

Profesor Dr. Antonio Pellicer Martínez. Catedrático del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Dra. Begoña Pellicer Iborra, doctora por la Universidad de Valencia en el Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina.

INFORMAN:

Que Dña. Esther Táboas Lima, Licenciada en Biología por la Universidad de Vigo, ha realizado íntegramente el trabajo de investigación titulado Cuantificación del daño tisular en tejidos animales tras el uso de Doppler pulsado, bajo mi supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal para optar al grado de doctor.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, expido y firmo la presente certificación en Valencia a 01 de Julio de 2015.

Fdo:

Dr. Antonio Pellicer Martínez.

Dra. Begoña Pellicer Iborra.

Dña. Esther Táboas Lima.

VNIVERSITAT E VALÈNCIA

Facultad de Ciencias Biológicas.

**Departamento de Biotecnología y Biología
Molecular**



CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO TISULAR EN TEJIDOS ANIMALES FETALES TRAS EL USO DE DOPPLER PULSADO

Tesis doctoral presentada por:
Esther Táboas Lima.
Valencia, 2015.

Directores:
Antonio Pellicer Martínez.
Begoña Pellicer Iborra.

I. INTRODUCCIÓN	9
– 1. Ecografía	12
– 2. Principios básicos de los ultrasonidos	13
2.1. Velocidad de propagación	15
2.2. Frecuencia y longitud de onda	15
2.3. Intensidad	17
2.4. Capacidad de resolución del haz	18
– 3 Tipos de representación de imagen	18
3.1. Modo M o ecografía unidimensional	18
3.2. Modo B o ecografía bidimensional	19
3.3. Efecto Doppler	20
– 4. Bioefectos de los ultrasonidos y su dosimetría	22
4.1. El efecto térmico	23
4.2.-Mecanismos no térmicos	25
4.3. Dosimetría	29
– 5. Controversias en seguridad ecográfica	34
5.1. Historial de seguridad	35
5.2. Valoración in vivo de la exposición	38
5.3. Extrapolación de los datos	41
5.4. Datos epidemiológicos en humanos	45
– 6. ¿Uso a abuso? Aplicación obstétrica.	46
– 7. Organogénesis Hepática y SNC	52
7.1. Organogénesis hepática de la rata.	52
7.2. Organogénesis del SNC.	58
II. HIPOTESIS	63
III. OBJETIVOS	67
IV. METODOLOGÍA	71
– 1. Elección del modelo animal.	73
– 2. Diseño del estudio.	76
– 3. Efecto de los ultrasonidos sobre el tejido hepático fetal (Fase 1).	77
3.1. Grupos de estudio.	77

3.2. Etapas del desarrollo de la fase 1.	78
3.3. Exposición a los ultrasonidos.	78
3.4. Procesado de muestras.	82
– 4. Estudio del efecto de los ultrasonidos sobre el SNC fetal. (Fase 2).	86
4.1. Grupos de estudio.	86
4.2. Etapas de desarrollo de la fase 2.	87
4.3. Análisis histológico.	90
4.4. Análisis inmunohistoquímicos.	90
4.5. Evaluación de la actividad motora, coordinación y función cognitiva.	92
– 5. Análisis Estadístico.	97
V. RESULTADOS	99
– 1. Determinaciones perinatales.	101
– 2. Determinación del daño celular en hígado fetal.	102
2.1. Análisis de la variabilidad inter-animal.	104
2.2. Correlación entre índice apoptótico y tiempo de exposición.	105
2.3. Duración del daño.	106
– 3. Determinación de daño celular en cerebro fetal.	107
3.1. Prueba de impacto preliminar.	107
3.2. Análisis de la actividad apoptótica.	107
3.3. Análisis histológico.	110
3.4. Análisis del efecto de la exposición a Doppler pulsado sobre la migración celular.	111
– 4.- Evaluación de actividad motora y cognitiva postnatal.	113
4.1. Actividad motora.	113
4.2. Coordinación motora.	115
4.3. Función cognitiva.	116
VI. DISCUSIÓN	119
– 1. Evaluación del modelo animal.	121

– 2. Efecto de la aplicación de Doppler Pulsado en sobre el resultado perinatal.	126
– 3. Efectos de la aplicación de Doppler pulsado sobre el Ductus Venoso.	127
– 4. Efectos de la aplicación de Doppler pulsado sobre la Arteria Cerebral Media.	135
VII. CONCLUSIONES	143
VIII. BIBLIOGRAFÍA	147
IX. ANEXOS	167

I. INTRODUCCIÓN

El objetivo principal de este trabajo de tesis consiste en evaluar los posibles bioefectos de los ultrasonidos (US) en un modelo animal. Para facilitar su comprensión, se hace precisa la revisión de una serie de conceptos expuestos a continuación.

Primero hablaremos de las características físicas de los US y las diversas modalidades de ecografías. Además se realizaremos una revisión exhaustiva sobre los efectos causados por los US, en base a los cuales se sustenta los principios de seguridad ecográfica para su uso cotidiano.

A continuación a modo de justificación, expondremos las evidencias científicas que han llevado a investigar sobre el tema.

Y por último, debido al empleo de un modelo animal en este trabajo, repasaremos determinados conceptos de su anatomía y fisiología para una mejor comprensión y extrapolación de resultados.

I. Ecografía.

La ecografía (del griego «ἤχώ» ēkhō="eco", y «γραφία» grafía= "escribir") es un procedimiento de análisis de imagen, generada por la formación de ecos producidos tras la emisión de ultrasonidos (US) dirigida sobre un cuerpo u objeto.

El principio básico de la ecografía consiste en que las ondas ultrasónicas son propulsadas pudiendo ser transmitidas, reflectadas o absorbidas por la superficie de estudio, en función de la naturaleza de la misma. Debido a sus características físicas, y en especial a su habilidad para recorrer larga distancia con escasa pérdida de energía en algunos materiales, los US son usados en infinidad de aplicaciones médicas e industriales.

Los US han sido una gran herramienta para el estudio del cuerpo humano mediante imágenes, desde los últimos 50 años. Para establecerse como uno de las más importantes y versátiles modelos de imagen que existen en la biomedicina. Entre sus principales ventajas se encuentra la capacidad de adquirir y reproducir dichas imágenes en tiempo real. Además poseen una buena relación coste/beneficio, en comparación con otros modelos de imagen, como son la resonancia magnética (RM) o la tomografía axial computarizada (TAC).

El uso de la tecnología Doppler acoplada a la ecografía mediante su modo de haz pulsado, permite la obtención de mediciones absolutas de velocidad sanguínea y mapear el flujo sanguíneo a lo largo del campo de visión de manera semicuantitativa.

Estas son algunas de las muchas características que hacen de los US, la principal modalidad diagnóstica de análisis por imagen. En el ámbito terapéutico, también están siendo ampliamente utilizados dentro del aparataje de muchas intervenciones quirúrgicas y su uso mediante altas intensidades puede hoy en día ser considerado como una nueva modalidad de terapia en tratamientos tan prevalentes como diversos cánceres (Crouzet S, *et al* 2014; Wu F, 2014).

2. Principios básicos de los ultrasonidos.

El fundamento básico de la ecografía reside en la visualización de las modificaciones de los rayos ultrasónicos ocasionadas al atravesar medios de diferente densidad e impedancia acústica.

Las ondas ultrasónicas emitidas son producidas por cristales semiconductores que presentan la característica de convertir un impulso eléctrico en uno mecánico, lo que se conoce como **efecto piezo-eléctrico**.

Desde el punto de vista físico toda onda y, por tanto los US también, tienen su eje de propagación. Y cada onda corresponde a una sucesión alternada de fases de compresión y descompresión, que varían en función de la elasticidad del medio.

Al igual que todo fenómeno ondulatorio posee unas características vinculadas a su calidad de oscilación (como pueden ser su frecuencia y amplitud) y otras asociadas a la onda (como la velocidad de propagación y longitud de onda). Además de esto, el fenómeno ondulatorio sufre durante su producción y propagación, los efectos que caracterizan a este tipo de fenómeno físico (como son la absorción, reflexión, difracción y efecto Doppler).

Algunos de estas características biofísicas van a influir en la producción de dichas imágenes y sobretodo son específicamente evaluadas en el tema de la seguridad ecográfica. Por ello y de una forma sencilla, a continuación hablaremos de la *velocidad de propagación, la frecuencia y longitud de onda*, así como de la *intensidad energética* o la capacidad de resolución del haz que emite los US (Carrera JM, 2000).

2.1. Velocidad de propagación

Hemos dicho que los US son vibraciones de tipo mecánico y frecuencia elevada, que se propagan a través de la materia por compresiones y dilataciones periódicas, de los átomos y moléculas del medio, a partir de un foco que las genera.

Las ondas sonoras requieren para su propagación, de un medio que pueda transmitir la energía de una partícula a otra, y la velocidad de propagación dependerá de las características físicas de ese medio; estando determinada por su densidad, la cual le otorga diferente resistencia a la compresión. En general, los US se propagan en el agua y en los seres vivos a velocidad constante, excepto en huesos, intestinos y pulmones (Levi S, 1972). A pesar de estas diferencias, por regla general se estima que para

frecuencias entre 1 y 10 MHz, la velocidad media en un organismo es de 1.540 m/sg (Tabla 1).

2.2. Frecuencia y longitud de onda

Se define como período (T) al tiempo que transcurre entre dos instantes consecutivos en que las condiciones de perturbación del medio transmisor son iguales.

La frecuencia (f) es el número de períodos por unidad de tiempo, es decir, el número de ciclos completos que suceden en un segundo. En los equipos ecográficos utilizados en el diagnóstico médico, las frecuencias van desde de 1 a 10 MHz.

El oído humano puede detectar sonidos hasta de frecuencias de 20 kHz y todo sonido superior a 20 kHz, se le denomina ultrasonido.

La longitud de onda (λ) es la distancia que avanza la onda durante un período y representa la distancia entre dos puntos ubicados en la trayectoria de la onda que presentan igual vibración.

En toda onda, su frecuencia y su longitud de onda son inversamente proporcionales. Relacionándose mediante la siguiente fórmula:

$$\lambda = \frac{V}{f}$$

Donde λ = longitud de onda.

V= velocidad de propagación de la onda

f= frecuencia.

La velocidad de propagación de una onda en un medio resulta ser independiente de la intensidad o cantidad de energía transmitida. En los tejidos blandos la velocidad de propagación varía entre 1490-1610 m/s en función del tipo de tejido (Tabla 1).

Como hemos dicho, las frecuencias empleadas en este tipo de estudios se encuentran en un rango de 1 a 10 millones de hertzios (Hz) de manera que para obtener un incremento en la velocidad de propagación en un mismo medio, sólo se puede conseguir mediante un incremento en la frecuencia de las ondas sonoras.

Propiedad	Hueso cortical	Tejido no graso	Grasa	Sangre	Líquido amniótico
Velocidad de propagación (m s ⁻¹)	3635	1575	1465	1584	1534
Impedancia acústica característica (10 ⁶ kg m ⁻² s ⁻¹)	6,98	1,66	1,44	1,68	1,54
Coefficiente de atenuación a 1MHz (db cm ⁻¹)	20	0,6	1	0,15	0,005
Frecuencia dependiente del coeficiente de atenuación	n/a	1,2	1	1,2	1,6
Coefficiente no lineal, B/A	n/a	7	10	6,1	n/a

Tabla 1: Valores representativos de algunas propiedades acústicas en los tejidos a la temperatura corporal (Valores obtenidos de Duck FA, 1990; ICRU Report, 1998; Verma PK et al, 2005)

En relación con la capacidad de penetración de la onda ultrasónica debemos considerar que, la energía ultrasónica emitida por el transductor se va debilitando a lo largo de su trayectoria, característica conocida como **factor de atenuación**. La disipación de la energía, principalmente en forma de luz o calor, se determina en fines prácticos como del orden de 1 db/MHz por cada centímetro de penetración del tejido. Este orden de magnitud nos muestra la importancia que tiene la frecuencia de emisión de los US, donde a mayor frecuencia, mayor será el factor de atenuación y por lo tanto las bajas frecuencias permiten una mayor penetración y son normalmente, empleadas para examinar órganos internos.

2.3. Intensidad.

La intensidad se define como la cantidad de energía que incide en la unidad del área receptor por unidad de tiempo, expresándose como W/cm^2 .

Las intensidades empleadas en diagnóstico ecográfico son de 2 a 6 mW/cm^2 para poder asegurar la inocuidad del método (Carrera JM, 2000).

En el diagnóstico, lo más importante es la relación entre la intensidad de onda emitida y la onda recibida. Estos valores son difíciles de comparar y suelen expresarse de manera logarítmica. De manera que actualmente se emplea el decibelio (dB) que no constituye propiamente una unidad, pero permite comparar niveles de potencia.

2.4. Capacidad de resolución del haz.

Algunos equipos empleados para uso clínico utilizan la misma sonda tanto para emitir como para captar los US. De manera que el eco que regresa debe ser amplificado para su análisis. La capacidad que permite diferenciar el origen de dos señales emitidas muy próximas como independientes es conocida como resolución. Siendo **el poder de resolución** la distancia mínima capaz de ser resuelta o diferenciada por la sonda, que como veremos a continuación, es la característica que permite la mejora histórica de esta técnica, gracias al avance y digitalización de la información.

3. Tipos de representación de imagen.

A lo largo de la historia de los US se han ido desarrollando diversos modos de representación, para poder acceder a una mayor y más compleja información.

3.1. Modo M o ecografía unidimensional

Modalidad ecográfica más simple, consiste en la visualización de un osciloscopio de los ecos recibidos, que se registran como oscilaciones sobre la línea base en un sistema de coordenadas. Es una representación muy sencilla, unidimensional y lineal que permite medir dimensiones y distancias de manera fácil y con gran precisión (1mm). Sin embargo, la morfología de

las deflexiones no es característica y por tanto su interpretación es subjetiva.

3.2. Modo B o ecografía bidimensional

El eco captado por el receptor se registra en la pantalla como un punto, cuyo tamaño y luminosidad dependen de la intensidad del eco. Los puntos se distribuyen en la pantalla de forma igual y proporcional a las estructuras donde se originan, generando una imagen en 2D de las estructuras estudiadas, dando la impresión de imagen en “tiempo real”. Este modo de examen ecográfico emplea unos niveles mínimos de energía, produciendo un riesgo mínimo de daño tisular.

3.2.1. Escala de grises: La intensidad lumínica que presenta el punto generado por el eco reflejado en la pantalla, depende de la densidad del cuerpo donde el eco ha quedado reflejado y se representa por una escala de grises que descompone la intensidad en una escala de 8, 10 o 15 intensidades. Cada una representada por una tonalidad en la escala de grises, donde el blanco es la máxima intensidad (ya que la densidad del tejido es elevada y todos los ecos se reflejan y la mayor parte de la energía vuelve) y el negro el silencio (donde los ecos no encuentran obstáculos y la energía se disipa). Esta aplicación, es más rica en datos y facilita la lectura y comprensión de las imágenes. La calidad de la imagen está relacionada con la resolución espacial, esto viene determinado por el número de píxel de la pantalla. Por tanto, el equipo debe trabajar con una frecuencia de actualización de imagen (*frame-rate*) mayor a 15 cuadros por segundo.

3.3.-Efecto Doppler

Hasta ahora hemos analizado las características del fenómeno ondulatorio y los efectos que tienen en el medio, en función de su impedancia, sobre la dirección y la energía portada por la onda de un emisor estático. Hemos observado que la onda sufre modificaciones de velocidad de propagación o amplitud, y que la presencia de interfases entre medios de distinta densidad puede desviar su trayectoria, sin embargo su frecuencia permanecía constante.

Sin embargo, a finales de la década de los 50 surge una nueva técnica ecográfica, la ecografía Doppler en la que el emisor se halla en movimiento, por lo que la onda registrada por el receptor no tendrá la misma frecuencia. La ecografía Doppler se basa en la ecuación Doppler, definida como “el cambio de frecuencias experimentado por una onda al ser reflejada es proporcional a la velocidad con la que se desplaza la superficie reflectora y al ángulo de incidencia de dicha superficie”. En consecuencia, conociendo las diferencias entre la onda emitida y la onda reflejada y el ángulo de insonación, es posible calcular la velocidad a la que se mueve un objeto sobre el que se ha hecho incidir el haz (Maulik Dev, 2005).

Teniendo en cuenta las características de emisión del haz US se pueden diferenciar dos tipos de Doppler: el Doppler continuo y el Doppler pulsado.

3.3.1 Doppler continuo: utiliza un primer transductor que emite un haz de luz de manera continua, suministrando una señal eléctrica de frecuencia y amplitud constantes; dicha señal se aplica a un segundo transmisor presente en la sonda ultrasónica. La elección de la frecuencia depende de la aplicación clínica, siendo de 2 MHz para los estudios obstétricos y abdominales profundos.

La señal codificada por el receptor consiste en el acoplamiento de señales, algunas de igual frecuencia que la del emisor (provocadas por reflexiones de estructuras estacionarias y por la pérdida de corriente eléctrica desde el emisor al receptor) y algunas con frecuencia distinta causada por reflexiones de objetos de movimiento en el campo ultrasónico (**efecto Doppler**)

Este sistema es sencillo y útil sólo cuando se desea conocer el cambio en la frecuencia Doppler, pero no brinda información direccional. Es el método más apropiado para la medición de velocidades de flujo elevadas, pero no permite discriminar entre los objetos de acuerdo a sus distancias debido a la presencia de dos transductores independientes.

3.3.2. Doppler pulsado: utiliza un único transductor que realiza las funciones de emisor y receptor. En este tipo de US, la distancia a la que se encuentra un objeto pueden ser estimada partiendo de los retrasos correspondientes en la recepción de los ecos emitidos, asumiendo un valor determinado para la velocidad del US. Para poder obtener una información casi continua del vaso estudiado, es necesario que este fenómeno suceda a la mayor velocidad posible. El número de veces que el proceso se repite por segundo se denomina **frecuencia de repetición de pulsos (FRP)**, y

lógicamente una mayor FRP implica una menor profundidad del vaso insonorizado ya que implica un menor tiempo entre la señal de emisión y la de recepción.

Esta técnica provee una excelente resolución en distancia y permite obtener información acerca del flujo dentro de una determinada región, denominada **volumen de muestra** (*sample volume*). Es apta para la medición de flujo de velocidades medias y bajas dentro de un sitio específico.

Gracias a la información aportada por los estudios hemodinámicos mediante Doppler pulsado, se ha desarrollado el estudio de múltiples procesos fisiológicos interesantes para la obstetricia, como luego veremos.

4. Bioefectos de los ultrasonidos y su dosimetría.

Como hemos dicho existe un amplio uso de los US y diversas modalidades que hacen necesario el estudio de los mecanismos responsables de su interacción con el material biológico o de la denominada *biofísica de los US* (Fleischer A *et al*, 2010) (Figura 1). Es una interacción bidireccional, de manera que los bioefectos investigan cómo los US afectan al material biológico, mientras que el estudio de cómo los tejidos afectan a la onda ultrasónica nos proporciona la base para el análisis de imágenes ecográficas, permitiéndonos obtener la base científica

para comprender la producción de imágenes y conocer el riesgo del examen ecográfico.

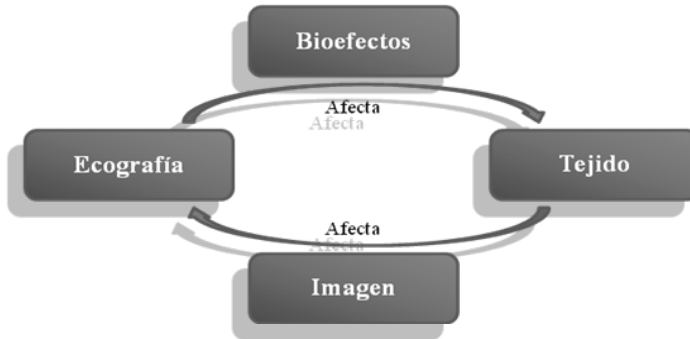


Figura 1: Esquema resumen de la interacción entre los tejidos y los haces de ultrasonidos. (Fleischer A et al. 2010)

Los posibles bioefectos de los US fueron constatados ya en 1972, cuando Hollander (Hollander HJ, 1972) afirmó que los US eran capaces de producir tres efectos biológicos básicos: i) incremento en la temperatura, ii) un efecto mecánico y iii) un efecto químico en los tejidos.

4.1. El efecto térmico se produce debido a las vibraciones moleculares provocadas por el uso de elevadas frecuencias al ser atravesadas por el haz incidente, de manera que la energía mecánica adquirida se transforma en calor. El cambio de temperatura en los tejidos insonados dependerá del balance entre la producción y la pérdida de calor por absorción. El calor localizado en un determinado tejido es proporcional al porcentaje de intensidad y tiempo al que se expone, convirtiéndose así en un concepto de potencia acústica el cual debe ser considerado a la hora de valorar el incremento de temperatura que un determinado

haz ultrasónico produce. De hecho, este concepto forma la base del índice térmico de seguridad como veremos a continuación. Las características físicas del haz como la frecuencia o amplitud, también modifican la temperatura.

La perfusión es una de las propiedades que más influye en el transporte del calor a través de los tejidos, siendo mucho más efectiva en los extremos más alejados del foco (cercano al transductor y más allá del foco) donde la sección transversal del haz es más amplia. En la región focal, donde el haz es estrecho, el efecto de la perfusión es menor ya que la conducción radial del calor hacia las zonas menos calientes es el mecanismo de transporte dominante para la disipación del calor (Abramowicz JS y Sheiner E, 2008).

La hipertermia tiene un efecto teratogénico probado en animales de experimentación (Edwards MJ, 1986) y está considerada por algunos investigadores como un teratógeno humano en determinadas circunstancias (Sherpard T, 1986). Esto es debido a que los tejidos biológicos son capaces de absorber la energía con la consiguiente producción de calor, de manera que puede existir un incremento de temperatura cuando la tasa de calor producido sea superior a la tasa de calor eliminado (O'Brien WD, Jr., 1992).

En relación con este efecto se ha introducido un nuevo punto de control, **la dosis térmica**. Este término hace relación al tiempo de exposición y se basa en un principio termodinámico sobre respuesta biotérmica, en la que se establece que el riesgo de aparición de un efecto térmico se incrementa de manera lineal en

relación con el tiempo y de manera exponencial con el incremento de temperatura.

Se han documentado incrementos de temperatura de 2.5 hasta 5°C tras exposiciones prolongadas de incluso una hora o mayores (AIUM (American Institute of Ultrasound in Medicine), 1994, Leie P, 1979, Miller MW y Ziskin MC, 1989). Sin embargo, se ha estipulado que no existen efectos térmicos en animales por debajo de los 39°C, aunque las elevaciones producidas en los tejidos fetales o embrionarios causados por los equipos diagnósticos no han podido ser suficientemente evaluados intraútero hasta el momento, como luego veremos.

4.2.- Por otro lado, el término “**mecanismos no térmicos**” hace referencia a la producción de bioefectos sin que se registre un incremento de temperatura (AIUM 1999), dichos efectos tendrían una causa mecánica.

Existen dos categorías de mecanismos mecánicos; cavitacionales y no cavitacionales:

4.2.1.- La cavitación es un término global que describe el crecimiento y posterior comportamiento dinámico de las burbujas gaseosas producidas en el tejido por la aplicación de US. Las cuales actúan sobre estas burbujas produciendo fuerzas de cizallamiento en las burbujas vecinas, lo cual puede alterar y/o destruir tejidos biológicos. Ocurre en presencia de cuerpos gaseosos, aunque la presencia de estos no es garantía de que dicho bioefecto sea por causa cavitacional y pueden existir dos condiciones cavitacionales diferentes:

4.2.1.1.-Cavitación transitoria inercial: se refiere a una actividad relativamente violenta, en la que “puntos calientes” de alta temperatura y/o presión dan lugar a rápidas explosiones, las cuales pueden ir acompañadas de ondas de choque localizadas o por la generación de especies reactivas de oxígeno (**ROS**; *Reactive oxygen species*) Es un proceso rápido que da lugar a la formación de radicales libres y otros compuestos químicos reactivos, como peróxido de hidrógeno, los cuales se ha demostrado que representan un papel en la aparición de mutaciones y en la fragmentación del ADN en estudios *in vitro*. (Riesz y Kondo 1992; Kondo y Kano 1988)

4.2.1.2. Cavitación estable: es mucho menos violenta y está asociada a la vibración de los cuerpos gaseosos.

Para que ocurra cavitación se requiere la presencia de gas estable dentro del cuerpo insonado. En los tejidos adultos de los mamíferos el gas lo podemos encontrar a nivel de intestinos o pulmón y existe una amplia relación de los efectos que la cavitación de los US producen en el organismo (Tabla 2).

Pero en el caso del feto es diferente, se asume que en su conjunto, el producto de la gestación es un compartimento estanco donde no existe la presencia de gas. Se ha visto en animales adultos la presencia de focos hemorrágicos en pulmón e intestino tras la exposición a límites diagnósticos de Doppler pulsado debido a la presencia de gas, pero estos mismos resultados no se han logrado repetir en tejidos fetales.

PRINCIPALES BIOEFECTOS MECÁNICOS DE LOS US

Liberación de ADN por rotura celular

- Generación de radicales libre (Fu *et al*, 1979)
- Permeabilidad (Montimer y Dyson, 1988; Dinno *et al*, 1989)
- Excitabilidad, incremento, supresión (Mihran *et al*, 1990)
- Aglutinación eritrocítica (Pohl *et al*, 1995)
- Crecimiento, descenso temporal (Kaufman y Miller, 1978)
- Roturas en el ADN de cadena simple (Miller *et al*, 1995)
- Incrementos en los cambios de cromátida hermana (Libeskind *et al*, 1979; Miller *et al*, 1996)
- Frecuencia de mutaciones (Kaufman 1985)

Ecografía diagnóstica con o sin agentes de contraste

- Petequias en capilares (Skyba *et al*, 1998; Miller y Quddus, 2000)
- Vasoconstricción vascular (Hynynen *et al*, 1996)
- Hemorragia microvascular a nivel pulmonar (Child *et al*, 1990; Tarantal y Canfield, 1994; Zachary y O'Brien, 1995)
- Hemorragia microvascular a nivel intestinal (Miller *et al*, 1995; Dalecki *et al*, 1995)
- Desarrollo fetal, desarrollo anormal de la cabeza, mecanismos térmicos (Ramnarine *et al*, 1998)
- Cardíaco, contracciones prematuras (Dalecki *et al*, 1993; MacRobbie *et al*, 1997)

Efectos terapéuticos

- Trombolítico (Nilsson *et al*, 1995; Tachibana y Tachibana, 1995)
- Antitumoral, realza el efecto de los agentes citotóxicos (Harrison *et al*, 1991; Saad y Hahn, 1992)
- Liberador de drogas a nivel local (Mukherjee *et al*, 2000; Price *et al*, 1998; Unger *et al*, 1998)
- Cirugía ecográfica (ter Haar, 1995)
- Estimulados del crecimiento óseo (Bender *et al*, 1954; Duarte, 1983)

Tabla 2: Resumen de los principales bioefectos mecánicos de los US
(Modificada de Stratmeyer ME *et al*, 2008)

4.2.2.- Efectos mecánicos No cavitacionales: puede causarse un efecto biológico inducido por US en condiciones donde no haya un exceso de calentamiento o cuerpos gaseosos. La causa es normalmente una fuerza de radiación, torsión o corrientes acústicas (Nyborg W, 1978).

La estimulación de los movimientos del feto con los US ha sido descrita y relacionada con el uso de un haz pulsado (Fatemi M *et al*, 2001). La explicación que se da es que un cuerpo expuesto a pulsos repetidos de US, inicia una vibración oscilatoria propia, capaz de generar también una onda ultrasónica con una frecuencia determinada, la cual se ha descrito resulta audible intraútero (Arulkumaran S *et al*, 1996).

Esta onda acústica al ser absorbida o reflejada por un objeto produce un cambio de densidad capaz de generar una fuerza constante en la dirección del haz de ese objeto, con la siguiente relación:

$$F = \frac{W}{c(R + 1)}$$

donde W es la fuerza incidente en el objeto, c la velocidad del sonido y R el poder del coeficiente reflexión del objeto.

Si bien esta fuerza reflectada puede estimular efectos auditivos, sensoriales y cardíacos, no se han descrito efectos adversos (Arulkumaran S *et al*, 1996), y los mecanismos de producción de ciertos efectos biológicos producidos *in vivo* todavía permanecen desconocidos, constatándose una especial sensibilidad al daño celular en los tejidos cuando la exposición se realiza en áreas próximas al hueso (Bigelow TA *et al*, 2007).

4.3. Dosimetría

A la hora de poder evaluar los posibles bioefectos y sus mecanismos biofísicos tras la exposición a US, surge la necesidad de desarrollar una cuidadosa definición de la exposición en términos de **duración de la exposición, dosis expuesta** así como de la caracterización de los **índices acústicos**.

La dosis acústica es definida como la energía depositada por segundo en cada unidad de masa de un medio bajo la onda acústica, siendo su unidad internacional los watios por kilogramo (Wkg^{-1}).

Los **índices acústicos**, deben ser caracterizados mediante la determinación del poder acústico y la intensidad media liberada por el transductor.

En relación con la **duración de la exposición**, se debe tener en cuenta las mediciones de presión acústica y los parámetros de intensidad, medidos en un punto específico del campo acústico. Pudiéndose dar como una medida estimada *in situ* en el punto de exposición ecográfico.

Cada una de estas mediciones son importantes para una especificación completa de las condiciones acústicas relacionadas con los posibles efectos biológicos.

Para ello, la FDA (FDA Report, 1993) pretende regular la potencia de los equipos ecográficos mediante el empleo *in vitro* de fantomas -medios libres de pérdidas de energía- con el fin de obtener los datos de presión acústica producida por cada aparato.

4.3.1. Los índices acústicos de seguridad de los ecógrafos: térmico (TI) y mecánico (MI).

El término “seguro” implica la ausencia de daño, es decir, el procedimiento no supone ningún riesgo. Un valor importante a la hora de evaluar la seguridad ecográfica es la intensidad del haz de US, ya que este parámetro es el más establecido en la bibliografía sobre los bioefectos y es un punto de control desde las administraciones reguladoras. Sin embargo, la intensidad al ser calculada *in vitro* no es un valor predictivo de cavitación y/o calentamiento de los tejidos.

Es por este motivo, que la FDA ha establecido los **ODS** (*Estándar de potencia de emisión de la señal*). Cuyo objetivo (Ewigman BG *et al.*, 1993; AIUM/NEMA (American Institute of Ultrasound in Medicine and National Electrical Manufacturers Association) Report, 1998; AIUM, 1994; AIUM, 1999; O'Brien WD Jr., 1995) es hacer posible la capacidad de trabajar con intensidades mayores a las previamente permitidas, ofreciendo un dato semicuantitativo (AIUM 1992, revisado 1996), basado en indicadores biofísicos, relacionado con el incremento máximo de temperatura (representado por el llamado índice térmico, **TI**; *Thermal index*), como de producción de cavitación (o índice mecánico, **MI**; *Mechanical index*) en un tejido sometido al haz de ecografía. Estos índices vendrán representados en la pantalla del ecógrafo durante la exposición, (Figura 2) permitiendo al clínico tener información útil en tiempo real para tomar decisiones clínicas apropiadas para valorar el riesgo/beneficio y poder aplicar el principio ALARA: *Tan bajo como sea razonablemente posible*. (Anonymous 1990; AIUM, 1994).

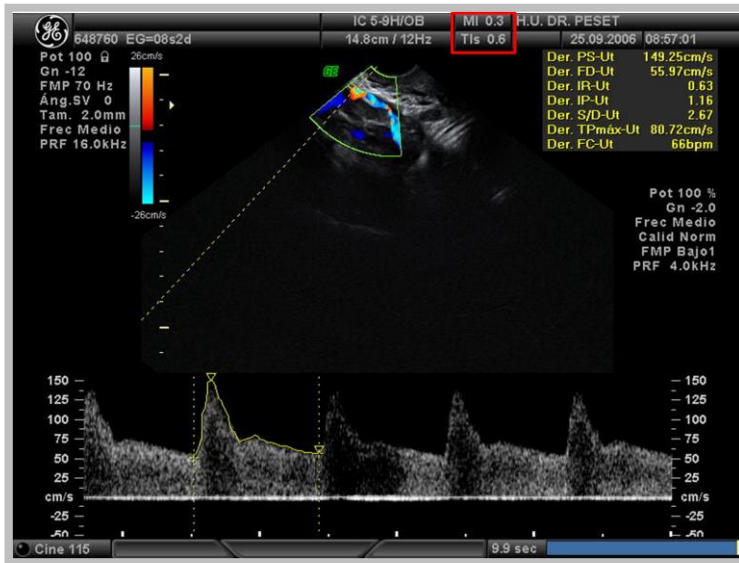


Figura 2: Imagen de la pantalla de un ecógrafo de uso clínico. En el cuadrado rojo se pueden observar cómo están presentes los valores del índice térmico y mecánico.

4.3.1.1. Índice térmico

El índice térmico (**TI**) es una estimación del aumento de temperatura debido a la absorción de US. Estima la potencia de fuente de US necesaria para incrementar un grado centígrado la temperatura tisular. Debe estar presente en la pantalla del ecógrafo en las exploraciones con uso de modos de elevada frecuencia como es el Doppler pulsado y además se recomienda que su valor sea inferior a 1 y que la exposición no supere los 5-10 minutos (Salvensen K *et al*, 2011).

Actualmente se consideran tres tejidos modelo a la hora de aplicar los ODS:

- i. *Modelo de tejido blando homogéneo* (TIS; *Thermal index soft tissues*): característico de los tejidos blandos
- ii. *Modelo de tejido con hueso a foco* (TIB; *Thermal index bone*): Es el tipo de exposición característica de en gestaciones de segundo y tercer trimestre, donde el hueso fetal es interceptado por el haz de US.
- iii. *Modelo de tejido óseo en superficie* (TIC; *Thermal index cranial*): es el tipo de exposición presente en las exposiciones craneales de individuos adultos.

Si estos modelos fuesen replicas exactas de la situación real, el TI podría cuantificar el incremento máximo de temperatura en grados Celsius en un tejido debido a la absorción de la ecografía. En la práctica, ofrece una estimación razonable del incremento de temperatura para modos no pulsados (modo M; Doppler continuo).

El TI se basa en cálculos relacionados con la distancia entre el haz de US y la superficie expuesta, con la intención de estimar el punto de mayor calentamiento, aunque en la zona proximal a la sonda el incremento de temperatura es debido principalmente al calentamiento propio de la sonda (Figura 3). Para ello se debe tener en cuenta que los tejidos blandos que atraviesa el haz de US actúan como un factor atenuante, haciendo que la onda disminuya al atravesar dichas estructuras. Como hemos mencionado anteriormente, esta disminución depende de dos propiedades; la absorción y la dispersión. La absorción representa la porción de energía de la onda que se pierde debido a su conversión en calor, mientras que la dispersión puede definirse

como la porción de energía que cambia de dirección, parte de la cual es reflejada como ecos dando lugar a la imagen en la pantalla.

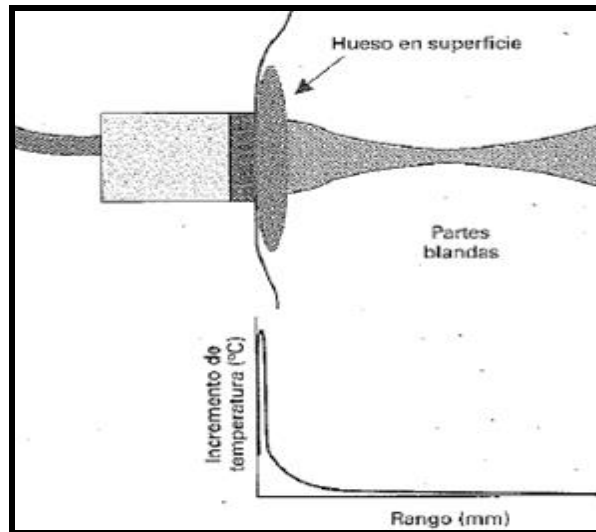


Figura 3: Perfil de incremento axial de temperatura en el modelo tisular de hueso a superficie y modo n enfocado. (Imagen extraída del Maulik Dev, 2005).

4.3.1.2. Índice mecánico:

Representa el potencial de cavitación de un proceso diagnóstico, este índice se basa en experimentos en laboratorio *in vitro* y no en resultados obtenidos de la experimentación *in vivo* (AIUM/NEMA Report, 1998; AIUM, 1999).

De manera que el índice mecánico se calcula mediante la siguiente fórmula;

$$MI = \frac{Pr.3}{\sqrt{f}}$$

y muestra la relación entre la presión *in situ* en el pico máximo de la refracción de la onda acústica ($P_{r,3}$) y la frecuencia (f) de emisión de onda.

La FDA recomienda no trabajar con índices superiores a 1.9 de MI. (FDA Report, 1997), donde el pico espacial *in situ* o *pulso de intensidad media (ISPPA)* es de aproximadamente 240Wcm^2 , y donde la fuerza de radiación generada sería 3.5 veces superior a la gravedad ejercida sobre el mismo tejido. La FDA establece que para las evaluaciones clínicas el ISPPA no debe superar un valor de 720mWCm^2 , donde la fuerza de radiación máxima sólo supondría alrededor del 1% de la fuerza de gravedad ejercida sobre el tejido.

5. Controversias en seguridad ecográfica:

Hace ya medio siglo desde la aparición de los primeros ecógrafos con aplicación ginecológica, sin notificación de riesgo para el crecimiento fetal, y han pasado ya casi cuatro décadas desde los primeros estudios para evaluar el riesgo de daño por la energía ecográfica (O'Brien WR Jr. *et al.*, 1972).

5.1. Historial de seguridad

El diagnóstico por ecografía tiene hasta la fecha un destacado historial de seguridad debido al rígido control de la FDA y las recomendaciones y revisiones de seguridad por grupos de trabajo son constantes (NCRP Report, 2002).

Desde que en 1972 Hollander (Hollander HJ, 1972) afirmó que los US eran capaces de producir tres efectos biológicos básicos; un aumento de la temperatura, un efecto mecánico y un efecto químico. El tema de la seguridad en la exposición de los fetos humanos ha sido un tema de constante revisión. Además Hollander afirmó que estos efectos podían presentar efectos sumatorios, dando lugar a la aparición de efectos perjudiciales considerables. Gracias a este tipo de afirmaciones surgió una gran controversia acerca de la seguridad de los US, la cual concluyó con las declaraciones de Hill (Hill CR, 1972) constatando que “no existen pruebas claras de que el uso de los US en medicina sea inherentemente dañino. A las intensidades y frecuencias que se emplean en el diagnóstico obstétrico los US son absolutamente inofensivos”

No fue hasta 1982, que la comunidad científica vuelve a preocuparse sobre la seguridad de los equipos. Momento en el que, Doreen Liebeskind, radióloga y genetista, explicaba con detalle el resultado de sus experimentos *in vitro* de exposición a US de rango diagnóstico con células humanas en suspensión. En sus resultados afirmaba que los US eran capaces de producir alteraciones del crecimiento celular, del ADN, y del intercambio

de cromátidas (Liebeskind D *et al.*, 1979; Liebeskind D *et al.*, 1981; Fleischer A *et al.*, 2010).

En 1983 el *National Institute of Health of EE.UU (NIH)*, convocó una conferencia extraordinaria en la que participaron tres de sus organismos integrantes: el *National Institute of Child Health and Human Development (NICHD)*, La *Office of Medical Applications of Research (OMAR)* y la *Division of Research Resources (DRR)*, junto con el *National Center for Devices and Radiological Health de la FDA* (Consensus Conference, 1984). En esta cita se trató de analizar en detalle todas las publicaciones acerca de los bioefectos de los US, llegando a las siguientes conclusiones: i) no se disponía de datos suficientes para recomendar un uso rutinario de la ecografía en todas las gestaciones. ii) no existía tampoco datos necesarios para impedir su uso en determinados momentos gestacionales siempre que su uso esté indicado. iii) a pesar de no existir evidencias de daño en el feto, dada la posible implicación de una afectación durante el primer trimestre que se pudiese constatar en un futuro, era aconsejable limitar las exploraciones a las indicaciones formales y ceñirse a la dosimetría de seguridad.

En 1985, la FDA publicó la guía 510k para la utilización de los US, en la que se incluyen las recomendaciones anteriores. En esta misma línea la *American Institute of Ultrasounds in Medicine (AIUM)* en dos informes publicados en 1987 y 1993 comunicaron que todavía se siguen sin confirmar efectos adversos como consecuencia del uso de US en obstetricia (FDA Report, 1987; FDA Report 1993).

Por lo tanto, se debe recordar que en el pasado la normativa de la FDA y diversas organizaciones relacionadas (Consensus Conference, 1984; AIUM, 1994) han incluido recomendaciones para el estudio de los bioefectos en aquellas áreas en las cuales existe poca bibliografía asociada, incluyendo en estos estudios el análisis postnatal de animales de experimentación tras su exposición intraútero a los US.

Sin embargo, las voces más críticas surgen en 1992, a raíz del incremento de la potencia de los equipos diagnósticos autorizada por la FDA, para obtener mejor resolución de imagen e intensidad, llegando a intensidades doce veces superiores a los equipos previos. Esta autorización, se basó en estudios previos a la norma, que habían sido realizados con aparatos más antiguos, lo que suponía potencias más bajas y con fantomas, nunca *in vivo*. Debido a este cambio en las intensidades acústicas permitidas, se produjo un cambio en el valor de intensidad de salida ($I_{STPA,3}$) desde valores de 94 a 720 mW/cm², para los equipos de ecografía obstétrica.

Desde principios de los noventa, se han sucedido diversas revisiones y recomendaciones por grupos de trabajo independientes destinadas a recopilar posibles efectos derivados del uso de los nuevos límites de intensidad (Ewigman BG *et al.*, 1993; AIUM, 1994; AIUM, 1999; National Committee on Radiation Protection and Measurement (NCRP), 1983), las cuales hacen hincapié en que no se han realizado los estudios necesarios que demuestren la ausencia de riesgos de la exposición humana a la ecografía (Alastair McKinlay, 2007; American Institute of Ultrasound in Medicine, 2013).

5.2. Valoración *in vivo* de la exposición

A continuación expondremos una serie de propiedades inherentes a la propagación *in vivo* de los US que hace dificultosa una valoración real de la exposición.

5.2.1 Propiedades acústicas de los tejidos corporales:

La propagación de las ondas a través de los tejidos está regulada por las propiedades acústicas inherentes a los mismos. (Duck FA, 1990; ICRU Report, 1998)

Estas propiedades inherentes que modifican la propagación de la onda son:

La velocidad de propagación: La velocidad a la que viaja una onda acústica es controlada por las propiedades mecánicas del medio que lo soporta, de manera que un incremento en la cantidad de agua o de lípidos da lugar a un descenso de dicha velocidad. Por lo tanto, tejidos con un elevado porcentaje lipídico como el hígado o la mama, presentan una menor velocidad de onda que los tejidos normales. En relación con el tejido fetal también muestra una reducción la velocidad de propagación de la onda, en comparación con tejidos adultos, debido a su elevada proporción de su contenido en agua.

Impedancia acústica y la presencia de interfases: Uno de los principales inconvenientes a la hora de trabajar en tejidos es la presencia de interfases entre diferentes tejidos. Estas interfases dan lugar a pérdidas en la intensidad de onda emitida, cambiando así los valores de intensidad que finalmente llegan al tejido diana.

Un claro ejemplo es que, cuando tenemos una interfaz formada por un tejido blando y hueso, cerca de la mitad de la energía emitida será reflejada al contacto con la interfaz. Siendo esta pérdida de energía completa cuando se produce una interfaz con el aire. Es por este motivo por el que es necesario la presencia de un material, como puede ser el aceite o un gel de acoplamiento, entre la sonda transductora y la piel para poder realizar el examen ecográfico.

Atenuación, absorción y dispersión: ya hemos comentado que la amplitud e intensidad en una onda de US varía con la distancia, produciéndose una pérdida de energía (Figura 4). Esta pérdida o atenuación provoca una serie de cambios en los tejidos corporales, tales como pérdida de viscosidad, conductividad térmica y alteraciones en procesos moleculares (Kinsler LE *et al.*, 2000). Es por este motivo que la FDA ha establecido el coeficiente de atenuación ultrasónico del tejido cuyo valor estimado es de 0.3 dB/(cm/MHz) (FDA Report, 1993; FDA Report 1994; FDA Report,1997). Sin embargo, es importante resaltar que esta estimación fue definida *in vitro*, bajo mediciones acústicas en un medio acuoso, y como ya hemos definido las propiedades de la onda difieren de aquellas realizadas en los tejidos, asumiendo por lo tanto una propagación lineal debido a la ausencia de interfases. Además, la energía absorbida por la materia incrementa los posibles efectos biológicos.

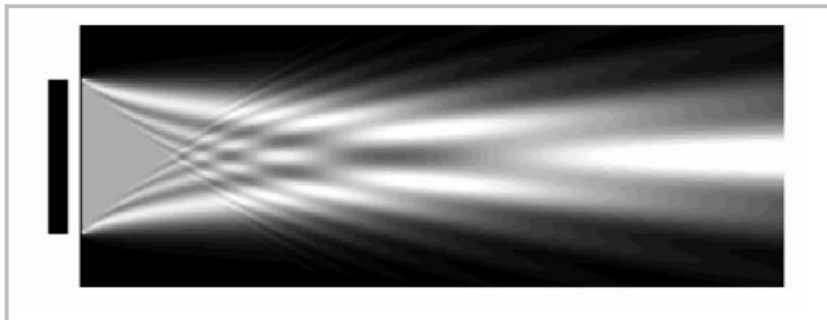


Figura 4: Variación en la presión acústica en un medio acuoso calculado mediante un plano transaxial de simetría. La fuente fue una pieza cuadrada de 20 mm, con una vibración de 2.25 MHz. La fuente se ha colocado en la parte izquierda con una dirección de propagación que llega hasta los 200mm desde el origen. Se puede apreciar como en la región más próxima a la fuente la variación en la presión acústica es más densa

Es por este motivo que numerosos autores informan sobre una posible infraestimación de este factor de corrección en determinadas exposiciones, como es el caso de exposiciones en gestaciones de menos de 20 semanas, en las que se ha demostrado un valor de pérdida mínima de 0,14dB/ (cm/MHz). (Siddiqi TA *et al.* 1995)

Propagación no lineal de los efectos cuando los pulsos ultrasónicos viajan a través de los tejidos. Existe una distorsión progresiva de la onda debido a la presencia de diferencias de presión. Este fenómeno se le denomina “*shock acústico*” (Duck FA, 2002; Starritt HC *et al.*, 1986). Esta distorsión está influenciada por varios factores: la frecuencia y amplitud de la onda, el coeficiente no lineal del medio y la distancia recorrida por la onda. La propagación de la onda está asociada con una

absorción adicional de energía, la cual altera la pérdida de propagación y la deposición de energía en los tejidos.

Esta propiedad es importante ya que: i) por un lado y como ya hemos comentado en las estimaciones de seguridad se ha asumido un modelo lineal, basado en valoraciones *in vitro* sobre un medio acuoso, pudiendo estar infravalorado cambios en esta linealidad en los tejidos, especialmente en exposiciones de tejidos profundos y de frecuencias elevadas (Cahill MD y Humphrey VF, 2000). ii) Por otro lado, los métodos de análisis presentan un alcance limitado para la predicción teórica de la propagación acústica no lineal, ya que están basados en modelos matemáticos. (Hamilton MF y Blackstock DT, 1998). De manera que, la predicción de la propagación no lineal a través de los medios de dispersión sigue siendo un reto en el tema de la seguridad.

Por último, otra consideración importante es **la duración de dichos bioefectos de los US**, no es sólo estimar la intensidad de US que se expone sino también determinar el número de exposiciones necesarias para el diagnóstico y su duración.

5.3. Extrapolación de los datos

A lo largo de las últimas décadas se han llevado a cabo numerosos estudios, tanto *in vivo* como *in vitro* para evaluar la seguridad del uso de ecografía. Sin embargo, dichos resultados deben ser tratados minuciosamente a la hora de comparar y extrapolar conclusiones, ya que las condiciones de experimentación pueden no ser comparables.

Por ejemplo, los estudios *in vivo* en los que se expone un tejido intacto, los mecanismos térmicos adquieren mayor importancia que en los desarrollados en sistemas *in vitro*, debido a una mayor absorción de la energía del haz en el tejido. Además, diferencias en los mecanismos iniciales de respuesta al daño entre estudios *in vitro* e *in vivo* dificulta la extrapolación de las condiciones de exposición entre modelos.

En el caso de los ecógrafos médicos nunca se han establecido distinciones entre la exposición y la dosis, debido principalmente a una mala interpretación de la literatura. En este tipo de trabajos se presentan datos como “exposición acústica”, pero casi ningún trabajo muestra valores como cantidad de energía depositada por unidad de masa. El principal problema a la hora de analizar estos trabajos es que estos parámetros no son fácilmente caracterizados, ya que este tipo de equipos vienen programados de fábrica y el acceso a esos datos no está disponible para el clínico.

No debemos olvidar que para evaluar la implicación de los posibles bioefectos observados, es importante considerar la maduración del individuo expuesto. De manera que la presencia de daño celular presenta una mayor significancia biológica cuando se ocasiona daño sobre unas pocas células de un feto en desarrollo, que cuando ese mismo daño es causado en un individuo adulto. El grado de desarrollo del feto es también muy importante cuando se analiza el impacto del uso de ecografía para el potencial biológico del organismo, ya que embriones tempranos presentan unas propiedades acústicas similares a las del agua, por lo que se puede descartar un efecto de calentamiento craneal, mientras que en un feto de tercer trimestre en el cual se ha producido ya la

mineralización la posibilidad de calentamiento de estructuras óseas es totalmente viable.

Basándonos en esta problemática a la hora de comparar la bibliografía existente, hemos obtenido una serie de consideraciones a tener en cuenta:

1.- que la exposición a US durante el embarazo podría inducir una hipertermia localizada, se ha analizado su efecto teratogénico de manera extensa (Miller MW y Ziskin MC, 1989; Miller NW, 2002; Edwards MJ *et al*, 2003). Concluyendo que la hipertermia puede causar diversidad de efectos que incluyen: la muerte del feto, el retardo en el crecimiento, presencia de anomalías externas e internas, déficits de desarrollo y alteraciones en el comportamiento persistentes en la edad adulta.

Pero también cabe destacar, que es el modo Doppler pulsado el que podría afectar a la integridad de los tejidos en desarrollo, mediante interacciones no térmicas. (Abramowicz JS, 2005; Sienkiewicz Z, 2007)

2.- El desarrollo del SNC parece particularmente sensible a los efectos del calor, de manera que la elevación de la temperatura materna puede producir efectos adversos en los tejidos en desarrollo.

Sin embargo, existen tres factores que interfieren en los resultados de los estudios complicando su extrapolación, son: el grado de elevación de la temperatura materna, la duración del mismo y la etapa de desarrollo embrionario en la que sucede la exposición (pre-implantacional, organogénesis o período fetal). En 2003, Edwards determino que existen periodos críticos durante el

desarrollo, los cuales se presenta una mayor sensibilidad al calor (Tabla 3).

Estado de desarrollo	Preimplantación	Embrión temprano	Estado fetal	Crecimiento fetal/postnatal
Eventos biológicos	-	Tubo neural, ojos, cara, corazón y desarrollo vertebral	Neurogénesis, migración celular neuronal. Desarrollo de órganos y estructuras	Proliferación de las células de la glia y mielinización
Mecanismos patológicos	-	Muerte celular, disrupción en la inducción de genes, membranas celular y migración de la cresta neuronal, crecimiento de los tejidos neuronales	Muerte celular, disrupción de la inducción de genes de la organogénesis, proliferación neuronal y migración, daño placentario	Muerte celular, disrupción de la inducción de genes y proliferación de células gliales, pérdida de mielinización y disrupción vascular.
Resultados adversos	Resorción, muerte, o falta de efecto	Aborto, defectos en el túbulo neural, defectos en las vertebras, microftalmia, ceguera.	Aborto, muerte fetal, microencefalia, déficit de comportamiento, talla anormal, defectos de pared, cambios en el tono muscular	-

Tabla 3: Efectos teratógenos del calor en los diferentes estados de desarrollo. (Adaptado de Edwards MJ *et al.*, 2003)

3.- El concepto de dosis térmica surge de la relación entre el incremento de temperatura y el tiempo de exposición necesario para producir un efecto biológico o teratogénico (Sapareto SA y Dewey WC, 1984; Miller MW y Ziskin MC, 1989; Church CC y

Miller MW, 2007). Existe incertidumbre acerca de qué incremento sería necesario para inducir estos efectos, dando lugar al concepto de “umbral de temperatura” por encima del cual se produce daño biológico: las mejores estimaciones sugieren un rango de 1.5-2.5 °C por encima de la temperatura corporal (Miller MW *et al.*, 2002). Siendo muy difícil su extrapolación a la hora de comparar resultados, ya que dicho umbral varía en función del daño causado y de la especie objeto de estudio.

4.- La gran controversia de los resultados publicados debido al uso de técnicas clásicas para la evaluación de la teratogenicidad, basadas en la viabilidad de los fetos o embriones, el tamaño o peso de las camadas y la incidencia macroscópica de las alteraciones, usando como modelo en su mayoría roedores (Abramowicz JS y Sheiner E, 2008).

5.4. Datos epidemiológicos en humanos

En ser humano se han realizado diversos estudios epidemiológicos (Hellman LM *et al.* 1970; Lyons EA *et al.* 1988; Moore RM Jr. *et al.* 1988; Mukubo M, 1986; Salvesen KA *et al.* 1994; Stark CR *et al.* 1984; Ziskin MC y Petitti DB, 1988) y estudios *in vivo* en mamíferos para examinar temas relacionados con la seguridad en el diagnóstico ecográfico, de los cuales se concluye que si los US fueran un agente capaz de inducir malformaciones grotescas, a estas alturas debería existir constancia de dichos defectos en recién nacidos. A pesar de haberse demostrado un aumento de la dislexia en niños expuestos a ecografía intraútero (Stark CR *et al.*, 1984), no se observaron

diferencias en las pruebas neurológicas y cognitivas realizadas entre los 7 y 12 años de edad. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la medida de circunferencia cefálica al nacimiento o en la altura y peso desde el nacimiento hasta los 6 años de edad (Lyons EA *et al.* 1988).

Sin embargo, se ha postulado acerca de la posibilidad de restricción del crecimiento intrauterino (Newnham JP *et al.*, 1993) asociado al examen ecográfico, existiendo varios modelos animales que muestran la disminución en la ganancia de peso fetal como respuesta a la exposición a los US (Hande MP y Devi PU, 1993; Rao S, 2006)

La importancia de esta inquietud radica en el elevado porcentaje de población prenatal expuesta y al desarrollo de la técnica que podría resultar en un incremento de la exposición al feto.

6. ¿Uso a abuso? Aplicación obstétrica.

En el campo de la obstetricia, debido a la abolición del empleo de las radiaciones ionizantes, es donde el uso de la ecografía adquiere un papel particularmente útil. Permitiendo evaluar el tamaño y el bienestar fetal, la presentación y posición del feto, junto con la hemodinámica materno-placentaria de manera rápida, barata y relativamente segura para el diagnóstico. Son muchos los facultativos que consideran que el diagnóstico ecográfico no supone ningún riesgo para la madre ni para el feto,

aunque también existe un gran número de investigadores que sostienen que las investigaciones realizadas para afirmar dicho cometido han sido inapropiadas. El hecho de que tras casi tres décadas se siga debatiendo acerca de su seguridad demuestra el interés de la comunidad científica básica y clínica en poder asegurar que su uso está exento de riesgo.

Acerca de sus indicaciones de uso, no existe un consenso internacional. Por un lado, no existe un uso universal de la ecografía en los sistemas de salud en países desarrollados, lo que provoca grandes diferencias en cuanto al número y contenido de los estudios. Por otro lado, tampoco existen unanimidad sobre quién deber realizar estos estudios o cual es la acreditación necesaria para realizarlos. Por último, en la actualidad existe un interés económico sobre el desarrollo de esta técnica para un uso “no médico” argumentando que la posibilidad de ver el feto a través de la tecnología disponible (fundamentalmente tridimensional) disminuye la ansiedad materna.

En la actualidad, esta tecnología forma parte del manejo de las gestaciones de riesgo. Entre sus usos más estandarizados se encuentran el análisis de fetos con retraso en el crecimiento intrauterino, patologías como la preeclampsia o el manejo de casos de isoimmunización y anemia fetal, además de estudios relacionados con la función cardíaca y la hemodinámica en patologías como las arritmias o las cardiopatías congénitas. (Barbieri C, 2012)

El cribado de los estados hipertensos del embarazo postula el análisis de los vasos uterinos maternos a las 20 semanas a toda

la población de gestantes y su repetición a las 4 semanas (Campbell S SP, 1993).

Gracias al desarrollo de esta tecnología se intenta desarrollar un seguimiento más exhaustivo de las gestaciones de alto riesgo, donde últimos trabajos exponen los beneficios de analizar las diversas áreas cerebrales en fetos con hipoxia mediante el uso de ecografías seriadas en cortos intervalos de tiempo (Harman CR y Baschat AA, 2003).

Sin embargo, cada vez son más los estudios que analizan el bienestar fetal mediante la valoración del flujo de diversos vasos y el acercamiento a edades tempranas del embarazo. El análisis del territorio uterino se ha estudiado desde el comienzo de la gestación y se está trabajando en el análisis de estos vasos como cribado de insuficiencia placentaria alrededor de la semana 12 de gestación (Jurkovic D *et al.*, 1991).

El cribado de aneuploidias como el síndrome de Down o de Edwards, se realiza en todos los fetos sobre la semana 12, incorporando cada vez más marcadores que precisan del uso de la tecnología Doppler mediante haces pulsados sobre el corazón y el hígado fetal, lo que va a suponer un aumento del tiempo de exposición de los fetos, cada vez más pequeños, a frecuencias cada vez mayores (Maiz N *et al.*, 2009).

Se ha estimado que cerca del 100% de las mujeres que solicitan atención obstétrica serán sometidas a no menos de una ecografía a lo largo de su embarazo. En países en los que la exploración ecográfica prenatal de rutina, los investigadores han observado que la exploración ecográfica es beneficiosa para

detectar malformaciones genéticas, diagnosticar gestaciones gemelares y placenta previa, y para identificar pacientes en riesgo de postmadurez y retraso del crecimiento intrauterino. Todo ello conlleva un mejor manejo y seguimiento de estas gestaciones, que a la larga repercute en una morbimortalidad perinatal más baja (The American institute of Ultrasound in Medicine (AIUM) Bioeffects Committee, 2009)

La indicación del seguimiento ecográfico de las gestaciones de riesgo es incuestionable, ahora bien, tema diferente es el cribado de las poblaciones de bajo riesgo. El estudio RADIUS proporcionó las pruebas de que en condiciones establecidas, el control ecográfico indiscriminado en poblaciones de bajo riesgo no aportaba beneficios perinatales significativos (RADIUS (Routine Antenatal Diagnostic Imaging with Ultrasound Study Group) *et al.*, 1993). El estudio mostró también que el examen ecográfico era percibido por las mujeres como una necesidad.

Otro punto en el que se basan muchos detractores del uso rutinario, es que los estándares de crecimiento fetal establecidos no sirven para detectar fetos con problemas de RCIU en los lugares en los que se tiene poco acceso al control prenatal ya que estos biomarcadores están basados en la población europea y americana de los años 70, además de tener un comportamiento biométrico diferente desde el inicio del embarazo. (Papageorghiou AT *et al.*, 2014).

En el marco internacional, existen tres estrategias posibles con respecto al uso de la ecográfica en el embarazo:

Países europeos con sistemas de salud similares al nuestro como son Alemania, Francia, Bélgica, Austria y Holanda, en los últimos años han desarrollado programas de cribado en los que se incorporan dos estudios ecográficos selectivos de cribado en la población gestante. (Uno en torno a las 11-14 semanas y otro alrededor de la semana 20).

En países con sistemas de salud no tan universales y gratuitos, como pueden ser USA y Reino Unido, defienden un uso más restrictivo de la ecografía y descartan el uso de un cribado ecográfico en la población de bajo riesgo.

Por último, estarían países con amplia experiencia y disponibilidad a los estudios gratuitos, como Italia y España donde se ha derivado en el uso rutinario de un mínimo de 3 estudios ecográficos a lo largo de la gestación. En nuestro país, existe la recomendación de realizar una ecografía de crecimiento fetal en torno a la semana 30 de gestación (Di Renzo GC *et al.*, 1992).

En cuanto a la calidad de este examen ecográfico es importante determinar el conocimiento de la técnica empleada por el personal clínico. Se ha mostrado que más del 90% de los usuarios americanos de aparatos ecográficos desconocen el tiempo máximo de aplicación de un haz concentrado durante el periodo embrionario (Sheiner E *et al.*, 2007). Dentro de los especialistas en Obstetricia y Ginecología de diversos países se observó que existía un gran desconocimiento acerca de los términos de seguridad presentes en los equipos, lo que constata la necesidad de formación de los especialistas en este tema (Salvensen K *et al.*, 2011). Fruto de este tipo de trabajos y del trabajo continuo de los comités de

seguridad fetal de las dos organizaciones internacionales más importantes en este tema (AUIM-EFSUM, ISUOG), han surgido en los últimos años importantes recomendaciones y guías sobre el uso apropiado de la ecografía con especial hincapié en evitar el empleo del Doppler pulsado en el primer trimestre de gestación salvo autorización expresa de los pacientes y se desaconseja el uso “no medico” de este tipo de exploraciones (Bhide A *et al.*, 2013; American Institute of Ultrasound in Medicine, 2013). También han surgido diversos trabajos en los que se evalúa una metodología empleando menores intensidades de salida para las exploraciones Doppler fetales (Sande RK *et al.*, 2012).

En relación con la acreditación necesaria para la realización de estudios obstétricos es un tema en continua controversia. El punto fundamental viene establecido por que fuera de nuestras fronteras, este tipo de estudios son realizados por personal paramédico, técnicamente cualificado en el área de la radiología. Además, conforme los estudios son más específicos, se complementan con la información clínica, de manera que es precisa una mayor información acerca de la flujometría del Doppler, por lo que la persona encargada de su manejo debe disponer de conocimientos y datos más extensos que pueden estar fuera de su formación.

Durante el embarazo, el período de mayor vulnerabilidad es durante el primer trimestre. La organogénesis finaliza sobre la semana 12 de gestación y tras este momento la posibilidad de daño por agentes teratógenos disminuye. Es por este motivo que se advierte a los usuarios que no deben utilizar la modalidad Doppler en el primer trimestre, especialmente durante el examen

transvaginal, a no ser que los beneficios superen claramente los riesgos, manteniendo siempre el principio de ALARA (Anonymous 1990).

En cuanto a la calidad de este examen ecográfico a nivel europeo sólo Alemania presenta un control estatal de calidad de las exploraciones ecográficas. En el caso de España, la sección de ecografía de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) desarrollo a partir de 1970 un sistema de niveles para graduar los cursos de ecografía obstétrica realizados en nuestro país. Existiendo 4 niveles de complejidad creciente, siendo el nivel IV reservado para el conocimiento de la hemodinámica materno-fetal y el aprendizaje de la tecnología Doppler.

7. Organogénesis Hepática y SNC

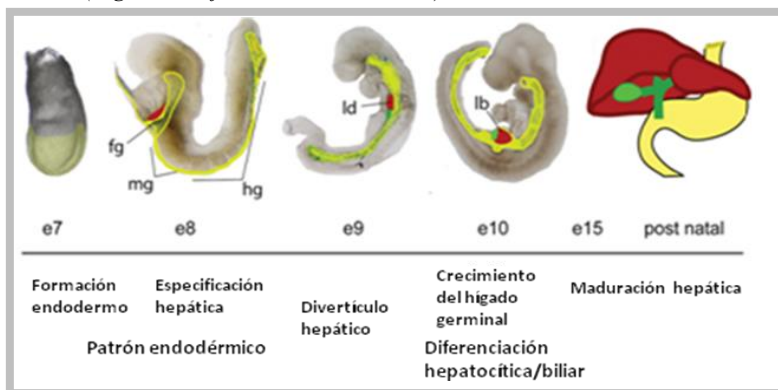
7.1. Organogénesis hepática de la rata.

Estudios de mapeo embrionario han datado que durante el proceso de gastrulación, en torno al sexto-séptimo día de vida embrionaria en la rata, se produce el desarrollo de la capa germinal del endodermo y la formación del intestino primitivo. Es a partir de la porción ventral anterior del intestino, desde donde se desarrolla el hígado embrionario de la rata, en torno al día 8 de vida embrionaria (E8) (Tremblay KD y Zaret KS, 2005).

La primera señal del desarrollo hepático es la formación del divertículo hepático coincidiendo con un incremento en la síntesis de proteínas precursoras de hueso (*Bone morphogenetic proteins* BMPs) y factores de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast growth factor* FGFs) desde el septo transverso y el corazón, respectivamente. Además, la presencia de factores de transcripción como GATA, Foxa1 y Foxa2 (Serls *et al.* 2005, Zaret 1996) provoca la activación de genes hepáticos específicos para la regulación de la hepatogénesis.

La parte anterior de este divertículo dará lugar al hígado y a la parte intrahepática de la vesícula biliar, mientras que la porción posterior dará lugar a la vesícula biliar y los conductos biliares extrahepáticos. (Figura 5)

Figura 5: Desarrollo hepático de un modelo murino. El esquema muestra embriones de rata en diversos estadios de desarrollo, los tejidos endodérmicos marcados en amarillo, el hígado en rojo y la vesícula biliar en verde. (Figura modificada de Zorn A, 2008)



A los 9-10 días de edad embrionaria, las células hepáticas endodermales, conocidas como hepatoblastos delimitan el epitelio e invaden los septos transversos de mesénquima adyacente para

formar el hígado germinal. (Houssaint 1980, Medlock y Haar 1983), precursores de los fibroblastos y células estrelladas del hígado. Entre los 10 y 13 días el hígado entra en un período de crecimiento acelerado y de vascularización, siendo invadido por células hematopoyéticas, convirtiéndose así en el mayor órgano hematopoyético fetal.

7.1.1. Eritropoyesis hepática.

La circulación fetal en el hígado es muy diferente que en un adulto, tanto desde el punto de vista estructural como funcional. El hígado fetal recibe dos diferentes vasos aferentes: la vena vitelina y la umbilical, completando su arquitectura fetal de la circulación venosa aferente en torno al día 14 de edad gestacional (E14).

Entre los días 9 (E9) y 13 (E13) de vida embrionaria, tiene lugar la eritropoyesis primitiva, la cual tiene su origen en el saco vitelino y será finalizada en el hígado embrionario. Durante este proceso se produce la formación de eritrocitos primordiales los cuales presentan como característica principal la presencia de núcleo celular, orgánulo que se perderá en su proceso de diferenciación a eritrocito adulto a partir del E13.

El hígado fetal ejerce funciones específicas, como la hematopoyesis, la cual no es mantenido en el hígado adulto; y va adquiriendo de manera progresiva la competencia fisiológica y metabólica desarrollada en el hígado adulto.

Comparación cronológica del desarrollo hepático fetal en humanos y ratas.		
Eventos:	Estadio embrionario (días)	
	Humanos promedio (rango)	Rata
Formación del <i>primordium</i> hepático	24 (23-26)	11.5
Desarrollo del divertículo hepático. Aparición de trabécula hepática en el <i>septum transversum</i>	28 (26-30)	12
Desarrollo del divertículo hepático. Proliferación del cordón hepático embebido en los sinusoides. Colapso de la vena umbilical derecha	30 (28-32)	12.5
Expansión rápida del hígado	33 (35-38)	13
Reorganización de la circulación fetal	36 (35-38)	13.5
Establecimiento de la circulación fetal definitiva	40 (37-42)	14
Formación de las placas ductales	Desde el día 42 hasta el 55 (41-56)	Desde el 14.5 hasta el 17
Formación del ductus intrahepático-biliar	57 (56-59)	7.5

Tabla 4: Relación cronológica del desarrollo fetal en humanos y rata.

(Modificada de Collardeau-Frachon S y Scoazec JY 2008)

Como ya hemos comentado los principales cambios en la circulación venosa del hígado fetal se producen alrededor del día 14 de vida embrionaria (Tabla 4). Llevándose a cabo el desarrollo de anastomosis intervitelinas, remodelación de la vena umbilical,

dividiéndose en dos arcos, uno dirigido directamente hacia el parénquima hepático y otro corre a lo largo del hígado hasta el seno venoso. Es a partir de este momento cuando se establece la circulación venosa aferente, remodelando el sistema umbilical a través del desarrollo del Ductus venoso (DV) y el establecimiento de la conexión permanente del la circulación portal y umbilical a lo largo del seno intermedio o portal (Collardeau-Frachon S y Scoazec JY, 2008) (Figura 6).

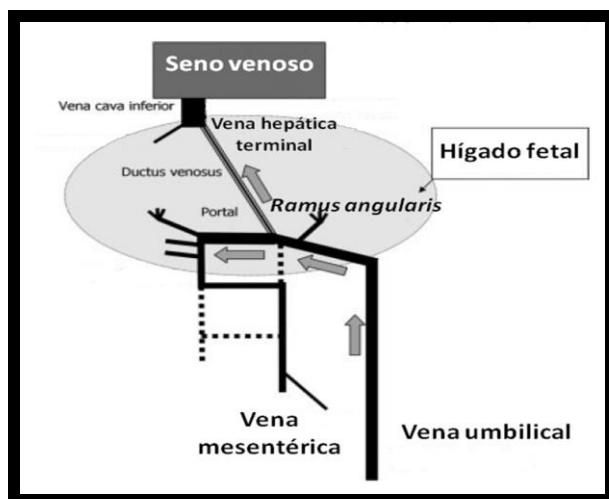


Figura. 6. La circulación fetal "definitiva" en el hígado en el día 14 de gestación. La vena porta está formado por diversos segmentos de venas vitelinas previas. La anastomosis subhepática ha sido originado por el seno porta, con conexiones con la vena umbilical al sistema portal. El DV conecta el ángulo izquierdo del seno portal a la vena cava inferior, lo cual también recibe terminaciones de tres venas hepáticas eferentes terminales. Las flechas indican la dirección de los flujos sanguíneos predominantes, la última parte del flujo sanguíneo en el seno portal alimenta los plexos sinusoidales (Imagen modificada de Collardeau-Frachon S y Scoazec JY, 2008)

La regeneración hepática es un parámetro fundamental de la respuesta al daño del tejido hepático. Este proceso es debido a la

interacción de diversos factores como son cambios en expresión génica, síntesis de factores de crecimiento, producción de interleucina 6, Factor de necrosis tumoral α , entre otros. (Böhm F *et al.*, 2010)

En 1931 Higgins y Anderson (Higgins GM y Anderson RM 1931) observaron que la hepatectomía parcial en ratas a las que se les extirpaban 2/3 del hígado se regeneraba tras 5 -7 días. Otros estudios han demostrado que la respuesta regenerativa es proporcional a la cantidad de hígado dañado. Esta regeneración está provocada por la proliferación de todas las células maduras remanentes; hepatocitos, células epiteliales biliares, células endoteliales, células de Kupffer y las células de Ito. Las primeras células en proliferar son los hepatocitos, alrededor del espacio periportal hacia los vasos centrales.

Existen factores de crecimiento envueltos en la respuesta mitogénica, como son el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) que aumenta rápidamente tras el daño, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformador α (TGF- α). Además también están implicadas ciertas citoquinas como son la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), secretados por las células de Kupffer (Figura 7).

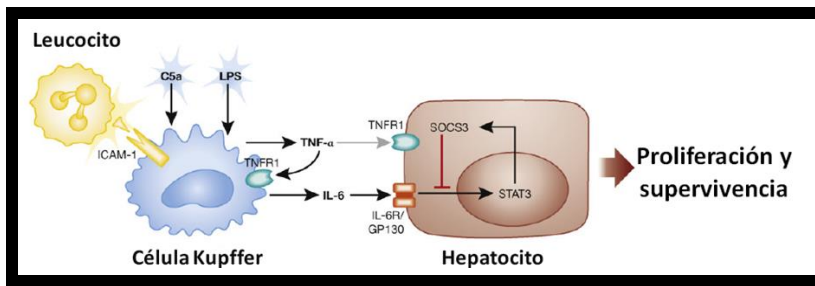


Figura 7: Regulación y función del TNF- α y la IL-6 en la regeneración hepática. (Imagen modificada de Böhm,F *et al.*, 2010)

7.2. Organogénesis del SNC

El desarrollo del cerebro fetal es un proceso complejo no del todo conocido. El cerebro fetal proviene de la placa neural. El desarrollo del túbulo neural muestra numerosas subdivisiones regionales, conocidas como entidades morfológicas (vesículas, eminencias, lóbulos...), sin embargo las subdivisiones moleculares, presentes incluso antes de ser apreciable cualquier cambio morfológico son los encargados de establecer un correcto diseño en el “estado morfológico definitivo”. De manera que a lo largo del desarrollo embrionario diversos factores de transcripción y genes de codificación morfológica se irán activando ya sea de manera homogénea o gradual para el correcto desarrollo del neuroepitelio codificando información posicional, de crecimiento y morfogénesis para dar lugar al cerebro adulto. Este proceso tan preciso puede ser influenciado por condiciones microambientales que pudiesen alterar el resultado final (Puelles E *et al.*, 2004)

A lo largo del desarrollo del primordio neural se irán sucediendo una serie de rutas de señalización cada vez más complejas, que darán lugar al desarrollo de procesos histológicos

de migración, proliferación, diferenciación y desarrollo de interacción que participarán en el desarrollo del cerebro adulto.

Es al inicio de la segunda semana de gestación en roedores (9.5 días de gestación) cuando en áreas específicas del SNC tiene lugar la neurogénesis y la migración celular hacia la región anterior, medio y posterior del cerebro. Dando lugar a la activación de procesos que implican la proliferación, migración, diferenciación, sinaptogénesis, apoptosis y mielinización. Alteraciones en estos procesos pueden dar lugar a anomalías congénitas severas, como podrían ser anacefalia, hidrocefalia,...

La ubicación de las células madres neuronales presentan un papel muy importante a la hora de la regularización, de manera que el desarrollo del hipocampo se produce en la capa media proliferativa a partir de las células piramidales y células dentadas, cuya formación se produce en la etapa prenatal y se desarrollan para dar lugar a la formación del hipocampo (Tabla 5) (Bayer SA, 1980). Mientras que la proliferación del cerebelo tiene lugar en diferentes fases, con la migración de las células proliferativas primarias hacia el cerebelo primordial durante el período fetal y una segunda etapa postnatal donde se produce proliferación celular en la capa granular externa del cerebelo.

Un dato constatado es la homogeneidad en los procesos de desarrollo del SNC en los vertebrados, de manera que el desarrollo del SNC humano presenta cierta homología con el de un murino, teniendo en cuenta claro está la diferencia en la escala temporal empleada en cada especie (Figura 8).

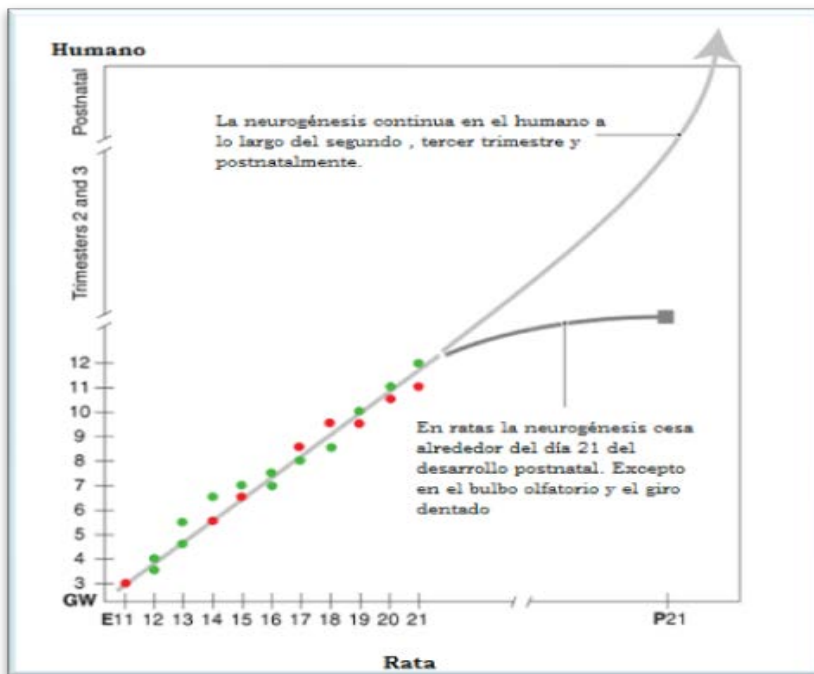


Figura 8: Correlación en el desarrollo embrionario de la rata y el humano. Los puntos verdes corresponden con datos comprobados por evidencia empírica, mientras que los puntos rojos corresponden a estimaciones teóricas. (Figura modificada de Bayer SA, 1980)

De manera que si se realizan comparaciones del desarrollo del SNC en cortes sagitales de rata y humano se puede apreciar una equivalencia entre el día E18 de la vida embrionaria de la rata con la semana 9 de desarrollo fetal humano. Sin embargo, esta homología no es total, estando sólo presente en el primer trimestre del desarrollo embrionario humano.

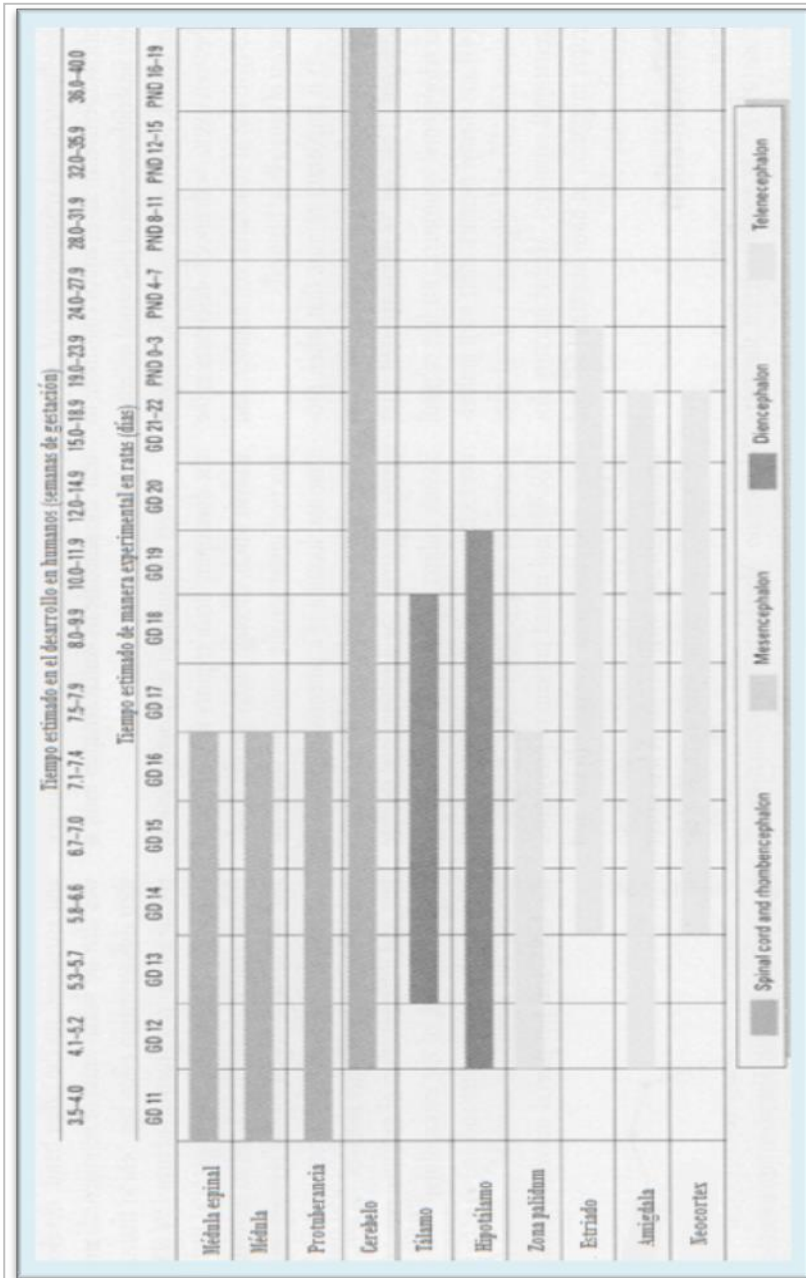


Tabla 5: Cronograma del desarrollo embriológico del cerebro de rata y humano. La leyenda inferior muestra la capa germinativa de la que proviene cada estructura. (Figura modificada de Bayer SA, 1980).

II. HIPÓTESIS

La hipótesis planteada en nuestro trabajo expone que la exposición a ondas de ultrasonidos de rango diagnóstico sobre el tejido fetal animal, tras la aplicación de la tecnología de los haces pulsados, podría producir daño tisular.

Además, dicho daño podría producirse respetando incluso los índices clásicos de seguridad para los aparatos diagnósticos de uso habitual en la práctica clínica.

Otro punto a evaluar es la durabilidad del daño ocasionado sobre los tejidos, ya que al actuar sobre tejidos en formación este daño podría resultar en un daño permanente o reversible en función del momento de exposición. La exposición a ultrasonidos sobre tejido nervioso en desarrollo, por sus características especiales, podría producir alteraciones del desarrollo neurológico que, de aparecer, podrían relacionarse con alteraciones del comportamiento presentes en el periodo postnatal.

III. OBJETIVOS

Objetivo Principal.

Evaluación de un posible daño tisular tras el uso de Doppler pulsado sobre tejidos fetales de rata. Para ello, se han elegido el hígado y cerebro fetal, por ser ambos tejidos órganos diana en controles ecográficos.

Objetivos Secundarios.

1. Comportamiento de los índices de seguridad en el curso de las investigaciones.
2. Correlación lineal o no del tiempo de exposición con la proporción de daño obtenido.
3. Averiguar si existe un “umbral de tiempo” presente a partir del cual existe daño tisular.
4. En caso de demostrar daño, valorar si persiste o no en el tiempo en esos tejidos expuestos, mediante el sacrificio de los animales en tiempos seriados.
5. Analizar en el cerebro de los animales expuestos las áreas cerebrales que presentan mayor susceptibilidad al daño tisular.
6. Analizar la descendencia expuesta con test de comportamiento para ver si existen alteraciones significativas.

IV. METODOLOGÍA

I.- Elección del modelo animal.

El uso de un modelo murino, cuyo ciclo reproductivo de 22-23 días, permite obtener suficientes datos de estudio en un corto período de tiempo. Además la homogeneidad en el desarrollo de los vertebrados, establece que el tamaño fetal en una camada de rata en día 18 de gestación (E18) es similar al de un feto humano de 9-10 semanas (Rao S *et al*, 2006), lo que ofrece una aproximación a las condiciones de una exploración transvaginal en una gestación humana de primer trimestre de gestación, teniendo en cuenta la distancia relativa al transductor, tal y como muestra la figura (Figura 9).

Esta aproximación asociada con su bajo coste, facilita el estudio de diversos tiempos de exposición tanto en los fetos como en la descendencia, en un corto período de tiempo.

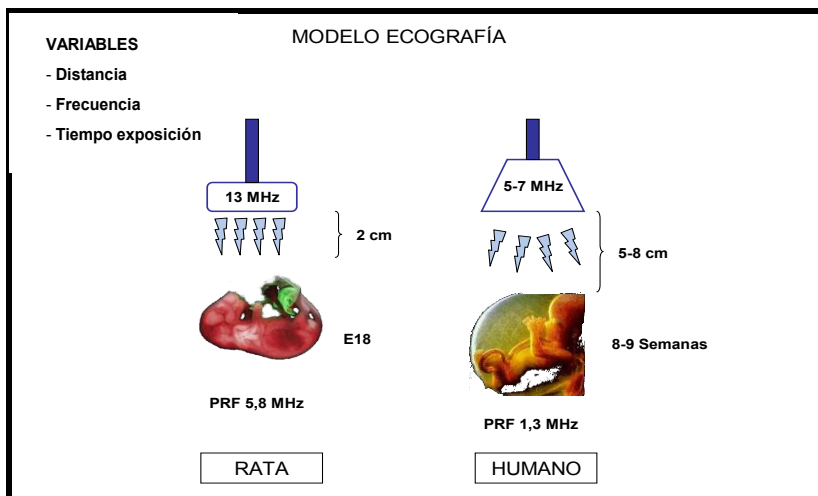


Figura 9: Comparativa de exposición de un feto humano y nuestro modelo animal.

La rata Wistar es una de la especies de roedores más resistentes al calor. (Miller NW, 2002). Además, gracias al útero bicorne y la obtención de una camada multifetal ofrece la posibilidad de diferencias los fetos expuestos de los fetos control dentro de una misma rata gestante, eliminando así posible variabilidad individual a la exposición al calor o las condiciones de estudio, como puede ser la metabolización de la anestesia, los cuales fueron objeto de crítica en estudios previos (The American Institute of Ultrasound in Medicine (AIUM) Bioeffects Committee, 2009)

1.1.- Desarrollo inicial del modelo.

Se seleccionaron hembras de rata Wistar vírgenes (Charles River Laboratorios, Barcelona, España), de aproximadamente 10 semanas de edad y pesos comprendidos entre los 200-250 gramos, que fueron estabuladas en las salas del animalario del Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia (CIPF).

Los animales fueron mantenidos, tratados y sacrificados de acuerdo con el protocolo establecido por el Comité de Ética y Bienestar Animal del CIPF. De manera que aquellos animales que presentaban características definidas como anormales en su morfología fueron descartados del estudio (n=2). Todos los procedimientos cumplieron con la legislación vigente de protección de los animales usados para experimentación y otros fines científicos, RD 1201/2005, Decreto 13/2007 del Consell y la Directiva Europea 86/606/CEE.

Los animales fueron distribuidos por parejas, en jaulas dispuestas en racks ventilados, conectados a un sistema de aire con filtros HEPA, y se sometieron a ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, $55\pm 10\%$ de humedad relativa y temperaturas de $22-24^{\circ}\text{C}$. Recibiendo comida estándar y bebida *ad libitum*.

Tras un período de cuarentena de dos semanas, se procedió al cruce de los animales. Para ello se estableció el momento del ciclo estral mediante el uso de un impedancímetro (Cibertec S. A., Madrid, España), de manera que las hembras en proestro fueron puestas con machos esa noche en relación de 2:1. A la mañana siguiente se procedió a la comprobación de cópula mediante la localización de esperma (“*plug*”) tras un lavado vaginal. Aquellas hembras en las que se encontró este *plug* fueron consideradas en día 0 de embarazo.

El ciclo de embarazo de la rata, es aproximadamente de 22-23 días y a ellos nos referiremos como E1, E2, ..., E22 (del inglés “*embryonic day*”). Estudios previos han catalogado que en torno al día E9.5-10 de vida embrionaria nos corresponderíamos con un desarrollo fetal similar al que se muestra en el segundo trimestre de embarazo humano (de Rijk EP *et al.*, 2002; Caluwaerts S *et al.*, 2005) y en el día E16 estaría ya en concordancia con el tercer trimestre, que será el momento que hemos elegido para probar los efectos de los US sobre los tejidos fetales (Clancy B *et al.*, 2007).

2.- Diseño del estudio.

Es un estudio prospectivo y aleatorizado mediante un modelo sistemático, de cohortes de animales expuestos o no a un factor de riesgo. Hemos diseñado este proyecto en dos fases atendiendo al órgano donde localizamos el haz pulsado, una primera fase, en la que el objetivo principal fue analizar la presencia de daño en tejido hepático, con la intención de poder estimar el tiempo máximo de exposición libre de daño (Fase 1) y una segunda etapa, en la que se pretende analizar la presencia de ese daño en tejido nervioso, y su efecto sobre la descendencia expuesta al haz del Doppler (Fase 2).

2.1.- Justificación del momento idóneo de exposición.

El momento de exposición elegido se incluye en ambos casos en el tercer trimestre de embarazo, con la intención de conseguir un alto grado de diferenciación y desarrollo de los dos órganos analizados, aunque el momento de exposición fue diferente en el hígado que en el cerebro.

En el caso del estudio del daño hepático la exposición fue realizada en día 18 de gestación (E18), ya que se deseaba obtener un desarrollo hepático y un tamaño fetal similar al obtenido en humanos alrededor de la semana 12 de gestación, momento a partir del cual se estudia el DV, con la intención de poder extrapolar resultados (Collardeau-Frachon S y ScoazecJY, 2008). Sin embargo, la exposición en el caso del análisis del daño en el SNC fue determinada

por los trabajos realizados en el campo de la seguridad por el grupo de Devi y colaboradores, donde se establece que el período embrionario con mayor sensibilidad para el cerebro fetal, en nuestro modelo animal, son los días 14-16 (Devi PU, 2006).

Para la realización del examen ecográfico, las hembras gestantes fueron anestesiadas utilizando sevoflurano (Sevorane, Abbot Laboratorios S.A., Madrid, España) al 8% en la fase de inducción y al 1.5% durante el resto del procedimiento. Durante todo examen ecográfico los animales fueron mantenidos sobre una manta eléctrica para poder mantener estable su temperatura corporal (36-37 °C). La temperatura rectal fue evaluada cada 5 minutos hasta presentar dos valores estables.

3.- Estudio del efecto de los US sobre el tejido hepático fetal (Fase I).

3.1.- Grupos de estudio.

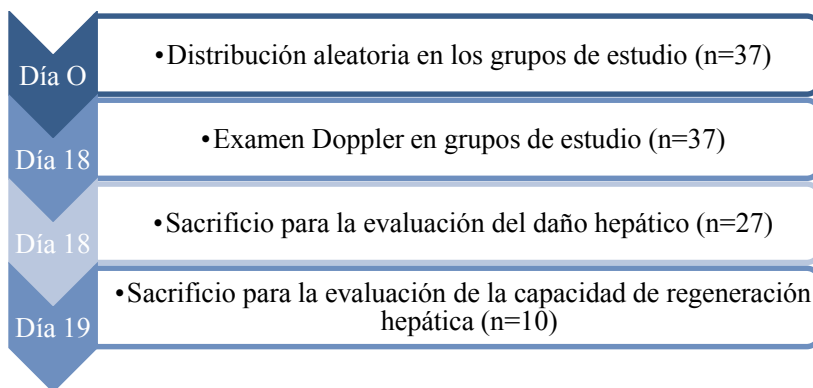
Se establecieron 7 grupos de estudio en esta fase en función de tiempos crecientes de exposición al haz de Doppler pulsado sobre los hígados fetales (Tabla 6).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7
Tiempos de exposición	3 seg	10 seg.	15 seg	20 seg	60 seg	300 seg	600 seg
n (madres)	5	2	5	5	5	8	7

Tabla 6: Distribución de los animales en los diferentes grupos de estudio.

Las hembras en día 0 de gestación fueron asignadas de manera aleatoria, en función del orden de salida del animalario, a los diferentes grupos de estudio.

3.2.- Etapas del desarrollo de la fase I



3.3.- Exposición a los US.

Para asegurar la posterior identificación de los fetos expuestos presentes en una misma madre frente a los no expuestos, una media de 5.14 fetos por madre ($\sigma=1.6$) de la región proximal de cada cuerno uterino fueron considerados como grupo expuesto (Figura 10). El criterio utilizado para la selección era la proximidad de los fetos a la

vagina y a la parte más caudal de la rata madre. Lo cual garantiza una localización segura en el examen bidimensional de los fetos que estaban siendo expuestos, así como la lejanía de los haces de US de los fetos no expuestos que forman el grupo control. En el grupo control los fetos fueron sometidos a los mismos procedimientos de barrido y presión sobre la pared abdominal de la madre, empleando la sonda ecográfica apagada.

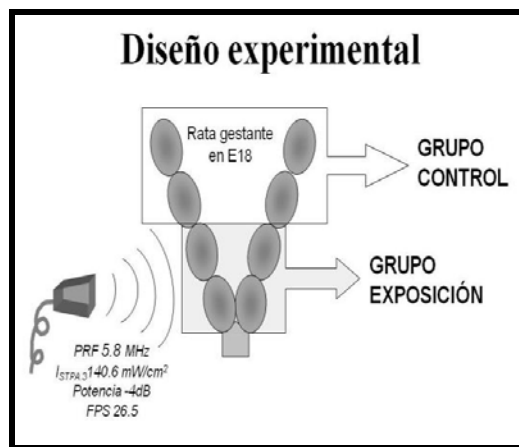


Figura 10: Esquema del diseño experimental, se puede apreciar como solamente los primeros fetos de cada cuerno uterino fueron considerados grupo expuesto, mientras que el resto de fetos se consideraron grupo control.

Examen ecográfico:

Para el estudio ecográfico se empleó un transductor lineal de 13 MHz (i13L probe) (GE Medical System, Horten, Norway) perteneciente al modelo de uso pediátrico de los ecógrafos VIVID 7 PRO BT04 (GE Medical SystemHorten, Norway). El transductor fue protegido con una funda ecográfica rellena de gel de ecografía

Transonic Gel® (Telic, SAU, Barcelona, España) con un espesor de la interfase de 1 cm, probando la ausencia de burbujas en su interior. Tras impregnar el abdomen del animal con el gel ecográfico, se procedió a la localización de la vagina y del cuello uterino en un barrido transversal de la pelvis, justo después de haber visualizado el nacimiento de la cola, y mediante un movimiento en dirección craneal se localizan los cuernos uterinos. Como ya hemos comentado, en cada cuerno uterino se encuentra una media de 5.4 fetos, de los cuales sólo se expusieron al haz de Doppler pulsado los más cercanos al cuello uterino, para tener la seguridad en el sacrificio posterior de los animales, que los primeros animales de cada cuerno habían sido insonados. Tras confirmar la viabilidad fetal, se obtuvo una visión sagital media del abdomen y se aplicaba el Doppler color que permitía la visualización de un flujo con el patrón característico de DV (Figura 11).

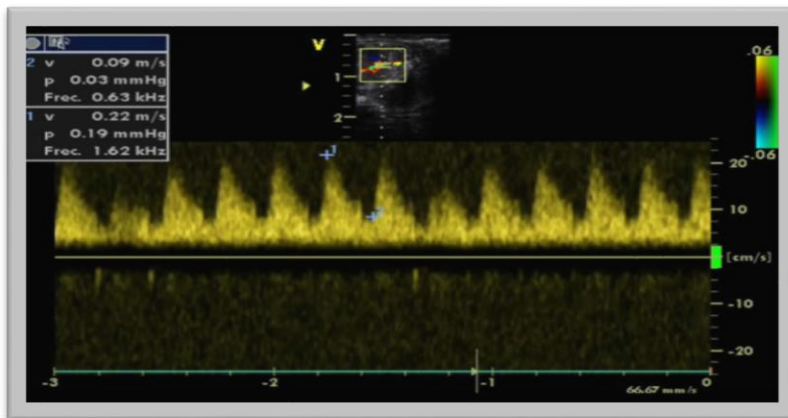


Figura 11: Características de la onda del Ductus Venoso. En la imagen se puede apreciar el patrón de onda característico de las mediciones de DV.

La obtención en tiempo real del registro continuo de la onda de Doppler del vaso (Figura 11), en este caso del DV, garantizaba el punto y tiempo de exposición. Se probaron diferentes tiempos de exposición a los US desde la obtención de dicho patrón de onda, entre los 10 min (600 s) y los 3 segundos, para analizar la posibilidad de que el daño presentase alguna relación con el tiempo de exposición y con el fin de intentar establecer el tiempo máximo de exposición libre de daño. En el caso de los animales del grupo control, la sonda apagada se pasaba por el abdomen materno hasta el apéndice xifoides, palpando el resto de los fetos.

Para la extracción de los fetos, las ratas gestantes fueron anestesiadas bajo analgesia intraperitoneal con fentanilo a una concentración de 0.80 mg/kg (Fentanest, Roche, Madrid, España) y anestesia por vía venosa con Thiopental a una concentración de 60 mg/kg, (Thiobarbital 0.5 g, Braun, Barcelona, España) A continuación se seccionó la cavidad abdominal del animal y se extrajo el útero, procediendo a la separación de los fetos de E18 del tejido uterino y a su posterior disección para la obtención de los hígados fetales, los cuales fueron almacenados a -80 °C hasta su procesado. Una vez terminada la intervención las ratas adultas fueron eutanasiadas mediante la inyección cardíaca de una pequeña dosis de Thiopental, para evitar mayor sufrimiento al animal.

Especificaciones técnicas de los exámenes ecográficos.

Debido al uso de un equipo diagnóstico fue necesario la consulta al fabricante para poder establecer las especificaciones técnicas del

equipo, con el fin de poder establecer la intensidad del haz de US en nuestro estudio. El transductor empleado posee una frecuencia de 5.8 MHz y una velocidad de reproducción de imágenes (*framerate*) de 26.5 en el modo Doppler pulsado (PW). Nuestro estudio se realizó a -4 dB, con un volumen de muestra de 0.5 mm y una intensidad máxima del pico espacial atenuada ($I_{STPA,3}$) generada en esas condiciones de 140.6 mW/cm², medidos en la región focalizada (GE Medical Systems, Horten, Norway). El ángulo de insonación fue siempre <30° y los índices térmico y mecánico, siempre se mantuvieron por debajo de 1.0, de acuerdo a lo aconsejado por el principio de ALARA (Fleischer A *et al.*, 2010).

3.4.- Procesado de muestras:

Basándonos en lo publicado al respecto sobre la detección de daño tisular mediante la determinación de la enzima Caspasa 3 en su forma bioactiva, donde se constata ser necesaria una ventana temporal de 7 horas para la determinación tisular (Jacobsen MD *et al.*, 1996), establecimos cuatro tiempos de sacrificio, (5, 7, 12 y 24 horas tras la exposición a US), con el fin de analizar si el daño producido presentaba efecto temporal o permanente en los tejidos.

Tras la obtención quirúrgica de los fetos se procedió al peso y homogeneizado de los hígados fetales, usando un tubo Plotter con 5 volúmenes de Tris-Cl ph 7.5 *blotting buffer*(composición: 50Mm NaCl, 10mM EGTA, 5mM EDTA, 4mM para-nitrophenylfosfato (pNPP), 2mM de pirofosfato sódico, 1mM Orthovanadato de sodio, 1mM NAF, 1mMP MSF, 1% sodio dodecyl sulfato (SDS), 20µg/mL Leuptina, 4µg/mL Aprotinin y suplementado con Inhibidores

completos de proteasas) a 4°C. A continuación, los homogeneizados fueron sonicados durante 10 segundos y almacenados a -80°C hasta su uso, para evitar degradación celular.

Se cuantificó el nivel de proteína total presente en cada muestra, mediante análisis de proteínas de Bio-Rad basado en el método de Bradford (Bio-Rad ProteinAssay, Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Posteriormente, las muestras fueron diluidas para obtener la proporción adecuada (1.5X) con 6XSDS simple buffer, el cual contiene un tampón de 0.5M Tris-HCL/0.4% SDS pH6.8, 30% glicerol, 10% SDS, 0.6 DTT y 0.012 % azul bromofenol, e inactivadas por calor durante 2 min a 100°C en agitación, colocadas en hielo nuevamente y centrifugadas durante 3 segundos.

Las muestras fueron sometidas a electroforesis DS-PAGE en geles de poliacrilamida del 15%, cargando 40 µg de proteína por carril. Obteniendo así la separación de la forma activa de la caspasa 3 y la β actina, la cual nos sirve como control interno de la técnica, según sus pesos moleculares. Tras este paso, las muestras fueron transferidas a membranas de PVDF con 0.2µm de tamaño de poro (Bio-Rad, Richmond, CA, USA), previamente embebidas en metanol absoluto durante 15 segundos y equilibradas con tampón Tris- Glicina, (Bio-Rad, Richmond, CA, USA), de acuerdo con los procedimientos estándar de la técnica. (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) Una vez finalizada la transferencia, se seccionan las membranas para permitir la cuantificación de ambas proteínas. Se realizó el bloqueo de las membranas durante una hora en temperatura ambiente y con agitación con TBS-T suplementado con 3% Albumina Sérica Bovina

(Bovine Serum Albumine, BSA) para la β -actina o con 5% leche desnatada para la caspasa 3 activada, seguido de una incubación con anticuerpos monoclonales anti β -actina 1:2000 (Abcam, Cambridge, UK) o con anticuerpo policlonal en ratón anti caspasa 3 activada 1:1200 (Cellsignaling Technology, Beverly, MA, USA) diluidos en la solución de bloqueo, durante toda la noche (overnight) a 4 °C con agitación suave.

Las membranas fueron lavadas 5 veces con TBT-T e incubadas durante 1h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (*goat anti.mouse IgG alkaline phosphatase*, 1:1000, Sigma Chemical CO, ST. Louis, MO, USA) o conjugados con peroxidasas (*Goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate*, 1:15000) diluidos en la solución de bloqueo. Tras 4 lavados con TBS-T, las membranas fueron embebidas en solución de BCIP/NBT 1:15000 (Sigma Chemical CO St.Louis, MO, USA) hasta producir un color púrpura característico de la proporción de β actina, o provocando la reacción en oscuridad con ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences, Roosendaal, The Netherlands) para caspasa 3 activada.

La señal obtenida fue entonces cuantificada, mediante un programa de análisis de Imagen (*AlphaImager 2200 software*) tras el escaneo de las membranas para detectar la densidad de ambas proteínas en las membranas de PVDF.

Tras el análisis de imagen se determinó:

Actividad apoptótica (AA), definida como el ratio entre la proporción de caspasa 3 activa con respecto a la β actina y se representa como:

$$\mathbf{AA = \frac{[caspasa\ 3\ activada]}{[\beta\ actina]}}$$

Tasa de muerte basal materna (tasa MBM); Cada individuo presenta un valor basal de muerte celular, definido como el porcentaje de células en estado apoptótico presente en los tejidos fetales, independientemente de si han sido expuestos o no a los US. Este valor es imprescindible para poder valorar a posteriori el porcentaje de muerte celular originado por exposición al haz de Doppler. Para determinar su valor se considera la relación entre los tejidos fetales no expuestos (grupo control) con respecto a la actividad apoptótica presente en los tejidos de los fetos expuestos al haz ecográfico (grupo estudio), representado mediante la siguiente fórmula:

$$\mathbf{Tasa\ MBM = \frac{AA\ no\ expuestos\ x\ 100}{AA\ expuestos}}$$

Daño celular, definido como el incremento de actividad apoptótica presente en los tejidos expuestos en relación con la tasa MBM, la cual se representa como:

$$\mathbf{Daño\ celular = \frac{AA\ expuestos\ x\ 100}{AA\ no\ expuestos}}$$

4.- Estudio del efecto de los US sobre el SNC fetal (Fase 2).

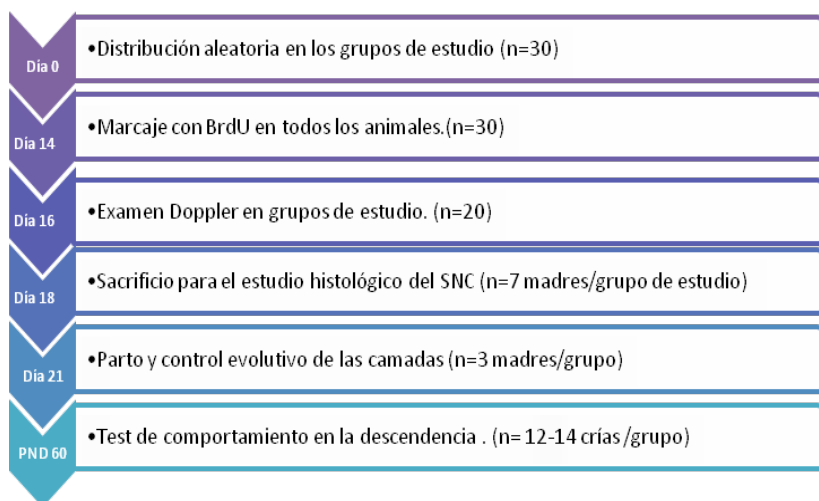
4.1.- Grupos de estudio.

Para esta parte del estudio se seleccionó una nueva cohorte de ratas Wistar sin previo contacto con los exámenes ecográficos. Debido a la necesidad de realizar estudios postnatales, para poder evaluar el efecto del haz de Doppler en la descendencia, fue necesario que cada camada perteneciese a un grupo de estudio determinado, ya que es imposible mantener la identidad de cada una de las crías una vez finalizado el parto. Por ello, en esta fase todos los embriones de una misma madre fueron expuestos y sus cerebros comparados frente al grupo de embriones de otra madre que no habían sido expuestos a US. Por lo tanto, se establecieron 3 grupos de estudio en esta fase (Tabla 7).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Tiempos de exposición	0 seg	20 seg.	60 seg
n (madres)	10	10	10

Tabla 7: Grupos de estudios para la segunda fase de estudio; se establecen tres grupos de estudio, un grupo control sin exposición al haz de US y dos grupos de exposición donde toda la camada es expuesta al haz del Doppler pulsado.

4.2.- Etapas de desarrollo de la fase 2.

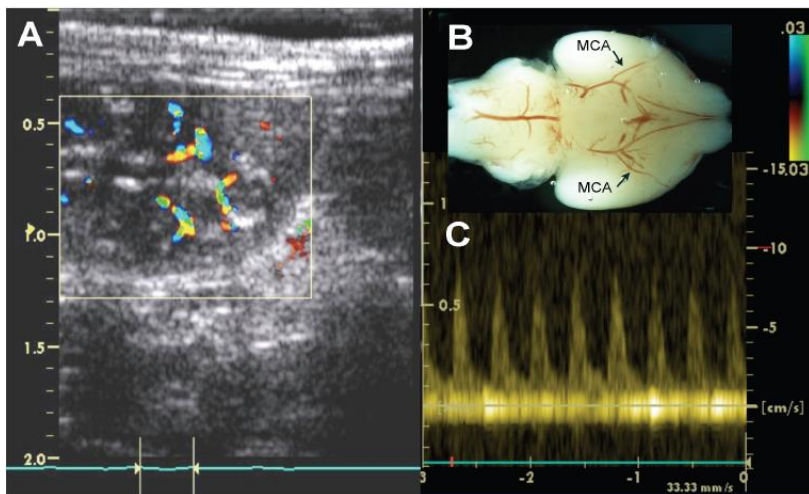


Para poder evaluar la posible alteración en el patrón de migración neuronal durante y tras la exposición, en el día 14 de gestación (E14), a las hembras gestantes se le inyectó, por vía intraperitoneal, 5-bromo-2'-deoxidiurina (**BrdU**) (50 mg/kg, Sigma-Aldrich, Química SA., Madrid, España) disuelta en 0.9% NaCl, para el marcaje de la proliferación celular. Se le administraron tres inyecciones en tres momentos diferentes durante la mañana, con un intervalo de dos horas entre cada inyección, para poder analizar el marcaje de las células durante un tiempo prolongado (Gómez-Pinedo U *et al.*, 2010).

En el día 16 de gestación (E16), las hembras gestantes fueron anestesiadas con Sevoflurano al 8% para la inducción y mantenidas con un 1.5% de sevoflurano (Sevorane®, Abbot Laboratorios SA., Madrid, España) y colocadas sobre una manta térmica para mantener su temperatura corporal constante. La temperatura rectal fue tomada

cada 30 segundos a intervalos de dos segundos, hasta que fueran registrados dos valores iguales.

La metodología de la exposición a US fue similar a la realizada en la fase 1, una vez comprobada la viabilidad fetal y tras la identificación de la ACM fetal gracias a la identificación del círculo de Willis, fueron exponiéndose todos los cerebros fetales de la misma madre gestante. Las ratas control fueron anestesiadas y se sometieron al mismo proceso con la sonda apagada. De igual modo que en la fase 1 el registro continuo de la onda de velocidad de flujo asegura la exposición del vaso en el tiempo establecido para cada grupo de estudio (Figura 12).



*Figura 12: Esquema gráfico de la metodología de la medición de la ACM.*A) Identificación del círculo de Willis gracias al mapeo con Color Doppler. B) Marcaje en fresco de la ACM en cerebro fetal. C) Registro de onda continua característica de ACM.

El día 18 de gestación (E18), 7 ratas hembras gestantes de cada grupo fueron anestesiadas y eutanizadas para estudiar el efecto prenatal de los US (Tabla 8). Fue necesario esperar 48h desde la exposición con el fin de poder observar alteraciones en el patrón de migración celular de las células marcadas con BrdU (Gómez-Pinedo *U et al.*, 2010). La eutanasia fue realizada mediante perfusión lenta intracardiaca con 4% de paraformaldehído (Merck, Damstandt, Alemania) en 0.1 Mol/l de tampón fosfato (PB, Phosphate buffer), 3 cerebros fetales fueron extraídos y fijados posteriormente en 2.5% de glutaraldehído (Electron Microscopy Systems, Fort Washington, PA) y 2% de paraformaldehído en 0.1 Mol/l de PB a 4°C durante 24 h, para el análisis histológico por cortes semifinos.

Mientras que otros siete cerebros fetales por grupo fueron extraídos y fijados con el mismo fijador a 4°C durante 24h y crioprotegidos en solución al 30% de glucosa a 4°C, estos cerebros fueron cortados mediante cortes coronales de 40 μ m de espesor realizados con un micrótopo de congelación modelo SM2500 (Leyca Byosystems S.L.U. Barcelona) y procesadas para análisis inmunológico. Se usaron un total de 10 fetos por grupo.

El resto de las ratas gestantes (n= 3 por grupo) fueron sacrificadas por inyección intraperitoneal con fentanil (Fentanest®, Roche 0,80mg/kg) y thiopental (Thiobarbital 0,5g Braum, 60mg/kg), una vez producido el alumbramiento, las crías fueron mantenidos hasta el momento de los estudios de comportamiento.

4.3.- Análisis histológico.

Para analizar los posibles efectos de los US en el cerebro fetal expuesto, tres fetos por grupo fueron embebidos en resina Durcupan® para el posterior análisis de secciones semifinas. Las muestras fueron procesadas con un vibrotomo modelo Leyca CM1860 (Leyca Byosystems S.L.U. Barcelona) para obtener secciones coronales de 100µm. Posteriormente, las muestras fueron postfijadas en solución de osmio al 2%, lavadas, deshidratadas y embebidas en Araldite® (Durcupan, Fluka). Las secciones semifinas (1.5 µm) fueron cortadas y teñidas con solución al 1% de azul de toluidina y examinadas mediante microscopía, para el estudio de la organización tisular del cerebro.

4.4. Análisis inmunohistoquímicos:

Marcaje de caspasa 3 en cerebro fetal.

Las secciones coronales de tejido cerebral fueron incubadas durante 45 min en solución de bloqueo constituido por 5% de Normal Goat Serum (NGS), 5% de leche desnatada en polvo, Albumina sérica bovina (0,1%g/ml **BSA**, *Bovine Serum Albumine*) en tampón salino fosfato (**PBS**, *phosphate buffer saline*) y 0,1% Tritón X-100 (sigma-Aldrich, Química S.A., Madrid, España), incubados durante toda la noche (*o/n overnight*) a 4°C con anticuerpo policlonal para la caspasa 3 (Asp 175) (rb, 1:200, Cell Signalling, Denver, MA, USA). A continuación, las muestras fueron lavadas en PBS-Tritón-BSA (3x5 min), bloqueadas 30 minutos con leche al 3% en solución de lavado e

incubadas durante 2 horas, con anticuerpo secundario biotinilizado (ms, 1:200, Vector Labs, Burlingame, CA, USA) en oscuridad.

Tras esta incubación, las muestras fueron bloqueadas mediante el kit Vectastain Elite ABC (Vectastain, Vector laboratorios, Burlingame, CA, USA) y tras lavados con PBS- Tritón-BSA, El marcaje de Caspasa 3 fue revelado utilizando la diaminobenzidina (DAB) (Vectastain, Vector Labs, Burlingame, CA, USA) mediante la reacción marrón en las células apoptóticas. Las muestras fueron contrateñidas con azul de toluidina, deshidratadas y montadas para su análisis microscópico.

El análisis cuantitativo de las células apoptóticas positivas se hizo mediante el uso de un microscopio Leyca equipado con una cámara (Leyca DMR 6000, Leyca Microsystems CMS GHmbH, Wetzlar, Alemania). Dentro de las áreas positivas, se tomaron 4 fotografías por área, a 20x, para poder realizar el recuento y comparar los patrones apoptóticos.

Las áreas del SNC analizadas fueron: Zona subventricular (ZSV), Zona Pallidum, área pre-óptica hipotalámica anterior, Neuroepitelio hipotalámico, amígdala y estriado (Figura 13). En un total de 3 crías por grupo, una media de 4 imágenes por área fueron analizadas para determinar el número de células apoptóticas en estas regiones. El recuento celular fue realizado usando el programa de análisis de imagen, *Image J*.

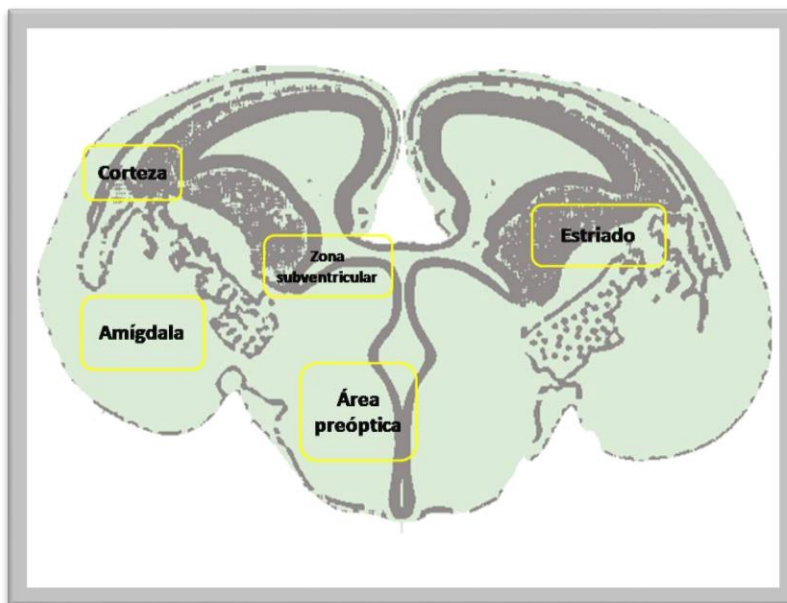


Figura 13: Esquema de sección coronal del cerebro fetal de rata en E18. Los recuadros amarillos muestran las áreas mapeadas para el análisis de actividad apoptótica.

4.5.- Evaluación de la actividad motora, coordinación y función cognitiva.

Entre los días postnatal 50-70 (PND 60) ratas control y expuestas *in utero* a los US durante 20 y 60 segundos fueron sometidas a test de comportamiento para analizar si la exposición a US podría inducir cambios a largo plazo en la función motor y/o cognitiva. En cada grupo experimental obtuvimos la mitad de la camada ± 1 hembras y la otra mitad ± 1 machos. Los resultados de los machos y las hembras fueron tratados de manera conjunta.

4.5.1.- Actividad motora

Los animales fueron ubicados en una cámara de actividad de campo abierto (43x43x30, 5 cm) que permitía su exploración durante 60 minutos. La actividad fue detectada mediante rayos de detección de movimiento infrarrojos, como las empleadas en Cauli y colaboradores (Cauli O *et al.*, 2009). Cuantificamos como variables de estudio: los movimientos ambulatorios, los episodios ambulatorios, los episodios verticales y los movimientos estereotípicos.

4.5.2.- Rotarod

El test del rotarod permite analizar la habilidad de las ratas de permanecer en una rueda rotacional para evaluar la función de coordinación motora. Se utiliza un Rotarod con aceleración constante (Ugo Basile, comercio, Italia) como en Boix J y colaboradores (Boix J *et al.*, 2010). El test se realizó en dos días consecutivos de la siguiente manera: cada rata fue colocada en el rotarod, el cual permaneció apagado durante 3 minutos para después, ir incrementando la velocidad del rotarod de 4 a 40 rpm en 300 segundos. Determinando el tiempo que pasa cada animal sin caer del rotarod, con un tiempo máximo de examen de 600 segundos.

4.5.3.- Beam walking test

Este test evalúa la capacidad de coordinación de los animales en el tronco anterior y posterior. El objetivo de este test consiste en analizar la habilidad de las ratas para pasar a través de una estrecha pasarela hasta alcanzar una caseta oscura (Figura 14). Para forzar a las ratas a

pasar la pasarela, una luz blanca ilumina el inicio de la pasarela. Una pasarela de madera en forma cuadrada (2 x 100 cm) fue colocada a una altura de 1m sobre el suelo. Durante la prueba se determinaron tanto el tiempo empleado en recorrer el circuito así como el número de resbalones sufridos por cada animal.

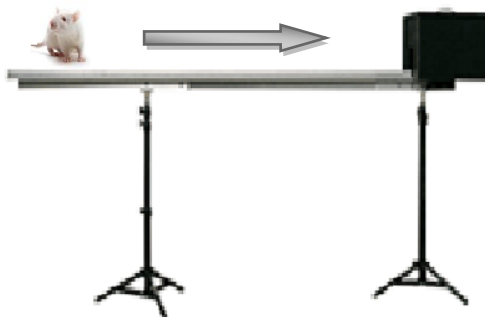


Figura 14: Fotografía del Beam Walking test. El test consiste en analizar la coordinación de cada animal al pasar desde el borde de la pasarela hasta la caseta.

4.5.4.- Y-maze test

En este test se pretende analizar la capacidad de aprendizaje de una tarea discriminativa. Para ello, una vez alcanzados los dos meses de edad, los animales son introducidos en un laberinto en forma de Y, con tres brazos de igual tamaño, como el empleado en el trabajo de Aguilar y colaboradores (Aguilar MA *et al.*, 2000). El brazo de salida es aquel, donde situaremos a cada animal al inicio de cada ensayo y, los otros brazos del laberinto, en los cuales colocamos un platito de comida al final de cada uno, fueron denominados los brazos de elección. Las paredes de los brazos de elección se podían intercambiar por piezas de color blanco o negro. El objetivo del test es que el

animal aprenda a asociar el color de las paredes del laberinto con la ubicación de la comida.

El pre-entrenamiento se llevó a cabo durante 4 días en los que todos los animales se familiarizaron con el laberinto. El primer día se ponen dos ratas a la vez durante 10 minutos en el laberinto con las paredes de color negro y se coloca la comida por todo el laberinto. El segundo día cada rata se deja 10 minutos en el laberinto con las paredes de color blanco y se coloca la comida por todo el laberinto. El tercer día de pre-entrenamiento, cada rata se deja 5 minutos en el laberinto con las paredes negras con la comida colocada al final de los dos brazos de elección. El cuarto día, cada rata se dejó 5 minutos en el laberinto de color blanco con la comida al final de los brazos de elección.

En cada ensayo, a cada animal se le enseñó que debía ir hacia el brazo izquierdo siempre que las paredes fuesen negras y hacia el lado derecho siempre que las paredes fuesen blancas. El premio por una buena respuesta, consistía en 4 pastillas de comida (45 mg cada una) colocadas en el plato al final del brazo correcto. Si la rata realizaba un recorrido incorrecto, se encontraba con un plato vacío, y era reemplazada durante 5 minutos, antes de repetir el test.

En cada ensayo se contabilizaban si la rata realizaba un acierto (iba hasta el final del brazo correcto) o un error (iba hasta el final del brazo donde no estaba la comida) o un no ensayo (se quedaba en el brazo de salida).

Cada rata fue analizada 10 veces por día, con intervalo de aproximadamente 5 minutos de espera en su jaula entre cada ensayo, hasta completar un criterio de 10 respuestas correctas en el mismo día o un total de 250 ensayos. Se emplearon 8 ratas por grupo.

4.5.5.- *Object Recognition memory test*

Este test pretende analizar la memoria a corto y largo plazo de cada animal, para ello se basa en la tendencia de predilección que presentan las ratas por explorar objetos nuevos en su entorno. De manera que cuando una rata se encuentra con un objeto nuevo y uno explorado recientemente, tiende a explorar el objeto nuevo durante más tiempo de manera significativa.

En los ensayos de aclimatación el animal se pone en contacto con dos objetos, para que el animal se familiarice con ambos objetos, durante 10 minutos. Pasado ese tiempo los animales son trasladados a sus jaulas durante 4 horas (corto plazo) o 24 horas (largo plazo). Una vez pasado el tiempo de espera, se vuelve a poner a los animales en la jaula con los objetos, donde previamente habremos reemplazado uno de los objetos. En cada ensayo se determinó el porcentaje de tiempo de exploración del objeto cambiado con respecto al entrenamiento sobre el total del tiempo de exploración. (Tiempo de exploración del objeto no familiar más el tiempo de exploración del objeto familiar).

5.- Análisis Estadístico.

Los datos obtenidos fueron expresados como media \pm error estándar de la media (*Standar Error Mean*, SEM). Expuestos y controles fueron comparados para cada tiempo de exposición.

Antes de proceder al análisis estadístico se procedió a comprobar la homogeneidad de varianzas mediante el estadístico de Levene. Las comparaciones entre múltiples grupos se realizaron mediante el test ANOVA de comparación de medias, tras el cual los datos fueron comparados mediante los análisis post-hoc de Bonferroni y Scheffe. En el caso de comparaciones entre dos grupos se realizaron t-test, teniendo en cuenta si las muestras estaban o no correlacionadas. La correlación entre las diferentes variables fue analizada mediante regresión lineal (Pearson) y las diferencias se consideraron significativas cuando el p valor fue menor a 0.05. Los programas estadísticos empleados fueron el GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla CA, USA) y el SPSS 17.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA)

V.- RESULTADOS

I.- Determinaciones perinatales.

Este punto sólo se pudo evaluar en la fase II del estudio, ya que en la primera fase no se realizó seguimiento de las camadas. No se encontraron diferencias entre animales expuestos y no expuestos en el número de resorciones y muerte perinatal ($p=0.38$) (Figura 15). Se observó un descenso en el peso corporal en el momento del nacimiento pero sin mostrar una tendencia significativa.

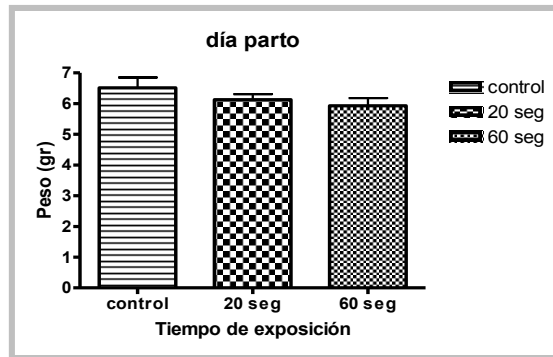


Figura 15: Relación de pesos en el momento del parto. Se puede observar como existe un descenso en el peso de las crías en los grupos expuestos. Control (n=32 crías), 20 seg (n=31 crías), 60 seg (n=24 crías).

En cuanto a la tasa de supervivencia de los individuos a los US, se observó que no existen diferencias significativas entre los grupos, sin embargo en el grupo de 20 segundos se observó la presencia de dos muertes perinatales (Figura 16). Estos dos animales procedían de la misma camada y presentaban una malnutrición asociada a la presencia de una malformación dental causada por un crecimiento caótico de los incisivos de la mandíbula inferior. Dicha malformación imposibilitó el acceso al alimento sólido, una vez producido el destete.

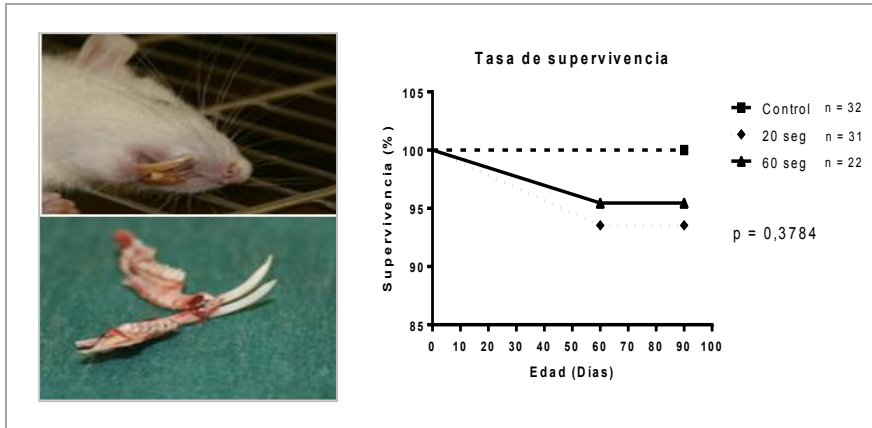


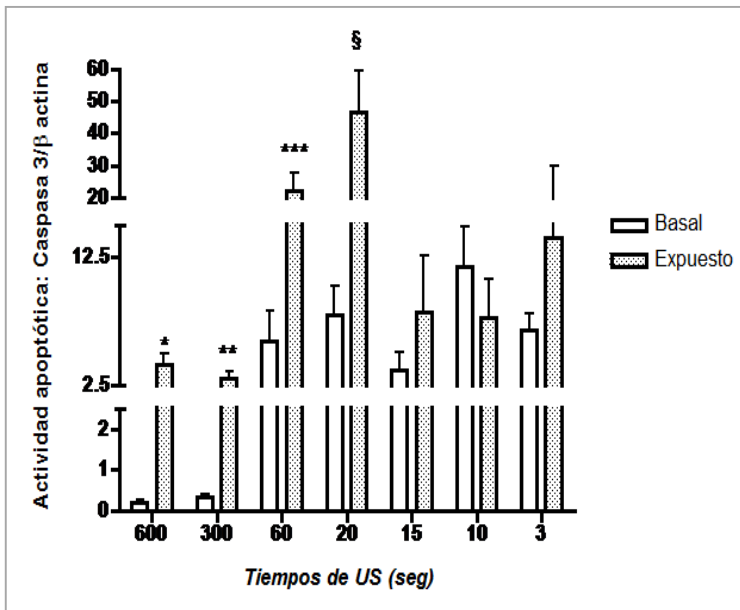
Figura 16: Detalle de la malformación presente en dos individuos del grupo 20 segundos. En la gráfica lateral se muestra la tasa de supervivencia a los ultrasonidos, donde podemos apreciar que no existen diferencias significativas entre grupos.

2.- Determinación del daño celular en hígado fetal.

Se evaluaron una media de 15.42 ($\sigma = 1.6$) hígados fetales expuestos y de 15.48 hígados fetales control, procedentes de animales expuestos a diferentes tiempos de exposición a los US y sacrificados 7 horas post- examen ecográfico (Figura 17). La señal de la β -actina fue empleada como control interno para validez de la técnica de western blot.

Al comparar la tasa de daño celular entre hígados fetales expuestos a los US con los hígados fetales control de cada camada. Se observa la presencia de un incremento significativo en la producción de daño celular en los hígados expuestos a 600s (10 min) de US

($p < 0.0001$), así como también es significativo este incremento en los grupos de 300, 60 y 20 segundos ($p < 0.0001$; $p = 0.03$; $p = 0.003$, respectivamente). Sin embargo, para tiempos de exposición más cortos el incremento de daño celular muestra una mayor variabilidad, mostrando un incremento no significativo en la tasa de daño celular tras 15 segundos ($p = 0.4$), la cual ya no se observa en el grupo de muestras de los fetos expuestos a menos de 10 segundos presento daño ($p > 0.05$). Por tanto, establecimos que el umbral de tiempo de exposición al Doppler pulsado era de 10 segundos, para producir daño en el tejido hepático en las condiciones establecidas.



Tiempos de US	600 seg	300 seg.	60 seg	20 seg	15 seg	10seg	3 seg
n (fetos expuestos)	18	17	15	7	12	10	6
N (fetos basal)	17	16	16	6	12	11	5

Figura 17: Actividad apoptótica detectada tras diferentes tiempos de exposición a Doppler pulsado en el Ductus Venoso del hígado de rata fetal, comparado con los controles no expuestos. Todos los hígados fueron obtenidos tras 7h de exposición. ($p < 0.0001$, ** $p < 0.0001$, *** $p = 0.03$, \$ $p = 0.003$)*

2.1.- Análisis de la variabilidad inter-animal.

No se encontraron diferencias significativas cuando se compararon los datos obtenidos para dos madres en cada uno de los grupos de estudio, de manera que las condiciones metabólicas de las madres parecen no influir en el resultado de daño celular. Un claro ejemplo de este dato se muestra en la figura 18, en la cual se observa que las muestras de hígado fetal de dos madres expuestas 10 segundos a US presentan valores de 4.55 ± 1.30 y 3.56 ± 1.63 , siendo la diferencia entre ambas muestras no significativa ($p=0.29$), de igual modo los valores de muerte celular en los hígados fetales no expuestos tampoco resultaron ser significativamente diferente en ambas madres ($p=0.65$).

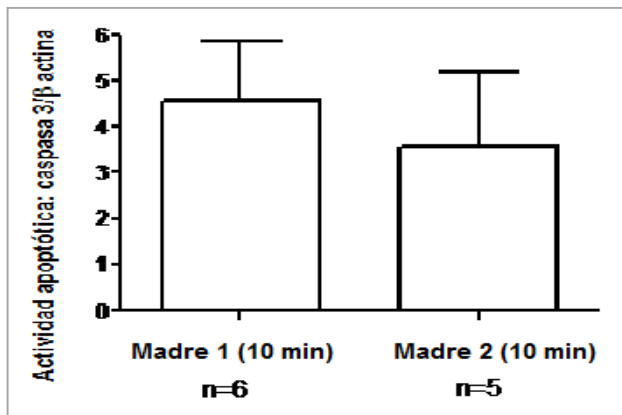


Figura 18: Variabilidad interanimal: No existen diferencias en la proporción de actividad apoptótica en los diferentes individuos de un mismo grupo de estudio.

2.2.-Correlación entre índice apoptótico y el tiempo de exposición.

Se observó un aumento exponencial entre la cantidad de daño presente en el tejido y los tiempos de exposición estudiados ($p < 0.001$), de manera que exposiciones más prolongadas dan lugar a un mayor incremento significativo en el daño celular en el hígado fetal, de manera que por cada segundo de exposición el daño celular en el tejido se incrementa por un factor de correlación de 0.486. (Figura 19).

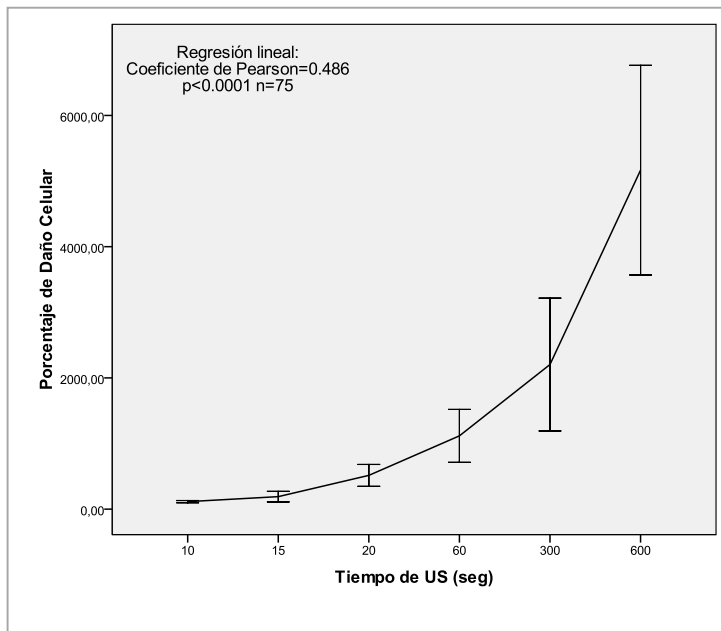


Figura 19: Relación entre los diversos tiempos de exposición y el porcentaje de daño producido. Se muestra como existe un aumento exponencial de manera que tiempos más largos de exposición se asocian a una mayor proporción de daño celular.

2.3.- Duración del daño.

El incremento en el porcentaje de daño celular provocado por la exposición a los US no persiste de forma permanente en el tejido hepático expuesto. Se analizaron los datos de daño celular en los hígados expuestos y no expuestos de cada grupo de estudio obtenidos en diferentes momentos de sacrificio de los animales (≤ 4 h; 5h, 7h, 12h y 24h). Se pretendía analizar si este daño celular persistía tras el examen ecográfico o era reparado y/o eliminado. Como podemos apreciar en la figura 20, este daño es temporal y ya no persiste en el tejido pasadas 12 ni 24 horas post exposición ($p > 0.05$), independientemente del grupo de exposición estudiado.

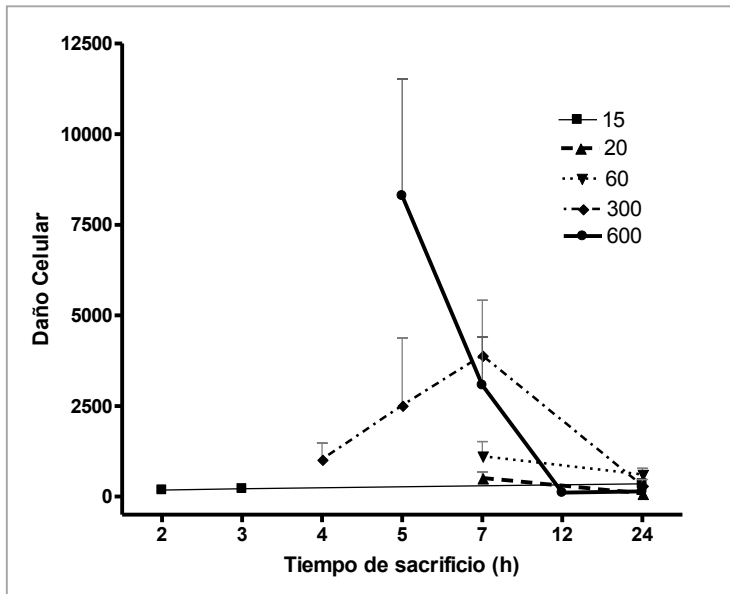


Figura 20: Proporción de daño celular en función de los tiempos de sacrificio. Se observa cómo no existe presencia de daño cuando los individuos son sacrificados a las 2, 3 o 4 horas, tampoco se muestra presencia de daño cuando el sacrificio se realiza a las 24 horas.

3.- Determinación de daño celular en cerebro fetal.

3.1.- Prueba de impacto preliminar.

Antes de iniciar esta etapa del proyecto, confirmamos la presencia de daño en tejido nervioso fetal mediante Western Blot, con la intención de establecer el umbral mínimo de tiempo de exposición necesario para producir daño en tejido nervioso fetal, el cual fue establecido como 20 segundos ($p > 0.21$) (Figura 21).

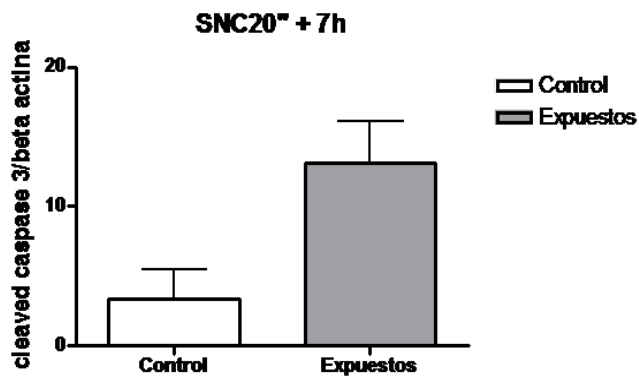


Figura21: Comprobación de presencia de incremento en actividad apoptótica en cerebro fetal tras 20 segundos de irradiación y sacrificio a las 7 horas tras exposición ($p > 0.21$).

3.2.- Análisis de la actividad apoptótica en el cerebro fetal.

Se observó un incremento en el patrón de actividad apoptótica en todas las zonas del cerebro fetal expuestos, comparado con el grupo

control (Figura 22). Además este incremento presenta una correlación lineal con el tiempo de exposición al cual fueron expuestos los fetos, al igual de lo observado en el hígado (Coeficiente de Pearson: 0.980 $p=0.003$).

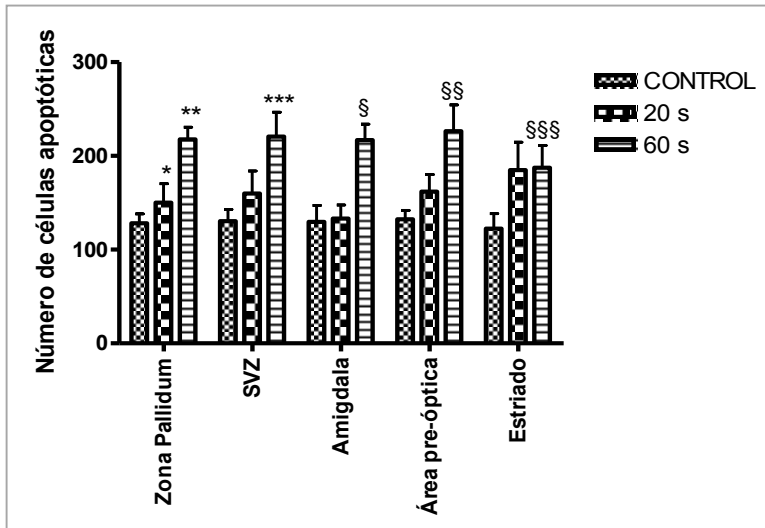


Figura 22: Actividad apoptótica detectada en diversas áreas del cerebro fetal de rata tras diversos tiempos de exposición a US sobre ACM. El incremento de actividad apoptótica muestra una relación lineal con los tiempos de exposición (Coeficiente de Pearson 0.980, $p=0.003$).

Al analizar de manera específica las áreas cerebrales, se observa que este marcaje es más pronunciado en la Zona pallidum del cerebro fetal, mostrando un incremento significativo de la actividad apoptótica en ambos grupos de estudio. (20 s $p=0.091$ y 60 s $p<0.0001$) (Figura 23A)

En las zonas sub ventricular (SVZ), amígdala, pre-óptica y estriada sólo se encontraron diferencias significativas en el grupo de

60 segundos (** $p < 0.01$, § $p < 0.01$, §§ $p < 0.001$ y §§§ $p < 0.05$, respectivamente) (Figura 22).

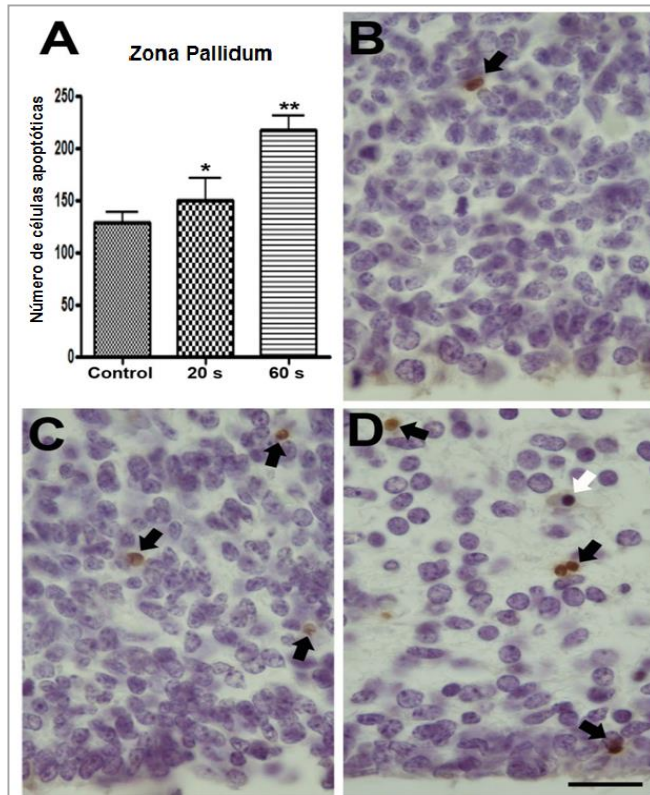


Figura 23: Actividad apoptótica presente en la corteza del cerebro fetal. La figura A representa como esta actividad incrementa en función del tiempo expuesto. B: grupo control. C: Grupo 20 segundos. D: Grupo 60 segundos. Las flechas negras indican las células caspasa 3 positivas. Las flechas blancas muestran las células picnóticas. Barra de escala 25 μ m.

3.3.- Análisis histológico.

El análisis histológico de los cerebros fetales tras el sacrificio, mostrabacomo, tras 20 segundos de exposición, la morfología y distribución celular son similares a la observada en el grupo control. Sin embargo, en el caso del grupo de 60 segundos se observan la presencia de alteraciones en el parénquima cerebral, caracterizado por un marcado patrón de células picnóticas en diferentes áreas del cerebro fetal, particularmente en la zona germinal cortical (Figura 23D).

Otro hallazgo interesante es el aumento de los espacios extracelulares, con un menor grado de compactación del parénquima celular, lo que le da una apariencia “vacuolada” al tejido expuesto (Figura 24). Estos hallazgos avalan una observación realizada durante el procesado de las muestras, en el que se puntualizó que las muestras del grupo de 60 segundos presentaban una mayor fragilidad, siendo más complicada la obtención de los cortes para el estudio histológico.

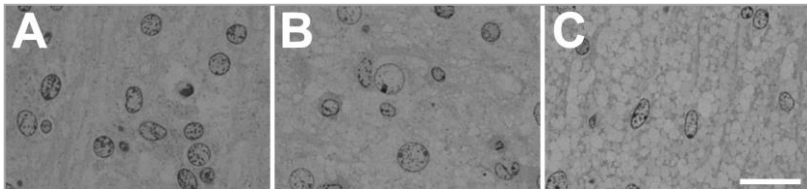


Figura 24: Comparativa de cortes histológicos de cerebro fetal en los diferentes grupos de estudio. A: grupo control, B: grupo de 20 segundos de exposición, C: grupo de 60 segundos de exposición.

3.4.- Análisis del efecto de la exposición a Doppler pulsado sobre la migración celular en cerebro fetal.

La exposición a US del territorio de la arteria cerebral media puede resultar en un daño sobre las células progenitoras que es evaluado de dos formas, mediante el conteo total del número de células a nivel del cortex y mediante el estudio de la progresión por migración de la descendencia de esas células a los diversos territorios cerebrales.

Así pues, el análisis de la estructura cortical de los animales expuestos, mostraba un descenso en la densidad celular, el cual era proporcional con el tiempo de exposición. El grupo de 20 segundos presentaba diferencias que no llegan a ser significativas, pero en los fetos expuestos durante 60 segundos, este descenso ya resultaba significativo situándose en un 40 % aproximadamente ($p < 0.05$) (Figura 25). Al analizar en detalle la zona ventricular, se observó un descenso significativo de las células BrdU positivas en el grupo de 60 segundos ($p < 0.05$) (Figura 26).

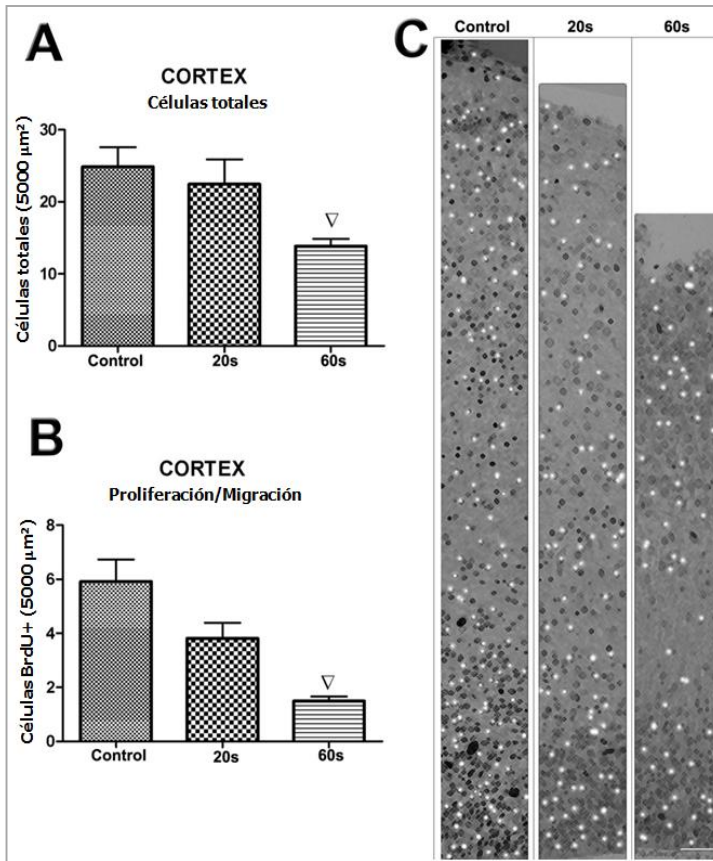


Figura 25: Imagen representativa de la distribución de las capas de la corteza originada desde las células madre neuronales proliferativas en día 14 de gestación. A, B: Muestran el análisis cuantitativo de densidad celular en grupo control y grupos expuestos, mostrando un descenso del 40% aproximadamente en el grupo de 60 segundos de exposición. C: Para facilitar la visualización de las células originadas desde las células madre proliferativas en día 14 de desarrollo, marcadas con BrdU, fueron cambiadas a marca blanca mediante el programa informático QWIN500. Barra de escala 50 μm .

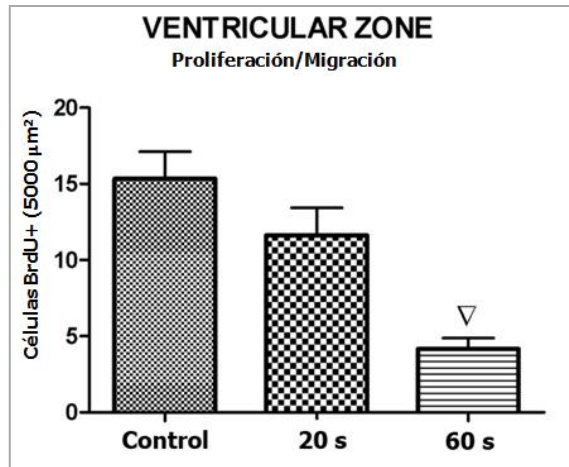


Figura 26: Análisis cuantitativo del marcaje de células BrdU positivas en la zona ventricular.

4.- Evaluación de actividad motora y cognitiva postnatal.

4.1 Actividad motora.

El estudio de la actividad motora en las ratas PND60 reveló diferencias significativas en el grupo de animales expuestos durante 60 segundos, comparándolos con el grupo control. Estos animales presentan una actividad motora incrementada (Figura 27), analizando el número de movimientos ambulatorios realizados en una hora, en el grupo control se obtienen valores de 1671 ± 188 movimientos, mientras que en el grupo de 60s, se observa un incremento

significativos en el número de movimientos ($p < 0.05$; 2700 ± 475). Un incremento similar se observó al contabilizar el número de episodios ambulatorios (72 ± 11 en el grupo control y 113 ± 16 en el grupo de 60", $p < 0.05$) y movimientos estereotípicos (5262 ± 389 en controles y 6907 ± 310 en el grupo de 60", $p < 0.05$).

En el grupo de animales expuestos durante 20" sólo encontramos diferencias significativas al analizar el número de movimientos estereotípicos (56262 ± 389 en grupo control y 6914 ± 492 en animales expuestos 20", $p < 0.05$).

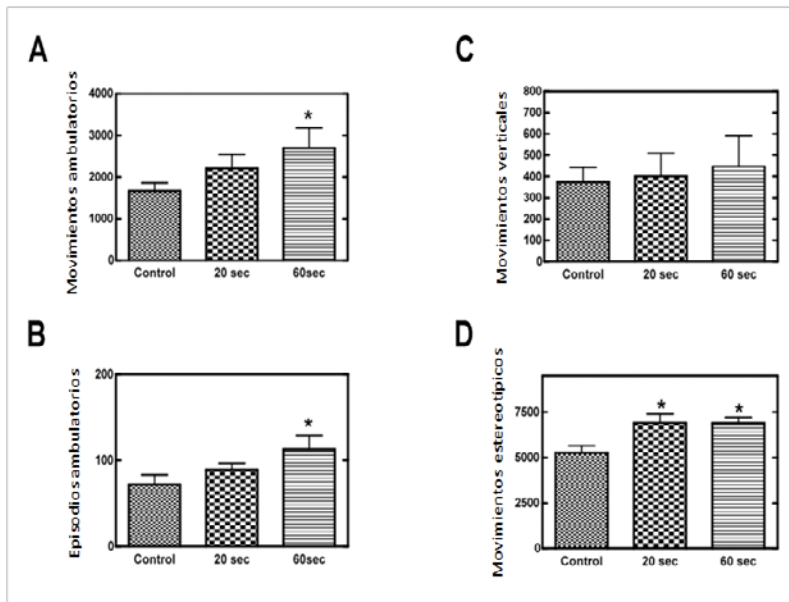


Figura 27: Comparativa de la actividad motora en ratas control y expuestas a ultrasonidos durante la gestación. Se observa como el grupo de 60 segundos de exposición presenta una mayor actividad ambulatoria comparada con los grupos control y 20 segundos de exposición. (A, B, C) Los grupos expuestos presentan una

diferencia significativa en el recuento de movimientos estereotípicos comparados con el grupo control. (D)

El número de cambios en la vertical no mostró diferencias significativas entre ninguno de los grupos.

4.2 Coordinación motora.

La exposición a los US durante 20 o 60 seg. reduce de manera significativa ($p < 0.05$) la coordinación motora en las ratas analizadas con el test *beamwalking*. Las ratas control mostraron 1.5 ± 0.2 resbalones. El número de resbalones se vio incrementado a 2.4 ± 0.3 y 2.4 ± 0.2 en las ratas expuestas durante 20 y 60 segundos, respectivamente (Figura 28 A).

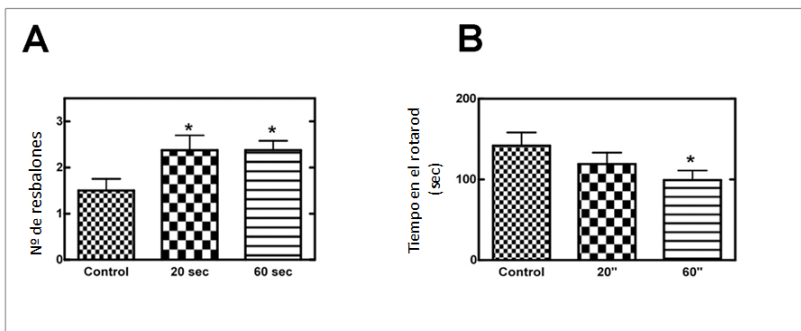


Figura 28: A: Test Beam walking. B: Rotarod test. Se observa como los grupos expuestos tienen menor coordinación que el grupo control.

En el test del *rotarod*, este descenso en la coordinación motora sólo fue significativo dentro del grupo de 60 segundos de exposición. Las ratas control permanecían en la rueda 142 ± 16 segundos, mientras

que las ratas expuestas a 60 segundos de ultrasonidos, sólo permanecieron 99 ± 12 segundos ($p < 0.05$). El grupo de 20 segundos de exposición, mostró una reducción en el tiempo que pasa el animal sobre el rotarod (119 ± 14 segundos) pero la diferencia con el control no tuvieron significación estadística (Figura 28 B).

4.3 Función cognitiva.

La exposición de ratas durante la vida fetal a ecografía durante 20 y 60 segundos no altera de manera significativa la habilidad de dicha descendencia en la capacidad de aprendizaje con pruebas de discriminación condicionada como el *Y maze*. Las ratas expuestas durante 60 segundos a ecografía necesitaron un mayor número de intentos (59 ± 5) que los controles (49 ± 4) para aprender el mensaje, pero las diferencias no fueron significativas (Figura 29 C).

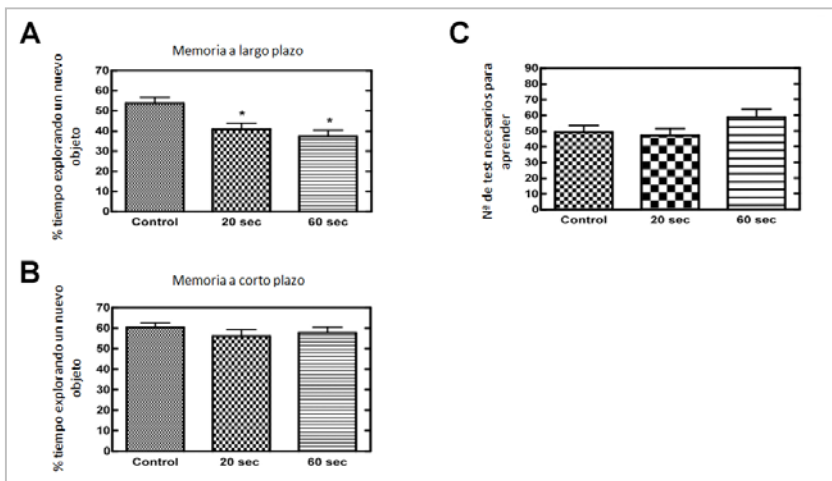


Figura 29: Análisis de la función cognitiva. A) Test de aprendizaje a largo plazo. B) Test de aprendizaje a corto plazo. C) Y-maze.

La exposición a ecografía durante 20 y 60 seg tampoco muestra alteraciones en la memoria a corto plazo en los animales evaluados con el test *object recognition memory* (Figura 29B). Sin embargo, la memoria a largo plazo mostró un descenso significativo en ambos grupos de exposición. Los animales controles permanecieron el $54 \pm 3\%$ del tiempo explorando el objeto nuevo, mientras que los animales expuestos 20 y 60” permanecieron $41 \pm 3\%$ ($p < 0.01$) y $37 \pm 3\%$ ($p < 0.01$) del tiempo con dicho objeto, respectivamente (Figura 29 A).

VI.-DISCUSIÓN

Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo sobre el tema de seguridad en US que desarrolla un modelo animal capaz de exponer los fetos *in vivo* de forma selectiva dentro de una madre. Además, también es la primera vez, que se realiza una exposición selectiva de los vasos fetales que se usan en la actualidad, para el diagnóstico prenatal.

El modelo presentado nos ha permitido establecer una comprobación que el daño se encuentra presente tras la exposición y además en el área expuesta.

Son muchos los trabajos que insisten en la necesidad de realizar estudios acerca del control de los US (Abramowicz JS, 2007; Church CC y Miller MW, 2007; Duck FA 2008; Houston LE *et al.* 2009; Miller DL, 2008). Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre seguridad ecográfica fueron realizados empleando equipos diagnósticos diseñados antes de 1992, fecha en la cual la FDA incrementó la intensidad de los equipos diagnósticos a $720\text{W}/\text{cm}^2$ (Duck FA, 2008).

I.- Evaluación del modelo animal.

Nuestro objetivo inicial fue analizar el efecto de los US sobre los órganos expuestos utilizando un equipo para uso diagnóstico. Por razones obvias, la exposición con fines de investigación en este tipo de trabajos sólo puede ser realizada en animales y no en seres humanos.

Como hemos comentado anteriormente, el modelo murino facilita la obtención de datos de manera rápida y es un modelo animal económico, lo que lo hace ideal para este tipo de estudios. Otra de las principales ventajas del modelo es que, al presentar un útero bicorne y una camada multi-fetal ofrece la posibilidad de diferenciar los fetos expuestos de los fetos control dentro de una misma madre. Nuestros resultados mostraron como no existían diferencias entre los resultados de fetos no expuestos de diferentes madres, una vez se relativizaron las cantidades de daño apoptótico presentes en el tejido hepático, con el valor medio de cada una de sus progenitoras (Figura nº 18). Eliminando así, una posible variabilidad individual en la exposición al calor o en la metabolización de la anestesia, los cuales son factores de confusión criticados en los trabajos previos (The American Institute of Ultrasound in Medicine (AIUM) Bioeffects Committee, 2009).

El desarrollo de equipos de anestesia aptos para modelos murinos, ha permitido eliminar el estrés causado en el animal al inmovilizarlo durante el tiempo de exposición, lo cual también ha sido referido, previamente, como un factor de confusión (Fisher JE Jr *et al.*, 1996; Ang ES Jr *et al.*, 2006).

Cuando iniciamos el trabajo, nos planteamos que para poder equiparar energías entre el modelo animal y el humano con el fin de conocer si realmente trabajábamos dentro de un rango de energía similar, hemos de jugar con las variables disponibles: la frecuencia, la distancia, el tiempo y la más importante, la potencia media o la potencia de pico, la cual a su vez, es dependiente de la frecuencia de repetición de pulsos.

Aunque la frecuencia no es modificable porque viene limitada por el aparataje, resultó ser equiparable. En el modelo murino, nosotros trabajábamos con una sonda lineal multicanal usada en la clínica para los estudios cardiacos en los lactantes y cuya frecuencia de emisión de la de la onda era de 5,8 MHz, mientras que la utilizada en fetos humanos está entre 3.5 y 7 MHz (General Electric Vingmed Ultrasound A/S, 2007).

La distancia al foco tampoco es posible modificarla puesto que limita la visión del objeto en la ecografía y es un factor considerable, ya que además, el espesor miometrial difiere bastante. En un feto con el tamaño de 9-12 semanas, que es cuando estudiamos el *Ductus venoso* atravesamos una distancia entre 3 y 6 cm y en el caso del feto de rata la distancia es de 2 cm, por lo que el foco de nuestro estudio estaba más cerca. Es un dato considerable, pero es cierto que esa distancia se iguala en las exploraciones vaginales donde la distancia focal es menor.

El tamaño del feto de rata es equiparable a un feto entre 8 - 9 semanas, mide entre 20 y 30 mm y los movimientos que pueda generar también son similares, aunque la cantidad de líquido que acompaña al feto humano es cuatro veces superior al del saco del rata y ello, podría suponer una mayor atenuación de calor del medio, aunque también podría influir en la generación de un mayor número de ondas que aumentarían el efecto.

La intensidad pico es el factor más determinante en este tipo de estudios y su valor se obtiene a partir de la frecuencia de repetición de pulsos (Fletcher A *et al.*, 2010). Sin embargo, el valor real de

intensidad de salida de la máquina ha supuesto uno de las mayores dificultades del trabajo, debido a que el software de los equipos diagnósticos imposibilita la modificación de los datos de conversión de la velocidad de reproducción de imágenes (*frame rate ó FPS*) del modo Doppler pulsado a frecuencia de repetición de pulsos (*PRF*). Por lo tanto, por una cuestión de seguridad en la protección del software comercial de las maquinas, desconocemos la verdadera intensidad de energía de salida de la máquina o intensidad pico espacial atenuada (*attenuated spatial peak average intensity, I_{STPA.3}*).

Esta limitación ampliamente criticada en foros internacionales, dificulta seriamente el avance de este tipo de investigaciones, ya que para poder establecer el valor de $I_{STPA.3}$ de nuestro equipo sólo se puede acceder a la estimación teórica del valor facilitado por la casa comercial del equipo, tras facilitarle nosotros nuestras condiciones de exposición (Advisory Group Non-ionising Radiation and the Subgroup on Ultrasound and Infrasound, 2010). Obviamente no da independencia ni exactitud a la hora de realizar diversos experimentos. En nuestro caso, empleamos un equipo de uso en pediatría, con unas condiciones de frecuencia e intensidad constante, dentro del margen establecido para su uso diagnóstico. El valor de la intensidad pico de 140 mW/cm^2 se encontraba suficientemente por debajo de los parámetros de seguridad establecidos (730 mW/cm^2) pero siempre limitados a la fiabilidad de lo calculado teóricamente por la casa comercial. No debemos olvidar que los equipos diagnósticos están sometidos a una regularización estricta, lo que nos permite asumir que la intensidad de salida facilitada por el fabricante está controlada en el equipo.

De esta manera, el tiempo de exposición resultó ser la constante más fácilmente modificable, además su manipulación nos permitió evaluar uno de los objetivos secundarios, el cual pretendía averiguar la existencia de un tiempo umbral a partir del cual la exposición pudiese causar un daño tisular, y conocer también si este daño tenía o no efecto acumulativo en el tiempo.

Entre los inconvenientes del modelo animal elegido estaría por un lado el tamaño, ya que es preciso hacer una exposición selectiva de los fetos y por lo tanto los espesores tisulares son diferentes, aunque como hemos visto podemos equiparar el tamaño del feto de rata con un feto expuesto a las 8 - 9 semanas. Y por otro, la hemodinámica de estos animales tan pequeños, hacen más difícil la extrapolación de los resultados. La velocidad de la sangre en las ratas es el triple que en humanos, lo que en teoría, minimiza el daño calorífico medio, tal como se ha visto en el uso de la ecografía para articulaciones (De Rijk EP *et al.*, 2002). Pero, también es cierto, que no va a evitar el golpe térmico inmediato y el muy breve efecto “mecánico” de la vibración del impulso (Kruse DE *et al.*, 2008). Por tanto, determinadas variables como la velocidad sanguínea o el coeficiente específico de atenuación, son factores intrínsecos del modelo que deben ser tenidos en cuenta, antes de cualquier extrapolación a otras especies.

Por otro lado y en relación al desarrollo cerebral, la ontogenicidad del desarrollo neurológico en los roedores es otro punto a tener en cuenta. La mayor parte del desarrollo neurológico de las áreas cerebrales tiene lugar postnatalmente, si bien la bibliografía sobre el tema, aconseja esta edad gestacional como el momento clave para el estudio del cerebro en este tipo de estudios y también el tipo de roedor

resulta ser más resistente al calor (Devi PU *et al.*, 1999; Devi PU *et al.*, 2001).

2.- Efecto de la aplicación de Doppler pulsado sobre el resultado perinatal.

Los resultados obtenidos sobre los datos perinatales muestran un descenso en el crecimiento fetal tras la exposición a US. Este descenso está patente sólo en las primeras horas de vida de los animales expuestos. Este hallazgo está en concordancia con los resultados obtenidos en estudios previos en los que se evaluó los bioefectos de los US en el desarrollo prenatal, como muestran revisiones recientes (Advisory Group in Non-ionising Radiation and the Subgroup on Ultrasound and Infrasound, 2010). En estos trabajos se han empleado marcadores clásicos de teratogenicidad como son el peso y la morbimortalidad, observando un descenso en el peso en el momento del nacimiento (O'BrienWR Jr 1983, Tarantal AF y Hendrickx AG 1989a). Sin embargo, esa correlación en humanos no ha sido demostrada (Miller MW y Ziskin MC, 1989; Tarantal AF *et al.*, 1993; Rao S *et al.*, 2006).

En relación a este dato, destacan los trabajos llevados a cabo por el grupo de Devi P.U. y colaboradores, los cuales son equiparables a nuestro estudio en el modelo animal y muestran diversos efectos en la

descendencia en función del día de exposición, encontrando una mayor tasa de reabsorción en las exposiciones tempranas junto con una reducción del peso fetal. Al igual que en nuestro trabajo, también observaron que esta reducción en el peso era temporal, llegando a restaurarse en torno las 6 semanas de edad (Devi PU *et al.*, 1995; Devi PU *et al.*, 1999). Sin embargo, a diferencia de estos trabajos, nuestros resultados no mostraron un incremento en el número de reabsorciones, probablemente debido a que la exposición a los US se realizó en una etapa más avanzada la gestación.

Entre los resultados se registró la presencia de dos individuos expuestos con malformación dental, probablemente debido a una anomalía intrínseca al individuo, ya que ambos animales eran descendientes de la misma madre. Sin embargo cabe destacar, que este tipo de malformaciones fueron documentadas por el grupo de Kolb B y cols (Kolb B *et al.*, 1999) asociadas a la inyección de BrdU en fetos de semana 11 de vida embrionaria.

3.- Efectos de la aplicación de Doppler pulsado sobre el *Ductus Venoso*.

Nuestros resultados muestran como la exposición del *Ductus Venoso* fetal al haz de Doppler pulsado provoca un incremento en la

actividad apoptótica en las células irradiadas, la cual es representativa del daño celular en dicho tejido.

Existen pocos trabajos que investiguen la posibilidad de producción de bioefectos en tejidos específicos dentro del feto y en la mayoría de los trabajos, aunque no en todos encuentran la presencia de efectos tras la exposición de los tejidos fetales (intestino, pulmón, cerebro...) (Advisory Group in Non-ionising Radiation and the Subgroup on Ultrasound and Infrasonics, 2010). El mayor inconveniente de estos estudios, tal como se pone de manifiesto en el trabajo de revisión anteriormente citado, es la heterogeneidad de tejidos, las distintas intensidades de exposición o los tiempos y demás condiciones de exposición empleados, lo que imposibilita la comparación de resultados con el fin de poder extraer conclusiones.

Los trabajos más recientes, han mostrado la presencia de bioefectos en modelos animales tras la modificación de la normativa emitida por la FDA permitiendo el uso de intensidades más elevadas (de 94 a 720 mW/cm²). En general preocupa, la presencia de microburbujas de gas por el uso de contrastes junto al uso de bajas frecuencias, que ha mostrado un daño tisular muy representativo en tejidos fetales como pulmón, corazón, intestino o cerebro, sin llevar asociada una modificación en los índices de seguridad (Stratmeyer ME *et al.*, 2008).

Stanton y colaboradores, determinaron la presencia de un incremento del 150 % en el índice de apoptosis y una disminución significativa del número de mitosis en las muestras de tejido, tras exponer durante 15 minutos, en modo B y modo color, el intestino de un ratón adulto (Stanton MT *et al.*, 2001). Cabe destacar, que la

intensidad empleada era muy superior a la nuestra (1120 mW/cm²), sin el uso de modo Doppler y sin embargo, el índice térmico y mecánico de seguridad se mantuvieron todo el tiempo en niveles normales, como sucedió en nuestro trabajo.

En relación al origen del daño, los mecanismos celulares y moleculares del daño producido, son desconocidos y, aunque no era objeto de este estudio, la literatura postula que existen otros daños no térmicos ni cavitacionales, como posibles microroturas causadas por fuerzas de radiación, que actúan sobre las membranas celulares (Duck FA, 2008; Miller MW *et al.*, 2001).

No obstante, no podemos subestimar el posible efecto causado por un daño térmico, ya que la distancia empleada y el tamaño del haz de Doppler empleados se ajusta a un modelo homogéneo de tejidos blandos en modo no enfocado con el transductor en posición fija, cuyo perfil de temperatura representa un incremento de temperatura máxima en el punto irradiado lo que podría causar un posible daño celular por efecto térmico (Abramowicz JS y Sheiner E 2008; O'Brien WD Jr, 1995). Este incremento térmico tras el uso de Doppler pulsado ya se ha comprobado en fetos humanos, donde se ha registrado un incremento de 1.5 veces su índice térmico (Sheiner E, *et al.*, 2007). Así como en las vellosidades coriónicas, procedentes de interrupciones voluntarias del embarazo, donde tras una larga exposición al modo bidimensional mediante ecografía transvaginal se ha observado un daño celular provocado mediante la activación de la vía apoptótica de la caspasa, al igual que nuestro estudio (Zhang J *et al.*, 2002).

El hecho de determinar una correlación lineal entre el tiempo de exposición y la cantidad de daño presente en los tejidos, junto con la presencia de un tiempo umbral necesario a partir del cual se registra muerte celular, son datos que hablan a favor de un posible incremento térmico en la formación del daño en nuestro modelo. La dosis acústica se define como la energía depositada por segundo por unidad de masa del medio expuesto, de manera que, exposiciones más duraderas, estarán asociadas a un mayor riesgo de daño térmico (Nyborg WL, 1978).

Determinados investigadores postulan que los incrementos de temperatura difieren en función del animal estudiado lo cual sería un impedimento a la hora de extrapolar los resultados de experimentación animal al ser humano (Church CC y Miller MW, 2007). Sin embargo, la temperatura corporal de la rata oscila entre 37.5 y 38 °C y en nuestro trabajo de experimentación los animales estuvieron monitorizados sobre una manta térmica, hasta obtener una temperatura corporal estable en torno a los 37 °C.

Otros factores como el movimiento, la termotolerancia de cada individuo y la respuesta a la anestesia pueden interferir en los resultados de alguna forma. Respecto al movimiento o la variabilidad intergrupar lo hemos resuelto con la metodología empleada. Si bien, es necesario barajar un posible efecto de la anestesia, que pudiese sesgar los resultados de daño celular presentes en nuestro estudio, ya que en los animales no expuestos de madres gestantes cuyos tiempos de exposición fueron cortos registraron mayores índices de daño celular que los animales no expuestos de madres gestantes sometidas a mayores tiempos de exposición a los US. Este hallazgo podría ser

explicado debido a la alta toxicidad de la anestesia durante el proceso de inducción (Reichle FM y Conzen PF, 2003), el cual asociado a un tiempo de sacrificio temprano de dicha camada, podría provocar la presencia de elevados niveles de anestésico en el flujo sanguíneo del animal, que a su vez podrían elevar los niveles de daño apoptótico.

El momento a partir del cual se muestra daño tisular, también resulta un factor característico de un posible daño térmico, ya que se precisa un mayor tiempo para su expresión mediante la activación de caspasa. Se sabe que a nivel celular, las células comienzan a desarrollar termo-tolerancia tras el registro de incrementos moderados de temperatura gracias a la aparición de proteínas intracelulares denominadas de choque térmico (*heat shock protein*) las cuales, presentan un tiempo de aparición de unos 10 o 15 minutos, tras el incremento de temperatura (Duck FA, 2008).

Debemos considerar que no todos los tejidos celulares podrían tener una misma respuesta a este tipo de exposiciones, La FDA establece unos índices de seguridad para las exposiciones de todos los órganos internos basados en modelos teóricos. Sin embargo, y a la vista de los resultados expuestos en este trabajo, dichos índices deberían ser reevaluados con el fin de asegurar un buen uso de la técnica. Así por ejemplo, al igual que se ha observado una elevada sensibilidad al uso de radiaciones ionizantes en el hígado fetal, incluso a bajas dosis, tras las cuales ha resultado en detrimento de las células progenitoras y un incremento en la proporción de células en metafase aberrantes (Devi PU y Hossain M 2000). Por lo que el efecto causado por la exposición a un haz de Doppler pulsado sobre un órgano como

el hígado fetal, encargado del proceso hematopoyético del feto, debe tener especial relevancia.

A la hora de una posible extrapolación de los resultados con interés en la clínica hay dos resultados que debemos considerar. El primero es la presencia de un umbral de tiempo, a partir del cual se observa un incremento significativo en el daño celular registrado en un tejido específico, el hígado fetal murino, el cual se establece en nuestro trabajo en los 10 segundos de exposición. Como ya sabemos, la exposición de los tejidos fetales presenta un incremento de temperatura más elevado que los tejidos adultos, debido a un mayor coeficiente de absorción gracias a su mayor densidad (Nyborg WL, 1978). La física de los US establece que los efectos inducidos por los US tienen un umbral a partir del cual producen sus efectos biológicos o terapéuticos.

Por otro lado debemos resaltar los resultados que muestran una duración transitoria del daño en el tejido hepático fetal, efecto que podría ser solventado por la velocidad de regeneración de este órgano en desarrollo (Tannuri AC *et al.*, 2007) La duración del daño también concuerda con los resultados obtenidos en otros trabajos realizados en pulmones e intestino de roedores adultos, donde la actividad reconstructiva de ambos órganos es capaz de resolver el daño producido (Miller DL y Thomas RM 1994; Stanton Mt *et al.*, 2001).

La pregunta ineludible que surge ante este resultado es: ¿Cuál es el tiempo máximo de exposición del *ductus venoso* fetal de un ser humano, conociendo que el tiempo máximo para este órgano en un modelo animal es de tan sólo 10 segundos?

A pesar de intentar desarrollar un modelo animal de experimentación equiparable a una exposición de uso clínico diario, son muchas las incógnitas y posibles factores que podrían influenciar estos resultados a la hora de extrapolar los resultados presentados en este trabajo.

Si nos centramos en el posible daño térmico generado, debemos considerar que la temperatura es una medida de la energía cinética de las moléculas de un reactivo, cuya distribución no es uniforme dentro del medio. De manera que cuanto mayor es la frecuencia empleada, mayor será la pérdida de energía ondulatoria en forma de calor. Además, la energía disipada por una onda o que es absorbida en su camino es directamente proporcional a la frecuencia y amplitud. Al trabajar con un haz de Doppler, cuando este colisiona con un hematíe su frecuencia se multiplica por cuatro de manera exponencial, es decir, la intensidad de la onda de dispersión eleva a la cuarta la potencia de la frecuencia. En nuestro modelo animal trabajamos con una frecuencia máxima de 13 MHz, mientras que en diagnóstico clínico las frecuencias empleadas son de 7 MHz, para conseguir un coeficiente de absorción teóricamente similar.

La diferencia en la profundidad a la que incide el haz de US entre nuestro modelo animal, de 2 cm, y el usado en clínica obstetra de entre 3 y 6 cm, daría lugar a un incremento de calor en nuestro modelo animal, el cual pudiese estar contrarrestado en parte por la reducción del efecto térmico de nuestro volumen de muestra, debido a un descenso en el tamaño del área focal expuesta en nuestro modelo (0.3 - 0.5 mm) en comparación con los empleados en exposiciones fetales humanas (0.5 - 0.9 mm), junto con la mayor velocidad de flujo

sanguíneo presente en el modelo animal que ejercería un efecto de enfriamiento 4 veces superior a la de los humanos. Aunque no debemos olvidar que velocidades más altas implican un incremento de frecuencias que en focos cercanos supondría una mayor absorción de calor.

A la vista de los resultados obtenidos en el hígado, podemos afirmar la existencia de daño tisular en tejido hepático fetal tras el uso de un aparato ecográfico de rango diagnóstico pero, basándonos en estos resultados del umbral de tiempo obtenido, extrapolar un tiempo para una exploración segura con Doppler pulsado de un DV en feto humano sigue siendo una cuestión por resolver. Lo que sí podemos considerar es teniendo en cuenta este valor umbral, sería prudente no superar más allá de los 30 segundos las exploraciones ecográficas con Doppler pulsado, que es lo que resultaría tras considerar el supuesto de mayor energía absorbible.

Además, en este trabajo se ha demostrado que la presencia de ese daño celular es temporal, existiendo recuperación celular tras el daño, de manera que resultaría lógico, espaciar las exploraciones para favorecer la recuperación celular del tejido.

4.- Efectos de la aplicación de Doppler pulsado sobre la Arteria Cerebral Media.

El tejido cerebral es especialmente sensible al calor y es, además, un tema que preocupa a los expertos como hemos visto en el apartado de introducción (Moretti ME *et al.*, 2005). En nuestro trabajo, hemos analizado si la exposición prenatal de la ACM, puede causar algún efecto sobre las células proliferativas del cerebro fetal en desarrollo.

Los resultados de daño celular en tejido nervioso muestran la presencia de daño apoptótico en todas las áreas cerebrales analizadas, encontrando al igual que en el hígado, una correlación entre el tiempo de exposición y el daño celular ocasionado. Además, hay una relación entre el daño histológico producido antes del nacimiento y una alteración en los test que analizan el desarrollo neurológico de las camadas expuestas, caracterizada fundamentalmente, por una hiperactividad selectiva y alteraciones en la memoria a largo plazo.

El incremento en la actividad apoptótica es claramente patente en la corteza cerebral, pero a diferencia de los resultados obtenidos en hígado, el daño es más persistente y estaba presente a las 48 horas tras la exposición. Esto puede ser debido a su mayor sensibilidad y a la distorsión del haz de Doppler pulsado al contactar con una zona de hueso, produciéndose un aumento en el daño tisular, se ha descrito que este efecto es capaz de producir hemorragias en la zona adyacente (Bigelow TA *et al.*, 2007). Además, debido a la presencia de esa fase ósea que protege el tejido cerebral, el máximo incremento de

temperatura ocurre en la superficie de la exposición (Fleischer A *et al.*, 2010), lo cual concuerda con los resultados que muestran un mayor índice de daño en la zona de la corteza y no en la zona subventricular, donde se sitúa la arteria irradiada en esta parte del estudio. En relación con esta hipótesis, el grupo de Pfaffenberger y colaboradores en un trabajo que evaluaba el uso de US eliminar trombos en el SNC, constató cómo las hemorragias producidas por efecto del haz de US, al atravesar el cráneo de ratones adultos, desaparecían al exponer el cerebro sin calota. (Pfaffenberger S *et al.* 2005).

Entre los posibles factores que podrían influir en la protección del área expuesta al US, la cual resulta menos afectada que la corteza, se debe pensar que la velocidad del flujo sanguíneo debido a la alta vascularización pudiese favorecer un posible efecto de enfriamiento. Sin embargo, este efecto de enfriamiento sólo se ha podido demostrar tras la exposición de vasos bien desarrollados en las etapas tardías del desarrollo, pero los estudios en porcino vieron que dicho efecto de enfriamiento tras la exposición fetal no se producía comparado con la exposición *postmortem* (Horder MM *et al.* 1998a, Horder MM *et al.*, 1998b). Por otro lado debemos tener en cuenta que, debido al reducido diámetro del haz y la distancia recorrida hasta el vaso irradiado puede registrarse una reducción del calor en la zona irradiada, debido a difusión en las capas más cercanas (Fleischer A *et al.*, 2010). La edad gestacional de exposición en esta fase del estudio es más temprana que en las exposiciones del *ductus venoso*, por lo que la presencia de un mayor contenido en agua en los tejidos, podría ejercer un efecto de

dispersión rápida del calor. Estudios previos de exposición de tejido óseo en fetos humanos han constatado esta reducción en los incrementos de temperatura, de manera que una exposición de una vértebra fetal humana en la semana 14 de gestación registró un incremento de 0.6 °C, lo cual suponía 1.2 °C más baja que la registrada para exposiciones en la semana 18 de gestación. (Doody C *et al.*, 1999)

Los estudios histológicos realizados, revelaron cómo la exposición a los US se asocia con una alteración en el parénquima celular, caracterizado por un incremento en la proporción de espacios extracelulares y la presencia de un bajo grado de compactación, dando lugar a una apariencia vacuolada y de hinchazón. Estos hallazgos recuerdan al edema citotóxico y necrosis intracerebral en ratas, descritos por Schneider y colaboradores tras la irradiación a baja frecuencia para la trombólisis en el tratamiento de la apoplejía (Schneider F *et al.*, 2006). El mecanismo responsable de esta alteración es todavía desconocido, además de no ser el objeto de esta investigación sin embargo, la duración del mismo hace probable la presencia de cambios en la síntesis proteica y la regulación genética. Un estudio preliminar llevado a cabo en nuestro laboratorio acerca de los marcadores genéticos de daño, ha revelado la presencia de daño inmediato a la exposición de los cerebros fetales (datos no mostrados en este trabajo de tesis), mostrando un daño significativo de un marcador genético denominado *Factor 1 de la activación de la proteasa apoptótica (Apaf-1)*. Lo cual concuerda con un estudio reciente, donde se sugiere que la apoptosis neuronal mediada por el

daño mitocondrial podría ser el mecanismo más importante del daño cerebral neonatal y que la proteína Apaf-1 sería la clave de su activación genética (Gao Y *et al.*, 2010).

Además de constatar la presencia de un daño inmediato sobre el tejido expuesto, caracterizado por alteraciones histológicas y por el descenso en el número de células progenitoras a las 48 horas, se muestra también, la aparición de un daño en el tejido en desarrollo, determinado por un descenso en el número de células en proceso de migración neuronal. Estos datos celulares registrados en nuestro estudio concuerdan con los relatados en el estudio realizado por el grupo de Ang ES Jr y colaboradores en ratones, el cual supuso un referente en todo el tema de seguridad ecográfica, donde también mostraba alteraciones en la migración neuronal y cambios histológicos de la corteza cerebral, si bien ellos, realizaban una exposición de todo el vientre materno con modo bidimensional y sus tiempos eran superiores a 4 horas (Ang Es Jr *et al.*, 2006). Ciertos puntos de este estudio han sido muy criticados por el AIUM, entre ellos el análisis estadístico, la reproductividad de los datos, junto con la dificultad de diferenciar los efectos del estrés materno de los propiamente causados por los US (AIUM Bioeffects Committee 2009). A favor de nuestro estudio, estaría el hecho que, el daño presente tras la exposición, está causado por la única variable que es la exposición, la cual se realizó en tiempos y áreas cerebrales concretas.

Estos resultados de alteración en la migración neuronal resultan plausibles si tenemos en cuenta que hemos seleccionado un período

embrionario altamente sensible a la exposición del cerebro fetal (E14-E16). Por otro lado la mayor parte de la proliferación y expansión de las zonas ventriculares y subventriculares en el desarrollo cerebral de la rata tienen lugar entre los días E13 y E18, siendo esta zona la zona irradiada debido a la localización de la ACM.(Devi PU, 2006; Rice D y Barone S Jr. 2000).

El último punto de nuestro estudio se centró en el análisis de la descendencia expuesta al haz de US. Nuestros resultados muestran anomalías significativas en la capacidad de aprendizaje a largo plazo, alteraciones en la actividad motora, además de una caracterizada hiperactividad. Estos datos concuerdan con otros estudios previos como los realizados por Devi y cols, que mostraron alteraciones en la actividad locomotora y de aprendizaje, tras 10 min de exposición en E14.5 (Devi PU *et al.* 1999; Devi PU y Hossain M, 2001). También el grupo de Norton y cols, determinaron alteraciones en el comportamiento en ratas expuestas intraútero en día 15 de gestación.(Norton S *et al.*, 1991) En *Cynomolgus macaques* se observó la presencia de alteraciones en el comportamiento postnatal tras la exposición intauterina de 10 minutos de haces de 7.5 MHz en los días 21- 35 y 36 - 60 de gestación. (Tarantal AF y Hendrickx AG 1989a; Tarantal AF y Hendrickx AG, 1989b) Y más recientemente, un estudio en pollos mostraba un efecto sobre la memoria y el aprendizaje tras exposiciones breves de los embriones a Doppler pulsado (Schneider-Kolsky ME *et al.* 2009).

Se ha descrito que la capacidad de memoria a corto plazo está modulada por el hipocampo, mientras que la formación de la memoria a largo plazo requiere la transferencia de información desde el hipocampo hasta la corteza cerebral. (Blumenfeld RS y Ranganath C, 2006; Hebert AE y Dash PK, 2002) Además se ha determinado que la alteración de la memoria a largo plazo, viene asociada por una alteración estructural determinada por un daño en la síntesis proteica y genética, lo cual está presente en nuestros resultados (Wainwright ML *et al.*, 2002). Además, la corteza cerebral juega un papel crucial en la modulación de la actividad motora, por lo que nuestros resultados sugieren que la exposición a US en día 16 de gestación afecta principalmente a la modulación del comportamiento en el área de la corteza cerebral, siendo reflejado por alteraciones en la memoria a largo plazo y la actividad motora, mientras que aquellos comportamientos modulados por el hipocampo (memoria a corto plazo) y cerebelo (test de aprendizaje Y-maze) presentan menor afectación.

Estos resultados revelan diferentes grados de susceptibilidad a los efectos de los US, pudiendo jugar un papel importante en la regulación de las vías bioquímicas que rigen dichos comportamientos, como puede ser la ruta del glutamato-óxido nítrico y cGMP en el cerebelo, característico de capacidad de aprendizaje mediante Y-maze. (Llansola M *et al.*, 2009; Piedrafita B *et al.*, 2007) El grupo de Suneetha y Kumar mostraron un incremento en la actividad de la acetilcolina (ACh), Acetilcolinesterasa (AChE) y GABA en el

cerebelo fetal, tras repetidas y cortas exposiciones a US durante la organogénesis (Suneetha N y Kumar RP, 1993).

Basándonos en estudios de análisis de multivariantes sobre la correlación de la maduración funcional de las regiones cerebrales en múltiples mamíferos, y teniendo en cuenta que el cerebro de rata tiene un gran desarrollo en etapas postnatales, podríamos establecer que el desarrollo neurológico del cerebro fetal de rata en E16 sería equiparable al desarrollo de un feto de semana 8-12 en el humano, de manera que en términos de desarrollo cerebral, la exposición al haz de Doppler se ha realizado al inicio del proceso de neurogénesis fetal (Clancy B *et al.*, 2007). A pesar de poder existir importantes diferencias en la respuesta celular a la exposición de diversos agentes, durante los estadios de desarrollo entre humanos y modelos animales, nuestros resultados sugieren que la exposición intraútero del cerebro fetal al Doppler pulsado, puede alterar la migración de las neuronas neocorticales, probablemente debido a un descenso en el soporte radial glial, causado por una mayor diferenciación de las células progenitoras neocorticales en la zona ventricular.

Somos conscientes de las limitaciones de la extrapolación de estos resultados, debido a las diferencias entre modelos animales en el desarrollo fetal. Pero si evaluamos de manera conjunta los resultados expuestos en este trabajo de tesis doctoral, podemos apreciar cómo el tejido cerebral en desarrollo es más sensible a la exposición a los sistemas diagnósticos de US, de lo que cabría esperar manteniéndonos dentro de los valores de seguridad establecidos, por lo que parece

suficiente motivo para avanzar en los trabajos que puedan esclarecer factores y mecanismos que puedan producir bioefectos. En resumen, los resultados obtenidos revelan la importancia del uso de modelos animales para la caracterización de los equipos diagnósticos, ya que la utilización de fantomas no permite analizar los posibles efectos *in vivo* producidos tras la interacción de los US y los diversos tejidos. Deseamos que las implicaciones aquí descritas, lejos de provocar una sensación de alarma, contribuyan a mejorar los sistemas seguridad para la implantación de estas tecnologías en el futuro.

VII.- CONCLUSIONES

Las conclusiones extraídas de este trabajo son:

- ✓ El modelo murino presentado resulta eficiente y reduce las variables que han sido objeto de crítica en trabajos previos.
- ✓ El uso del Doppler pulsado sobre el *Ductus Venoso* fetal muestra un incremento en los niveles de daño celular basal, mostrando una relación directa con los tiempos de exposición.
- ✓ Existe un tiempo máximo de exposición a partir del cual el incremento de daño basal es significativo, denominándolo tiempo umbral.
- ✓ En el tejido hepático fetal se observa que la presencia de daño es temporal, quizás debido a su capacidad regenerativa.
- ✓ La exposición al Doppler en el SNC presenta un incremento en el daño celular e histológico permanente a diferencia del constatado en tejido hepático.
- ✓ No es el foco de exposición sino el área de la corteza cerebral el territorio cerebral que presenta más daño celular.
- ✓ La exposición fetal de la ACM, al Doppler pulsado en el modelo murino, tiene una repercusión en la descendencia.
- ✓ Es necesaria la aplicación de modelos animales para la caracterización de los equipos diagnósticos, para poder establecer una exposición libre de riesgo.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abramowicz JS. Ultrasonographic contrast media: has the time come in obstetrics and gynecology?. **J Ultrasound Med** 2005;24:517-531.
- Abramowicz JS. Prenatal exposure to ultrasound waves: is there a risk?. **Ultrasound Obstet Gynecol** 2007;29:363-367.
- Abramowicz JS and Sheiner E. Ultrasound of the placenta: a systematic approach. Part II: functional assessment (Doppler). **Placenta** 2008;29:921-929.
- Advisory Group n Non-ionising Radiation and the Subgroup on Ultrasound and Infrasound. Health Effects of Exposure to Ultrasound and Infrasound. 2010, **Health Protection Agency.** London.
- Aguilar MA, Minarro J and Felipo V. Chronic moderate hyperammonemia impairs active and passive avoidance behavior and conditional discrimination learning in rats. **Exp Neurol** 2000;161:704-713.
- AIUM (American Institute of Ultrasound in Medicine). Medical Ultrasound Safety. **Laurel MD: American Institute of Ultrasound in Medicine** 1994.
- AIUM (American Institute of Ultrasound in Medicine). Nonthermal Mechanical Bioeffects. **Laurel MD: American Institute of Ultrasound in Medicine** 1999.
- AIUM/NEMA (American Institute of Ultrasound in Medicine/ National Electrical Manufacturers Association). Standar for Real- Time Display of Thermal and Mechanical Indices and Diagnostic Ultrasound Equipment. **Laurel MD: American Institute of Ultrasound in Medicine** 1992, revised 1996.

- Alastair McKinlay. Progress in Biophysics and Molecular Biology: Effects of Ultrasound and Infrasound relevant to Human Health Volume 93, Issues 1–3, Pages 1-420 ed, January/February 2007. Elsevier Ltd.
- American Institute of Ultrasound in Medicine. AIUM practice guideline for the performance of obstetric ultrasound examinations. **J Ultrasound Med** 2013;32:1083-1101.
- Ang ES Jr, Gluncic V, Duque A, Schafer ME and Rakic P. Prenatal exposure to ultrasound waves impacts neuronal migration in mice. **Proc Natl Sci USA** 2006;103:12903-12910.
- Arulkumaran S, Talbert DG, Nyman M, Westgren M, Su HT and Ratnam SS. Audible in uterus sound caused by the ultrasonic radiation force from a real-time scanner. **J Obstet Gynaecol Res** 1996;22:523-527.
- Barbieri C. Doppler ultrasound in high risk pregnancies. Protocol for a Cochrane Systematic Review. 2012.
- Bayer SA, Altman J, Russo RJ and Zhang X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. **Neurotoxicology** 1993;14:83-144
- Bayer SA. Development of the hippocampal region in the rat. II: Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. **J Comp Neurol** 1980;190:115-134.
- Bhide A, Acharya G, Bilardo CM, Brezinka C, Cafici D, Hernandez-Andrade E, Kalache K, Kingdom J, Kiserud T, Lee W *et al*. ISUOG practice guidelines: use of Doppler ultrasonography in obstetrics. **Ultrasound Obstet Gynecol** 2013;41:233-239.

- Bigelow TA, Miller RJ, Blue JP,Jr and O'Brien WD,Jr. Hemorrhage near fetal rat bone exposed to pulsed ultrasound. **Ultrasound Med Biol** 2007;33:311-317.
- Blumenfeld RS and Ranganath C. Dorsolateral prefrontal cortex promotes long-term memory formation through its role in working memory organization. **J Neurosci** 2006;26:916-925.
- Böhm F, Kohler UA, Speicher T and Werner S. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. **EMBO Mol Med** 2010;2:294-305.
- Boix J, Cauli O and Felipo V. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 affects differentially learning or motor coordination in adult rats. Mechanisms involved. **Neuroscience** 2010;167:994-1003.
- Cahill MD and Humphrey VF. A theoretical investigation of the effect of nonlinear propagation on measurements of mechanical index. **Ultrasound Med Biol** 2000;26:433-440.
- Caluwaerts S, Vercruyse L, Luyten C, Pijnenborg R. Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. **Placenta**, 2005, 26, 7, 574-584.
- Campbell S SP. Detection and management of intrauterine growth retardation: a British approach. In Chervenak FA, Isaacson GC, Campbell S, editors (ed) **Ultrasound in obstetrics and gynaecology**, vol 2. 1993. Little, Brown and Company, Boston, pp. 1431-5.

- Carrera JM. Bases físicas de los ultrasonidos aplicados a la medicina perinatal. In Masson SA (ed) *Ecografía en medicina materno fetal.* 2000. Masson S.A., pp. 3-22.
- Cauli O, Rodrigo R, Piedrafita B, Llansola M, Mansouri MT and Felipe V. Neuroinflammation contributes to hypokinesia in rats with hepatic encephalopathy: ibuprofen restores its motor activity. **J Neurosci Res** 2009;87:1369-1374.
- Church CC and Miller MW. Quantification of risk from fetal exposure to diagnostic ultrasound. **Prog.Biophys.Mol.Biol.** 2007, 93, 1-3, 331-353.
- Clancy B, Kersh B, Hyde J, Darlington RB, Anand KJ and Finlay BL. Web-based method for translating neurodevelopment from laboratory species to humans. **Neuroinformatics** 2007;5:79-94.
- Collardeau-Frachon S and Scoazec JY. Vascular development and differentiation during human liver organogenesis. **Anat Rec (Hoboken)** 2008;291:614-627.
- Consensus Conference. The use of diagnostic ultrasound imaging during pregnancy. **JAMA** 1984;252:669-672.
- Crouzet S, Rouviere O, Martin X and Gelet A. High-intensity focused ultrasound as focal therapy of prostate cancer. **Curr Opin Urol** 2014;24:225-230.
- De Rijk EP, Van Esch E, Flik G. Pregnancy dating in the rat: placental morphology and maternal blood parameters. **Toxicol. Pathol.**, 2002, 30, 2, 271-282.
- Devi PU, Suresh R and Hande MP. Effect of fetal exposure to ultrasound on the behavior of the adult mouse. **Radiant Res** 1995;141:314-317.

- Devi PU, Hossain M and Bisht KS. Effect of late fetal irradiation on adult behavior of mouse: Dose-response relationship. **Neurotoxicol Teratol**. 1999;21:193-198.
- Devi PU and Hossain M. Evaluation of the cytogenetic damage and progenitor cell survival in foetal liver of mice exposed to gamma radiation during the early foetal period. **Int J Radiant Biol** 2000;76(3):413-7.
- Devi PU and Hossain M. Effect of early foetal irradiation on the postnatal development mouse. **Teratology** 2001;64:45-50.
- Devi PU, Pillai KK and Vohora D. Facilitation action of N-acetylcysteine on the anticonvulsant effect of sodium valproate in mice. **Basic Clin Pharmacol Toxicol** 2006;98:521-522.
- Di Renzo, G.C *et al.* Organization of perinatal care within the european community. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 1992;45:81-87.
- Doody C, Porter H, Duck FA, Humphrey VF. In vitro heating of human fetal vertebra by pulsed diagnostic ultrasound. **Ultrasound Med Biol**. 1999;25(8):1289-1294.
- Duck FA. Acoustic properties of tissue at ultrasonic frequencies. In Academic Press (ed) *Physical Properties of Tissue, A Comprehensive Reference Book*. 1990. Academic Press, London, pp. Chapter 4, pp 73–135.
- Duck FA. Nonlinear acoustics in diagnostic ultrasound. **Ultrasound Med Biol** 2002;28:1-18.
- Duck FA. Hazards, risks and safety of diagnostic ultrasound. **Med Eng Phys** 2008;30:1338-1348.

- Edwards MJ, Saunders RD and Shiota K. Effects of heat on embryos and foetuses. **Int J Hyperthermia** 2003;19:295-324.
- Edwards MJ. Hyperthermia as a teratogen: a review of experimental studies and their clinical significance. **Teratog Carcinog Mutagen** 1986;6:563-582.
- Ewigman BG, Crane JP, Frigoletto FD and *et al.* Effect of prenatal ultrasound screening on prenatal outcome. RADIUS Study Group. **N Engl J Med** 1993;329:821.
- Fatemi M, Ogburn PL, Jr and Greenleaf JF. Fetal stimulation by pulsed diagnostic ultrasound. **J Ultrasound Med** 2001;20:883-889.
- FDA (US Food and Drug Administration) Revised 510(k) Diagnostic ultrasound guidance for 1993. **Rockville, MD: Center for Devices and Radiological Health** 1993.
- FDA (US Food and Drug Administration) Use of mechanical index in place of spatial peak, pulse average intensity in determining substancial equivalence. **Rockville, MD: Center for Devices and Radiological Health.** 1994.
- FDA (US Food and Drug Administration) Information for manufacturers seeking marketing clearance of diagnostic ultrasound system and transducers. **Rockville, MD: Center for Devices and Radiological Health.** 1997.
- Fisher JE Jr, Acuff-Smith KD, Schilling MA, Meyer RA, Smith NB, Moran MS, O'Brien WD Jr. Vorhees CV. Behavioral effects of prenatal exposure to pulsed-wave ultrasound in unanesthetized rats. **Teratology** 1996;54(2):65-72.
- Fleischer A, Toy E, Lee W and Manning F. Obstetric Sonography: The output Display Standard and Ultrasound

- Bioeffects. In *Sonography in obstetrics and Gynecology: principles and practice*. 2010. Mac Graw-hill, England, pp. 50-82
- Gao Y, Liamng W, Hu X, Zhang W, Stetler RA, Vosler P, Cao G, Chen J. Neuroprotection against hypoxic-ischemic brain injury by inhibiting the apoptotic protease activating factor-1 pathway. **Stroke** 2010. 41(1):166-172.
 - General Electric Vingmed Ultrasound A/S. Technical publication: *Vivid 7 Dimension/Vivid 7 Pro: Reference Manual vol.2*. 2007 General Electric Vingmed Ultrasound A/S. Norway.
 - Gómez-Pinedo U, Rodrigo R, Cauli O, Herraiz S, García-Verdugo JM, Pellicer B, Pellicer A, Felipe V. cGMP modulates stem cells differentiation to neurons in brain in vivo. **Neuroscience**, 2010, 165, 4, 1275-1283.
 - Hamilton MF and Blackstock DT. Nonlinear Acoustics . San Diego, Academic Pres. In. 1998. Academic Pres, San Diego.
 - Hande MP and Devi PU. Effect of in utero exposure to diagnostic ultrasound on the postnatal survival and growth of mouse. **Teratology** 1993, Nov; 48 (5): 405-11
 - Harman CR and Baschat AA. Comprehensive assessment of fetal wellbeing: which Doppler tests should be performed?. **Curr Opin Obstet Gynecol** 2003;15:147-157.
 - Hellman LM, Duffus GM and Ronald I, *et al.* Safety of diagnostic ultrasound in obstetrics. **Lancet** 1970;1:1133.
 - Hebert AE and Dash PK. Extracellular signal-regulated kinase activity in the entorhinal cortex is necessary for long-term spatial memory. **Learn Mem** 2002;9:156-166.

- Higgins GM and Anderson RM. Experimental pathology of liver, restoration of liver of the wither rat following partial surgery removal. **Arch Pathol** 1931:186:202-219.
- Hill CR. Ultrasonic exposure thresholds for changes in cells and tissues. **J Acoust Soc Am** 1972:52:667-672.
- Hollander HJ. Ultrasonic interseccion picture study in obstetrics and gynecology. **Fortschr Geb Rontgenstr Nuklearmed** 1972: Suppl: 78-9.
- Horder MM, Barnett SB, Vella GJ, Edwards MJ, Wood AK. In vivo heating of the guinea-pig fetal brain by pulsed ultrasound and estimates of thermal index. **Ultrasound Med Biol.** 1998a. 24(9):1467-1474.
- Horder MM, Barnett SB, Vella GJ, Edwards MJ, Wood AK. Ultrasound-induced temperature increase in guinea-pig fetal brain in utero: third-trimester gestation. **Ultrasound Med Biol.** 1998b. 24 (9):150-1510.
- Houssaint E. Differentiation of the mouse hepatic primordium. I. An analysis of tissue interactions in hepatocyte differentiation. **Cell Differ** 1980:9:269-279.
- Houston LE, Odibo AO and Macones GA. The safety of obstetrical ultrasound: a review. **Prenat Diagn** 2009:29:1204-1212.
- Implementation of the Principle of as Low as Reasonably Achievable (ALARA) for Medical and Dental Personnel. Bethesda (MD): **National Council on Radiation Protection and Measurement Document** 1990:107.
- International Commission on Radiation Units and Measurements. Tissue Substitutes, Phantoms and

-
- Computational Modelling in Medical Ultrasound. **ICRU Report** Bethesda MD, 1998:61.
- Jacobsen MD, Weil M and Raff MC. Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. **J Cell Biol** 1996;133:1041-1051.
 - Jurkovic D, Jauniaux E, Kurjak A, Hustin J, Campbell S and Nicolaides KH. Transvaginal color Doppler assessment of the uteroplacental circulation in early pregnancy. **Obstet Gynecol** 1991;77:365-369.
 - Kinsler LE, Frey AR, Coppens AB and Sanders JV. Fundamentals of Acoustics. 560 pp ed, 2000. John Wiley, Chichester.
 - Kolb B, Pedersen B, Ballermann M, Gibb R and Wishaw IQ. Embryonic and postnatal injections of bromodeoxyuridine produce age-dependent morphological and behavioral abnormalities. **J Neurosci**. 1999;19:2337-2346.
 - Kondo T and Kano E. Effect of free radicals induced by ultrasonic cavitation on cell killing. **Int J Radiat Biol** 1988;54:475-486.
 - Kruse DE, Mackanos MA, O'Connell-Rodwell CE, Contag CH, Ferrara KW. Short duration focused ultrasound stimulation of Hsp70 expression *in vivo*. **Phys Med Biol**. 2008;53(13):3641-3660.
 - Leie P. Safety and potential hazards in the current applications of ultrasound in obstetrics and gynecology. **Ultrasound Med Biol** 1979;5:307.

- Levi S. Diagnostic par ultrasons en Gynécologie-Obstétrique. 1972, 2-11, Masson, Paris
- Liebeskind D, Bases R, Koenigsberg M, Koss L and Raventos C. Morphological changes in the surface characteristics of cultured cells after exposure to diagnostic ultrasound. **Radiology** 1981;138:419-423.
- Liebeskind D, Bases R, Mendez F, Elequin F and Koenigsberg M. Sister chromatid exchanges in human lymphocytes after exposure to diagnostic ultrasound. **Science** 1979;205:1273-1275.
- Llansola M, Hernández-Viadel M, Erceg S, Montoliu C, Felipo V. Increasing the function of the glutamate-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway increases the ability to learn a Y-maze task. **J Neurosci Res** 2009, Aug;87 (10),2351-5
- Lyons EA, Dyke C, Toms M and Cheang M. In utero exposure to diagnostic ultrasound: a 6-year follow-up. **Radiology** 1988;166:687-690.
- Maiz N, Staboulidou I, Leal AM, Minekawa R and Nicolaides KH. Ductus venosus Doppler at 11 to 13 weeks of gestation in the prediction of outcome in twin pregnancies. **Obstet Gynecol** 2009;113:860-865.
- Maiz N, Valencia C, Kagan KO, Wright D and Nicolaides KH. Ductus venosus Doppler in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11-13 weeks of gestation. **Ultrasound Obstet Gynecol** 2009;33:512-517.
- Maulik, Dev. Spectral Doppler Sonography: Waveforms analysis and hemodynamic interpretation. 2005, 35-56, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany

- Medlock ES and Haar JL. The liver hemopoietic environment: I. Developing hepatocytes and their role in fetal hemopoiesis. **Anat Rec** 1983;207:31-41.
- Miller DL and Thomas RM. Heating as a mechanism for ultrasonically-induced petechial hemorrhages in mouse intestine. **Ultrasound Med Biol.** 1994, 20:5:493-503.
- Miller MW and Ziskin MC. Biological consequences of hyperthermia. **Ultrasound Med Biol** 1989;15:707-722.
- Miller MW, Brayman AA, Sherman TA, Abramowicz JS and Cox C. Comparative sensitivity of human fetal and adult erythrocytes to hemolysis by pulsed 1 MHz ultrasound. **Ultrasound Med Biol** 2001;27:419-425.
- Miller NW. Hyperthermic teratogenicity, thermal dose and diagnostic ultrasound during pregnancy: implications of new standards on tissue heating. **Int J Hyperthermia** 2002 Sep-Oct;18 (5):361-384.
- Miller DL. Safety assurance in obstetrical ultrasound. **Semin Ultrasound CT MR** 2008;29:156-164.
- Moore RM,Jr, Diamond EL and Cavalieri RL. The relationship of birth weight and intrauterine diagnostic ultrasound exposure. **Obstet Gynecol** 1988;71:513-517.
- Moretti ME, Bar-OZ B, Fried S, Koren G. Maternal hyperthermia and the risk for neural tube defects in offspring: systematic review and meta-analysis. **Epidemiology** 2005. 16 (2):216-219.

- Mukubo M. Epidemiological study: Safety of diagnostic ultrasound during pregnancy on fetus and child development. **Ultrasound Med Biol** 1986;12:691.
- National Committee on Radiation Protection and Measurement (NCRP). Biological effects of ultrasound: mechanisms and clinical implications. Bethesda (MD): The Council, **NCRP Report n° 74** 1983.
- National Council on Radiation Protection and Measurements. Exposure Criteria for Medical Diagnostic Ultrasound: II. Criteria Based on All Known Mechanisms. . **NRCP Report No 140** Bethesda MD, 2002.
- Newnham JP, Evans SF, Michael CA, Stanley FJ and Landau LI. Effects of frequent ultrasound during pregnancy: a randomised controlled trial. **Lancet** 1993;342:887-891.
- Norton S, Kimler BF, Cytacki EP, Rosenthal SJ. Prenatal and postnatal consequences in the brain and behavior of rats exposed to ultrasound in utero. **J Ultrasound Med.** 1991. Feb 10(2), 69-75.
- Nyborg WL. Physical principles of ultrasound. In Fry F, ed. (ed) Ultrasound: Its Application in Medicine and Biology. 1978. Elsevier, New York.
- O'Brien WD Jr. Dose-dependent effect of ultrasound on fetal weight in mice. **J Ultrasound Med.** 1983;2:1-8.
- O'Brien WD, Jr, Shore ML and Fred RK, *et al.* On the assessment of risk of ultrasound. **IEEE Ultrasonics Symp Proc** 1972:486.
- O'Brien WD, Jr. Ultrasound dosimetry and interaction mechanisms. In Greene M, (ed) Non-Ionising Radiation:

Proceedings of the Second International Non-Ionizing Radiation Workshop. 1992. Vancouver, BC: Canadian Radiation Protection Association, Vancouver, pp. 151.

- O'Brien WD, Jr. Ultrasound bioeffect issues related to obstetric sonography and related issues of the output display standard. In Fleischer, A.C, *et al*, eds (ed) *The principles and practice of ultrasonography in obstetrics and gynecology*, 5th ed. 1995. CT: Appleton & Lange, Norwalk, pp. 17.
- Papageorghiou AT, Ohuma EO, Altman DG, Todros T, Cheikh Ismail L, Lambert A, Jaffer YA, Bertino E, Gravett MG, Purwar M *et al.* International standards for fetal growth based on serial ultrasound measurements: the Fetal Growth Longitudinal Study of the INTERGROWTH-21st Project. **Lancet** 2014;384:869-879.
- Pfaffenberger S, Devcic-Kuhar B, Kollmann C, Kastl SP, Kaun C, Speidl WS *et al.* Can a commercial diagnostic ultrasound device accelerate thrombolysis? An in vitro skull model. **Stroke**, 2005, 36, 1, 124-128.
- Piedrafita B, Cauli O, Montoliu C, Felipo V. The function of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in brain in vivo and learning ability decrease in parallel in mature compared with young rats. **Learn Mem.** 2007. 14 (4)254-258.
- Puelles E, Annino A, Tuorto F, Usiello A, Acampora D, Czerny T, Brodski C, Ang SL, Wurst W and Simeone A. Otx2 regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain. **Development** 2004;131:2037-2048.

- RADIUS (Routine Antenatal Diagnostic Imaging with Ultrasound Study Group), Le Ferre ML, Bain RP, Ewigman BG, Frigoletto FD, Crane JP and McNellis D. A randomized trial of prenatal ultrasonographic screening. 1993 **Am J Obstet Gynecol**: 169 (3):483-489.
- Rao S, Ovchinnikov N and McRae A. Gestational stage sensitivity to ultrasound effect on postnatal growth and development of mice. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol** 2006;76:602-608.
- Reichle FM and Conzen PF. Halogenated inhalational anaesthetics. **Best Pract Res Clin Anesthesiol**. 2003;17(1):29-46.
- Rice D and Barone S Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environ Health Perspect**. 2000. 108, Suppl.3. 511-533.
- Riesz P and Kondo T. Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. **Free Radic Biol Med** 1992;13:247-270.
- Salvesen KA, Vatten LJ, Bakketeig LS and Eik-Nes SH. Routine ultrasonography in utero and speech development. **Ultrasound Obstet Gynecol** 1994;4:101
- Salvesen KA, Lees C, Abramowicz J, Brezinka C, Ter Haar G and Marsal K. Safe use of Doppler ultrasound during the 11 to 13 + 6-week scan: is it possible?. **Ultrasound Obstet Gynecol** 2011;37:625-628.
- Salvesen K, Lees C, Abramowicz J, Brezinka C, Ter Haar G, Marsal K and Board of International Society of Ultrasound in

- Obstetrics and Gynecology (ISUOG). ISUOG statement on the safe use of Doppler in the 11 to 13 +6-week fetal ultrasound examination. **Ultrasound Obstet Gynecol** 2011;37:628.
- Sande RK, Matre K, Eide GE and Kiserud T. Ultrasound safety in early pregnancy: reduced energy setting does not compromise obstetric Doppler measurements. **Ultrasound Obstet Gynecol** 2012;39:438-443.
 - Sapareto SA and Dewey WC. Thermal dose determination in cancer therapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1984;10:787-800.
 - Serls AE, Doherty S, Parvatiyar P, Wells JM and Deutsch GH. Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung. **Development** 2005;132:35-47.
 - Schneider F, Gerriets T, Walberer M, Mueller C, Rolke R, Eicke BM, *et al.* Brain edema and intracerebral necrosis caused by transcranial low-frequency 20-kHz ultrasound: a safety study in rats. **Stroke.** 2006;37:1301-1306.
 - Schneider-Kolsky ME, Ayobi Z, Lombardo P, BrownD, Kedang B, Gibbs ME. Ultrasound exposure of the foetal chick brain: effects on learning and memory. **Int J Dev. Neuro Sci.** 2009; 27(7):677-683.
 - Sheiner E, Shoham-Vardi I and Abramowicz JS. What do clinical users know regarding safety of ultrasound during pregnancy?. **J Ultrasound Med** 2007;26:319-25; quiz 326-7.
 - Sherpard T. Human teratogenicity. **Adv Pediatr** 1986;33:225.

- Siddiqi TA, O'Brien WD Jr, Meyer RA, Sullivan JM, Miodovnik M In situ human obstetrical ultrasound exposimetry: estimates of derating factors for each of three different tissue models. **Ultrasound Med.Biol.**, 1995, 21, 3, 379-39.
- Sienkiewicz Z. Rapporteur report: Roundup, discussion and recommendations **Prog.Biophys.Mol.Biol.**,2007, 93, 1-3, 414-420
- Stanton MT, Ettarh R, Arango D, Torna M and Brennan PC. Diagnostic ultrasound induces changes within numbers of cryptal mitotic and apoptotic cells in small intestine. **Life Sci.** 2001;68:1471-1475.
- Stark CR, Orleans M, Haverkamp AD and *et al.* Short and Long-term risks after exposure to diagnostic ultrasound in utero. **Obstet Gynecol** 1984;63:194.
- Starritt HC, Duck FA, Hawkins AJ and Humphrey VF. The development of harmonic distortion in pulsed finite-amplitude ultrasound passing through liver. **Phys Med Biol** 1986;31:1401-1409.
- Stratmeyer ME, Greenleaf JF, Dalecki D and Salvesen KA. Fetal ultrasound: mechanical effects. **J Ultrasound Med** 2008;27:597-605; quiz 606-9.
- Suneetha N, Kumar RP. Ultrasound-induced enhancement of ACh, AChE and GABA in fetal brain tissue of mouse. **Ultrasound Med Biol.** 1993. 19(5):411-413.
- The American institute of Ultrasound in Medicine (AIUM) Bioeffects Committee. Bioeffects Literature Review: Prenatal exposure to ultrasound waves impacts neuronal migration in mice. **J Ultrasound Med** 2009;28:558-561.

- Tarantal AF and Hendrickx AG. Evaluation of the bioeffects of prenatal ultrasound exposure in the cynomolgus macaque (Macaca fascicularis): I. Neonatal/infant observations. Growth and behavior during the first year. **Teratology** 1989a;**39**:137-147.
- Tarantal AF and Hendrickx AG. Evaluation of the bioeffects of prenatal ultrasound exposure in the cynomolgus macaque (Macaca fascicularis): II Growth and behavior during the first year. **Teratology** 1989b;**39**:149-162.
- Tarantal AF, O'Brien WD, Hendrickx AG. Evaluation of the bioeffects on prenatal ultrasound exposure in the cynomolgus macaque (Macaca fascicularis): III Developmental and hematologic studies. **Teratology**. 1993;47:2:159-170.
- Tannuri AC, Tannuri U, Coelho MC, Santos NA, Mello Es. Experimental models of hepatectomy and liver regeneration using newborn and weaning rats. **Clinics (Sao Paulo)** 2007. 62(6):757-762
- Tremblay KD and Zaret KS. Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. **Dev Biol** 2005;280:87-99.
- Verma PK, Humphrey VF and Duck FA. Broadband measurements of the frequency dependence of attenuation coefficient and velocity in amniotic fluid, urine and human serum albumin solutions. **Ultrasound Med Biol** 2005;31:1375-1381.

- Wainwright ML, Zhang H, Byrne JH and Cleary LJ. Localized neuronal outgrowth induced by long-term sensitization training in aplysia. **J Neurosci** 2002;**22**:4132-4141.
- Wu F. High intensity focused ultrasound: a noninvasive therapy for locally advanced pancreatic cancer. **World J Gastroenterol** 2014;**20**:16480-16488.
- Zhang J, Zhou F, Song Y, Ying W, Zhang Y. Long dwell-time exposure of human chorionic villi to transvaginal ultrasound in the first trimester of pregnancy induces activation of caspase-3 and cytochrome C release. **Biol Reprod** 2002;**64**(2):580-3.
- Zaret KS. Molecular genetics of early liver development. **Annu Rev Physiol** 1996;**58**:231-251.
- Ziskin MC and Petitti DB. Epidemiology of human exposure to ultrasound: a critical review. **Ultrasound Med Biol** 1988;**14**:91.
- Zorn A. Liver development. In StemBook. 2008. The Stem Cell Research Community.

IX.- ANEXOS

Abreviaturas empleadas

2D	Dos dimensiones
ACM	Arteria cerebral media
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AIUM	Instituto Americano regulador del uso de los Ultrasonidos en Medicina
ALARA	As Low As Reasonable Achievable: <i>Tan bajo como sea razonablemente posible.</i>
BrdU	5-bromo-2'-deoxidiurina
CIPF	Centro de Investigación Príncipe Felipe
DV	<i>Ductus venoso</i>
f	Frecuencia
FDA	Agencia americana del medicamento
FRP	Frecuencia de repetición de pulsos
ISPPA	Pulso de intensidad media
MI	Índice mecánico
NIH	Instituto nacional de salud americana
ODS	Estándares de emisión de señal
RADIOUS	Routine Antenatal Diagnostic Imaging with Ultrasound Study Group. <i>Grupo de Estudio para el diagnóstico prenatal rutinario mediante imagen con ultrasonidos.</i>
RCIU	Retraso en el crecimiento intrauterino

RM	Resonancia magnética
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SEGO	Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia
SNC	Sistema Nervioso Central
T	Periodo
TAC	Tomografía axial computarizada
TI	Índice térmico
US	Ultrasonido
ZSV	Zona Sub Ventricular
λ	Longitud de onda

En primer lugar quería agradecer a mis tutores, el Dr. Antonio Pellicer y la Dra. Begoña Pellicer por la oportunidad que me han ofrecido con este proyecto. Gracias a ellos he conocido de primera mano el mundo de la investigación, el cual poco a poco me ha ido conquistado y me ha ayudado a crecer profesionalmente.

También me gustaría agradecer la inmensa ayuda de Sonia y el resto de personas que han colaborado conmigo para el desarrollo de este trabajo de tesis, gracias a Omar y Ulises por su asesoramiento y por su apoyo como expertos cuando los resultados se hacían de rogar, a las chicas del departamento del Dr. Felipe por enseñarme a entender el comportamiento de las ratas.

A mis compañeros del departamento de Dr. Simón por acogerme en vuestro laboratorio y hacerme sentir como parte de la “familia” que creo que fuimos.

Y como no agradecer a mi familia, a mis padres por haber creído en mi todos estos años, a mis hermanos por su apoyo y en especial a Javi por ser la persona que más me anima en cada aventura que inicio.

Gracias a todos.