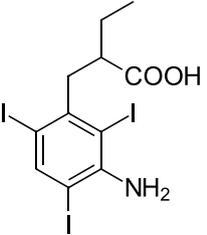
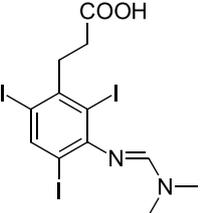
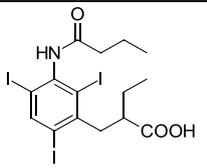
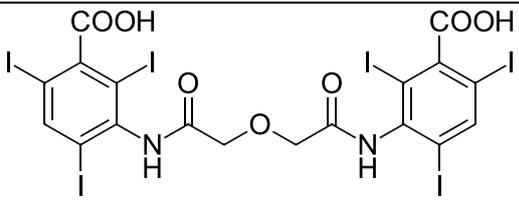


Figura 89: Esquema de los productos sintetizados

Parte A

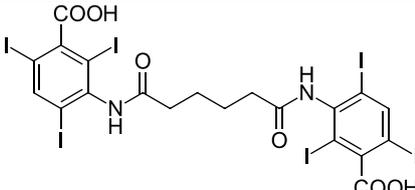
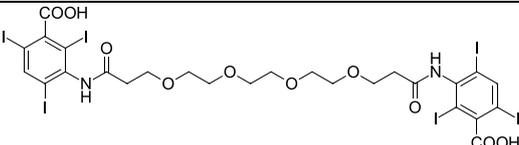
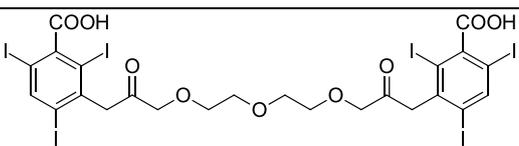
Consiste en una estructura química con la posición 5 del anillo aromático libre, característica que le confiere una alta afinidad por algunas macromoléculas presentes en la sangre ⁽⁹⁵⁾; y que es a su vez portadora de un elemento con número atómico elevado (yodo) que proporciona contraste a los rayos X. En la tabla 16 se incluyen diferentes propuestas para la parte A de la estructura:

Tabla 16: Propuestas para la parte A

Nombre químico	Fórmula	Número CAS
Ácido acetrizoico		85-36-9
Ácido iopanoico		96-83-3
Ácido ipódico		5587-89-3
Ácido tiropanoico		27293-82-9
Ácido ioglicámico		2618-25-9

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Iodipamida		606-17-7
Ácido iodoxámico		31127-82-9
Ácido iotróxico		26887-04-7

El compuesto más sencillo que posee tres átomos de yodo, la posición 5 del anillo aromático libre y un grupo funcional que facilita la conexión con la parte B por medio del espaciador es el ácido acetrizoico.

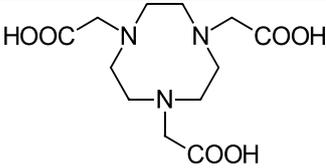
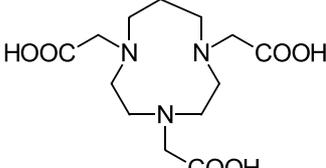
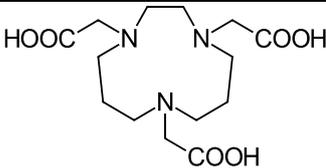
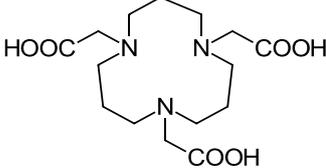
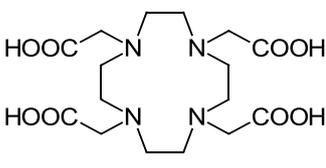
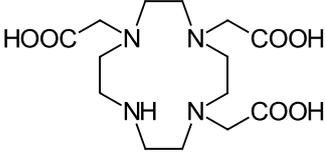
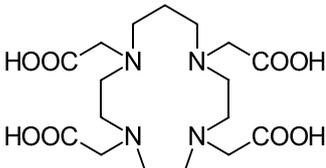
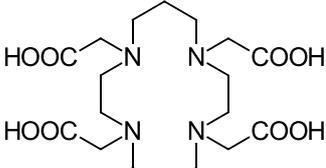
Parte B

Se trata de una estructura química formada por un macrociclo que posibilita la formación de quelatos de elementos paramagnéticos como el gadolinio, europio o disprosio entre otros; o de otros metales como galio “natural” o radioisótopos como galio-67 o galio-68, que permiten su uso en técnicas como SPECT o PET respectivamente.

Existe un elevado número de posibles moléculas macrocíclicas como el NOTA (y algunos de sus derivados como DETA, UNTA y DOTRA), el DOTA (incluyendo sus derivados tetraacetilados o triacetilados como DO3A, TRITA, TETA, PCTA, PyTETA y BP2A) o algún otro compuesto derivado de estos. Las moléculas lineales como DTPA se han descartado como posible estructura para esta parte de la molécula debido a la baja estabilidad de los quelatos que tienen en su interior este ligando ⁽⁹⁶⁾.

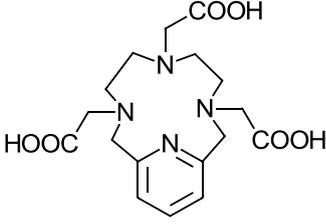
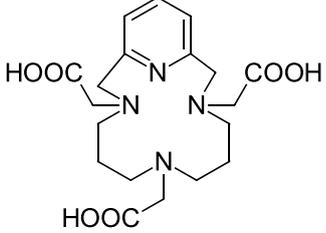
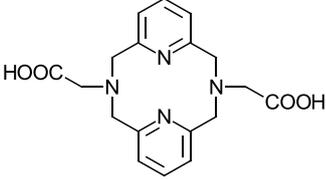
Algunas de las posibilidades que se proponen son las siguientes (Tabla 17):

Tabla 17: Propuestas para la parte B.

Ligando	Nombre químico	Fórmula	Número CAS
NOTA	Ácido 1,4,7-triazaciclono-nano-1,4,7-triacético		56491-86-2
DETA	Ácido 1,4,7-triazaciclodeca-no-1,4,7-triacético		65439-21-6
UNTA	Ácido 1,4,8-triazacicloundecano-1,4,8-triacético		124659-24-1
DOTRA	Ácido 1,5,9-triazaciclododecano-1,5,9-triacético		106415-34-3
DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclo dodecano-1,4,7,10-tetraacético		60239-18-1
DO3A	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclo dodecano-1,4,7-triacético		114873-37-9
TRITA	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclo tridecano-1,4,7,10-tetraacético		60239-20-5
TETA	Ácido 1,4,8,11-tetraazaciclo tetradecano-1,4,8,11-tetraacético		60239-22-7

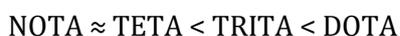
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Ligando	Nombre químico	Fórmula	Número CAS
PCTA	Ácido 3,6,9,15-tetraazabicyclo[9,3,1]pentadeca-1(15), 11,13-trieno-3,6,9-triacético		129162-88-5
PyTETA	Ácido 3,7,11,17-tetraazabicyclo[11,3,1]heptadeca-1(17), 13,15-trieno-3,7,11-triacético		106967-44-6
BP2A	Ácido 3,11,17,18-tetraazatriciclo[11,3,1,1 ^{5,9}]octadeca-1(17),5,7,9(18),13,15-hexaeno-3,11-diacético		161034-89-5

Una vez que se han realizado las diferentes propuestas para la parte B que forma parte de la estructura de los compuestos que se van a estudiar a lo largo de la Tesis Doctoral, es importante analizar cuáles son los más recomendables con relación a la sencillez de fabricación y cuáles aportan una mejora sustancial en cuanto a su aplicabilidad. Para ello, es importante analizar una serie de conceptos que se describen a continuación.

La estabilidad de los medios de contraste que se utilizan en el campo del diagnóstico por imagen empleando la técnica de resonancia varía en función del tamaño del ligando macrocíclico; de esta manera, se puede observar que la estabilidad de los complejos de gadolinio se relaciona con la siguiente serie ⁽⁹⁷⁾:



El anillo de nueve miembros del NOTA es demasiado pequeño como para albergar en su interior el metal y por esta razón, su estabilidad es diez veces menor que para el DOTA. A su vez, al estudiar la secuencia de los derivados macrocíclicos del NOTA (NOTA-DETA-UNTA-DOTRA), se puede observar que, al aumentar el tamaño del anillo, manteniendo los grupos que se coordinan con el metal (-COOH y -NH₂), únicamente el DETA forma quelatos más estables que el NOTA; de hecho, para UNTA y DOTRA no se han encontrado complejos sintetizados ⁽⁹⁸⁾.

En la siguiente tabla se puede verificar con datos experimentales bibliográficos que el ligando DOTA es el más estable de la serie estudiada (Tabla 18):

Tabla 18: Constantes de estabilidad de quelatos de gadolinio.

Ligando	Log $K_{Gd(L)}$
NOTA	13,7 ⁽⁹⁹⁾
DOTA	24,7 ^{(97), (100), (101)}
DO2A	13,1 ⁽¹⁰²⁾
DO3A	21,0 ^{(103), (104), (105)}
TRITA	19,2 ^{(100), (101)}
PCTA	20,4 ⁽¹⁰⁶⁾
BP2A	14,5 ⁽¹⁰⁷⁾

Se puede comprobar que para la serie DOTA-DO3A-DO2A, la estabilidad del compuesto disminuye en cuatro órdenes de magnitud desde el DOTA cuando el macrociclo pierde un grupo acetilo, siendo la disminución de hasta 12 órdenes de magnitud cuando pierde dos grupos acetilo ^{(108), (109)}.

Comparando la estabilidad de los ligandos DO3A y PCTA, ambos tienen el mismo número de nitrógenos y oxígenos que se unen al metal; pero debido a la sustitución del grupo acetilo por un anillo de piridina, la constante de estabilidad del PCTA es menor que la del DO3A.

Existe una relación entre la constante de estabilidad y la basicidad de un compuesto como se puede observar en la figura 90, en la que los datos se ajustan según la ecuación 11:

$$\log(K_{Gd(L)}) = 1,5 \times (\log K_1^H + \log K_2^H) - 9,7 \quad (R^2 = 0,86) \quad (11)$$

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

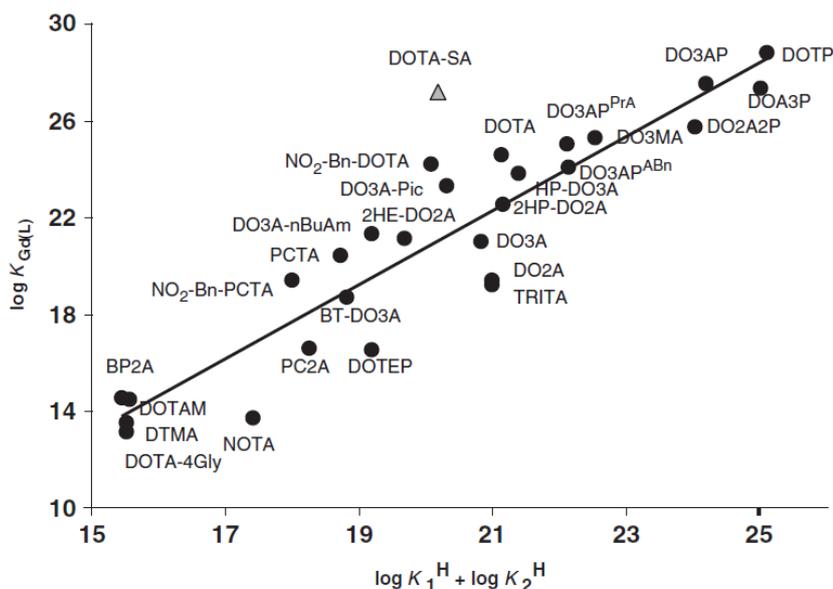


Figura 90: Relación entre la constante de estabilidad y la basicidad de compuestos macrocíclicos con átomos de nitrógeno.

Un parámetro fundamental para tener en cuenta en la elección de la parte B, es el conjunto de metales que pueden formar parte del quelato en función de la técnica de diagnóstico por imagen de interés. Entre estos se encuentran:

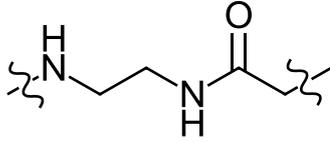
- Gadolinio: Para iRM y rayos X⁽¹¹⁰⁾
- Disproseo: Para iRM y rayos X⁽¹¹⁰⁾
- Iterbio: Para iRM y rayos X⁽¹¹⁰⁾
- Manganeso: Para iRM
- Europio: Para rayos X e iRM (Pueden utilizarse como “PARACEST” por sus propiedades paramagnéticas y su lento intercambio de las moléculas de agua)⁽¹¹¹⁾.
- Galio natural: Para rayos X
- Galio 68: Para PET
- Galio 67: Para SPECT

Debido al uso de metales trivalentes para formar el quelato de la parte B de la estructura, se elige el macrociclo DO3A por su estructura de ligando trivalente. Además, la presencia de una amina secundaria le aporta la posibilidad de unirse a la parte C y conectar, de esta manera, la parte macrocíclica de la estructura con la aromática triyodada.

Parte C

Estructura química que actúa como espaciador entre las partes A y B. Existe una gran variedad de compuestos que se pueden utilizar en esta parte de la estructura como son los aminoácidos, etilendiamino, epiclorhidrina o polietilenglicoles, entre otros. Su característica fundamental es conseguir una estructura rígida y metabólicamente estable. Por su sencillez, la estructura química que se propone es la siguiente (Tabla 19):

Tabla 19: Propuesta para la parte C.

Nombre químico	Fórmula
N-(2-aminoetil)-acetamida	

En base a todas estas justificaciones, la estructura del producto cabeza de serie que se ha elegido para estudiar a lo largo de la presente Tesis Doctoral es la siguiente (Fig. 91):

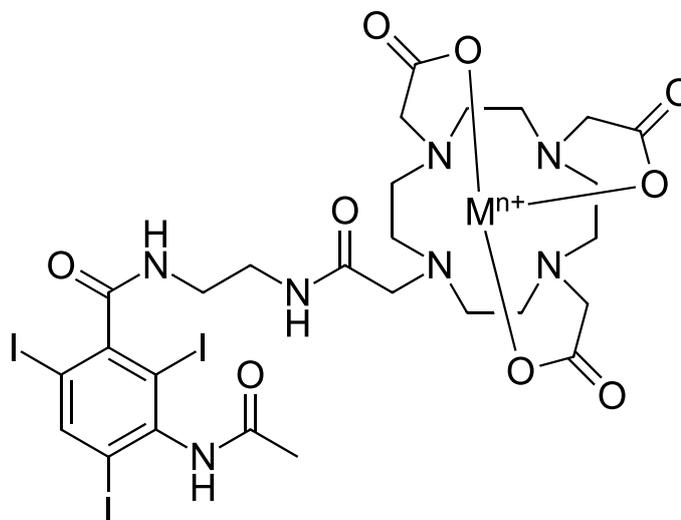


Figura 91: Estructura del cabeza de serie estudiado

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Objetivos

Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo consiste en llevar a cabo la síntesis de un grupo de compuestos basados en el macrociclo ácido {10-{2-[2-(3-acetilamino-2,4,6-triyodobencilamino)aminoetil]-2-oxoetil}-1,4,7,10-tetraaza-1-ciclododecil}-1,4,7-triacético (ICJ1707-01), al que se le añaden diferentes metales como gadolinio, galio y europio para dar características concretas que permitan su uso como agentes de contraste multimodales, tanto en una única técnica del campo del diagnóstico por imagen (iRM, rayos X, TAC, PET, SPECT, ...) como en una combinación de ellas (PET-TAC, SPECT-TAC, PET-iRM, TAC-iRM, ...).

Se buscará que los medios de contraste sintetizados permitan la visualización de ciertos órganos del interior del cuerpo como los riñones, la vejiga o el estómago, enfocando su aplicación a la obtención de imágenes del hígado y la vesícula biliar. También se va a estudiar la posibilidad de que estos medios de contraste puedan ser utilizados como medios de contraste para la visualización del espacio intravascular (*Blood Pool Agents*).

Para identificar los compuestos sintetizados, se realizará su caracterización por medio de ^1H RMN, ^{13}C RMN, COSY, HMQC y HMBC, espectro infrarrojo, punto de fusión, análisis de masas y análisis elemental (microanálisis).

Una vez caracterizados, se evaluará la posibilidad de que puedan ser utilizados como medios de contraste. Para ello, se van a estudiar una serie de parámetros fisicoquímicos relacionados con la funcionalidad de los compuestos, entre los que se encuentran la osmolalidad, solubilidad, coeficiente de reparto, afinidad a albúmina de suero bovina, relajatividad y número de aguas de coordinación.

Posteriormente, se estudiarán parámetros relacionados con la seguridad como la estabilidad metabólica, toxicidad, mutagenicidad y biodegradabilidad de los compuestos. Algunos de estos parámetros se estudiarán *in silico* y otros *in vitro*.

A su vez, se demostrará que utilizando los compuestos sintetizados se obtiene una señal acorde a las técnicas en las que se van a utilizar. Para ello, se realizará un estudio de calibrador (*Phantom*) que permitirá observar la relación de la señal obtenida en función de la concentración de los compuestos administrada.

Finalmente se llevarán a cabo las pruebas *in vivo*, para lo que se administrarán los compuestos a animales y se analizarán las señales generadas con diferentes técnicas de diagnóstico por imagen como son iRM, TAC y PET/TAC. A través de las imágenes obtenidas será posible evaluar si los medios de contraste sintetizados permiten diferenciar órganos y zonas del interior del cuerpo que no es posible visualizar con otras técnicas.

De una manera más específica, los objetivos de la presente Tesis Doctoral son los que se establecen a continuación:

- Síntesis de una familia de compuestos para su posterior uso como agentes de contraste en el campo del diagnóstico por imagen.
- Caracterización estructural de los productos intermedios y finales sintetizados.
- Uso de estos medios de contraste para visualizar las zonas deseadas, lo que implica que los productos tengan las características necesarias, de acuerdo con los parámetros fisicoquímicos y de seguridad del paciente estudiados.
- Uso de estos medios de contraste en una combinación de técnicas del campo del diagnóstico por imagen o en alguna de estas por separado consiguiendo una buena relación de la señal con la concentración utilizada.
- Uso de estos medios de contraste para la visualización de diferentes órganos tras su administración, destacando el hígado, la vesícula y las vías biliares.
- Uso de estos medios de contraste para la visualización del espacio intravascular (*Blood Pool Agent*).

*“El misterio de la vida no es un problema a resolver,
sino una realidad a experimentar.”*

Frank Herbert
(Dune)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Aspectos éticos y legales

En la investigación y desarrollo de nuevos productos que tienen como objetivo ser administrados en humanos, siempre es necesario llevar a cabo estudios previos en animales. Durante la realización del presente trabajo, se ha intentado evitar causar cualquier daño físico innecesario y se ha priorizado el bienestar físico y psíquico de los animales en los casos en los que ha sido imperativo su uso.

Por esta razón, se han utilizado métodos alternativos a la experimentación con animales para la evaluación de algunos parámetros relacionados con el posible uso de los compuestos sintetizados en este trabajo como medios de contraste en el campo del diagnóstico por imagen. Algunos de estos métodos están basados en ensayos fisicoquímicos (determinación de la afinidad por albúmina plasmática), el uso de cultivos celulares (determinación de la concentración inhibitoria) o estudios *in silico*; en los que a partir de modelos computacionales que utilizan multitud de bases de datos, se pueden predecir ciertos parámetros característicos relacionados con la toxicidad.

En los casos en los que es obligatorio el uso de animales, como son los estudios *in vivo*, se han seguido todas las directrices institucionales y nacionales aplicables para el cuidado y uso de animales; en particular la Directiva de la Unión Europea 2010/63/UE y las regulaciones nacionales (RD 53/2013). Además, en todo caso se ha intentado reducir el número de individuos a estudiar para obtener unos resultados preliminares significativos. Para establecer las estrategias seguidas a la hora de realizar dichas pruebas se ha contado con expertos en la materia, como los profesionales encargados de realizar los ensayos en cada centro y la documentación aportada por la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio ⁽¹¹²⁾. Cabe destacar que todos los procedimientos utilizados para llevar a cabo este tipo de estudios cuentan con la aprobación de los Comités de Ética en Experimentación Animal del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnologías (CIEMAT) y del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Instalaciones

Instalaciones

La presente Tesis Doctoral se ha realizado principalmente en las instalaciones de Justesa Imagen S.A.U. (Grupo Juste), llevándose a cabo una serie de experimentos y estudios en otros centros de investigación externos como son en el Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo (Laboratorio de Resonancia Magnética de Investigación en Animales), instalaciones del CIEMAT (Unidad de Aplicaciones Biomédicas y Farmacocinética del Departamento de Medio Ambiente), Universidad de la Coruña (Grupo de Investigación Reactividad Química y Fotorreactividad del Departamento de Química Inorgánica), Universidad de Alcalá (Servicio de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear y CQAB: Centro de Química Aplicada y Biotecnología) y CSIC (Centro de Química Orgánica "Lora-Tamayo").

Metodología

El trabajo de investigación que se ha realizado a lo largo de esta Tesis Doctoral se puede considerar como multidisciplinar, ya que comprende métodos, técnicas e información que se pueden aplicar a diversas disciplinas científicas; y cuyos resultados se van a relacionar y explicar, a través del diagnóstico por imagen.

Búsqueda bibliográfica

Se ha realizado una extensa búsqueda bibliográfica para elegir cuales son los compuestos cabeza de serie que se van a sintetizar, pero también es importante esclarecer las diferentes rutas de síntesis que se deben seguir con la finalidad de utilizar un procedimiento sintético sencillo y de minimizar tanto el contenido de posibles impurezas que se pueden generar como el uso de disolventes. Para ello, se han utilizado herramientas de búsqueda de información científica como Scifinder®, además de la documentación histórica de Justesa Imagen S.A.U.

Desarrollo analítico

Para asegurar que, tanto los productos intermedios como los finales, tienen una pureza acorde a la aplicación deseada, se han desarrollado varios métodos analíticos que se pueden utilizar para el control en proceso de las reacciones orgánicas y para poder analizar la calidad de todos los productos sintetizados. Para la realización de estos estudios, se ha utilizado un cromatógrafo HPLC Jasco con detección de ultravioleta-visible (DAD), un cromatógrafo HPLC Jasco con detector DAD y de radiactividad y un cromatógrafo HPLC Agilent (Serie 1200) con detectores DAD, de fluorescencia (FLD) y un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD). Posteriormente, en el apartado de RESULTADOS Y DISCUSIÓN se procederá a describir cada uno de los métodos desarrollados, comentando tanto las condiciones utilizadas como los resultados obtenidos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

Síntesis y purificación

Se han realizado una serie de reacciones orgánicas a nivel de laboratorio, con el objetivo de sintetizar los nuevos productos. Para ello, se ha seguido el esquema (Fig. 92) que se indica a continuación, utilizando como producto de partida el ácido 3-nitrobenzoico (CAS 121-92-6) o el ácido acetrizoico (CAS 85-36-9). Para la realización de este apartado de la investigación se ha utilizado el material de laboratorio de Justesa Imagen S.A.U. Posteriormente, en el apartado de RESULTADOS Y DISCUSION se procederá a describir cada una de las etapas que se han realizado, incluyendo las condiciones y los reactivos empleados.

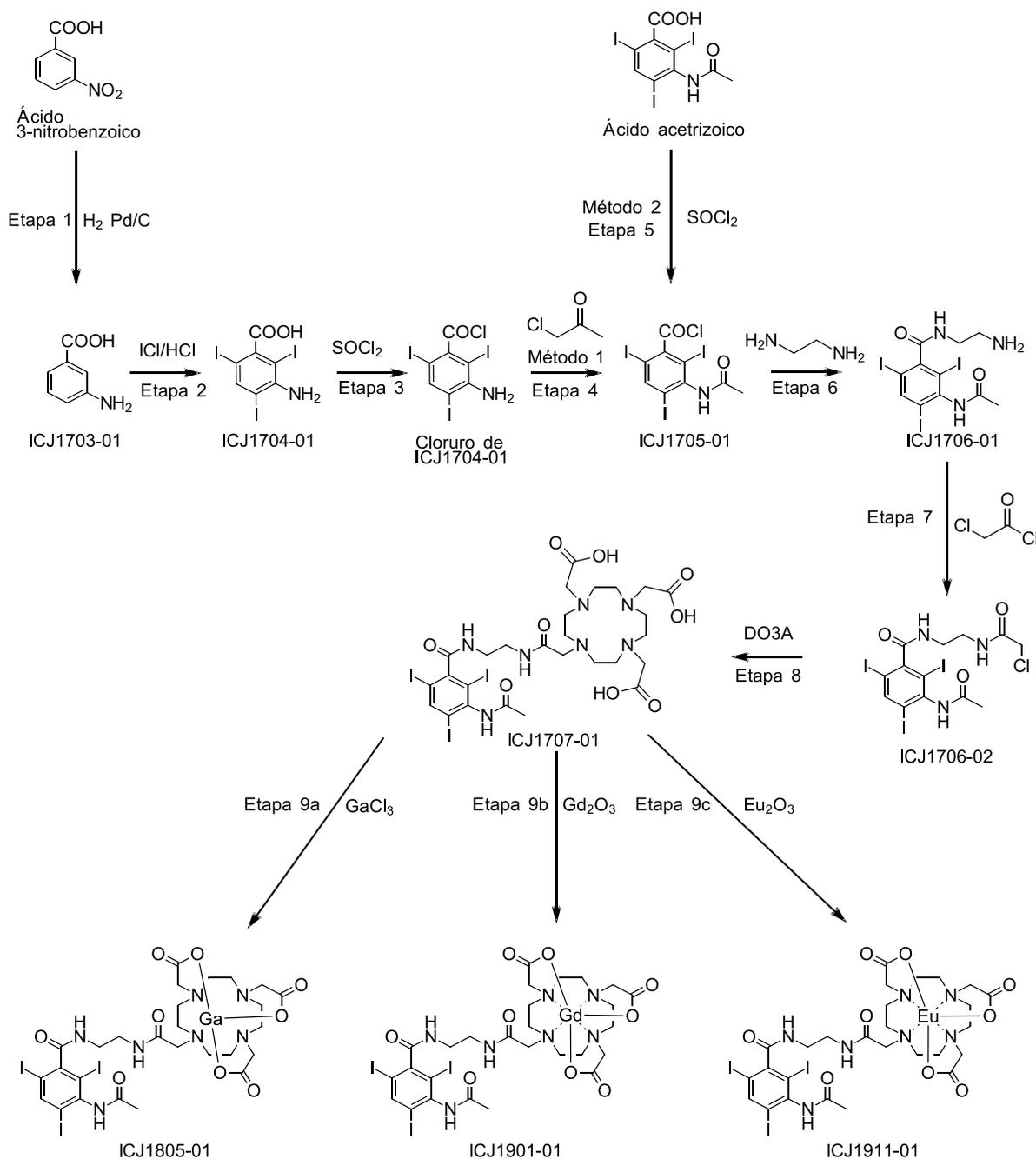


Figura 92: Esquema sintético

Debido a la necesidad de purificar algunos productos intermedios y finales, se han utilizado una serie de técnicas de purificación como purificación con resinas de intercambio, electrodiálisis, nanofiltración y cristalización con disolventes orgánicos, entre otras.

En el caso de la electrodiálisis, se han utilizado dos sistemas con diferentes disposiciones de membranas dependiendo de la finalidad deseada:

- Reducción de cationes y aniones. El objetivo de esta purificación es la eliminación de sales inorgánicas e impurezas iónicas que son capaces de atravesar estas membranas cuando se genera una corriente eléctrica en el sistema (Fig. 93).

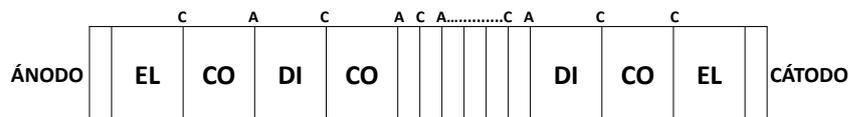


Figura 93: Electrodiálisis tipo I

C son membranas catiónicas (sólo permite el paso de cationes) y *A* son membranas aniónicas (sólo se permite el paso de aniones). *EL* es el compartimento de la disolución de electrolito, que mantiene aislado el producto para que no esté en contacto con el ánodo ni con el cátodo y, de esta manera, prevenir la aparición de reacciones de oxidación o de otro tipo que puedan degradar el producto que se intenta purificar. *CO* es el compartimento del concentrado, donde la disolución se va enriqueciendo con las sales inorgánicas e impurezas iónicas pequeñas, y *DI* es el compartimento del diluido, donde está el producto que se va a purificar.

- Reducción de cationes. El objetivo de esta purificación de compuestos en forma de sal es la formación del ácido libre, aplicando un intercambio de protones por los cationes presentes en la molécula. Esto ocurre cuando se genera una corriente eléctrica en el sistema (Fig. 94).

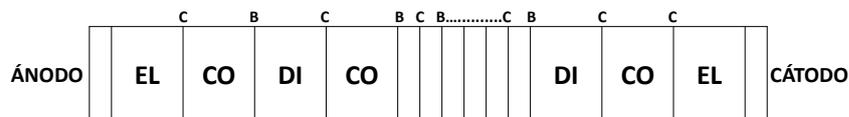


Figura 94: Electrodiálisis tipo II

C son membranas catiónicas (sólo se permite el paso de cationes) y *B* son membranas bipolares (favorecen la hidrólisis del agua sin permitir el paso de cationes ni aniones, generando iones hidroxilo en el compartimento del concentrado y protones en el compartimento del diluido). *EL* es el compartimento de la disolución de electrolito, que mantiene aislado el producto para que no esté en contacto con el ánodo ni con el cátodo y, de esta manera, prevenir la aparición de reacciones de oxidación o de otro tipo que puedan degradar el producto que se intenta purificar. *CO* es el compartimento del concentrado, donde la disolución se va enriqueciendo con los cationes generando hidróxido sódico o sales de ácidos, y *DI* es el compartimento del diluido, donde está el producto que se va a purificar.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

Ambos sistemas de electrodiálisis comparten el mismo esquema de funcionamiento, que se incluye a continuación (Fig. 95):

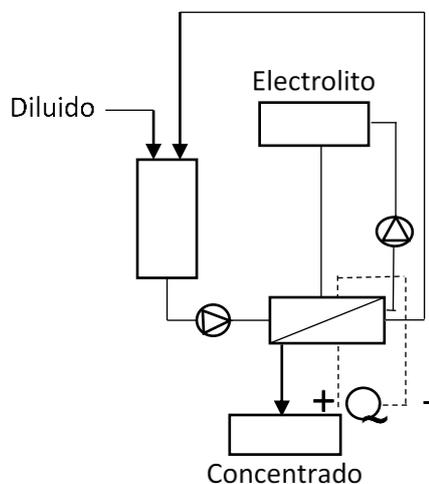


Figura 95: Esquema general de electrodiálisis

En la purificación del producto por nanofiltración, se ha utilizado un sistema de membranas de CSM (modelo NE1812-70). En este caso, se ha llevado a cabo un proceso de nanofiltración a volumen constante (diananofiltración) para conseguir una mejora en la capacidad de purificación. Se utiliza una bomba peristáltica para regular la adición de agua purificada en función del caudal de permeado y así mantener el volumen de la disolución. El sistema utilizado corresponde al siguiente esquema de funcionamiento (Fig. 96):

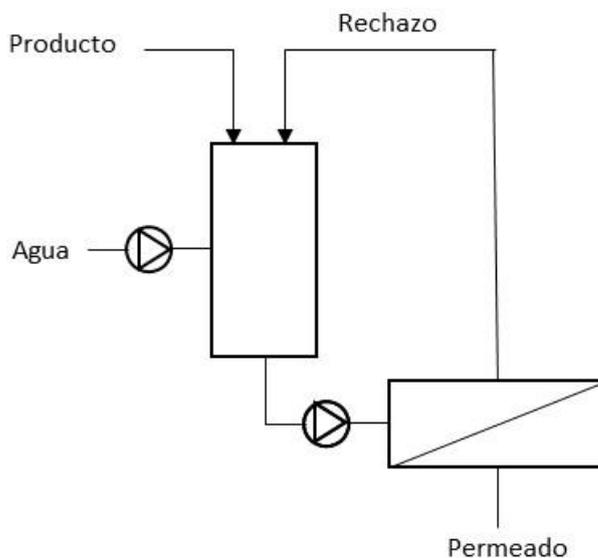


Figura 96: Esquema general de diananofiltración

El permeado es la disolución que tiene las impurezas con un tamaño menor que el poro de la membrana; y el rechazo es la disolución con las sustancias que no son capaces de atravesar la membrana por su tamaño, como es el producto que se quiere purificar.

Caracterización espectroscópica

Una vez obtenidos los productos intermedios y finales con la pureza deseada y verificada, se han realizado diferentes ensayos para caracterizar estos compuestos y así poder garantizar su identidad. A continuación, se muestra una relación de los ensayos de caracterización realizados, incluyendo el equipamiento utilizado y el centro donde se han realizado (Tabla 20).

Tabla 20: Relación de ensayos de caracterización, equipamiento y centro.

Ensayo	Equipamiento	Centro
^1H y ^{13}C RMN	Varian System-500	CSIC
	Bruker AVANCE III HD 400	
	Bruker AVANCE III HD 400 y 500	Universidad de la Coruña
	Varian System-500	Universidad de Alcalá
COSY	Bruker AVANCE III HD 400 y 500	Universidad de la Coruña
HMQC	Bruker AVANCE III HD 400 y 500	Universidad de la Coruña
HMBC	Bruker AVANCE III HD 400 y 500	Universidad de la Coruña
Espectro infrarrojo	Espectrofotómetro de infrarrojo (FTIR) Shimadzu (modelo IRAffinity-1S)	Justesa Imagen S.A.U.
Punto de fusión	Mettler Toledo (modelo MP55)	Justesa Imagen S.A.U.
Análisis de masas	Cromatógrafo HPLC acoplado a Triple Cuadrupolo LC/MS Agilent (serie 6410)	Universidad de Alcalá
Análisis elemental (microanálisis)	Analizador LECO-932	CSIC

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

Parámetros fisicoquímicos

Después de la caracterización de los productos sintetizados, se han estudiado una serie de parámetros fisicoquímicos con el objetivo de evaluar la posibilidad de utilizar los compuestos sintetizados como medios de contraste de diagnóstico por imagen. A continuación, se presenta una relación del equipamiento utilizado y el centro de investigación donde se han realizado (Tabla 21).

Tabla 21: Relación de ensayos fisicoquímicos, equipamiento y centro.

Ensayo	Equipamiento	Centro
Osmolalidad	Miliosmómetro de punto de congelación Roebling	Justesa Imagen S.A.U.
Solubilidad	-	Justesa Imagen S.A.U.
Coefficiente de reparto	ICP-MS Agilent (Serie 7900)	Justesa Imagen S.A.U.
Afinidad por albúmina de suero bovina (BSA)	ICP-MS Agilent (Serie 7900) Single-Use RED Plate with Inserts Thermo Scientific 8K MWCO	Justesa Imagen S.A.U.
Relajatividad y número de aguas de coordinación	Bruker AVANCE 300 Espectrofluorímetro Horiba FluoroMax Plus-P equipado con una lámpara de arco de xenón sin ozono de 150 W, un contador de fotones y un detector de fotodiodos de referencia	Universidad de la Coruña

Los resultados obtenidos en estos ensayos fisicoquímicos para los compuestos sintetizados se han comparado con los establecidos para otros medios de contraste comerciales que se utilizan en el campo del diagnóstico por imagen. El primero de ellos es el ácido acetrizoico, que es un medio de contraste con tres átomos de yodo y la posición 5 del anillo aromático libre. Se utiliza en pruebas radiológicas, tiene una cierta afinidad a la albúmina y, tras su administración, permite obtener imágenes de las vías biliares debido a que su eliminación no se lleva a cabo totalmente por vía renal.

Otros medios de contraste utilizados como referencia son el gadobutrol y el gadoterato de meglumina, los cuales poseen una estructura macrocíclica de gadolinio como metal quelante. Se administran para exploraciones en iRM, no presentan afinidad por la albúmina y son muy solubles en agua.

A continuación, se describen los métodos utilizados para la determinación de los parámetros fisicoquímicos incluidos en la tabla anterior. Posteriormente, en el apartado de RESULTADOS Y DISCUSIÓN se procederá a plasmar y comentar los resultados obtenidos.

Osmolalidad

Para la determinación de este parámetro se ha utilizado un osmómetro de punto de congelación.

Es necesario, como paso previo a la realización de cualquier medida, calibrar el equipo nada más encenderlo. Para ello se utilizan tres disoluciones de cloruro sódico (CAS 7647-14-5) con concentraciones de 0, 0,9 y 2,7 %. El equipo se ajusta para que su respuesta frente a estos patrones proporcione una señal de 0, 300 y 900 mOsm/Kg, respectivamente.

Posteriormente, después de lavar la célula de medida según el procedimiento de lavado descrito en los manuales, se realiza una comprobación del estado del equipo determinando el valor de osmolalidad de un patrón de 900 mOsm/Kg y repitiendo la medida seis veces.

El fundamento analítico del equipo se basa en la variación de la temperatura que se consigue una vez que interacciona la aguja fría con la muestra; en función de esta temperatura, existe una relación lineal con el valor de la osmolalidad de las muestras analizadas.

La determinación de las medidas de osmolalidad de las muestras desconocidas se realiza por triplicado para minimizar errores instrumentales y humanos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

Coeficiente de reparto

Se ha realizado adaptando el procedimiento PNT-IDB/FC-002 descrito por Justesa Imagen S.A.U. Se utilizan como reactivos 1-butanol (CAS 71-36-3) y 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol (TRIS) (CAS 77-86-1) y el procedimiento consiste en:

- Preparación de las muestras

Se prepara una disolución de cada uno de los compuestos que se van a estudiar en una concentración de 5 mM utilizando un tampón de TRIS a pH 7,6. Los productos que se van a estudiar son el ICJ1805-01, ICJ1901-01, gadobutrol y ácido acetrizoico.

Se preparan 3 tubos de cada compuesto a estudiar y en cada uno de ellos se añaden 3 mL de la disolución preparada anteriormente, 4,5 mL del tampón de TRIS a pH 7,6 y 7,5 mL de 1-butanol.

- Procedimiento del ensayo

Se fijan en un agitador todos los tubos y se agitan durante 30 minutos a 230 rpm.

Se dejan reposar hasta que las dos fases estén totalmente separadas.

- Preparación de las muestras para el análisis

Se preparan las muestras de cada una de las fases por separado para cuantificar la concentración de los productos en cada fase, y para ello se utiliza un calibrado de yodo, gadolinio y galio en ICP-MS.

Para las fases acuosas, se realiza una dilución 1:200 en HNO₃ 2%.

Para las fases alcohólicas, se evaporan a sequedad 5 mL de cada una de las fases, se añade 1 mL de HNO₃ concentrado y se realiza un tratamiento de digestión por microondas durante 30 segundos. Una vez digeridas, las muestras están mineralizadas y se realiza una dilución 1:20 en HNO₃ 2%.

Para la determinación del coeficiente de reparto, se utiliza la siguiente fórmula en la que se introducen los datos obtenidos en el análisis de ICP-MS (Ec. 12):

$$P = \frac{C_{Alcohol} \cdot \frac{6}{5} \cdot 20}{C_{Buffer (acuosa)} \cdot \frac{200}{1}} = \frac{C_{Alcohol} \cdot 0,12}{C_{Buffer (acuosa)}} \quad (12)$$

Afinidad por albúmina de suero bovina (BSA)

Se ha realizado un estudio *in silico* utilizando el programa Toxtree®⁽¹¹³⁾. A partir de los datos obtenidos, se realiza una comparación del gadobutrol, el ácido acetrizoico y los compuestos sintetizados ICJ1707-01, ICJ1805-01 e ICJ1901-01.

La determinación experimental de este parámetro se ha realizado adaptando el procedimiento PNT-IDB/FC-003, descrito por Justesa Imagen S.A.U., y la información del manual proporcionado por Thermo Scientific para el uso de sus dispositivos, en el que se sugiere un proceso acorde al equipamiento que se va a utilizar en esta determinación. Como reactivos se utilizan BSA (CAS 9048-46-8), cloruro sódico, ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES) (CAS 7365-45-9) e hidróxido sódico. A continuación, se describe el proceso:

- Preparación de las muestras

Se prepara una disolución de cada uno de los compuestos que se van a estudiar en una concentración cercana a 8 g/L en agua. Los compuestos evaluados son el ICJ1805-01, ICJ1901-01, gadobutrol y ácido acetrizoico.

El primer estudio necesario es la determinación de la afinidad de la membrana por los compuestos que se van a evaluar, ya que, si existe una gran afinidad por estos, el intercambio producido no va a ser explicado por la técnica conllevando a errores en su determinación. Para ello se disuelven los compuestos por separado en el tampón HEPES ajustado a pH 7,4.

Una vez estudiada la afinidad por la membrana, se puede proceder con el estudio de la afinidad por la albúmina. Se prepara por triplicado una disolución de cada compuesto a una concentración de 0,50 mM en presencia de BSA. Para ello, se añaden 0,2 g de BSA, 0,36 mL de la disolución madre correspondiente preparada con anterioridad y se lleva a un volumen final de 5 mL utilizando un tampón HEPES a pH 7,4.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

- Procedimiento de análisis

Una vez preparadas las disoluciones necesarias para realizar los estudios, se procede a realizar los experimentos según el manual descrito en Thermo Scientific para el dispositivo de diálisis al equilibrio Sigma-Use RED Plate with Inserts Thermo Scientific 8K MWCO.

- a) Para el primer experimento, enfocado en el estudio de la afinidad del medio de contraste por las membranas y las células de diálisis, se añaden en los pocillos de la muestra 400 μL del medio de contraste a estudiar disuelto en el tampón. En los otros pocillos se añaden 600 μL del tampón.

Se ajusta el dispositivo mencionado en un agitador termostatzado a 37°C, se agita a 300 rpm durante cinco horas y, posteriormente, se realiza un tratamiento a las muestras para la determinación de la concentración de los compuestos en los pocillos por ICP-MS utilizando un calibrado de yodo, gadolinio y galio.

Una vez terminado el experimento, la concentración de los compuestos estudiados en ambos pocillos debería ser igual, indicando que no existe una interacción apreciable entre cada compuesto y la membrana.

- b) Para el segundo experimento, basado en la determinación de la afinidad por la seroalbúmina bovina de cada compuesto, se añaden en los pocillos de la muestra 400 μL del medio de contraste a estudiar con BSA disuelto en el tampón comentado anteriormente. En los otros pocillos se añaden 600 μL del tampón.

Se ajusta el dispositivo mencionado en un agitador termostatzado a 37°C, se agita a 300 rpm durante cinco horas y, posteriormente, se realiza un tratamiento a las muestras para la determinación de la concentración de los compuestos en los pocillos por ICP-MS utilizando un calibrado de yodo, gadolinio y galio.

Una vez terminado el experimento, se utiliza la concentración de cada compuesto en cada pocillo para calcular el porcentaje de afinidad de cada compuesto por la albúmina según la siguiente ecuación donde: C_T es la concentración del compuesto total en los dos pocillos, C_L es la concentración del compuesto que no se ha unido a la albúmina, C_M es la concentración del compuesto en el pocillo de la muestra y C_B es la concentración del compuesto en el pocillo del tampón (Ec. 13):

$$\text{Unión a proteínas(\%)} = \frac{C_T - C_L}{C_T} \cdot 100 = \frac{C_M + C_B - 2C_B}{C_M + C_B} \cdot 100 = \frac{C_M - C_B}{C_M + C_B} \cdot 100 \quad (13)$$

- Tratamiento de las muestras para el análisis

La determinación de la concentración de los compuestos en cada pocillo se ha realizado utilizando el modelo de ICP-MS comentado anteriormente. Se prepara una linealidad para cada uno de los elementos estudiados según la siguiente tabla (Tabla 22):

Tabla 22: Linealidades ICP-MS.

	Yodo (ppm)	Gd (ppm)	Ga (ppm)
P1	0,10	0,01	0,004
P2	0,30	0,04	0,020
P3	1,00	0,20	0,100
P4	3,00	0,80	0,400
P5	9,00	4,00	2,000

Relajatividad

La determinación de este parámetro para el compuesto de gadolinio ICJ1901-01 se ha realizado en las instalaciones de la Universidad de la Coruña comentadas anteriormente. El protocolo utilizado consiste en la medida de una disolución acuosa del compuesto a 25°C en un campo magnético de 7 T operando a 300 MHz. Los tiempos de relajación longitudinales (T_1) se registran empleando la secuencia de pulsos de inversión-recuperación. Se emplea una disolución del complejo en H₂O conteniendo un 10% de D₂O para detectar la señal del deuterio. Una vez completados los experimentos de T_1 , se adapta al tubo de RMN un inserto conteniendo H₂O y una gota de *terc*-butanol (CAS 75-65-0), y se añade otra gota a la disolución del complejo. A continuación, se registra un espectro de RMN de ¹H y se determina la concentración del complejo mediante la técnica de susceptibilidad magnética, evaluando la diferencia de desplazamiento químico de las señales de *terc*-butanol de ambos compartimentos (δ) (Ec. 14) ⁽¹¹⁴⁾:

$$\delta = \frac{4\pi[M]s}{T} \left(\frac{\mu_{eff}}{2.84} \right) \times 10^3 \quad (14)$$

En esta expresión: $[M]$ es la concentración molar de la sustancia paramagnética disuelta, s es un factor que depende de la forma del recipiente que contiene la muestra ($s= 0, 1/3$ y $-1/6$ para una esfera, un cilindro paralelo al campo magnético aplicado y un cilindro perpendicular a él, respectivamente), T es la temperatura absoluta y μ_{eff} es el momento magnético efectivo. El desplazamiento químico se expresa en ppm.

El parámetro de relajatividad se determina empleando la ecuación 15:

$$\frac{1}{T_{1,obs}} = \frac{1}{T_{1,dia}} + [M]r_1 \quad (15)$$

Donde $T_{1,obs}$ es el tiempo de relajación longitudinal observado, $T_{1,dia}$ es la contribución diamagnética, r_1 es la relajatividad, y $[M]$ representa la concentración molar del complejo.

En este caso, se compara el resultado obtenido con el valor calculado para el gadoterato de meglumina (DOTAREM®) medido en las mismas condiciones.

Número de aguas de coordinación

Se ha realizado utilizando el compuesto con europio (ICJ1911-01) a partir de medidas de tiempos de vida de emisión. Este estudio se ha llevado a cabo en la Universidad de la Coruña.

Esta metodología se basa en los estudios de Horrocks y Sudnick, que en 1979 propusieron un método para determinar el número de moléculas de agua coordinadas al ion metálico a través de medidas de luminiscencia ⁽¹¹⁵⁾. El método relaciona las semividas de emisión del estado excitado ⁵D₀ del Eu³⁺ o Tb³⁺, medidas en H₂O y D₂O, con el número de aguas coordinadas al metal. Los osciladores O-H de las moléculas de agua coordinadas comparados con los de O-D son más eficaces desactivando el estado excitado del ion lantánido y las semividas en D₂O son mayores.

Antes de proceder a la medida de las semividas de emisión, se deben registrar los espectros de excitación y emisión de una disolución acuosa del complejo ICJ1911-01 (5×10⁻⁵ M) en H₂O a pH 7,0 utilizando un tampón TRIS a una concentración de 0,1 M.

Las semividas del estado excitado ⁵D₀ del Eu³⁺ se miden basándose en la técnica de recuento de fotones. Se realiza un ajuste a una expresión exponencial descrita en la ecuación 16:

$$C_{(t)} = A \cdot e^{(-t/\tau)} \quad (16)$$

Donde $C_{(t)}$ es el número de fotones registrados a un tiempo t después del pulso de excitación, A es una constante, y τ es la semivida de la luminiscencia. Este método se basa en la medida del tiempo de llegada de un fotón con respecto al pulso de radiación utilizado para excitar la muestra. Se utiliza una fuente de radiación (lámpara) pulsada, que permite obtener medidas para un número elevado de fotones.

El número de aguas de coordinación puede estimarse cuantitativamente aplicando las ecuaciones desarrolladas por Horrocks ⁽¹¹⁶⁾ o Parker ⁽¹¹⁷⁾ (Ec. 17 y 18):

$$q_{Eu} = 1,20 (k_{(H_2O)} - k_{(D_2O)} - 0,25) \quad \text{(Horrocks)} \quad (17)$$

$$q_{Eu} = 1,11 (k_{(H_2O)} - k_{(D_2O)} - 0,31) \quad \text{(Parker)} \quad (18)$$

En estas expresiones q indica el número de moléculas de hidratación del compuesto estudiado y tanto $k_{(H_2O)}$ como $k_{(D_2O)}$ son las velocidades de desactivación del estado excitado, que están relacionadas con las semividas de la siguiente manera (Ec. 19 y 20):

$$k_{(H_2O)} = \frac{1}{\tau_{(H_2O)}} \quad (19)$$

$$k_{(D_2O)} = \frac{1}{\tau_{(D_2O)}} \quad (20)$$

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

Parámetros relacionados con la seguridad

Los parámetros relacionados con la seguridad del producto que se han estudiado son la estabilidad metabólica y la toxicidad. Los resultados se han obtenido mediante métodos *in silico*, utilizando programas de ordenador como Toxtree® y TEST®⁽¹¹⁸⁾ entre otros, y análisis *in vitro* en el CIEMAT. Utilizando el programa de ordenador Toxtree® se han realizado estudios de Test de Ames y biodegradabilidad. Con respecto al programa TEST®, se han realizado estudios de mutagenicidad, dosis letal media (LD₅₀) y solubilidad.

Citotoxicidad

Para evaluar la toxicidad de los compuestos sintetizados en el presente estudio y poder compararlos con otros productos como el ácido acetrizoico y el gadobutrol, se ha realizado un estudio *in vitro* en el que se determina la concentración inhibitoria (IC₅₀) en cultivos celulares de fibroblastos V79, como alternativa a la experimentación con animales.

El método utilizado estudia la viabilidad celular (actividad metabólica) por reducción del compuesto MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Fig. 97), que es un compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, que presenta una alta solubilidad en agua y tiene un color amarillo.

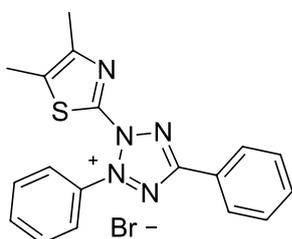


Figura 97: Estructura del compuesto MTT

Al reducirse, el MTT se convierte en un compuesto de la familia formazanos, de color violeta o marrón e insoluble en agua ((*E,Z*)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano) (Fig. 98).

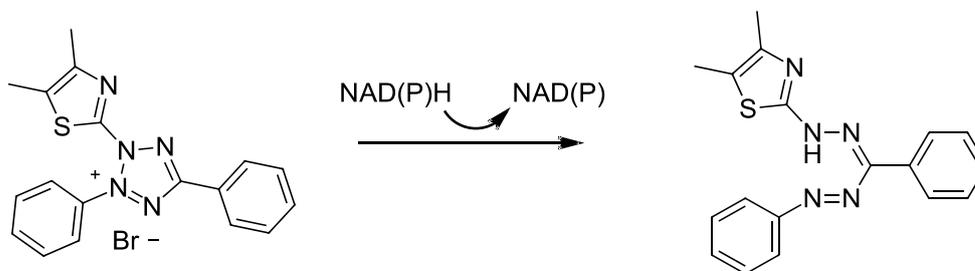


Figura 98: Reacción de degradación del compuesto MTT

La actividad metabólica de las células incluye la de las deshidrogenasas, ya que se puede considerar que la acción crítica que se estudia se debe principalmente a las deshidrogenasas mitocondriales, más específicamente la succinato deshidrogenasa; aunque también pueden intervenir reductasas citosólicas o de otros compartimentos subcelulares. Las responsables de la transformación de MTT en su formazano son las coenzimas NADH y NADPH.

Cuando la formación de este formazano se reduce o no se forma, quiere decir que la capacidad enzimática de las células va disminuyendo o que es nula y las disoluciones se caracterizan por tener un color degradado desde violeta-marrón oscuro hasta tener un color amarillo, característico por la ausencia de la capacidad metabólica y la correspondiente muerte celular. De esta manera, en este método se determina la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas, pudiendo ser utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad del compuesto formazano que se forma en cada disolución.

Este fenómeno se puede observar en la siguiente figura (Fig. 99), que es una fotografía tomada directamente del ensayo, en la que se puede observar que al cabo del tiempo, las disoluciones con concentraciones superiores del medio de contraste estudiado, presentan un color amarillo (ausencia de actividad enzimática), mientras que en las disoluciones con sucesivas diluciones del mismo, aumenta progresivamente la tonalidad hacia ese violeta o marrón que indica capacidad enzimática de las células.

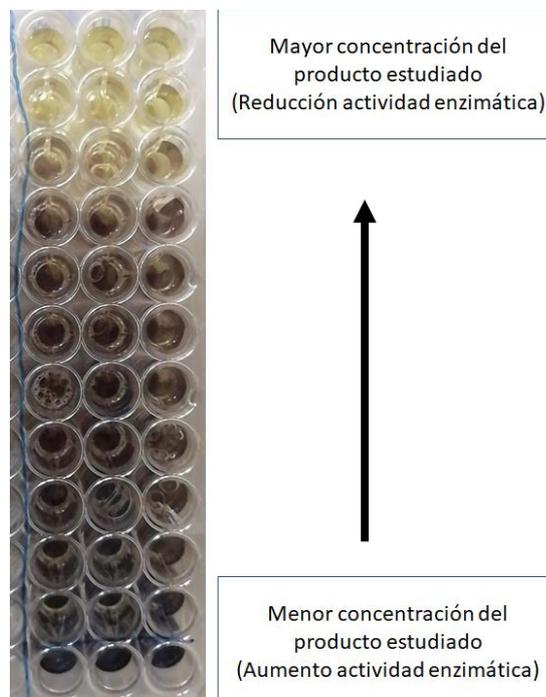


Figura 99: Imagen real de la determinación de citotoxicidad por reducción de MTT

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

Este estudio se realiza en células V79 (células de pulmón de hámster chino) de Sigma Aldrich (línea celular proveniente de la “ECACC”, *European Collection of Authenticated Cell Cultures*)

Estas células utilizadas son inmortales, tienen un ciclo celular corto y mutan fácilmente dando lugar a otras líneas estables, aunque deficientes en enzimas de reparación del ADN, permitiendo estudiar funciones relacionadas con la respuesta al daño del ADN.

El procedimiento utilizado para determinar la citotoxicidad por separado en cada uno de los productos estudiados se realiza por triplicado y es el siguiente:

En placas de 96 pocillos, se siembran entre 20000 y 25000 células V79 en 140 μ L del medio de cultivo utilizado (enriquecido con penicilina, estreptomycin y 10% de suero fetal bovino FBS) en cada pocillo (hay uno para cada disolución que se va a estudiar) y se incuban durante 24 horas manteniendo unas condiciones de 37°C y 5% CO₂.

Después del periodo inicial de incubación, se adicionan por triplicado en placas diferentes 50 μ L de cada disolución de un banco de diluciones del compuesto a estudiar y de esta manera se estudian por triplicado los siguientes rangos para cada compuesto (Tabla 23):

Tabla 23: Concentraciones estudiadas en citotoxicidad.

Compuesto	Disolución madre utilizada	Rango estudiado (mg/mL)
ICJ1805-01	286 mg/mL	0,070-71,5
ICJ1901-01	300 mg/mL	0,073-75
Gadobutrol	600 mg/mL	0,148-151,25
Ácido acetrizoico	555 mg/mL	0,072-37

Se incuban las placas en la estufa de cultivo durante 24 horas manteniendo unas condiciones de 37°C y 5% CO₂.

Se retira todo el medio de cultivo de los pocillos sin levantar las células y se lavan con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar posibles restos.

Se añaden 100 μ L a cada pocillo del compuesto 1 del kit de MTT, que al dejarlo incubar durante cuatro horas manteniendo unas condiciones de 37°C y 5% CO₂, comienza a generar unos cristales debidos a los formazanos formados.

Se añaden 100 µL del segundo compuesto del kit de MTT (PBS), que actúa como disolvente, y se deja toda la noche en incubación manteniendo unas condiciones de 37°C y 5% CO₂.

Al día siguiente, se determina la actividad metabólica utilizando un espectrofotómetro que permite medir la cantidad de células vivas y muertas que hay en cada pocillo. Se mide la absorbancia de cada pocillo a las longitudes de onda de 570 y 690 nm y, calculando la diferencia entre ambas absorbancias, se expresa este resultado como el porcentaje de la viabilidad celular tomando como el 100 % el valor de los pocillos con células no tratadas.

Se ajusta la viabilidad celular expresada en % en función del logaritmo de la concentración del compuesto estudiado, mediante regresión no lineal utilizando la siguiente curva sigmoide (Ec. 21):

$$Y = Inferior + \frac{(Superior - Inferior)}{1 + 10^{[(\log IC_{50} - X) \cdot pendiente]}} \quad (21)$$

Donde Y representa el porcentaje de viabilidad celular, X el logaritmo de la concentración de los compuestos utilizada y el valor de IC₅₀ se expresa como el valor medio y su intervalo de confianza al 95%.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

Ensayo de calibrador (*Phantom*)

Para estudiar la relación de la señal obtenida con diferentes concentraciones de los compuestos ICJ1901-01 e ICJ1911-01 en iRM, se realiza este estudio en iRM empleando un equipo de resonancia magnética para animales Bruker Biospec 70/30 de 7 T en el Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo (Fig. 100). Se estudian concentraciones de los compuestos en muestras acuosas correspondientes a 0, 1, 3, 10, 25 y 50 mM. Estas disoluciones se utilizan para evaluar el contraste midiendo en T_1 y en T_2 .



Figura 100: Equipo de iRM utilizado en el Hospital de Paraplégicos de Toledo.

De la misma manera, este estudio se realiza en un equipo de PET/TAC SuperArgus (2 camas, 45 kv, 150 μ A, 8 disparos) (Fig. 101) para los compuestos ICJ1805-01, ICJ1901-01 e ICJ1911-01, ya que debido a la presencia de una estructura triyodada y otros elementos que son capaces de absorber los rayos X como son el gadolinio, galio y europio puede haber una buena respuesta en dicha técnica. Este ensayo de calibrador se realiza en las instalaciones del CIEMAT. En cada pocillo se añaden 250 μ L de diferentes disoluciones con concentraciones de 0,08, 0,30, 1,18, 4,70, 18,8, 75 y 300 mM para cada compuesto.



Figura 101: Equipo de PET/TAC utilizado en las instalaciones del CIEMAT.

Marcaje radiactivo

Es un estudio fundamental para evaluar el posible uso de estos compuestos como medios de contraste en medicina nuclear, tanto en PET como en SPECT, ya sea teniendo como metal galio 67 o 68, respectivamente.

En este caso, se ha optimizado el método realizando una serie de pruebas de marcaje en las que se emplea el radionucleido emisor de positrones ^{68}Ga , $T_{1/2}$ de 67,845 minutos ⁽¹¹⁹⁾ obtenido del generador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ diseñado en el CIEMAT (Fig. 102 y 103) ⁽¹²⁰⁾. Se utiliza un HPLC Jasco con detector de DAD y de radiactividad Berthold LB503 para hacer el seguimiento del marcaje y comprobar la pureza radioquímica del compuesto marcado.

Para eluir el galio radiactivo del generador que se introducirá en la molécula, se utilizan 7 mL de ácido clorhídrico 1M, eluyendo el galio-68 en forma de cloruro de galio.

El proceso de marcaje optimizado se describe de la siguiente manera:

Se utilizan 7 mL de ácido clorhídrico 1 M para eluir el galio-68 del generador llegando a tener unos 30 mCi.



Figura 102: Cámara protectora del generador.



Figura 103: Generador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$.

Posteriormente, se toman 0,45 mL del ácido clorhídrico 1M eluido del generador, que corresponden al pico de mayor actividad, y se añaden en un tubo junto con 0,55 mL de ácido clorhídrico 1M.

A continuación, se neutraliza el pH de la disolución por adición de 1 mL de HEPES con una concentración de 200 g/L y se añaden al tubo de reacción 0,5 mL de una disolución del producto sin marcar ICJ1707-01 a una concentración de 2 mg/L, teniendo en el medio de reacción 1 nmol de producto sin marcar.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

Antes de llevar a cabo la reacción, se mide la radiactividad inicial de la mezcla de reacción, obteniendo un valor de 6,0 mCi.

Para comenzar con la reacción de marcaje, se introduce el tubo en un reactor de microondas durante 25 minutos a 90°C (Fig. 104).



Figura 104: Reactor de microondas.

Una vez finalizada la reacción, se deja enfriar la disolución hasta temperatura ambiente pasando una corriente de nitrógeno y se mide la radiactividad residual del ambiente y la actividad final conseguida en la disolución en dicha reacción (Fig. 105), obteniéndose unos valores de 0,8 μ Ci y 3,15 mCi, respectivamente.



Figura 105: Medidor de radiactividad.

Para verificar que la reacción ha sido exitosa, se analiza la pureza radiactiva que tiene la disolución, considerando como proceso aceptable aquel en el que se consigue una pureza mayor del 95%.

Una vez confirmado el resultado positivo por HPLC, se ajusta el pH a 7 con NaOH 1M y esta disolución ya se puede administrar a un animal. Cada 100 μ L tienen del orden de 130 μ Ci de actividad radiactiva.

Después de estudiar las características fundamentales de los medios de contraste sintetizados durante la Tesis Doctoral, se realiza una caracterización biológica tanto en iRM como en PET y PET/TAC.

Imagen *in vivo* en iRM

El protocolo, que fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal del Hospital Nacional de Parapléjicos de Toledo, consiste en la administración del medio de contraste ICJ1901-01 a una concentración de 0,03 M (0,1 mmol/Kg) en cinco ratones macho adultos por la vena de la cola, con el objetivo de estudiar la biodistribución a lo largo del tiempo. Para estos experimentos se utiliza un equipo de resonancia magnética para animales Bruker Biospec 70/30 de 7 T.

La elección de ratón en lugar de rata se debe a que los ratones tienen vesícula biliar y, de esta manera, podría existir la posibilidad de observar la eliminación del medio de contraste por esta vía.

El procedimiento de medida consiste en analizar la evolución del medio de contraste en el interior de los animales, aplicando una secuencia eco de gradiente (tiempo total de la secuencia: 8 segundos; T_R : 78,3, T_E : 1,5 ms y como F_A : 90°). Una vez adquirida la imagen basal, se inyecta el agente de contraste. Las imágenes post-contraste se adquieren con la misma secuencia, pero programando la secuencia con un número de 200 repeticiones (24 minutos de tiempo total de análisis). A su vez, esta secuencia es repetida tres veces para estudiar la distribución y eliminación del medio de contraste durante 70 minutos.

El seguimiento de la evolución de la escala de gris en diferentes partes del cuerpo de los ratones permite la posibilidad de realizar un estudio de la distribución y eliminación del medio de contraste evaluado.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

Imagen *in vivo* en PET/TAC

La experimentación con animales realizada se basa en el estudio de distribución y eliminación en diferentes órganos en función de la concentración administrada en varios ratones (Athimyc Nude macho en ayunas). Para la realización de estas pruebas *in vivo*, se evalúan las imágenes de un estudio dinámico (ventana 250-700 keV) en un escáner SuperArgus durante 20 minutos tras la administración.

Las imágenes se reconstruyen con el programa del equipo (2 iteraciones, con corrección *random* y *scatter*) en 4 periodos consecutivos de 5 minutos cada una. Con el fin de registrar las imágenes PET con su correspondiente TAC, a los animales también se les hace un TAC (1 cama, 45 kv, 150 μ A, 8 disparos) al finalizar la adquisición PET.

En las imágenes de PET se utilizan regiones de interés (ROIs, del inglés *Regions of Interest*) centradas en el corazón, hígado, riñones y vejiga, las cuales fueron utilizadas para calcular la captación usando el valor de absorción estandarizado (SUV, del inglés *Standardised Uptake Value*) de las imágenes PET co-registradas (Ec. 22):

$$SUV = \frac{\text{Concentración de actividad } \left(\frac{\mu\text{Ci}}{\text{cm}^3}\right) \cdot \text{masa corporal (g)}}{\text{Actividad inyectada } (\mu\text{Ci})} \quad (22)$$

El protocolo, que fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal, consiste en la realización de una serie de experimentos que estudian la relación de la señal obtenida en PET con la concentración del medio de contraste administrado:

- Estudio dinámico tras la administración del producto radiactivo ICJ1805-01 marcado con galio-68. La masa de sustancia inyectada es prácticamente despreciable, del orden de ng.
- Estudio dinámico tras la administración de una mezcla del producto radiactivo ICJ1805-01 marcado con galio-68 con una concentración del producto "frío" ICJ1805-01 de 0,3 M (dosis equivalente a la utilizada en exploraciones radiológicas, 1 mmol/Kg).
- Estudio dinámico tras la administración de una mezcla del producto radiactivo ICJ1805-01 marcado con galio-68 con una concentración del producto "frío" ICJ1805-01 de 0,03 M (dosis equivalente a la utilizada en exploraciones de resonancia, 0,1 mmol/Kg).

Utilizando los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo*, se va a realizar un estudio farmacocinético en el que se evaluarán diferentes parámetros.

Para poder entender el comportamiento de los medios de contraste en el organismo, es importante comenzar a entender qué es la farmacocinética y qué estudia; para ello, en este apartado se incluye una breve explicación de algunos conceptos básicos de farmacocinética y de su aplicación a lo largo del presente trabajo ⁽¹²¹⁾.

Se puede definir la farmacocinética como la rama de la farmacología que estudia los procesos cinéticos de los fármacos desde que son administrados hasta su total eliminación del organismo. Sus principales aplicaciones están relacionadas con la elaboración de nuevos fármacos y la optimización de tratamientos farmacológicos, así como con la detección de respuestas anómalas, el análisis retrospectivo de errores terapéuticos o tratamientos inadecuados. Es muy utilizada, además, para la detección de interacciones y problemas de biodisponibilidad. La realización de un buen estudio farmacocinético permite la optimización del efecto terapéutico reduciendo al mínimo los efectos adversos que pueden aparecer tras la administración del fármaco.

La base de la farmacocinética es la relación entre la dosis administrada y la concentración del fármaco libre en la zona de acción, así como la evolución temporal de la concentración de dicho fármaco en el cuerpo humano. Los procesos que se estudian se abrevian como ADMET (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad).

Existen dos parámetros fundamentales que se pueden describir en función de la interacción del fármaco con los procesos fisiológicos básicos. El primero es el aclaramiento (Cl), que describe la eficacia de eliminación irreversible de un fármaco en el organismo; y el segundo es el volumen aparente de distribución (V), que describe la relación entre la concentración del fármaco en la sangre y el fármaco presente en los tejidos del organismo. Un tercer parámetro, que se determina a partir de los dos parámetros anteriores, es la semivida ($t_{1/2}$), que se representa como el inverso de la constante de la velocidad de eliminación.

Con respecto al aclaramiento, se considera eliminación irreversible a la eliminación del fármaco por cualquier medio, ya sea a través de la orina, intestino, aire espirado, sudor, etc., pudiendo metabolizarse en el hígado o en otros órganos en menor medida. También se puede definir como el volumen de sangre (o plasma) que es limpiado de fármaco por unidad de tiempo, y por eso sus unidades son volumen/tiempo. El índice de extracción (E) es un término que relaciona la concentración del fármaco que entra en un órgano y la concentración de este que sale de él, indicando que cantidad de este se elimina en un solo paso en dicho órgano; se representa con la ecuación 23 y el más común es el índice de extracción hepático (E_H).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

$$E_H = 1 - \frac{\text{Concentración de salida}}{\text{Concentración de entrada}} \quad (23)$$

Entendiendo esto, se puede apreciar una dependencia del aclaramiento con el flujo sanguíneo que llega a un órgano (Q) y con la eficacia de extracción irreversible en el órgano (E).

También se puede expresar el aclaramiento con la ecuación 24, relacionando la concentración del fármaco en la sangre (C) con la velocidad de eliminación de este.

$$\text{velocidad de eliminación (mg/h)} = Cl (L/h) \cdot C (mg/L) \quad (24)$$

Es posible determinar la velocidad de administración (DR) de un fármaco necesaria para alcanzar la concentración plasmática en estado estacionario (C_{ss} , situación en la que la velocidad de administración es igual a la velocidad de eliminación) de la siguiente manera (Ec. 25):

$$DR (mg/h) = Cl (L/h) \cdot C_{ss} (mg/L) \quad (25)$$

El método clásico para determinar el aclaramiento se basa en la medida de la velocidad de excreción en la orina y la concentración sanguínea al mismo tiempo; esta relación se explica con la siguiente ecuación (Ec. 26), donde U es la concentración del fármaco en la orina, V es el flujo urinario y P es la concentración plasmática o sanguínea:

$$Cl = U \cdot \frac{V}{P} \quad (26)$$

Otra opción es la toma de muestras de la sangre cada cierto tiempo, ya que midiendo la concentración del fármaco en cada muestra se puede calcular la cantidad del fármaco que accede a la zona estudiada, pudiendo ser expresada como el área bajo la curva de concentración respecto del tiempo (AUC) (Ec. 27) (Fig. 106):

$$Cl (L/h) = \frac{\text{dosis (mg)}}{AUC (mg \cdot h/L)} \quad (27)$$

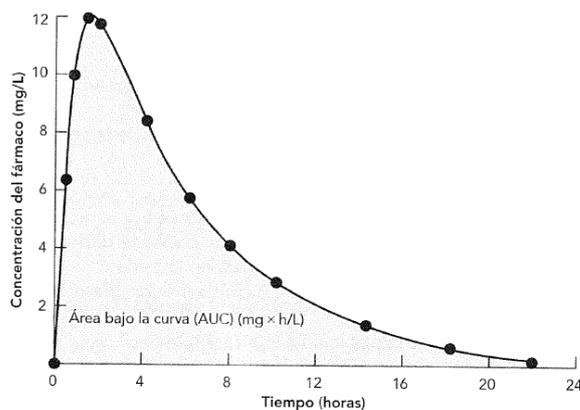


Figura 106: Determinación del aclaramiento.

El segundo parámetro fundamental como se comentó anteriormente es el volumen de distribución V . No es un volumen real, sino que es un parámetro que relaciona la cantidad del fármaco en el plasma o sangre (C) con la cantidad del fármaco en el organismo (A) o bien la dosis administrada con la concentración plasmática inicial (C_0), según la ecuación 28:

$$V = \frac{A}{C} = \frac{\text{Dosis}}{C_0} \quad (28)$$

El volumen de distribución determina el tipo de unión del fármaco a los componentes tisulares con respecto a la unión con proteínas plasmáticas; de esta manera, si el fármaco se une en gran medida a los tejidos, habrá una mayor concentración del fármaco en dichos tejidos y una concentración menor en la sangre. En caso contrario, si el fármaco presenta una unión importante a las proteínas plasmáticas, la mayor concentración del fármaco estará en la sangre.

Para determinar la concentración plasmática inicial del fármaco (C_0) se toman muestras cada cierto tiempo y, con una representación gráfica del logaritmo de la concentración del fármaco (eje y) en función del tiempo (eje x), se obtiene una línea recta. Si se extrapola hacia el eje y, se puede determinar este valor C_0 (Fig. 107)

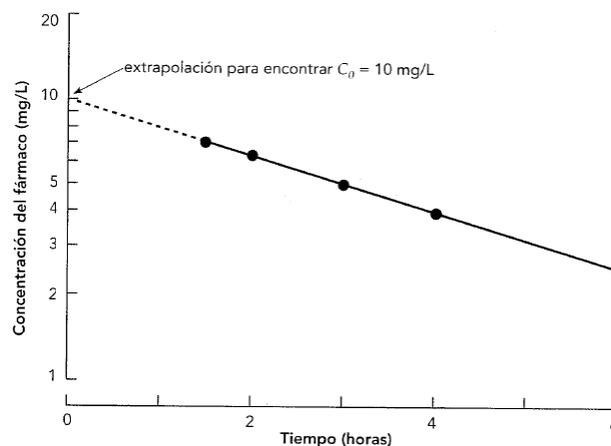


Figura 107: Determinación de C_0 .

En el momento en el que los fármacos son administrados existen varias opciones, ya que estos pueden llegar directamente al torrente sanguíneo o ser absorbidos antes de llegar a la sangre. Considerando que no exista ningún tipo de absorción, el volumen de distribución coincide con el volumen sanguíneo y las concentraciones del fármaco en la sangre son elevadas. Posteriormente, el fármaco se distribuye a diversos tejidos en función de la perfusión del tejido y de la facilidad que tenga el fármaco para atravesar las barreras (entre las que están las membranas celulares). Algunos tejidos están muy perfundidos, como el cerebro, y algunos fármacos como el diazepam y el tiopental se distribuyen rápido desde la sangre hasta allí; en cambio, ocurre lo contrario en el músculo esquelético y la grasa, habiendo en estos casos una distribución más lenta.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

El tercero de los parámetros farmacocinéticos mencionados anteriormente es la semivida $t_{1/2}$, que es el tiempo que transcurre hasta que la cantidad del fármaco en el organismo se reduce a la mitad. En el cuerpo humano, la eliminación suele ocurrir de manera exponencial, por lo que, al representar el logaritmo de la concentración frente al tiempo, se obtiene una línea recta; a este fenómeno se le conoce como “eliminación de primer orden” (Fig. 108). La ecuación exponencial se explica de la siguiente manera (Ec. 29):

$$C_t = C_0 \cdot e^{-kt} \quad (29)$$

Donde C_t es la concentración del fármaco en un instante t , C_0 es la concentración inicial del fármaco y k es la constante de la velocidad de eliminación (sus unidades son tiempo⁻¹).

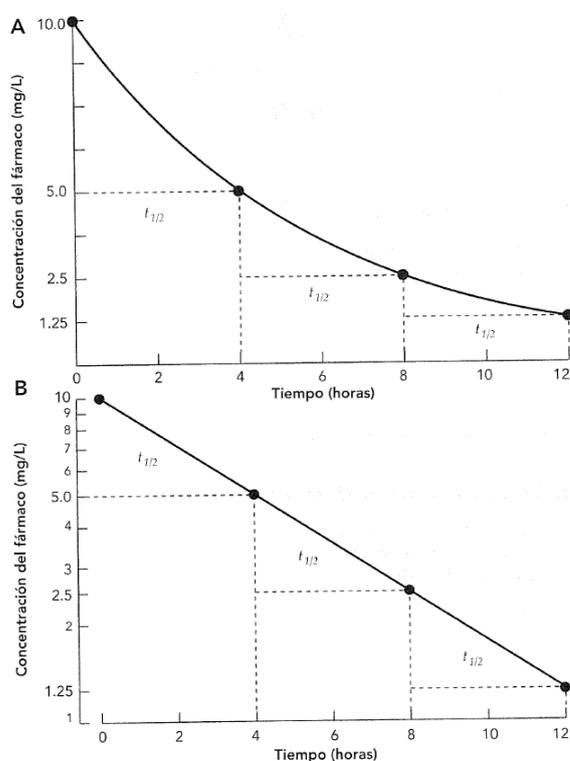


Figura 108: Eliminación de primer orden con una semivida de 4 horas. Escala lineal (A) y escala semilogarítmica (B).

La expresión que relaciona la semivida con el volumen de distribución y el aclaramiento se expresa con la siguiente ecuación (Ec. 30):

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2) \cdot V}{Cl} \quad (30)$$

Si se relacionan las ecuaciones anteriores, se puede observar la relación de la constante de la velocidad de eliminación con el aclaramiento y el volumen de distribución (Ec. 31).

$$k = \frac{Cl}{V} \quad (31)$$

Cuanto mayor es el volumen de distribución, mayor es la cantidad del fármaco que se encuentra en los tejidos, en comparación con la concentración existente en la sangre. Si el volumen de distribución es elevado, los mecanismos de eliminación ocurren para una cantidad que no es la totalidad del fármaco; pero en cambio, si el volumen de distribución es pequeño, la mayoría del producto está en la sangre y los procesos de eliminación afectan casi íntegramente a la concentración total de este.

En cuanto a la eliminación de los fármacos, las vías principales son la excreción por los riñones sin ninguna modificación, la eliminación por la vía hepática, aunque también existen otras opciones de eliminación como la biotransformación o la excreción en el aire espirado.

Centrándonos en la vía hepática, los fármacos llegan desde la vena porta al hígado, donde hay dos posibles caminos: uno consiste en la metabolización de los fármacos por medio de enzimas (índice de extracción hepático, E_H), excretando el fármaco por las vías biliares; y el otro consiste en la vuelta a la circulación sistémica de los fármacos ($1-E_H$), lo que se conoce como extracción presistémica o efecto de primer paso.

Los parámetros que están relacionados con el efecto de primer paso son la absorción, el aclaramiento de primer paso, la biodisponibilidad y la bioequivalencia. La absorción (" f_g ") se define como la proporción del fármaco que se queda atrapado en la zona intestinal llegando a la circulación portal. El aclaramiento de primer paso (metabolismo de primer paso o extracción de primer paso, " f_H ") corresponde a la eliminación del fármaco por el hígado en el primer paso desde la circulación portal hasta la circulación sistémica; esta secreción biliar suele implicar procesos activos y, por consiguiente, la eliminación por esta vía puede seguir una cinética de orden uno, a no ser que exista un proceso de saturación, que da lugar a cinéticas no lineales (o de orden cero). La biodisponibilidad (F) se define como la proporción de la dosis en forma de fármaco inalterado (no metabolizado) que llega a la circulación sistémica. Se puede calcular utilizando la ecuación 32:

$$F = f_g \cdot f_H \quad (32)$$

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

En la figura 109, la biodisponibilidad calculada según la ecuación 32 correspondería a $0,8 \times 0,25 = 0,2$ (20%).

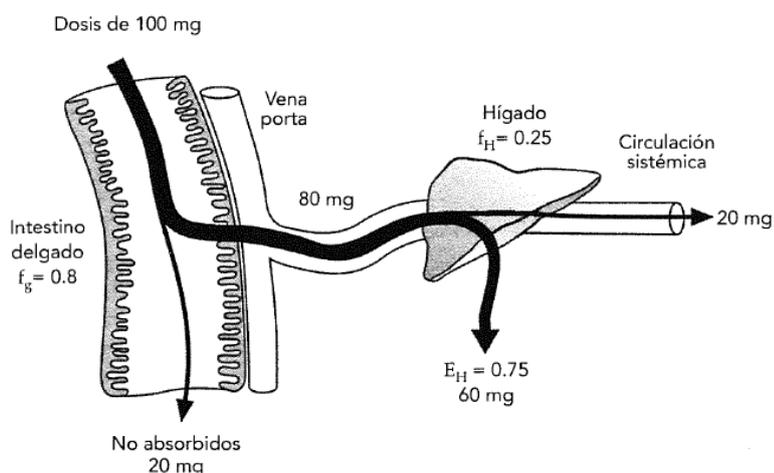


Figura 109: Efecto del primer paso.

Para evitar este efecto de primer paso y así garantizar que el 100% del fármaco llegue a la circulación sistémica, se puede utilizar una administración por vía sublingual, ya que el drenaje venoso de la boca se conecta directamente con la circulación sistémica evitando el paso hepático. También existe la alternativa de la administración por vía transdérmica. Otra opción es por la vía rectal, ya que aproximadamente la tercera parte de esta corresponde a una circulación sistémica en vez de portal; aunque existe el inconveniente de que la absorción en el recto suele ser irregular e incompleta. La última alternativa para evitar el efecto de primer paso es el uso de la administración por inhalación.

Volviendo al estudio de las dos principales vías de eliminación de los fármacos, la manera más sencilla de calcular el porcentaje del fármaco que se elimina por cada una es tomar muestras de orina del paciente durante un tiempo determinado tras la administración del producto. Así, se puede cuantificar la proporción del fármaco excretado sin modificarse y, posteriormente, se calcula la proporción del fármaco vinculada a cada vía de administración; lo que se conoce como fracción excretada inalterada (f_e).

En la eliminación de los fármacos por vía renal existen tres procesos: filtración, secreción y reabsorción. La figura 110 sirve para entender gráficamente el proceso que sufren los fármacos cuando se eliminan por vía renal.

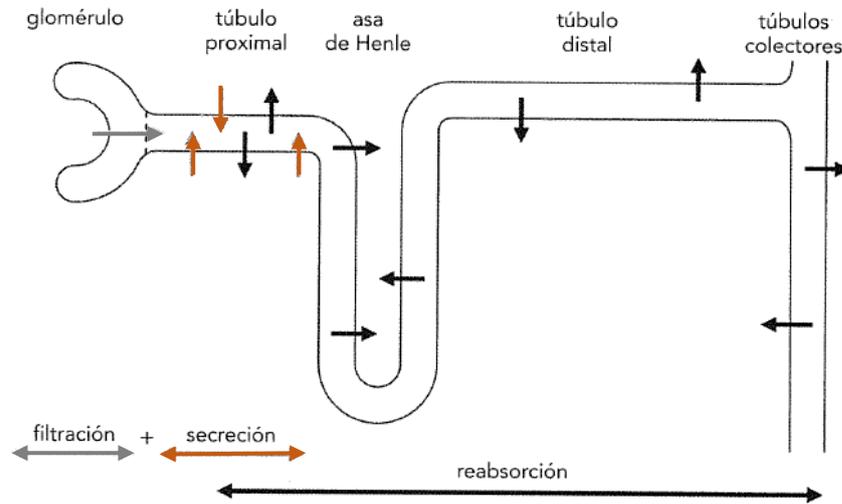


Figura 110: Eliminación renal.

En este caso, los fármacos pasan de la sangre a la orina a través de una filtración inicial en el glomérulo; que consiste en la separación de las moléculas libres disueltas en el agua plasmática de otras moléculas que se unen a proteínas plasmáticas y quedan retenidas. El flujo de esta filtración se conoce como tasa de filtración glomerular (GFR) y suele tener un valor de 120 mL/min. Así, la expresión del aclaramiento se expresa de la siguiente manera, donde f_u es la fracción del fármaco que está libre en el plasma (Ec. 33):

$$Cl_{GF} = f_u \cdot GFR \quad (33)$$

Una vez filtrada la sangre, el aclaramiento de los fármacos continúa a través de una secreción tubular activa (Cl_s). En ella, se transportan las moléculas desde la sangre hasta el túbulo renal en una situación similar al índice de extracción hepático comentado anteriormente, ya que los mecanismos de secreción son tan activos que, incluso algunos fármacos que se unen a proteínas plasmáticas se pueden liberar en un solo paso por el riñón. De manera análoga a la filtración glomerular, el componente de aclaramiento de este proceso se explica según la ecuación 34:

$$\text{Aclaramiento por secreción} = f_u \cdot Cl_s \quad (34)$$

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

Cuando los fármacos atraviesan el túbulo renal, una parte del plasma filtrado es reabsorbida por el organismo y vuelve a la sangre, lo que provoca que sólo una fracción de los fármacos pasen a formar parte de la orina. Entre los factores que afectan a que la reabsorción sea menor o mayor se encuentran la velocidad de flujo urinario, ya que cuanto mayor es el flujo, mayor es la eliminación y menor es la reabsorción de los fármacos; y la capacidad del fármaco para atravesar las membranas de las células tubulares, ya que únicamente atraviesan estas membranas los compuestos no ionizados, por lo que en función del pH de la orina y el pK_a del fármaco puede haber una mayor o menor predisposición a la reabsorción.

Por consiguiente, se puede expresar de manera general el aclaramiento renal de la siguiente manera (Ec. 35):

$$\text{aclaramiento renal} = \text{filtración} + \text{secreción} - \text{reabsorción} \quad (35)$$

De una forma más específica, se pueden unificar los términos anteriores en la siguiente expresión (Ec. 36):

$$Cl_R = fu \cdot (GFR + Cl_S) \cdot (1 - FR) \quad (36)$$

Donde FR es la fracción del fármaco que no se reabsorbe en el túbulo renal.

Hasta ahora, se ha considerado un caso ideal en el que los procesos de eliminación tienen un comportamiento lineal en función de las concentraciones de los fármacos en el tiempo, pero en muchas ocasiones el comportamiento farmacocinético no es lineal. Esto puede ocurrir por una saturación del metabolismo de los fármacos o por la interacción de fenómenos que provocan una modificación en la respuesta lineal de los procesos.

Las reacciones enzimáticas que intervienen en la eliminación de los fármacos se describen según la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 37) (Fig. 111), donde v es la velocidad de la reacción, S es la concentración de sustrato (equivalente a la concentración del fármaco), V_{max} es la velocidad máxima para concentraciones muy altas de sustrato y K_m es la concentración del sustrato a la mitad de V_{max} .

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S} \quad (37)$$

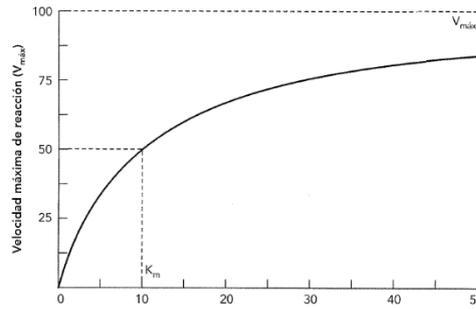


Figura 111: Comportamiento enzimático.

Teniendo en cuenta este comportamiento, el aclaramiento depende de la velocidad de eliminación y de la concentración del fármaco (C). De esta manera, se establecen las siguientes ecuaciones (Ec. 38 y 39):

$$\text{velocidad de eliminación} = Cl \cdot C \quad (38)$$

$$Cl = \frac{v}{C} = \frac{V_{max}}{K_m + C} \quad (39)$$

En la ecuación anterior, el término C suele ser despreciable en el intervalo terapéutico en comparación con K_m , lo que marcaría la independencia entre el aclaramiento y la concentración del fármaco administrado. Pero existen casos en los que la concentración administrada del fármaco es similar o mayor que K_m , lo que favorece la disminución del aclaramiento con el aumento de la concentración del fármaco, permaneciendo este más tiempo en el interior del cuerpo humano.

Cuando la cantidad del fármaco eliminado es constante en el tiempo, la eliminación se ajusta a una cinética de orden cero en vez de a la cinética habitual de orden uno (existe una proporción constante del fármaco eliminado en una unidad de tiempo). Esta cinética de orden cero ocurre generalmente por una saturación del metabolismo de los fármacos y puede llegar a producir la aparición de efectos adversos de múltiples magnitudes que pueden ser muy perjudiciales para la salud. Esto demuestra la relevancia de este estudio a la hora de controlar la dosis administrada a un paciente.

Una elevada concentración del fármaco administrado puede llegar a provocar una saturación en el metabolismo de primer paso también, en el que se satura la capacidad de funcionamiento de las enzimas metabolizadoras con la consiguiente reducción del aclaramiento.

En la excreción renal, la filtración glomerular y la reabsorción tubular son procesos pasivos no saturables, pero la secreción implica la unión a un mecanismo de transporte activo y posibilita su saturación en función de la concentración del fármaco que se administra. Otro posible caso de saturación por un exceso de concentración de fármaco administrado ocurre en la unión a proteínas plasmáticas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

Una vez definidos los parámetros farmacocinéticos más importantes, nos vamos a centrar en la caracterización farmacocinética, entendiendo un organismo como un sistema de compartimentos ⁽¹²²⁾.

El modelo monocompartimental es el más sencillo de todos y en él se considera el organismo como un único compartimento homogéneo. No quiere decir que la concentración del fármaco sea la misma en todos los tejidos, pero sí que cualquier cambio que ocurra en el plasma refleja exactamente los cambios que han ocurrido a nivel tisular. En este caso, la eliminación del fármaco siempre sigue una cinética de primer orden, siendo la velocidad de eliminación proporcional a la concentración del medicamento y el tiempo. Entre los procesos de eliminación que siguen este comportamiento se encuentra la filtración glomerular en el riñón y la difusión pasiva en la bilis. En estos casos, la constante de velocidad de eliminación suele ser la suma de las constantes de velocidad de los procesos individuales.

Para calcular los parámetros farmacocinéticos más importantes en un modelo monocompartimental se utilizan las ecuaciones comentadas anteriormente.

Los modelos compartimentales se basan en el supuesto de que todos los procesos de transferencia de fármacos (entradas y salidas del fármaco al interior del organismo y transferencia entre los compartimentos) son lineales o pseudolineales.

En el modelo bicompartimental se explica que la mayoría de los medicamentos que llegan a la circulación sistémica necesitan un tiempo inicial para distribuirse por completo en todo el espacio corporal. Por esta razón, en los modelos bicompartimentales se diferencian dos fases, una relativa a la disposición rápida en la que las concentraciones en el plasma disminuyen rápidamente; y otra fase de disposición lenta en la que predominan los procesos de eliminación sobre la distribución de los fármacos. Hay ocasiones en las que no se aprecia este comportamiento, pero suele ser debido a que no se toman suficientes muestras para analizar.

El compartimento central en este sistema está formado normalmente por la sangre, tejidos de órganos y otros tejidos bien perfundidos. Como la distribución de los fármacos está relacionada con el flujo sanguíneo, los tejidos y órganos muy bien perfundidos, como el hígado y el riñón, tienen que conseguir una rápida distribución en la sangre. Por esta razón, en un modelo con una farmacocinética bicompartimental es característica una disposición biexponencial (Fig. 112), en la que después de una administración intravenosa, existe una primera etapa de disposición en la que la concentración de los fármacos disminuye a mayor velocidad que en la etapa posterior. La distribución se expresa según la ecuación 40:

$$C_t = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t} \quad (40)$$

Donde A y B son las ordenadas a tiempo cero para cada uno de los segmentos y cuya suma es la concentración plasmática inicial del fármaco (C_0). α y β son las constantes de velocidad relativas a cada segmento.

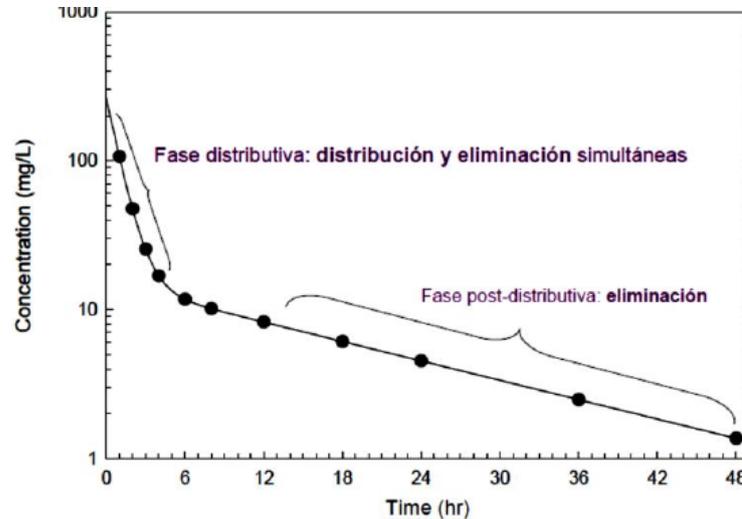


Figura 112: Modelo bicompartimental.

En la opción contraria se conoce como compartimento periférico al conjunto de los tejidos que son poco perfundidos, además, se caracterizan por ser más inaccesibles al flujo sanguíneo, como músculos, tejidos magros o la grasa. En este caso se puede observar una primera fase que consiste en un aumento de la concentración del fármaco hasta alcanzar un máximo, seguida de una segunda fase en la que comienza a disminuir la concentración a medida que avanza la distribución en los tejidos con su correspondiente eliminación (Fig. 113).

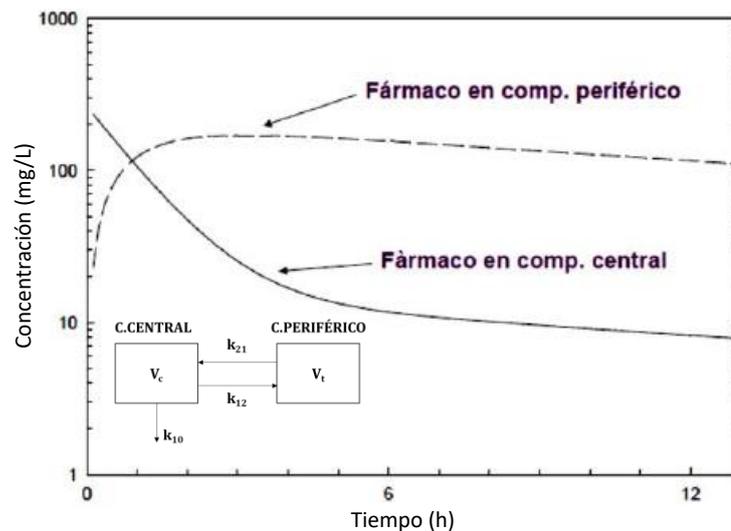


Figura 113: Representación gráfica de un modelo farmacocinético bicompartimental.

En esta figura K_{10} corresponde a la constante de velocidad de eliminación desde el compartimento central y tanto K_{12} , como K_{21} son constantes de distribución entre los compartimentos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

El cerebro está completamente separado de la sangre por una barrera lipídica (barrera hematoencefálica), pero dependiendo de los fármacos utilizados se puede considerar como parte del compartimento central o del periférico. Para medicamentos liposolubles, el cerebro se puede incluir en el compartimento central; pero si se utilizan medicamentos polares, el cerebro se debe incluir en el compartimento periférico.

En un momento, se consigue un equilibrio de pseudodistribución entre el compartimento central y los tejidos poco perfundidos y, a partir de ahí, la eliminación del medicamento en el plasma se describe como una curva monoexponencial.

La representación gráfica más utilizada para el modelo bicompartimental se basa en la eliminación de los fármacos por el compartimento central. Se supone que el hígado y los riñones tienen una buena perfusión sanguínea, por lo que se pueden considerar como una parte del compartimento central.

Realizando un desarrollo matemático con los términos farmacocinéticos que se pueden encontrar en cualquier libro de farmacocinética se puede llegar a las siguientes conclusiones (Ec. 41-45):

$$\alpha + \beta = k_{12} + k_{21} + k_{10} \quad (41)$$

$$\alpha\beta = k_{21}k_{10} \quad (42)$$

$$C = \frac{X_0(\alpha - k_{21})}{V_c(\alpha - \beta)} e^{-\alpha t} + \frac{X_0(k_{21} - \beta)}{V_c(\alpha - \beta)} e^{-\beta t} \quad (43)$$

$$k_{21} = \frac{A\beta + B\alpha}{A + B} \quad (44)$$

$$k_{10} = \frac{\alpha\beta}{k_{21}} \quad (45)$$

Donde X_c es la cantidad del fármaco en el compartimento central, X_0 es la dosis intravenosa, V_c es el volumen aparente del compartimento central, el cociente de X_c/V_c es la concentración del fármaco en el compartimento central y A y B son (Ec. 46 y 47):

$$A = \frac{X_0(\alpha - k_{21})}{V_c(\alpha - \beta)} \quad (46)$$

$$B = \frac{X_0(k_{21} - \beta)}{V_c(\alpha - \beta)} \quad (47)$$

Para determinar el volumen aparente del compartimento central (V_c) se puede utilizar la siguiente expresión (Ec. 48):

$$V = \frac{X_0}{A + B} \quad (48)$$

Además, para calcular otros parámetros farmacocinéticos como la semivida en cada uno de los tramos se utilizan las siguientes expresiones (Ec. 49 y 50):

$$t_{1/2\alpha} = \frac{\ln(2)}{\alpha} \quad (49)$$

$$t_{1/2\beta} = \frac{\ln(2)}{\beta} \quad (50)$$

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

Imagen *in vivo* en rayos X (TAC)

El procedimiento realizado, que fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal, consiste en el análisis de imágenes en un escáner de rayos X (TAC) SuperArgus (1 cama, 45 kv, 150 μ A, 8 disparos) 2-3 minutos después de la administración de una disolución del producto ICJ1901-01 en una concentración de 0,3 M (dosis equivalente a la utilizada en exploraciones radiológicas, 1 mmol/Kg) ajustada a pH 7 con NaOH 1M a un ratón (Athimyc Nude) macho en ayunas.

Debido a la imposibilidad de realizar la inyección al animal con el medio de contraste dentro del equipo, puesto que existe una fuente ionizante que tiene que estar aislada del personal que realiza las exploraciones, el animal se introduce en el equipo para la captación de las imágenes después de la administración. Este proceso de pérdida de la señal puede suponer un retraso de tres minutos desde que se realiza la inyección.

*“Conseguir lo que quieres es tan difícil como no conseguir lo que quieres.
Porque entonces tienes que averiguar qué hacer con ello,
en lugar de averiguar qué hacer sin ello.”*

David Levithan
(El reino de la Posibilidad)

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo analítico

Para obtener unos productos finales que se puedan administrar tanto en animales como en personas, es necesario que estos cumplan ciertas especificaciones relacionadas sobre todo con la pureza. Es por ello, que la química analítica tiene un papel importante en la presente Tesis Doctoral, ya que permite llevar a cabo el seguimiento analítico del proceso sintético y así determinar el éxito de cada etapa en cuanto a los productos buscados. Además, a través de los métodos analíticos es posible determinar el grado de pureza tanto de las materias primas como de los productos intermedios y finales.

Para ello, se han desarrollado una serie de métodos cromatográficos con el fin de conseguir una buena separación analítica de los compuestos presentes en las mezclas de reacción y, de esta manera, poder determinar inequívocamente cada compuesto consiguiendo una buena resolución entre ellos. Por consiguiente, se puede determinar el grado de pureza de los compuestos en cada una de las etapas de la síntesis.

Para el desarrollo de estos métodos se han utilizado tanto productos intermedios sin aislar provenientes de las reacciones orgánicas, como productos aislados previamente caracterizados tal como se describirá en apartados posteriores en el presente capítulo.

De todos los métodos que se han desarrollado, se describen a continuación los más destacados, indicando cuales son los productos que se pueden determinar con ellos:

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo analítico

Método 1

Se ha utilizado en el seguimiento de la reacción para las etapas de hidrogenación (Etapa 1) y yodación (Etapa 2), en las que intervienen los productos ácido 3-nitrobenzoico e ICJ1704-01. Las condiciones analíticas son las siguientes:

- Tiempo: 18 minutos
- Temperatura de la columna: 30°C
- Isocrático 55% Fase móvil A/ 45% Fase móvil B
- Columna: Luna 5µm C18(2) 100Å, 250 x 4,6 mm
- Fase móvil A: 100% 1,7 g/L Tetrabutilamonio (CAS 32503-27-8) en agua
- Fase móvil B: 100% Acetonitrilo (CAS 75-05-8)
- Flujo: 1,0 mL/min
- Detección: UV (254 nm)

En el siguiente cromatograma (Fig. 114) se muestran los resultados obtenidos con este método, en el que el ácido 3-nitrobenzoico eluye a un tiempo de retención de 5,32 min y el compuesto ICJ1704-01 a un tiempo de retención de 10,34 min.

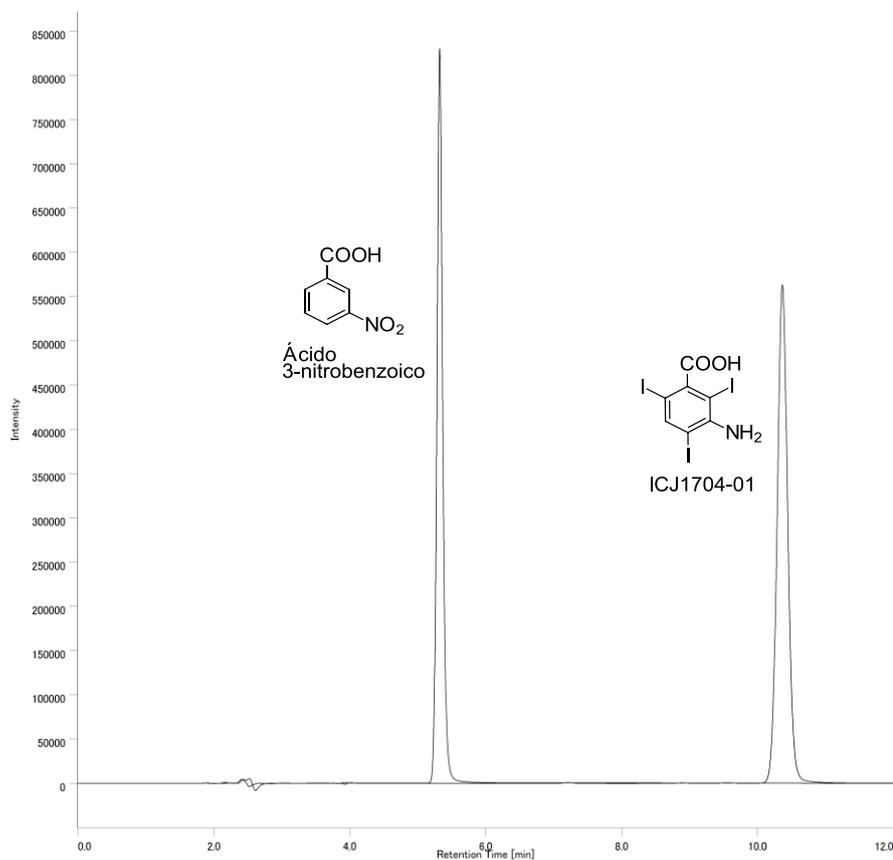


Figura 114: Cromatograma a 254 nm obtenido con el método de análisis 1.

Método 2

Se ha utilizado en el seguimiento de reacción para la etapa de acetilación (Etapa 4), en la que intervienen el cloruro de ICJ1704-01 y el producto ICJ1705-01. Las condiciones analíticas son las siguientes:

- Tiempo: 25 minutos
- Temperatura de la columna: 30°C
- Gradiente:

Tabla 24: Gradiente para el método 2.

Tiempo (min)	%A	%B
0	55	45
9,50	55	45
15,00	0	100
22,00	55	45
25,00	55	45

- Columna: Luna 5 μ m C18(2) 100Å, 250 x 4,6 mm
- Fase móvil A: 100% Agua
- Fase móvil B: 100% Acetonitrilo
- Flujo: 1,0 mL/min
- Detección: UV (254 nm)

En el siguiente cromatograma (Fig. 115) obtenido con el método 2 se observa que el compuesto ICJ1705-01 eluye a un tiempo de retención de 14,91 min mientras que el cloruro de ICJ1704-01 lo hace a 19,35 min.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo analítico

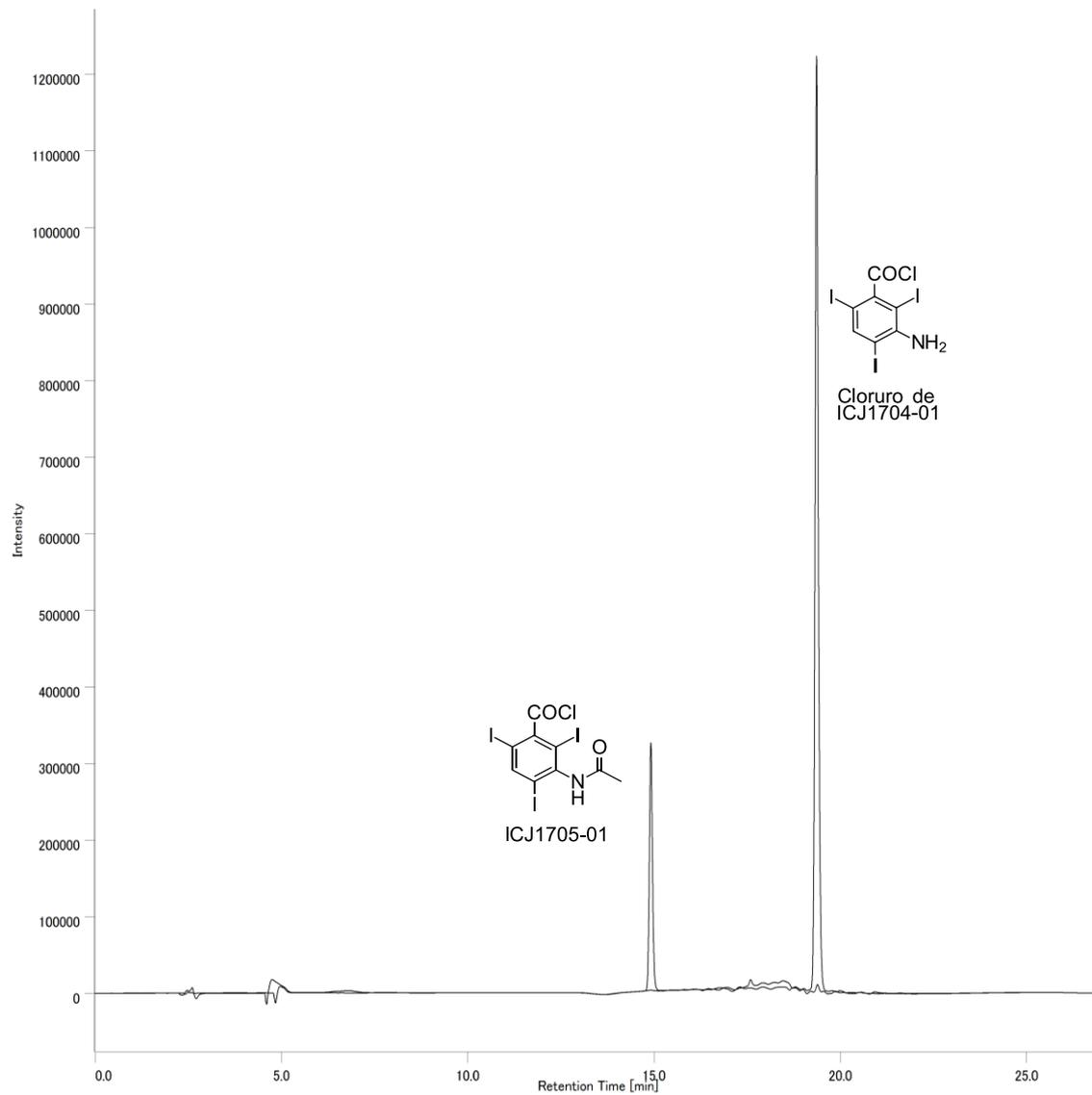


Figura 115: Cromatograma a 254 nm obtenido con el método de análisis 2.

Método 3

Se ha utilizado en el seguimiento de reacción para las etapas de hidrogenación (Etapa 1), yodación (Etapa 2), formación del cloruro de ácido (Etapas 3 y 5) y acetilación (Etapa 4), en las que intervienen el ácido 3-nitrobenzoico, ICJ1703-01, ICJ1704-01, el cloruro de ICJ1704-01, ICJ1705-01 y el ácido acetrizoico. Las condiciones analíticas son las siguientes:

- Tiempo: 33 minutos
- Temperatura de la columna: 30°C
- Gradiente:

Tabla 25: Gradiente para el método 3.

Tiempo (min)	%A	%B
0	55	45
9,50	55	45
20,00	0	100
23,00	45	45
33,00	45	45

- Columna: Luna 5 μ m C18(2) 100Å, 250 x 4,6 mm
- Fase móvil A: 100% 1,7 g/L Tetrabutilamonio en agua
- Fase móvil B: 100% Acetonitrilo
- Flujo: 1,0 mL/min
- Detección: UV (254 nm)

En la figura 116 se puede observar que el compuesto ICJ1703-01 desdobra en dos picos de tiempos de retención 2,41 y 2,77 min. A 4,18 min eluye el ácido acetrizoico, a 5,30 min el ácido 3-nitrobenzoico, a 10,04 min el ICJ1704-01, a 15,14 min el ICJ1705-01 y a 22,25 min el cloruro de ICJ1704-01.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo analítico

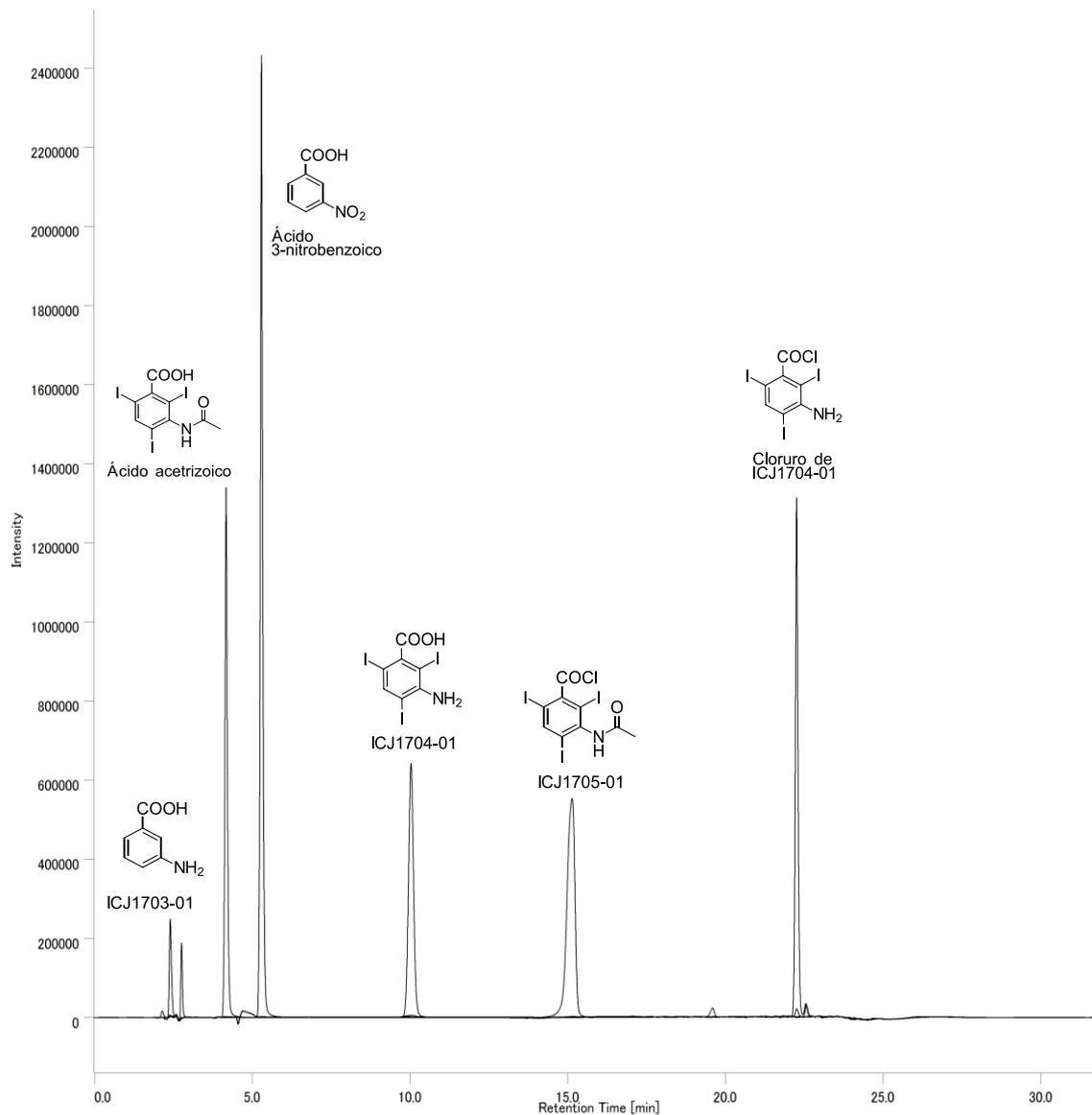


Figura 116: Cromatograma a 254 nm obtenido con el método de análisis 3.

Método 4

Se ha utilizado en el seguimiento de reacción para las etapas de formación del cloruro de ácido (Etapa 5), adición de la etilendiamina (Etapa 6) y adición del cloruro de cloroacetilo (Etapa 7), en las que intervienen los compuestos ICJ1705-01, el ácido acetrizoico, ICJ1706-01 e ICJ1706-02. Las condiciones analíticas son las siguientes:

- Tiempo: 33 minutos
- Temperatura de la columna: 30°C
- Gradiente:

Tabla 26: Gradiente para el método 4.

Tiempo (min)	%A	%B
0	90	10
3,00	90	10
15,00	0	100
23,00	90	10
33,00	90	10

- Columna: Luna 5 μ m C18(2) 100Å, 250 x 4,6 mm
- Fase móvil A: 100% 1,7 g/L Tetrabutilamonio en agua
- Fase móvil B: 100% Acetonitrilo
- Flujo: 1,0 mL/min
- Detección: UV (254 nm)

En el cromatograma obtenido con este método (Fig. 117) se puede observar que a un tiempo de retención de 7,74 min eluye el compuesto ICJ1706-01, a 11,19 min el compuesto ICJ1706-02, a 11,76 min el ácido acetrizoico y a 15,40 min el compuesto ICJ1705-01.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo analítico

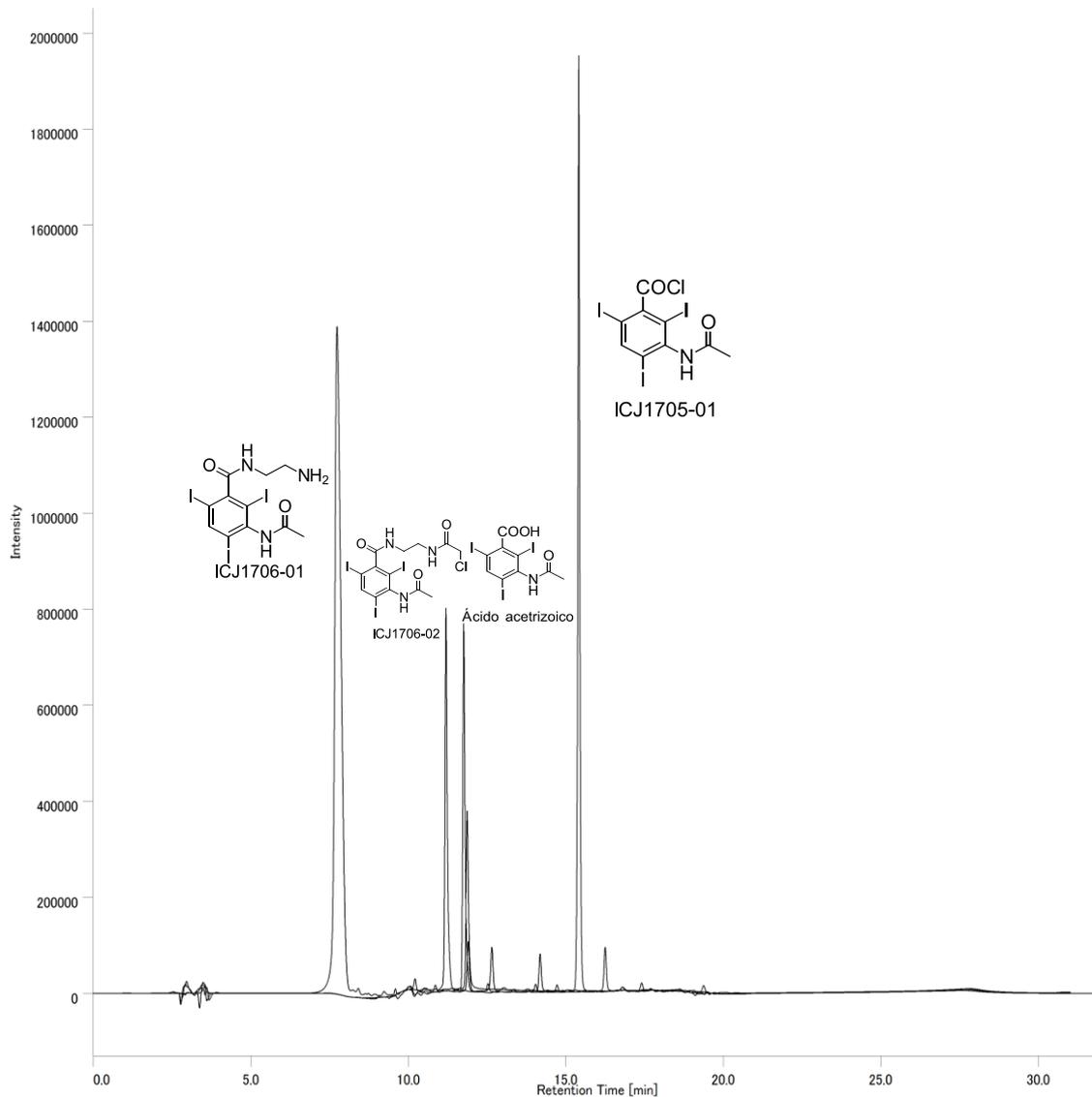


Figura 117: Cromatograma a 254 nm obtenido con el método de análisis 4.

Método 5

Se ha utilizado en el seguimiento de reacción para la etapa de adición de DO3A (Etapa 8), en la que intervienen los productos ICJ1706-02 e ICJ1707-01. Las condiciones analíticas son las siguientes:

- Tiempo: 30 minutos
- Temperatura de la columna: 30°C.
- Isocrático 82% Fase móvil A/ 18% Fase móvil B
- Columna: Luna 5µm C18(2) 100Å, 250 x 4,6 mm
- Fase móvil A: 100% 1,7 g/L Tetrabutilamonio en agua
- Fase móvil B: 100% Acetonitrilo
- Flujo: 1,0 mL/min
- Detección: UV (210 y 254 nm)

Con este método, el compuesto ICJ1707-01 eluye a un tiempo de retención de 3,57 min y el compuesto ICJ1706-02 eluye a un tiempo de retención de 22,75 min (Fig. 118).

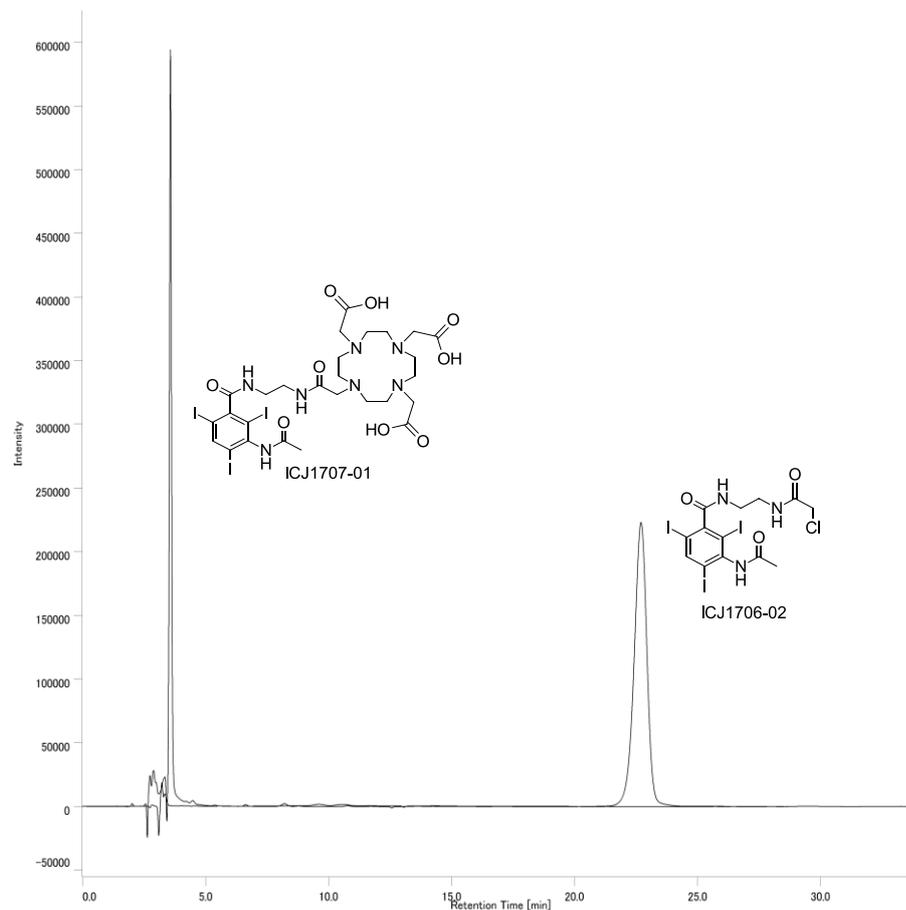


Figura 118: Cromatograma a 254 nm obtenido con el método de análisis 5.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo analítico

Método 6

Se ha utilizado en el seguimiento de reacción para la purificación del compuesto ICJ1707-01. Las condiciones analíticas son las siguientes:

- Tiempo: 30 minutos
- Temperatura de la columna: 30°C
- Isocrático 90% Fase móvil A/ 10% Fase móvil B
- Columna: Luna 5µm C18(2) 100Å, 250 x 4,6 mm
- Fase móvil A: 100% 1,7 g/L Tetrabutilamonio en agua
- Fase móvil B: 100% Acetonitrilo
- Flujo: 1,0 mL/min
- Detección: UV (210 y 254 nm)

En el cromatograma obtenido con este método (Fig. 119) se observa la presencia del compuesto ICJ1707-01 a un tiempo de retención de 7,78 min.

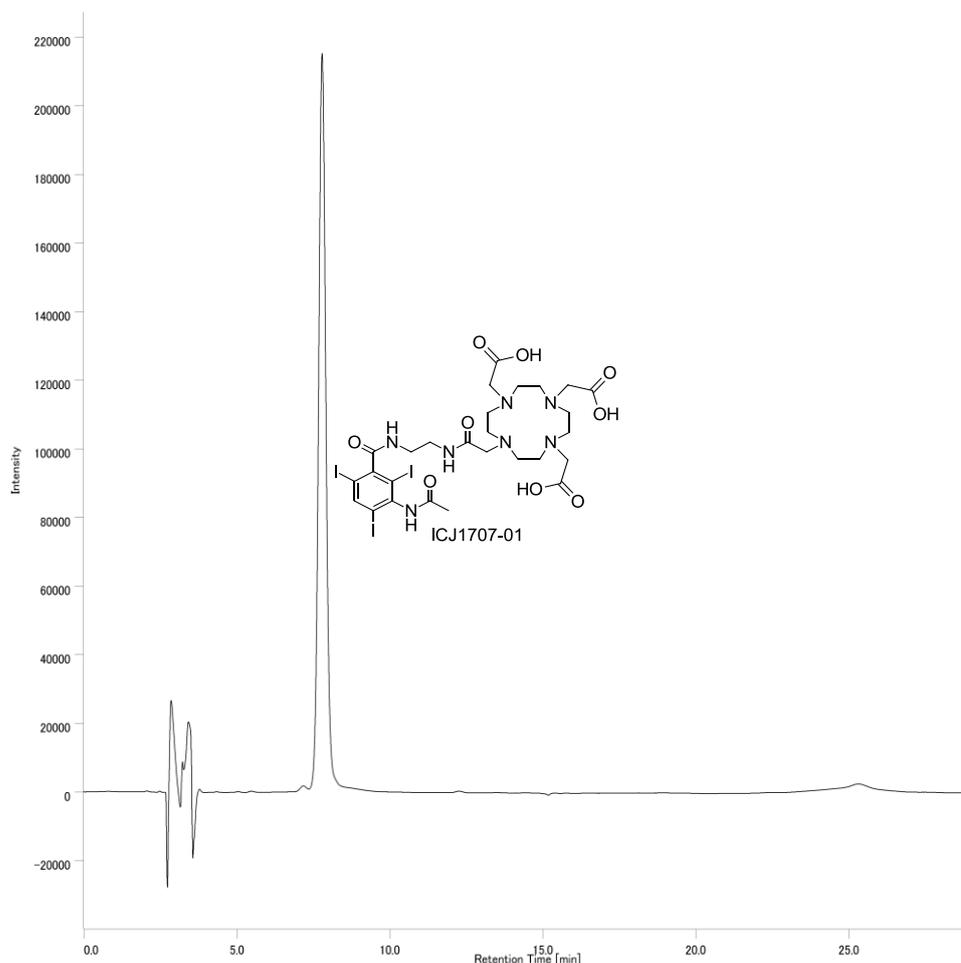


Figura 119: Cromatograma a 254 nm obtenido con el método de análisis 6.

Método 7

Se ha utilizado en el seguimiento de reacción para las etapas de purificación de ICJ1707-01 y la adición de los metales galio (Etapa 9a), gadolinio (Etapa 9b) y de europio (Etapa 9c), en las que intervienen los productos ICJ1707-01, ICJ1805-01, ICJ1901-01 e ICJ1911-01. Las condiciones analíticas son las siguientes:

- Tiempo: 30 minutos
- Temperatura de la columna: 30°C
- Isocrático 100% Fase móvil A
- Columna: Lichrosorb RP18-5 5µm, 250 x 4,6 mm
- Fase móvil A: 90% (K₂HPO₄ 5 mM CAS 7758-11-4 ajustado a pH 4,5) / 10% (octilamina 5 mM CAS 111-86-4 en acetonitrilo)
- Flujo: 1,5 mL/min
- Detección: UV (200 y 250 nm)

En el siguiente cromatograma se muestran los resultados obtenidos con este método (Fig.120). A un tiempo de retención de 5,10 min eluye el compuesto ICJ1805-01, a un tiempo de retención de 5,30 min el compuesto ICJ1911-01, a un tiempo de retención de 5,93 min el compuesto ICJ1901-01 y a un tiempo de retención de 13,76 min el compuesto ICJ1707-01.

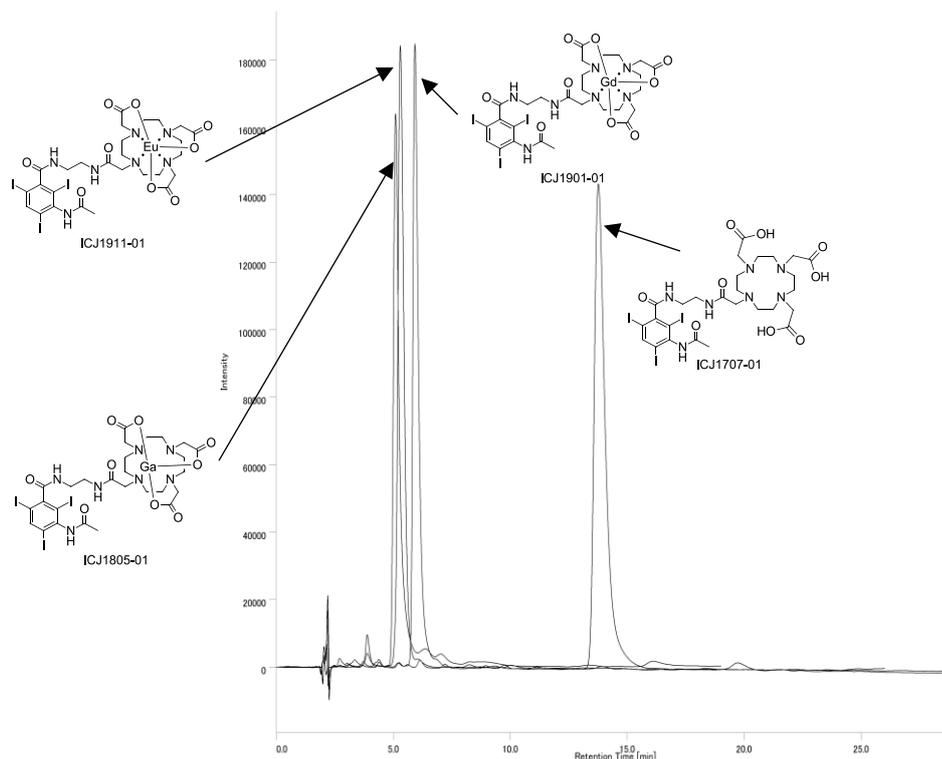


Figura 120: Cromatograma a 250 nm obtenido con el método de análisis 7.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo analítico

Método 7 DAD-FLD

Debido a que la presencia de gadolinio y europio produce una señal en el detector de fluorescencia, este método se ha utilizado en el seguimiento de reacción para las etapas de la adición de los metales gadolinio (Etapa 9b) y europio (Etapa 9c), en las que intervienen los compuestos ICJ1707-01, ICJ1805-01, ICJ1901-01 e ICJ1911-01. Las condiciones analíticas son las siguientes:

- Tiempo: 30 minutos
- Temperatura de la columna: 30°C
- Isocrático 100% Fase móvil A
- Columna: Lichrosorb RP18-5 5µm, 250 x 4,6 mm
- Fase móvil A: 90% (K₂HPO₄ 5 mM ajustado a pH 4,5) / 10% (octilamina 5 mM en acetonitrilo)
- Flujo: 1,5 mL/min
- Detección: UV (200 y 250 nm)
- Detección: Fluorimétrica (Ex: 253 nm/Em: 313 nm)

A continuación, se pueden observar los resultados obtenidos con este método, donde a un tiempo de retención de 6,10 min eluye el compuesto ICJ1901-01 y a 16,67 min eluye el compuesto ICJ1707-01. En el caso de los compuestos que no tienen gadolinio y/o europio en su estructura, el cromatograma obtenido con el detector de fluorescencia no presenta ninguna señal identificativa. Sin embargo, la presencia de gadolinio y/o europio en los compuestos origina una señal en el detector de fluorescencia que coincide con el tiempo de retención de los compuestos en el cromatograma obtenido con el detector DAD (Fig. 121 y 122).

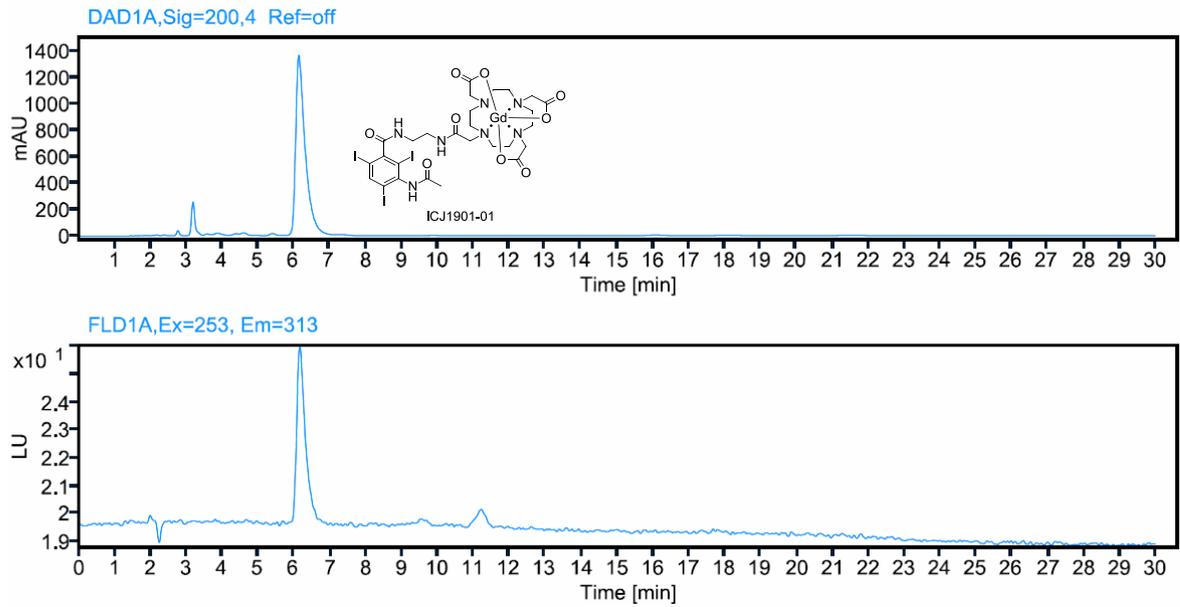


Figura 121: Cromatograma del ICJ1901-01 a 250 nm en el detector DAD y en el detector de fluorescencia según el método de análisis 7 DAD-FLD.

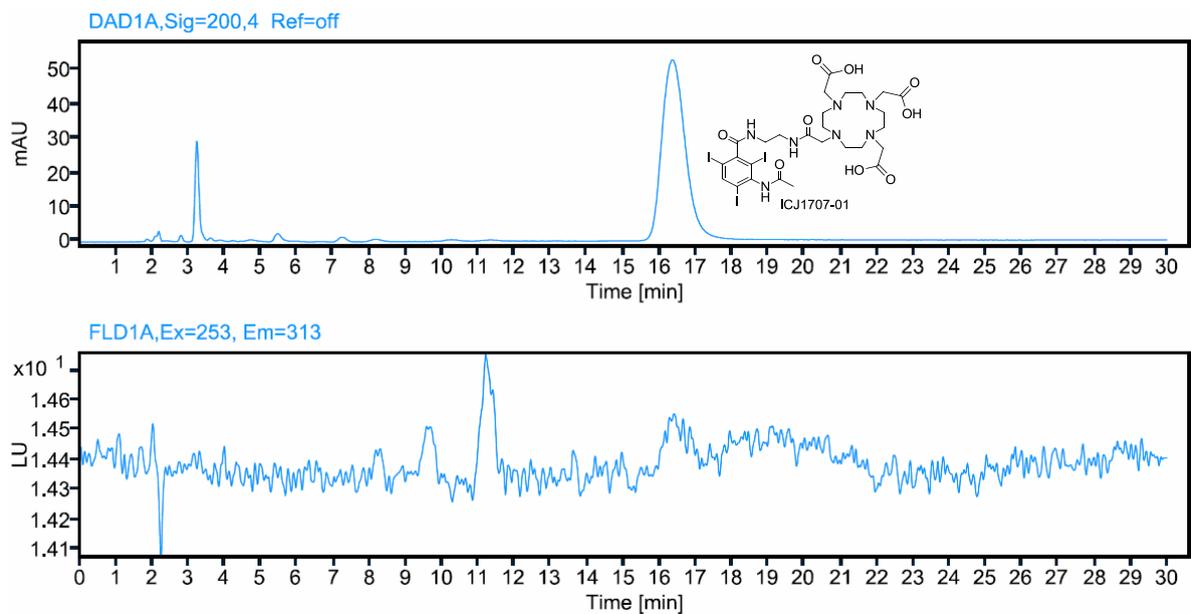


Figura 122: Cromatograma del ICJ1707-01 a 200 nm en el detector DAD y en el detector de fluorescencia según el método de análisis 7 DAD-FLD.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo analítico

Método 7 DAD-Radiactividad

En presencia de un metal radiactivo como es el galio-68 en el compuesto ICJ1805-01, se produce una señal en el detector de radiactividad. Por esta razón, este método se ha utilizado en el seguimiento de reacción para la etapa de marcaje radiactivo de ICJ1707-01, en la que intervienen los compuestos ICJ1707-01 e ICJ1805-01. Las condiciones analíticas son las siguientes:

- Tiempo: 30 minutos
- Temperatura de la columna: 30°C.
- Isocrático 100% Fase móvil A
- Columna: Lichrosorb RP18-5 5µm, 250 x 4,6 mm
- Fase móvil A: 90% (K₂HPO₄ 5 mM ajustado a pH 4,5) / 15% (octilamina 5 mM en acetonitrilo)
- Flujo: 1,5 mL/min
- Detección: UV (200 y 250 nm)
- Detección: Radiactividad (Berthold LB503/ constante de tiempo 3 s/ escala 1Mcps)

A continuación, se muestran los cromatogramas obtenidos con los diferentes detectores utilizados para cada compuesto. En este caso, para el compuesto ICJ1707-01 (tr: 12,4 min) se observa una señal en el detector DAD, pero no en el detector de radiactividad (Fig. 123).

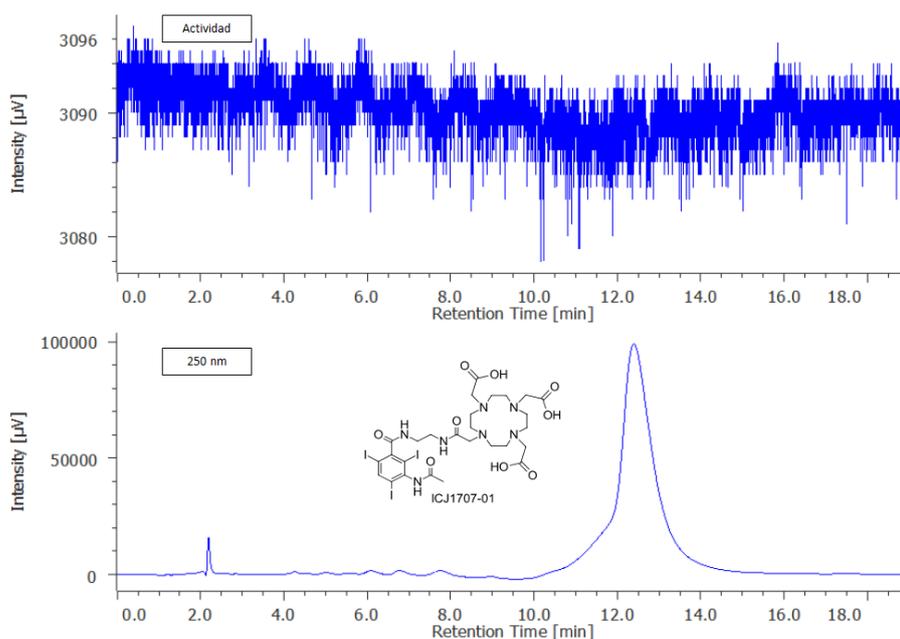


Figura 123: Cromatograma del ICJ1707-01 a 250 nm en el detector DAD y en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.

Para el compuesto ICJ1805-01 (tr:5,5min), que tiene galio natural sin actividad (galio frío), se observa una señal en el detector DAD, pero, igual que ocurría en el caso anterior, tampoco se obtiene señal en el detector de radiactividad (Fig. 124).

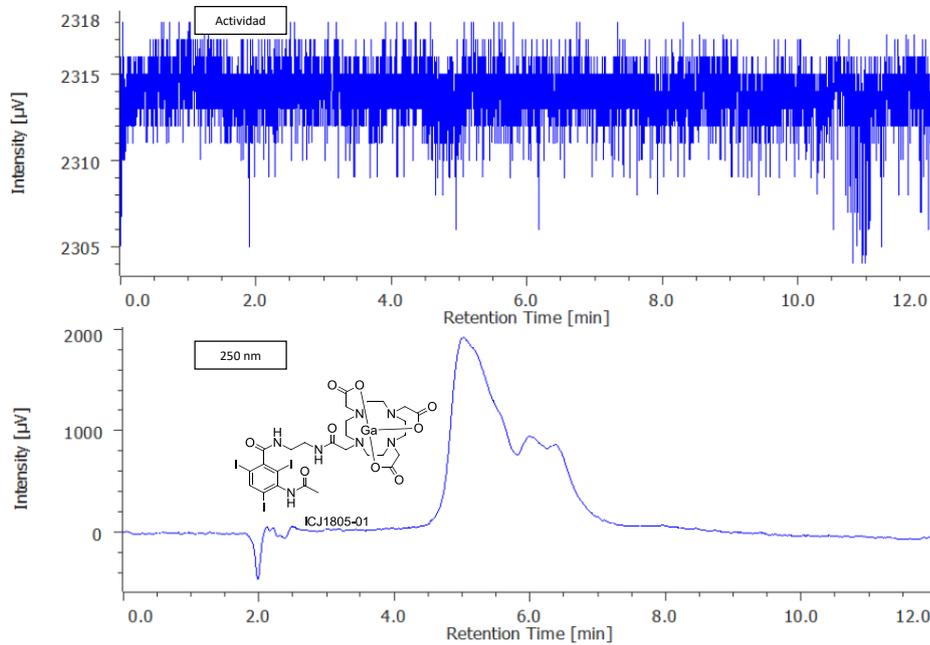


Figura 124: Cromatograma del ICJ1805-01 a 250 nm en el detector DAD y en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.

En cambio, para el compuesto ICJ1805-01 (tr:5,8) que tiene galio-68 procedente de una reacción de marcaje, solo se observa señal en el detector de radiactividad debido a la presencia de galio-68 pero no en el detector DAD ya que se forma una cantidad realmente pequeña del producto (Fig. 125).

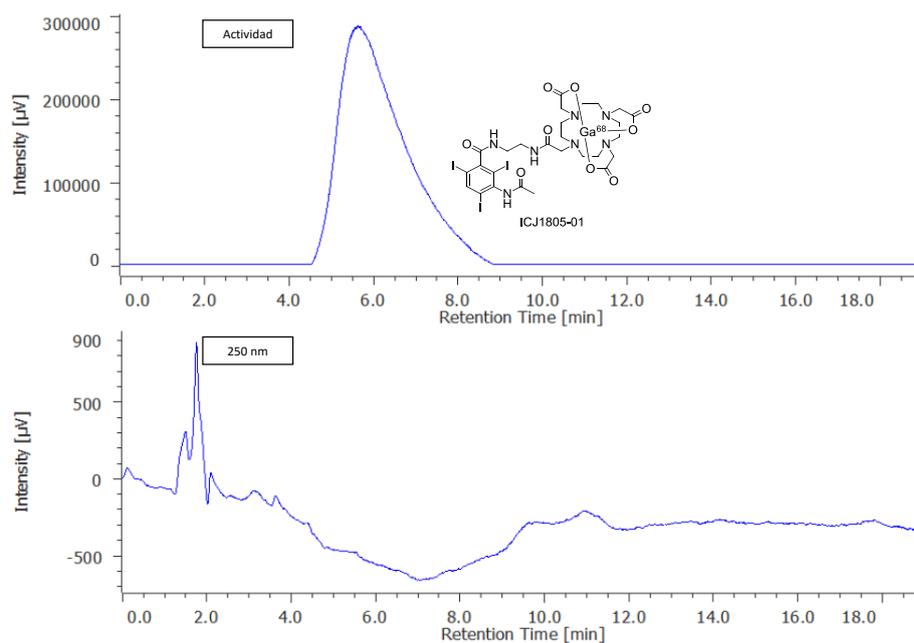


Figura 125: Cromatograma del compuesto ICJ1805-01 con ^{68}Ga a 250 nm en el detector DAD y en el detector de radiactividad utilizando el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo analítico

Por lo tanto, una mezcla de los productos ICJ1707-01, ICJ1805-01 con galio frío e ICJ1805-01 con galio-68 presenta el siguiente perfil cromatográfico (Fig. 126), en el que se observa una señal en el detector de radiactividad por la presencia del galio-68 y en el detector DAD debido al resto de los compuestos que absorben en el ultravioleta.

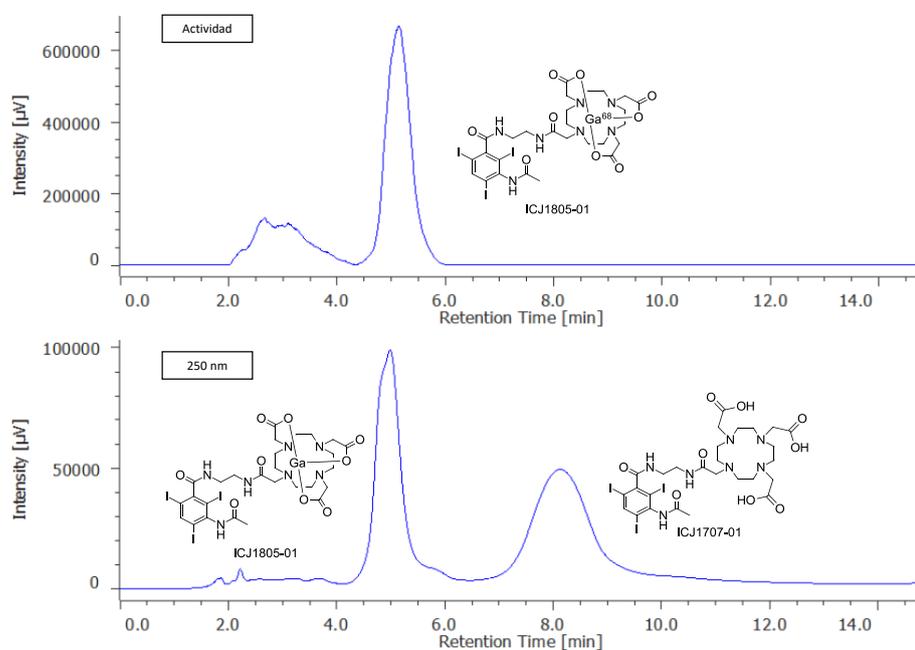


Figura 126: Cromatograma de la mezcla de los compuestos ICJ1707-01 e ICJ1805-01 con ^{68}Ga y Ga "frío" a 250 nm en el detector DAD y en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.

Síntesis, purificación y caracterización espectroscópica

La síntesis orgánica de los compuestos objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral supone una de las etapas más laboriosas, pero a la vez más esenciales, en el desarrollo de este trabajo.

El comienzo de esta etapa se remonta a la búsqueda bibliográfica inicial en la que se buscaba esclarecer cuáles eran los compuestos idóneos a sintetizar, teniendo en cuenta los objetivos descritos en el capítulo de HIPÓTESIS Y OBJETIVOS con la premisa de que dichos compuestos pudieran ser utilizados como medios de contraste en varias técnicas del campo del diagnóstico por imagen.

Una vez elegidos los cabezas de serie de la lista de compuestos a sintetizar, nos centramos en la síntesis de un producto formado por una parte con estructura aromática con tres átomos de yodo, que es un derivado del ácido 3-nitrobenzoico o el ácido acetrizoico; y otra parte con un quelato de un macrociclo, en este caso derivado del DO3A (CAS 114873-37-9) con un metal como galio o un metal de transición como gadolinio o europio. Estas dos partes se unen por medio de un espaciador que es un derivado de etilendiamina (CAS 107-15-3) y cloruro de cloroacetilo (CAS 79-04-9).

Existe una gran diversidad de rutas sintéticas que se pueden seguir para la obtención de los compuestos cabezas de serie elegidos; pero es importante realizar una elección que simplifique el proceso, reduciendo los procesos de purificación, maximizando el rendimiento. Para tomar esta decisión tan crítica se ha realizado una extensa búsqueda bibliográfica, tanto en bases de datos científicas, como en la documentación histórica de la investigación realizada en las instalaciones de Justesa Imagen S.A.U. De esta manera, la ruta sintética seleccionada que se abordará en el presente trabajo y que se describe detalladamente a continuación es la incluida en el apartado de MATERIALES Y MÉTODOS (Fig. 92).

En esta ruta sintética existe la posibilidad de utilizar varios productos de partida, pero en este caso se ha realizado utilizando el ácido 3-nitrobenzoico y el ácido acetrizoico. El proceso consta de 9 etapas en total que se han estudiado y llevado a cabo en las instalaciones de Justesa Imagen S.A.U.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis, purificación y caracterización espectroscópica

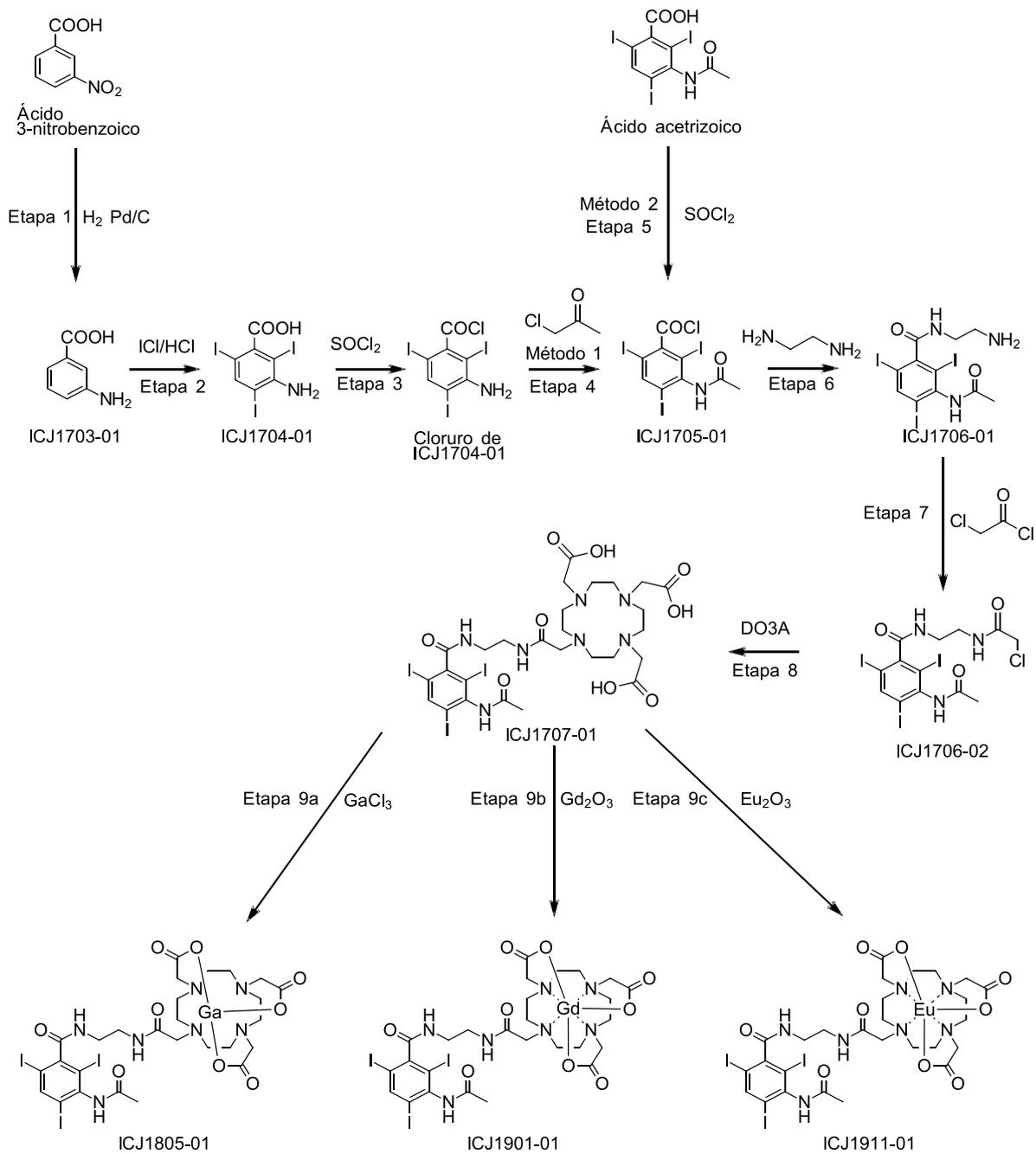


Figura 92: Esquema sintético

-
- **Etapa 1:** Hidrogenación del ácido 3-nitrobenzoico hasta llegar al ácido 3-aminobenzoico. Esta reacción se lleva a cabo en medio acuoso en presencia de catalizador Pd/C a una presión de H₂ de 3,4 bares.
 - **Etapa 2:** Yodación del ácido 3-aminobenzoico. Esta reacción se lleva a cabo en medio acuoso en presencia de una disolución de monoclورو de yodo (CAS 7790-99-0) estabilizada con ácido clorhídrico.
 - **Etapa 3:** Formación del cloruro de ácido. Esta reacción se lleva a cabo en acetato de etilo (CAS 141-78-6) y se utiliza como reactivo cloruro de tionilo (CAS 7719-09-7).
 - **Etapa 4:** Acetilación. Esta reacción se lleva a cabo en *N,N*-dimetilacetamida (CAS 127-19-5) y se utiliza como reactivo cloruro de acetilo (CAS 75-36-5). El aislamiento del producto obtenido se realiza en medio acuoso.
 - **Etapa 5:** Formación del cloruro de ácido del ácido acetrizoico. Esta reacción se lleva a cabo en acetato de etilo y se utiliza como reactivo cloruro de tionilo.
 - **Etapa 6:** Adición de etilendiamina. Esta reacción se lleva a cabo en acetato de etilo y se utiliza como reactivo etilendiamina. El aislamiento del producto obtenido se realiza en medio acuoso.
 - **Etapa 7:** Adición de cloruro de cloroacetilo. Esta reacción se lleva a cabo en *N,N*-dimetilacetamida en presencia de trietilamina (CAS 121-44-8) y se utiliza como reactivo cloruro de cloroacetilo. El aislamiento del producto se realiza en medio acuoso.
 - **Etapa 8:** Adición del DO3A. Esta reacción se lleva a cabo en *N,N*-dimetilacetamida-agua.
 - **Etapa 9a:** Quelación con galio. Esta reacción se lleva a cabo en medio acuoso utilizando como reactivo cloruro de galio (CAS 13450-90-3).
 - **Etapa 9b:** Quelación con gadolinio. Esta reacción se lleva a cabo en medio acuoso y se utiliza como reactivo óxido de gadolinio (CAS 12064-62-9).
 - **Etapa 9c:** Quelación con europio. Esta reacción se lleva a cabo en medio acuoso y se utiliza como reactivo óxido de europio (CAS 1308-96-9).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis, purificación y caracterización espectroscópica

El proceso sintético que se ha llevado a cabo ha permitido obtener unos productos intermedios con la pureza suficiente para poder conseguir unos productos finales con una pureza elevada, capaces de cumplir las características necesarias para poder ser administrados y utilizados en el estudio de su aplicabilidad como medios de contraste para el campo del diagnóstico por imagen.

- Síntesis de ICJ1703-01:

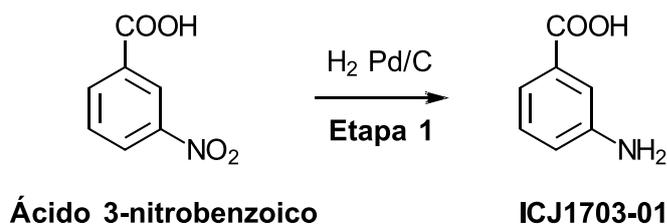


Figura 127: Reacción etapa 1

Se disuelven 31,8 g de carbonato sódico en 500 mL de agua a 45°C. Se añaden poco a poco 150 g de ácido 3-nitrobenzoico y la mezcla se calienta a 55°C. Se ajusta el pH entre 5,0 y 5,5 con HCl 5%. Posteriormente, se realiza la hidrogenación en el reactor manteniendo una presión de hidrógeno de 3-4 bares y una temperatura límite de 90°C. Después de registrar estos valores, se puede controlar la reacción, observando su finalización a los 75 minutos. Como se puede ver en la siguiente figura, el final de la reacción queda determinado por un incremento de la presión (debido al cese de consumo de H₂) y un descenso de la temperatura (Fig. 128).

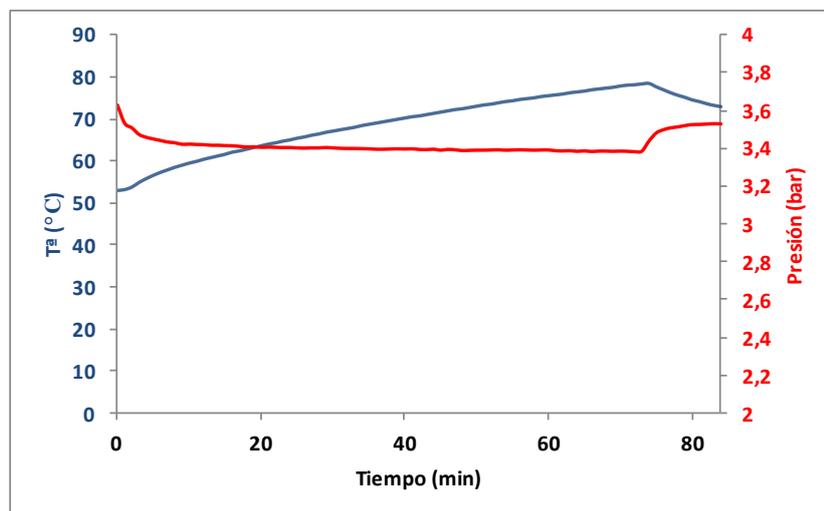
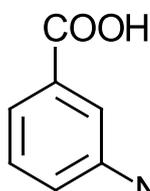


Figura 128: Evolución del proceso de hidrogenación

Una vez que la reacción ha finalizado, se filtra la disolución a través de una membrana con un tamaño de poro de 0,45 μm y, posteriormente, se precipita con ácido sulfúrico concentrado hasta pH 1 muy despacio a 65°C. Según va bajando el pH, se aprecia la aparición del precipitado del ácido 3-aminobenzoico (ICJ1703-01). Se deja enfriar el producto y finalmente se filtra, lavándolo con 500 mL de agua ácida. Se obtiene un rendimiento de un 90%.

ICJ1703-01: Ácido 3-aminobenzoico

¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8,66 (bs, 3H, COOH, NH₂); 7,62-7,59 (m, 2H, H-Ph); 7,42-7,39 (m, H, H-Ph); 7,28-7,26 (m, H, H-Ph).



¹³C RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 167,1 (COOH); 139,3 (C-NH₂); 132,0 (C-COOH); 129,8 (CH-Ph); 124,0 (CH-Ph); 123,8 (CH-Ph); 120,1 (CH-Ph).

IR (ATR): 2600-3100, 1688, 1315, 1288, 1067, 891, 752 cm⁻¹.

p.f.: 229,9°C.

ESI-MS (m/z): (ES+) 138 [M+H]⁺, 139 [M+2H]²⁺. (ES-) 136 [M-H]⁻.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis, purificación y caracterización espectroscópica

- Síntesis de ICJ1704-01:

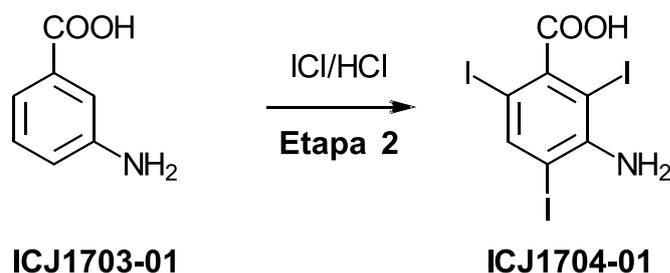


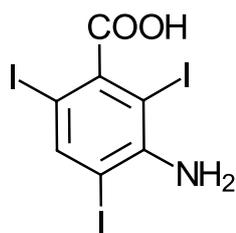
Figura 129: Reacción etapa 2

Se disuelven 53,2 g de ICJ1703-01 en 250 mL de agua y se ajusta el pH a 7,0 con carbonato sódico. Se prepara en un reactor una cama ácida con 1 L de agua y 30,27 mL de HCl concentrado. Posteriormente, se realiza una adición simultánea de las dos corrientes durante una hora; una es la disolución de ICJ1703-01 y la otra es solución yodante que está formada por monoclóruo de yodo estabilizado con ácido clorhídrico. A los 4 minutos de la adición, se comienza a apreciar como cristaliza el ácido 3-amino-2,4,6-triyodobenzoico (ICJ1704-01) y sus derivados. Después de una noche a reflujo para conseguir una yodación total, se enfría a temperatura ambiente. Se añade bisulfito sódico (CAS 7631-90-5) hasta que se aclaran las aguas. Posteriormente, se filtra y el sólido filtrado se lava con tres porciones de 30 mL de agua. Se observan un 3% de impurezas que resultan ser productos subyodados, por lo que se procede a purificar.

Para la purificación de ICJ1704-01, se disuelven 22,69 g de bicarbonato sódico (CAS 144-55-8) en 300 mL de agua y se adiciona el producto en agitación, hasta que se consigue una disolución total. Se añade una espátula de bisulfito sódico junto con un 1% de carbón en polvo y se mantiene agitando durante media hora a 50°C. Después, se enfría a temperatura ambiente y se filtra por papel y por 0,45 μm . Se precipita con HCl concentrado hasta que el pH está por debajo de 1,0, se enfría a temperatura ambiente, se filtra y se seca a vacío. Se obtiene un rendimiento de un 60% correspondiente al proceso global de reacción y purificación.

ICJ1704-01: Ácido 3-amino-2,4,6-triyodobenzoico

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 13,68 (bs, H, COOH); 7,99 (s, H, H-Ph); 5,39 (bs, 2H, NH_2).



$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 172,9 (COOH); 150,6 (C- NH_2); 150,5 (C-COOH); 149,5 (CH-Ph); 85,5 (C-Ph); 82,0 (C-Ph); 77,7 (C-Ph).

IR (ATR): 3329, 1701, 1649, 1597, 1520, 1422, 1379, 1304, 1265, 953, 872, 733 cm^{-1} .

p.f.: 196,2°C

ESI-MS (m/z): (ES^+) 516 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 517 [$\text{M}+2\text{H}$] $^{2+}$, 538 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

- Síntesis del cloruro de ácido de ICJ1704-01:

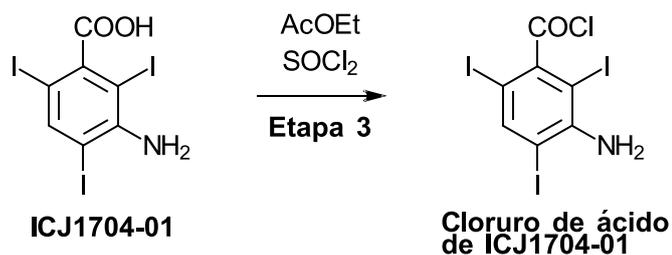


Figura 130: Reacción etapa 3

Se disuelven 5 g de ICJ1704-01 en 25 mL de acetato de etilo a temperatura ambiente. Se añaden 1,5 mL de cloruro de tionilo durante 30 minutos. Después se destila el exceso de cloruro de tionilo y acetato de etilo hasta que comienza a aparecer un precipitado de color marrón sin llegar a sequedad. Se filtra el sólido obtenido y se seca a vacío; se obtiene un rendimiento de un 80%.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis, purificación y caracterización espectroscópica

- Síntesis de ICJ1705-01:

- Ruta desde ácido 3-nitrobenzoico (método 1):

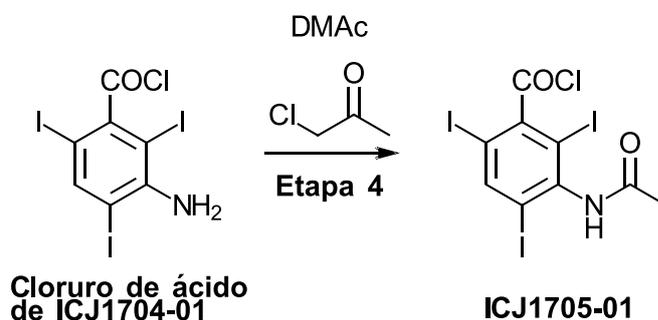


Figura 131: Reacción etapa 4

Se disuelven 4 g del cloruro de ácido formado anteriormente en 3,2 mL de *N,N*-dimetilacetamida a temperatura ambiente. Se va añadiendo durante media hora una disolución de 1,13 mL de cloruro de acetilo en 2,5 mL de *N,N*-dimetilacetamida. Una vez finalizada la adición se deja agitando durante media hora. Para aislar el producto acetilado (ICJ1705-01), se añade gota a gota sobre una cama de agua/hielo de 90 mL. Posteriormente, se filtra y se lava con tres porciones de 40 mL de agua. Una vez seco se obtiene un rendimiento de un 70%.

- Ruta desde el ácido acetrizoico (método 2):

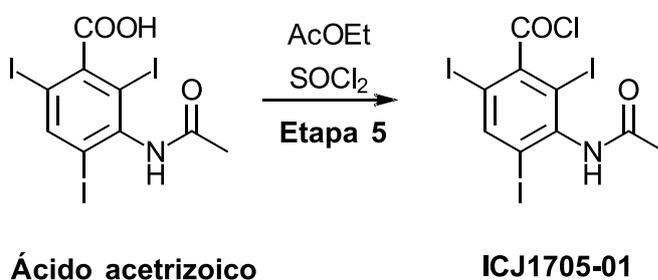
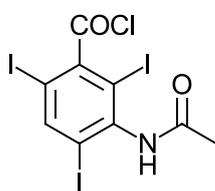


Figura 132: Reacción etapa 5

Se disuelven 20 g del ácido acetrizoico en 200 mL de acetato de etilo a 25 °C. Se calienta a reflujo y se añaden 7 mL de cloruro de tionilo durante media hora. Se deja agitando hasta que la reacción se da por finalizada al ver una completa conversión en la formación del cloruro de ácido (ICJ1705-01) por HPLC. Posteriormente, se destilan 150 mL, se añaden 100 mL de acetato de etilo y se destilan 100 mL para asegurar la eliminación del exceso de cloruro de tionilo. Se añaden 150 mL de *N,N*-dimetilacetamida. Este producto se utiliza sin aislar en la siguiente etapa.

ICJ1705-01: Cloruro de 3-acetilamino-2,4,6-triyodobenzoilo

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10,02 (bs, H, NH); 8,46 (s, H, H-Ph); 2,04 (s, 3H, CH₃).



¹³C RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 172,9 (COCl); 172,4 (CONH); 151,4 (C-NH); 150,6 (C-COCl); 150,0 (CH-Ph); 108,3 (C-Ph); 105,1 (C-Ph); 102,2 (C-Ph); 26,1 (CH₃).

IR (ATR): 3231, 1776, 1661, 1501, 1412, 1339, 1277, 1026, 986, 876, 822,

754, 714 cm⁻¹

p.f.: 199,1°C.

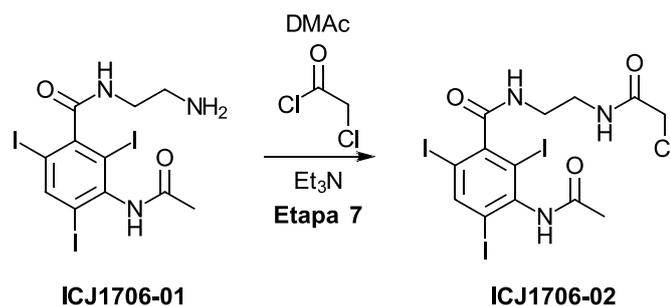
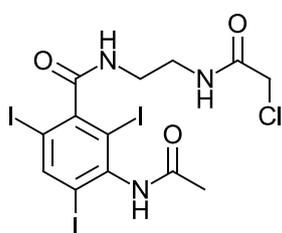
- Síntesis de ICJ1706-02:

Figura 134: Reacción etapa 7

Se suspenden 13,31 g del producto ICJ1706-01 en 130 mL de *N,N*-dimetilacetamida a temperatura ambiente. Se añaden 2,72 mL de trietilamina y se calienta a 70°C. Se añaden 2,66 mL de cloruro de cloroacetilo durante media hora en tres porciones. Posteriormente, se deja agitando hasta la total disolución y conversión seguida por HPLC. Posteriormente, se añade el producto sobre 150 mL de agua. Se deja enfriando durante toda una noche, se filtra y se seca a vacío. Finalmente se obtiene un rendimiento del 78 %.

ICJ1706-02: 1-[2-(3-acetilamino-2,4,6-triyodobenzoilamino)aminoetil]-2-cloro-1-etanona

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 9,90 (bs, H, NH); 8,61 (bs, H, NH); 8,31 (s, H, H-Ph); 8,17 (bs, H, NH); 4,07-4,03 (m, 2H, CH₂); 3,34-3,32 (m, 4H, 2CH₂); 2,01 (s, 3H, CH₃).



$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 172,2 (CONH); 171,3 (CONH); 170,9 (CONH); 152,8 (C-Ph); 149,9 (CH-Ph); 146,0 (C-Ph); 104,4 (C-Ph); 103,9 (C-Ph); 95,9 (C-Ph); 45,8 (CH₂); 44,4 (CH₂); 43,2 (CH₂); 26,0 (CH₃).

IR (ATR): 3231, 1649, 1549, 1501, 1412, 1236, 866, 833 cm^{-1} .

p.f.: 266,5°C

ESI-MS (m/z): (ES⁺) 676 [M]⁺, 677 [M+H]⁺, 678 [M+2H]²⁺. (ES⁻) 674 [M-2H]²⁻, 675 [M-H]⁻.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis, purificación y caracterización espectroscópica

- Síntesis de ICJ1707-01:

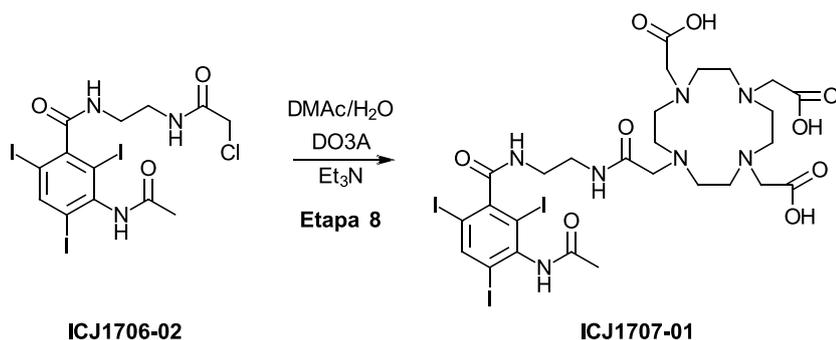


Figura 135: Reacción etapa 8

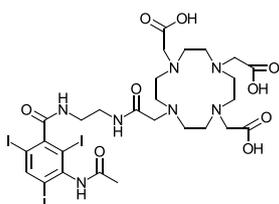
Se disuelven 11,69 g del producto ICJ1706-02 en 110 mL de *N,N*-dimetilacetamida a temperatura ambiente. Se añaden 1,83 mL de trietilamina y se calienta la disolución a 50°C. Se añaden 10,02 g de DO3A en forma trisódica y se deja agitando durante 12 horas. El DO3A no llega a disolverse; por lo tanto, se añade agua poco a poco hasta que se tiene una disolución. Una vez que por HPLC se ha comprobado que la reacción ha finalizado totalmente con éxito, se destila el agua y la *N,N*-dimetilacetamida. Se añade más agua y se vuelve a destilar la mezcla. Este proceso se repite varias veces para minimizar la cantidad de *N,N*-dimetilacetamida en la mezcla. Posteriormente, se filtra por 0,45 μm y por 0,22 μm .

En la mezcla está el producto obtenido en forma trisódica, además de sales que hay que eliminar. Para ello se utiliza la técnica de nanofiltración a volumen constante llevando la disolución a un volumen de 1 L y ajustando el pH entre 4,0 y 4,5 con ácido clorhídrico concentrado. Después de 10 vueltas se han eliminado las impurezas y las sales.

Para aislar el producto, se evapora el disolvente hasta casi sequedad, se añaden 200 mL de acetona (CAS 67-64-1) y se calienta a reflujo durante 2 horas. Después se deja enfriar y precipita un sólido blanco, que tras dejarlo enfriar se filtra. Se obtiene un 84 % de rendimiento.

ICJ1707-01: ácido {10-{2-[2-(3-acetilamino-2,4,6-triyodobencilamino) aminoetil]-2-oxoetil}-1,4,7,10-tetraaza-1-ciclododecil}-1,4,7 triacético

¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10,05 (bs, H, COOH); 9,98 (bs, 2H, 2COOH); 9,90 (bs, H, NH); 8,58 (bs, H, NH); 8,42 (bs, H, NH); 8,30 (s, H, H-Ph); 3,70-3,51 (m, 8H, 4CH₂); 3,41-2,84 (m, 20H, 10 CH₂); 1,97 (s, 3H, CH₃).



¹³C RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 172,2 (CONH); 171,3 (CONH); 170,9 (CONH); 152,8 (C-Ph); 149,9 (CH-Ph); 146,0 (C-Ph); 104,4 (C-Ph); 103,9 (C-Ph); 95,9 (C-Ph); 45,8 (CH₂); 44,4 (CH₂); 43,2 (CH₂); 26,0 (CH₃).

IR (ATR): 1632, 1362, 1221, 1084, 1045, 880, 779 cm⁻¹.

p.f.: 233,2°C.

ESI-MS (m/z): (ES⁺) 986 [M+H]⁺, 987 [M+2H]²⁺, 988 [M+3H]³⁺.

AE Calculado: 30,89 %C 4,57 %H 9,01 %N

Hallado: 30,99 %C 4,23 %H 8,70 %N

Pureza por HPLC >99% según método 7 (Fig. 136)

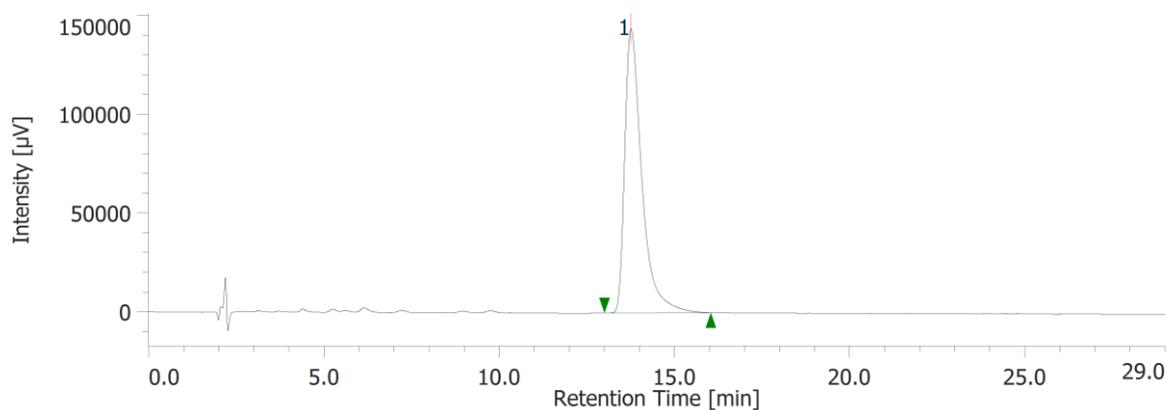


Figura 136: Cromatograma del producto final ICJ1707-01 a 250 nm obtenido con el método de análisis 7.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis, purificación y caracterización espectroscópica

- Síntesis de ICJ1805-01:

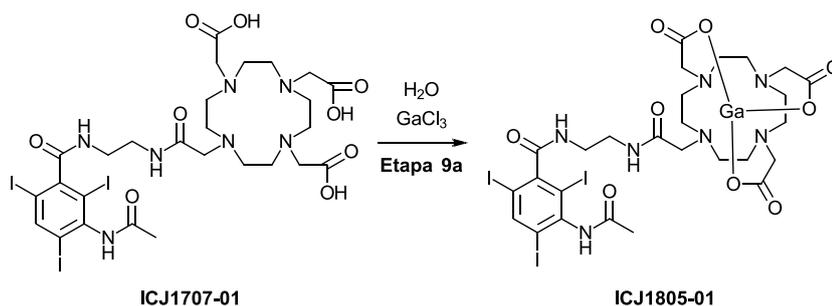
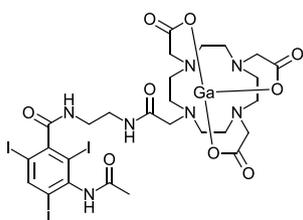


Figura 137: Reacción etapa 9a

Se disuelven 12,43 g del compuesto ICJ1707-01 en 125 mL de agua y se calienta a 80°C. Se añaden 2,67 g de cloruro de galio y se va siguiendo la reacción por HPLC por si se necesita hacer alguna adición de cloruro de galio (debido a la baja estabilidad del cloruro de galio en medio acuoso). Una vez completada la conversión al compuesto ICJ1805-01, se enfría a temperatura ambiente y precipita un sólido algodonoso que no filtra bien. Después de filtrarlo y 0,45 µm se lleva el volumen a 1 L, se calienta la disolución a 50°C y se purifica por tratamiento con resinas, empleando IRA-67 (CAS 65899-87-8) e IR-120 (CAS 68441-33-8). Se destila hasta casi sequedad y se le añaden 100 mL de etanol anhidro (CAS 64-17-5). Posteriormente, se destila casi a sequedad la mezcla azeotrópica con el fin de eliminar el agua y, para asegurar que la eliminación es prácticamente total, se vuelven a añadir 100 mL de etanol anhidro repitiendo la destilación hasta llegar casi a sequedad. Posteriormente, se añaden 130 mL de acetona en caliente y se va dejando enfriar poco a poco observándose un precipitado blanco. Una vez llegado a temperatura ambiente, se filtra y se seca el sólido a vacío. Se obtiene un rendimiento de un 80%.

ICJ1805-01: {10-{2-[2-(3-acetilamino-2,4,6-triyodofenilamino) aminoetil]-2-oxoetil}-1,4,7,10-tetraaza-1-ciclododecil}-1,4,7-triacetato de galio (3+)-k01,k04,k07

$^1\text{H RMN}$ (500 MHz, D_2O) δ : 8,52 (s, H, H-Ph); 3,98-3,46 (m, 12H, 6 CH_2); 3,45 (s, 6H, 3 CH_2); 3,44-3,06 (m, 10H, 5 CH_2); 2,21 (s, 3H, CH_3).



$^{13}\text{C RMN}$ (125 MHz, D_2O) δ : 175,0 (CO); 174,5 (CO); 173,6 (CO); 173,5 (CO); 172,5 (CO); 168,6 (CO); 148,8 (CH-Ph); 147,9 (C-Ph); 141,6 (C-Ph); 100,1 (C-Ph); 96,9 (C-Ph); 91,4 (C-Ph); 63,3 (CH_2); 61,8 (CH_2); 59,4 (3 CH_2); 57,3 (CH_2); 57,2 (CH_2); 55,9 (2 CH_2); 54,6 (2 CH_2); 53,9 (2 CH_2); 44,8 (CH_2); 22,1 (CH_3).

COSY, HMQC y HMBC- Confirman la estructura buscada

IR (ATR): 1651, 1558, 1539, 1520, 1310, 1082, 922, 729 cm^{-1}

p.f.: 287,9°C

ESI-MS (ES^+) 1054 [$M+2\text{H}$] $^{2+}$, 1055 [$M+3\text{H}$] $^{3+}$, 1056 [$M+4\text{H}$] $^{4+}$. (ES^-) 1050 [$M-2\text{H}$] $^{2-}$, 1051 [$M-\text{H}$] $^-$, 1052 [M] $^-$.

AE Calculado: 30,37 %C 3,73 %H 8,85 %N

Hallado: 30,32 %C 4,31 %H 9,18 %N

Pureza por HPLC >99% según método 7 (Fig. 138)

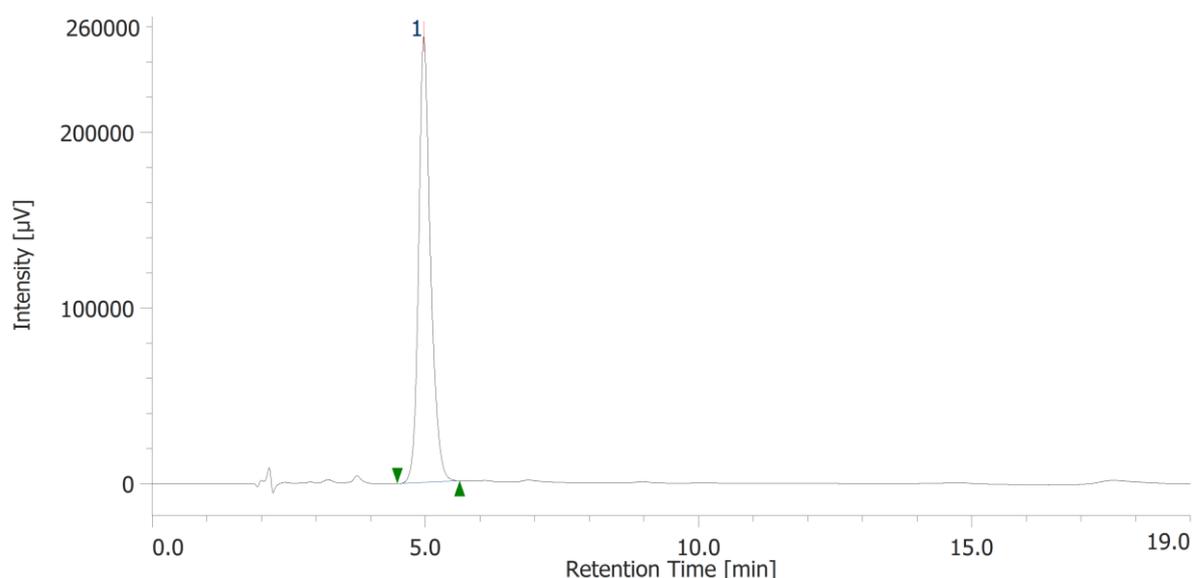


Figura 138: Cromatograma del producto final ICJ1805-01 a 250 nm obtenido con el método de análisis 7.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis, purificación y caracterización espectroscópica

- Síntesis de ICJ1901-01:

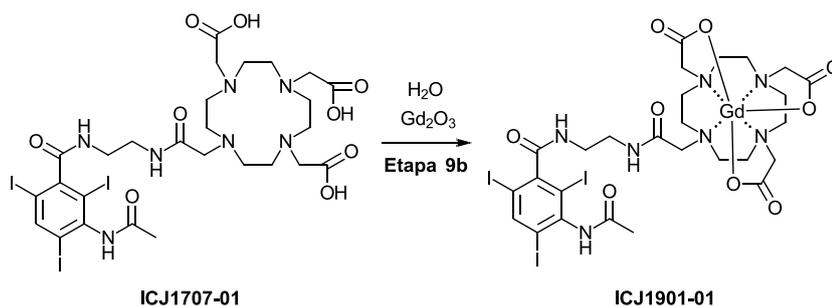


Figura 139: Reacción etapa 9b

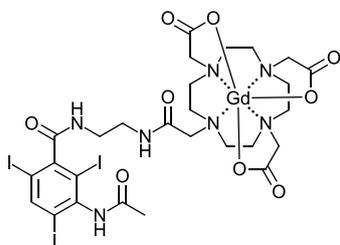
Se disuelven 4,5 g de ICJ1707-01 en 45 mL de agua. Se calienta la disolución a 80°C y se añaden 0,84 g de óxido de gadolinio. Se mantiene el pH entre 4,0 y 4,5 con ácido clorhídrico concentrado y se mantiene la reacción a 80°C hasta la completa transformación, verificando por HPLC. Una vez finalizada la reacción, teniendo únicamente el producto ICJ1901-01, se realiza un tratamiento de purificación con resinas por agitación, empleando IRA-67 e IR-120. Una vez que se han eliminado las sales e impurezas, se elimina el disolvente hasta sequedad, se añaden 5 mL de agua, se calienta la disolución a 90°C y se añaden 100 mL de etanol anhidro. Posteriormente, se destila casi a sequedad la mezcla azeotrópica para eliminar el agua y, para asegurar que la eliminación es casi total, se añaden otros 100 mL de etanol anhidro y se vuelve a destilar casi a sequedad. Posteriormente, se añaden en caliente 140 mL de acetona y después de mantener agitando durante 2 horas, se deja enfriar toda la noche. Se filtra un sólido blanco que se seca en la estufa. Se obtiene de esta manera un 63% de rendimiento.

Para recuperar parte del producto de las aguas madres de filtración, se elimina el disolvente hasta casi sequedad y en caliente se añaden 60 mL de acetona. Se deja enfriar el producto obtenido, se filtra y después de secar a vacío se obtiene un sólido blanco de las mismas características que el anterior. Se recupera un 28% adicional, teniendo un rendimiento global en esta etapa de un 91%.

ICJ1901-01: {10-[2-[2-(3-acetilamino-2,4,6-triyodofenilamino) aminoetil]-2-oxoetil]-1,4,7,10-tetraaza-1-ciclododecil}-1,4,7-triacetato de gadolinio (3+)-kN1,kN4,kN7,kN10,kO1,kO4,kO7

IR (ATR): 1601, 1397, 1317, 1281, 1242, 1086, 714 cm⁻¹.

p.f.: 290,9°C



ESI-MS (m/z): (ES⁺) 1140 [M]⁺, 1141 [M+H]⁺. (ES⁻) 1139 [M-1H]⁻.

AE Calculado: 26,37 %C 3,69 %H 7,97 %N

Hallado: 26,11 %C 3,60 %H 7,85 %N

Pureza por HPLC >99% según método 7 (Fig. 140)

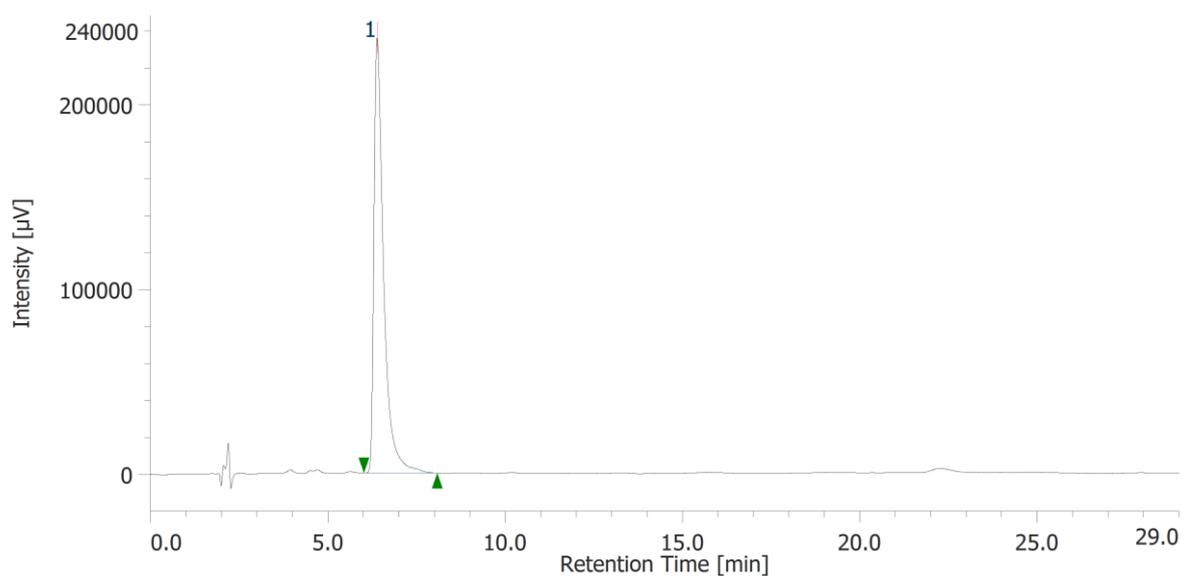


Figura 140: Cromatograma del producto final ICJ1901-01 a 250 nm obtenido con el método de análisis 7.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis, purificación y caracterización espectroscópica

- *Síntesis de ICJ1911-01:*

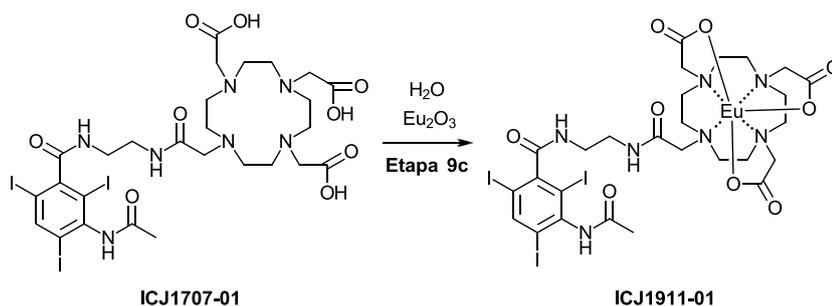


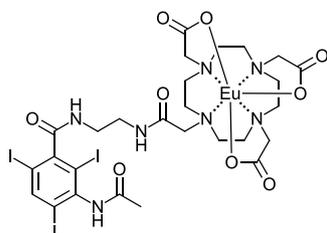
Figura 141: Reacción etapa 9c

Se disuelven 1,5 g de ICJ1707-01 en 20 mL de agua. Se calienta la disolución a 80°C y se añaden 0,27 g de óxido de europio. Se mantiene el pH entre 4,0 y 4,5 con ácido clorhídrico concentrado y se van añadiendo pequeñas porciones de óxido de europio hasta que, por HPLC, se verifique la finalización de la reacción. Una vez que se obtiene una conversión total al producto ICJ1911-01, se realiza un tratamiento de purificación con resinas por agitación, empleando IRA-67 e IR-120. Una vez que se han eliminado las sales e impurezas, se rota a sequedad el producto, se añaden 3,86 mL de agua, se calienta la disolución a 90°C y se añaden 115 mL de etanol anhidro. Posteriormente, se destila casi a sequedad la mezcla azeotrópica para eliminar el agua y, para asegurar que la eliminación es casi total, se añaden otros 115 mL de etanol anhidro y se vuelve a destilar casi a sequedad. Se añaden en caliente 85 mL de acetona y después de mantener agitando durante 2 horas, se deja enfriar toda la noche. Se filtra un sólido algodonoso que al secarlo en la estufa a vacío se transforma en un sólido blanco. Se obtiene de esta manera un 45% de rendimiento.

Para recuperar parte del producto de las aguas madres de filtración, estas se rotan casi a sequedad y en caliente se añaden 85 mL de acetona. Se deja enfriar el producto obtenido, se filtra y después de secar a vacío se obtiene un sólido blanco de las mismas características que el anterior. Se recupera un 42% adicional, teniendo así un rendimiento global en esta etapa de un 87%.

ICJ1911-01: {10-[2-[2-(3-acetilamino-2,4,6-triyodofenilamino) aminoetil]-2-oxoetil]-1,4,7,10-tetraaza-1-ciclododecil}-1,4,7-triacetato de europio (3+)-kN1,kN4,kN7,kN10,kO1,kO4,kO7

¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9,90 (bs, H, NH); 8,58 (bs, H, H-Ph); 8,25 (m, 2H, 2NH); 3,25-2,75 (m, 28H, 14CH₂); 2,03 (s, 3H, CH₃).



¹³C RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 175,0 (CO); 174,5 (CO); 173,6 (CO); 173,5 (CO); 172,5 (CO); 168,6 (CO); 148,8 (CH-Ph); 147,9 (C-Ph); 141,6 (C-Ph); 100,1 (C-Ph); 96,9 (C-Ph); 91,4 (C-Ph); 63,3 (CH₂); 61,8 (CH₂); 59,4 (3CH₂); 57,3 (CH₂); 57,2 (CH₂); 55,9 (2CH₂); 54,6 (2CH₂); 53,9 (2CH₂); 44,8 (CH₂); 22,1 (CH₃).

IR (ATR): 1595, 1368, 1315, 1279, 1238, 1084, 935, 712 cm⁻¹.

p.f.: 294,0°C

ESI-MS (m/z): (ES⁺) 1136 [M+H]⁺, 1158 [M+Na]⁺. (ES⁻) 1134 [M-H]⁻.

AE Calculado: 27,35 %C 3,77 %H 7,98 %N

Hallado: 27,58 %C 4,32 %H 8,22 %N

Pureza por HPLC >97% según método 7 (Fig. 142)

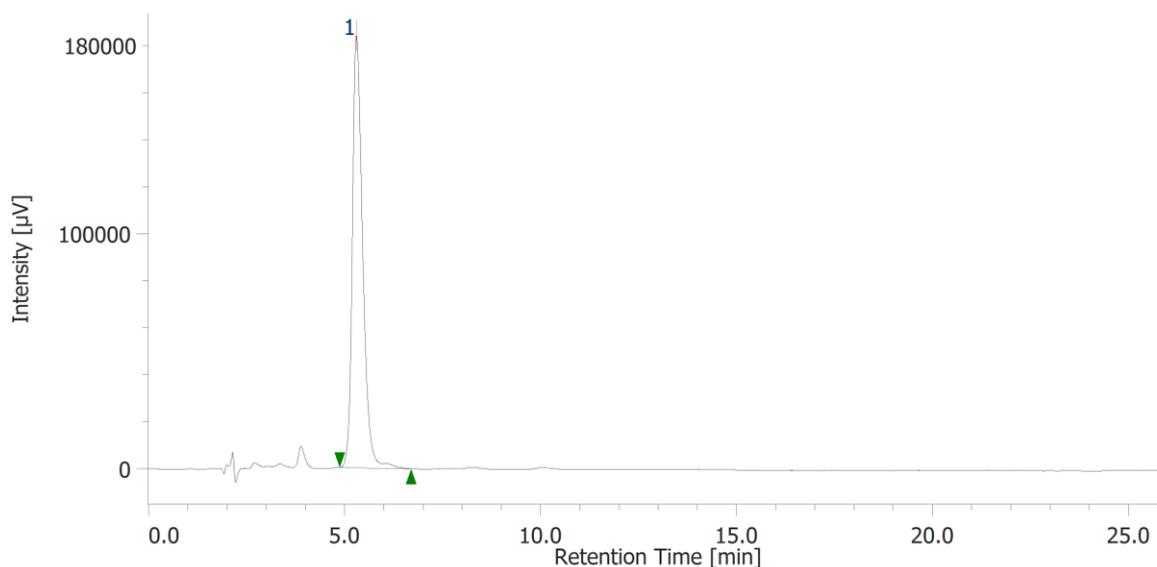


Figura 142: Cromatograma del producto final ICJ1911-01 a 250 nm obtenido con el método de análisis 7.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros Físicoquímicos

Parámetros Físicoquímicos

Con el objeto de predecir el comportamiento de los compuestos finales sintetizados tras su administración, se han estudiado una serie de parámetros que se describen a continuación.

El compuesto ICJ1911-01 se ha sintetizado únicamente para la determinación del número de aguas de coordinación, no para ser administrado en animales y, por lo tanto, el resto de los estudios físicoquímicos sólo se han llevado a cabo para los productos ICJ1085-01 e ICJ1901-01.

Osmolalidad y solubilidad

Para la realización de la parte experimental relacionada con el parámetro de osmolalidad, se ha seguido el procedimiento descrito previamente en el apartado de MATERIALES Y MÉTODOS. Se han estudiado los compuestos ICJ1805-01 e ICJ1901-01, sintetizados en la presente Tesis Doctoral, y se han comparado los resultados con otros compuestos de referencia como son el gadobutrol y el ácido acetrizoico.

Para la medida de las muestras se preparan disoluciones de los compuestos a analizar con una concentración de 0,1 M. Los valores de osmolalidad obtenidos se muestran en la tabla 27:

Tabla 27: Valores experimentales del estudio de osmolalidad.

Compuestos	mOsm/Kg
Gadobutrol	155,33
ICJ1901-01	162,58
ICJ1805-01	204,32
Ácido acetrizoico	620,47

En el estudio de la máxima solubilidad en agua de los compuestos ICJ1805-01, ICJ1901-01 e ICJ1911-01 se llegó a disolver estos productos en concentraciones de 0,2 M, 0,3 M y 0,3 M respectivamente.

Los compuestos sintetizados en el presente trabajo son medios de contraste que se administran por vía intravenosa a una dosis determinada, dependiendo del tipo de imagen que se necesite. En el caso de los medios de contraste utilizados en iRM, la dosis típica de los compuestos basados en gadolinio se encuentra entre 0,1 y 0,3 mmol/Kg. Para el uso en rayos X, la dosis típica de los compuestos yodados es 10 veces mayor que la utilizada para iRM. En general, la concentración de estos compuestos puede variar entre 0,1 M y 1,0 M.

Los primeros medios de contraste utilizados en iRM se caracterizaban por tener, a las concentraciones de administración habituales, una osmolalidad entre 4 y 6 veces superior que el plasma sanguíneo (aprox 300 mOsm/Kg), lo que puede causar efectos desagradables para el paciente. Posteriormente, los medios de contraste de nueva generación fueron no iónicos, teniendo osmolalidades más próximas a la de la sangre y reduciendo así los efectos adversos causados en los pacientes tras su administración.

En la tabla 28 se incluyen los valores de osmolalidad para una serie de compuestos comerciales utilizados en iRM ⁽¹²³⁾⁽¹²⁴⁾.

Tabla 28: Valores bibliográficos de osmolalidad para medios de contraste comerciales en iRM.

Nombre	Nombre comercial	Tipo	Carga	Conc. (M)	Osmolalidad (mOsm/kg)
Gadopentetato	Magnevist®	Lineal	Iónico	0,5	1960
Gadobenato	MultiHance®	Lineal	Iónico	0,5	1970
Gadoxetato	Primovist®/Eovist®	Lineal	Iónico	0,25	688
Gadofosveset	Vasovist®/Ablavar® MS- 325	Lineal	Iónico	0,25	825
Gadodiamida	Omniscan®	Lineal	Neutro	0,5	789
Gadoversetamida	OptiMARK®	Lineal	Neutro	0,5	1110
Gadoterato	Dotarem®	Macrocielo	Iónico	0,5	1350
Gadobutrol	Gadovist®	Macrocielo	Neutro	1,0	1603
Gadoteridol	ProHance®	Macrocielo	Neutro	0,5	630

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros Fisicoquímicos

De la misma forma, a continuación, se recogen los valores de osmolalidad para algunos compuestos disponibles en el mercado que se utilizan como medios de contraste en el campo del diagnóstico por imagen por rayos X (Tabla 29) ⁽¹²⁵⁾.

Tabla 29: Valores bibliográficos de osmolalidad para diferentes medios de contraste comerciales en rayos X.

Nombre	Tipo	Carga	Contenido yodo (mg/mL)	Conc. (M)	Osmolalidad (mOsm/kg)
Metrizoato	Monómero	Iónico	370	2,9	2100
Ioxatlamato	Monómero	Iónico	325	2,6	1843
Diatrizoato	Monómero	Iónico	300	2,4	1550
Iopamidol	Monómero	Neutro	370	2,9	796
Iopromida	Monómero	Neutro	370	2,9	774
Iohexol	Monómero	Neutro	350	2,8	884
Ioxilan	Monómero	Neutro	350	2,8	695
Iomeprol	Monómero	Neutro	350	2,8	618
Ioversol	Monómero	Neutro	300	2,4	651
Ioxaglato	Dímero	Iónico	320	2,5	580
Iodixanol	Dímero	Neutro	320	2,5	290
Iotrolan	Dímero	Neutro	300	2,4	320

Se puede observar que los resultados experimentales de osmolalidad obtenidos para los productos sintetizados en este trabajo son intermedios entre los valores de los compuestos utilizados como referencia: el gadobutrol como medio de contraste de iRM y ácido acetrizoico como medio de contraste de rayos X.

Además, en base a la comparativa bibliográfica realizada, se puede establecer que estos productos tienen valores de osmolalidad adecuados para ser utilizados como medios de contraste en las diferentes técnicas de diagnóstico por imagen, especialmente en iRM y rayos X, Las disoluciones de los compuestos a la máxima solubilidad, entre 0,2 y 0,3 M, tienen una osmolalidad próxima a la de la sangre, lo que conlleva una disminución de los posibles efectos adversos causados al paciente tras la administración de los medios de contraste.

Coeficiente de reparto

Otro parámetro importante que se ha estudiado es la hidrofobicidad de los compuestos. Esta puede influir en la farmacocinética (velocidad de absorción, eliminación, distribución, metabolismo y excreción) y se mide por el coeficiente de reparto o partición (P), que viene determinado por la relación entre la concentración del compuesto en fase acuosa y en un disolvente orgánico inmisible como octanol o 1-butanol.

Los compuestos que se utilizan como agentes de contraste tienen la característica de ser muy polares, por lo que es recomendable realizar el estudio del coeficiente de partición en butanol/agua, ya que el octanol es más lipofílico. De esta manera, los medios de contraste estudiados presentarían concentraciones muy bajas en la fase orgánica; lo que haría muy complicada su cuantificación a través de los métodos analíticos desarrollados debido a que la concentración calculada podría deberse a impurezas polares en vez de al medio de contraste.

Para la realización de la parte experimental se ha seguido el procedimiento descrito previamente en el apartado de MATERIALES Y MÉTODOS. Así, se han determinado los valores experimentales para los compuestos ICJ1805-01 e ICJ1901-01, sintetizados en el presente trabajo, y se han comparado con los de varios medios de contraste comerciales de referencia como son el gadobutrol (utilizado en iRM) y el ácido acetrizoico (utilizado en rayos X). Los valores experimentales de log P son los que se muestran en la tabla 30:

Tabla 30: Valores experimentales del estudio del coeficiente de partición.

Nombre	Log P (butanol-agua)
Gadobutrol	-2,309
ICJ1805-01	-1,426
ICJ1901-01	-0,971
Ácido acetrizoico	-0,482

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros Fisicoquímicos

Después de realizar una búsqueda bibliográfica de los valores del coeficiente de reparto para diversos medios de contraste utilizados en iRM, que se encuentran en el mercado, en la tabla 31 se puede observar que todos tienen un carácter hidrofílico ya que presentan valores de log P entre -2 y -3. Además, se observa que los quelatos iónicos tienen un valor de log P de un orden de magnitud inferior a los no iónicos; exceptuando el gadoxetato y el gadobenato, que son agentes específicos para estudios de hígado y tienen valores similares a los no iónicos debido a la presencia de un resto aromático hidrofóbico ⁽¹²⁶⁾⁽¹²⁷⁾⁽¹²⁸⁾.

Tabla 31: Valores bibliográficos del coeficiente de partición para medios de contraste comerciales en iRM.

Nombre	Nombre comercial	Estructura	Carga	Log P (butanol-agua)
Gadopentetato de dimeglumina	Magnevist®	Lineal	Iónico	-3,16
Gadodiamida	Omniscan®	Lineal	No iónico	-2,13
Gadoversetamida	OptiMARK®	Lineal	No iónico	-1,82
Gadobenato de dimeglumina	MultiHance®	Lineal	Iónico	-2,23
Gadoxetato disódico	Primovist® (EU) Eovist® (US)	Lineal	Iónico	-2,11
Gadofosveset trisódico	Vasovist®, Ablavar® MS-325	Lineal	Iónico	-2,11
Gadoterato de meglumina	Dotarem®	Macro ciclo	Iónico	-2,87
Gadoteridol	ProHance®	Macro ciclo	No iónico	-1,98
Gadobutrol	Gadovist®	Macro ciclo	No iónico	-2,22

Según los valores de log P encontrados en la bibliografía (Tabla 32), se observa que los compuestos utilizados en exploraciones radiológicas son menos hidrofílicos que los compuestos utilizados en iRM ⁽¹²⁹⁾:

Tabla 32: Valores bibliográficos del coeficiente de partición para medios de contraste comerciales en rayos X.

Nombre	Carga	Log P (butanol-agua)
Diatrizoato sódico o de meglumina	Iónico	-1,360
Ioxaglato sódico o de meglumina	Iónico	-0,983
Iotrolán	Neutro	-2,301
Ioversol	Neutro	-1,360
Iohexol	Neutro	-1,165
Iopamidol	Neutro	-0,959
Iopromida	Neutro	-0,854
Iopentol	Neutro	-0,816

De la misma manera que ocurría en el estudio de la osmolalidad, tanto los resultados experimentales obtenidos para el coeficiente de reparto como los valores reportados en bibliografía permiten concluir que los compuestos sintetizados en el presente trabajo pueden ser utilizados como medios de contraste en el campo del diagnóstico por imagen, particularmente en iRM y rayos X.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros Físicoquímicos

Afinidad por seroalbúmina bovina (BSA)

Para los compuestos sintetizados durante la Presente Tesis Doctoral, se han determinado los valores de afinidad por BSA realizando estudios *in vitro* de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado de MATERIALES Y MÉTODOS. Además, se ha llevado a cabo un estudio *in silico* utilizando el programa Toxtree® con el objetivo de predecir la capacidad de unión de los compuestos.

Según el estudio en Toxtree®, el ácido acetrizoico y los compuestos ICJ1707-01, ICJ1805-01, ICJ1901-01 e ICJ1911-01 pueden presentar unión a proteínas, mientras que el gadobutrol no. Los informes generados con el programa son los que se muestran a continuación (Fig. 143-148):

- Gadobutrol

```
No protein binding alerts identified. = YES
cdk:Comment = Created from SMILES
Alert for SN2 identified. = NO
Alert for Michael Acceptor identified. = NO
Alert for Acyl Transfer agent identified. = NO
SMILES =
C1N(C2)CC(=O)O[Gd](OC(=O)C3)OC(CN(CCN(C1)
C(CO)C(O)CO)CCN3C2)=O
Alert for SNAr Identified. = NO
Alert for Schiff base formation identified. = NO
```

Figura 143: Resultado estudio *in silico* para el gadobutrol.

- Ácido acetrizoico

```
No protein binding alerts identified. = NO
cdk:Comment = Created from SMILES
Alert for SN2 identified. = NO
Alert for Michael Acceptor identified. = YES
Alert for Acyl Transfer agent identified. = YES
SMILES = C1(NC(=O)C)=C(I)C=C(C(=C1)C(O)=O)I
Alert for SNAr Identified. = NO
Alert for Schiff base formation identified. = NO
```

Figura 144: Resultado estudio *in silico* para el ácido acetrizoico.

- ICJ1707-01

```
Alert for SN1 Identified. = YES
Alert for SN2 identified. = NO
Alert for Acyl Transfer agent identified. = YES
SMILES =
C1=C(I)C(=C(I)C(NC(C)=O)=C1I)C(NCCNC(=O)CN(
CCN(CC(=O)O)CCN1CC(=O)O)CCN(CC(=O)O)CC1)
=O
toxTree.tree.cramer.CramerTreeResult =
1N,2N,3Y,4N
Alert for Schiff base formation identified. = NO
No DNA binding alerts identified. = NO
No protein binding alerts identified. = NO
cdk:Comment = Created from SMILES
Alert for Michael Acceptor identified. = YES
Alert for SNAr Identified. = NO
```

Figura 145: Resultado estudio *in silico* para el compuesto ICJ1707-01.

- ICJ1805-01

```
No protein binding alerts identified. = NO
cdk:Comment = Created from SMILES
Alert for SN2 identified. = NO
Alert for Michael Acceptor identified. = YES
Alert for Acyl Transfer agent identified. = YES
SMILES =
C1(I)C=C(I)C(=C(I)C=1NC(=O)C)C(NCCNC(=O)CN(
CCN(CC(=O)O[Ga]1O2)CCN3CC2=O)CCN(CC3)CC
(O1)=O)=O
Alert for SNAr Identified. = NO
Alert for Schiff base formation identified. = NO
```

Figura 146: Resultado estudio *in silico* para el compuesto ICJ1805-01.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros Físicoquímicos

- ICJ1901-01

```
No protein binding alerts identified. = NO
cdk:Comment = Created from SMILES
Alert for SN2 identified. = NO
Alert for Michael Acceptor identified. = YES
Alert for Acyl Transfer agent identified. = YES
SMILES =
C1(I)C=C(I)C(=C(I)C=1NC(=O)C)C(NCCNC(=O)CN(
CCN(CCN1CC2=O)CC(=O)O[Gd]3O2)CCN(CC(=O)
O3)CC1)=O
Alert for SNAr Identified. = NO
Alert for Schiff base formation identified. = NO
```

Figura 147: Resultado estudio *in silico* para el compuesto ICJ1901-01.

- ICJ1911-01

```
No protein binding alerts identified. = NO
cdk:Comment = Created from SMILES
Alert for SN2 identified. = NO
Alert for Michael Acceptor identified. = YES
Alert for Acyl Transfer agent identified. = YES
SMILES =
N1(C2)(C3)CC(O[Eu]1(OC1=O)(OC4=O)(N(C5)(C2)
C1)(N(C1)(C4)C5)N(C3)(C1)CC(=O)NCCNC(=O)C(=
C(I)C(=C1I)NC(C)=O)C(I)=C1)=O
Alert for SNAr Identified. = NO
Alert for Schiff base formation identified. = NO
```

Figura 148: Resultado estudio *in silico* para el compuesto ICJ1911-01.

Por otra parte, teniendo en todos los casos una concentración de los compuestos a estudiar de 0,25 mM y una concentración de BSA de 0,6 mM, los resultados obtenidos en la determinación experimental para evaluar la afinidad por la albúmina se recogen en la tabla 33:

Tabla 33: Valores experimentales del estudio de afinidad por la albúmina.

Nombre	Afinidad (%)
Gadobutrol	No detectable
ICJ1805-01	8,89
ICJ1901-01	11,16
Ácido acetrizoico	39,16

La unión no covalente a macromoléculas como las proteínas de la sangre (por ejemplo, a la albúmina) o dendrímeros, ha sido objeto de estudio en las últimas décadas debido a que se ha demostrado que, cuando se produce esta unión, aumenta la rigidez de la molécula utilizada como medio de contraste y disminuye la rotación tanto de los átomos como de la molécula. Además, como se explicará en el punto siguiente, según el concepto de la mejora de la magnetización inducida por receptores (RIME, del inglés "*Receptor-Induced Magnetization Enhancement*"), la relajatividad aumenta al facilitar el intercambio de moléculas de agua con el medio y se obtiene una señal más intensa ⁽¹³⁰⁾.

La albúmina plasmática está en el plasma a una concentración entre 3,4 y 5,4 % (p/V), equivalente a 500-800 μM , y es la responsable de mantener la presión osmótica y de transportar sustancias poco solubles como ácidos grasos, hormonas, bilirrubina y algunos medicamentos ⁽¹³¹⁾. Cada molécula de albúmina tiene al menos seis sitios de unión diferentes para fármacos. Dos de ellos se unen con gran intensidad y de manera específica a ácidos grasos de cadena larga, mientras que un tercer sitio permite la unión selectiva a la bilirrubina. Otros dos sitios, denominados sitio I y sitio II, son puntos de unión para fármacos ácidos. El resto de los sitios pueden tener interacción con distintas moléculas según diferentes factores como pueden ser el tamaño molecular, la especificidad de unión y su capacidad de ionizarse.

Además de la albúmina, existen medios de contraste que se unen a otras macromoléculas con el objetivo de dirigir un producto hacia una zona de interés del interior del cuerpo humano. Entre estas están las fibrinas (principal componente de la pared de coágulos de la sangre), el colágeno tipo I (forma parte del tejido conectivo), elastina (proteína de la matriz extracelular y principal componente de la pared de los vasos arteriales), ácido siálico (azúcar presente en la superficie de la célula, en las cadenas de oligosacáridos de glucolípidos y glicoproteínas, producido en el proceso de glucosilación), receptor de folato (vitamina B que ayuda al organismo al mantenimiento y creación de células nuevas), alanina aminopeptidasa (CD13, es una aminopeptidasa que se expresa por las células endoteliales angiogénicas), receptores de estrógenos y progesterona (hormonas responsables de las características sexuales femeninas), productos naturales, ARN mensajero, ADN, ...

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los compuestos que se definen como agentes de contraste para el espacio intravascular (*Blood Pool Agents*) se caracterizan por tener una gran afinidad por estas macromoléculas y, de esta manera, generan complejos de alto peso molecular que provocan una mayor retención en el plasma sanguíneo y evitan una rápida eliminación por la vía renal. Esto permite obtener imágenes con mayor facilidad y, además, posibilita el estudio de espacios vasculares que son inaccesibles para otras técnicas como las flebografías.

Otro aspecto que contemplar es el hecho de que la albúmina se metaboliza en el hígado y se elimina por vía biliar. Al formarse el complejo albúmina-medio de contraste, este se acumula en el hígado permitiendo así su visualización. Un ejemplo es el $[\text{Gd}(\text{EOB-DTPA})\text{H}_2\text{O}]^{-2}$ (Eovist), que presenta una eliminación por la vía hepática del 50%. Tiene una relajatividad de $60 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, medido a 20 MHz y 37°C, cuando se une a la albúmina de suero; pero en el plasma sanguíneo únicamente se une a una fracción de esta, por lo que la relajatividad es de $8,7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, medido a 20 MHz y 37°C ⁽¹³²⁾. A pesar de esto, una unión parcial es necesaria para que se pueda eliminar el producto por vía renal o biliar y no se quede retenido en el interior del organismo ⁽¹³³⁾.

A continuación, se incluye una descripción de algunos medios de contraste comerciales que tienen una alta afinidad por las macromoléculas como son el gadofosveset (MS-325. Vasovist o Ablavar), MP-2269, ácido gadocolético (B22956) y el EP-647 ⁽¹³⁴⁾.

El MS-325 tiene una afinidad por la seroalbúmina humana (HSA) entre el 80 y 90 %, una relajatividad libre del orden de $5,5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ y, cuando se une a la HSA, de $27,2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Presenta una eliminación principalmente por vía renal debido a la presencia de grupos fosfodiéster, que favorecen la eliminación por esta vía impidiendo que se excrete por vía hepatobiliar ⁽¹³⁵⁾.

El medio de contraste EP-647 presenta una elevada afinidad por la albúmina y una alta relajatividad. En este caso, los valores de los dos parámetros son muy similares independientemente de que el estudio se realizara en humanos o en conejos ⁽¹³⁶⁾.

El medio de contraste B22956 (ácido gadocolético) tiene una afinidad por albúmina alrededor del 95% y presenta un valor de relajatividad cuando se une a esta de $27 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ⁽¹³⁷⁾.

El medio de contraste MP-2269, diseñado por Adzamli y otros investigadores, presenta una buena afinidad por la albúmina al tener cadena alifática lipofílica en su estructura; de esta manera, se obtienen unos valores de relajatividad uniéndose a la albúmina humana y en conejos de 17,0 y 18,0 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente, llegando hasta $26,0 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ en sangre humana ⁽¹³⁸⁾.

Dumas y otros investigadores elaboraron una serie de compuestos derivados del macrociclo DOTA que presentaban una gran afinidad por la HSA, llegando a conseguir uniones con valores superiores al 98%. Todos los compuestos se caracterizaban por tener un grupo común de unión a la albúmina, cuatro aminas terciarias del cyclen (que afectan a la esfera interna de hidratación), un acetato α -sustituido, dos grupos amidas, una molécula de hidratación y grupos funcionales que presentaban modificaciones ⁽¹³⁹⁾. Analizando esta serie, se observa una relación entre los valores de relajatividad y los grupos funcionales utilizados que se puede expresar de la siguiente manera:

Fosfonato > Fenolato > acetato α -sustituido > acetato > hidroxamato > sulfonamida >
amida > piridilo > imidazol.

El gadobutrol es un medio de contraste basado en gadolinio que se utiliza en iRM y, como se puede comprobar en la búsqueda bibliográfica, presenta una unión muy baja a albúmina plasmática. En cambio, el ácido acetrizoico es un medio de contraste ampliamente utilizado en exploraciones radiológicas para la visualización de las vías hepatobiliares, debido principalmente a una unión significativa a proteínas plasmáticas. En base a los resultados obtenidos en los experimentos realizados, se ha podido verificar el mismo comportamiento observado en el estudio de los parámetros físicoquímicos anteriores; ya que los compuestos sintetizados en la presente Tesis Doctoral tienen un carácter de unión a albúmina intermedio entre los compuestos de referencia estudiados.

A partir de los resultados experimentales y bibliográficos del estudio de este parámetro físicoquímico, se establece que al administrar los compuestos que se han sintetizado se consigue una unión a albúmina que podría ser suficiente para visualizar las vías hepatobiliares.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros Fisicoquímicos

Relajatividad y número de aguas de coordinación

La determinación del parámetro de relajatividad para el compuesto ICJ1901-01 se realizó utilizando una disolución acuosa de dicho producto a una temperatura de 25°C en un campo magnético de 7 T. El valor de r_1 medido en estas condiciones es de 3,9 mM⁻¹s⁻¹. Este valor de relajatividad es muy similar al del complejo de Gd-DOTA (DOTAREM®) medido en las mismas condiciones de temperatura y campo magnético (3.8 mM⁻¹ s⁻¹)⁽¹⁴⁰⁾. Se puede observar que el valor obtenido de relajatividad para el compuesto ICJ1901-01 es del orden al obtenido en diferentes estudios bibliográficos para otros medios de contraste que se utilizan en iRM. De esta manera, el valor obtenido a 1,41 T para Magnevist, Dotarem, Omniscan, Prohance, MultiHance y Gadovist corresponde a 3,4, 3,1, 3,6, 3,2, 4,1, 3,2 mM⁻¹ s⁻¹, respectivamente⁽¹⁴¹⁾.

El espectro de excitación registrado para el compuesto ICJ1911-01 analizando la emisión a 613 nm presenta un máximo a 318 nm (Fig. 149). Esto indica la presencia de una unidad aromática en el complejo, que puede usarse para la excitación indirecta del ion metálico empleando el conocido efecto antena (Fig. 150)⁽¹⁴²⁾. De hecho, la excitación directa del ion lantánido es muy poco eficaz; ya que las transiciones f→f están prohibidas por las reglas de selección y, en consecuencia, presentan coeficientes de extinción molar muy bajos. Sin embargo, la presencia de un cromóforo orgánico en la estructura del ligando que coordina al ion lantánido permite solucionar este problema. La excitación del cromóforo con radiación UV o visible da lugar a la población de su estado excitado singlete (S₁), que mediante un cruce de sistemas puede dar lugar al estado excitado triplete centrado en el ligando (T₁). La energía del estado excitado triplete puede, a continuación, transferirse al estado excitado del ion lantánido (el ⁵D₀ en el caso del Eu³⁺), que posteriormente puede desactivarse mediante la emisión de luz.

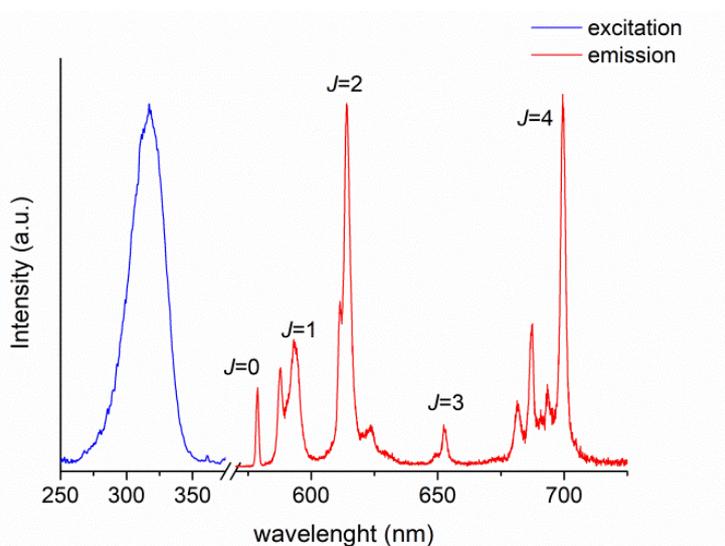


Figura 149: Espectro de excitación (azul) y emisión (rojo) registrados empleando una disolución del complejo ICJ1911-01 a una concentración de 5×10^{-5} M en H₂O (pH 7.0, tampón TRIS 0.1 M). Las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas fueron $\lambda_{ex} = 318$ y $\lambda_{em} = 613$ nm, respectivamente.

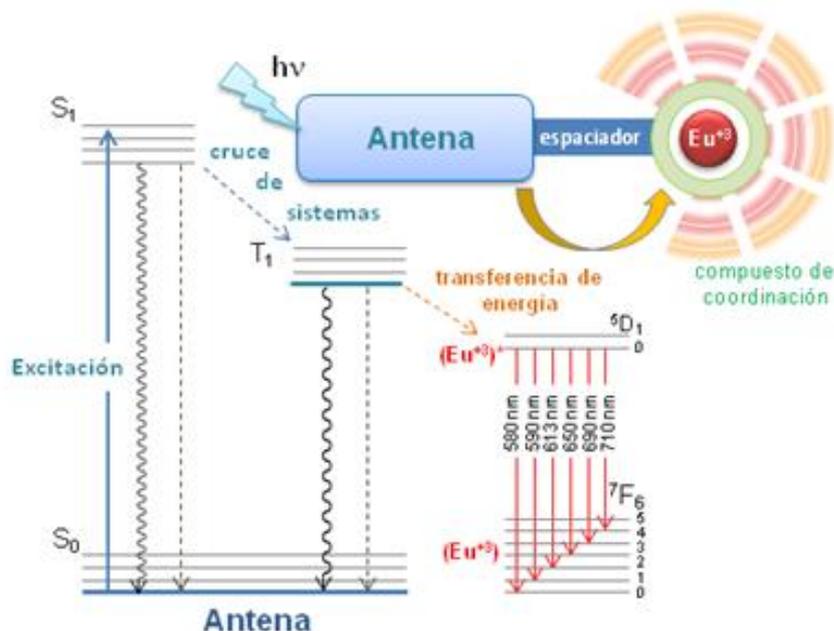


Figura 150: Efecto antena: La excitación del grupo cromóforo del ligando puebla el estado excitado singlete (S_1), que a su vez se transforma en el estado excitado triplete (T_1) mediante un cruce de sistemas. La energía se transfiere a continuación al estado 5D_0 del ion Eu^{3+} , que se desactiva a su estado fundamental mediante emisión debida a las transiciones $^5D_0 \rightarrow ^7F_j$.

El espectro de emisión registrado para el compuesto ICJ1911-01 bajo excitación a 318 nm muestra las bandas de emisión debidas a las transiciones $^5D_0 \rightarrow ^7F_j$ ($J = 0-4$), que son características del ion Eu^{3+} (Fig. 149). Las diferentes transiciones se desdoblan en un máximo de $2J+1$ componentes debido al efecto del campo cristalino. El espectro muestra una única banda bien definida para la transición $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$, lo que sugiere la existencia de una única especie en disolución. La elevada intensidad de la transición $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$, que normalmente es muy débil, parece indicar una simetría baja del entorno de coordinación del metal. Las transiciones $^5D_0 \rightarrow ^7F_j$ presentan intensidades relativas de 0,05, 0,42, 0,84, 0,09 and 1,0, lo que muestra que la emisión está dominada por la transición $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros Fisicoquímicos

Las curvas de persistencia del estado excitado 5D_0 del Eu^{3+} con sus correspondientes ajustes por mínimos cuadrados se recogen en la figura 151.

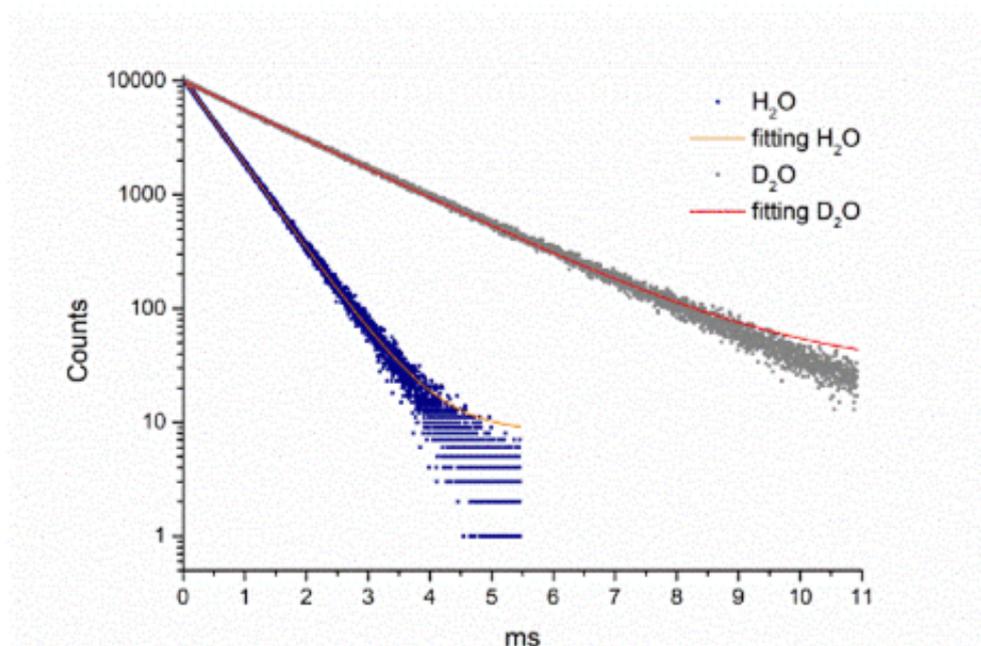


Figura 151: Curvas de caída de la intensidad de la emisión del estado excitado 5D_0 obtenidas mediante la técnica de recuento de fotones únicos (*single photon counting*) empleando disoluciones del compuesto ICJ1911-01 en H_2O y D_2O . Las líneas rojas corresponden a los ajustes realizados para calcular la semivida de emisión.

El ajuste de mínimos cuadrados proporciona semividas de 0,5813 y 1,6779 ms en H_2O y D_2O respectivamente. La semivida registrada en H_2O es próxima a la registrada para complejos de Eu^{3+} que contienen una molécula de agua coordinada ⁽¹⁴³⁾.

Según las ecuaciones de Horrocks y Parker (Ecuaciones 17 y 18), los valores del número de aguas de hidratación calculados corresponden a 1,0 y 0,9, respectivamente, indicando que el complejo ICJ1911-01 tiene una molécula de agua coordinada al ion lantánido.

Las principales interacciones estudiadas corresponden a la unión de las moléculas de agua del medio con la primera esfera de coordinación del metal ⁽¹⁴⁴⁾. Las moléculas de agua de la esfera interna de los compuestos que tienen el metal en su interior se intercambian con las del medio y, de esta manera, se propaga el carácter paramagnético al medio de interés (relajatividad de la esfera interna de hidratación). Posteriormente, se produce una difusión aleatoria del paramagnetismo por el resto del medio (relajatividad de la esfera exterior). También hay moléculas que, debido a los enlaces de hidrógeno con los ligandos (por ejemplo, los grupos carboxilato o fosfonato), pueden permanecer en los alrededores de la esfera interior durante un tiempo, lo que se define como relajatividad de la segunda esfera de hidratación.

La relajatividad de la esfera interna de hidratación es el parámetro que puede ser modificado con mayor facilidad variando la estructura de los medios de contraste.

Como se puede observar en la figura 152, la esfera interna de hidratación (en rojo) está coordinada con el metal. La segunda esfera de hidratación (en verde) está próxima a los grupos donde se une el metal y tiene los hidrógenos orientados hacia los oxígenos de los grupos carboxilato, formando los enlaces de hidrógeno. Las moléculas de la esfera exterior no presentan ninguna orientación preferente. De las tres contribuciones, las responsables del efecto de relajatividad del compuesto son la interna y la externa; de hecho, para realizar los cálculos teóricos, el parámetro relacionado con la segunda esfera de hidratación suele ser despreciado.

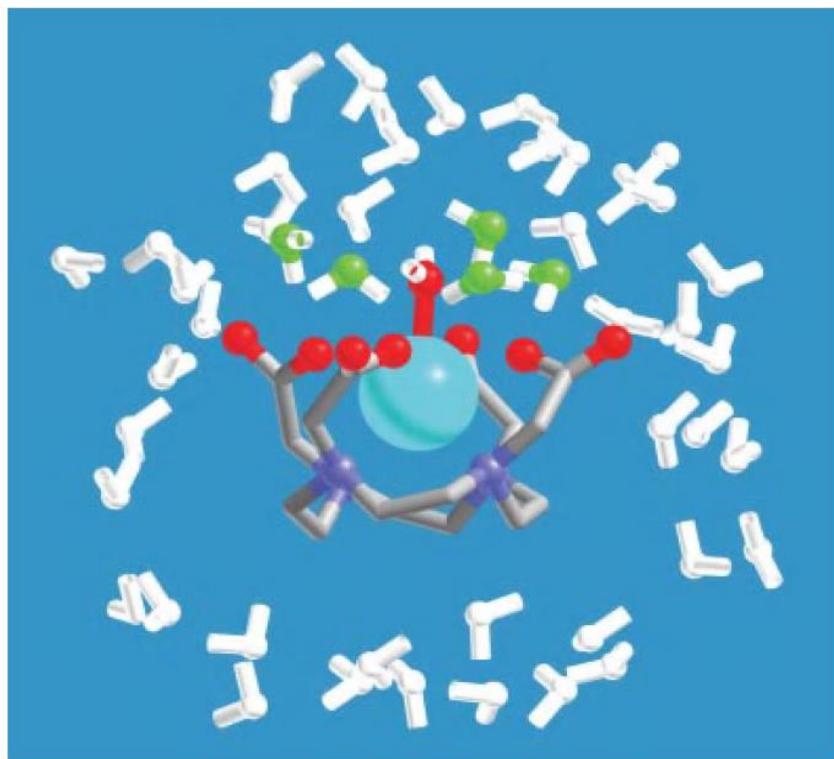


Figura 152: Tipos de moléculas de hidratación alrededor de medio de contraste paramagnético.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros Fisicoquímicos

Los grupos amido se coordinan más débilmente que los grupos carboxilato con los lantánidos ⁽¹⁴⁵⁾, por esta razón las esferas internas de hidratación con amidas están menos pobladas que las de carboxilato. Esto se traduce en una mayor capacidad de intercambio de las moléculas de agua para los grupos carboxilato frente a las amidas, ya que cuanto mayor sea la aglomeración estérica en la esfera de coordinación, más fácil será la salida de la molécula de agua para intercambiarse en el medio.

Por la misma razón, los ligandos utilizados que presentan un mayor efecto estérico favorecen una mayor velocidad de intercambio de las moléculas de agua con el medio ⁽¹⁴⁶⁾.

Por otra parte, si el radio del lantánido utilizado se reduce, los estados de coordinación del metal estarán más accesibles y aumentará la capacidad de intercambio de las moléculas de agua de la esfera interna de hidratación con el medio. El número de moléculas de hidratación no varía en los complejos que poseen los metales Nd, Eu, Gd, Tb, Dy y Ho; pero se ha observado que mientras que para Nd, Eu y Gd la velocidad de intercambio de las moléculas de hidratación no varía y es elevada, para Tb, Dy y Ho la velocidad es menor ⁽¹⁴⁷⁾⁽¹⁴⁸⁾.

También la carga neta del medio de contraste puede afectar al intercambio de moléculas de agua de la esfera de hidratación con el medio. Cuanto más negativamente cargado esté un medio de contraste, más rápida será la capacidad de intercambio. Por esta razón, el compuesto $[\text{Gd}(\text{DOTASA})(\text{H}_2\text{O})]^{-2}$ intercambia más rápido las moléculas de agua que el $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^{-}$ y, de la misma manera, la capacidad de intercambio del $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^{+}$ se verá reducida al aumentar la protonación del compuesto ⁽¹⁴⁹⁾.

La presencia de ciertos ligandos, como por ejemplo etano-1,2-diamina y ciclohexano-1,2-diamina combinados con piridina y grupos fosfonato ⁽¹⁵⁰⁾, favorece el incremento de la velocidad de intercambio de las moléculas de hidratación.

En la tabla 34 se recogen algunos datos comparativos de ligandos utilizados en medios de contraste para el diagnóstico por imagen:

Tabla 34: Valores bibliográficos de relajatividad para diferentes ligandos y medios de contraste utilizados en iRM

Ligando	Moléculas de agua	r_1 (20 MHz; 25 °C) (mM ⁻¹ s ⁻¹)
DTPA ⁽¹⁴⁶⁾	1	4,69
BOPTA ⁽¹⁵¹⁾	1	5,20
DTPA-BMA ⁽¹⁴⁶⁾	1	4,39
DOTA ⁽¹⁴⁶⁾	1	4,74
DOTASA ⁽¹⁵²⁾	1	5,93
HP-DO3A ⁽¹⁵³⁾	1	3,70 (40 °C)
DO3A ⁽¹⁵³⁾	1,8	4,80 (40 °C)
TTAHA ⁽¹⁵⁴⁾	2	8,50
EGTA ⁽¹⁵⁵⁾	1	4,73
MP-2269 ⁽¹⁵⁶⁾	1	6,64
MP-2269-BSA ⁽¹⁵⁶⁾	1	24,5
MS-325 ⁽¹⁵⁷⁾	1	6,60 (37 °C)
MS-325-HSA ⁽¹⁵⁸⁾	1	48,9

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros Fisicoquímicos

Geometría

El espectro de RMN de protón del complejo ICJ1911-01 se registró en disolución de D₂O (Fig. 153). Presenta una serie de picos relativamente anchos en el intervalo aproximado de -20 a 35 ppm, debido al paramagnetismo del ion metálico, que origina tanto desplazamientos paramagnéticos como un aumento de las velocidades de relajación de las señales de RMN ⁽¹⁵⁹⁾. El intervalo en el que se observan las resonancias de RMN es característico de complejos de Eu³⁺ basados en cyclen. Las señales de los protones axiales de la unidad macrocíclica que aparecen más desapantalladas se observan en el intervalo 30-34 ppm. El número de señales observadas (4) es característico de un entorno de baja simetría, que hace que los cuatro protones no sean magnéticamente equivalentes. El desplazamiento observado para estas señales es característico del isómero conocido como antiprisma cuadrado (M o SA del inglés, *square antiprism*), nombrado de esta manera debido al entorno de coordinación con dicha geometría. Sin embargo, no puede descartarse la presencia de una proporción menor del isómero antiprisma cuadrado truncado (m o TSA, del inglés, *twisted-square antiprismatic*), que presenta estas señales en torno a 15 ppm ⁽¹⁶⁰⁾.

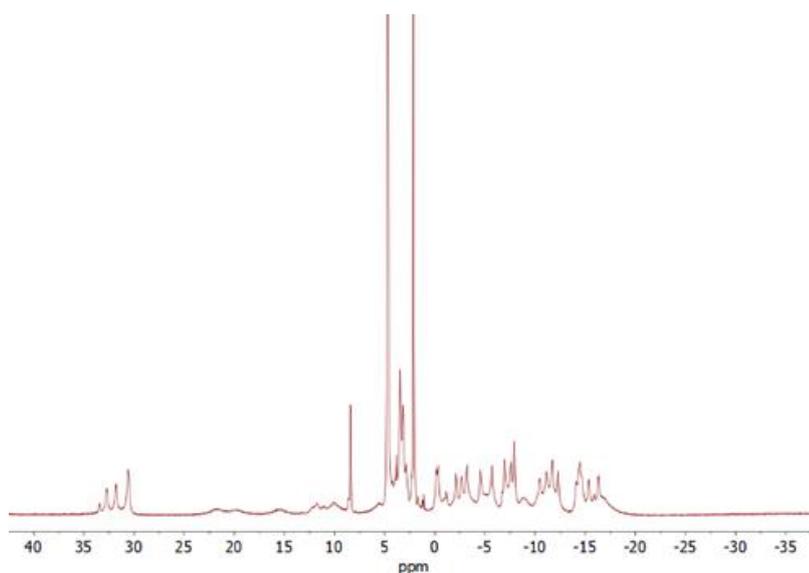


Figura 153: RMN de protón del complejo ICJ1911-01 registrado en disolución de D₂O a 25°C (400 MHz, 30 mM, pH 7,0).

Las estructuras de rayos X de complejos de gadolinio que tienen nueve posiciones para coordinar con quelatos como DTPA, tienen una unión del metal a los tres nitrógenos de las aminas y a los cinco oxígenos de los grupos carboxilo, dejando una posición de coordinación libre para una molécula de hidratación. En cambio, si el quelato es DOTA, el metal se une a los cuatro nitrógenos de las aminas y a los cuatro oxígenos de los grupos carboxilo, dejando también una posición de coordinación libre para una molécula de agua de hidratación. A continuación, se muestra un esquema de ambas estructuras (Fig. 154) ⁽¹⁶¹⁾.

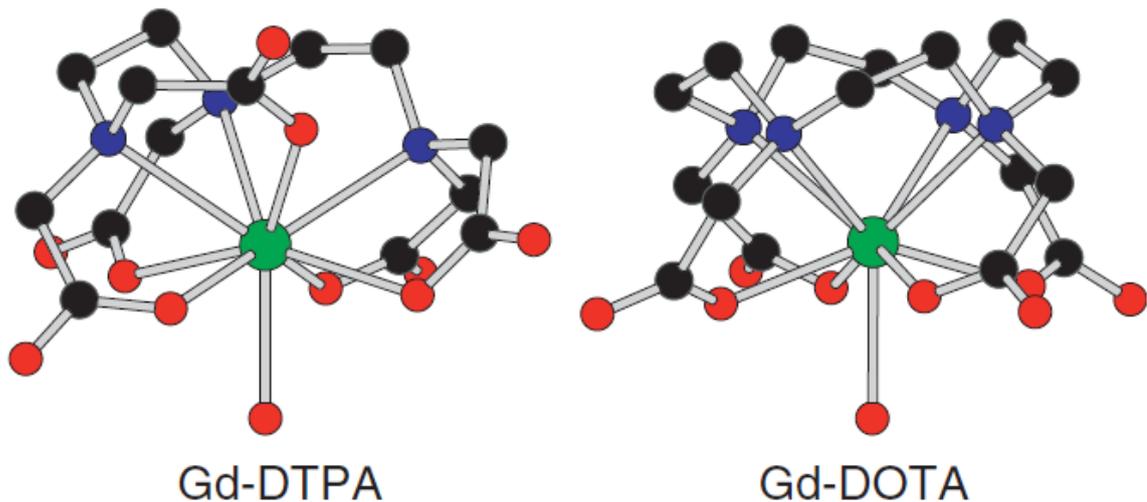


Figura 154: Estructura cristal de Gd(DTPA) y Gd(DOTA).

Los compuestos que tienen un ligando como DOTA presentan dos tipos de isómeros, como se observa en la figura 155. Se puede comprobar que los oxígenos de los grupos carboxilos están en el mismo plano y los nitrógenos están en otro plano paralelo diferente, en una estructura de SA o TSA ⁽¹⁶²⁾. Debido a que el ángulo Ψ es mayor de 133° , existe una molécula de agua coordinada; ya que para ángulos menores de 133° no es posible la presencia de dicha molécula ⁽¹⁶³⁾. Aunque en disolución tienden a estar en equilibrio, el más estable en estos compuestos es el isómero SA ⁽¹⁶⁴⁾.

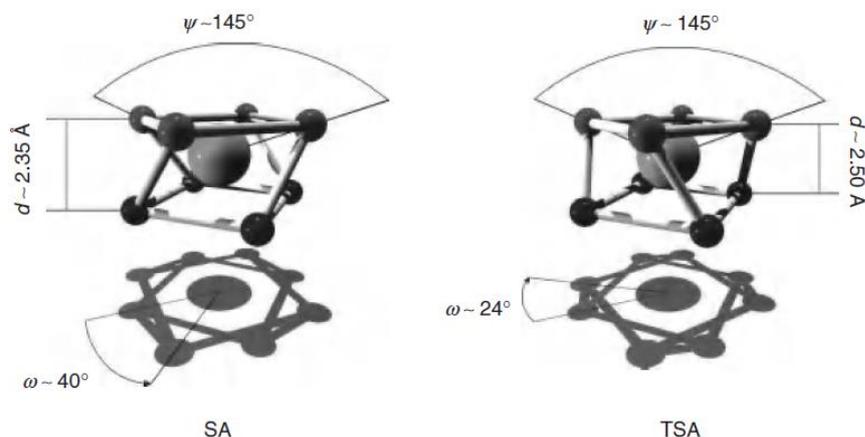


Figura 155: Isómeros de complejos con ligando como DOTA.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros Físicoquímicos

Además, cada isómero puede presentar dos pares estereoisoméricos de enantiómeros ($\delta\delta\delta\delta$ / $\lambda\lambda\lambda\lambda$) pudiendo variar la coordinación con un giro opuesto del anillo aromático y los grupos acetatos (coordinación SA) o si el giro es en la otra dirección del anillo aromático y los grupos acetatos (coordinación TSA). En disolución, estas conformaciones pueden interconvertirse invirtiendo el anillo ($\delta\delta\delta\delta \rightleftharpoons \lambda\lambda\lambda\lambda$), pero también variando la rotación del acetato ($\Lambda \rightleftharpoons \Delta$). Si la inversión es sólo de un proceso y no de los dos, daría un intercambio entre los isómeros SA y TSA. En la figura 156 se pueden observar todas las combinaciones.

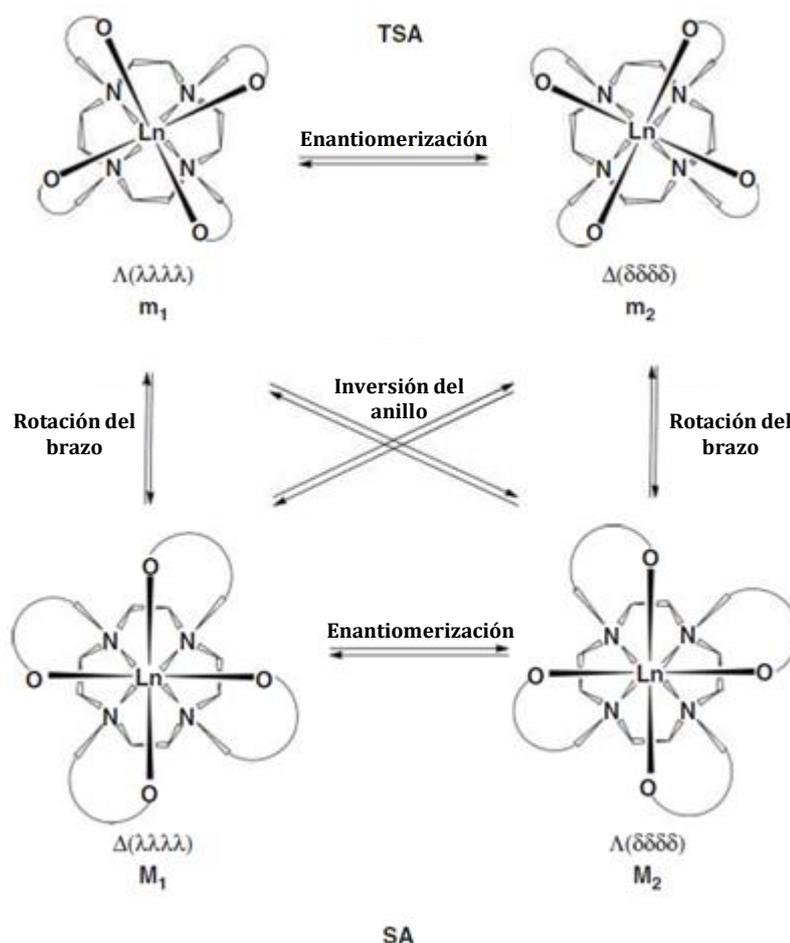


Figura 156: Equilibrios de estructuras Ln(DOTA).

En el caso de que el ligando sea el DO3A, el metal se une a los cuatro nitrógenos de las aminas y a los tres oxígenos de los grupos carboxilo; de esta forma deja dos posiciones de coordinación libres y por eso presenta dos moléculas de hidratación⁽¹⁶⁵⁾. Aun así, el modo de coordinación es muy parecido al de los compuestos que tienen DOTA como ligando; ya que presentan los mismos isómeros comentados anteriormente y SA es el isómero más estable. Cuando se forma un monocristal y se estudia su estructura mediante difracción de rayos X, se ve que estos tipos de quelatos se distribuyen como dímeros o trímeros donde los compuestos se unen por los aniones carbonatos⁽¹⁶⁶⁾. También se ha descrito la unión de otros ligandos al metal como son acetato, hidroxiacetato, aminoácidos o ácido cítrico⁽¹⁶⁷⁾.

En la tabla 35 se resumen algunos datos interesantes de compuestos relacionados con los sintetizados en la presente Tesis Doctoral:

Tabla 35: Valores bibliográficos de la geometría y moléculas de hidratación para diferentes ligandos y medios de contraste utilizados en iRM.

Compuesto	Ángulo ω SA (°)	Ángulo ω TSA (°)	q	Sitios de unión
DOTA ⁽¹⁶²⁾	40	24	1	4 (-N-) + 4 (O ⁻)
DO3A ⁽¹⁶⁶⁾	39	-	2	4 (-N-) + 3 (O ⁻)
Gadoteridol ⁽¹⁶⁸⁾	38	26	1	4 (-N-) + 3 (O ⁻) + 1 (OH)
Gadobutrol ⁽¹⁶⁹⁾	-	28	1	4 (-N-) + 3 (O ⁻) + 1 (O ⁻ de otro complejo)
Gd(DO3A-L2) ⁽¹⁷⁰⁾	39	-	1	4 (-N-) + 3 (O ⁻) + 1 (oxígeno de la amida)
DO3ABn ⁽¹⁷¹⁾	40	-	1	4 (-N-) + 3 (O ⁻) + 1 (O ⁻ de otro complejo)

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros relacionados con la seguridad

Parámetros relacionados con la seguridad

Para estudiar la toxicidad de los compuestos sintetizados durante la presente Tesis Doctoral se han utilizado varios programas basados en predicciones *in silico*, como Toxtree® y TEST®, además de realizarse la determinación experimental de la IC₅₀ con una técnica *in vitro* que se describirá posteriormente.

Test de Ames

Según Toxtree®, no existe ninguna alerta de mutagenicidad ni para los compuestos de referencia gadobutrol o ácido acetrizoico, ni para los compuestos sintetizados durante la Tesis Doctoral ICJ1707-01, ICJ1805-01, ICJ1901-01 ni ICJ1911-01.

Utilizando el programa TEST® para predecir el parámetro de mutagenicidad, los compuestos: ácido acetrizoico, ICJ1707-01 y el compuesto DO3A-butrol (precursor del gadobutrol), presentan resultados negativos de mutagenicidad.

Biodegradabilidad

Según Toxtree®, tanto los compuestos de referencia gadobutrol y ácido acetrizoico, como los compuestos sintetizados durante la presente Tesis Doctoral ICJ1707-01, ICJ1805-01, ICJ1901-01 e ICJ1911-01, se consideran de clase 2 y se definen como compuestos persistentes. Esto es debido a la ausencia de enlace terc-butilo terminal, epóxido, anillos alifáticos no ramificados enlazados, al menos dos grupos isopropilo terminales en compuestos lineales, compuestos cíclicos alifáticos sin ramificaciones, uno o más sustituyentes halogenados o moléculas ramificadas, moléculas no cíclicas con dos sustituyentes halogenados, más de dos sustituyentes hidroxilos en anillos aromáticos, dos grupos diamino terminales en un compuesto no-cíclico, dos dobles enlaces carbono-carbono terminales en una molécula no ramificada, grupo ciano unido a una cadena de más de 8 átomos o grupos nitro.

Dosis letal media

Se ha utilizado el programa TEST® para evaluar el parámetro de dosis letal media en ratón, por vía oral, para los compuestos ácido acetrizoico, ICJ1707-01 y DO3A-butrol (precursor del gadobutrol). Los valores obtenidos en la predicción de la LD₅₀ para estos tres productos han sido 10,70, 10,89 y 6,33 g/Kg, respectivamente.

Estudio de citotoxicidad

Se ha realizado un estudio de citotoxicidad para determinar el valor de la concentración inhibitoria (IC_{50}) en diferentes compuestos, según el procedimiento descrito en el apartado de MATERIALES Y MÉTODOS. Este ensayo se ha realizado en las instalaciones del CIEMAT y los compuestos estudiados han sido el gadobutrol y el ácido acetrizoico como productos de referencia, y los productos ICJ1805-01 e ICJ1901-01 sintetizados en el presente trabajo. Los valores obtenidos indican que ninguno de los productos evaluados presenta una toxicidad significativa.

El valor medio de IC_{50} obtenido para el ácido acetrizoico es 4,04 mg/mL, y su intervalo de confianza al 95% se encuentra entre 3,19 y 5,13 mg/mL. De los compuestos estudiados, es el que presenta un valor de toxicidad más elevado. La curva que relaciona la viabilidad celular en función de las concentraciones estudiadas es la siguiente (Fig.157):

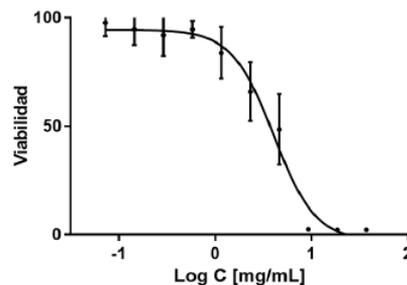


Figura 157: Viabilidad celular (%) de células V79 en presencia de diferentes concentraciones de ácido acetrizoico.

El valor medio de IC_{50} obtenido para el producto ICJ1805-01 es 8,64 mg/mL, y su intervalo de confianza al 95% se encuentra entre 6,54 y 12,65 mg/mL. Es el segundo producto que presenta un valor de toxicidad más elevado. La curva que relaciona la viabilidad celular en función de las concentraciones estudiadas es la siguiente (Fig. 158):

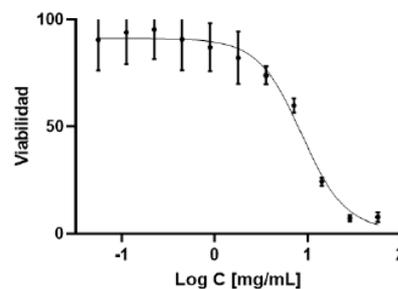


Figura 158: Viabilidad celular (%) de células V79 en presencia de diferentes concentraciones de ICJ1805-01

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros relacionados con la seguridad

Los valores de IC_{50} para el gadobutrol y el compuesto ICJ1901-01 no pudieron determinarse, ya que con las concentraciones máximas estudiadas no se consiguió llegar al 50% de muerte celular. De esta manera, queda demostrado que son productos con una toxicidad aún menor que la observada para los compuestos anteriores, pudiendo afirmar que sus valores de IC_{50} son mayores o iguales que 75 mg/mL (Fig. 159 y 160).

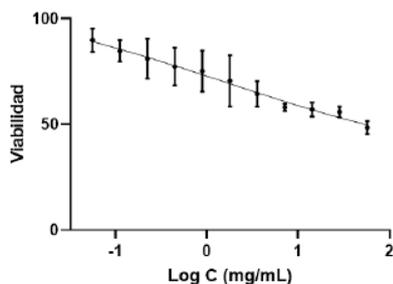


Figura 159: Viabilidad celular (%) de células V79 en presencia de diferentes concentraciones de ICJ1901-01

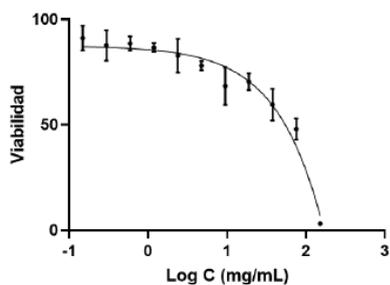


Figura 160: Viabilidad celular (%) de células V79 en presencia de diferentes concentraciones de gadobutrol

Marcaje radiactivo

Un objetivo de esta etapa de la Tesis Doctoral es conseguir un marcaje radiactivo superior a un 95% de pureza; lo que no quiere decir que se consiga marcar todo el producto ICJ1707-01, sino que toda la actividad que se extrae del generador en forma de galio-68 se introduce en la molécula, quelando el compuesto ICJ1707-01 y no existe galio sin reaccionar en el medio ni tampoco en forma de otros productos. Con el objetivo de determinar las mejores condiciones para conseguir una pureza radioquímica lo más elevada posible, se han realizado una serie de experimentos en los que se ha priorizado el estudio del tiempo de la reacción por microondas y la cantidad inicial del producto ICJ1707-01 (producto sin metal).

En el primer estudio se realizaron diferentes reacciones en las que se varió el tiempo de reacción entre 5, 15 y 30 minutos, utilizando en todo caso 2 miligramos de producto ICJ1707-01. Se obtuvieron los siguientes cromatogramas con detector de radiactividad (Fig. 161-163) (Tablas 36-38).

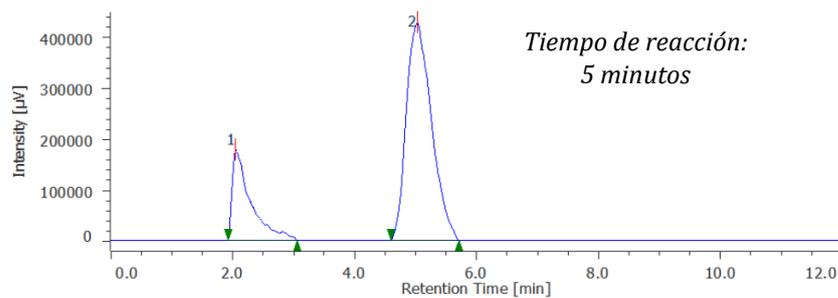


Figura 161: Cromatograma obtenido de la reacción de marcaje después de 5 minutos de reacción en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.

Tabla 36: Resultados cromatográficos de la reacción de marcaje después de 5 minutos de reacción en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.

Producto	Tr (min)	Área	%Área	Altura
1(Galio libre)	2,0	3712245	23,3	177661
2(Galio marcado)	5,1	12214406	76,7	425911

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Marcaje radiactivo

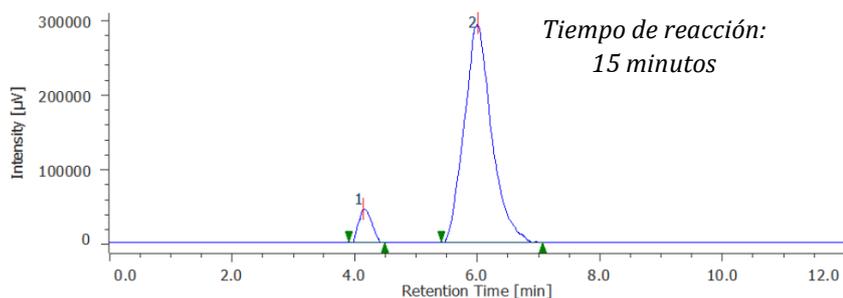


Figura 162: Cromatograma obtenido de la reacción de marcaje radiactivo después de 15 minutos de reacción en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.

Tabla 37: Resultados cromatográficos de la reacción de marcaje radiactiva después de 15 minutos de reacción en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.

Producto	Tr (min)	Área	%Área	Altura
1(Galio libre)	4,1	652671	6,7	44723
2(Galio marcado)	6,0	9049675	93,3	292707

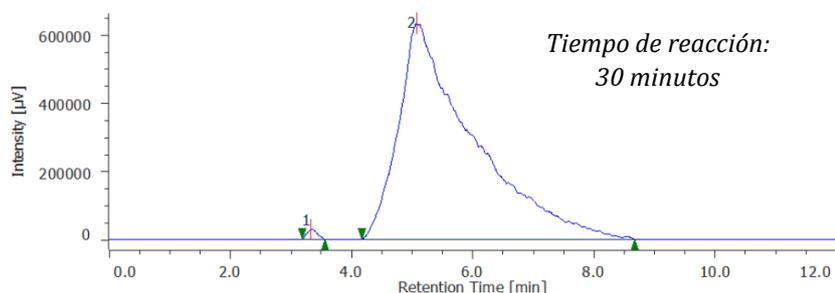


Figura 163: Cromatograma obtenido de la reacción de marcaje radiactivo después de 30 minutos de reacción en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.

Tabla 38: Resultados cromatográficos de la reacción de marcaje radiactiva después de 30 minutos de reacción en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.

Producto	Tr (min)	Área	%Área	Altura
1(Galio libre)	3,3	336290	0,6	28386
2(Galio marcado)	5,1	53776177	99,4	631062

Como se puede observar en los cromatogramas y tablas anteriores, con un tiempo de reacción de 30 minutos se llega a conseguir cerca de un 100 % de pureza radioquímica, sin necesitar una etapa de purificación adicional.

Una vez optimizado el procedimiento de marcaje en relación con el tiempo de reacción se procedió a disminuir la cantidad de producto ICJ1707-01 para marcar. De esta manera, se repitió el mismo proceso utilizando 1 microgramo de producto. Como se puede observar en la siguiente tabla, se llegó a conseguir una pureza radioquímica aún mayor que el obtenido con 2 microgramos; lo que supone una mejora muy interesante debido a que es posible conseguir mejores resultados con la presencia de una cantidad menor de producto sin marcar en el medio (Fig. 164) (Tabla 39).

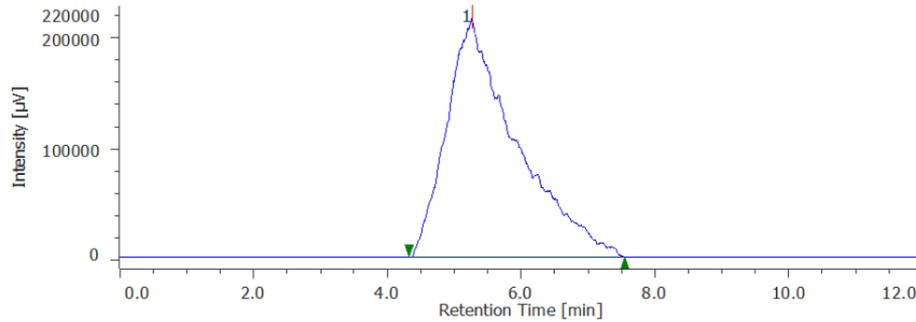


Figura 164: Cromatograma obtenido de la reacción de marcaje radiactivo de 1 µg de ICJ1707-01 después de 30 minutos de reacción en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.

Tabla 39: Resultados cromatográficos de la reacción de marcaje radiactivo de 1 µg de ICJ1707-01 después de 30 minutos de reacción en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.

Producto	Tr (min)	Área	%Área	Altura
1(Galio marcado)	5,3	15422673	100	215102

Se ha conseguido un proceso de marcaje con ^{68}Ga que da lugar a un compuesto marcado con una pureza radioquímica suficiente como para utilizarse de forma directa en experimentación con animales.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización biológica

Caracterización biológica

Utilizando los compuestos ICJ1805-01 e ICJ1901-01 sintetizados durante la presente Tesis Doctoral, se realizaron diversas pruebas con varias técnicas de diagnóstico por imagen, con el fin de observar los efectos que se podían apreciar tras administrar estos compuestos en ratones macho. La experimentación en PET/TAC se llevó a cabo en el CIEMAT, mientras que las pruebas en iRM se realizaron en el Hospital Nacional de Parapléjicos de Toledo.

Imagen *in vivo* en iRM

Para obtener una buena imagen de las zonas de interés en una técnica como iRM, se ha llevado a cabo un estudio de los parámetros descritos previamente en el capítulo de INTRODUCCIÓN. De esta manera, en primer lugar, se ha realizado el denominado estudio de calibrador (*Phantom*), que consiste en evaluar la relación obtenida al analizar la señal en la escala de gris en función de diferentes concentraciones del medio de contraste. En este caso, se han utilizado concentraciones de los compuestos estudiados ICJ1901-01 e ICJ1911-01 de 0, 1, 3, 10, 25 y 50 mM. Los pocillos con las diferentes concentraciones de los medios de contraste estudiados están colocados siempre de la siguiente manera (Fig. 165):

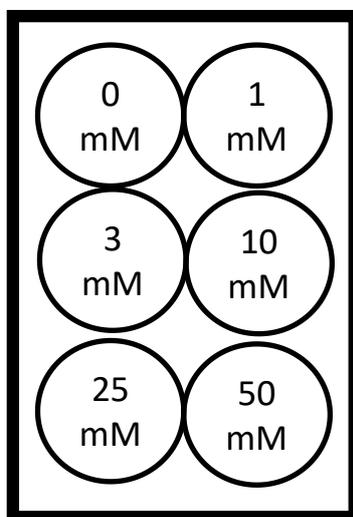


Figura 165: Patrón de colocación de las disoluciones en el estudio de calibrador en iRM.

El primer parámetro estudiado para el uso del producto ICJ1901-01 en medidas de T_1 ha sido el tiempo de repetición T_R . Se han realizado diferentes secuencias con valores desde 35 hasta 1200 ms. La siguiente figura representa la relación estudiada (Fig. 166):

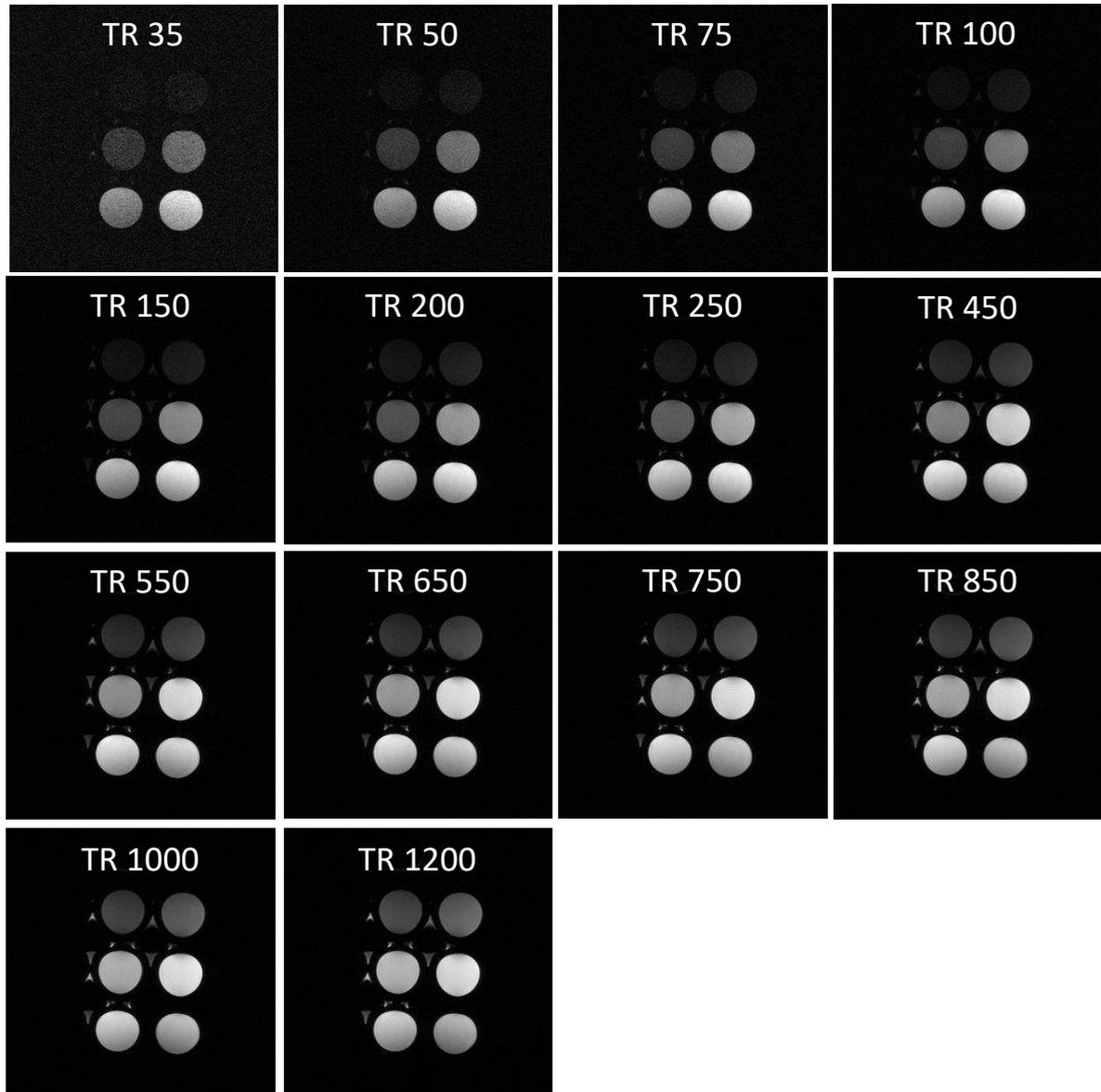


Figura 166: Imágenes de los valores de T_1 al variar T_R en función de la concentración de ICJ1901-01.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización biológica

Para valores de T_R inferiores o iguales a 250 ms, el comportamiento observado coincide con el deseado, debido a que se obtiene un color más claro a medida que aumenta la concentración del producto. Sin embargo, el comportamiento de la serie se distorsiona para valores superiores de T_R , ya que para las disoluciones con una concentración más elevada como son 25 y 50 mM se obtiene una señal más oscura que las anteriores sin seguir con la secuencia de color deseada. Este comportamiento se puede apreciar con mayor claridad en las siguientes gráficas, en las que se muestra la intensidad observada en cada pocillo (Fig. 167 y 168):

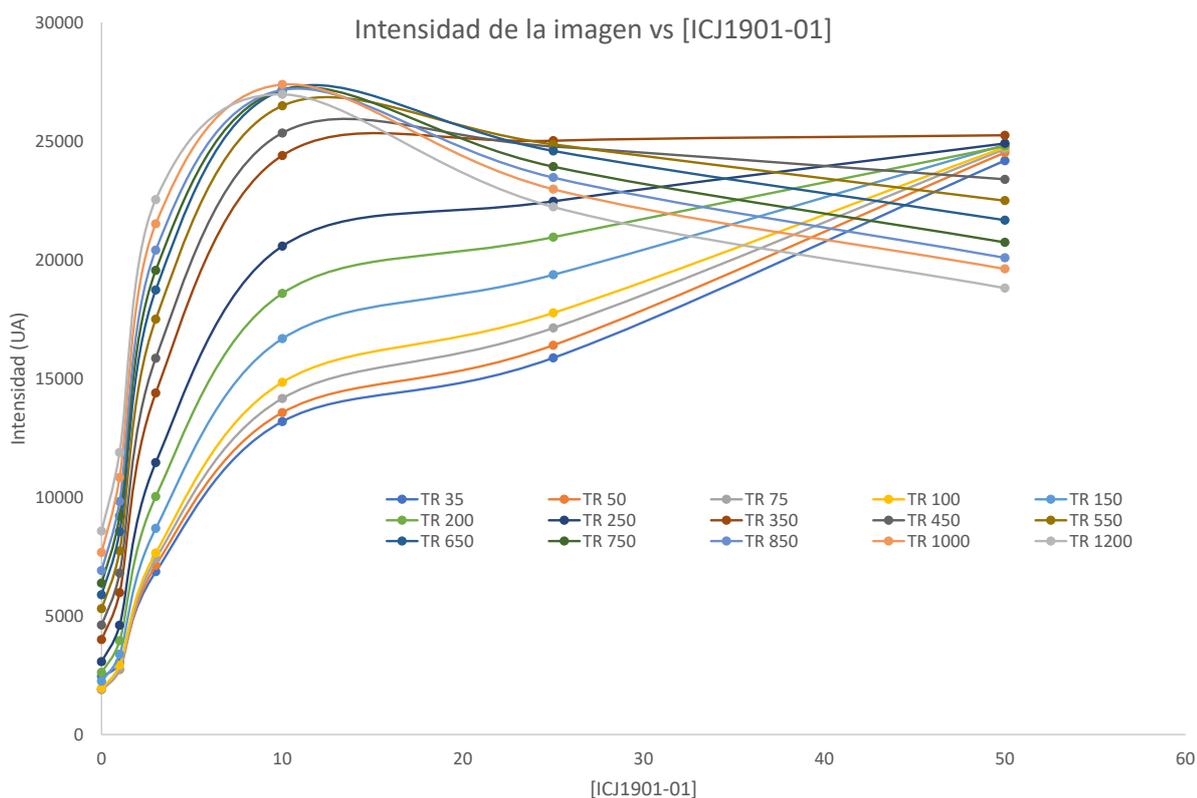


Figura 167: Representación gráfica de la intensidad de T_1 al variar T_R en función de la concentración de ICJ1901-01.

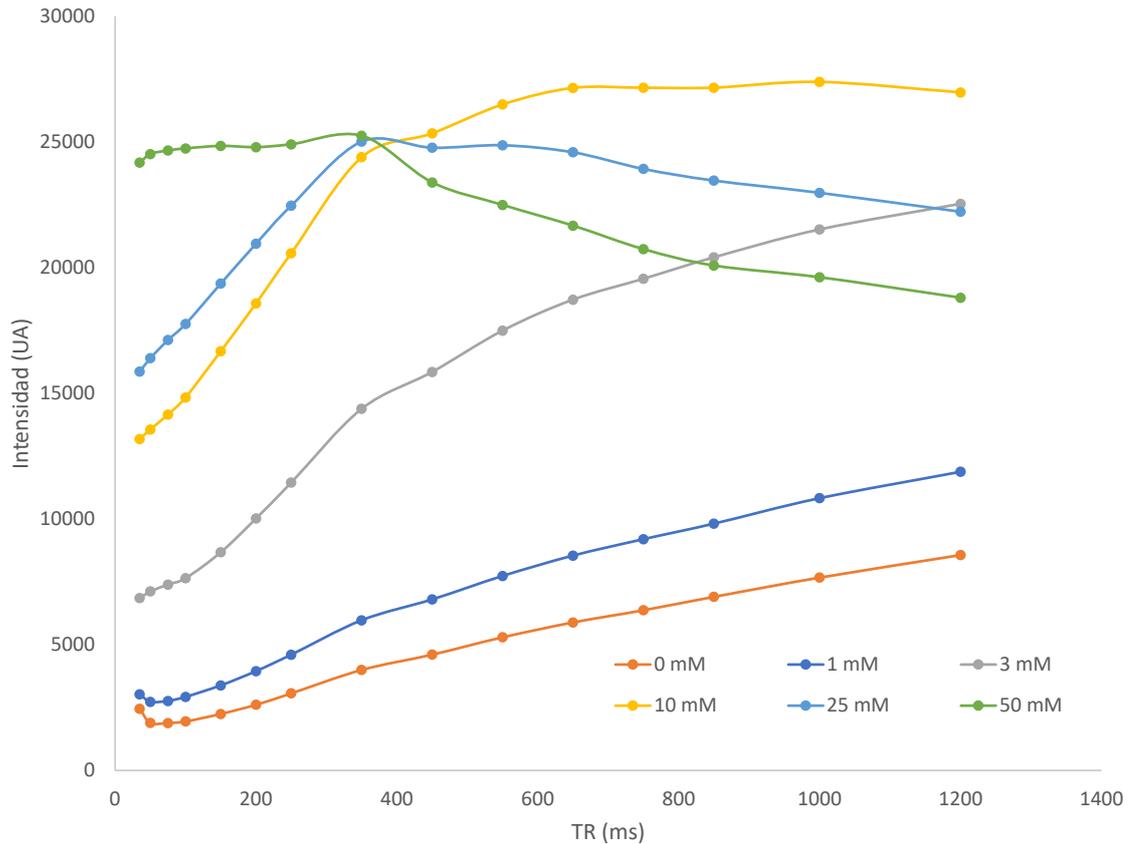


Figura 168: Representación gráfica de la intensidad de T_1 al variar T_R en función de la concentración de ICJ1901-01.

Se puede observar que, cuando T_R es superior a 250 ms, la intensidad obtenida para las concentraciones de 25 y 50 mM es menor que para las concentraciones inferiores. Así, se establece la necesidad de utilizar un valor de T_R igual o menor a 250 ms para conseguir mejores imágenes en esta técnica administrando este compuesto.

Posteriormente, se ha estudiado la relación entre los parámetros T_R y F_A en medidas de T_1 . Se han realizado diferentes secuencias utilizando combinaciones de T_R desde 15 hasta 2000 ms con F_A de 10, 45 y 90°. En las siguientes figuras (Fig. 169-182) se incluyen las imágenes obtenidas con las diferentes combinaciones utilizadas, y las gráficas que relacionan la intensidad de la señal con las concentraciones del producto ICJ1901-01.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización biológica

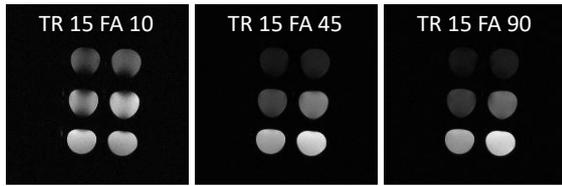


Figura 169: Imágenes del estudio *Phantom* de ICJ1901-01 variando T_R y F_A

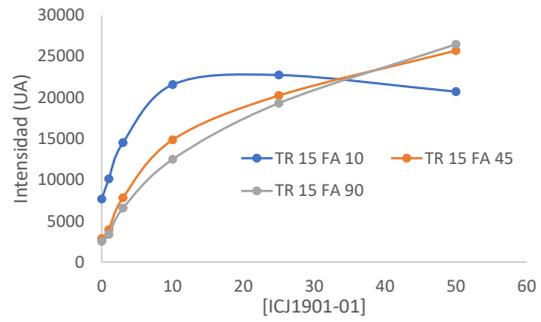


Figura 170: Gráficas del estudio *Phantom* de ICJ1901-01 variando T_R y F_A

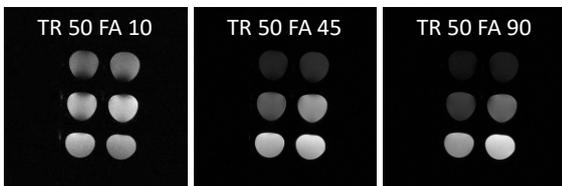


Figura 171: Imágenes del estudio *Phantom* de ICJ1901-01 variando T_R y F_A

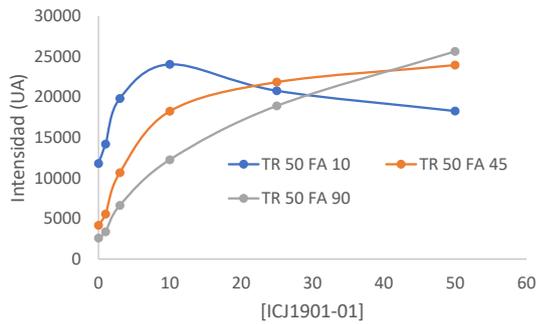


Figura 172: Gráficas del estudio *Phantom* de ICJ1901-01 variando T_R y F_A

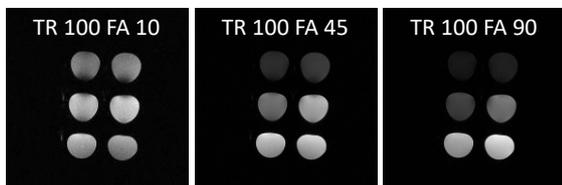


Figura 173: Imágenes del estudio *Phantom* de ICJ1901-01 variando T_R y F_A

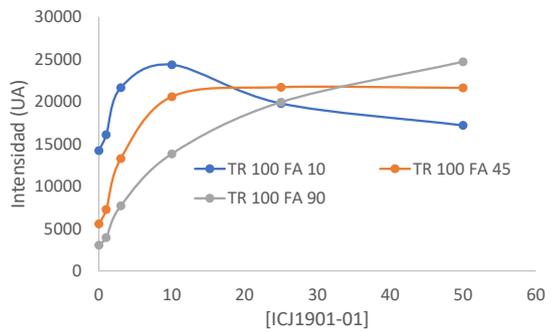


Figura 174: Gráficas del estudio *Phantom* de ICJ1901-01 variando T_R y F_A

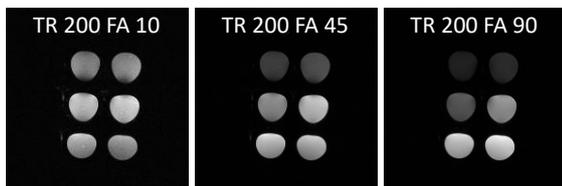


Figura 175: Imágenes del estudio *Phantom* de ICJ1901-01 variando T_R y F_A

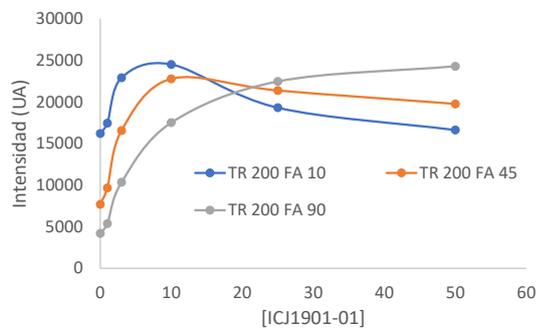


Figura 176: Gráficas del estudio *Phantom* de ICJ1901-01 variando T_R y F_A

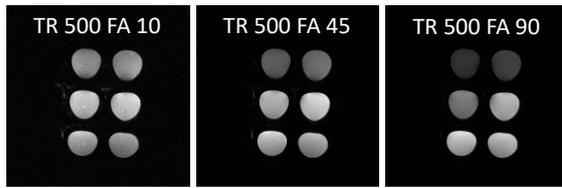


Figura 177: Imágenes del estudio *Phantom* de ICJ1901-01 variando T_R y F_A

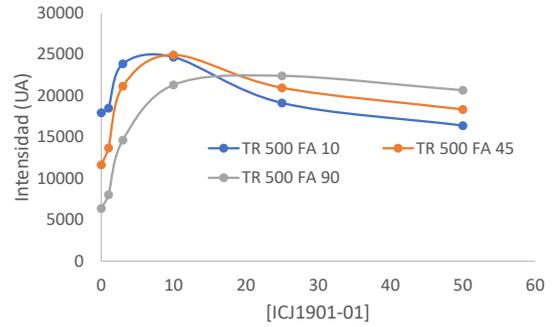


Figura 178: Gráficas del estudio *Phantom* de ICJ1901-01 variando T_R y F_A

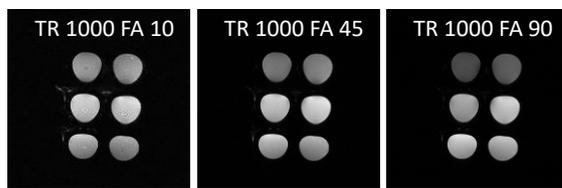


Figura 179: Imágenes del estudio *Phantom* de ICJ1901-01 variando T_R y F_A

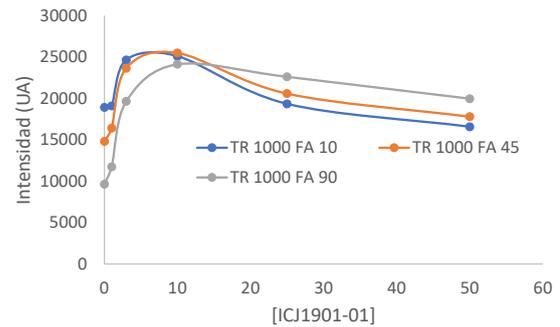


Figura 180: Gráficas del estudio *Phantom* de ICJ1901-01 variando T_R y F_A

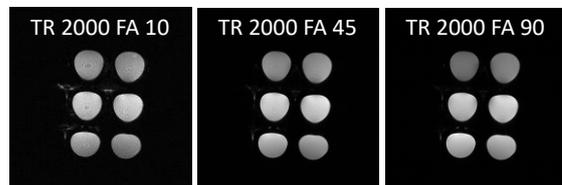


Figura 181: Imágenes del estudio *Phantom* de ICJ1901-01 variando T_R y F_A

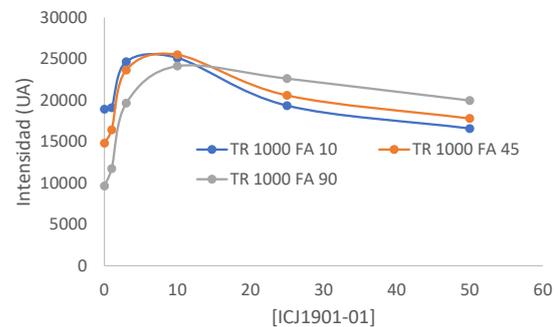


Figura 182: Gráficas del estudio *Phantom* de ICJ1901-01 variando T_R y F_A

Analizando las imágenes, se puede observar un comportamiento similar al del estudio anterior; ya que para valores de T_R superiores a 200 ms, la serie no corresponde al patrón esperado en el que el crecimiento de la concentración origina un aclaramiento mayor en la escala de gris. En cuanto al parámetro de F_A , se observa una mejora de la relación logarítmica estudiada para valores de 90° . De hecho, estudiando los ajustes logarítmicos de las figuras 175 y 176, en las que se muestran resultados para un T_R de 200 ms y ángulos de 10, 45 y 90° en las disoluciones desde 1 hasta 50 mM, se observan coeficientes de correlación (R^2) de 0,03, 0,66 y 0,99, respectivamente. Esto demuestra que para conseguir una mejoría de los valores de T_1 se debe utilizar valores elevados de F_A .

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización biológica

El tercer estudio realizado para el medio de contraste ICJ1901-01, fue para la medida de T_2 variando los parámetros de F_A y el tiempo de eco T_E . Sin embargo, como se observa en las siguientes figuras (Fig. 183 y 184), no se obtuvieron buenos resultados para la medida en T_2 porque en ningún caso se consiguió un patrón de crecimiento o decrecimiento de la intensidad que se ajustase a la concentración del compuesto utilizado en el rango estudiado. Aun así, para el rango de concentraciones entre 0 y 3 mM, en cualquier combinación de T_R y T_E se consigue una secuencia con el patrón deseado y para el intervalo entre 0 y 10 mM se puede utilizar cualquier valor de T_E de los estudiados cuando T_R es 1500 ms.

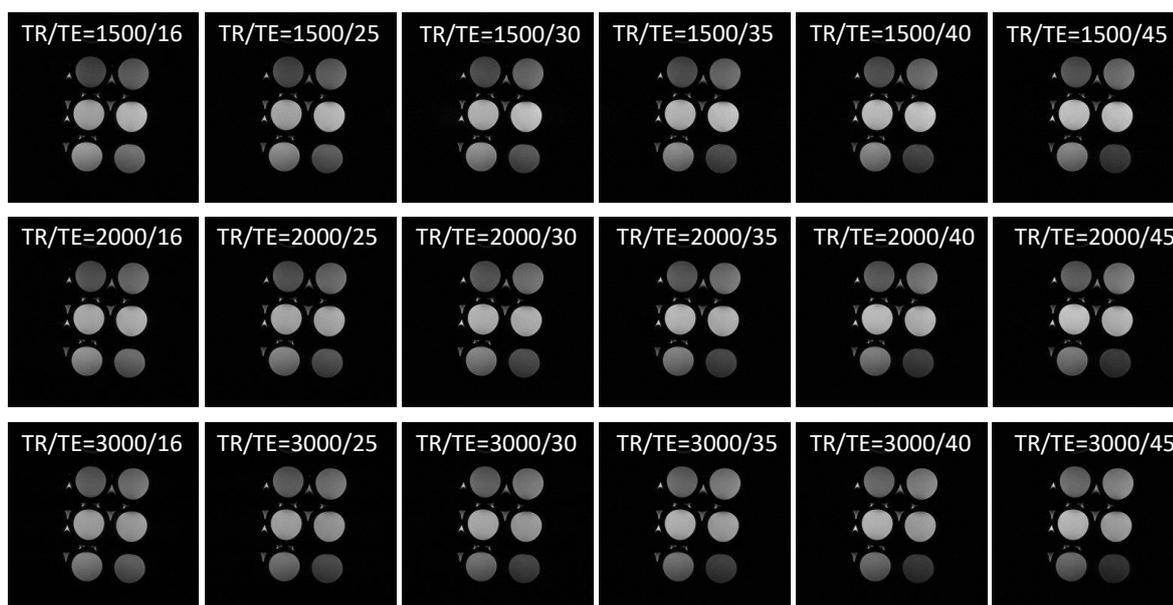


Figura 183: Imágenes de los valores de T_2 al variar T_R y T_E en función de la concentración de ICJ1901-01.

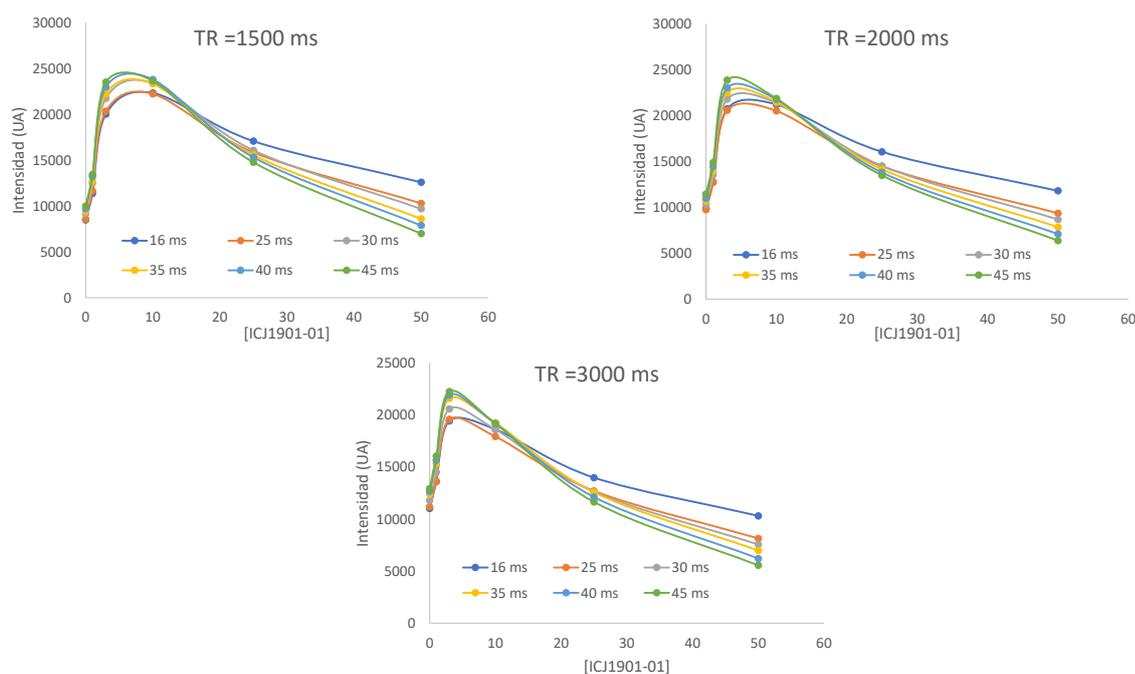


Figura 184: Representación gráfica de la intensidad de T_2 al variar T_R y T_E en función de la concentración de ICJ1901-01.

Por otra parte, también se llevó a cabo un estudio de calibrador para evaluar la posibilidad de usar el compuesto ICJ1911-01 como medio de contraste en iRM, analizando la medida de T_1 . Se han realizado diferentes secuencias para optimizar el parámetro de T_R , utilizando valores desde 35 hasta 1200 ms. En las siguientes figuras (Fig. 185-187) se representa la relación estudiada:

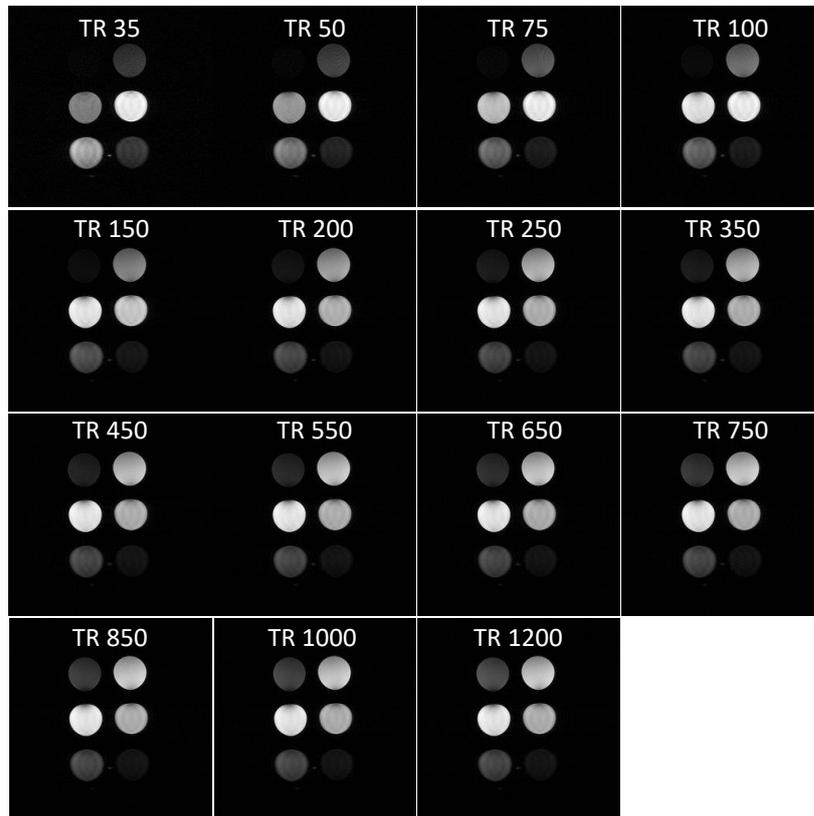


Figura 185: Imágenes de los valores de T_1 al variar T_R en función de la concentración de ICJ1911-01.

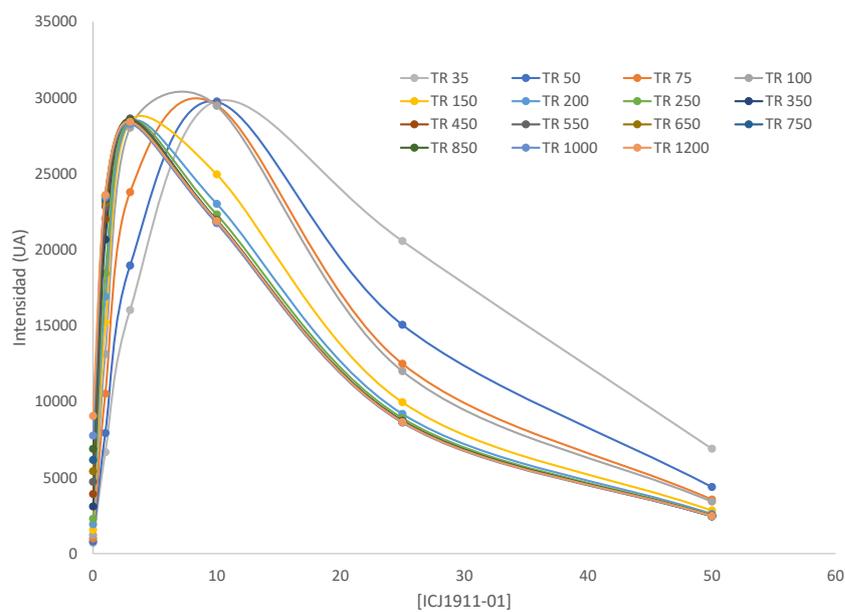


Figura 186: Representación gráfica de la intensidad de T_1 al variar T_R en función de la concentración de ICJ1911-01.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización biológica

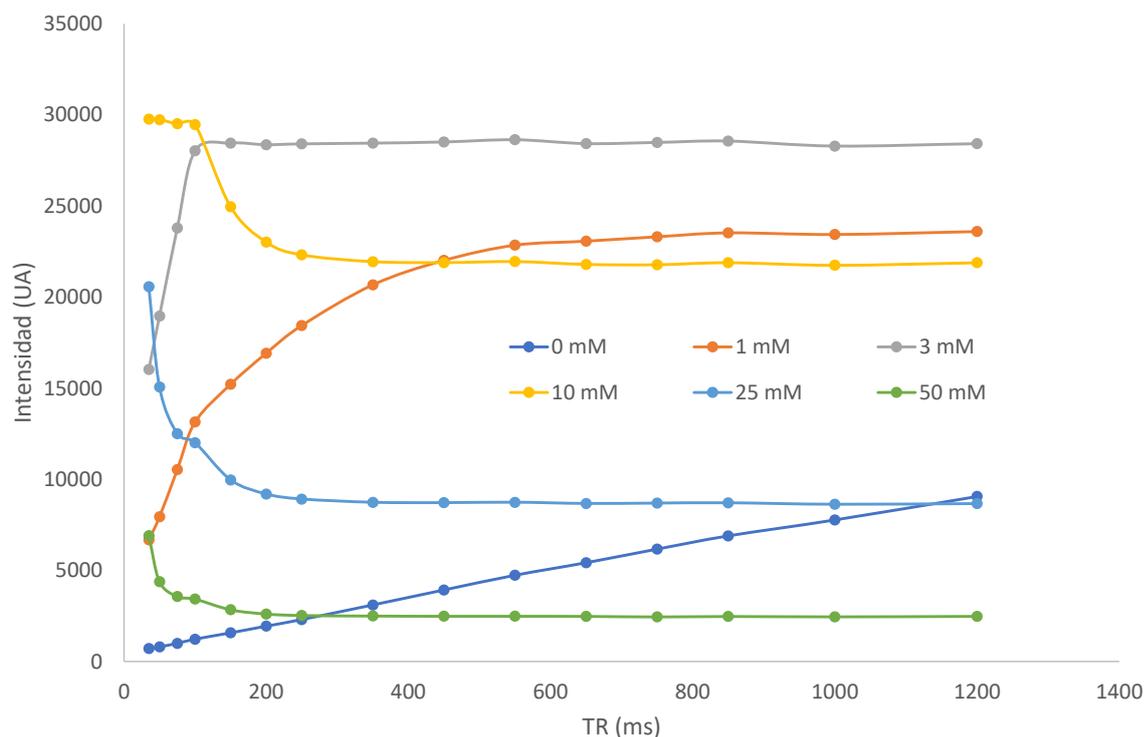


Figura 187: Representación gráfica de la intensidad de T_1 al variar T_R en función de la concentración de ICJ1911-01.

En la imagen de la escala de gris no se observa un patrón de aclaramiento creciente a medida que aumenta la concentración de medio de contraste utilizado. De la misma forma, en las gráficas se puede verificar que no existe una relación coherente para los valores estudiados. Esta diferencia de comportamiento entre el compuesto con europio y el compuesto con gadolinio puede deberse a que el europio tiene un electrón menos que el gadolinio, lo que hace que sus compuestos tengan valores de T_1 inferiores a los que presentan los productos con gadolinio. De hecho, el compuesto con europio ICJ1911-01 se ajusta al patrón de comportamiento esperado para concentraciones entre 0 y 10 mM cuando T_R es igual o inferior a 100 ms.

Una vez estudiados los parámetros comentados anteriormente para evaluar la posibilidad de utilizar los compuestos ICJ1901-01 e ICJ1911-01 como medios de contraste en iRM, se ha realizado un estudio comparativo de los dos compuestos en una misma secuencia; usando 78,3 ms de T_R , 1,5 ms para T_E , 90° de F_A y las mismas concentraciones comentadas anteriormente. Se obtienen las siguientes imágenes en las que se repite el mismo comportamiento observado en los anteriores estudios (Fig. 188):

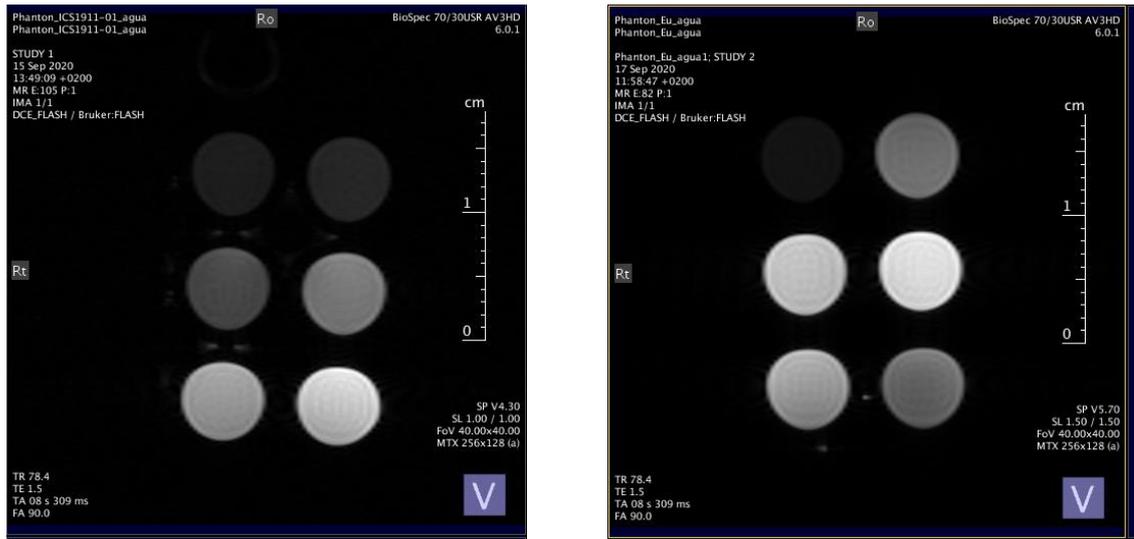


Figura 188: Imágenes obtenidas con el método definitivo en iRM para ICJ1901-01 (izq.) e ICJ1911-01 (der.).

En el estudio *in vivo* se ha repetido durante 70 minutos una secuencia de 0,8 segundos en las mismas condiciones que el último estudio de calibrador comentado, es decir, 78,3 ms de T_R , 1,5 ms para T_E y 90° de F_A . Se han analizado las imágenes de diferentes zonas del interior del cuerpo de cinco ratones después de administrar una disolución del compuesto ICJ1901-01 en una concentración de 0,03 M (0,1 mmol/Kg) (Fig. 189).



Figura 189: Imágenes de un ratón previo al estudio *in vivo* en iRM

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización biológica

La siguiente imagen (Fig. 190), en diferentes cortes del interior del ratón, demuestra que la administración intravenosa del medio de contraste ICJ1901-01 permite la visualización del corazón, el hígado, el estómago, la vejiga y los riñones por iRM:

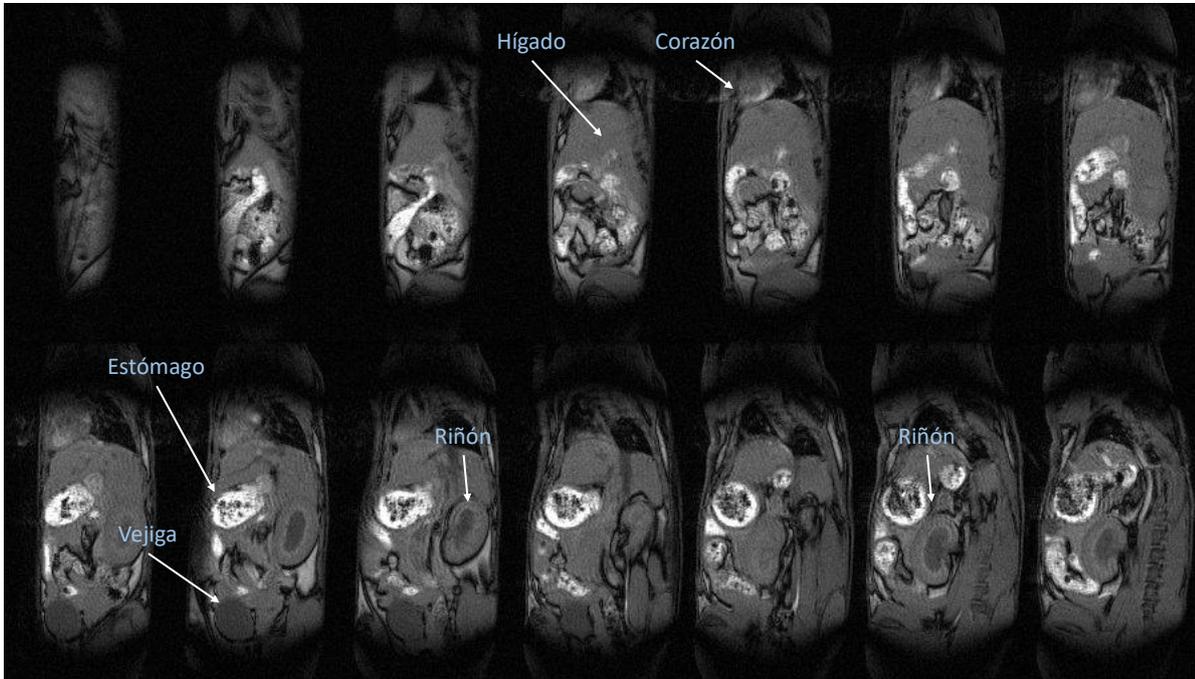


Figura 190: Imágenes de varios cortes de un ratón obtenidas en el estudio de iRM..

También se ha estudiado la distribución y eliminación del producto ICJ1901-01 a lo largo del tiempo. En los diferentes cortes del interior del ratón se puede observar la diferencia entre las imágenes obtenidas antes de la administración del compuesto (basal) y transcurridos 2 y 72 minutos después de la administración. Se puede apreciar que a tiempos cortos existe una buena visualización del hígado y sus conductos hepáticos, además de los riñones. Estos últimos mantienen la capacidad de ser visualizados 72 minutos después de la administración (Fig. 191).

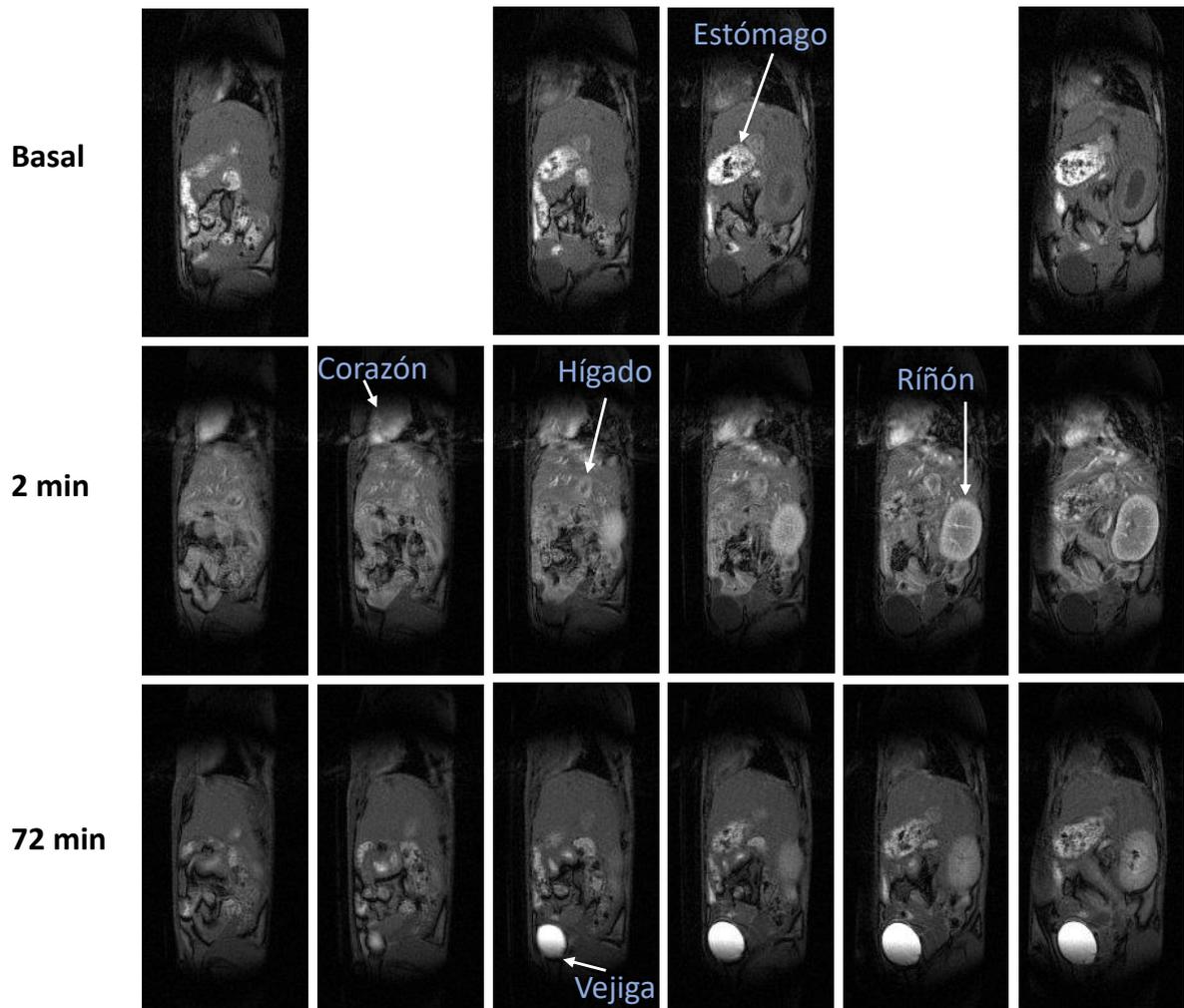


Figura 191: Imágenes de varios cortes de un ratón obtenidas en el estudio de iRM a diferentes tiempos

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización biológica

A continuación, se analiza un mismo corte del animal en el estado basal, a los 12 y 24 minutos después de la administración. Tras la administración se pueden visualizar los riñones y la eliminación del producto a la vejiga (Fig. 192).

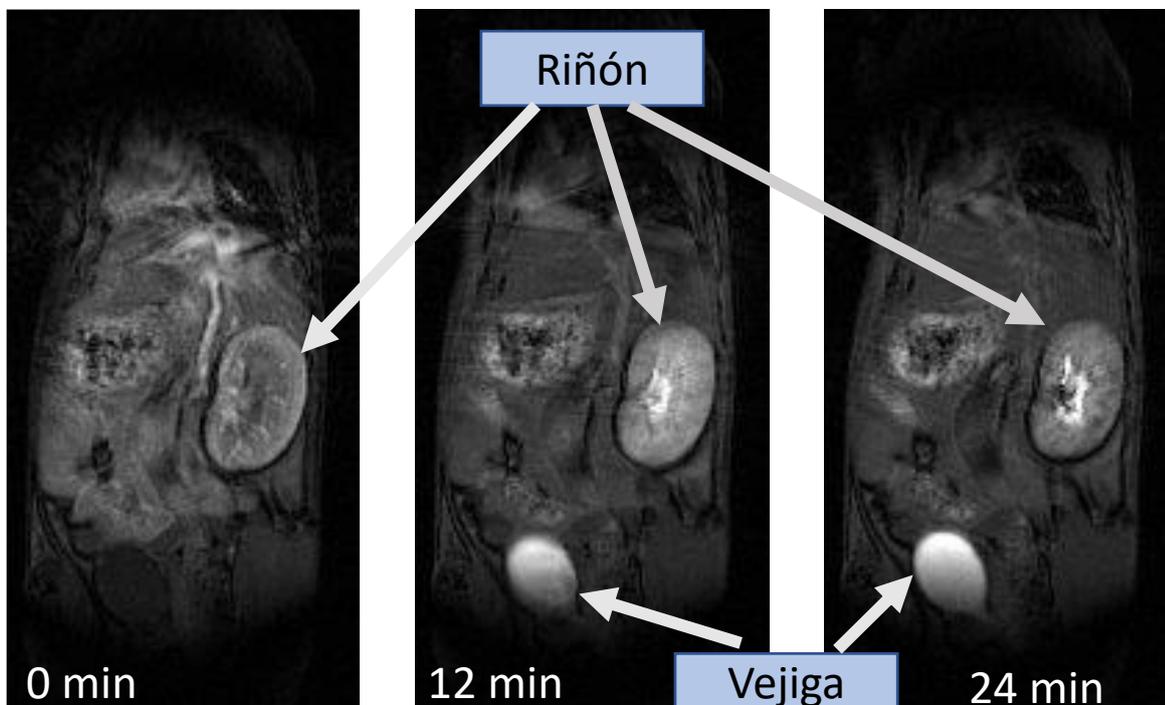


Figura 192: Estudio de las imágenes de riñón en iRM.

Existe la posibilidad de cuantificar la intensidad de la señal en una ROI, definida por el órgano a estudiar en cada caso. En la siguiente gráfica se muestra que, tanto la distribución en los riñones como la eliminación en la vejiga son de tipo exponencial (Fig. 193):

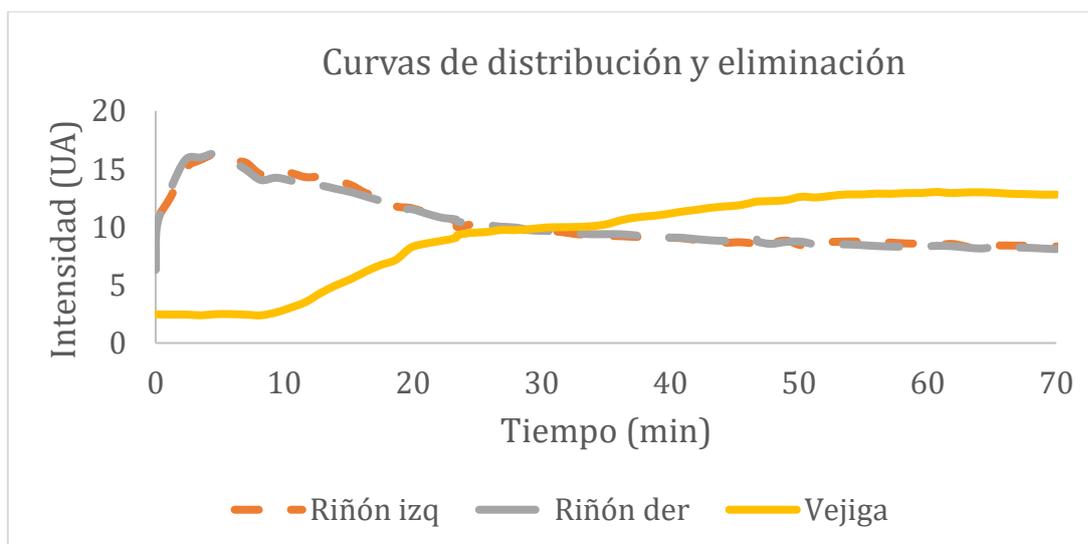


Figura 193: Representación gráfica de la distribución y eliminación del producto ICJ1901-01 en el tiempo en iRM para vejiga y los riñones.

Si se analiza en profundidad el siguiente corte del cuerpo del ratón incluido en la secuencia de imágenes representada en la Figura 191, se puede ver que a tiempos cortos (2 minutos) se consigue la visualización del hígado y los conductos hepáticos (Fig. 194).

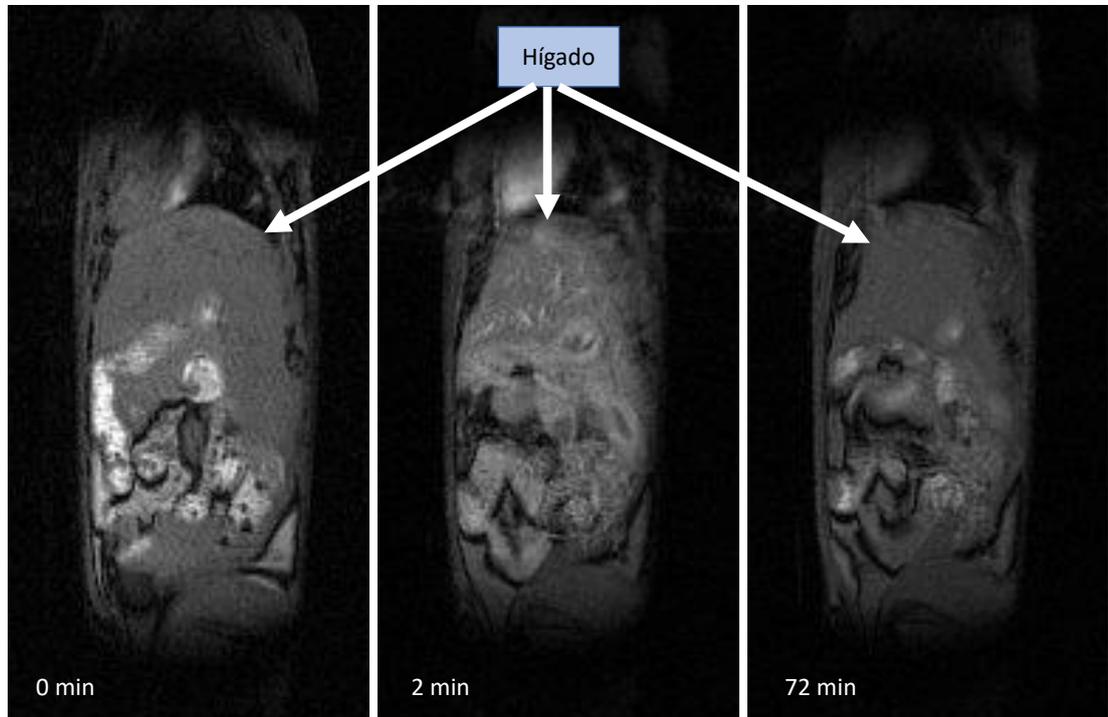


Figura 194: Estudio de las imágenes del hígado en iRM

Al igual que para los riñones y la vejiga, analizando la intensidad del ROI definido por el hígado durante los 70 minutos de toma de datos, se observa una distribución también de tipo exponencial (Fig. 195).

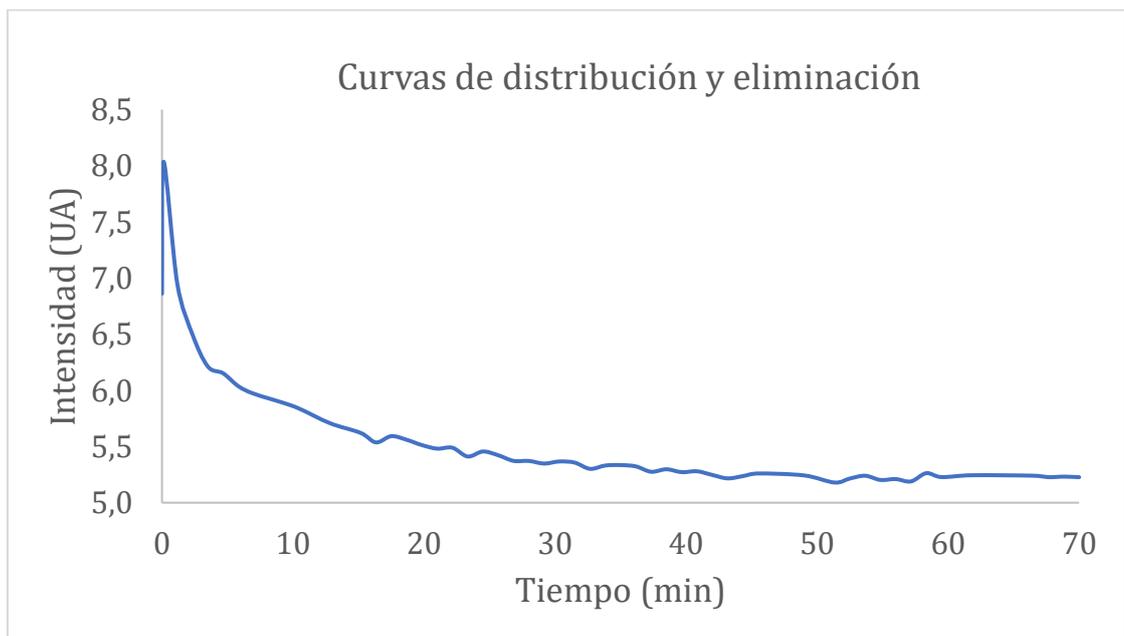


Figura 195: Representación gráfica de la distribución y eliminación del producto ICJ1901-01 en el tiempo en iRM para el hígado.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización biológica

Imagen *in vivo* en PET/TAC

El producto ICJ1805-01, que se obtiene según el procedimiento de marcaje con galio-68 radiactivo comentado anteriormente, permite obtener imágenes de las zonas interiores del cuerpo cuando se utiliza un equipo de PET (Fig. 196).

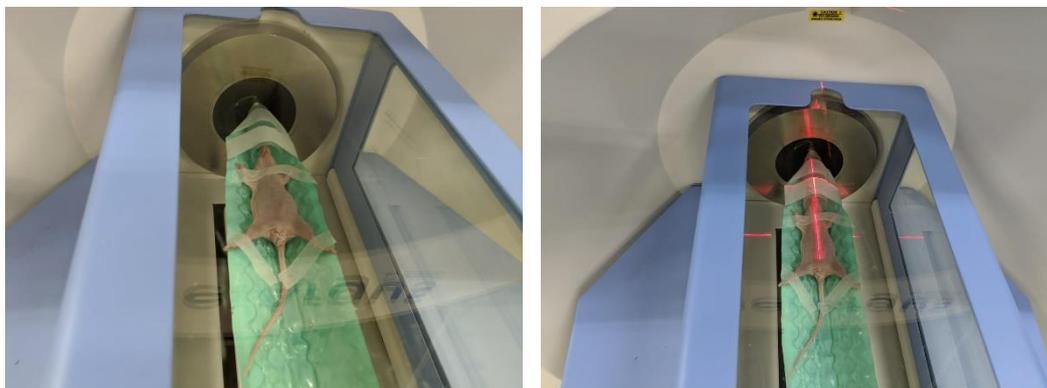


Figura 196: Imágenes de un ratón previo al estudio *in vivo* en PET/TAC.

En función de la cantidad de producto que se administra, puede modificarse la distribución y eliminación del medio de contraste en los órganos y otras zonas de interés del interior del cuerpo. Se han diseñado diferentes experimentos en los que se han tomado imágenes en un equipo de PET/TAC variando la dosis del compuesto ICJ1805-01.

Experimento 1

Se marca 1 nmol del producto ICJ1707-01 con galio-68 según el procedimiento de marcaje radiactivo descrito en MATERIALES Y MÉTODOS y se preparan varias jeringas de unos 100 μ L, obteniendo unas actividades medidas de 8,54 y 5,92 MBq.

Después de realizar una imagen del estado basal en TAC, se inyectan las jeringas cargadas con anterioridad a 2 ratones (la actividad inyectada a cada ratón es de 6,55 y 1,45 MBq) y se realiza el primer estudio dinámico en PET durante 20 minutos, finalizando con la adquisición de la imagen en TAC. En este caso la cantidad del producto administrado es del orden de 2 ng.

En la siguiente figura (Fig. 197) se muestran las imágenes PET/TAC de la prueba en la que se administra una mayor actividad (6,55 MBq), diferenciando la imagen de los valores acumulados de actividad para cada uno de los periodos de 5 minutos analizados. Se observa que la administración del compuesto ICJ1805-01 permite la visualización del corazón, hígado, vejiga y riñones a través de PET.

Ensayo 1

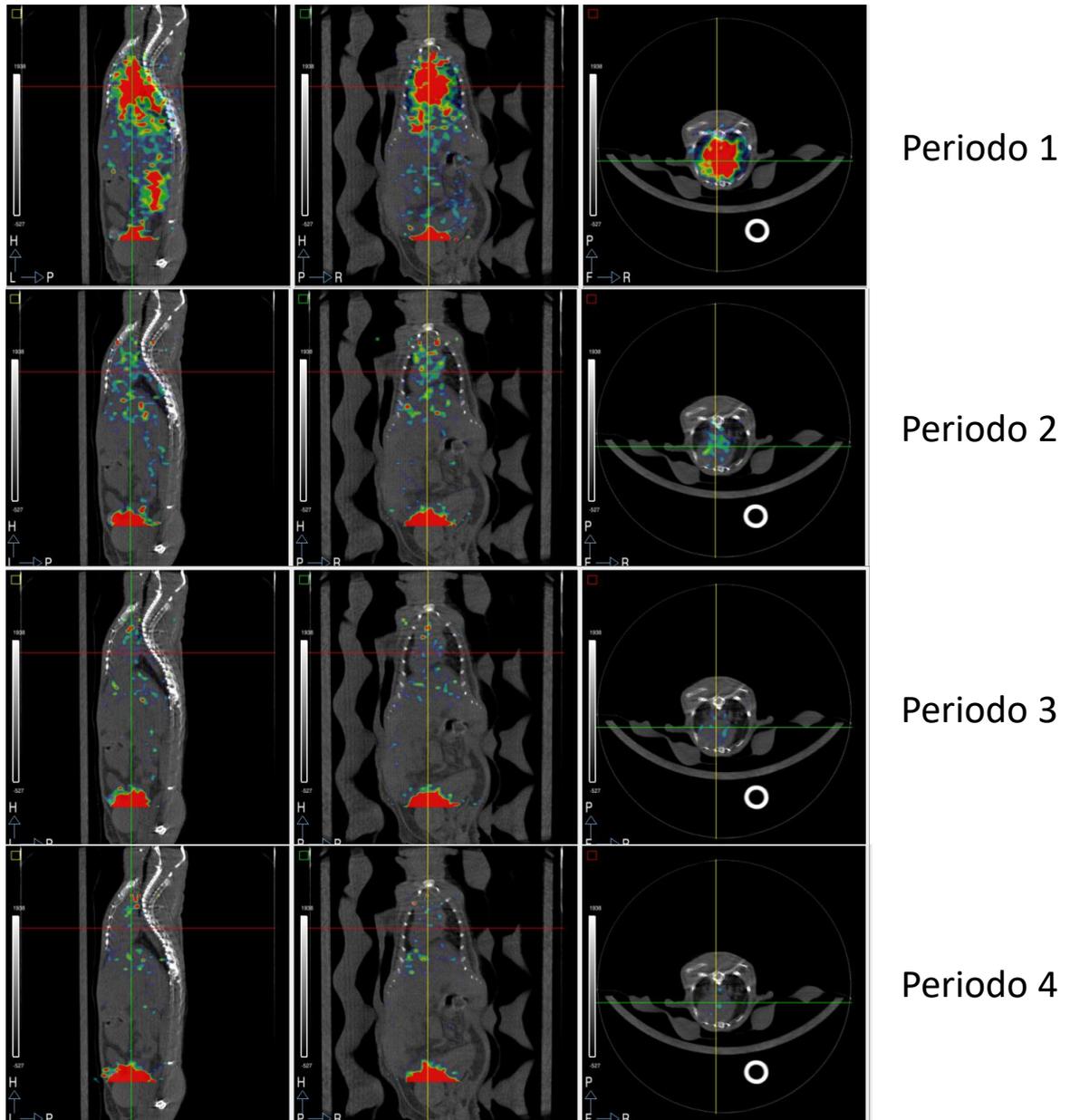


Figura 197: Imágenes obtenidas en el experimento 1 en PET/TAC

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización biológica

De una forma más detallada, en las siguientes imágenes (Fig. 198-200) de diferentes cortes del ratón obtenidas al analizar el acumulado total al final del estudio dinámico, se pueden apreciar con mayor resolución los órganos destacados en este estudio como son el corazón, el hígado, los riñones y la vejiga.

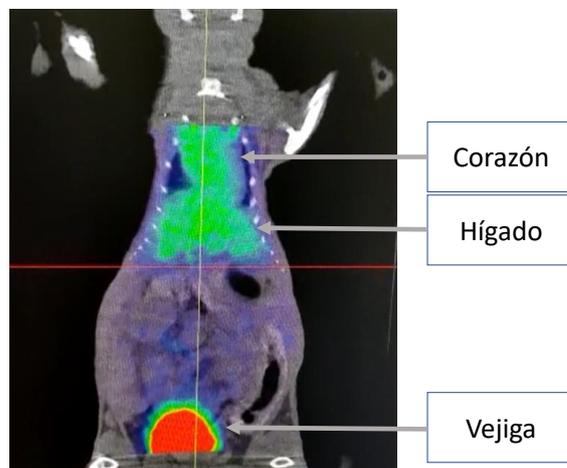


Figura 198: Imagen de la actividad total acumulada en un corte de un ratón obtenidas en el estudio de PET/TAC.

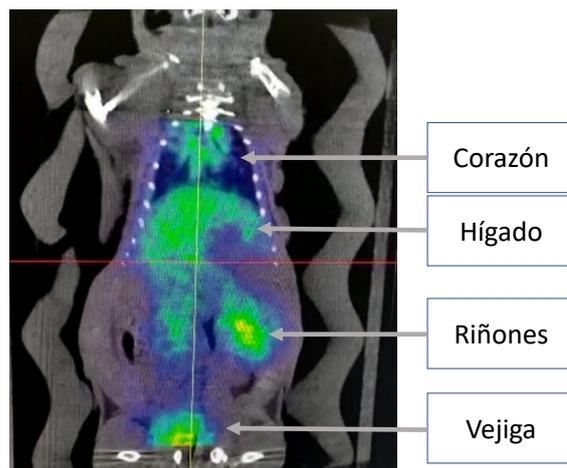


Figura 199: Imagen de la actividad total acumulada en un corte de un ratón obtenidas en el estudio de PET/TAC.

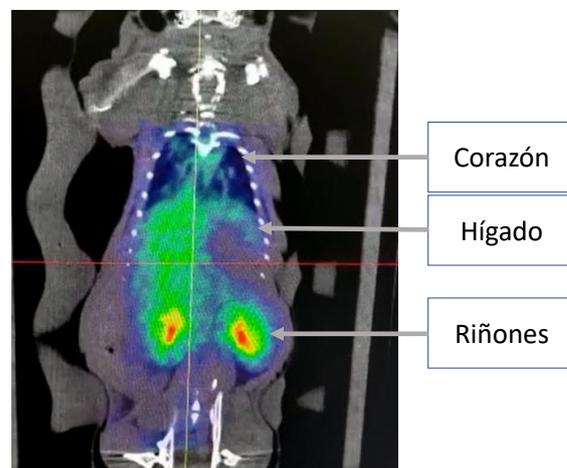


Figura 200: Imagen de la actividad total acumulada en un corte de un ratón obtenidas en el estudio de PET/TAC.

Experimento 2

Se marca 1 nmol del producto ICJ1707-01 con galio-68 según el procedimiento de marcaje radiactivo descrito en MATERIALES Y MÉTODOS. Se preparan varias jeringas de unos 150 μ L de una disolución compuesta por 50 μ L de la disolución obtenida según el proceso de marcaje radiactivo (ICJ1805-01 con galio-68), y 100 μ L de una disolución del compuesto ICJ1805-01 con galio "frío" en una concentración de 0,3 M (dosis equivalente a la utilizada en la administración de medios de contraste en exploraciones radiológicas, 1 mmol/Kg). En las jeringas se obtienen unas actividades medidas de 3,03 y 3,14 MBq.

Después de realizar una imagen del estado basal en TAC, se inyectan las jeringas cargadas con anterioridad a 2 ratones (la actividad inyectada a cada ratón es de 1,06 y 0,32 MBq) y se realiza el segundo estudio dinámico en PET durante 20 minutos, finalizando con la adquisición de la imagen en TAC. En este caso la cantidad del producto administrado es de 32 mg.

En la figura 201 se observan las imágenes PET/TAC de la prueba en la que se administra una mayor actividad (1,06 MBq), diferenciando la imagen de los valores acumulados de actividad para cada uno de los periodos de 5 minutos analizados. De la misma forma que en el experimento 1, la administración del compuesto permite la visualización del corazón, el hígado, los riñones y la vejiga.

Ensayo 2

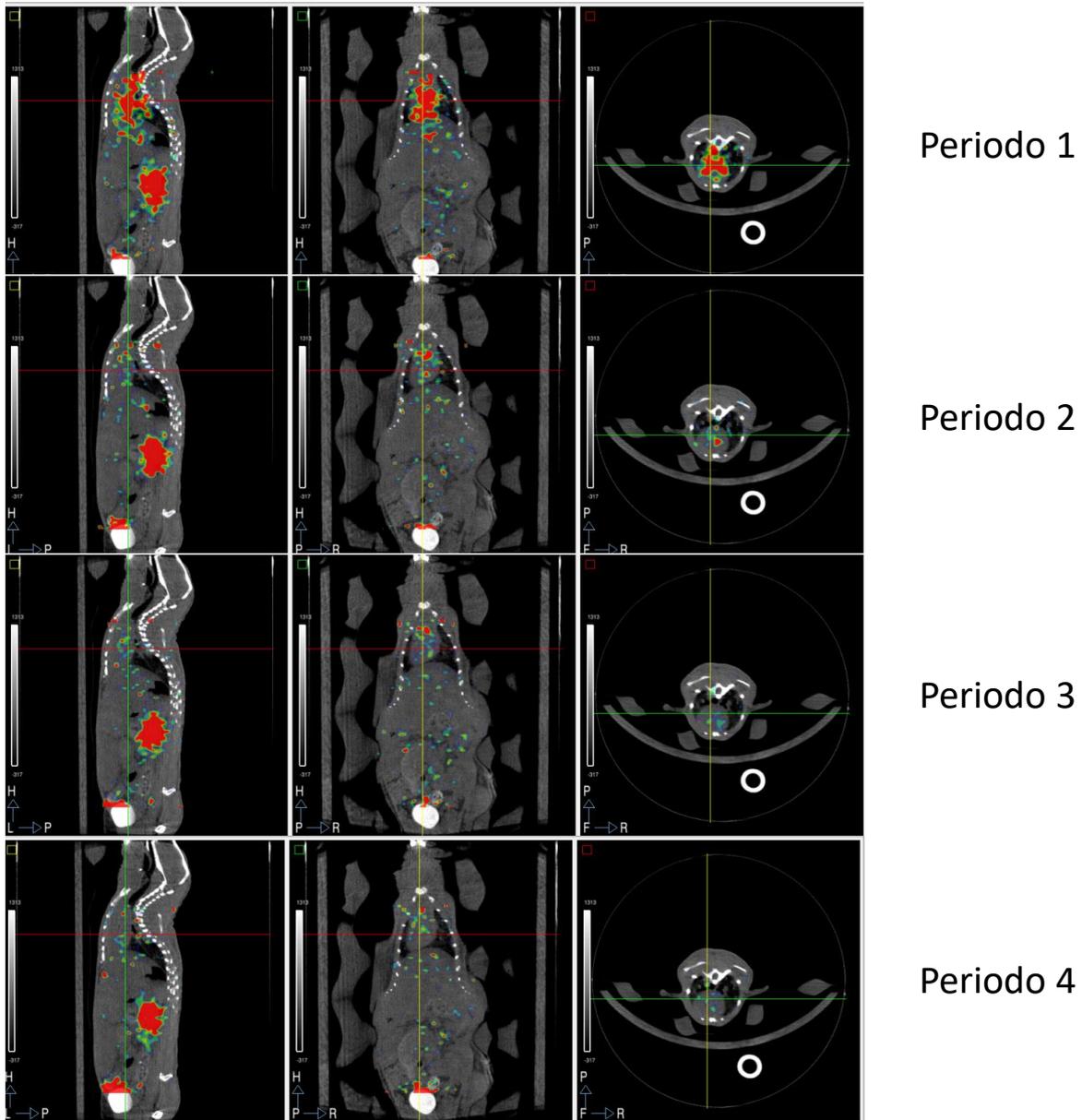


Figura 201: Imágenes obtenidas en el experimento 2 en PET/TAC.

Experimento 3

Se marca 1 nmol del producto ICJ1707-01 con galio-68 según el procedimiento de marcaje radiactivo descrito en MATERIALES Y MÉTODOS. Se preparan varias jeringas de unos 100 μ L de una disolución compuesta por 900 μ L de la disolución obtenida según el proceso de marcaje radiactivo (ICJ1805-01 con galio-68), y 100 μ L de una disolución del compuesto ICJ1805-01 con galio "frío" en una concentración de 0,3 M (dosis equivalente a la utilizada en la administración de medios de contraste en resonancia, 0,1 mmol/Kg). En las jeringas se obtienen unas actividades medidas de 6,29 y 6,69 MBq.

Después de realizar una imagen del estado basal en TAC, se inyectan las jeringas cargadas con anterioridad a 2 ratones (la actividad inyectada a cada ratón es de 4,77 y 2,80 MBq) y se realiza el segundo estudio dinámico en PET durante 20 minutos, finalizando con la adquisición de la imagen en TAC. En este caso la cantidad del producto administrado es de 3,2 mg.

En la figura 202 se observan las imágenes PET/TAC de la prueba en la que se administra una mayor actividad (4,77 MBq), diferenciando la imagen de los valores acumulados de actividad para cada uno de los periodos de 5 minutos analizados. De la misma forma que en los experimentos 1 y 2, aunque con una mayor intensidad en este caso, la administración del compuesto permite la visualización del corazón, el hígado, los riñones y la vejiga.

Ensayo 3

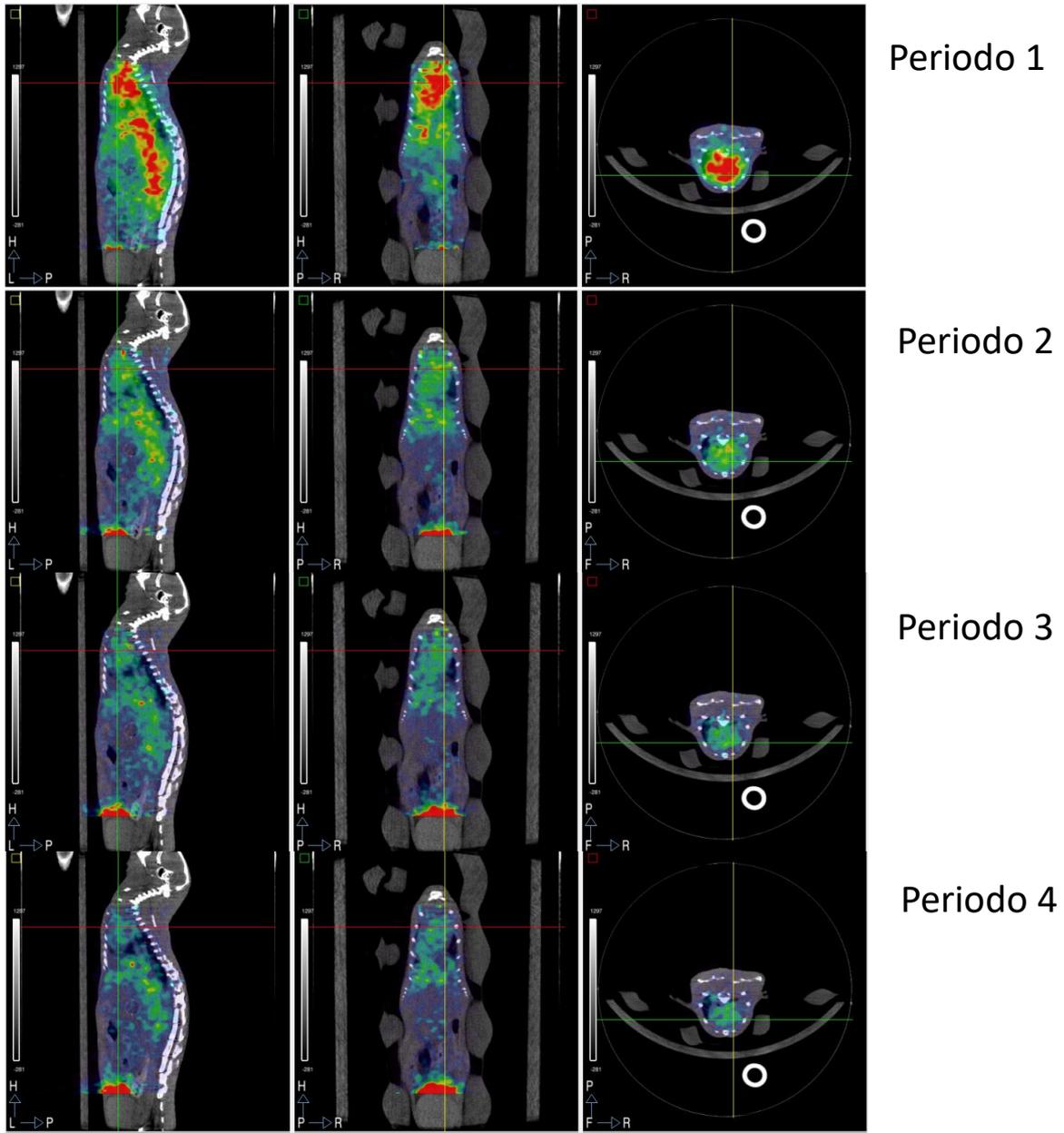


Figura 202: Imágenes obtenidas en el experimento 3 en PET/TAC.

En la figura 203 se comparan las imágenes obtenidas en las que se ha administrado una actividad similar en cada uno de los experimentos (1,45 MBq en el experimento 1, 1,06 MBq en el experimento 2 y 2,80 MBq en el experimento 3):

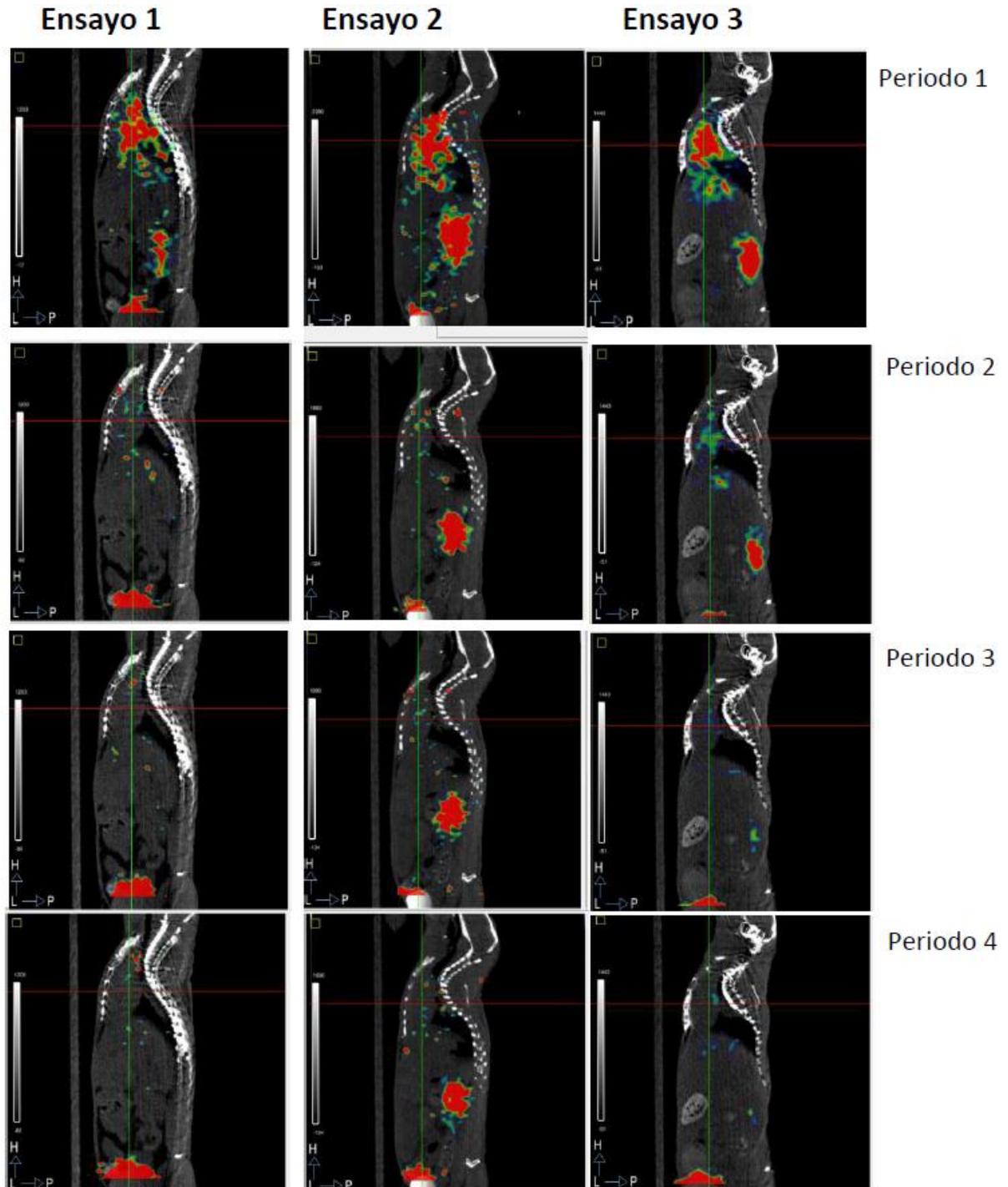


Figura 203: Imágenes PET/TAC obtenidas durante los 20 minutos posteriores a la inoculación de las disoluciones preparadas según se describe en los experimentos 1, 2 y 3.

Se puede apreciar cómo, transcurrido el tiempo, se produce una mayor acumulación en diferentes órganos como los riñones, el hígado o el corazón cuando se utiliza una mayor concentración de los productos administrados.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización biológica

Por otra parte, se ha evaluado la captación media del radiotrazador en las diferentes ROIs a través de los resultados obtenidos en los tres experimentos descritos anteriormente.

Los valores SUV en la ROI definida por el corazón, que sirven para explicar la distribución y eliminación en el torrente sanguíneo, disminuyen de forma exponencial durante los 20 minutos tras la administración del radiotrazador. No existen diferencias significativas cuando al radiotrazador se le añade ICJ1805-01 con galio “frío” en diferentes cantidades (experimentos 2 y 3). Este comportamiento se muestra en la figura 204:

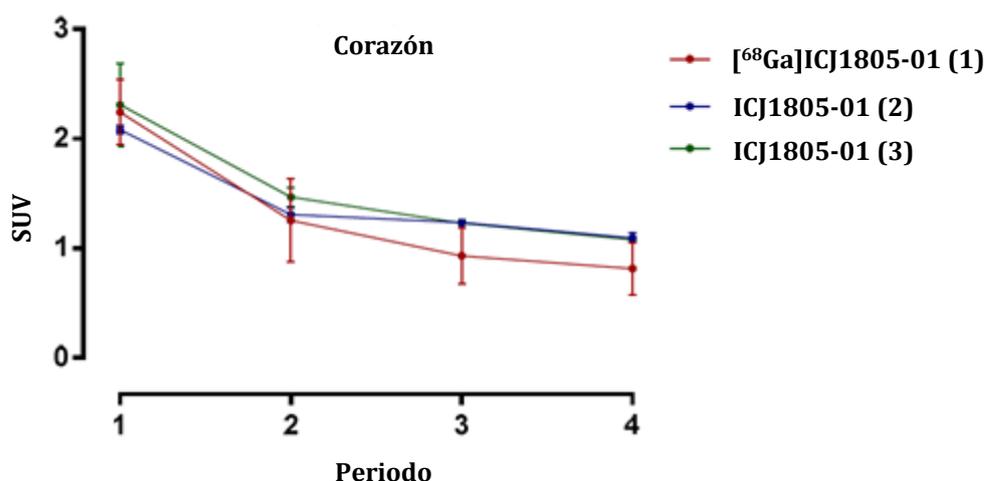


Figura 204: Valores SUV en el corazón obtenidos en los estudios dinámicos para los 3 experimentos.

Los valores SUV en la ROI definida para el hígado también disminuyen de forma exponencial durante los 20 minutos tras la administración del radiotrazador, sin observarse tampoco un comportamiento diferente cuando a este se le añade ICJ1805-01 “frío” en diferentes cantidades (experimentos 2 y 3). Este comportamiento se muestra a continuación en la figura 205:

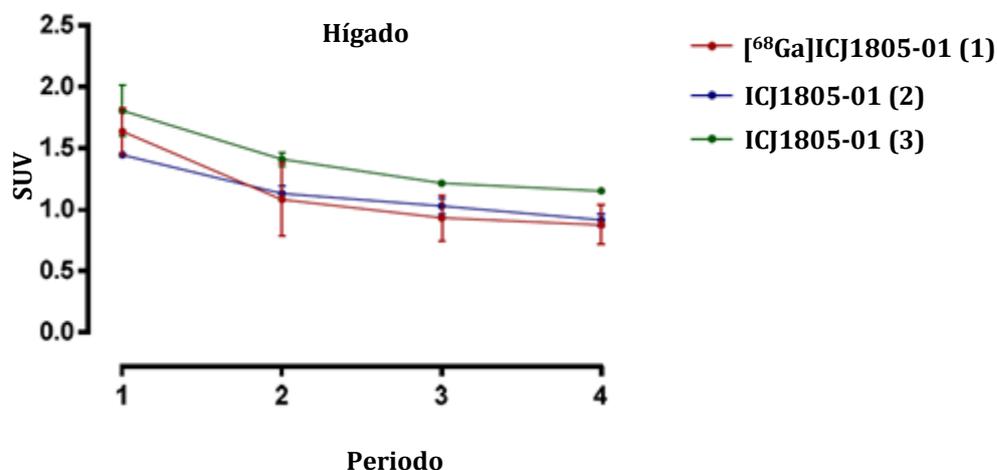


Figura 205: Valores SUV en el hígado obtenidos en los estudios dinámicos para los 3 experimentos.

Los valores SUV en la ROI definida por la vejiga se incluyen en la figura 206, aunque no aportan ninguna información relevante al no poder cuantificar la cantidad total del radiotrazador en toda la vejiga. Este problema existe porque la cama de la imagen en PET no permite definir una ROI completa de toda la vejiga.

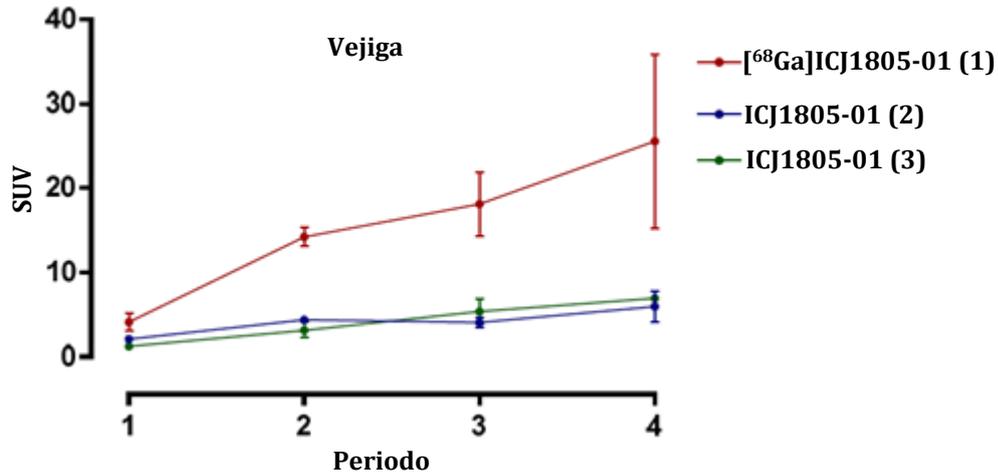


Figura 206: Valores SUV en la vejiga obtenidos en los estudios dinámicos para los 3 experimentos.

La última ROI analizada corresponde a la definida por el riñón, y los valores SUV son los que se muestran en la figura 207. Tal como sucedía con los niveles en el corazón y el hígado, los valores disminuyen exponencialmente cuando se administra el radiotrazador solo (experimento 1) y también en el caso de añadir el compuesto ICJ1805-01 “frío” en una dosis del orden de la utilizada en las exploraciones en iRM (experimento 3). Sin embargo, al añadir ICJ1805-01 “frío” en una dosis del orden de la utilizada en exploraciones radiológicas (experimento 2), los niveles en riñón permanecen prácticamente constantes durante los 20 minutos posteriores a la administración, indicando que puede llegar a existir saturación de los procesos de excreción renal.

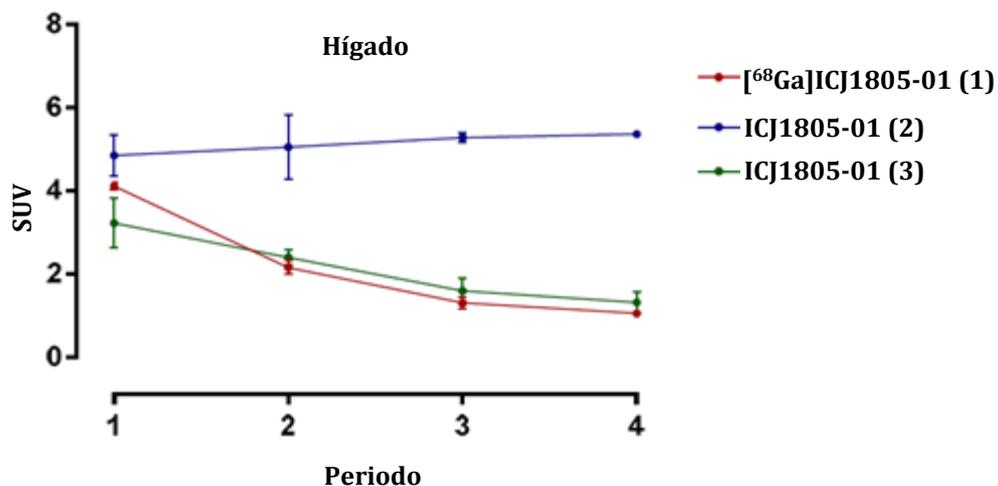


Figura 207: Valores SUV en el riñón obtenidos en los estudios dinámicos para los 3 experimentos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización biológica

Una vez normalizados los resultados obtenidos en los diferentes experimentos de PET/TAC con la cantidad de producto administrada utilizando la actividad específica (S), es posible determinar y relacionar algunos parámetros farmacocinéticos comentados anteriormente en MATERIALES Y MÉTODOS para evaluar el comportamiento del producto en el organismo en las pruebas *in vivo* (Ec. 51).

$$(S) = \frac{\text{Actividad administrada } (\mu\text{Ci})}{\text{Dosis administrada (masa)}} \quad (51)$$

En las representaciones gráficas que se muestran a continuación, se puede demostrar que el modelo que mejor describe la distribución y eliminación del compuesto ICJ1805-01 en el organismo es el bicompartimental, ya que es posible observar las fases de disposición rápida y lenta. El primero de los segmentos, que corresponde a la fase alfa de disposición rápida, está relacionado principalmente con la distribución al compartimento periférico y el retorno de éste. El segundo segmento corresponde a la fase beta de disposición lenta, en la que están implicados procesos de distribución y eliminación, siendo estos últimos los predominantes.

En este caso, se ha estudiado la distribución y eliminación del producto en el torrente sanguíneo (sangre), así como en las vías hepáticas, utilizando las ROIs definidas por el corazón y el hígado respectivamente. Ambos sistemas se ajustan mediante una utilidad para Excel de regresión no lineal ⁽¹⁷²⁾ que permite calcular los parámetros farmacocinéticos según las ecuaciones descritas en el apartado de MATERIALES Y MÉTODOS.

En la figura 208 se puede apreciar que el perfil relacionado con la distribución y eliminación en el torrente sanguíneo después de la administración intravenosa del producto es similar, independientemente de la concentración de producto administrada. En la figura 209, relacionada con la distribución y eliminación del producto por la vía hepática, se puede observar un comportamiento similar al obtenido para el torrente sanguíneo. Posteriormente, se analizarán en profundidad ambos comportamientos a partir de los parámetros farmacocinéticos calculados.

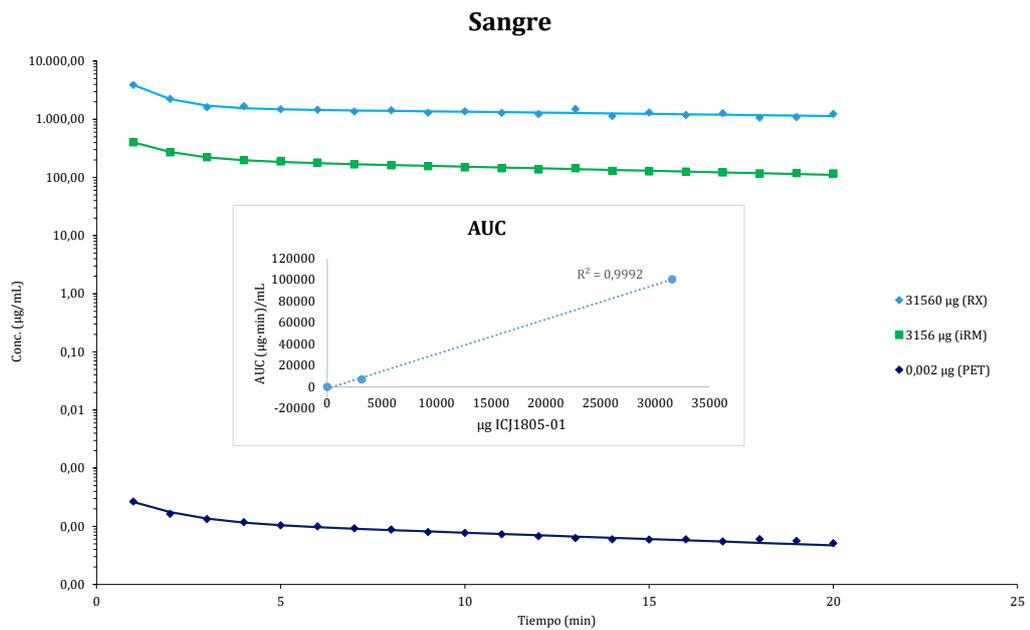


Figura 208: Representación gráfica de la distribución y eliminación del producto ICJ1805-01 en el torrente sanguíneo. Incluye el estudio del parámetro farmacocinético AUC en función de la dosis administrada.

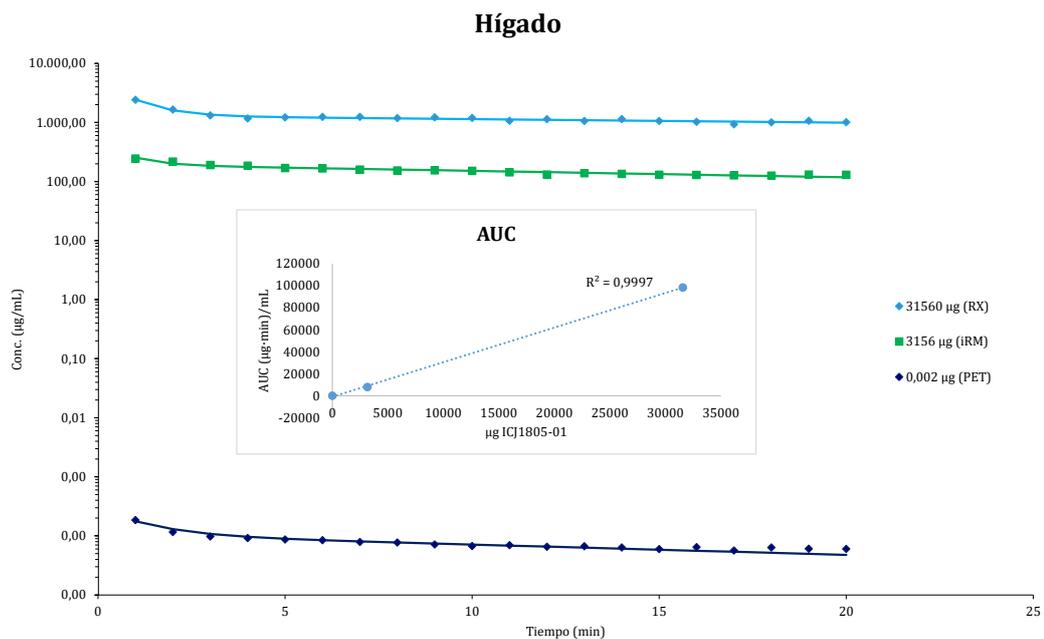


Figura 209: Representación gráfica de la distribución y eliminación del producto ICJ1805-01 en el hígado. Incluye el estudio del parámetro farmacocinético AUC en función de la dosis administrada.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización biológica

Una vez demostrado que la distribución y eliminación del producto se ajusta a un modelo bicompartimental, se pueden determinar una serie de parámetros farmacocinéticos que se describieron previamente en el capítulo de MATERIALES Y MÉTODOS. En la siguiente tabla (Tabla 40) se incluyen los resultados de dichos parámetros para la distribución y eliminación del producto, tanto en la sangre como en el hígado, para las diferentes dosis administradas:

Tabla 40: Parámetros farmacocinéticos determinados.

	Dosis PET (Experimento 1)		Dosis iRM (Experimento 3)		Dosis TAC (Experimento 2)	
	Sangre	Hígado	Sangre	Hígado	Sangre	Hígado
Dosis (µg)	0,002	0,002	3156	3156	31560	31560
A (µg/mL)	0,0003	0,0002	502	270	8045	3908
α (min⁻¹)	0,850	0,850	0,942	1,450	1,240	1,239
B (µg/mL)	0,0001	0,0001	211	195	1598	1308
β (min⁻¹)	0,050	0,040	0,032	0,025	0,017	0,014
C₀ (µg/mL)	0,00046	0,00028	714	465	9643	5217
t_{½α} (min)	0,82	0,82	0,74	0,48	0,56	0,56
t_{½β} (min)	13,86	17,33	21,51	27,55	40,80	50,51
K₂₁ (min⁻¹)	0,273	0,348	0,301	0,623	0,220	0,321
K₁₂ (min⁻¹)	0,471	0,445	0,572	0,794	0,942	0,879
K₁₂/K₂₁	1,723	1,279	1,898	1,276	4,286	2,738
K₁₀ (min⁻¹)	0,155	0,098	0,101	0,059	0,096	0,053
V_c (mL)	4,4	7,2	4,4	6,8	3,3	6,1
V_β (mL)	13,6	17,5	13,8	15,8	18,5	23,4
Cl (mL/min)	0,68	0,70	0,45	0,40	0,31	0,32
AUC (µg·mL⁻¹·min)	0,0029	0,0029	7087	7933	100564	98482

Comparando los parámetros que se han determinado, se puede explicar con mayor conocimiento como es la distribución y eliminación del producto después de la administración del compuesto ICJ1805-01 en diferentes dosis. Analizando la sangre y el hígado se deduce que:

- Además de la similitud observada en los perfiles de distribución y eliminación del producto en la sangre y el hígado, se puede confirmar este comportamiento con los valores de las constantes referidas a cada segmento como son α (distribución) y β (eliminación), siendo estas del mismo orden en ambos casos.
- Se puede confirmar que el producto presenta un claro carácter bicompartimental, aunque no parece que haya una acumulación en los tejidos periféricos. La relación K_{12}/K_{21} es, en todos los casos, superior a 1, lo que indica que el gradiente del producto se establece desde el compartimento central hacia los periféricos.
- Puesto que se puede definir la constante de distribución y eliminación de la sangre ($K_{10 \text{ sangre}}$) como la suma de las constantes de velocidad de eliminación por las diferentes vías de eliminación principales, que suelen ser la hepática y la urinaria; se observa que la eliminación por las vías hepáticas supone un 59% de la eliminación total por lo que existe una acumulación importante en el hígado.
- La cantidad del fármaco que accede a la zona estudiada en ambos casos (circulación sistémica y eliminación por vía hepática), definida por el parámetro de *AUC*, presentan valores del mismo orden para la sangre y el hígado en cada una de las tres concentraciones evaluadas.

Analizando la evolución de estos parámetros en cada órgano en función de la concentración administrada se puede confirmar que:

- Como se representa en las gráficas anteriores, existe una relación lineal entre el parámetro *AUC* y la dosis administrada en los dos sistemas estudiados, siendo $R^2=0,9992$ para la sangre y $R^2=0,9997$ para el hígado. Esto indica que hay una buena linealidad de dosis en todo el rango de las concentraciones administradas.
- Los valores de los parámetros K_{10} y *Cl* en ambos órganos, para las dosis de iRM y TAC, se mantienen prácticamente constantes indicando que el proceso es constante y que no existe un proceso de saturación. En esta comparativa no es recomendable tener en cuenta la dosis de PET por ser demasiado baja.
- La relación K_{12}/K_{21} mayor que la unidad implica que el compuesto se está distribuyendo en toda el agua intracelular profunda y queda retenido de forma más o menos prolongada en depósitos tisulares. Como se observa, este valor aumenta según aumenta la dosis administrada y por lo tanto, esto indica que existe una retención del compuesto en alguna parte del compartimento periférico.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización biológica

Imagen *in vivo* en rayos X (TAC)

Debido a que los compuestos sintetizados ICJ1805-01, ICJ1901-01 e ICJ1911-01 presentan tres átomos de yodo y un metal de elevado peso molecular como galio, gadolinio y europio, respectivamente; dichos productos tienen la capacidad de absorber los rayos X y tienen por ello la posibilidad de ser utilizados en exploraciones de rayos X. Para evaluar esta posibilidad, se ha realizado un estudio de calibrador (*Phantom*), que consiste en evaluar la relación obtenida al analizar la señal en la escala de gris en función de las diferentes concentraciones de cada medio de contraste utilizado. En este caso, las concentraciones utilizadas de los compuestos estudiados ICJ1805-01, ICJ1901-01 e ICJ1911-01 han sido 0,08, 0,30, 1,18, 4,7, 18,8, 75 y 300 mM, colocadas según la figura 210:

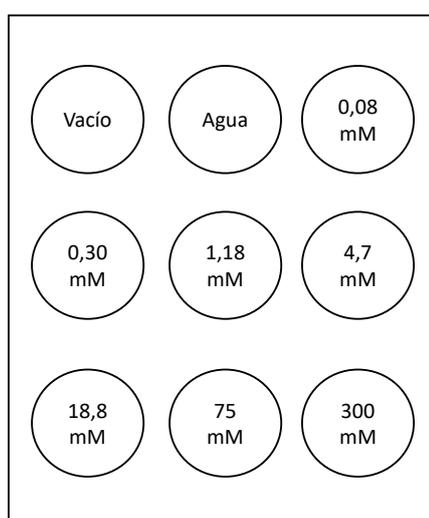


Figura 210: Patrón de colocación de las disoluciones en el estudio de calibrador en rayos X

A continuación, se pueden observar las imágenes obtenidas en el estudio para cada uno de los compuestos (Fig. 211).

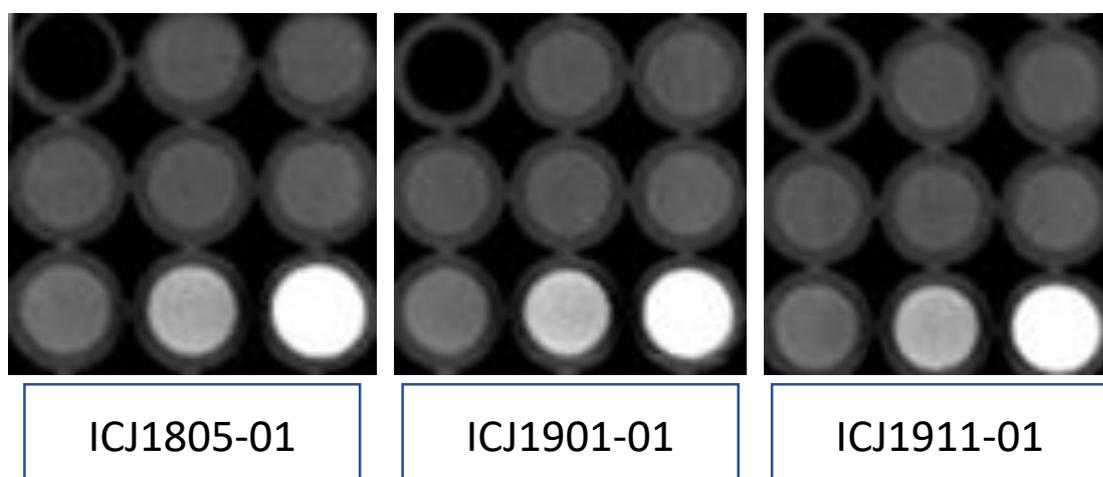


Figura 211: Imágenes obtenidas en el estudio de calibrador (*Phantom*)

Analizando la densidad de las disoluciones (expresada en unidades Hounsfield, HU), se observa que para concentraciones del compuesto por debajo de 1,18 mM la densidad obtenida es similar a la del agua (133 ± 16). La densidad muestra un incremento lineal con la concentración a partir de 4 mM, tal como se muestra en la figura 212.

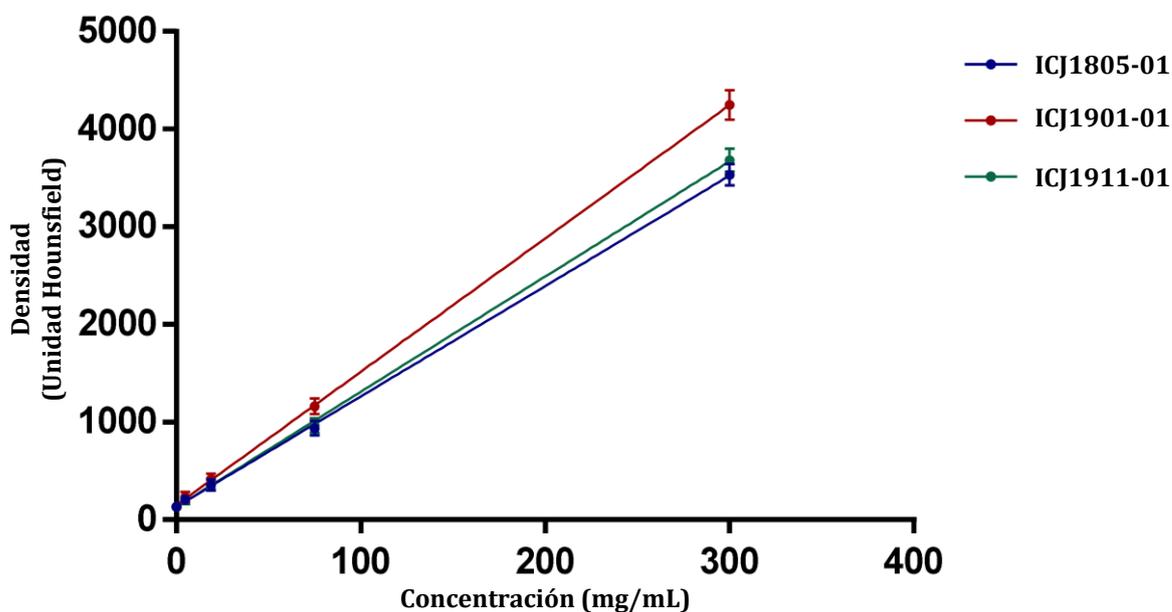


Figura 212: Relación de la señal en función de las concentraciones estudiadas.

Las rectas de regresión obtenidas corresponden a las siguientes ecuaciones:

$$\text{ICJ1805-01} \quad Y = 11,30 \cdot X + 133,1$$

$$\text{ICJ1911-01} \quad Y = 11,80 \cdot X + 130,8$$

$$\text{ICJ1901-01} \quad Y = 13,65 \cdot X + 149,8$$

En el estudio de las pendientes se puede observar, como era de esperar, que existe una relación entre la señal obtenida en rayos X y los números atómicos de los metales que se encuentran en el interior de las estructuras macrocíclicas de los compuestos estudiados. De esta manera, el compuesto que presenta una mayor señal en la técnica de rayos X es el ICJ1901-01 ya que tiene una pendiente superior ($13,65 \pm 0,06$) debido a la presencia de un quelato de gadolinio ($Z=64$), seguido por el compuesto ICJ1911-01 (pendiente $11,80 \pm 0,13$) que presenta un quelato de europio ($Z=63$) y, por último, el compuesto ICJ1805-01 (pendiente $11,30 \pm 0,12$) que presenta un quelato de galio ($Z=31$).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización biológica

En base a estos resultados, se ha realizado un experimento *in vivo* basado en el análisis de imágenes de un ratón después de administrar la disolución del compuesto ICJ1901-01 en una concentración de 0,3 M, consiguiendo de esta forma una dosis equivalente a la utilizada en exploraciones de rayos X (1 mmol/Kg).

La imagen obtenida alrededor de 3 minutos después de administrar el compuesto (aproximadamente lo que se tarda en introducir el animal en el escáner) muestra que el contraste se encuentra en el hígado (aunque con poca señal), en los riñones y en la parte superior de la vejiga que se encuentra más cerca de la camilla, quizás debido esto último a la densidad del compuesto (Fig. 213).

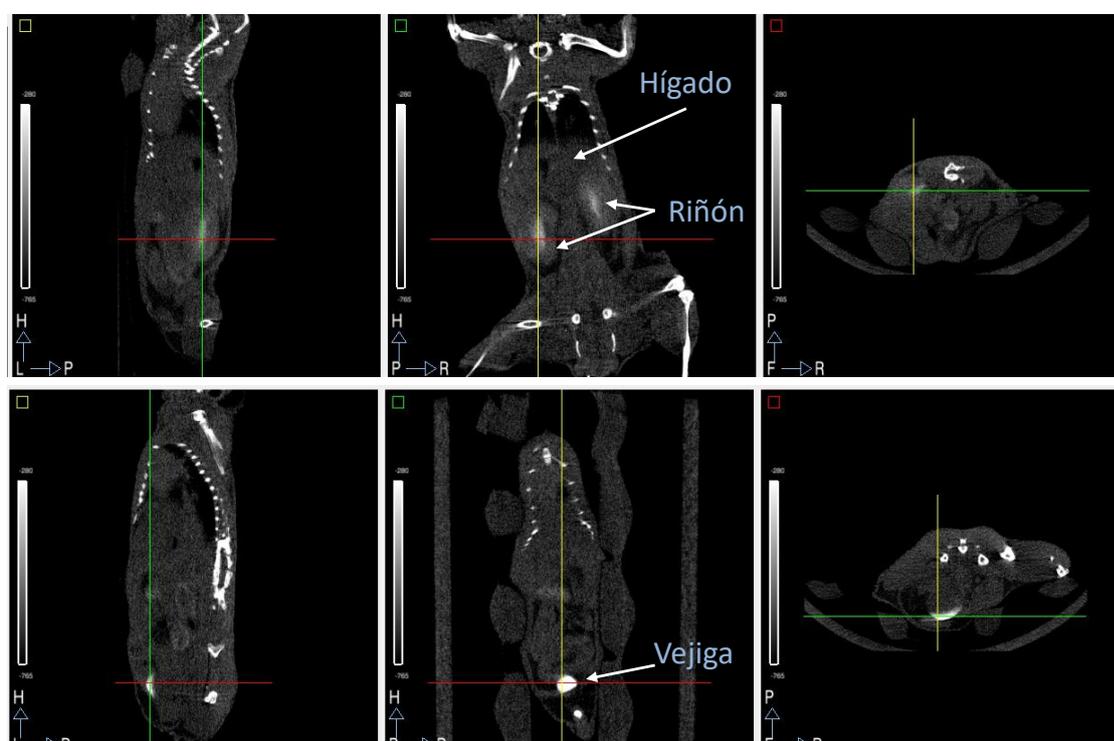


Figura 213: Imagen TAC tras administrar ICJ1901-01.

*“Todos los finales son también comienzos.
Simplemente no lo sabemos en el momento”*

Mitch Albom
(Las cinco personas que conocerás en el cielo)

V. CONCLUSIONES

Una vez descritos los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo de investigación, es posible establecer una serie de conclusiones que dan respuesta a los objetivos planteados al inicio de la Tesis Doctoral. De forma general, se puede afirmar que se ha alcanzado el objetivo principal propuesto al haberse conseguido la síntesis de un grupo de compuestos que pueden ser utilizados como medios de contraste multimodales en el campo del diagnóstico por imagen.

Se ha llevado a cabo la síntesis y purificación de los compuestos de interés en un proceso de nueve etapas, en las que los productos intermedios y finales han presentado una pureza acorde con su posterior aplicación. La caracterización espectroscópica de los productos finales ha confirmado que se trata de los compuestos objeto de síntesis, formados por una estructura aromática triyodada que se une por un espaciador a un macrociclo que posibilita la formación de quelatos de diferentes metales, en función de la técnica de diagnóstico utilizada. La evaluación de los parámetros relacionados con la seguridad ha permitido verificar que estos productos presentan una baja toxicidad.

En cuanto al estudio de los parámetros fisicoquímicos, la osmolalidad, el coeficiente de reparto y la afinidad por seroalbúmina bovina demuestran que el comportamiento de los compuestos sintetizados es intermedio al observado para el gadobutrol, utilizado como agente de contraste en iRM; y el ácido acetrizoico que se usa en exploraciones radiológicas. Además, se ha comprobado que los productos objeto de estudio tienen una unión a proteína plasmática suficiente para favorecer su retención en el interior del cuerpo humano, metabolizándose en el hígado y permitiendo la visualización de la vía hepática; aunque esta unión no llega a ser suficiente para que los compuestos puedan comportarse como *blood pool agents*. Por otra parte, el valor de relajatividad obtenido para el compuesto de gadolinio (ICJ1901-01) señala un comportamiento similar al del DOTAREM[®], que se utiliza en iRM. En definitiva, estos resultados dan a entender que los compuestos sintetizados pueden ser utilizados como medios de contraste para la visualización de las zonas deseadas.

En relación con el proceso de marcaje del ICJ1707-01, se han conseguido unas condiciones óptimas que han dado lugar a la obtención de un producto con galio-68 de una elevada pureza radioquímica para su posterior aplicación en técnicas de medicina nuclear como PET o SPECT.

V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el estudio de calibrador (*Phantom*) han mostrado una buena correlación entre la señal y la concentración utilizada de los compuestos en iRM y TAC, lo que indica que son válidos para su uso en las técnicas mencionadas de diagnóstico por imagen.

Con el objetivo de evaluar la aplicabilidad de los compuestos sintetizados como medios de contraste para las diferentes técnicas de diagnóstico por imagen, se han realizado una serie de pruebas *in vivo* en iRM, TAC y PET/TAC. Después del tratamiento de las imágenes obtenidas, es posible concluir que la administración de dichos productos permite la visualización de órganos como el corazón, el hígado, el estómago, los riñones y la vejiga; lo que confirma su uso como medios de contraste multimodales que pueden ser utilizados tanto en técnicas independientes como en combinaciones de ellas. Sin embargo, la dificultad en la visualización de la vesícula biliar no ha permitido confirmar su distinción con respecto a los tejidos y órganos circundantes. Además, como ya predecían los resultados obtenidos en el estudio de afinidad por albúmina, no se observa un comportamiento de los compuestos como *blood pool agents*.

El estudio farmacocinético llevado a cabo con los resultados obtenidos en las pruebas *in vivo* realizadas en PET/TAC, indican por una parte que los productos presentan una buena linealidad de la dosis en todo el rango de concentraciones administradas y, por otra, que se observa una elevada eliminación por la vía hepática (del orden del 60%), permitiendo la visualización del hígado y de los conductos biliares. A pesar de los buenos resultados obtenidos, posiblemente se podría mejorar la calidad de las imágenes si la eliminación del producto transcurriera de una manera más lenta dando lugar a concentraciones en el hígado más elevadas y prolongadas en el tiempo. Esto facilitaría la distinción del hígado con una mayor resolución.

En definitiva, la estructura que caracteriza a los compuestos sintetizados en este trabajo cumple con las expectativas marcadas y ha permitido alcanzar los objetivos principales planteados al inicio de esta Tesis Doctoral. Merece la pena destacar la importancia de estos productos, ya que pueden suponer el inicio de una serie de compuestos que tengan la posibilidad de ser utilizados como medios de contraste para el espacio intravascular (*blood pool agents*) y que presenten una eliminación más lenta en el hígado permitiendo así su visualización. Esta optimización se podría conseguir a través de modificaciones en la estructura de los compuestos estudiados, aplicando el conocimiento adquirido durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

*“Es un hecho importante y conocido
que las cosas no son lo que parecen.”*

Douglas Adams
(Guía de un autoestopista galáctico)

VI. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Primera radiografía de un hueso humano. (W.C. Roentgen. "X" rays and their applications in the new photography (panphlet). 1896.)	5
Figura 2: Primer reactor de fisión nuclear. (https://naukas.com/2015/04/13/enrico-fermi-desafiando-a-los-dioses/) (Consultada el 10 de febrero de 2020 a las 11:15 h).....	6
Figura 3: Dispersión elástica. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.)	10
Figura 4: Dispersión inelástica (Efecto fotoeléctrico). (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.)	10
Figura 5: Clasificación de los medios de contraste.....	12
Figura 6: iRM de un tumor cerebral en ausencia (a) y en presencia (b) de un medio de contraste basado en gadolinio. (A.S. Merbach, L. Helm, É. Toth. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2013.).....	14
Figura 7: Medios de contraste basados en gadolinio utilizados en clínica. (A.S. Merbach, L. Helm, É. Toth. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2013.).....	14
Figura 8: iRM de hígado en ausencia (a) y en presencia (b) de partículas de óxidos de hierro. (S. Namkung, C.J. Zech, T. Helmberger et al. Superparamagnetic iron oxide (SPIO)-enhanced liver MR imaging with ferucarbotran: efficacy for characterization of focal liver lesions. J. Magn. Reson. Imaging. 2007. 25, 755–765.).....	15
Figura 9: Comportamiento de Agentes CEST. (A.S. Merbach, L. Helm, É. Toth. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2013.).....	16
Figura 10: Técnica convencional de rayos X (radiografía 2D). (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.)	18
Figura 11: Efecto de la exposición en una película fotográfica. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.)	18
Figura 12: Proceso de tomografía. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	19
Figura 13: Reconstrucción tomográfica. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	20
Figura 14: Formas de corregir la dispersión de radiación. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	22
Figura 15: Espectro de energía de rayos X. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	23

VI. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 16: Generación de radiación en tubo de rayos X con ánodo giratorio. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.)	24
Figura 17: Incremento de la resolución. Foco de radiación delgado (izq.) y foco de radiación grueso (der.). (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	24
Figura 18: Esquema de pantalla intensificadora. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	25
Figura 19: Detector por ionización de fotones. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	26
Figura 20: Detector de centelleo. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	27
Figura 21: Esquema de un detector de semiconductores. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.)	28
Figura 22: Equipo moderno con detector de semiconductores de estado sólido con amplificador y tubo de rayos X montado en estructura con forma de C. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	28
Figura 23: Escáner de rayos X-TAC de tercera generación. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	29
Figura 24: Tomografía axial computarizada helicoidal. (J.S. Quintero, M. Martín-Landrove. Determinación in vitro del Índice de conformidad para la Evaluación de Planes de Tratamiento 3D en Radiocirugía Estereotáctica Intracraneal. Tesis Doctoral en Física Médica. 2011.).....	30
Figura 25: Imagen obtenida en una radiografía de manos. (https://definicion.de/radiografia/) (Consultada el 19 de febrero de 2020 a las 09:35 h).....	33
Figura 26: Imagen obtenida en una radiografía dental. (https://www.feistdental.com/digital-dental-x-rays/) (Consultada el 19 de febrero de 2020 a las 09:50 h).....	33
Figura 27: Imagen obtenida de una radiografía de columna vertebral. (https://www.webconsultas.com/escoliosis/diagnostico-de-la-escoliosis-534) (Consultada el 19 de febrero de 2020 a las 10:25 h).....	33
Figura 28: Imagen obtenida en una angiografía con contraste. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	34
Figura 29: Imagen obtenida en una angiografía con contraste de una mano. (https://www.volusiahandsurgery.com/the-cold-hand/) (Consultada el 19 de febrero de 2020 a las 12:30 h).....	34

Figura 30: Imagen obtenida en una cistografía. (http://www.teknon.es/fr/pruebas-diagnosticas/diagnostico-imagen/radiologia-convencional-digitalizada/abdomen-pelvis/cistografia-cums) (Consultada el 19 de febrero de 2020 a las 12:40 h)	34
Figura 31: Imagen obtenida en una colecistografía. (http://www.radtechonduty.com/2015/06/radiographic-examination-of-biliary.html) (Consultada el 19 de febrero de 2020 a las 12:45 h)	35
Figura 32: Imagen obtenida en una colangiografía. (https://radiopaedia.org/cases/normal-t-tube-cholangiogram) (Consultada el 19 de febrero de 2020 a las 13:10 h)	35
Figura 33: Esquema iRM. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.)	41
Figura 34: Comportamiento resonante en iRM. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.)	42
Figura 35: Señal FID de iRM. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.)	42
Figura 36: Obtención de la señal en iRM. (A.S. Merbach, L. Helm, É. Toth. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2013.)	42
Figura 37: Técnicas sensibles a T_1 . (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.)	43
Figura 38: Imagen IRM con gradiente-eco sin (a) y con (b) inversión-recuperación. (A.S. Merbach, L. Helm, É. Toth. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2013.)	44
Figura 39: Técnica de espín-eco. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.)	44
Figura 40: Efecto gradiente-eco. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.)	46
Figura 41: Ponderación de la densidad de protones. (A.S. Merbach, L. Helm, É. Toth. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2013.)	46
Figura 42: Ponderación de valores de T_1 . (A.S. Merbach, L. Helm, É. Toth. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2013.)	47
Figura 43: Ponderación de valores de T_2 . (A.S. Merbach, L. Helm, É. Toth. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2013.)	47
Figura 44: Relación de T_1 , T_2 y densidad de protones en función de T_R y T_E . (A.S. Merbach, L. Helm, É. Toth. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2013.)	48

VI. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 45: Ponderación de T ₁ (izq.) y T ₂ (der.) en imágenes IRM. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005 .)	48
Figura 46: Turbo espín-eco. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005 .)	49
Figura 47: Esquema eco-planar (EPI) por single-shot. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005 .)	50
Figura 48: Esquema SE-EPI. (L.C. Pesquera, R.G. Valtuille, F.A. Abascal et al. Técnica de la imagen por resonancia magnética. Resonancia magnética del sistema musculoesquelético. 2000 . Capítulo 1. 9-28.)	51
Figura 49: Esquema de la técnica GRASE. (L.C. Pesquera, R.G. Valtuille, F.A. Abascal et al. Técnica de la imagen por resonancia magnética. Resonancia magnética del sistema musculoesquelético. 2000 . Capítulo 1. 9-28.)	51
Figura 50: Codificación de frecuencia. (L.C. Pesquera, R.G. Valtuille, F.A. Abascal et al. Técnica de la imagen por resonancia magnética. Resonancia magnética del sistema musculoesquelético. 2000 . Capítulo 1. 9-28.)	52
Figura 51: Esquema de codificación de fase. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005 .)	53
Figura 52: Codificación de fase 0, 1 y 2. (L.C. Pesquera, R.G. Valtuille, F.A. Abascal et al. Técnica de la imagen por resonancia magnética. Resonancia magnética del sistema musculoesquelético. 2000 . Capítulo 1. 9-28.)	53
Figura 53: Método tiempo de vuelo (TOF). (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005 .)	54
Figura 54: Aplicación de un gradiente a una zona dividida en secciones. (A.S. Merbach, L. Helm, É. Toth. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2013 .)	54
Figura 55: Comportamiento del campo magnético en forma de gradiente según la movilidad de sustancias. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005 .)	55
Figura 56: Sistema de imán abierto. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005 .)	56
Figura 57: Tipos de transmisor/receptor usados en IRM. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005 .)	57
Figura 58: Imagen iRM de cerebro. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005 .)	60

Figura 59: Imagen iRM de cerebro donde se ve gran contraste entre tejido gris y blanco. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	60
Figura 60: Imagen iRM de columna vertebral. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	60
Figura 61: Imagen iRM de rodilla. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	60
Figura 62: Imagen iRM de tobillo. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	60
Figura 63: Imagen iRM del círculo de Willis (Unión de varias arterias en la parte inferior del cerebro). (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	60
Figura 64: Esquema PET. (S.R. Cherry, S. Gambhir. Use of positron emission tomography in animal research. ILAR J. 2001. 42,219-232.).....	63
Figura 65: Técnica de PET. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	63
Figura 66: Equipo de imagen por medicina nuclear con dos gammacámaras. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	64
Figura 67: Gammacámara. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	64
Figura 68: Optimización de la señal observada. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	65
Figura 69: Reactor de fusión. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	68
Figura 70: Ciclotrón. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	69
Figura 71: Imagen por SPECT (Siemens). (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	71
Figura 72: Estudio de huesos por SPECT (Philips). (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	71
Figura 73: Perfusión de la sangre en el corazón (Philips). (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	71
Figura 74: Estudio de absorción de anfetamina (Philips). (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005.).....	71

VI. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 75: Estudio PET de FDG en cerebro (Centro de PET St Thomas). (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005 .).....	71
Figura 76: Imagen fetal por ultrasonidos. (C. Guy, D. Ffytche. An introduction to the principles of medical imaging. 2005 .).....	72
Figura 77: Uso de microburbujas con ultrasonidos. (Y. Zhao, L. Du, C. Lu et al. Potential and problems in ultrasound-responsive drug delivery systems. Int. J. Nanomedicine. 2013 . 8, 1621-1633.).....	74
Figura 78: Inversión de pulso o inversión de fase. (M.X. Tang. The assessment of microvascular flow and tissue perfusion using ultrasound imaging. Proc. Inst. Mech. Eng. H. 2010 . 224, 273-290.).....	75
Figura 79: Inversión de pulso o inversión de fase. (https://radiologykey.com/ultrasound-contrast-agents-and-contrast-enhanced-ultrasonography/) (Consultada el 13 de marzo de 2020 a las 13:10 h).....	76
Figura 80: Técnica de funcionalización para microburbujas. (W, Krause. Topics in Current Chemistry. Contrast II. Optical, Ultrasound, X-Ray and Radiopharmaceutical Imaging. 2002 .).....	76
Figura 81: Imagen de la sección media del estómago obtenida por una endoscopia. (http://digestivehealth.net/faqs/upperendoscopyfaqs.html) (Consultada el 27 de noviembre de 2020 a las 13:35 h).....	77
Figura 82: Imagen obtenida con la combinación de luminiscencia y TAC. (D. Lapota. Bioluminescence- Recent Advances in Oceanic Measurements and Laboratory Applications. 2012 .).....	81
Figura 83: IRM de carcinoma nasofaríngeo (izq). TAC-iRM de carcinoma nasofaríngeo (der). La línea roja delimita la zona de aplicación de radioterapia (Der). (M. Braddock. Biomedical Imaging: The Chemistry of Labels, Probes and Contrast Agents. 2012 .).....	82
Figura 84: Previsión de crecimiento de los mercados en el mundo. (Marketsandmarkets™. Contrast media/ Contrast agents market. Global Forecast to 2024. 2019 .).....	83
Figura 85: Mercado en millones de dólares por tipos de medios de contraste. (Marketsandmarkets™. Contrast media/ Contrast agents market. Global Forecast to 2024. 2019 .).....	84
Figura 86: Mercado en millones de dólares de las principales técnicas en diagnóstico por imagen. (Marketsandmarkets™. Contrast media/ Contrast agents market. Global Forecast to 2024. 2019 .).....	87

Figura 87: Evaluación del mercado en Europa de las técnicas y su uso en los tres países con mayor cuota de mercado. (Marketsandmarkets™. Contrast media/ Contrast agents market. Global Forecast to 2024. 2019.).....	87
Figura 88: Mercado en millones de dólares de los medios de contraste según la afección estudiada. (Marketsandmarkets™. Contrast media/ Contrast agents market. Global Forecast to 2024. 2019.).....	92
Figura 89: Esquema de los productos sintetizados.....	96
Figura 90: Relación entre la constante de estabilidad y la basicidad de compuestos macrocíclicos con átomos de nitrógeno. (A.S. Merbach, L. Helm, É. Toth. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2013.)...102	102
Figura 91: Estructura del cabeza de serie estudiado.....	103
Figura 92: Esquema sintético.....	112
Figura 93: Electrodiálisis tipo I.....	113
Figura 94: Electrodiálisis tipo II.....	113
Figura 95: Esquema general de electrodiálisis.....	114
Figura 96: Esquema general de diananofiltración.....	114
Figura 97: Estructura del compuesto MTT.....	124
Figura 98: Reacción de degradación del compuesto MTT.....	124
Figura 99: Imagen real de la determinación de citotoxicidad por reducción de MTT.....	125
Figura 100: Equipo de iRM utilizado en el Hospital de Paraplégicos de Toledo. (Imagen cedida por el Laboratorio de Resonancia Magnética de Investigación en Animales del Hospital de Paraplégicos de Toledo).....	128
Figura 101: Equipo de PET/TAC utilizado en las instalaciones del CIEMAT. (Imagen cedida por la Unidad de Aplicaciones Biomédicas y Farmacocinéticas del Departamento de Medio Ambiente del CIEMAT).....	128
Figura 102: Cámara protectora del generador. (Imagen cedida por la Unidad de Aplicaciones Biomédicas y Farmacocinéticas del Departamento de Medio Ambiente del CIEMAT).....	129
Figura 103: Generador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. (Imagen cedida por la Unidad de Aplicaciones Biomédicas y Farmacocinéticas del Departamento de Medio Ambiente del CIEMAT).....	129
Figura 104: Reactor de microondas. (Imagen cedida por la Unidad de Aplicaciones Biomédicas y Farmacocinéticas del Departamento de Medio Ambiente del CIEMAT).....	130

VI. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 105: Medidor de radiactividad. (Imagen cedida por la Unidad de Aplicaciones Biomédicas y Farmacocinéticas del Departamento de Medio Ambiente del CIEMAT)	130
Figura 106: Determinación del aclaramiento. (D.J. Birkett. Farmacocinética Fácil. 2002.).....	134
Figura 107: Determinación de C_0 . (D.J. Birkett. Farmacocinética Fácil. 2002.).....	135
Figura 108: Eliminación de primer orden con una semivida de 4 horas. Escala lineal (A) y escala semilogarítmica (B). (D.J. Birkett. Farmacocinética Fácil. 2002.)	136
Figura 109: Efecto del primer paso. (D.J. Birkett. Farmacocinética Fácil. 2002.)	138
Figura 110: Eliminación renal. (D.J. Birkett. Farmacocinética Fácil. 2002.)	139
Figura 111: Comportamiento enzimático. (D.J. Birkett. Farmacocinética Fácil. 2002.).....	141
Figura 112: Modelo bicompartimental. S. Negro y E. Barcia. Biofarmacia y Farmacocinética. Universidad Complutense de Madrid. 2016-2017	143
Figura 113: Representación gráfica de un modelo farmacocinético bicompartimental. S. Negro y E. Barcia. Biofarmacia y Farmacocinética. Universidad Complutense de Madrid. 2016-2017	143
Figura 114: Cromatograma a 254 nm obtenido con el método de análisis 1.....	150
Figura 115: Cromatograma a 254 nm obtenido con el método de análisis 2.....	152
Figura 116: Cromatograma a 254 nm obtenido con el método de análisis 3.....	154
Figura 117: Cromatograma a 254 nm obtenido con el método de análisis 4.....	156
Figura 118: Cromatograma a 254 nm obtenido con el método de análisis 5.....	157
Figura 119: Cromatograma a 254 nm obtenido con el método de análisis 6.....	158
Figura 120: Cromatograma a 250 nm obtenido con el método de análisis 7.....	159
Figura 121: Cromatograma del ICJ1901-01 a 250 nm en el detector DAD y en el detector de fluorescencia según el método de análisis 7 DAD-FLD.....	161
Figura 122: Cromatograma del ICJ1707-01 a 200 nm en el detector DAD y en el detector de fluorescencia según el método de análisis 7 DAD-FLD.	161
Figura 123: Cromatograma del ICJ1707-01 a 250 nm en el detector DAD y en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.	162
Figura 124: Cromatograma del ICJ1805-01 a 250 nm en el detector DAD y en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.	163

Figura 125: Cromatograma del compuesto ICJ1805-01 con ^{68}Ga a 250 nm en el detector DAD y en el detector de radiactividad utilizando el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.....	163
Figura 126: Cromatograma de la mezcla de los compuestos ICJ1707-01 e ICJ1805-01 con ^{68}Ga y Ga “frío” a 250 nm en el detector DAD y en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.	164
Figura 127: Reacción etapa 1	168
Figura 128: Evolución del proceso de hidrogenación.....	168
Figura 129: Reacción etapa 2	170
Figura 130: Reacción etapa 3	171
Figura 131: Reacción etapa 4	172
Figura 132: Reacción etapa 5	172
Figura 133: Reacción etapa 6	174
Figura 134: Reacción etapa 7	175
Figura 135: Reacción etapa 8	176
Figura 136: Cromatograma del producto final ICJ1707-01 a 250 nm obtenido con el método de análisis 7.....	177
Figura 137: Reacción etapa 9a.....	178
Figura 138: Cromatograma del producto final ICJ1805-01 a 250 nm obtenido con el método de análisis 7.....	179
Figura 139: Reacción etapa 9b.....	180
Figura 140: Cromatograma del producto final ICJ1901-01 a 250 nm obtenido con el método de análisis 7.....	181
Figura 141: Reacción etapa 9c	182
Figura 142: Cromatograma del producto final ICJ1911-01 a 250 nm obtenido con el método de análisis 7.....	183
Figura 143: Resultado estudio in silico para el gadobutrol.	190
Figura 144: Resultado estudio in silico para el ácido acetrizoico.	190
Figura 145: Resultado estudio in silico para el compuesto ICJ1707-01.....	191
Figura 146: Resultado estudio in silico para el compuesto ICJ1805-01.....	191
Figura 147: Resultado estudio in silico para el compuesto ICJ1901-01.....	192

VI. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 148: Resultado estudio in silico para el compuesto ICJ1911-01.....	192
Figura 149: Espectro de excitación (azul) y emisión (rojo) registrados empleando una disolución del complejo ICJ1911-01 a una concentración de 5×10^{-5} M en H ₂ O (pH 7,0, tampón TRIS 0.1 M). Las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas fueron $\lambda_{ex} = 318$ y $\lambda_{em} = 613$ nm, respectivamente.	196
Figura 150: Efecto antena: La excitación del grupo cromóforo del ligando puebla el estado excitado singlete (S_1), que a su vez se transforma en el estado excitado triplete (T_1) mediante un cruce de sistemas. La energía se transfiere a continuación al estado 5D_0 del ion Eu ³⁺ , que se desactiva a su estado fundamental mediante emisión debida a las transiciones $^5D_0 \rightarrow ^7F_j$	197
Figura 151: Curvas de caída de la intensidad de la emisión del estado excitado 5D_0 obtenidas mediante la técnica de recuento de fotones únicos (single photon counting) empleando disoluciones del compuesto ICJ1911-01 en H ₂ O y D ₂ O. Las líneas rojas corresponden a los ajustes realizados para calcular la semivida de emisión.	198
Figura 152: Tipos de moléculas de hidratación alrededor de medio de contraste paramagnético. (A.S. Merbach, L. Helm, É. Toth. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2013 .)	199
Figura 153: RMN de protón del complejo ICJ1911-01 registrado en disolución de D ₂ O a 25°C (400 MHz, 30 mM, pH 7,0).....	202
Figura 154: Estructura cristal de Gd(DTPA) y Gd(DOTA). (A.S. Merbach, L. Helm, É. Toth. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2013 .) ..	203
Figura 155: Isómeros de complejos con ligando como DOTA. (A.S. Merbach, L. Helm, É. Toth. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2013 .)	203
Figura 156: Equilibrios de estructuras Ln(DOTA). (A.S. Merbach, L. Helm, É. Toth. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2013 .) ..	204
Figura 157: Viabilidad celular (%) de células V79 en presencia de diferentes concentraciones de ácido acetrizoico.....	207
Figura 158: Viabilidad celular (%) de células V79 en presencia de diferentes concentraciones de ICJ1805-01	207
Figura 159: Viabilidad celular (%) de células V79 en presencia de diferentes concentraciones de ICJ1901-01	208
Figura 160: Viabilidad celular (%) de células V79 en presencia de diferentes concentraciones de gadobutrol.....	208

Figura 161: Cromatograma obtenido de la reacción de marcaje después de 5 minutos de reacción en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.....	209
Figura 162: Cromatograma obtenido de la reacción de marcaje radiactivo después de 15 minutos de reacción en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.	210
Figura 163: Cromatograma obtenido de la reacción de marcaje radiactivo después de 30 minutos de reacción en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.	210
Figura 164: Cromatograma obtenido de la reacción de marcaje radiactivo de 1µg de ICJ1707-01 después de 30 minutos de reacción en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.	211
Figura 165: Patrón de colocación de las disoluciones en el estudio de calibrador en iRM.	212
Figura 166: Imágenes de los valores de T_1 al variar T_R en función de la concentración de ICJ1901-01.....	213
Figura 167: Representación gráfica de la intensidad de T_1 al variar T_R en función de la concentración de ICJ1901-01.	214
Figura 168: Representación gráfica de la intensidad de T_1 al variar T_R en función de la concentración de ICJ1901-01.	215
Figura 169: Imágenes del estudio Phantom de ICJ1901-01 variando T_R y F_A	216
Figura 170: Gráficas del estudio Phantom de ICJ1901-01 variando T_R y F_A	216
Figura 171: Imágenes del estudio Phantom de ICJ1901-01 variando T_R y F_A	216
Figura 172: Gráficas del estudio Phantom de ICJ1901-01 variando T_R y F_A	216
Figura 173: Imágenes del estudio Phantom de ICJ1901-01 variando T_R y F_A	216
Figura 174: Gráficas del estudio Phantom de ICJ1901-01 variando T_R y F_A	216
Figura 175: Imágenes del estudio Phantom de ICJ1901-01 variando T_R y F_A	216
Figura 176: Gráficas del estudio Phantom de ICJ1901-01 variando T_R y F_A	216
Figura 177: Imágenes del estudio Phantom de ICJ1901-01 variando T_R y F_A	217
Figura 178: Gráficas del estudio Phantom de ICJ1901-01 variando T_R y F_A	217
Figura 179: Imágenes del estudio Phantom de ICJ1901-01 variando T_R y F_A	217
Figura 180: Gráficas del estudio Phantom de ICJ1901-01 variando T_R y F_A	217
Figura 181: Imágenes del estudio Phantom de ICJ1901-01 variando T_R y F_A	217

VI. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 182: Gráficas del estudio Phantom de ICJ1901-01 variando T_R y F_A	217
Figura 183: Imágenes de los valores de T_2 al variar T_R y T_E en función de la concentración de ICJ1901-01.	218
Figura 184: Representación gráfica de la intensidad de T_2 al variar T_R y T_E en función de la concentración de ICJ1901-01.....	218
Figura 185: Imágenes de los valores de T_1 al variar T_R en función de la concentración de ICJ1911-01.	219
Figura 186: Representación gráfica de la intensidad de T_1 al variar T_R en función de la concentración de ICJ1911-01.....	219
Figura 187: Representación gráfica de la intensidad de T_1 al variar T_R en función de la concentración de ICJ1911-01.....	220
Figura 188: Imágenes obtenidas con el método definitivo en iRM para ICJ1901-01 (izq.) e ICJ1911-01 (der.).....	221
Figura 189: Imágenes de un ratón previo al estudio in vivo en iRM	221
Figura 190: Imágenes de varios cortes de un ratón obtenidas en el estudio de iRM.....	222
Figura 191: Imágenes de varios cortes de un ratón obtenidas en el estudio de iRM a diferentes tiempos	223
Figura 192: Estudio de las imágenes de riñón en iRM.....	224
Figura 193: Representación gráfica de la distribución y eliminación del producto ICJ1901-01 en el tiempo en iRM para vejiga y los riñones.....	224
Figura 194: Estudio de las imágenes del hígado en iRM.....	225
Figura 195: Representación gráfica de la distribución y eliminación del producto ICJ1901-01 en el tiempo en iRM para el hígado.....	225
Figura 196: Imágenes de un ratón previo al estudio in vivo en PET/TAC.	226
Figura 197: Imágenes obtenidas en el experimento 1 en PET/TAC	227
Figura 198: Imagen de la actividad total acumulada en un corte de un ratón obtenidas en el estudio de PET/TAC.....	228
Figura 199: Imagen de la actividad total acumulada en un corte de un ratón obtenidas en el estudio de PET/TAC.....	228
Figura 200: Imagen de la actividad total acumulada en un corte de un ratón obtenidas en el estudio de PET/TAC.....	228
Figura 201: Imágenes obtenidas en el experimento 2 en PET/TAC.	230

Figura 202: Imágenes obtenidas en el experimento 3 en PET/TAC.....	232
Figura 203: Imágenes PET/TAC obtenidas durante los 20 minutos posteriores a la inoculación de las disoluciones preparadas según se describe en los experimentos 1, 2 y 3. ..	233
Figura 204: Valores SUV en el corazón obtenidos en los estudios dinámicos para los 3 experimentos.....	234
Figura 205: Valores SUV en el hígado obtenidos en los estudios dinámicos para los 3 experimentos.....	234
Figura 206: Valores SUV en la vejiga obtenidos en los estudios dinámicos para los 3 experimentos.....	235
Figura 207: Valores SUV en el riñón obtenidos en los estudios dinámicos para los 3 experimentos.....	235
Figura 208: Representación gráfica de la distribución y eliminación del producto ICJ1805-01 en el torrente sanguíneo. Incluye el estudio del parámetro farmacocinético AUC en función de la dosis administrada.	237
Figura 209: Representación gráfica de la distribución y eliminación del producto ICJ1805-01 en el hígado. Incluye el estudio del parámetro farmacocinético AUC en función de la dosis administrada.	237
Figura 210: Patrón de colocación de las disoluciones en el estudio de calibrador en rayos X.	240
Figura 211: Imágenes obtenidas en el estudio de calibrador (Phantom).....	240
Figura 212: Relación de la señal en función de las concentraciones estudiadas.	241
Figura 213: Imagen TAC tras administrar ICJ1901-01.	242

*“No basta con alcanzar la sabiduría,
es necesario saber utilizarla”*

Cicerón

VII. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Escala de grises en iRM	38
Tabla 2: Datos isótopos en iRM	40
Tabla 3: Datos de radioisótopos.....	70
Tabla 4: Comparación de técnicas de diagnóstico por imagen relativas al uso de animales	80
Tabla 5: Mercado de los medios de contraste yodados. (Marketsandmarkets™. Contrast media/ Contrast agents market. Global Forecast to 2024. 2019 .).....	85
Tabla 6: Mercado de los medios de contraste basados en gadolinio. (Marketsandmarkets™. Contrast media/ Contrast agents market. Global Forecast to 2024. 2019 .).....	85
Tabla 7: Mercado de los medios de contraste de microburbujas. (Marketsandmarkets™. Contrast media/ Contrast agents market. Global Forecast to 2024. 2019 .).....	86
Tabla 8: Mercado de los medios de contraste basados en bario. (Marketsandmarkets™. Contrast media/ Contrast agents market. Global Forecast to 2024. 2019 .).....	86
Tabla 9: Mercado en \$ por técnica en España. (Marketsandmarkets™. Contrast media/ Contrast agents market. Global Forecast to 2024. 2019 .)	88
Tabla 10: Equipos de Alta Tecnología disponibles por Comunidad Autónoma. (https://www.mscbs.gob.es/ciudadanos/hospitales.do?tipo=equipos).....	89
Tabla 11: Escáneres de TAC instalados. (Marketsandmarkets™. Contrast media/ Contrast agents market. Global Forecast to 2024. 2019)	90
Tabla 12: Mercado de los rayos X/TAC en el mundo. (Marketsandmarkets™. Contrast media/ Contrast agents market. Global Forecast to 2024. 2019 .).....	90
Tabla 13: Equipos de iRM instalados. (Marketsandmarkets™. Contrast media/ Contrast agents market. Global Forecast to 2024. 2019 .).....	91
Tabla 14: Mercado de iRM en \$ en el mundo. (Marketsandmarkets™. Contrast media/ Contrast agents market. Global Forecast to 2024. 2019 .)	91
Tabla 15: Mercado de los ultrasonidos en el mundo. (Marketsandmarkets™. Contrast media/ Contrast agents market. Global Forecast to 2024. 2019 .).....	92
Tabla 16: Propuestas para la parte A	97
Tabla 17: Propuestas para la parte B.	99
Tabla 18: Constantes de estabilidad de quelatos de gadolinio.....	101
Tabla 19: Propuesta para la parte C.....	103
Tabla 20: Relación de ensayos de caracterización, equipamiento y centro.....	115
Tabla 21: Relación de ensayos fisicoquímicos, equipamiento y centro.....	116

VII. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 22: Linealidades ICP-MS.	121
Tabla 23: Concentraciones estudiadas en citotoxicidad.	126
Tabla 24: Gradiente para el método 2.	151
Tabla 25: Gradiente para el método 3.	153
Tabla 26: Gradiente para el método 4.	155
Tabla 27: Valores experimentales del estudio de osmolalidad.	184
Tabla 28: Valores bibliográficos de osmolalidad para medios de contraste comerciales en iRM.	185
Tabla 29: Valores bibliográficos de osmolalidad para diferentes medios de contraste comerciales en rayos X.	186
Tabla 30: Valores experimentales del estudio del coeficiente de partición.	187
Tabla 31: Valores bibliográficos del coeficiente de partición para medios de contraste comerciales en iRM.	188
Tabla 32: Valores bibliográficos del coeficiente de partición para medios de contraste comerciales en rayos X.	189
Tabla 33: Valores experimentales del estudio de afinidad por la albúmina.	192
Tabla 34: Valores bibliográficos de relajatividad para diferentes ligandos y medios de contraste utilizados en iRM.	201
Tabla 35: Valores bibliográficos de la geometría y moléculas de hidratación para diferentes ligandos y medios de contraste utilizados en iRM.	205
Tabla 36: Resultados cromatográficos de la reacción de marcaje después de 5 minutos de reacción en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD- Radiactividad.	209
Tabla 37: Resultados cromatográficos de la reacción de marcaje radiactiva después de 15 minutos de reacción en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.	210
Tabla 38: Resultados cromatográficos de la reacción de marcaje radiactiva después de 30 minutos de reacción en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.	210
Tabla 39: Resultados cromatográficos de la reacción de marcaje radiactivo de 1µg de ICJ1707- 01 después de 30 minutos de reacción en el detector de radiactividad obtenido con el método de análisis 7 DAD-Radiactividad.	211
Tabla 40: Parámetros farmacocinéticos determinados.	238

*“Caminando en línea recta
no puede uno llegar muy lejos”*

Antoine de Saint-Exupéry
(El Principito)

VIII. ÍNDICE DE ECUACIONES

		<u>Página</u>
(1)	$\sigma = \frac{Z^5}{E^2}$	11
(2)	$\mu_{Bohr} = -\frac{e}{2m} \times L$	39
(3)	$\mu_{Bohr} = \gamma \times L = \gamma \times nh$	39
(4)	$\Delta E = \gamma \left(\frac{h}{2\pi} \right) B$	40
(5)	$v = \Delta E/h$	41
(6)	$f_L = \frac{\gamma B}{2\pi}$	41
(7)	$T_{vuelta} = \frac{1}{\gamma B_{RF}}$	42
(8)	$f_L = \gamma B$	42
(9)	$S = M_0 \left(1 - e^{-\frac{T_R}{T_1}} \right)$	43
(10)	$S = M_0 \left(1 - e^{-\frac{t}{T_2}} \right)$	44
(11)	$\log(K_{Gd(L)}) = 1,5 \times (\log K_1^H + \log K_2^H) - 9,7 \quad (R^2 = 0,86)$	101
(12)	$P = \frac{C_{Alcohol} \cdot \frac{6}{5} \cdot 20}{C_{Buffer (acuosa)} \cdot \frac{200}{1}} = \frac{C_{Alcohol} \cdot 0,12}{C_{Buffer (acuosa)}}$	118
(13)	$\begin{aligned} \text{Unión a proteínas(\%)} &= \frac{C_T - C_L}{C_T} \cdot 100 = \frac{C_M + C_B - 2C_B}{C_M + C_B} \cdot 100 \\ &= \frac{C_M - C_B}{C_M + C_B} \cdot 100 \end{aligned}$	120
(14)	$\delta = \frac{4\pi[M]S}{T} \left(\frac{\mu_{eff}}{2,84} \right) \times 10^3$	122
(15)	$\frac{1}{T_{1,obs}} = \frac{1}{T_{1,dia}} + [M]r_1$	122
(16)	$C_{(t)} = A \cdot e^{(-t/\tau)}$	123
(17)	$q_{Eu} = 1,20 (k_{(H_2O)} - k_{(D_2O)} - 0,25 \text{ (Horrocks)})$	123
(18)	$q_{Eu} = 1,11 (k_{(H_2O)} - k_{(D_2O)} - 0,31 \text{ (Parker)})$	123

		<u>Página</u>
(19)	$k(H_2O) = \frac{1}{\tau(H_2O)}$	123
(20)	$k(D_2O) = \frac{1}{\tau(D_2O)}$	123
(21)	$Y = Inferior + \frac{(Superior - Inferior)}{1 + 10^{[(\log IC_{50} - X) \cdot pendiente]}}$	127
(22)	$SUV = \frac{\text{Concentración de actividad } \left(\frac{\mu Ci}{cm^3}\right) \cdot \text{masa corporal (g)}}{\text{Actividad inyectada (Bq)}}$	132
(23)	$E_H = 1 - \frac{\text{Concentración de salida}}{\text{Concentración de entrada}}$	134
(24)	$\text{velocidad de eliminación } \left(\frac{mg}{h}\right) = Cl \left(\frac{L}{h}\right) \cdot C \left(\frac{mg}{L}\right)$	134
(25)	$DR \left(\frac{mg}{h}\right) = Cl \left(\frac{L}{h}\right) \cdot C_{ss} \left(\frac{mg}{L}\right)$	134
(26)	$Cl = U \cdot \frac{V}{P}$	134
(27)	$Cl (L/h) = \frac{\text{dosis (mg)}}{AUC \left(\frac{mg \cdot h}{L}\right)}$	134
(28)	$V = \frac{A}{C} = \frac{\text{Dosis}}{C_0}$	135
(29)	$C_t = C_0 \cdot e^{-kt}$	136
(30)	$t_{1/2} = \frac{\ln(2) \cdot V}{Cl}$	136
(31)	$k = \frac{Cl}{V}$	136
(32)	$F = f_g \cdot f_H$	137
(33)	$Cl_{GF} = fu \cdot GFR$	139
(34)	$\text{Aclaramiento por secreción} = fu \cdot Cl_S$	139
(35)	$\text{aclaramiento renal} = \text{filtración} + \text{secreción} - \text{reabsorción}$	140
(36)	$Cl_R = fu \cdot (GFR + Cl_S) \cdot (1 - FR)$	140

	<u>Página</u>	
(37)	$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S}$	140
(38)	<i>velocidad de eliminación</i> = $Cl \cdot C$	141
(39)	$Cl = \frac{v}{C} = \frac{V_{max}}{K_m + C}$	141
(40)	$C_t = A \cdot e^{-at} + B \cdot e^{-\beta t}$	142
(41)	$\alpha + \beta = k_{12} + k_{21} + k_{10}$	144
(42)	$\alpha\beta = k_{21}k_{10}$	144
(43)	$C = \frac{X_0(\alpha - k_{21})}{V_c(\alpha - \beta)} e^{-at} + \frac{X_0(k_{21} - \beta)}{V_c(\alpha - \beta)} e^{-\beta t}$	144
(44)	$k_{21} = \frac{A\beta + B\alpha}{A + B}$	144
(45)	$k_{10} = \frac{\alpha\beta}{k_{21}}$	144
(46)	$A = \frac{X_0(\alpha - k_{21})}{V_c(\alpha - \beta)}$	144
(47)	$B = \frac{X_0(k_{21} - \beta)}{V_c(\alpha - \beta)}$	144
(48)	$V = \frac{X_0}{A + B}$	145
(49)	$t_{1/2\alpha} = \frac{\ln(2)}{\alpha}$	145
(50)	$t_{1/2\beta} = \frac{\ln(2)}{\beta}$	145
(51)	$(S) = \frac{\text{Actividad administrada } (\mu\text{Ci})}{\text{Dosis administrada (masa)}}$	236

*“Lo que sabemos es una gota de agua;
lo que ignoramos es el océano”*

Isaac Newton

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Roentgen. "X" rays and their applications in the new photography (panphlet). **1896**.
2. E. Rutherford. LXXIX. The scattering of α and β particles by matter and the structure of the atom. *Philos Mag. A*. **1911**. *21*, 669-688.
3. G. Hevesy, A. Christiansen, S. Lomholt. Radiochemical method of studying the circulation of bismuth in the body. *Compt. Rend.* **1924**. *178*, 1324-1326.
4. E.O. Lawrence and M.S. Livingston. The production of high speed light ions without the use of high voltages. *Phys. Rev.* **1932**. *40*, 19-35.
5. H.O. Anger. Scintillation Camera. *Rev. Sci. Instrum.* **1958**. *29*, 27-33.
6. E. Odeblad, G. Lindstrom. Some preliminary observations on the proton magnetic resonance in biologic simples. *Acta radiol.* **1955**. *43*, 469.
7. P. Cook, J.R. Mallard. An electron spin resonance cavity for the detection of free radicals in the presence of water. *Nature*. **1963**. *198*, 145-147.
8. R. Damadian. Tumor detection by nuclear magnetic resonance. *Science*. **1971**, *171*, 1151-1153.
9. P.C. Lauterbur. Image formation by induced local interactions. Examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature*. **1973**. *242*, 190-191.
10. P. Mansfield. Multi-planar image formation using NMR spin echoes. *J. Phys C: Solid State Phys.* **1977**. *10*, L55-L58.
11. P. Slavkovsky. The Nobel Prize in Physiology or Medicine in 2003 to Paul C. Lauterbur, Peter Mansfield for magnetic resonance imaging. *Bratislavske lekarske listy*. **2004**. *105*, 245-249.
12. M.F. Bellin, A.J. Van Der Molen. Extracellular gadolinium-based contrast media: An overview. *Eur J. Radiol.* **2008**. *66*, 160-167.
13. A. Bianchi, L. Calabi, C. Giorgi et al. Thermodynamic and structural aspects of manganese(II) complexes with polyaminopolycarboxylic ligands based upon 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (cyclen). Crystal structure of dimeric $[\text{MnL}]_2 \cdot 2\text{CH}_3\text{OH}$ containing the new ligand 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4-diacetate. *J. Chem. Soc, Dalton Trans.* **2001**. 917-922.
14. G. Elizondo, C.J. Fretz, D.D. Stark et al. Preclinical evaluation of Mn-DPDP: new paramagnetic hepatobiliary contrast agent for MR imaging. *Radiology*. **1991**. *178*, 73-78.
15. S. Rivera-Mancia, C. Rios, S. Montes. Manganese accumulation in the CNS and associated pathologies. *Biometals*. **2011**. *24*, 811-825.
16. S. Laurent, S. Bountry, I. Mahieu et al. Iron oxide based MR contrast agents: from chemistry to cell labeling. *Curr. Med. Chem.* **2009**. *16*, 4712-4727.
17. S. Aime, M. Botta, E. Terreno. Advances in Inorganic Chemistry. *Elsevier*. **2005**. *57*, 173-237.

IX. BIBLIOGRAFÍA

18. D.L. Longo, W. Dastrù, G. Digilio et al. Iopamidol as a responsive MRI- chemical exchange saturation transfer contrast agent for pH mapping of kidneys: in vivo studies in mice at 7 T. *Magn. Reson. Med.* **2011.** 65, 202-211.
19. S. Aime, A. Barge, D. Delli Castelli et al. Paramagnetic lanthanide (III) complexes as pH-sensitive Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST). *Magn. Reson. Med.* **2002.** 47, 639-648.
20. S. Aime, D. Delli Castelli, E. Terreno. Supramolecular adducts between poly-L-arginine and [TmIII dotp]: a route to sensitive-enhance magnetic resonance imaging-chemical exchange saturation transfer agents. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005.** 42, 4527-4529.
21. G. Gregoriadis. Liposome technology. **2006**
22. S. Hak, H. Sanders, P. Agrawal et al. A high relaxivity Gd(III)DOTA-DSPE-based liposomal contrast agent for magnetic resonance imaging. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009.** 72, 397-404.
23. Y. Teow, P.V. Asharani, M. Prakash Hande et al. Health impact and safety of engineered nanomaterials. *Chem Commun.* **2011.** 47, 7025-7038.
24. U. Boas, P.M.H. Heegaard. Dendrimers in drug research. *Chem. Soc. Rev.* **2004.** 33, 43-63.
25. J.F. Cai, E.M. Shapiro, A.D. Hamilton. Self assembling DNA quadruplex conjugated to MRI contrast agents. *Bioconjugate Chem.* **2009.** 20, 205-208.
26. M.J. Adam, D.S. Wilbur. Radiohalogens for imaging and therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2005.** 34, 153-163.
27. J. Radon. Über die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte längs gewisser Mannigfaltigkeiten. *Ber. Verh. Sächs. Akad. Wiss. Leipzig. Math. Nat. Kl.* **1917.** 69, 262-277.
28. R.H. Clarke, J. Valentin. The history of ICRP and the evolution of its policies: invited by the commission in october 2008. *Annals of the ICRP.* **2008.** 39, 75-110.
29. M. Swick. Radiographic media in urology, the discovery of excretion urography. *Surg. Clin. North. Am.* **1978.** 58, 977-994.
30. D. Cameron. Aqueous solutions of potassium & sodium iodides as opaque media in roentgenography. *J. American Medical Association.* **1917.** 70, 754-755.
31. E.D. Osborne, C.G. Sutherland, A.J. Scholl et al. Roentgenology of the urinary tract during excretion of sodium iodide. *American Medical Association.* **1923.** 80, 368-373.
32. V.H. Wallingford. The development of organic iodide compounds as X-ray contrast media. *J. Am. Pharm. Assoc. Am. Pharm. Assoc..* **1953.** 42, 721-728.
33. J.O. Hoppe, H.A. Larsen, F.J. Coulston. Observations on the toxicity of a new urographic contrast medium, sodium 3,5-diacetamido-2,4,6-tri-iodobenzoate (Hypaque sodium) and related compounds. *J. Pharmacol. Exp. Ther..* **1956.** 116, 394-403.
34. R.G. Grainger. Intravascular contrast media- the past, the present and the future. *Br. J. Radiol.* **1982.** 55, 1-18.

-
35. R.P. Amdam, K. Sogner. Welath of contrast. Ad Notam Gyldendal. **1994**.
 36. P. Dawson, S. Saini, H. Schild et al. The new low-osmolar contrast media: a simple guide. *Clin. Radiol.* **1983.** 34, 221-226.
 37. P. Dawson, S. Saini, H. Schild et al. Continuing progress in contrast agents. *Imaging.* **1994.** 6, 273-284.
 38. P. Aspellin, P. Aubry, S.G. Fransson et al. Nephrotoxic effects in high-risk patients undergoing angiography. *N. Engl. J. Med.* **2003.** 348, 491-499.
 39. M.A. Shampo, R.A. Kyle. Edward M. Purcell- Nobel Prize for magnetic resonance imaging. *Mayo Clin. Proc.* **1997.** 72, 585.
 40. M.A. Shampo, R.A. Kyle. Felix Bloch- Developer of magnetic resonance imaging. *Mayo Clin. Proc.* **1995.** 70, 889.
 41. E.L. Hahn and D.E. Maxwell. Spin echo measurements of nuclear spin coupling in molecules. *Phys. Rev.* **1952.** 88, 1070-1084.
 42. R. Damadian. Apparatus and method for detecting cancer in tissue. US Patent US 3,789,832.
 43. R. Damadian, M. Goldsmith, L. Minkoff. NMR in cancer: XVI. FONAR Image of the live human body. *Physiol. Chem. Phys.* **1977.** 9, 97-108.
 44. M. Rudin, N. Beckmann, M. Rausch. Imaging in drug discovery and early clinical trials (Progress in Drug Research). **2005.** 62, 185-255.
 45. P.G. Kluetz, C.C. Meltzer, V.L. Villemagne et al. Combined PET/CT imaging in oncology: impact on patient management. *Clin. Positron Imaging.* **2001.** 3, 223-230.
 46. I.C. Kiricuta Jr, V. Simplăceanu. Tissue Water Content and Nuclear Magnetic Resonance in Normal and Tumor Tissues. *Cancer Res.* **1975.** 35, 1164-1167.
 47. J. Hajnal, D. Bryant, L. Kasubosky. Use of fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) pulse sequence in IRM of the brain. *J. Comput. Assist. Tomog.* **1992.** 16, 841-844.
 48. G. Fullerton. Physiologic basis of magnetic relaxation. *J.Magn. Reson. Imaging.* **1992,** 88-108.
 49. S. Meiboom, D. Gill. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Rev. Sci. Instr.* **1958.** 29, 688-691.
 50. M. Markl, J. Leupold. Gradient echo imaging. *J.Magn. Reson. Imaging.* **2012.** 35, 1274-1289.
 51. J. Henning, A. Nauerth, H. Friedburg. RARE imaging- a fast imaging method for clinical MR. *Magn. Reson. Med.* **1986.** 3, 823-833.
 52. M. Poustchi-Amin, S.A. Mirowitz, J.J. Brown et al. Principles and applications of echo-planar imaging: A review for the general radiologist. *Radiographics.* **2001.** 21, 767-779.
 53. F. Forzaneh, S. Riederer, N. Pelc. Analysis of T2 Limitations and Off-Resonance. Effects on Spatial Resolution and Artifacts in Echo-Planar Imaging. *Magn. Reson. Med.* **1990.** 14, 123-139.
-

IX. BIBLIOGRAFÍA

54. G. McKinnon. Ultrafast interleaved gradient echo-planar imaging on standard scanner. *Magn. Reson. Med.* **1993.** *30*, 609-616.
55. D.A. Feinberg, K. Oshio. GRASE (gradient- and spin-echo) MR imaging: a new fast clinical imaging technique. *Radiology.* **1991.** *181*, 597-602.
56. P.V. Gallart, B.M. Ribas, J.M. Pigem. Angiografía por resonancia magnética: técnica y aplicaciones en el estudio de la estenosis de carótida. *Imagen Diagn.* **2014.** *5*, 24-31.
57. P.C. Lauterbur, M.H. Mendonca Dias, A.M. Rudin. Augmentation of tissue water proton spin-lattice relaxation rates by In Vivo addition of paramagnetic ions. *Frontiers of Biological Energetics.* **1978.** 752-759.
58. C. Haën. Conception of the first magnetic resonance imaging contrast agents: a brief history. *Top. Magn. Reson. Imaging.* **2001.** *12*, 221-230.
59. H.J. Weinmann, R.C. Brasch, W.R. Press et al. Characteristics of gadolinium-DTPA complex: a potential NMR contrast agent. *Am. J Roentgenology.* **1984.** *142*, 619-624.
60. S. Hess, P.F. Hoiland-Carlsen, A. Alavi. Historic images in nuclear medicine. 1976: the first issue of clinical nuclear medicine and the first human FDG study. *Clin. Nucl. Med.* **2014.** *39*, 701-703.
61. H.M. Park. ¹²³I: almost a designer radioiodine for thyroid scanning. *J. Nucl. Med.* **2002.** *43*, 77-78.
62. D.E. Kuhl, R.Q. Edwards. Image separation radioisotope scanning. *Radiology.* **1963.** *80*, 653-661.
63. M.M. Ter-Pogossian, M.E. Phelps, E.J. Hoffman et al. Positron-emission transaxial tomograph for nuclear imaging (PET). *Radiology.* **1975.** *114*, 89-98.
64. E. Romero, M. Á. Morcillo. Inorganic oxides with potential application in the preparation of a ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator system. *Appl. Radiat. Isot.* **2017.** *119*, 28-35.
65. W.C. Eckelman, B.M. Coursey et al. Technetium-99m: generators, chemistry and preparation of radiopharmaceuticals. *Pergamon press.* **1982.** 793-951.
66. J.C. Clark. Current methodology for oxygen-15 production for clinical use. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. A.* **1987.** *8*, 597-600.
67. J.S. Fowler, A.P. Wolf. The synthesis of carbon-11, fluorine-18 and nitrogen-13 labeled radiotracers for biomedical applications. *Nucl. Sci. Ser. Natl. Acad. Sci. Natl. Res. Council Monogr.* **1982.**
68. R. Gramiak, P. Shah, D. Kramer. Ultrasound cardiography: contrast study in anatomy and function. *Radiology.* **1969.** *92*, 939-948.
69. C. Doppler. Über das farbige Licht der Doppelsterne und einiger anderer Gestirne des Himmels. *Abhandl Königl Böhm Gesellsch Wiss.* **1842.** *2*, 465-482.
70. V. Paefgen, D. Doleschel, F. Kiessling. Evolution of contrast agents for ultrasound imaging and ultrasound-mediated drug delivery. *Front. Pharmacol.* **2015.** *6*, 1-16.

-
71. M.D. Smith, O.L. Kwan, H.J. Reiser et al. Superior intensity and reproducibility of SHU-454, a new right heart contrast agent. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1984.** *3*, 992-998.
 72. M.D. Smith, J.L. Elion, R.R. McClure et al. Left heart opacification with peripheral venous injection of a new saccharide echo contrast agent in dogs. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1989.** *13*, 1622-1628.
 73. S.B. Feinstein, J. Cheirif, J.F. Tencate et al. Safety and efficacy of a new transpulmonary ultrasound contrast agent: initial multicenter clinical results. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1990.** *16*, 316-124.
 74. J.G. Wiencek, S.B. Feinstein. Albumin spheres as contrast agents. *Advances in Echo Imaging Using Contrast Enhancement.* **1993.** 57-70.
 75. R.H. Simon, S.Y. Ho, J. D'Arrigo et al. Lipid-coated ultrastable microbubbles as contrast agent in neurosonography. *Invest. Radiol.* **1990.** *25*, 1300-1304.
 76. M. Schneider, M. Arditi, M.B. Barrau et al. BR1: A new ultrasonographic contrast agent based on sulfur hexafluoride-filled microbubbles. *Invest. Radiol.* **1995.** *30*, 451-457.
 77. M. Meza, Y. Greener, R. Hunt et al. Myocardial contrast echocardiography: reliable, safe and efficacious myocardial perfusion assessment after intravenous injections of a new echocardiographic contrast agent. *Am. Heart J.* **1996.** *132*, 871-881.
 78. T.R. Porter, X. Feng, A. Kricsfeld et al. Noninvasive identification of acute myocardial ischemia and reperfusion with contrast ultrasound using intravenous perfluoropropane-exposed sonicated dextrose albumin. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1995.** *26*, 33-40.
 79. F. Forsberg, R. Roy, D.A. Merton et al. Conventional and hypobaric activation of an ultrasound contrast agent. *Ultrasound Med. Biol.* **1998.** *24*, 1143-1150.
 80. T.J. Pelura. Clinical experience with AF0150 (Imagen US), a new ultrasound contrast agent. *Acad. Radiol.* **1998.** *1*, Suppl. 1, S69-71.
 81. P.A. VanderWouw, A.C. Brauns, M. Levi et al. Quantison (TM), a new long-living ultrasound contrast agent: Experience in human volunteers. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1997.** *29*, 4107.
 82. H.R. Villarraga, D.A. Foley, B.C. Aeschbacher et al. Destruction of contrast microbubbles during ultrasound imaging at conventional power output. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **1997.** *10*, 783-791.
 83. M.J.K. Blomley, T. Albrecht, D.O. Cosgrove et al. Stimulated acoustic emission in the liver parenchyma with the US contrast agent Levovist. *Lancet.* **1998.** *351*, 568.
 84. A.L. Klibanov. Targeted delivery of gas-filled microspheres, contrast agents for ultrasound imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999.** *37*, 139-157.
 85. T. Nakamura, A. Terano. Capsule endoscopy: past, present and future. *J. Gastroenterol.* **2008.** *43*, 93-99.
 86. R. Cherry. Multimodality in vivo imaging systems: twice the power or double the trouble? *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2006.** *8*, 35-62.
-

IX. BIBLIOGRAFÍA

87. S.R. Meikle, F.J. Beekman, S.E. Rose. Complementary molecular imaging technologies: high resolution SPECT, PET and MRI. *Drug Discov. Today Technol.* **2006.** 3, 187-194.
88. D.W. Townsend. Combined positron emission tomography-computed tomography: the historical perspective. *Semin. Ultrasound. CT. MR.* **2008.** 29, 232-235.
89. B.J. Pichler, M.S. Judenhofer, H.F. Wehrl. PET/MRI hybrid imaging: devices and initial results. *Eur. Radiol.* **2008.** 18, 1077-1086.
90. R.B. Schulz, J. Ripoll, V. Ntziachristos. Experimental fluorescence tomography of tissues with noncontact measurements. *IEEE Trans. Med. Imaging.* **2004.** 23, 492-500.
91. S. Lee, X. Chen. Dual-modality probes for in vivo molecular imaging. *Mol. Imaging.* **2009.** 8, 87-100.
92. V. Ntziachristos, A. G. Yodh, M. Schnall et al. Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000.** 97, 2767-2772.
93. P. Fraff, M. Lapeyre, E. Desandes et al. Impact of intensity-modulated radiotherapy on health-related quality of life for head and neck cancer patients: matched-pair comparison with conventional radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2007.** 67, 1309-1317.
94. E.C. Lasser. Pharmacodynamics of biliary contrast media. *Radiol. Clin. North Am.* **1966.** 4, 511-519.
95. M. Sovak. Radiocontrast Agents. **1984,** 73, 383-398.
96. D.K. Cabbiness, D.W. Margerum. Macrocyclic effect on the stability of copper (II) tetramine complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1969.** 91, 6540-6541.
97. C. Yang, K. Chuang. Gd(III) chelates for MRI contrast agents: from high relaxativity to "smart", from blood pool to blood-brain barrier permeable. *Royal Soc. of Chem.* **2012.** 3, 552-565.
98. E. Brucher, S. Cortes, F. Chavez et al. Synthesis, equilibrium, and kinetic properties of the gadolinium (III) complexes of three triazacyclodecanetriacetate ligands. *Inorg. Chem.* **1991.** 30, 2092-2097.
99. A.E. Martell, R.M. Smith, R.J. Motekaitis. Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database. Version 8.
100. W.P. Cacheris, S.K. Nickle, A.D. Sherry. Thermodynamic study of lanthanide complexes of 1,4,7-triazacyclononane-N,N',N''-triacetic acid and 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N',N''-tetraacetic acid. *Inorg. Chem.* **1987.** 26, 958-960.
101. E.T. Clarke, A.E. Martell. Stabilities of trivalent metal ion complexes of the tetraacetate derivatives of 12-, 13- and 14- membered tetraazamacrocycles. *Inorg. Chim. Acta.* **1991.** 190, 27-36.
102. C.A. Chang, Y.H. Chen, H.Y. Chen et al. Capillary electrophoresis, potentiometric and laser excited luminescence studies of lanthanide (III) complexes of 1,7-dicarboxymethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (DO2A). *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1998.** 19, 3243-3248.

-
103. K. Kumar, M.F. Tweedle, M.F. Malley et al. Synthesis, Stability, and Crystal Structure Studies of Some Ca²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺. Complexes of Macrocyclic Polyamino Carboxylates. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 6472-6480.
 104. K. Kumar, C.A. Chang, M.F. Tweedle. Equilibrium and kinetic studies of lanthanide complexes of macrocyclic polyamino carboxylates. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 587-593.
 105. S. Gündüz, S. Vibhute, R. Botár et al. Coordination Properties of GdD03A-Based Model Compounds of Biorresponsive MRI Contrast Agents. *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 5973-5986.
 106. G. Tircsó, Z. Kovacs, A.D. Sherry. Equilibrium and formation/dissociation kinetics of some Ln(III)PCTA complexes. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 9269-9280.
 107. W.D. Kim, D.C. Hrnčir, G.E. Kiefer et al. Synthesis, crystal structure, and potentiometry of pyridine-containing tetraaza macrocyclic ligands with acetate pendant arms. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 2225-2232.
 108. E. Szilágyi, E. Toth, Z. Kovacs et al. Equilibria and formation kinetics of some cyclen derivative complexes of lanthanides. *Inorg. Chim. Acta.* **2000**, *298*, 226-234.
 109. J. Huskens, D.A. Torres, Z. Kovacs et al. Alkaline earth metal and lanthanide (III) complexes of ligands based upon 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-bis (acetic acid). *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 1495-1503.
 110. S. Kalaivani, S. Kannan. Collective substitutions of selective rare earths (Yb³⁺, Dy³⁺, Tb³⁺, Gd³⁺, Eu³⁺, Nd³⁺) in ZrO₂: an exciting prospect for biomedical applications. *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 9291-9302.
 111. S. Zhang, M. Merritt, D.E. Woessner et al. PARACEST agents: modulating MRI contrast via water proton exchange. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 783-790.
 112. D.B. Morton, M. Jennings, A. Buckwell et al. Refining procedures for the administration of substances. *Laboratory Animals.* **2001**, *35*, 1-41.
 113. G. Patlewicz, N. Jeliaskova, R.J. Safford. An evaluation of the implementation of the Cramer classification scheme in the Toxtree software. *SAR QSAR Environ Res.* **2008**, *19*, 495-524.
 114. D. M. Corsi, C. Platas-Iglesias, H. Van Bekkum et al. Determination of paramagnetic lanthanide (III) concentrations from bulk magnetic susceptibility shifts in NMR spectra. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 723-726.
 115. W. D. Horrocks, D. R. Sudnick. Lanthanide Ion Probes of Structure in Biology. Laser-Induced Luminescence Decay Constants Provide a Direct Measure of the Number of Metal-Coordinated Water Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 334-340
 116. R.M. Supkowski, W.D. J. Horrocks. On the Determination of the Number of Water Molecules, Q, Coordinated to europium(III) Ions in Solution from Luminescence Decay Lifetimes. *Inorganica Chim. Acta.* **2002**, *340*, 44-48.
-

IX. BIBLIOGRAFÍA

117. A. Beeby, I.M. Clarkson, R.S. Dickins et al. Non-Radiative Deactivation of the Excited States of Europium, Terbium and Ytterbium Complexes by Proximate Energy-Matched OH, NH and CH Oscillators: An Improved Luminescence Method for Establishing Solution Hydration States. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*. **1999**. 3, 493-504.
118. T. Martin. Toxicity Estimation Software Tool (TEST). U.S. Environmental Protection Agency. **2016**.
119. E. García-Toraño, V. Peyrés, E. Romero et al. Measurement of the half-life of ⁶⁸Ga. *Appl. Radiat. Isot.* **2014**. 87, 122-125.
120. E. Romero, A. Martínez, M. Oteo et al. Development and long-term evaluation of a new ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator based on nano-SnO₂ for PET imaging. *Sci. Rep.* **2020**. 10, 12756.
121. D.J. Birkett. Pharmacokinetics Made Easy. **2002**.
122. M. Gibaldi, D. Perrier. Pharmacokinetics. **1982**.
123. M. Port, J-M. Idée, C. Medina et al. Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: a critical review. *Biometals*. **2008**. 21, 469-490.
124. C.F.G.C. Geraldes, S. Laurent. Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging. *Contrast Media Mol. Imaging*. **2009**. 4, 1-23.
125. M. Andreucci, T. Faga, A. Pisani et al. The choice of the iodinated radiographic contrast media to prevent contrast-induced nephropathy. *Advances in Nephrology*. **2014**.
126. P. Wedeking, K. Kumar, M.F. Tweedle. Dissociation of gadolinium chelates in mice: relationship to chemical characteristics. *Magn. Reson. Imaging*. **1992**. 10, 641-648.
127. H. Vogler, J. Platzek, G. Schuhmann-Giampieri et al. Pre-clinical evaluation of gadobutrol: a new, neutral, extracellular contrast agent for magnetic resonance imaging. *Eur. J. Radiol.* **1995**. 21, 1-10.
128. A.J. Van der Molen, M-F. Bellin. Extracellular gadolinium-based contrast media: differences in diagnostic efficacy. *Eur. J. Radiol.* **2008**. 66, 168-174.
129. K. Krause, H. Miklutz, U. Kollenkirchen et al. Physicochemical parameters of X-ray contrast media. *Invest. Radiol.* **1994**. 29, 72-80.
130. P. Caravan. Protein-targeted gadolinium-based magnetic resonance imaging (MRI) Contrast agents: Design and mechanism of action. *Acc. Chem. Res.* **2009**. 42, 7, 851-862.
131. T.J. Peters. All about albumin: Biochemistry, genetics, and medical applications. *Academic Press*. **1995**.
132. B. Hamm, T. Staks, M. Bollow et al. Phase I clinical evaluation of Gd-EOB-DTPA as a hepatobiliary MR contrast agent: safety, pharmacokinetics, and MR imaging. *Radiology*. **1995**. 195, 785-792.
133. R.B. Lauffer. Targeted relaxation enhancement agents for MRI. *Magn. Reson. Med.* **1991**. 22, 339-342.

-
134. S. Aime, E. Gianolio, E. Terreno et al. Ternary Gd(III)L-HAS Adducts: Evidence for the replacement of Inner-sphere water molecules by coordinating groups of the protein. Implications for the design of contrast agents for MRI. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000.** *5,* 488-497.
135. T.J. McMurry, D.J. Parmelee, H. Sajuki et al. The effect of a phosphodiester linking group on albumin binding. Blood half-life, and relaxivity of intravascular diethylenetriaminepentaacetato aquo gadolinium(III) MRI contrast agents. *J. Med. Chem.* **2002.** *45,* 3465-3474.
136. S. Dumas, J.S. Troughton, N.J. Cloutier. A high relaxivity magnetic resonance imaging contrast agent targeted to serum albumin. *Aus. J. Chem.* **2008.** *61,* 682-686.
137. I. Paetsch, C. Jahnke, J. Barkhausen et al. Detection of coronary stenoses with contrast enhanced, three-dimensional free breathing coronary MR angiography using the gadolinium-based intravascular contrast agent gadocoletic acid (B-22956). *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* **2006.** *8,* 509-516.
138. R.A. Wallace, J.P.J. Haar, D.B. Miller et al. Synthesis and preliminary evaluation of MP-2269: a novel, nonaromatic small-molecule blood-pool MR contrast agent. *Magn. Reson. Med.* **1998.** *40,* 733-739.
139. S. Dumas, V. Jacques, W.C. Sun et al. High relaxivity MRI contrast agents part 1: Impact of single donor atom substitution on relaxivity of serum albumin-bound gadolinium complexes. *Invest. Radiol.* **2010.** *45,* 600-612.
140. Y.A. Mondjinou, B.P. Loren, C.J. Collins et al. Gd³⁺: DOTA-Modified 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin/4-sulfobutyl ether- β -cyclodextrin-based polyrotaxanes as long circulating high relaxivity MRI contrast agents. *Bioconjug. Chem.* **2018.** *21,* 3550-3560.
141. S. Laurent, L.V. Elst, R.N. Muller. Comparative study of the physicochemical properties of six clinical low molecular weight gadolinium contrast agents. *Contrast Media Mol. Imaging.* **2006.** *1,* 128-137.
142. E.G. Moore, A.P.S. Samuel, K.N. Raymond. From antenna to assay: Lessons learned in lanthanide luminescence. *Acc. Chem. Res.* **2009.** *42,* 542-552.
143. M. Le Fur, E. Molnár, M. Bevler et al. A coordination chemistry approach to Fine-Tune the physicochemical parameters of lanthanide complexes relevant to medical applications. *Chem. Eur. J.* **2018.** *24,* 3127-3131.
144. L. Helm. Relaxivity in paramagnetic systems: theory and mechanism. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2006.** *49,* 45-64.
145. D.H. White, L.A. DeLearie, D.A. Moore et al. The thermodynamics complexation of lanthanide (III) DTPA-bisamide complexes and implication for stability and solution structure. *Invest. Radiol.* **1991.** *26,* S226-S228.
-

IX. BIBLIOGRAFÍA

146. D.H. Powell, O.M. Ni Dhubhghaill, D. Pubanz et al. Structural and dynamic parameters obtained from ^{17}O NMR, EPR, and NMRD studies of monomeric and dimeric Gd^{3+} complexes of interest in magnetic resonance imaging: An integrated and theoretically self-consistent approach. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**. *118*, 9333-9346.
147. N. Graepi, D.H. Powell, G. Laurency et al. Coordination equilibria and water exchange kinetics of lanthanide (III) propylenediaminetetraacetates and other magnetic resonance imaging related complexes. *Inorg. Chim. Acta.* **1995**. *235*, 311-326.
148. D. Pubanz, G. Gonzalez, D.H. Powell et al. Unexpectedly large change of water exchange rate and mechanism on $[\text{Ln}(\text{DTPA-BMA})(\text{H}_2\text{O})]$ complexes along the lanthanide (III) series. *Inorg. Chem.* **1995**. *34*, 17, 4447-4453.
149. E. Szilágyi, É. Tóth, E. Brücher et al. Lanthanide (III)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid complexes in acidic medium: significant decrease in water exchange rate. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1999**, 2481-2486.
150. M. Mato-Iglesias, C. Platas, K. Djanashvili et al. The highest water exchange rate ever measured for a $\text{Gd}(\text{III})$ chelate. *Chem. Commun.* **2005**. 4729-4731.
151. S. Aime, M. Botta, M. Panero et al. Inclusion complexes between β -cyclodextrin and β -benzyloxy- α -propionic derivatives of paramagnetic DOTA- and DOTA- $\text{Gd}(\text{III})$ complexes. *Magn. Reson. Chem.* **1991**. *29*, 923-927.
152. J.P. André, H.R. Maecke, É. Tóth et al. Synthesis and physicochemical characterization of a novel precursor for covalently bound macromolecular MRI contrast agents. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**. *4*, 341-347.
153. S.I. Kang, R.S. Ranganathan, J.E. Emswiler et al. Synthesis, characterization, and crystal structure of the gadolinium (III) chelate of (1R, AR, JR)- α , α' , α'' -trimethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetic acid (DO3MA). *Inorg. Chem.* **1993**. *32*, 2912-2918.
154. R. Ruloff, R.N. Muller, D. Pubanz et al. A tripod gadolinium (III) poly(aminocarboxylate) relevant to magnetic resonance imaging: structural and dynamical ^{17}O NMR and ^1H NMRD studies. *Inorg. Chim. Acta.* **1998**. *276*, 15-23.
155. S. Aime, A. Barge, A. Borel et al. A multinuclear NMR study on the structure and dynamics of lanthanide (III) complexes of the poly(aminocarboxylate) EGTA^{4-} in aqueous solution. *Inorg. Chem.* **1997**. *36*, 5104-5112.
156. É. Tóth, F. Connac, L. Helm et al. Direct assessment of water exchange on a $\text{Gd}(\text{III})$ chelate bound to a protein. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**. *3*, 606-613.
157. N. Siauve, O. Clément, C.A. Cuenod et al. Capillary leakage of a macromolecular MRI agent, carboxymethyl dextran- GdDTPA , in the liver; pharmacokinetics and imaging implications. *Magn. Reson. Imaging.* **1996**. *14*, 381-390.

-
158. R.N. Muller, B. Radüchel, S. Laurent et al. Physicochemical characterization of MS-325, a new gadolinium complex, by multinuclear relaxometry. *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999.** 1949-1955.
159. J.A. Peters, J. Huskens, D.J. Raber. Lanthanide induced shifts and relaxation rate enhancements. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1996.** 28, 283-350.
160. C. Adair, M. Woods, P. Zhao et al. Spectral properties of a bifunctional PARACEST europium chelate: an intermediate for targeted imaging applications. *Contrast. Media Mol. Imaging.* **2007.** 2, 55-58.
161. F. Uggeri, S. Aime, P.L. Anelli et al. Novel contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. Synthesis and Characterization of the Ligand BOPTA and Its Ln(III) Complexes (Ln = Gd, La, Lu). X-ray Structure of Disodium (TPS-9-145337286-C-S)-[4-Carboxy-5,8,11-tris(carboxymethyl)-1-phenyl-2-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oato(5-)]gadolate(2-) in a Mixture with Its Enantiomer. *Inorg. Chem.* **1995.** 34, 3, 633-643.
162. S. Aime, M. Botta, M. Fasano et al. Conformational and coordination equilibria on DOTA complexes of lanthanide metal ions in aqueous solution studied by ^1H -NMR spectroscopy. *Inorg. Chem.* **1997.** 36, 10, 2059-2068.
163. I. Lukeš, J. Kotek, P. Vojtiek et al. Complexes of tetraazacycles bearing methylphosphinic/phosphonic acid pendant arms with copper (II), zinc (II) and lanthanides (III). A comparison with their acetic acid analogues. *Coord. Chem. Rev.* **2001.** 216, 287-312.
164. F. Benetollo, G. Bombieri, L. Calabi et al. Structural variations across the lanthanide series of macrocyclic DOTA complexes: Insights into the design of contrast agents for magnetic resonance imaging. *Inorg. Chem.* **2003.** 42, 1, 148-157.
165. R.S. Dickins, A.S. Batsanov, J.A.K. Howard et al. Structural and NMR investigations of the ternary adducts of twenty α -amino acids and selected dipeptides with a chiral, diaqua-ytterbium complex. *Dalton Trans.* **2004.** 1, 70-80.
166. C.A. Chang, L.C. Francesconi, M.F. Malley et al. Synthesis, characterization, and crystal structures of M(DO3A) (M= iron, gadolinium) and Na[M(DOTA)] (M= Fe, yttrium, Gd). *Inorg. Chem.* **1993.** 32, 3501-3508.
167. R.S. Dickins, S. Aime, A. S. Batsanov et al. Structural, luminescence, and NMR studies of the reversible binding of acetate, lactate, citrate, and selected amino acids to chiral diaqua-ytterbium, gadolinium, and europium complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2002.** 124, 43, 12697-12705.
168. K. Kumar, C.A. Chang, L.C. Francesconi et al. Synthesis, stability, and structure of gadolinium(III) and yttrium(III) macrocyclic poly(amino carboxylates). *Inorg. Chem.* **1994.** 33, 16, 3567-3575.
-

IX. BIBLIOGRAFÍA

169. J. Platzek, P. Blaszkiewicz, H. Gries et al. Synthesis and structure of a new macrocyclic polyhydroxylated gadolinium chelate used as a contrast agent for magnetic resonance imaging. *Inorg. Chem.* **1997**. *36*, 26, 6086-6093.
170. S. Aime, P.L. Anelli, M. Botta et al. Synthesis, characterization, and 1/T1 NMRD profiles of gadolinium(III) complexes of monoamide derivatives of DOTA-like ligands. X-ray structure of the 10-[2-[[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl]amino]-1-[(phenylmethoxy)methyl]-2-oxoethyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetic acid-gadolinium(III) complex. *Inorg. Chem.* **1992**. *31*, 12, 2422-2428.
171. M. Regueiro-Figueroa, D. Esteban-Gómez, A. de Blas et al. Structure and dynamics of lanthanide(III) complexes with an N-alkylated DO3A ligand (H₃DO3A= 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetic acid): a combined experimental and DFT study. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**. 3586-3595.
172. A. Aguilar, M.C. Montejo, M. Caamaño, F.R. Martín. *Biofarmacia y Farmacocinética*. **2014**.