



Facultad de Química
Universidad de la República
Pedeciba Química



Maestría en Química

Lic. Mirel Cabrera

Diseño y evaluación química y biológica de sistemas
nanoestructurados como agentes para centellografía

El presente trabajo para aspirar al grado de Magister en Química de la Universidad de la República y PEDECIBA, fue realizado en el Centro de Investigaciones Nucleares de la Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.

Bajo la dirección de la Doctora Henia Balter (CIN, Fac. Ciencias, Udelar).

Índice

Resumen	1
Abreviaturas.....	3
Introducción.....	6
Cáncer	7
Ilimitado potencial replicativo.....	7
Melanoma	8
Clasificación	9
Ciclo celular en células de melanoma.....	10
Modulación del ciclo celular del melanocito por radiación UV	12
Desregulación del ciclo celular	12
Angiogénesis	14
Vasculatura tumoral	15
Angiogénesis y Melanoma	15
Nanotecnología y nanovehículos.....	16
Generalidades de Liposomas	17
Clasificación de liposomas según unilamellaridad	18
Formación de liposomas	19
Clasificación de liposomas liposomas	22
Liposomas convencionales	22
Liposomas de circulación prolongada (Stealth liposomes).....	22
Liposomas catiónicos	23
Immunoliposomas	23
Immunoliposomas	23
Efecto EPR	24
Comportamiento <i>in vivo</i> de las nanopartículas	25
Radiofármacos	27
Radiofármacos de ^{99m} Tc.....	29
Propiedades del Tecnecio	30

Diagnóstico y Centellografía	31
Ventajas de la centellografía frente a otros métodos no invasivos	34
Objetivo General.....	36
Bibliografía.....	37
Capítulo 1. DTPA-Liposomas y sus análogos estéricamente estabilizados marcados con ^{99m}Tc	43
Introducción.....	45
Obtención de DTPA-Liposomas y sus análogos estéricamente estabilizados marcados con ^{99m}Tc	45
Materiales y métodos.....	48
Preparación de los liposomas.....	48
Caracterización de los liposomas	48
Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	48
Distribución de tamaño	48
Cuantificación de fosfolípidos totales	49
Radiomarcado de DTPA-liposomas, DTPA-PEG-liposomas.....	50
Estudios de Transquelación	50
Modelo Animal	51
Estudios de Biodistribución	51
Estudios de bloqueo del sistema Reticuloendotelial	52
Estudio de metabolización liposomal	52
Centellografía.....	53
Resultados.....	54
Caracterización de los liposomas	54
Marcado de los liposomas.....	55
Estabilidad in vitro	56
Estudios de Biodistribución	57
Bloqueo del sistema retículo endotelial	59
Metabolización	61
Imagen centellográfica.....	62
Discusión	63
Bibliografía.....	66
Capítulo 2. HYNIC-Liposomas y sus análogos estéricamente estabilizados marcados con ^{99m}Tc	69

Introducción.....	70
Desarrollo experimental.....	77
Síntesis Orgánica	77
Generalidades	77
Síntesis de Estearilamida-HYNIC-hidrazona	78
Preparación de los liposomas	80
Marcado de los liposomas con ^{99m}Tc	80
Solución Sn/tricina	80
Estabilidad in vitro	82
Estudios de biodistribución y centellografía	82
Estudio de variación en la biodistribución dependiente de la dosis.....	83
Resultados.....	84
Síntesis de Estearilamida-HYNIC-hidrazona	84
Caracterización de liposomas	90
Relación de Tricina/ SnF2	90
Controles de estabilidad	91
Estudio de estabilidad	92
Estudios de biodistribución.....	93
Estudio de variación de la biodistribución dependiendo de la dosis	94
Estudio de biodistribución en ratones portadores de Melanoma	98
Estudios centellográficos	101
Discusión	103
Bibliografía.....	107
Capítulo 3. DTPA-Arqueosomas marcados con ^{99m}Tc	111
Introducción.....	112
Arqueosomas.....	112
Lípidos de Arqueas	113
Estudios de toxicidad	115
Arqueosomas agente antitumoral?	116
Comportamiento in vitro e in vivo	116
Materiales y métodos.....	117
Síntesis Orgánica	117
Generalidades	117
Síntesis de Estearilamida-DTPA	117
Formación de Arqueosomas	119
Marcación y controles fisicoquímicos	119
Controles de estabilidad in vitro	120
Modelo Animal	120
Estudios de biodistribución.....	120
Estudios centellográficos	121
Resultados.....	122

Síntesis de Estearilamida-DTPA.....	122
Caracterización de los arqueosomas	125
Marcado y estabilidad en solución.....	126
Estabilidad in vitro	127
Estudios de biodistribución.....	127
Estudios centellográficos	129
Discusión	131
Bibliografía.....	133
Discusión y conclusiones	136

RESUMEN

La nanotecnología se ha desarrollado con alto impacto en las últimas décadas y su aplicación en detección precoz y toma de imágenes en la terapia contra el cáncer es un novísimo campo en desarrollo.

Las imágenes centellográficas constituyen una herramienta importante que permite de una manera no invasiva, la visualización y cuantificación de la distribución de las nanopartículas radiomarcadas en el organismo.

Dentro de la gran variedad de nanopartículas en desarrollo en los últimos 20 años, los liposomas han sido investigados como transportadores para un amplio espectro de compuestos, comprendiendo desde agentes quimioterapéuticos, antibióticos, medios de contraste, radionucleidos y agentes quelantes. El estudio y comprensión de cómo estos potenciales transportadores alcanzan y se acumulan en el tumor, su farmacocinética y distribución en los diferentes órganos puede lograrse uniendo un radionucleido a los diferentes clases de liposomas.

Para la elección de dicho radionucleido deben considerarse sus propiedades fisicoquímicas y nucleares. Una alternativa muy atractiva es el ^{99m}Tc , que por ser emisor gamma puro ($E = 140 \text{ keV}$), tener un período de semidesintegración de 6 horas, suficientemente largo para permitir la marcación de moléculas, control, administración y adquisición de imágenes y suficientemente corto para trabajar en buenas condiciones de radioprotección es empleado muy ampliamente en medicina nuclear. Además, por ser obtenido a partir de un sistema generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, libre de portador, permite disponer del mismo con facilidad en el laboratorio. Otro nanovehículo de gran potencial son los Arqueosomas, constituidos por lípidos extraídos de arqueas lo cual le otorga una mayor resistencia estructural en entornos hostiles. Por tanto su aplicación se destaca en la liberación controlada de moléculas de acción como agentes quimioterapéuticos. En esos casos los arqueosomas tienen un rol como adyuvantes, pero en la presente tesis se plantea su novedosa aplicación como transportador de radionucleidos a blancos tumorales y la consiguiente adquisición de imágenes centellográficas de aplicación en diagnóstico.

Los principales objetivos del trabajo fueron el diseño, desarrollo y caracterización fisicoquímica, así como también estudios de estabilidad biológica tanto *in vitro* como *in vivo* de dichos nanovehículos marcados con ^{99m}Tc .

Se desarrolló la caracterización y marcación de distintos nanosistemas lipídicos. Se diseñaron dos clases fundamentales de liposomas, los convencionales y los estéricamente estabilizados también se procedió al desarrollo de arqueosomas, de manera de evaluar de forma química y biológica cual es el mejor vehículo para el diagnóstico a través de centellografía. El modelo tumoral utilizado fue el de melanoma inducido por células B16F1 en ratones C57 black.

Como parte esencial del trabajo fue necesario la síntesis en nuestro laboratorio del derivado de 3-N-Hidroxisuccinimidil carbonil-6-hidrazinopiridina clorhidrato (HYNIC) y de Bis Anhídrido del Ácido dietilentriaminopentacético, cDTPA, dos agentes bifuncionales utilizados en la marcación indirecta de los nanovehículos. Para todos los nanosistemas estudiados y marcados con ^{99m}Tc , se obtuvo alta pureza radioquímica y estabilidad tanto *in vitro* como *in vivo*. Los sistemas liposomales y los arqueosomas desarrollados, demostraron tener captación selectiva por el modelo tumoral utilizado. Constituyendo así, a estos nanovehículos como potenciales candidatos a radiofármacos para la detección de tumor de melanoma a través de imágenes centellográficas.

Abreviaturas

Ácido etilentriaminopentacético (DTPA)

Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

Ácido etilendiaminodiacético (EDDA)

Ácidos grasos polinsaturados (AGPI)

Agentes bifuncionales (BFC)

Arqueosomas (ARQ)

Background (BG)

Buffer fosfato salino (PBS)

Cadherina vascular endotelial (VE-cadherina)

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Células endoteliales (EC)

Células Natural Killer (NK)

Ciclina E correspondiente a G1 (CLNE)

Comité Nacional de Experimentación Animal (CHEA)

Cromatografía en capa fina (CCF)

Diciclohexilurea (DCU)

Diciclohexilcarbodiimida (DCC)

Dimetil sulfóxido (DMSO)

Distearoil fosfatidiletanolamina (DSPE)

Efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR)

Enzima oxido nítrico sintasa (NOS)

Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)

Inmunogen codificante para péptido (TRP-2)

Lipopolisacáridos (LPS)

Melanoma de extensión superficial (MES)

Melanoma nodular (MN)

Melanoma lentigo maligno (LMM)

Melanoma lentiginoso acral (MAL)

Nanopartículas sólidas (SLNs)

N,N-dimetilformamida (DMF)

N-hidroxisuccinimida (NHS)

Polietilenglicol (PEG)

Proteínas que se expresan en forma aberrante en tumores y no en tejidos normales (TAAs)

Péptido expresado en melanoma reconocido por linfocitos T citotóxicos (MART-1)

Porcentaje de dosis inyectada por gramo (%DI/g)

Porcentaje de dosis inyectada (%Act)

Proteínquinasa dependiente de la CLNE: ciclina E correspondiente a G1 (CDPK2)

Pureza radioquímica (PRQ)

Quinasas dependientes de ciclinas (cdk)

Regiones de interés (ROI)

Resonancia Magnética (MRI)

Resonancia magnética nuclear (NMR)

Ruptura de cadena doble (RCD)

Ruptura de cadena simple (RCS)

Sistema retículo endotelial (RES)

Sistema fagocítico mononuclear (MSP)

Tetrametilsilano (TMS)

Tomografía Computarizada (CT)

Tomografía de emisión de positrones (PET)

Tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT)

Trifluorometilcarbonil (TFA)

Trifenil fosfina (TPPTS)

t-butoxicarbonil (Boc)

Vesículas multilamelares grandes (MLV)

Vesículas unilamelares grandes (LUV)

Vesículas unilamelares de tamaño intermedio (IUV)

Vesículas unilamelares pequeñas (SUV)

Universidad Nacional de Quilmes (UNQ)

2-Butanona (MEC)

Maestría en Química

Lic. Mirel Cabrera

Introducción

Director Dra. Henia Balter

Área de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, 2009-2011

Cáncer

El proceso del cáncer se genera cuando mutaciones genéticas se acumulan en células normales de tal forma que comienzan a exhibir un crecimiento descontrolado. El proceso por el cual una célula normal se transforma en una tumoral se le denomina carcinogénesis. Si el tumor tiene la capacidad metastizar del sitio de origen (primario), es considerado como maligno (Kenneth J Pienta, 2009).

A pesar que cada tipo de cáncer exhibe un único conjunto de características de crecimiento y de morfología (fenotipo), los distintos tipos comparten un grupo de características comunes (Hanahad D, Weinberg RA, 2000). Un tumor es el resultado de un gran número de células cancerígenas que se encuentran dividiéndose activamente y adquiriendo mutaciones, permitiendo así la aparición de un grupo de clones exitosos. Este es un proceso altamente ineficiente, por lo que en los tumores se encuentran muchas células que no van a sobrevivir y están bajo el proceso de apoptosis. Este último proceso surge de mutaciones nefastas, carencia de oxígeno (hipoxia) ó de otros nutrientes y de la destrucción por el sistema inmune.

El vasto catalogo de genotipos celulares del cáncer es la manifestación de seis alteraciones en la fisiología que colectivamente dictaminan el crecimiento tumoral: autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad ante señales de inhibición de crecimiento, evasión a la muerte programada (apoptosis), potencial replicativo casi ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión de tejidos y metástasis.

Estos cambios fisiológicos y las capacidades adquiridas durante el desarrollo tumoral, representa la violación al mecanismo de defensa anticancerígeno sustentado por las células y los tejidos.

Ilimitado potencial replicativo

En un tejido normal, una célula puede duplicarse 50 veces antes de que la población se torne senescente y muera. Esto se debe al acortamiento que sucede en los telómeros en cada división celular; las células tumorales reactivan una enzima, la telomerasa, que mantiene la longitud de los telómeros adicionando pares de bases en cada división (Rubin H , 2002.).

Una propiedad fundamental del cáncer es la heterogeneidad de las células tumorales, es decir, células con múltiples características mutadas o fenotipos. Cuando una célula normal se divide hace una replica exacta de su ADN, mientras que cuando una célula cancerígena se divide, el ADN de las células hijas no es una copia exacta, dando como resultados una variedad de mutaciones. Por tanto la emergencia de inestabilidad genética rápidamente selecciona células con las ventajas de sobrevivir más robustas (Reynolds TY, y col., 1996).

En células normales, la inhibición del crecimiento es controlado por factores dependientes de contacto entre células. Si una célula se desconecta de sus vecinas o de la membrana basal en la cual reside, la célula muere por apoptosis. En cambio las células cancerígenas han desarrollado mutaciones que le permiten seguir viviendo independientemente de la unión a una membrana basal o a otras células. En muchos tipos de cáncer se han identificado alteraciones de las proteínas de unión; estas mutaciones le otorgan a las células la libertad de dejar el ambiente tumoral primario y comenzar la fase de metástasis.

Melanoma

El melanoma, quizás por encima de cualquier otro tipo de cáncer, tiene la capacidad de metastizar de forma totalmente impredecible, en un número extraordinario de sitios con una amplia variedad de apariciones.

El melanoma puede metastizar en cualquier órgano o tejido. Las metástasis en la piel, en tejido subcutáneo o en nódulos linfáticos situados más allá de los ganglios linfáticos regionales de la afección primaria son considerados metástasis distantes (Herald J Hoekstra, Heimen Schraffordt Koops). En aproximadamente la mitad de los pacientes, que desarrollan metástasis, el primer sitio de metástasis es la piel, tejido subcutáneo o nódulos linfáticos distales; en un tercio de los pacientes el sitio de diagnóstico de metástasis es en los pulmones, mientras que en el resto de los pacientes los sitios pueden ser: cerebro, hígado, hueso, tracto gastrointestinal, corazón, glándulas adrenales, páncreas y riñones (Balch C.M. y col., 1983). Las metástasis viscerales pueden ser identificadas a través de estudios imagenológicos como ser: Tomografía Computarizada (CT), Resonancia Magnética (MRI), Tomografía de emisión de positrones (PET) y exámenes de ultrasonido.

Sin embargo hay datos limitados a la hora de realizar un pronóstico de sobrevida en pacientes con metástasis sistémicas, el estudio del número de sitios metastásicos y su localización (visceral vs no visceral) presenta una correlación con la tasa de sobrevida. El pronóstico para pacientes con melanoma diseminado tiene una media de sobrevida entre 7 a 11 meses y se estima una tasa de sobre vida a 5 años de sólo 6%. El número de órganos o tejidos con metástasis es el factor más significativo a la hora de predecir la sobrevida en pacientes con metástasis sistémicas. Otro factor importante de pronóstico a tener en cuenta es la tasa de crecimiento del tumor. Los tumores de melanoma pueden tener la capacidad de sufrir una regresión espontáneamente, pero la incidencia de regresión espontánea es menor al 1 % (Barth A. y col., 1995).

Clasificación

El melanoma puede clasificarse de acuerdo a varios patrones de crecimiento principales, que se definen de acuerdo con sus características macroscópicas, y se correlacionan con su tiempo de evolución (Matsui W, 2006).

- Melanoma de extensión superficial (MES): es el tipo más común. Generalmente es plano y de forma y color irregular, con sombras variables de negro y café. Puede ocurrir a cualquier edad y en cualquier parte del cuerpo y es más común en las personas de raza blanca. Melanoma nodular (MN): generalmente empieza con un área elevada de color azul-negro oscuro o rojo-azulado, aunque algunos no tienen color.
- Melanoma lentigo maligno (LMM): generalmente aparece en las personas de edad avanzada. Ocurre más comúnmente en la piel dañada por el sol en la cara, cuello y los brazos. Las áreas de piel anormal generalmente son grandes, planas y de color bronceado con manchas café entremezcladas.
- Melanoma lentiginoso acral (MAL): es la forma menos frecuente de melanoma. Generalmente ocurre en la palma de las manos, las plantas de los pies o por debajo de las uñas y es más común en las personas de raza negra.
- Melanoma de la mucosa: Las localizaciones más frecuentes son las superficies mucosas de la cabeza y el cuello (cavidades nasal y oral) y la mucosa vulvar o anorectal.

- Melanoma Desmoplásico-Neurotrópico: es un subtipo raro, agresivo en forma local y asociado a una elevada tasa de recurrencias locales. Se desarrolla con mayor frecuencia en la piel de la cabeza y el cuello expuesta al sol de individuos de edad avanzada, por lo general durante la sexta y séptima década de vida.

El melanoma metastásico con primario desconocido se define por la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales o a distancias confirmadas en forma histológica en un individuo sin antecedentes ni evidencias de melanoma cutáneo, mucoso y ocular primario. Esta situación se presenta en alrededor de 2 a 8% de todos los casos de melanoma (Langley RGB y col., 2005).

Ciclo celular en células de melanoma

El ciclo celular consta de cuatro fases, una fase de duplicación del ADN (fase S), una fase de división mitótica (fase M) y dos fases más llamadas G1 y G2 previas a las etapas mencionadas anteriormente respectivamente. La progresión del ciclo celular esta asociado con la expresión y activación secuencial de complejos formados por ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (cdk).

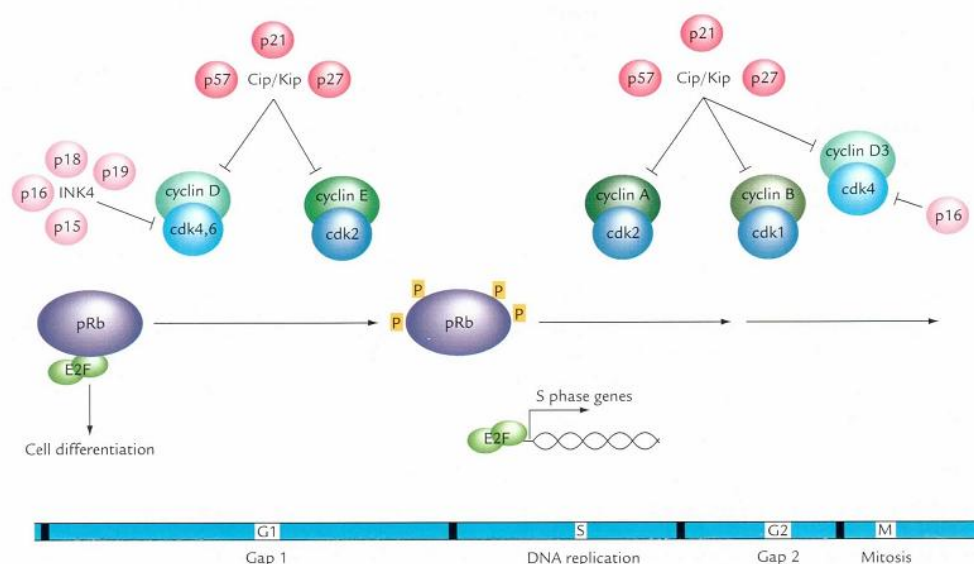


Figura 1. Regulación del ciclo celular de una célula eucariota. En la fase tardía de G1, la ciclina D / cdk 4,6 y el complejo de ciclina E/cdk2 fosforilan el complejo pRB. (Helen R. y col., 2004)

Claramente la alteración de ésta cascada de señales bioquímicas perturbará la regulación del ciclo celular, con la tendencia de llevar a las células a una división descontrolada.

En células normales los inhibidores de Cip/Kip están agrupados en complejos que contienen una ciclina y una molécula cdk. El nivel de inactivación de ciclina/cdk está determinado por la fracción de quinasas que se encuentren formando un complejo con el inhibidor de cdk (Hengst L y col., 1998). La expresión de Cip/kip pueden retrasar el ciclo celular en la fase G1 y G2 permitiendo así la reparación del daño en el ADN antes de su replicación (fase S) o antes de la división celular (fase M). Por otra parte p53 (supresor tumoral) es rápidamente activado en respuesta a señales de estrés y puede inducir retrasos en las fases G1 y G2 o en el caso de ser un daño irreparable conducirá a la célula a la muerte por apoptosis. El mecanismo por el cual p53 induce la apoptosis es activando genes como bax e inhibiendo genes de supervivencia como bcl-2 (Miyashita T and Reed JC, 1995). El nivel relativo de bcl-2 y bax en un melanocito bajo estímulos determinará su destino: si se acumulan heterodímeros de bax/bcl-2 suprimirá la apoptosis, mientras la acumulación de homodímeros de bax promoverá su muerte. (Miyashita T y col., 1994). En más detalle el mecanismo del retraso de G1 a S sería el que se expone a continuación. Al producirse un daño en el ADN (ruptura de doble [RCD] o simple cadena [RCS]), actúan complejos sensores (en el caso de una ruptura doble sería MNR y de cadena simple el complejo 9-1-1 ó RAD 17) los cuales inmediatamente interactúan con los transductores de las señales ATM y ATR (fosfoinositol-3-quinasas) los cuales responden a RCD y RCS, errores en la replicación y RCS respectivamente. Estos transductores fosforilan a CHK1 y CHK2 los cuales a su vez fosforilan a p53 (proteína tetramérica de unión al ADN), éste último estimula la transcripción del gen WAF/CIP1: p21; p21 es el efector que produce la inhibición de la transición a la fase S. Dicha inhibición se da a nivel del complejo CDPK2-CLNE (CDPK2: proteinquinasa dependiente de la CLNE: ciclina E correspondiente a G1) el que por fosforilaciones reguladas determina la activación que lleva a la fase S. La proteína p21 también inhibe al factor PCNA (antígeno nuclear de células proliferantes) involucrado en la síntesis de ADN. De ésta manera se produce el retardo de G1 a S permitiendo la reparación de la lesión y en caso de no lograrlo se produce la muerte

celular mediada por apoptosis. Si se origina un error en el mencionado mecanismo se producen mutaciones genéticas y aberraciones cromosómicas conllevando a la inestabilidad genómica y oncogénesis

Modulación del ciclo celular del melanocito por radiación UV

La radiación UV estimula la división de los melanocitos y promueve la producción de pigmentos fotoprotectores (melanina). Luego que la exposición a la radiación cesa, el número de melanocitos y la síntesis de melanina retorna a su nivel normal (Bacharach – Buhles M. y col., 1999). La estimulación de la síntesis de melanina luego de la exposición a radiación UV implica el sistema receptor de la hormona estimulante de α -melanocitos y el factor de transcripción p53. La radiación UV activa la síntesis y la liberación de α -MSH y otros factores paracrinos por la epidermis humana (Imokawa G y col., 1992). Estos factores actúan vía el receptor de melanocortina-1, en los melanocitos, activan la vía de cAMP. La activación de la vía inicia una serie de eventos que culmina en un aumento de la síntesis de melanina. Además de la acumulación de melanina, los melanocitos en cultivo responden a la radiación UV con una disminución dependiente de la dosis en la progresión del ciclo celular y la supervivencia celular. La apoptosis inducida por radiación UV en los melanocitos implica la acumulación de p53 y la reducción de los niveles del promotor de supervivencia bcl-2. La disminución del ciclo celular es debida a los retrasos transitorios en la fase G1, lo cual conlleva una reducción del porcentaje de células que replican su ADN (Barker D. y col., 1999).

Desregulación del ciclo celular

Las mutaciones genéticas que afectan el ciclo juegan un importante rol en el desarrollo del cáncer dado que todos los tipos de cáncer tienen alguna forma de desregulación del ciclo celular. Un lugar donde la pérdida de control del ciclo es bastante frecuente es en punto de restricción. Este es punto clave del checkpoint en la fase G1 tardía (detallada anteriormente en el ítem de regulación del ciclo celular), donde el cometido es replicar el ADN previo a la división celular. Los errores en esta parada de chequeo tienen

importantes consecuencias, primero, la pérdida de control en este punto conlleva una replicación con células anormales; segundo, este checkpoint también es el nexo de dos vías que son importantes en la generación del cáncer. La vía de pRB que lleva este nombre por la proteína de supresión tumoral (tumor supresor protein). La segunda vía es la c-Myc por el proto oncogen c-Myc. Tomando la información colectivamente se evidencia que el programa de apoptosis celular puede ser disparado por la sobreexpresión de un oncogen; de hecho la eliminación de células portadoras de oncogenes por apoptosis representa el principal mecanismo por el cual las células mutadas son eliminadas del organismo.

La resistencia a la apoptosis puede ser adquirida por las células tumorales por una variedad de estrategias, la más común es la pérdida de regulador proapoptótico por medio de mutaciones que involucran el supresor génico p53, considerada como la molécula de año por la revista Science en el año 1993 (Levine A.J., 1997).

En resumen, el cáncer se podría explicar por acumulación de mutaciones en los siguientes tipos de genes: protooncogenes, implicados en la proliferación celular, y antioncogenes o supresores tumorales que frenan la progresión del ciclo. Los genes de reparación del ADN actúan en forma coordinada con los supresores tumorales (Nunes E. y Gelòs U., 2006), durante los períodos de freno del ciclo y además durante las distintas fases; por otra parte, sus mutaciones pueden aumentar la probabilidad de transformación maligna.

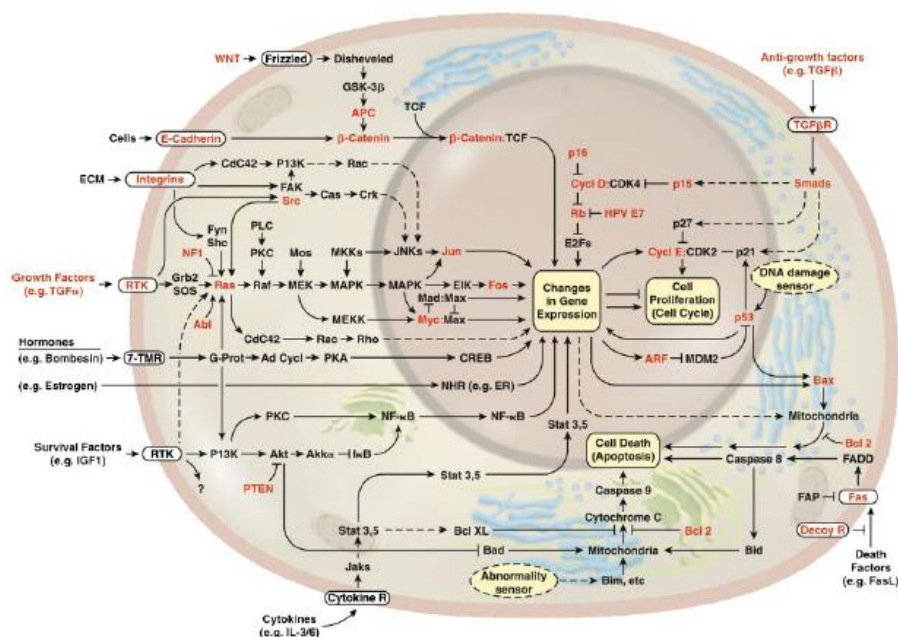


Figura 2 .Mapa de genes implicados en la generación del cáncer. Algunos de los genes conocidos por ser funcionalmente alterados se destacan en rojo. (Hanahad D y Weinberg RA, 2000)

Angiogénesis

La capacidad para inducir y mantener la angiogénesis parece ser adquirido en un paso discreto (o pasos) durante el desarrollo tumoral al activar el switch angiogénico. Los tumores activan este switch angiogénico cambiando el balance entre los inductores y sus respectivos inhibidores (Hanahan y Folkman, 1996); una estrategia común para cambiar el balance es alterar la transcripción de genes. Muchos tumores evidencian una alta expresión de VEGF y/o FGFs comparado al correspondiente tejido normal.

En condiciones de neoplasia la hipoxia es un fuerte estímulo para la activación de la angiogénesis a través de factores de transcripción (HIF's). Estos inducen la expresión de varios marcadores pro angiogénicos, que incluyen: el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), la enzima oxido nítrico sintasa (NOS) y otros. La angiogénesis depende principalmente de la propia activación, proliferación, adhesión, migración y maduración de las células endoteliales (EC) (Semenza G.L, 1998).

La vasodilatación que involucra el NO y la permeabilidad vascular permite la extravasación de proteínas plasmáticas que forman una matriz que permita la migración de las EC. La permeabilidad es mediada por la formación de fenestraciones y de la

redistribución de las moléculas de adhesión (PECAM-1) y de la cadherina vascular endotelial (VE-cadherina).

Vasculatura tumoral

En los tejidos normales, la sangre sistemáticamente fluye de arterias, a arteriolas, a capilares, a vénulas y a finalmente a venas. A pesar que la vasculatura tumoral se origina de estos vasos y que los mecanismos de angiogénesis son similares, su organización es completamente diferente dependiendo del tipo tumoral, su localización y donde se encuentra creciendo o remplazando (Baish J.W. y Jain R.K., 2000). Por lo general, los vasos de los tumores son dilatados, tortuosos y caóticos en su patrón e interconexiones (Jain R.K., 1988). Una molécula puede alcanzar la extravasación por difusión, convección y presumiblemente por transitis. La permeabilidad de una molécula depende del tamaño, forma, carga y flexibilidad de la molécula así como también de las características y del mecanismo de la vía que lo transporte. En los tejidos normales estas vías de transporte incluyen, difusión a través de las células endoteliales (moléculas lipofílicas), uniones interendoteliales (<7 nm), fenestraciones instantáneas (<10 nm) y canales transendoteliales (incluyendo vesículas) (Jain R.K., 1987). Tanto la permeabilidad vascular a solutos y la permeabilidad al agua (referido a la conductividad hidráulica) de los tumores, en general, es significativamente superior que la de los tejidos normales (Endo M. y col., 1999).

Angiogénesis y Melanoma

La progresión del tumor de melanoma es un proceso que consta de varios pasos, que involucra: proliferación, neovascularización, linfangiogénesis, invasión, circulación, embolismo y extravasación. La adquisición de irrigación vascular durante este proceso ocurre a medida que aumenta la proporción de células tumorales que expresan el receptor de lamininas, que les permite su adhesión a la pared de la vasculatura. Con ello se potencia la extravasación de las células tumorales y en consecuencia la metástasis. La diseminación metastásica es inducida por la actividad proteolítica y migratoria, la expresión de moléculas de adhesión, así como también la deposición de matriz

extracelular por el estroma y las células tumorales. Para el crecimiento y generación de metástasis del melanoma cutáneo es sumamente importante la presencia de moléculas de adhesión como las cadherinas, integrinas y la familia de inmunoglobulinas. Por tanto una correlación positiva ha sido descripta entre la expresión endotelial de la molécula de adhesión celular 1 y la agresividad del tumor en el melanoma cutáneo, mientras la integrina $\alpha\beta 3$ se asocia con un aumento del crecimiento tumoral *in vitro* y podría promover la invasión tumoral.

Nanotecnología y nanovehículos

La nanotecnología es por definición el estudio, síntesis y manipulación de materiales y sistemas funcionales a través del control de la materia a escala nano. Tiene como objetivo la fabricación de materiales tecnológicos a esa escala.

Definiciones formales de dispositivos nanotecnológicos normalmente son dictaminadas en función de los requisitos que el mismo dispositivo o su componentes esenciales deben cumplir: ser hechos por el hombre, y con un rango 1-100 nm en al menos una dimensión.

Las técnicas de nanofabricación pueden dividirse en dos clases: La aproximación „bottom-up“ tiene el enfoque opuesto respecto de la „top down“. En esta aproximación se parte de átomos y/o moléculas que se re arreglan y ensamblan en estructuras mayores nanométricas. Es extensamente utilizada y permite la creación de diversos tipos de materiales. Requiere un buen entendimiento de las fuerzas de atracción entre dichos átomos y moléculas las cuales son las que realmente “hacen el trabajo” de nanofabricación.

Algunos aspectos a tener en cuenta acerca de los métodos sintéticos de generación de nanopartículas:

- Deben ser reproducibles
- En lo ideal se deberían obtener partículas monodispersas
- En lo ideal se debería poder controlar la forma de las partículas
- Costos que implica
- Sencillez del proceso

Los procesos químicos de síntesis han demostrado ser muy efectivos (incluso, en muchos casos, por sobre los métodos físicos) pudiéndose lograr un buen control del producto lográndose diferentes tamaños, morfologías y funcionalizaciones.

En relación con el cáncer ejemplos de nano-tecnologías incluyen nanovehículos inyectables (Nanovectores) como liposomas para el tratamiento del cáncer mama (Park J.W., 2002); biológicamente dirigidas, agentes de contraste de dimensiones nanométricas para resonancia magnética (MRI), agentes de contraste para imágenes intraoperatorias en el contexto de la neuro-oncológica (Kircher M.F. y col., 2003) y lo novedoso: métodos basados en nanopartículas de alta especificidad para la detección de ADN y proteínas (Nam J. M. y Mirkin, 2004).

Hay determinados parámetros que son importantes para el desarrollo y la fabricación de la administración dirigida de medicamentos vía nanovehículos (Gu F. y col., 2008). Estos incluyen (a) la utilización de materiales biocompatibles con procesos simples y robustos para el montaje del biomaterial, la química de conjugación, y los pasos de purificación, (b) la capacidad para optimizar de forma paralela la gran cantidad de parámetros biofísicoquímicos, importantes para las propiedades farmacocinéticas y la posible captación celular de los vehículos transportadores de fármacos, y (c) el desarrollo de operaciones escalables capaces de la fabricación de grandes cantidades de sistemas de entrega de fármacos necesarios para ser llevados a la clínica. Se ha demostrado que en el desarrollo de entrega de fármacos, los vehículos de auto-ensamblaje de biomateriales prefuncionalizados simplifica la optimización y la posibilidad de fabricación de estos sistemas (Omid C. Farokhzad and Robert Lange, 2009).

Generalidades de Liposomas

Los liposomas primeramente se desarrollaron hace alrededor de 40 años (Kingsley J.D. y col., 2006 ; Ostro M.J., 1983.). Son pequeñas vesículas artificiales (50 – 100nm) que se desarrollaron a partir de fosfolípidos como fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, que han sido utilizados en biología, bioquímica, medicina, alimentos y cosméticos (Moussaoui N. y col., 2002). Las características de los liposomas están determinadas por la elección de los lípidos, su composición, método

de preparación, el tamaño y la carga superficial. Se han utilizado los liposomas como transportadores de droga debido a su habilidad para evitar su degradación, reducir los efectos secundarios y la habilidad de vehiculizarlas hacia el sitio de acción. Sin embargo, las limitaciones de los liposomas incluyen: baja eficiencia de encapsulación, liberación rápida de drogas solubles en agua en presencia de componentes sanguíneos y pobre estabilidad de almacenamiento.

Sin embargo, la modificación de la superficie puede conferir estabilidad e integridad de estructura en duras condiciones ambientales luego de una administración oral o parenteral (Sihorkar V. y Vyas S.P., 2001). La modificación de la superficie puede ser logrado mediante la fijación de polímeros tales como Poli (ácido metacrílico-co-stearil de metacrilato), polietilenglicol de modo de mejorar el tiempo de circulación de liposomas en la sangre; y por conjugación de anticuerpos o ligandos tales como lectinas para la entrega de drogas específicas al sitio blanco (Bakowsky H., 2008).

Algunas aplicaciones de liposomas incluyen: entrega transdérmica de drogas para mejorar la permeabilidad de fármacos con alto peso molecular y pobre solubilidad en agua; transporte a los pulmones por nebulización, en oncología y en el tratamiento de infecciones parasitarias. Sin embargo, los lípidos de las nanopartículas sólidas (SLNs) proporcionan una efectiva alternativa debido a su estabilidad, facilidad de escalabilidad y comerciabilidad.

Ejemplos de otras estructuras vesiculares son: transferrosomas, niosomas y marinosomas que se utilizan principalmente para entrega transdérmica (Barry B.W., 2001). Los transferrosomas son desarrollados por la incorporación de agentes tensoactivos y moléculas (activadores de borde) tales como clorato sodio en liposomas. Los niosomas son vesículas que se desarrollaron a partir de tensoactivos no iónicos y los marinosomas son liposomas producidos a partir de extracto de lípidos marinos que contienen una alta proporción de ácidos grasos (poliinsaturados) (AGPI).

Clasificación de liposomas según unilamellaridad

De acuerdo a su tamaño y lamellaridad, los liposomas se clasifican en:

- Vesículas multilamelares grandes (MLV), con un diámetro entre 500 nm y varios micrones; con varias lamelas internas.
- Vesículas unilamelares grandes (LUV), con diámetros entre 100 y 400 nm.

- Vesículas unilamelares de tamaño intermedio (IUV), con diámetros del orden de los 100 nm.
- Vesículas unilamelares pequeñas (SUV), que poseen el mínimo tamaño vesicular posible, se refiere a tamaños menores a 50 nm teniendo una sola bicapa de lípido. Comprende un único compartimiento acuoso encerrado por una única bicapa pudiendo presentar diámetros entre 12 nm y 25 nm

Formación de liposomas

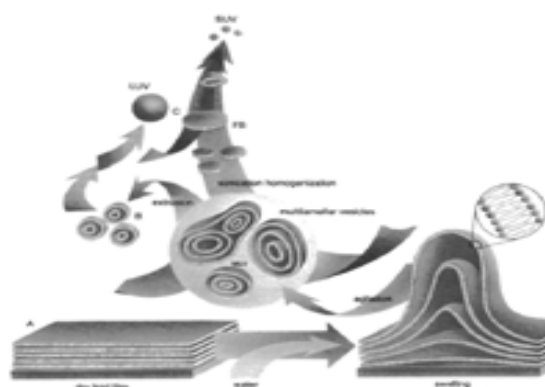


Figura 3. Hidratación de un film lipídico, formación de liposomas (www.avantilipids.com).

Los liposomas se pueden obtener aplicando distintas metodologías, que conducen a la formación de vesículas con características diferentes en función del procedimiento aplicado (tamaño y distribución de tamaños, lamellaridad, eficacia de asociación, etc), lo que sugiere que diversos mecanismos pueden estar implicados en este proceso de formación (tabla 1). El componente mayoritario de estas estructuras son lípidos (en particular fosfolípidos) que, cuando se encuentran en un medio acuoso a una temperatura próxima a su temperatura de transición de fase, tienen la capacidad de formar estas estructuras vesiculares cerradas, incluso de manera espontánea. Si la situación de partida es un film lipídico que se hidrata con una solución acuosa mediante agitación mecánica, entonces se obtienen vesículas multilaminares de tamaño relativamente grande y heterogéneo, siendo éste además de el primer procedimiento de fabricación propuesto, también el más sencillo y el más popular.

Partiendo de estas vesículas multilaminares y aplicando ultrasonidos, se pueden obtener liposomas unilaminares de tamaño pequeño, tal y como propusieron por primera vez en 1962 Saunders y col. (Saunders L. y col., 1962).

Para controlar el diámetro de vesícula, la lamellaridad y también la homogeneidad del tamaño de los MLV obtenidos por hidratación de una película de fosfolípidos, es posible aplicar un procedimiento de extrusión a la suspensión heterogénea de vesículas MLV, que consiste en hacerlas pasar a través de filtros de membrana de policarbonato con un tamaño de poro determinado. El número de veces que se repita esta operación, así como el diámetro de poro utilizado para llevarla a cabo, determina la lamellaridad y la dispersión de tamaños de la suspensión final de liposomas (Simard P. y col., 2007).

La formación de la película de lípidos que representa la primera etapa de la preparación -liposomas MLV- en todos los casos anteriormente citados, requiere el uso de importantes cantidades de disolventes orgánicos que plantean importantes problemas de toxicidad ya que pueden comprometer la seguridad del producto final obtenido, además de suponer un inconveniente serio para la obtención de liposomas a nivel industrial, dado el impacto medioambiental que supone el empleo de disolventes. Como consecuencia, se han propuesto procedimientos alternativos que requieren el uso de disolventes menos tóxicos, como el etanol, con los que la formación de los liposomas se produce por la inyección de una solución etanólica de lípidos en un medio acuoso de volumen considerablemente mayor. De esta manera los liposomas se forman espontáneamente, pudiendo controlarse mínimamente sus características (tamaño, lamellaridad, etc) a través de la relación de volúmenes de etanol/agua, la velocidad de inyección o la concentración inicial de lípidos utilizada. El etanol utilizado se puede eliminar fácilmente, por ejemplo por diálisis, si bien lo que limita en la práctica la utilización de este procedimiento es la posible inactivación de muchas biomoléculas en presencia del etanol.

Tabla 1. Abreviatura Nombre completo/método de preparación

REV	Vesículas uni u oligolamelares obtenidas por evaporación en fase reversa
MLV-REV	Vesículas multilamelares obtenidas por evaporación en fase reversa
SPLV	Vesículas estables plurilamelares
FATMLV	Vesículas multilamelares obtenidas por ciclos repetidos de congelación/descongelación
VET	Vesículas obtenidas por extrusión
LUVET	Vesículas unilamelares grandes obtenidas por extrusión
DRV	Vesículas obtenidas por deshidratación/rehidratación

Al final de la década de los 70, Szoka y Papahadjopoulos desarrollaron un procedimiento de preparación de liposomas al que denominaron de evaporación en fase reversa, mediante el cual se pueden obtener vesículas con un espacio central acuoso mucho más voluminoso (Szoka F. y Papahadjopoulos D., 1980). En todo este proceso las monocapas lipídicas que constituyen las micelas se sitúan lo suficientemente cerca unas de otras, como para dar lugar a las bicapas lipídicas que constituyen la pared de los liposomas. Las vesículas formadas de esta manera son de tipo uni u oligolaminar, con un tamaño medio entorno a 500 nm aunque bastante heterogéneo. La fuerza iónica de la solución acuosa determina la capacidad de encapsulación que van a tener las vesículas, la cual puede oscilar entre en 20 y el 65% (a menor fuerza iónica mayor eficacia de encapsulación). Posteriormente, el mismo Szoka (Szoka F. y col., 1980), propuso la extrusión secuencial de los liposomas obtenidos en fase reversa, como alternativa para reducir tanto el tamaño como la polidispersión, si bien la eficacia de encapsulación disminuye en relación a las vesículas sin extruir. Vesículas de tipo unilaminar pequeño se pueden obtener a partir de MLV por una técnica de microfluidificación, la cual consiste en producir colisiones entre los liposomas al hacerlos pasar rápidamente a presión, a través de filtros de membrana de 5 μm de diámetro. Este proceso se repite una serie de veces, de manera que se estima que después de 10 ciclos se pueden obtener SUV de tamaño inferior a 100 nm (Talsma H. y col., 1989).

Clasificación de liposomas

Además de la clasificación habitual de los liposomas atendiendo a sus características fisicoquímicas o al proceso por el que han sido elaborados es posible realizar otra clasificación teniendo en cuenta más bien al comportamiento que previsiblemente tendrán los liposomas como consecuencia de las modificaciones que, con diferentes fines, se hayan podido introducir en su estructura. Desde este punto de vista, se podrían distinguir los siguientes tipos de liposomas:

- Liposomas convencionales.
- Liposomas de circulación prolongada o stealth liposomas.
- Liposomas catiónicos.
- Inmunoliposomas.

Liposomas convencionales

Son los liposomas clásicos de superficie hidrofóbica, constituidos por ejemplo por fosfatidilcolina y colesterol que, tras su administración i.v., son rápidamente recubiertos por las proteínas plasmáticas y a continuación eliminados de la circulación, tras ser fagocitados por células del sistema retículo endotelial (RES) (Storm G. y Crommelin D.J.A., 1998)

Liposomas de circulación prolongada (Stealth liposomes)

La presencia de polietilenglicol (PEG) en la superficie de los liposomas incrementa su hidrofilia, dando lugar a una reducción en la interacción con proteínas plasmáticas y lipoproteínas (Senior J. y col., 1991).

Esta modificación de los liposomas a la cual, teniendo en cuenta el material utilizado se ha dado en llamar pegilación, sirve para obtener dos funciones muy importantes: la primera, un incremento en la biodisponibilidad de los fármacos encapsulados, y la segunda, que el proceso de liberación sea más lento y que se minimice la toxicidad y los

efectos secundarios (Immordino M.L. y col., 2006). Además del PEG, otros polímeros como la poliacrilamida, el alcohol polivinílico o la polivinilpirrolidona, han sido utilizados para lograr los mismos objetivos (Torchilin V.P. y col., 1995).

Es especialmente destacable del comportamiento de estos liposomas pegilados su capacidad para experimentar un proceso de extravasación en determinados lugares en los que se produce un incremento en la permeabilidad de la pared de los vasos sanguíneos, como puede ocurrir por ejemplo en zonas en las que hay un proceso infeccioso o una inflamación.

Liposomas catiónicos

Su principal aplicación es la vehiculización de material genético (Lasic D.D. y Templeton N.S., 1996). Los lípidos catiónicos constitutivos de estos liposomas neutralizan la carga negativa del ADN, formando así una estructura compacta aunque diferente de la estructura vesicular típica de los liposomas. Estos complejos resultantes de la interacción entre el ADN y los lípidos catiónicos proporcionan una protección al material genético y promueven la internalización y la expresión del plásmido en el interior celular (Storm G. y Crommelin D.J.A., 1998).

Inmunoliposomas

Estos liposomas tienen la capacidad de dirigirse específicamente y reconocer algunas células y órganos del cuerpo, gracias a la presencia de determinados elementos introducidos en el diseño de su estructura, como pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, unidos a la superficie de los liposomas (Torchilin V.P., 2006). La elección del antígeno diana, la función del anticuerpo y el tipo de linker utilizado para lograr su unión a la superficie (por ej. PEG), son factores que requieren un análisis exhaustivo en el diseño de este tipo de liposomas (Schnyder A. y col., 2004).

Efecto EPR

Los productos nanotecnológicos terapéuticos aprobados en la actualidad para el tratamiento del cáncer, funcionan mediante la acumulación en el tejido tumoral a través de una mayor permeabilidad y retención (efecto EPR) (Matsumura Y. y Maeda H., 1986) y la liberación de su carga en el tejido extravascular tumoral. Mientras que estos sistemas de entrega de droga no dirigidos a una diana celular han sido clínicamente eficaces, ha habido datos contradictorios sobre el beneficio adicional de la inclusión de moléculas que dirijan específicamente a estos sistemas. (Pun S.H. y col., 2004) (Hussain S. y col., 2007). La acumulación en el tejido tumoral es un proceso pasivo que requiere una vida media de circulación larga para facilitar la extravasación del nanovehículo a través de la microvasculatura aberrante del tumor y la acumulación de los fármacos en el tejido tumoral (Jain R.K., 2001). Este proceso es en gran medida mediado por las propiedades biofísicoquímicas de las nanopartículas y no por reconocimiento específico. Por lo tanto, incluso en la ausencia de ligandos que los dirijan, los sistemas de transporte de fármacos pueden ser diseñados para dirigirse mejor a un tejido en particular, o inespecíficamente ser capturados por las células, mediante la optimización de sus propiedades físicoquímicas (Verma A. y col., 2008) (Gratton S.E. y col., 2008). Sin embargo, una vez que las partículas extravasan al tejido tumoral, su retención y captura específica por las células cancerosas se ve facilitada por *targeting* activo y endocitosis mediada por receptor (Kirpotin D.B. y col., 2006). Este proceso puede traducirse en mayor concentración intracelular del fármaco y un aumento de la citotoxicidad celular. Mientras que hay una modesta mejora relativa, de la acumulación en el tejido tumoral de los sistemas de administración de fármacos dirigido en relación con la administración de sistemas de fármacos no dirigidos (Pirollo K.F. y col., 2008), la diferencia en la citotoxicidad celular es más pronunciada (Gu F. y col., 2008) (Farokhzad O. C. y col., 2006).

En el caso de la inmunología, el *targeting* tisular, a través de sistemas de transporte de fármacos (vacunas), donde las partículas son transportadas a través de los vasos linfáticos a los ganglios linfáticos; se ha demostrado que el tamaño es importante para la eficiente presentación de antígenos a las células en los nodos linfáticos (Reddy S.T. y col., 2007).

La captación selectiva de las nanopartículas en el tumor puede ser simplemente alcanzada por el bien conocido efecto EPR. Los tumores tienden a tener una vasculatura permeable y un sistema linfático funcionalmente pobre. Las nanopartículas con tamaños de 10 a 100 nm logran escapar de la eliminación por filtración renal y acumularse en los tumores luego de una prolongada circulación sanguínea.

Los niveles de acumulación dependen de factores tales como el tamaño de las nanopartículas, del tamaño del poro de la fenestración de la vasculatura, el tiempo de vida medio sanguíneo (a mayor tiempo, mayor acumulación), el grado de vascularización del tumor (hay menor acumulación en tumores pobremente irrigados), el grado de angiogénesis (hay una pobre acumulación en tumores pequeños preangiogénicos o en grandes tumores necróticos, estas últimas características dependen en gran medida del tipo tumoral

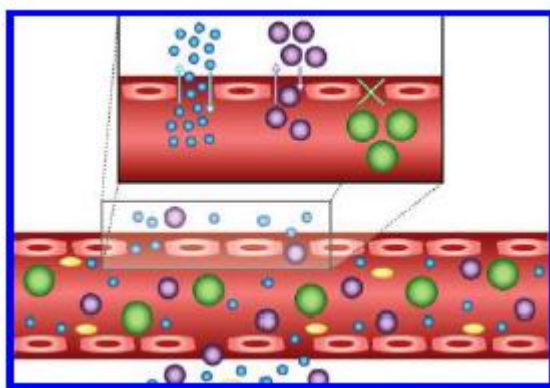


Figura 4. Efecto del tamaño y forma de las nanopartículas sobre el transporte de fármacos. El tamaño afecta su movimiento hacia y desde la vasculatura al tejido, mientras que la forma está implicada en la marginaión de la nanopartícula a la pared endotelial (Omid C. Farokhzad y Robert Langer , 2009)

Comportamiento *in vivo* de las nanopartículas

Luego de la introducción al torrente sanguíneo vía administración intravenosa, las partículas viajan a los órganos y tejidos periféricos del organismo a través de los vasos sanguíneos. Dado que el tamaño de poro medio efectivo en el endotelio normal es de 5 nm, las nanopartículas con un radio hidrodinámico menor a este rápidamente extravasan

el endotelio resultando en un tiempo de circulación sanguíneo corto (Longmire M.L. y col., 2008). La vía de eliminación es dependiente del tamaño de la nanopartícula. La filtración glomerular en el riñón tiene un cutoff de 6 nm. Las nanopartículas que presentan clearance renal van a tener una vida media plasmática corta (Choi H.S y col., 2007). Las partículas más grandes comúnmente son eliminadas por la vía hepática, donde las células de Kupffer (macrófagos localizados en el hígado) y los hepatocitos capturan las partículas foráneas y las procesan rompiéndolas o atrapándolas en las células de Kupffer, ó eliminándolas por excreción biliar por los hepatocitos.

Además de la dependencia de tamaño, los grupos superficiales de la nanopartícula también son críticos. Dependiendo de las propiedades superficiales como carga y hidrofobicidad, pueden ser adsorbidos u opsonizados por las proteínas del suero, lo que resulta en un aumento del tamaño de la partícula (Moghimi S.M. y col., 2001). Las nanopartículas altamente cargadas (ya sea positiva o negativamente) son capturadas por los macrófagos en el sistema reticuloendotelial (RES). De manera de minimizar las interacciones no específicas y aumentar la captación tumoral un método muy usado es unir a la superficie de la nanopartícula polietilenglicol (PEG), el cual provee estabilización estérica y neutralización de carga.

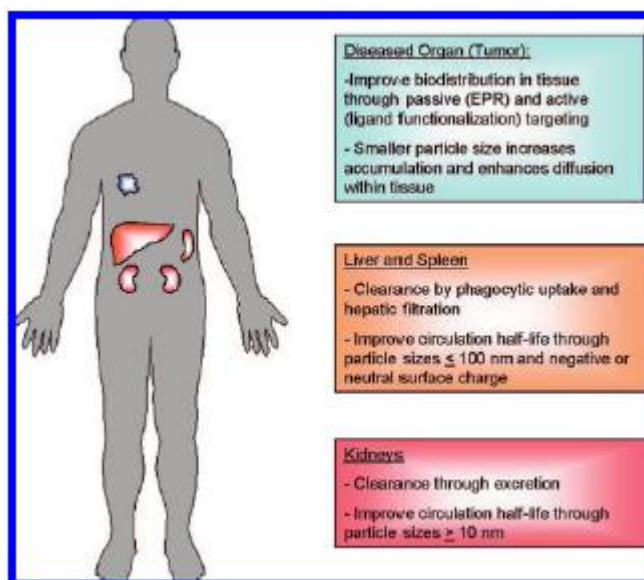


Figura 5. Biodistribución y clearance de nanopartículas. Los principales factores que afectan la biodistribución y clearance son: targeting, tamaño y circulación prolongada (stealth) (Frank Alexis y col., 2008).

Radiofármacos

Un radiofármaco es una sustancia química definida, que contiene átomos radiactivos en su estructura, y que por su forma farmacéutica y tipo de radiación, es aptos para ser administrado en seres humanos con fines de diagnóstico o terapia (<http://www.cancer.gov/diccionario>).

Los radiofármacos molecularmente específicos pueden generalmente constar de cuatro partes bien diferenciadas: la molécula que forma un complejo con el radionucleido (agente quelante), un espaciador o linker (puede incluirse en la composición o no), la molécula a la que se le une el agente quelante y que condiciona la ruta metabólica del radiofármaco dentro del organismo y el radionucleido propiamente dicho que emite radiación permitiendo la detección externa del radiofármaco y la valoración del proceso de forma cualitativa y/o cuantitativa.

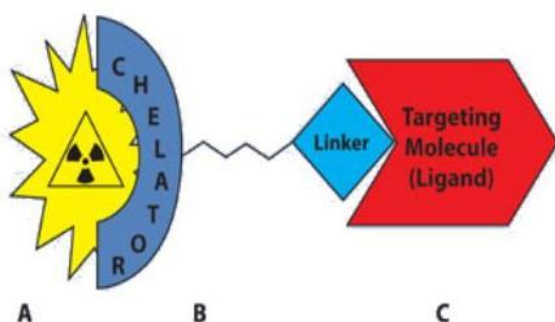


Figura 6. Esquema que representa la composición básica de un radiofármaco molecularmente específico.

Según el radionucleido con que esté marcado se los puede clasificar en radiofármacos de diagnóstico o terapia. Los radiofármacos de diagnóstico, son utilizados con el fin de visualizar la anatomía de un órgano o sistema, evaluar el comportamiento fisiopatológico a nivel de los tejidos, analizar a través de su metabolismo el comportamiento bioquímico o determinar cuantitativamente sus parámetros farmacocinéticos. Son considerados verdaderos trazadores radiactivos ya que son administrados a muy bajas concentraciones.

Los radionucleidos que se emplean en radiofármacos para diagnóstico centellográfico, son idealmente radionucleidos emisores γ puros, con un período de semidesintegración corto y una energía óptima de 30 a 300 KeV que es detectada externamente por la gamma cámara.

Un radiofármaco para diagnóstico, requiere que su pureza radioquímica (PRQ) sea mayor a 90%, puesto que la inyección de una mezcla de diversas especies químicas del radionucleido disminuye la captación en el órgano blanco, y aumenta innecesariamente la dosis de la radiación en órganos no blancos. En caso de que el radiofármaco sea de terapia se exige una PRQ mayor a 95%.

El procedimiento de marcado debe ser simple, eficiente, reproducible y accesible. Para la unión de radionucleidos metálicos a una biomolécula es necesaria la utilización de agentes quelantes. La reacción de complejación debe ocurrir bajo condiciones prácticas. Algunas reacciones pueden ser lentas lo que requiere de altas temperaturas o la incubación a pH elevado durante períodos prolongados, comprometiendo de esta manera el uso de esa metodología de marcado.

También es fundamental la elección de un agente quelante bifuncional que forme un complejo tanto cinéticamente como termodinámicamente estable, dentro del contexto de la elección de radionucleidos y su aplicación. Una estabilidad inadecuada *in vivo* daría lugar a la pérdida del radionucleido y su unión a proteínas plasmáticas (en caso de ser inyectado), aumentando el background en el diagnóstico por imágenes y / o impartiendo dosis de radiación a órganos normales durante el tratamiento.

La elección de un radionucleido adecuado es igualmente importante para las aplicaciones imagenológicas. Por ejemplo, emisiones de positrones (β^+) de alta energía (por ejemplo, ^{66}Ga) pueden producir imágenes PET de relativamente baja calidad y resolución, emisores β^+ de baja energía (por ejemplo, ^{64}Cu o ^{68}Ga) son más deseables dado que la aniquilación se produce a una distancia menor dando así una mejor resolución de imagen (Anderson CJ. y col., 1992). Bajas energías β^+ y γ están asociadas con una mayor calidad de imagen PET y SPECT, respectivamente.

Entre los emisores γ el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es el más ampliamente utilizado en medicina nuclear, si bien se usan también el ^{111}In , ^{123}I , ^{67}Ga entre otros (Liu S., 2003).

Radiofármacos de ^{99m}Tc

Estos radiofármacos han sido tradicionalmente clasificados en amplios términos basados en el rol del tecnecio sobre la suerte final del complejo. Las dos categorías de los radiofármacos son comúnmente referidas como agentes esenciales de tecnecio y agentes de marcado con tecnecio (Bartholoman M.D. y col., 2010). Para los compuesto de tecnecio esenciales, su incorporación es clave para determinar la estructura y carácter fisicoquímico general, y por lo tanto la localización y destino biológico de la molécula. Esta clase de radiofármacos por lo general poseen bajo peso molecular, donde su distribución bilógica esta determinada por la perfusión y las características fisicoquímicas de los complejos de coordinación, como ser: tamaño, forma, carga y lipofilia. Su captación en general, está orientada a los sistemas y procesos de alta capacidad, incluyendo la fagocitosis, remoción por los hepatocitos, filtración glomerular y absorción ósea.

La segunda clase (agentes marcados con tecnecio), la biodistribución del reactivo que contiene tecnecio es determinada por algún sitio del receptor, o por la química o proceso enzimático asociado a la molécula transportadora del sustrato. En el caso ideal, la afinidad por el objetivo biológico debe ser independiente de la presencia del tecnecio.

Los primeros radiofármacos de tecnecio se desarrollaron aprovechando propiedades fisiológicos tales como absorción, distribución, metabolismo y excreción de varios complejos de $^{99m}\text{-Tecnecio}$, y fueron utilizados para obtener imágenes de la tiroides, hígado, huesos, riñones, etc. El cuidadoso diseño de nuevos complejos de $^{99m}\text{-Tecnecio}$ llevó al descubrimiento de agentes para obtener imágenes del flujo sanguíneo (perfusión) en el tejido muscular del corazón (miocardio) y el cerebro. En la actualidad, las imágenes SPECT con derivados del $^{99m}\text{-Tecnecio}$ es a menudo un componente importante de la evaluación de pacientes con conocida o sospecha de enfermedades de las arterias coronarias (Beneficial Uses and Production of Radioisotopes, 2004).

También se descubrió que algunos de los radiofármacos de $^{99m}\text{-Tecnecio}$ utilizados para estudios renal y cardíacos también se acumulaban en algunas formas de tumores primarios, lo que ha llevado a la utilización del $^{99m}\text{-Tecnecio}$ en investigaciones en el desarrollo de agentes de imagen para el cáncer en su mayoría utilizan como portador

péptidos y anticuerpos contra moléculas blanco en los sitios tumorales (Nuclear Technology Review 2006, IAEA).

Los radiofármacos pueden proporcionar información útil sobre el funcionamiento y la biología molecular del tumor mediante la medición de varios de los factores causales de la tumoración. En el futuro, las proyecciones específicas de los radiofármacos de ^{99m}Tc para la obtención de imágenes en oncología puede incluir, por ejemplo, el sistema linfático, en el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y el seguimiento de la terapia génica (<http://www.biotechsystems.com/default.asp>).

Propiedades del Tecnecio

El tecnecio es un elemento artificial obtenido por el decaimiento β^- del ^{99}Mo (Mazzi U., 2007). Es el elemento 43 de la tabla periódica, fué descubierto por Carlo Terrier y Emilio Segré en una mezcla de productos de irradiación obtenida en el laboratorio Berkely y recibió el nombre de Tecnecio en 1947.

El descubrimiento se produjo a partir del bombardeo del molibdeno con deuterones de 8 MeV en un ciclotrón; que dió lugar a una especie radioactiva de molibdeno (vida media de 66 hs) la cual decae por emisión β^- a un isótopo de corta vida media (6 hs) con novedosas propiedades, fué identificado como ^{99m}Tc (Figura 7). El elemento pertenece al grupo VIIB de la tabla periódica, entre el manganeso y el renio. El radio atómico del tecnecio es similar a la del renio, por tanto le confiere similitudes en su química. La configuración electrónica del átomo neutro es $[\text{Kr}]4d^65s^1$, indicando en su capa de valencia los orbitales 4d y 5s, por lo que el Tc puede presentar muchos estados de oxidación, variando desde (VII) a (-I). Los estados mas estables son VII, V, IV, III, I y O.

El estado más alto de oxidación (VII) da lugar a la formación del anión pertecneciato (TcO_4^-), forma química bajo la cual se eluye del generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. La reactividad química del pertecneciato es pobre, no se une directamente a ningún ligando.

Por ello, es necesaria la reducción del estado de oxidación VII a niveles de oxidación más bajos, en presencia de un ligando adecuado para la síntesis de moléculas marcadas. Durante la reducción, el ligando estabiliza el estado de oxidación, pero por otro lado se puede formar el coloide de $\text{TcO}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$ en un medio acuoso.

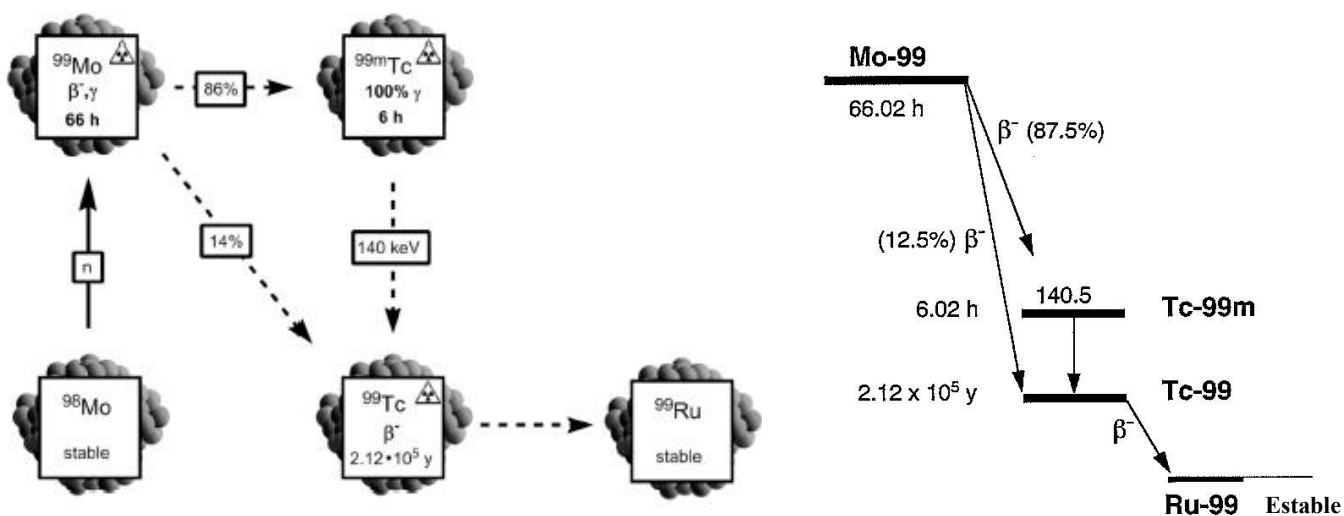


Figura 7. Generación y decaimiento del ^{99m}Tc utilizando un generador ^{99}Mo - ^{99m}Tc (Bartholoma M.D. y col., 2010)

Diagnóstico y Centellografía

La tomografía computada de emisión de fotón único (SPECT) es una técnica de adquisición de imágenes, usada para visualizar procesos biológicos y fisiológicos tanto en seres humanos como en animales, mediante la administración de un trazador radiomarcado. El potencial de ésta técnica es el poder detectar anomalías fisiológicas previas a la aparición de cambios anatómicos que puedan ser visualizados por modalidades de adquisición de imágenes convencionales como el CT y MRI (Metser U, Even-Sapir E, 2007).

Los scanners SPECT utilizan colimadores (blindajes de plomo que contienen canales estrechos paralelos) para adquirir solo aquellos fotones que tienen una trayectoria paralela a los canales. Por lo tanto, la ruta original del fotón detectado puede ser extrapolado linealmente a partir del conocimiento de la orientación de los colimadores.

Los SPECT / CT son sistemas híbridos que capturan información funcional sobre los procesos moleculares y celulares (crecimiento y actividad) y el detalle anatómico (tamaño y forma) de una estructura molecularmente específica con mayor rapidez, eficiencia y claridad que los dispositivos de imagen estándar. Las imágenes obtenidas de estos sistemas pueden ayudar a la rápida identificación de los tumores, el análisis de

un tratamiento adecuado, terapia dirigida a destruir precisamente las células diana, y el seguimiento para evaluar la efectividad del tratamiento.

Desde un punto de vista *in vivo*, el radioligando debe presentar baja o insignificante unión no específica a fin de proporcionar una alta captación comparada a la señal de fondo. La cinética *in vivo* de la captación del radiofármaco en su sitio blanco y el clearance debe ser compatible con la vida media del radioisótopo. Además, el radioligando no debe ser metabolizado extensamente y sus metabolitos, si están presentes, no debe competir con el radiofármaco por su sitio de unión.

La cantidad de radiofármaco unido a la diana de los sitios tumorales es a menudo limitada si se usan las estrategias disponibles en la actualidad, tales como anticuerpos monoclonales y péptidos, debido a la relativamente baja y heterogénea expresión de receptores en las células tumorales, así como la limitante de tener una baja dosis de radiación en los tejidos normales. Para maximizar el índice de captación, es muy importante entregar los radionucleidos al sitio correcto, en la concentración correcta y en el momento adecuado (Boerman O.C. y col., 2000). El rápido avance en el campo de la nanotecnología con aplicación en oncología ha generado innovadores radionucleidos y sistemas de entrega de la droga, como los liposomas para mejorar y realizar el transporte de fármacos citotóxicos o radionucleidos al tumor (Shokeen M. y col., 2008).

En los trabajos de Harrington y colaboradores (Harrington K.J. y col., 2001) se ha realizado una captación eficaz de liposomas radiomarcados en tumores sólidos como: mama ($5,3 \pm 2,6$ ID% / kg para un volumen tumoral de $234,7 \pm 101,4$ cm³), de cabeza y cuello (la más alta absorción de $33,0 \pm 15,8$ % ID / kg para un tumor con un volumen de $36,2 \pm 18,0$ cm³), pulmón ($18,3 \pm 5,7$ % ID / kg para un volumen tumoral de $114,5 \pm 42,0$ cm³), el cerebro y cuello uterino.

Se han reportado desde 1979 hasta 2001 (Goins B.A., 2008), estudios clínicos con liposomas radiomarcados para el diagnóstico imagenológico de tumores y de inflamación. Se han desarrollado unas nuevas sondas anfífilas para marcar liposomas con ¹⁸F y realizar la determinación del tráfico liposomal por PET (Urakami T. y col., 2007). Liposomas encapsulando emisores de positrones como ¹⁸F y ⁶⁴Cu son aplicables para el diagnóstico por imagen y el seguimiento de liposomas en tiempo real (Seo J. W.

y col., 2008). A continuación se resumen los posibles radionucleidos a utilizar en el marcado de liposomas para el diagnóstico a través de imágenes

Tabla 2. Características de los potenciales radionucleidos para el diagnóstico de tumores a través de liposomas

Radionuclide	Production	Emission type	Half-life	$E_{\max}(\gamma)$, (keV)
^{131}I	$^{130}\text{I}(\text{n}, \gamma)^{131}\text{Te}(\beta)^{131}\text{I}$	γ (81.2%), β	8.0 days	284, 364, 637
^{67}Ga	$^{68}\text{Zn}(\text{n}, \text{p})^{67}\text{Ga}$	γ	78.3 h	93, 184, 300, 393
^{111}In	$^{111}\text{Cd}(\text{p}, \text{n})^{111}\text{In}$	Auger, γ	67.2 h	171, 245
^{123}I	$^{121}\text{Sn}(\alpha, 2\text{n})^{123}\text{I}$	Auger, γ	13.2 h	159
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -generator	γ	6.0 h	140
^{18}F	$^{18}\text{O}(\text{p}, \text{n})^{18}\text{F}$	Positron	1.83 h	E_{β^+} 635
^{64}Cu	$^{64}\text{Ni}(\text{p}, \text{n})^{64}\text{Cu}$	Positron	12.7 h	E_{β^+} 656
^{76}Br	$^{76}\text{Se}(\text{p}, \text{n})^{76}\text{Br}$	Positron	16.0 h	E_{β^+} 3941
^{124}I	$^{124}\text{Te}(\text{p}, \text{n})^{124}\text{I}$	Positron	100.2 h	E_{β^+} 2134, 1533

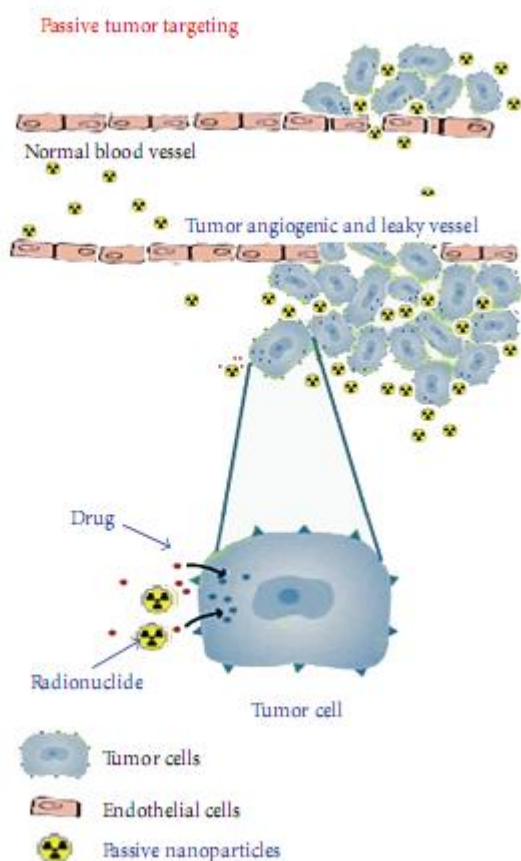


Figura 8. Ilustración esquemática, mostrando el posible mecanismo de acumulación de los sistemas de transporte de radionucleidos a través de difusión pasiva, por el efecto EPR para el diagnóstico tumoral (Allen T.M. y Cullis P.R., 2004)

Ventajas de la centellografía frente a otros métodos no invasivos

Entre las numerosas ventajas podemos destacar. Primero, la imagen centellográfica permite cuantificar no invasivamente la distribución de los liposomas en el cuerpo marcándolos con un radionucleido emisor gamma. Segundo, la centellografía requiere solo una pequeña cantidad de material (usualmente en el rango de los nanogramos), con lo cual no interfiere ni con la biodistribución de los liposomas marcados ni con el proceso fisiológico involucrado con la distribución. Otras modalidades de imagen, como resonancia magnética (MRI) y tomografía computada (CT) proveen una mayor resolución que la centellografía, pero requieren la administración de cantidades mucho mayores de manera de alcanzar un buen contraste en la imagen (miligramos para MRI y gramos para CT). La mayor masa de material de contraste requerido para estas otras modalidades de imagen puede alterar la normal biodistribución del agente así como también un aumento en el riesgo de una reacción adversa inducida por el agente de contraste (Gabizon A.A., 2006). Tercero, las imágenes centellográficas son de utilidad para mostrar una amplia variedad de procesos fisiológicos, desde cambios en el metabolismo de la glucosa, proteínas, metabolismo de ácidos grasos, hasta la demostración de cambios en la expresión de genes y en la detección de cambios en la concentración de receptores para cierta señal celular. Mientras que los agentes de contraste de MRI y CT son útiles solamente para demostrar cambios en la permeabilidad y en el flujo sanguíneo. Cuarto, comparando con otras modalidades de imagen, la centellografía tiene la habilidad de tomar la imagen de todo el organismo en una única cámara para todo el cuerpo. Quinto, a lo largo del tiempo en que están en movimiento los liposomas radiomarcados pueden fácilmente obtenerse imágenes en función del tiempo para distintas regiones de interés (ROI) luego de la administración. Sexto, el método centellográfico es inherentemente cuantitativo porque cada evento de centelleo es recolectado y escaneado en una matriz de imagen que será representada como una imagen visualizable. Séptimo, múltiples agentes podrían ser seguidos simultáneamente en el mismo organismo usando imágenes centellográficas. Este es por ejemplo importante para garantizar un estado fisiológico constante durante la observación del experimento.

Los radionucleidos típicamente utilizados tienen energías que van desde los 70 a 300 KeV para SPECT y de 511 keV para PET (Boswell A., Brechbiel M.W., 2007). Por tanto con una cuidadosa elección de los radionucleidos de manera que haya una adecuada separación de energías en los fotones, muchos agentes radiactivos pueden ser seguidos simultáneamente. Por ejemplo un liposoma marcado con un determinado radionucleido puede ser seguido simultáneamente con la molécula encapsulada marcada con un radionucleido diferente.

En la pasada década, los numerosos avances en el diseño de gamma cámaras han conducido a una mayor sofisticación en el seguimiento tanto preclínico como clínico de los liposomas. Uno de estos avances es la obtención de imágenes en tres dimensiones mediante la rotación de la gamma cámara alrededor del humano o animal, mientras se toma un set de imágenes en distintos ángulos. Este set de imágenes es luego procesado de manera de reconstruir una imagen topográfica única. La tomografía computarizada de emisión de fotones únicos (SPECT) permite determinar la localización de la radiactividad en el organismo.

El tiempo necesario para adquisición de una imagen está comprendido entre 2 segundos y 20 minutos, dependiendo del proceso al cual se le toma la imagen y de la cantidad y actividad del radionucleido administrado. El tiempo requerido para obtener una imagen de SPECT es por lo general mayor que para una imagen planar debido a que la cámara debe rotar alrededor del sujeto.

Con éste tipo de imágenes, la biodistribución dinámica puede ser monitoreada de una forma no invasiva usando un computador dispuesto para la toma de imágenes centellográficas con las cuales se analizan y calculan las curvas de captación y aclaramiento, así como la biodistribución en los órganos.

Las imágenes centellográficas han dado prueba de ser una herramienta muy útil para mostrar el desarrollo de los liposomas como agentes terapéuticos (Gabizon A.A., 2006). En particular, esta modalidad de imagen puede ser usada en la siguientes áreas: visualización de la distribución de los liposomas en el organismo; monitoreo de la respuesta terapéutica seguida luego de la administración de liposomas encapsulando fármacos e investigación de la respuesta fisiológica asociada a la administración del liposoma.

Objetivo General

En ésta tesis se investigó la marcación y caracterización de distintos nanosistemas lipídicos. Para ello se desarrollaron dos sistemas de marcación a través de sistemas bifuncionales como lo son el DTPA y el HYNIC.

Se diseñaron dos clases fundamentales de liposomas, los convencionales y los estéricamente estabilizados, también se procedió a la marcación de arqueosomas a través de DTPA, de manera de evaluar de forma química y biológica cual es el mejor vehículo para el diagnóstico a través de centellografía. El modelo tumoral utilizado fue el de melanoma inducido por células B16F1 en ratones C57 black.

Bibliografía

Advances in medical radiation imaging for cancer diagnosis and treatment; 2006. Nuclear Technology Review, IAEA, 110-127.

Allen T.M. y Cullis P. R; 2004. Drug delivery systems: entering the mainstream. Science, 303(5665):1818–1822.

Anderson CJ, Connett JM, Schwarz SW, Rocque PA, Guo LW, Philpott GW, et al; 1992. Copper-64-labeled antibodies for PET imaging. J. Nucl. Med., 33:1685–91.

Bacharach –Buhles M, Lubowietzki M, Almeyer P; 1999. Dose-dependent shift of apoptotic and unaltered melanocytes into the dermis after irradiation with UVA1. Dermatology., 198:5-10.

Baish JW, Jain R.K.; 2000. Fractals and cancer. Cancer Res., 60: 3683-3688.

Bakowsky H., Richter T., Kneuer C., Hoekstra D., Rothe U., Bendas G., Ehrhardt C., Bakowsky U.; 2008. Adhesion characteristics and stability assessment of lectin-modified liposomes for site-specific drug delivery. Biochimica et Biophysica Acta, 1778: 242-249.

Balch CM, Soong S-J, Murad TM et al; 1983. A multifactorial analysis of Melanoma: IV. Prognostic factor in 200 melanoma patients with distant metastases (Stage III). J Clin. Oncol., 1: 126-34.

Barker D., Dixon K., Medrano E.E., et al; 1999. Comparison of the responses of human melanocytes with different melanin contents to ultraviolet B irradiation. Cancer. Res., 55:4041-6.

Barry B.W.; 2001. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. Eur. J. Pharm. Sci., 14(2): 101-114.

Barth A, Wanek LA, Morton DL; 1995. Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. J Am Coll Surg., 181:193-201.

Bartholoma M.D, Louie AS, Valliant J F., y Zubieta J; 2010. Technetium and Gallium Derived Radiopharmaceuticals: Comparing and Contrasting the Chemistry of Two Important Radiometals for the Molecular Imaging Era. Chem. Rev., 110:2903–2920

Beneficial Uses and Production of Radioisotopes, 2004 Update. NEA/IAEA Joint Publication. OECD 2005.

BIO-TECH Systems, Inc. Market Research in Healthcare field with expertise in medical imaging and radioisotopes. <http://www.biotechsystems.com/default.asp>

Boerman O.C., Laverman P., Oyen W.J.G., Corstens F.H.M., y Storm G.; 2000. Radiolabeled liposomes for scintigraphic imaging. Progress in Lipid Research, 39(5): 461–475.

Boswell Andrew, Brechbiel Martin W.; 2007. Development of radioimmunotherapeutic and diagnostic antibodies:an inside-out view.C. Nuclear Medicine and Biology, 34:757–778.

Choi, H. S.; Liu, W.; Misra, P.; Tanaka, E.; Zimmer, J. P.; Ipe, B. I.; Bawendi, M. G.; Frangioni, J. V; 2007. Renal Clearance of Quantum Dots. Nat. Biotechnol., 25: 1165–1170.

Endo M., Jain R.K., Witwer B., et al; 1999.Water channel (aquaporin 1) expression and distribution in mammary carcinomas and glioblastomas. Microvasc Res., 58:89-98.

Farokhzad, O. C.; Cheng, J.; Teply,B. A.; Sherifi, I.; Jon, S.; Kantoff, P. W.;Richie, J. P.; Langer, R, 2006 . Targeted Nanoparticle-Aptamer Bioconjugates for Cancer Chemotherapy in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 103:6315–6320.

Frank Alexis, Eric Pridgen, Linda K. Molnar, y Omid C. Farokhzad, 2008. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of polymeric nanoparticles. Molecular Pharmaceutics (5) 4.

Gabizon Alberto A.. Applications of Liposomal Drug Delivery Systems to cancer therapy. . Nanotechnology for cancer therapy. Editor: Mansoor M. Amiji, Northeastern University, Boston, Massachusetts, USA (2006).

Goins B.A.; 2008. Radiolabeled lipid nanoparticles for diagnostic imaging. Expert Opinion on Medical Diagnostics, 2 (7): 853–873.

Gratton, S. E.; Ropp, P. A.; Pohlhaus, P. D.; Luft, J. C.; Madden, V. J.; Napier, M. E.; DeSimone, J. M; 2008. The Effect of Particle Design on Cellular Internalization Pathways. Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A., 105: 11613–11618.

Gu F., Zhang L., Teply B. A., Mann N., Wang A., Radovic-Moreno A. F.,Langer R., Farokhzad O. C.; 2008. Precise Engineering of Targeted Nanoparticles by Using Self-Assembled Biointegrated Block Copolymers. Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A., 105: 2586–2591.

Hanahad D y Weinberg RA; 2000. The hallmarks of cancer. Cell, 10:57-70.

Hanahan, D. y Folkman, J.; 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell, 86: 353–364.

Harrington K. J., Mohammadtaghi S., Uster P. S. et al.; 2001.Effective targeting of solid tumors in patients with locall advanced cancers by radiolabeled pegylated liposomes. Clinical Cancer Research, 7 (2): 243–254.

Helen Rizos, Therese M Becker, Elizabeth a Holland; 2004. Cell cycle regulation in the melanocyte.Text Book of Melanoma.

Hengst L, Göpfert U, Lashuel HA, et al; 1998. Complete inhibition of cdk/cyclin by one molecule of p21.Gene Dev., 12: 3882-8.

Herald J Hoekstra, Heimen Schraffordt Koops; 2004. Diagnosis of systemic melanoma metástasis: general principales; Textbook of Melanoma.

Hussain S., Pluckthun A., Allen T.M., Zangemeister-Wittke U.; 2007. Antitumor Activity of an Epithelial Cell Adhesion Molecule-Targeted Nanovesicular Drug Delivery System. *Mol. Cancer. Ther.*, 6: 3019–3027.

Imokawa G., Yada Y., Miyagishi M.; 1992. Endotelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *J. Biol. Chem.*, 267: 24675-80.

Immordino M.L., Dosio F. y Cattel L.; 2006. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale and clinical applications; existing and potential. *Int. J. Nanomed.*, 1: 297-315.

Jain R.K.; 1987. Transport of molecules across tumor vasculature. *Cancer Metastasis Rev.*, 6: 559-593.

Jain R.K.; 1988. Determinants of tumor blood flows: A review. *Cancer Res.*, 48: 2641-2658.

Jain, R.K; 2001. Delivery of Molecular and Cellular Medicine to Solid Tumors. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 46:149–168.

Kenneth J. Pienta; 2009. Cancer as disease: types of tumor, their frequencies , and their progresión. *The biology and traetment of Cancer: Understanding Cancer.* Wiley – Blackwell.

Kingsley J.D., Dou H., Morehead J., Rabinow B., Gendelman H.E., Destache C.J.; 2006. Nanotechnology: a focus on nanoparticles as drug delivery system. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 1: 340-350 .

Kircher M.F., Mahmood, U., King, R.S., Weissleder, R. y Josephson, L; 2003. A multimodal nanoparticle for preoperative magnetic resonance imaging and intraoperative optical brain tumor delineation. *Cancer Res.*, 63: 8122–8125.

Kirpotin, D. B.; Drummond, D. C.; Shao, Y.; Shalaby, M. R.; Hong, K.; Nielsen, U. B.; Marks, J. D.; Benz, C. C.; Park, J. W; 2006. Antibody Targeting of Long-Circulating Lipidic Nanoparticles Does Not Increase Tumor Localization but Does Increase Internalization in Animal Models. *Cancer Res.*, 66: 6732–6740.

Langley R.G.B., Bamhill R.L., Mihm Mc, Fitzpatrick T.B., Sober A.J.; 2005. Neoplasias: Melanoma cutáneo. *Dermatología en medicina general.* Tomo II 6ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1929-1965.

Lasic D.D. y Templeton N.S.; 1996. Liposomes in gene therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 20: 221-266 .

Levine A.J.; 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88: 323–331.

Longmire, M. L.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H; 2008. Clearance Properties of Nano-Sized Particles and Molecules Used as Imaging Agents: Considerations and Caveats. *Nanomedicine*, 3: 703–717.

Liu, S.; 2003. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.*, 27: 43-55.

Mazzi U. Technetium in Medicine. Technetium- 99m Pharmaceuticals: preparation and quality control in nuclear medicine. Springer (ed Ilse Zolle) 2007.

Marcian E. Van Dort, Alnawaz Rehemtulla, y Brian D. Ross; 2009. PET and SPECT Imaging of Tumor Biology: New Approaches towards Oncology Drug Discovery and Development. *Curr Comput Aided Drug Des.*

Mark D Bartholoman, Anika S. Louie, Jhon F. Valliant, y Jon Zubieta; 2010. Technetium and Gallium Derived Radiopharmaceuticals: Comparing and Contrasting the Chemistry of Two Important Radiometals for the Molecular Imaging Era. *Chem. Rev.*, 110:2903-2920.

Matsui W; 2006. Melanoma. *Enciclopedia medica en español, Medline plus: Información de salud para usted.*

Matsumura Y.; Maeda H.; 1986. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.*, 46: 6387–6392.

Metser U., Even-Sapir E.; 2007. *Semin. Nucl. Med.*, 37:206–222.

Miyashita T, Harigai M, Hanada M, et al; 1994. Identification of a p53 –dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res.*, 54:3131-5.

Miyashita T, Reed J.C.; 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80:293-9.

Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C; 2001. Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice. *Pharmaco Rev.*, 53: 283–318.

Moussaoui N., Cansell M., Denizot A.; 2002. Marinosomes, marine lipid-based liposomes: physical characterization and potential application in cosmetics. *Int. J. Phar.*, 242 (1-2):361-385.

Nam C. A, J. M. y Mirkin, C. A; 2004. Bio-barcode-based DNA detection with PCR-like sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.*, 126:5932–5933.

Nunes Elia y Gelòs Ulises; 2006. Proliferación celular y su perturbación. Aspectos cuantitativos y moleculares. Oficina del libro FEFMUR, Montevideo.

Omid C. Farokhzad y Robert Lange; 2009. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery 3: 16–20 • (www.acsnano.org)

Ostro M.J.. Liposomes. ed Marcel Dekker, New York, 1983

Park, J.W.; 2002. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. Breast Cancer Res., 4: 95–99.

Pirollo K.F., Chang E.H.; 2008. Does a Targeting Ligand Influence Nanoparticle Tumor Localization or Uptake? Trends Biotechnol., 26: 552–558.

Pun S.H., Tack F., Bellocq N.C., Cheng J.; Grubbs B.H., Jensen G.S., Davis M.E., Brewster M., Janicot M., Janssen, B., et al; 2004. Targeted Delivery of RNA-Cleaving DNA Enzyme (DNAzyme) to Tumor Tissue by Transferrin-Modified, Cyclodextrin-Based Particles. Cancer Biol. Ther., 3: 641–650.

Reddy S.T., Van der Vlies A.J., Simeoni E., Angeli V., Randolph G. J., O’Neil C.P., Lee L.K., Swartz M.A., Hubbell J.A.; 2007. Exploiting Lymphatic Transport and Complement Activation in Nanoparticle Vaccines. Nat. Biotechnol., 25: 1159–1164.

Reynolds TY, Rockwell S, Glazer PM. 1996. Genetic insatibility induced by the tumor microenvironment. Cancer Res, 56:5754-5757.

Rubin H; 2002. The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo. Nat biotechnol, 20:675-681.

Saunders, L., Perrin, J. y Gammack, D.B.; 1962. Ultrasonic irradiation of some phospholipid solutions. J. Pharm. Pharmacol., 14: 576-572.

Schnyder A., Krahenbuhl S., Torok M., Drewe J. y Huwyler J.; 2004. Targeting of skeletal muscle in vitro using biotinylated immunoliposomes. Biochim. J., 377: 61-67.

Semenza G.L.; 1998. Hypoxia –inducible transcription factors: regulation of O₂ homeostasis. Curr. Opin. Genet. Dev., 8: 588.

Senior, J., Delgado C., Fisher D., Tilcock C. y Gregoriadis G. ; 1991. Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma proteins and clearance from the circulation: studies with polyethyleneglycol-coated vesicles. Biochim. Biophys. Acta., 1062: 77-82.

Seo J. W., Zhang H., Kukis D. L., Meares C. F., y Ferrara K. W; 2008. A novel method to label preformed liposomes with ⁶⁴Cu for positron emission tomography (PET) imaging. Bioconjugate Chemistry, 19(12): 2577–2584.

Shokeen M., Fetti N. M., and Rossin R.; 2008. Synthesis, in vitro and in vivo evaluation of radiolabeled nanoparticles. Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 52(3): 267–277.

Sihorkar V., Vyas S.P.; 2001. Potential of polysaccharide anchored liposomes in drugs delivery, targeting and immunization. *J. Pharm Pharmaceut Sci.*, 4(2): 138-158.

Simard P., Leroux J.C., Allen C. y Meyer O.; 2007. Liposomes for drug delivery. *Nanoparticles for Pharmaceutical Applications*. Domb AJ, Tabata Y, Ravi Kumar MNV (eds). American Scientific Publishers, Stevenson Ranch California, 1-62.

Storm G. y Crommelin D.J.A.; 1998. Liposomes: quo vadis? *Pharm. Sci. Technol. Today.*, 1: 19-31.

Szoka F. y Papahadjopoulos D.; 1980. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9: 467-508.

Szoka F., Olson F., Heath T., Vail W., Mayhew E. y Papahadjopoulos D.; 1980. Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1-0.2 microns) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 601: 559-571.

Talsma H., Ozer A.Y., Van Bloois L. y Crommelin D.J.; 1989. The size reduction of liposome with a high pressure homogenizer (Microfluidizer): characterization of prepared dispersions and comparison with conventional methods. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 15: 197-207.

Torchilin V.P., Trubetskoy V.S., Whitemen K.R., Calcetti P., Feruti P. y Veronese F.M.; 1995. New synthetic amphiphilic polymers for the steric protection of liposomes in vivo. *J. Pharm. Sci.*, 84: 1049-1053.

Torchilin V.P.; 2006. Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 8: 343-375.

Urakami T., Akai S., Katayama Y., Harada N., Tsukada H., y Oku N.; 2007. Novel amphiphilic probes for [¹⁸F]- radiolabeling preformed liposomes and determination of liposomal trafficking by positron emission tomography. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(26): 6454–6457.

Verma, A., Uzun O., Hu Y., Han, H. S., Watson, N., Chen S., Irvine D. J., Stellacci F.; 2008. Surface-Structure-Regulated Cell-Membrane Penetration by Monolayer-Protected Nanoparticles. *Nat. Mater.*, 7:588–595.

Maestría en Química

Lic. Mirel Cabrera

Capítulo 1

“DTPA-Liposomas y sus análogos estéricamente estabilizados marcados
con ^{99m}Tc ”

Director Dra. Henia Balter

Área de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, 2009-2011

1.1.Introducción

1.1.1. Obtención de DTPA-Liposomas y sus análogos estéricamente estabilizados marcados con ^{99m}Tc

Los liposomas presentan aplicación diagnóstica en imagenología molecular, y para ello deben ser marcados con ^{99m}Tc debido a sus adecuadas propiedades fisicoquímicas y nucleares ya detalladas en la introducción.

Los liposomas pueden ser radiomarcados simplemente adicionando el $^{99m}\text{TcO}_4^-$ al medio acuoso utilizado para hidratar los lípidos. Sin embargo, éste método por su baja eficiencia de marcado (generalmente menor al 10%) no es el óptimo (Fenske y col., 2003). Por tanto se han desarrollado otras estrategias para realizar el marcado de los liposomas preformados con una mayor eficiencia.

Hay cinco métodos generalmente utilizados para el marcado o para encapsular los radionucleidos en los liposomas:

- (i) marcarlos por encapsulación durante la preparación (Mitra A. y col., 2006)
- (ii) marcarlos en superficie de forma directa después de su preparación (Hamoudeh M. et al., 2008)
- (iii) realizar la marcación de bioconjugados en superficie después de su preparación (Harrington K. J y col., 2001)
- (iv) incorporación a la bicapa lipídica después de su preparación (Shokeen M. y col., 2008)
- (v) formación del liposoma, incubación con el radionucleido vehiculizado en una molécula sensible al pH, incorporación en el medio acuoso interior del liposoma y estabilización por cambio de pH. (Gann Ting y col., 2010)

En el desarrollo de esta maestría, la marcación se realizó a empleando Acido etilentríaminopentacético (DTPA). El DTPA es un agente quelante ampliamente utilizado en medicina nuclear, los primeros antecedentes de marcación con ^{99m}Tc datan de la década de los 70 (Hauser W. y col., 1979), habiendo sido posteriormente utilizado en distintas aplicaciones biomédicas, siendo una de las mas conocidas su uso como agente de contraste en Resonancia Magnética Nuclear actuando como quelante para el lantánido Gadolinio (Reimer P. y col., 1997).

También se han realizado trabajos marcando el DTPA con otros radionucleidos emisores gamma como ser ^{111}In (Jasanada François y col., 1996), así como también con emisores de positrones para imágenes PET como ser ^{68}Ga (Chanda Mithu y col., 2008).

Posteriormente se lo ha utilizado en la marcación con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ de distintas biomoléculas como por ejemplo folato (Mathias Carla J. y col., 2000), e incluso liposomas por medio de la encapsulación del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA (Koukourakis M.I. y col., 2000), pero cabe destacar que hasta la fecha es el único trabajo que ha utilizado este lípido (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-DTPA) para marcar en superficie a los liposomas con $^{99\text{m}}\text{Tc}$. En un trabajo reciente (Lingappa Mohanambe y col., 2010) se realizó la marcación del mismo lípido pero empleado un emisor alfa (^{213}Bi), lo cual permitiría su utilización en terapia pero no en diagnóstico, realzando la importancia de tener un sistema similar que permita previamente localizar el tumor de una forma no invasiva.

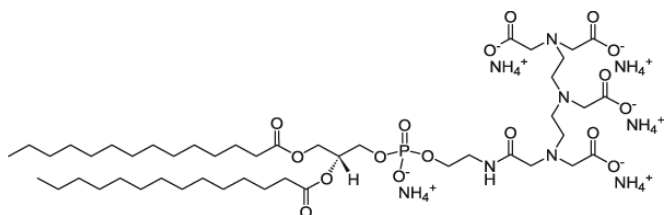


Figura 1.1 Estructura de la sal de amonio de 1,2- dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-DTPA. Lípido derivatizado empleado en la composición de los liposomas de manera de permitir la marcación con $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Las estrategias iniciales para dirigir los liposomas a los tumores fueron desalentadoras dado que la mayoría de las partículas se acumulaban rápidamente en el hígado y el bazo luego de la inyección intravenosa de estas nanopartículas. Los liposomas son removidos de la circulación por células del sistema fagocítico mononuclear (MSP). Sin embargo se han desarrollado estrategias mediante: reducción del tamaño, inclusión de colesterol y minimización de la carga, las que han logrado cierto éxito en disminuir el reconocimiento de los liposomas por el MSP. (Belhaj-Tayeb y col., 2003).

Las modificaciones químicas superficiales de los liposomas con ciertos polímeros, como polietilenglicol (PEG), son la estrategia más frecuentemente utilizada para aumentar el tiempo de residencia en sangre a estos nanosistemas. Se presenta el término “estabilización estérica” para describir el fenómeno mediado por la protección polimérica. A nivel biológico, el recubrimiento de la superficie liposomal con PEG previene la interacción de las nanopartículas con las opsoninas disminuyendo su captura por el sistema MSP (Dams y col., 2000; Papahadjopoulos y col., 1991; Irma and Bakker-Woudenberg , 2002).

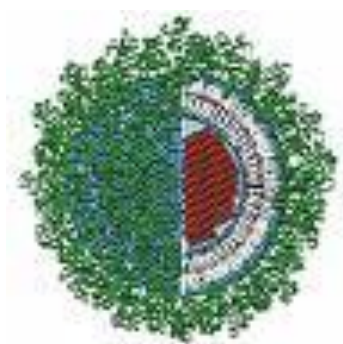


Figura 1.2 Imagen esquemática de un liposoma Pegilado

1.2. Materiales y Métodos

1.2.1. Preparación de los liposomas

Ambas clases de liposomas fueron preparados por el método de hand shaken, en la preparación del film de DTPA-liposomas se agregaron a un balón, 9 mg de fosfatidilcolina (Avanti polar lipids), 4 mg de colesterol y 1 mg de 1,2- dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-DTPA (Avanti polar lipids) en un mezcla de cloroformo: metanol(2:1 v/v). Para la preparación del film de PEG-DTPA-liposomas se realiza de igual manera solamente que para otorgarle la estabilización estérica se agrega a la disolución de lípidos 1mg de 1,2 dimiristoil-sn-glicero fosfoetanolamine-3-N-metoxi (polietilenglicol-5000) (Avanti polar lipids). Los lípidos son rotaevaporados a sequedad en baño de agua a 60 °C y 120 rpm.

Los films obtenidos son hidratados con 5 mL de agua bidestilada, en baño de agua a 60°C por 60 minutos, con rotación a 120 rpm. Las MLV obtenidas son extruidas por una serie (11 veces, 0,4 µm ; 11 veces, 0.1 µm) de filtros de policarbonato a 60 °C para formar los liposomas unilamelares.

1.2.2. Caracterización de los liposomas

1.2.2.1. Calorimetría diferencial de barrido(DSC)

El DSC fue realizado con un dispositivo Shimadzu DSC 50 previamente calibrado con Indio. Todas las determinaciones fueron realizadas en duplicado. Fueron preparados paneles de aluminio herméticamente sellados conteniendo 5 mg de liposomas liofilizados. Las muestras fueron escaneadas a 1°C/ min desde 5°C hasta 60°C; fue utilizado como referencia un panel de aluminio vacío. Los cambios de entalpía y las transiciones características de temperatura fueron calculados utilizando un software de sistema de análisis térmico (TA-50 WSI)

1.2.2.2. Distribución de tamaño

La distribución de tamaños fue estimada por difracción de luz láser y dispersión de luz polarizada utilizando un analizador de partículas Coulter Counter Multisizer (Coulter Electronics Ltd.), fueron determinados los índices $d_{3,2}$ y $d_{4,3}$. El índice $d_{3,2}$ es el promedio de la relación volumen-superficie de las gotitas de emulsión mientras que

d_{4,3} representa el diámetro principal ponderado en volumen, ambas expresadas en nanómetros.

1.2.2.3. Cuantificación de fosfolípidos totales.

Los lípidos totales se calcularon por cuantificación de fosfolípidos a través de la determinación de fosfato inorgánico (ensayo de Bartlett) La determinación cuantitativa de los fosfatos inorgánicos se obtuvo por la técnica colorimétrica de desarrollo de color de azul de molibdeno, donde la absorbancia fue determinada en un espectrofotómetro a 882 nm. La determinación cuantitativa de los fosfatos inorgánicos fue basada en la aplicación de la ley de Lambert-Beer, las muestras fueron comparadas con soluciones estándar de fosfatos que recibieron el mismo tratamiento que las suspensiones liposomales.

Tabla 1.1 Tabla de ensayo de cuantificación de fosfatos inorgánicos mostrando la curva estándar y las soluciones problema (suspensión de liposomas).

Solución	Solución madre	Solución problema	Solución extractiva	Solución B	Agua destilada	Reacción de coloración	[NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O] (g/L)	[P] (g/L)
Blanco	---	---	0,8 mL	4 mL	Enrasar a 25,0 mL	Esperar 30 minutos	---	0
Estándar 1	0,5 mL	---	0,8 mL	4 mL			5 x 10 ⁻⁴	1,12 x 10 ⁻⁴
Estándar 2	1,0 mL	---	0,8 mL	4 mL			10 x 10 ⁻⁴	2,24 x 10 ⁻⁴
Estándar 3	2,0 mL	---	0,8 mL	4 mL			20 x 10 ⁻⁴	4,49 x 10 ⁻⁴
Estándar 4	5,0 mL	---	0,8 mL	4 mL			40 x 10 ⁻⁴	8,98 x 10 ⁻⁴
Estándar 5	10,0 mL	---	0,8 mL	4 mL			100 x 10 ⁻⁴	22,4 x 10 ⁻⁴
Estándar 6	20,0 mL	---	0,8 mL	4 mL			200 x 10 ⁻⁴	44,9 x 10 ⁻⁴
Problema 1	---	2,0 mL	---	4 mL			---	?
Problema 2	---	2,0 mL	---	4 mL			---	?

1.2.3. Radiomarcado de DTPA-liposomas, DTPA-PEG-liposomas

Ambas marcaciones se realizaron con la misma metodología a fin de obtener altos rendimientos de marcado y poder comparar los resultados. A continuación se detalla como ejemplo la marcación de los DTPA-liposomas, debe tomarse en consideración lo mismo para sus análogos estéricamente estabilizados.

La marcación con ^{99m}Tc requiere la reducción del pertecneciato dado que este se encuentra en su mayor estado de oxidación (VII), esto fue realizado a través del agente reductor Sn^{2+} .

Se agregaron 0.1 ml de una solución de SnF_2 (4.4mM) a 0.8 mL de DTPA-liposomas, y posteriormente se adicionaron 200-250 MBq (5-7 mCi) de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos. La eficiencia del marcado y la pureza radioquímica fueron estimados por cromatografía instantánea de forma ascendente en capa fina, como fase estacionaria ITLC-SG (Pall Corporation), en tiras cromatográficas de 1 x 10 cm. Fue aplicada una gota de ^{99m}Tc -DTPA-liposoma en el punto de siembra, el cual se encontraba a 1.5 cm del borde inferior de la tira. Se realizaron dos ensayos utilizando NaCl 0.9 % (Fluka), y piridina: ácido acético: agua (3:5:1.5 v/v) como fases móviles. Luego de desarrollar la corrida, se realizó la etapa de secado, la tira fue cortada en ocho segmentos y la actividad de cada uno fue medida en contador de centelleo sólido NaI (TI) 3"x3" acoplado a un analizador monocanal ORTEC. La actividad de cada segmento fue expresada como porcentaje del total de la actividad de la tira. También, para estimar la eficiencia del marcado se realizó una cromatografía de exclusión molecular (columna PD-10) utilizando NaCl 0.09 % como eluyente, y colectando fracciones de 0.5 mL.

1.2.4. Estudios de Transquelación

Para estudiar la estabilidad y la fuerza de unión del ^{99m}Tc -DTPA-liposomas y sus análogos estéricamente estabilizados, se realizaron dos ensayos en paralelo, donde una suspensión de cada uno de ellos fue mezclada volúmenes iguales (0.5 mL) de soluciones de L-Cisteína (SIGMA) de diferente concentración (0.1, 10 y 30 mM), y se incubó durante 1 y 3 h en baño de agua a 37°C. Para evaluar la cantidad de liposomas y de especies transqueladas la muestra se analizó por cromatografía en ITLC-SG dejando desarrollar en NaCl al 0,9 %. La actividad unida a los liposomas permanece en el origen, mientras que las otras formas químicas solubles migran con el frente. Para poder

diferenciar el $^{99m}\text{TcO}_4^-$ de ^{99m}Tc -Cisteína se realizó una cromatografía en Whatman 1, utilizando como fase móvil 2-butanona (MEC), el frente migró hasta una altura de unos 10 cm desde el borde de la tira cromatográfica (R_f ^{99m}Tc -DTPA-PEG- liposomas y ^{99m}Tc - Cisteína = 0.0, R_f $^{99m}\text{TcO}_4^-$ = 0.8-1.0). Cada tira fue dividida en ocho secciones y su actividad fue medida en el contador de centelleo sólido (ORTEC).

1.2.5. Modelo Animal

Se desarrolló un modelo animal de melanoma por inoculación de células tumorales. La línea celular de melanoma murino B16-F1 se obtuvo de la colección American Type Culture Collection y se mantuvo en el medio de Dulbecco modificación Eagle (DMEM) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (PAA Laboratories GmbH) y glutamina 2 mM (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany). Para todos los experimentos se utilizaron ratones C57 black (URBE, Uruguay) de seis semanas de edad. Todos los protocolos experimentales que involucran animales se realizaron siguiendo las directivas aprobadas por el Comité Nacional de Experimentación Animal (CHEA, Uruguay). Los melanomas fueron inducidos en los ratones por administración subcutánea de 2.5×10^5 células de melanoma B16-F1 en 0.1 mL de buffer fosfato salino (PBS). Luego de dos semanas de la inoculación, los tumores eran palpables y los ratones se encontraban listos para comenzar los estudios de biodistribución y centellográficos.

1.2.6. Estudios de Biodistribución

Los estudios de biodistribución de ^{99m}Tc -DTPA-liposomas se realizaron en ratones C57 black normales (n=5), pesando 25.4 ± 2.9 y portadores de melanoma (n=3), pesando 26.2 ± 3.1 . Se inyectó una actividad entre 16-20 MBq (0,4-0,5 mCi) por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical a las 4 h y 24 h post inyección. Tanto el tumor como los tejidos y órganos de interés fueron extirpados, pesados y su actividad medida en un contador de centelleo sólido. La actividad captada en los tejidos normales y tumor fue expresada como porcentaje de actividad por gramo de órgano/tejido.

Los estudios de biodistribución de ^{99m}Tc -DTPA-PEG-liposomas se realizaron en ratones C57 black normales, pesando $24,6 \pm 3.1$ g. Los ratones fueron divididos en tres

grupos (n=5) los que fueron sacrificados a las 2, 4 y 24 h post inyección i.v. de 19-20 MBq (0,5-0,6 mCi)

La captación tumoral del ^{99m}Tc -DTPA-PEG-liposoma se determinó en ratones C57 black portadores de melanoma, pesando $25,6 \pm 5,6$ g (n=6). Después de la inyección de una dosis de 15-17 MBq (0,4-0,5 mCi) de ^{99m}Tc -DTPA-PEG-liposoma, los ratones fueron sacrificados a 4h (n=3) y 24 h (n=3). El tumor así como los órganos de interés fueron extirpados, pesados y medida su actividad en un contador de centelleo sólido (ORTEC).

1.2.7. Estudios de bloqueo del sistema Reticuloendotelial

Con el fin de disminuir la captación de órganos y tejidos del sistema reticuloendotelial se intentó saturar las células del mismo con liposomas no marcados, llamados “liposomas fríos” los que fueron inyectados 30 min antes de la administración de ^{99m}Tc -DTPA-PEG-liposomas. Para este estudio se utilizaron grupos de 5 ratones por cada punto de concentración y de tiempo. Se administraron 0.75 mg de liposomas fríos en ratones C57 black normales, pesando $29,6 \pm 5,4$ g (n = 10) y 1.5 mg de liposomas fríos en ratones C57 black normales, pesando $21,7 \pm 3,0$ g (n =10) a través de la vena de la cola. Como grupo control (sin bloqueo) se trabajó con ratones C57 black normales, pesando $23,4 \pm 3,0$ g. La biodistribución se llevo a cabo a 1h y 3 h post inyección de una dosis 8-10 MBq de ^{99m}Tc -DTPA-PEG-liposomas.

1.2.8. Estudio de metabolización liposomal

Se administran en 4 ratones hembra C57 black normales, pesando 19-22 g, las fracciones de purificación (6 y 7) de ^{99m}Tc -PEG-DTPA-liposomas por columna PD-10 las cuales se corresponden con el liposoma marcado. Cada ratón recibió una dosis de 70 μCi . Se deja biodistribuir por una hora, luego se le extrae la orina por estimulación manual. Se realiza un pool con la orina de los 4 ratones y se realizan los controles, por sistema de exclusión molecular, PD-10, se siembran 400 μL de orina y se eluye con NaCl al 0,9%, colectando fracciones de 0,5 mL. También se aplican los mismos sistemas cromatográficos con los cuales se realizan los controles de pureza

radioquímica para los ^{99m}Tc -PEG-DTPA-liposomas. Se realiza la siembra con una pequeña gota de orina, se seca, se deja desarrollar y posteriormente se seca con aire.

1.2.9. Centellografía

Se realizaron estudios imagenológicos por centellografía en ratones C57 black normales, pesando 25-30 g y en ratones portadores de melanoma, pesando 25-30 g utilizando una gamma cámara (Modelo Sophy DSX, Sopha Medical, Buc, France); conectada en serie con un sistema computacional (Mirage Segami, Columbia, MD) calibrado para detectar la radiación gamma de 140 keV del ^{99m}Tc . Los ratones fueron inyectados con aproximadamente 18.5 MBq (0,5 mCi) de ^{99m}Tc -DTPA-PEG-liposomas a través de la vena de la cola y se anestesiaron por inyección intraperitoneal de Ketamina–Xilazina (100-10 mg/ Kg) previo a la obtención de las imágenes. Los animales se posicionaron debajo de la gamma cámara a 4 y 24 h post administración de los liposomas radiomarcados y se realizó la adquisición de la imagen.

1.3. Resultados

1.3.1. Caracterización de los liposomas

La muestra de liposomas presentó una concentración de fosfolípidos de 1.2274 mg/mL, este valor se obtuvo de interpolar la absorbancia de la solución problema en la curva estándar que se muestra en la figura 1.4.

Los PEG-DTPA-liposomas presentan tamaño nanométrico de $D(4,3) = 0.155 \mu\text{m}$ y un rango de $(0.768- 0.214) \mu\text{m}$, mientras que los DTPA-liposomas poseen un tamaño de $D(4,3) = 0.155 \mu\text{m}$ idéntico a sus análogos pegilados, con un rango de $(0,970- 0,235)$. La transición de fase para éstos último ocurrió a una temperatura de 57.4°C mientras que para sus análogos pegilados se dio a 37.2°C con una entalpía de 301 mJ/g como se muestra en la Figura 1.5.

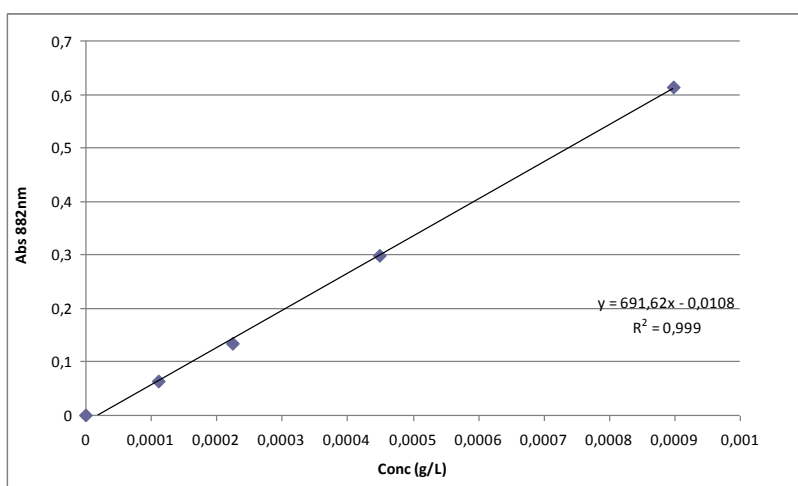


Figura 1.3. Curva de calibración para la cuantificación de fosfatos inorgánicos y determinación de fosfolípidos totales

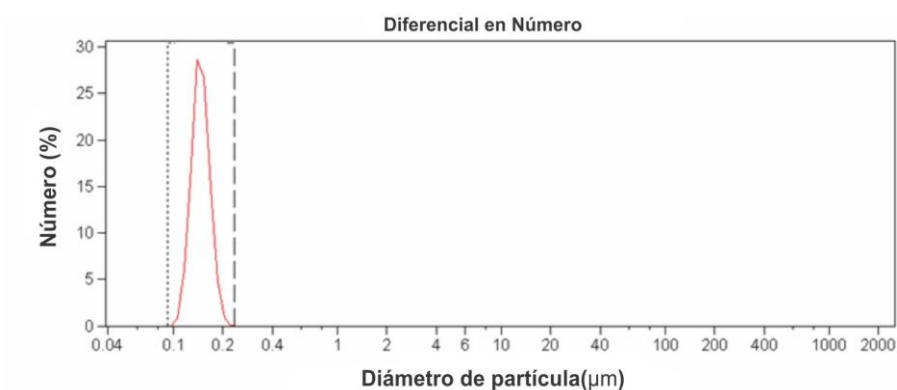


Figura 1.4 Distribución de tamaño de los DTPA-liposomas utilizando un analizador de partículas Coulter Counter Multisizer.

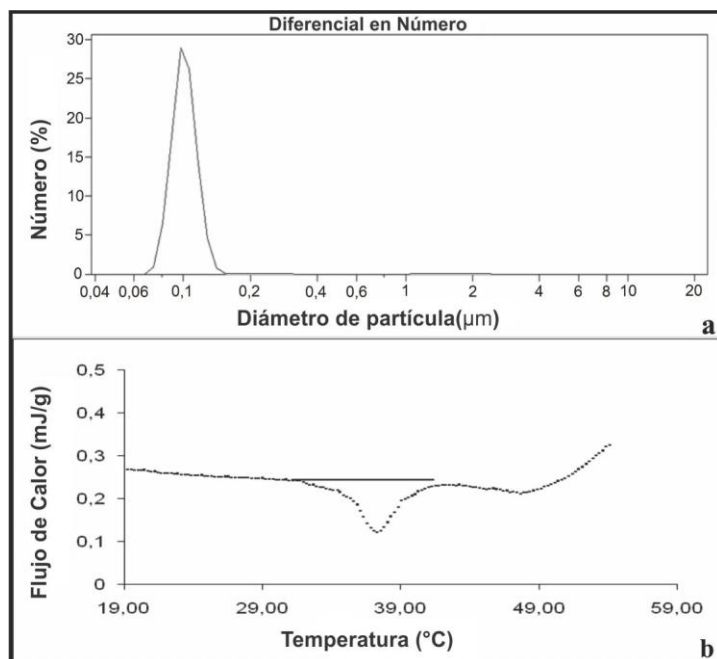


Figura 1.5 (a) Distribución de tamaño de PEG-DTPA-liposomas utilizando un analizador de partículas Coulter Counter Multisizer.
(b) DSC representativo de la formulación de los liposomas en escaneo calorimétrico. Transición de fase de los liposomas: ΔH : 301 mJ/g; Td: 37.5 °C

1.3.2. Marcado de los liposomas

El rendimiento de marcado fue superior al 90% para los ^{99m}Tc -DTPA-liposomas y sus análogos estéricamente estabilizados. La pureza radioquímica se evaluó utilizando diferentes sistemas cromatográficos: a) NaCl 0,9%/ITLC-SG, b) piridina: ácido acético: agua /ITLC-SG, c) gel permeación en columna PD-10 con NaCl 0,9% como eluyente. En el sistema NaCl 0,9%/ITLC-SG tanto los ^{99m}Tc -DTPA-liposomas, como los ^{99m}Tc -DTPA-PEG-Liposoma se mantuvieron en el origen (^{99m}Tc -liposomas $R_f = 0.0$; $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $R_f = 0.0$; y del $^{99m}\text{TcO}_4^-$ $R_f = 0.9-1.0$). En el sistema de piridina: ácido acético: agua / ITLC-SG los liposomas marcados migraron con el frente de la fase móvil (^{99m}Tc -liposomas $R_f = 0.9-1.0$; $^{99m}\text{TcO}_4^-$ $R_f = 0.9-1.0$; y del $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $R_f = 0.0$). En la cromatografía de exclusión molecular (columna PD-10) ambas clases de liposomas se eluyeron con 2.5-3.0 mL mientras que el $^{99m}\text{TcO}_4^-$ se eluyó con 7.0 mL.

1.3.3. Estabilidad *in vitro*

La estabilidad de ambas clases de liposomas en presencia de diferentes concentraciones de cisteína muestra que para la concentración 0.1 mM, el 85% del ^{99m}Tc permanece unido a los liposomas aún a las 3h de incubación. Con concentraciones de cisteína de 10 y 30 mM, en el caso de los DTPA-liposomas, el ^{99m}Tc se mantiene unido en un 50% y 75% respectivamente; mientras que para los DTPA-PEG-liposoma permanece unido en un 87% y 78% a las 3 h de incubación respectivamente (figura 1.7).

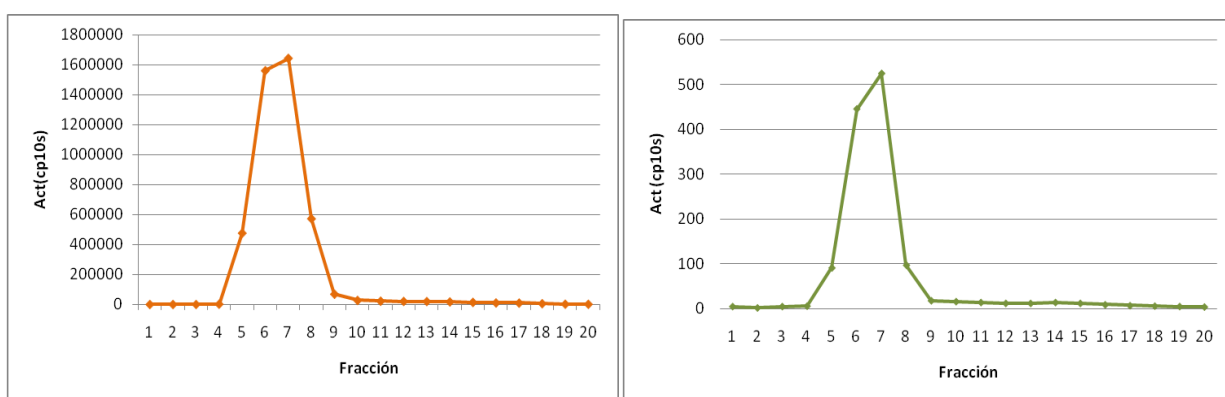


Figura1.6. Cromatografía de exclusión molecular (PD-10) de ^{99m}Tc -DTPA-liposomas (izquierda) y ^{99m}Tc -PEG-DTPA-liposomas (derecha). Se eluyó con NaCl 0,9 % y se tomaron fracciones de 0,5 mL.

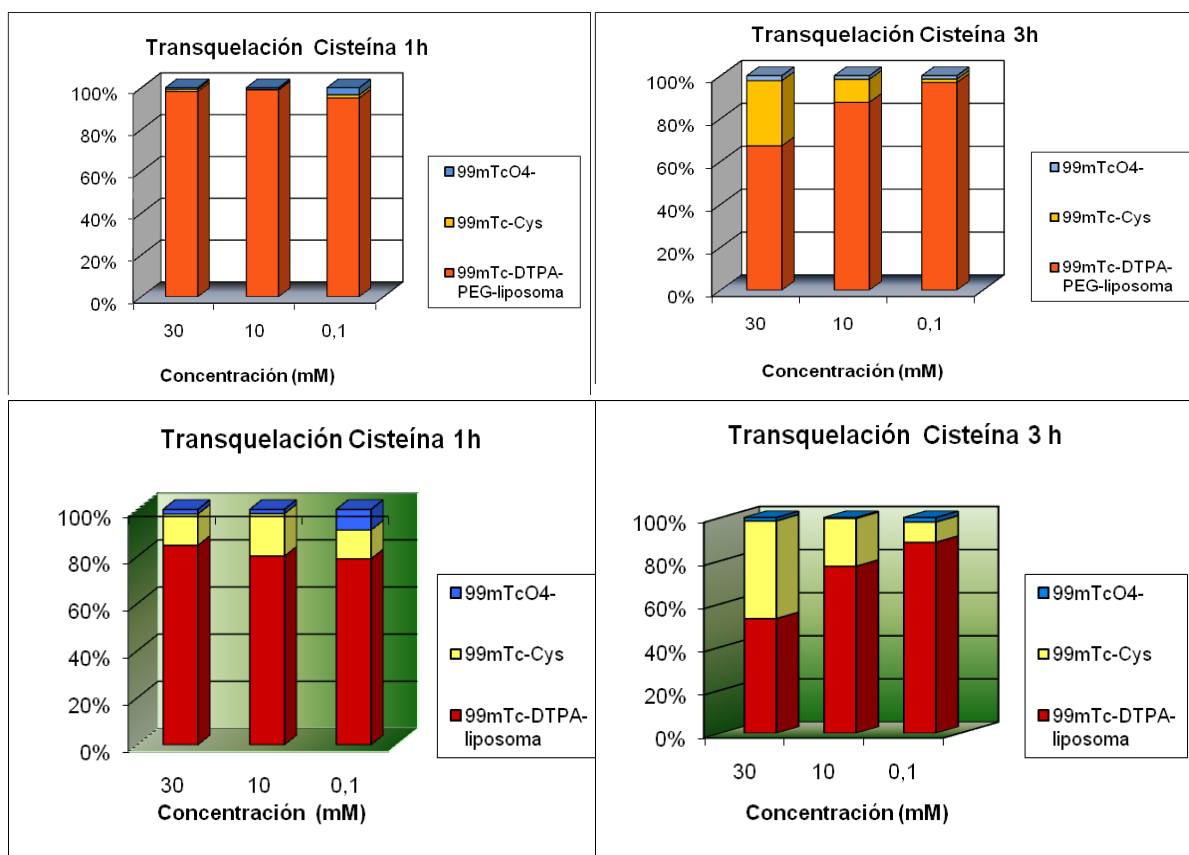


Figura 1.7. Estudio de transquelación a diferentes concentraciones de cisteína para ambas formulaciones liposomales

1.3.4. Estudios de Biodistribución

La biodistribución de los liposomas se determinó al cabo del tiempo predeterminado para el ensayo.

Los resultados de la biodistribución en ratones normales a 4h y 24h para los ^{99m}Tc -DTPA-liposomas se muestran en la figura 1.8, los resultados para los ^{99m}Tc -DTPA-PEG-liposomas (2, 4 y 24 h post-inyección) (Fig. 1.9) muestran captación hepática ($28\% \pm 7\%$, $23\% \pm 3\%$, $24\% \pm 5\%$ a 2, 4 y 24h respectivamente) al igual que sus análogos convencionales. También se observa excreción por vía urinaria ($10.0\% \pm 1.3$, $4.9\% \pm 0.6$, $6.4\% \pm 0.5$ a 2, 4 y 24h respectivamente)

En los ratones con melanoma se observa el mismo patrón de biodistribución que para los ratones normales en ambas clases de liposomas (Figura 1.10 y 1.11). La captación tumoral para los ^{99m}Tc -DTPA-liposomas fue significativa a 4 h post inyección (1.37 ± 0.09). Para sus análogos pegilados ya se observa una buena captación incluso a las 4h (1.58 ± 1.11), con una relación tumor: musculo de 4.

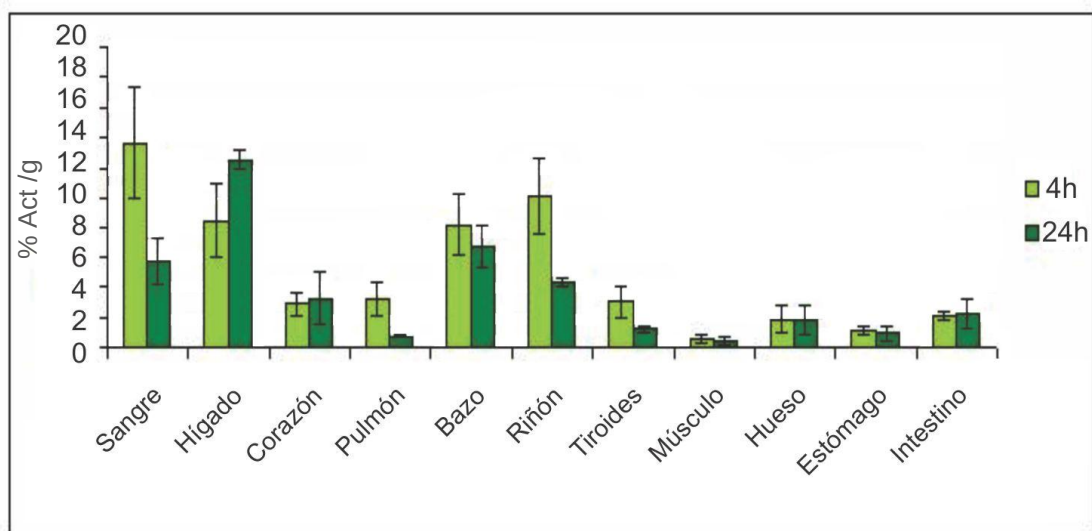


Figura 1.8. Distribución biológica de ^{99m}Tc -DTPA-liposomas a distintos tiempos en ratones C57 black normales. Los valores se expresan en %Act/g (promedio $\pm$ desviación estándar, n=5)

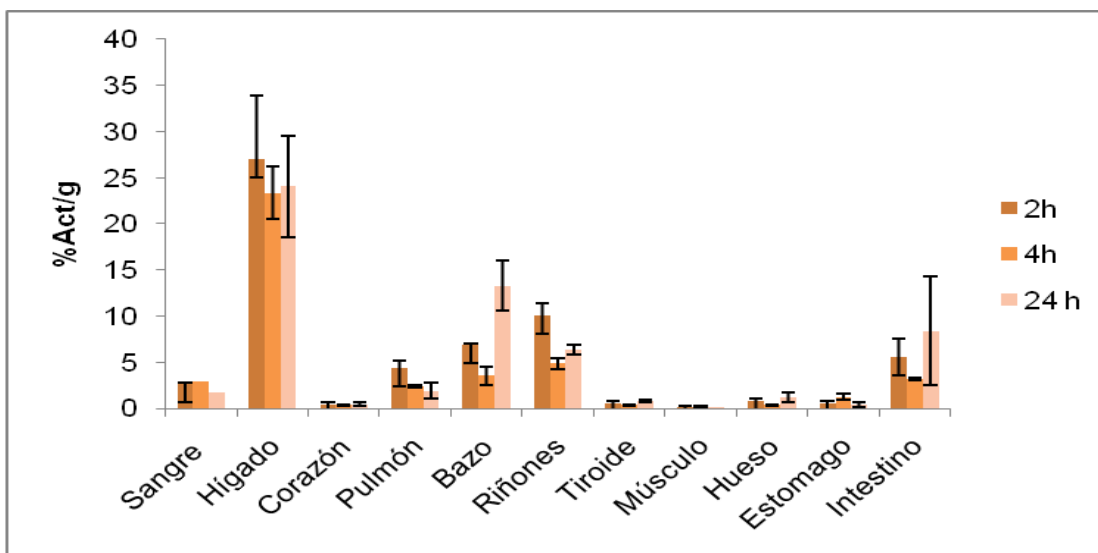


Figura 1.9. Distribución biológica de ^{99m}Tc -PEG-DTPA-liposomas a distintos tiempos en ratones C57 black normales. Los valores se expresan en %Act/g (promedio $\pm$ desviación estándar, n=5)

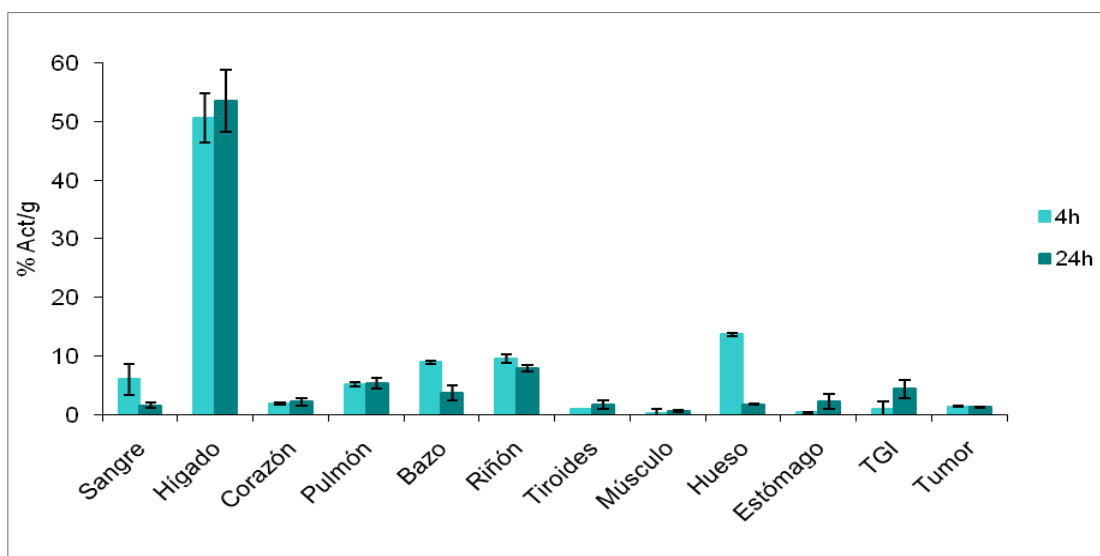


Figura 1.10 Biodistribución de ^{99m}Tc -DTPA-liposomas en ratones C57 black con tumor de melanoma inducido por células B16F1, a 4 y 24h post inyección. Los valores se expresan en %Act/g (promedio $\pm$ desviación estándar, n=3)

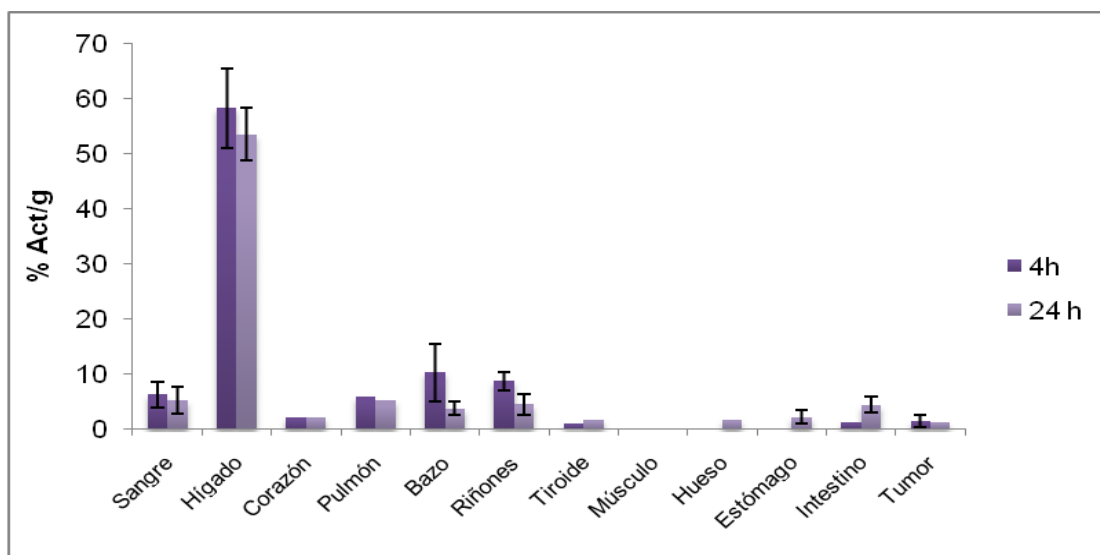


Figura 1.11 Biodistribución de ^{99m}Tc -PEG-DTPA-liposomas en ratones C57 black con tumor de melanoma inducido por células B16F1, a 4 y 24h post inyección. Los valores se expresan en %Act/g (promedio $\pm$ desviación estándar, n=3)

1.3.5. Bloqueo del sistema retículo endotelial

En la biodistribución a 1h de los ^{99m}Tc -PEG-DTPA-liposomas la captación hepática disminuyó un 73% y 70% en los grupos de ratones con bloqueo de 0.75 y 1.5 mg respectivamente con respecto al grupo control (sin bloqueo) (fig 1.12). Los niveles plasmáticos disminuyeron en un 33% y 59% para los grupos con bloqueo de 0.75 y 1.5

mg respectivamente, por otra parte la excreción urinaria se vio aumentada en un 41% y 59% respecto al grupo control. En la biodistribución a las tres horas, se produjo una disminución en la captación hepática (fig 1.12), siendo más pronunciada (50%) para el grupo con bloqueo de 1.5 mg. Se observa un clearance mas lento para el grupo con bloqueo de 0.75 mg con respecto tanto a grupo con bloqueo de 1,5 mg como para el control. La excreción urinaria en cambio presenta niveles comparables para el grupo con bloqueo de 0,75 mg y el grupo control, mientras que el grupo con bloqueo de 1,5 mg presenta un aumento en la excreción urinaria superior al 100%.

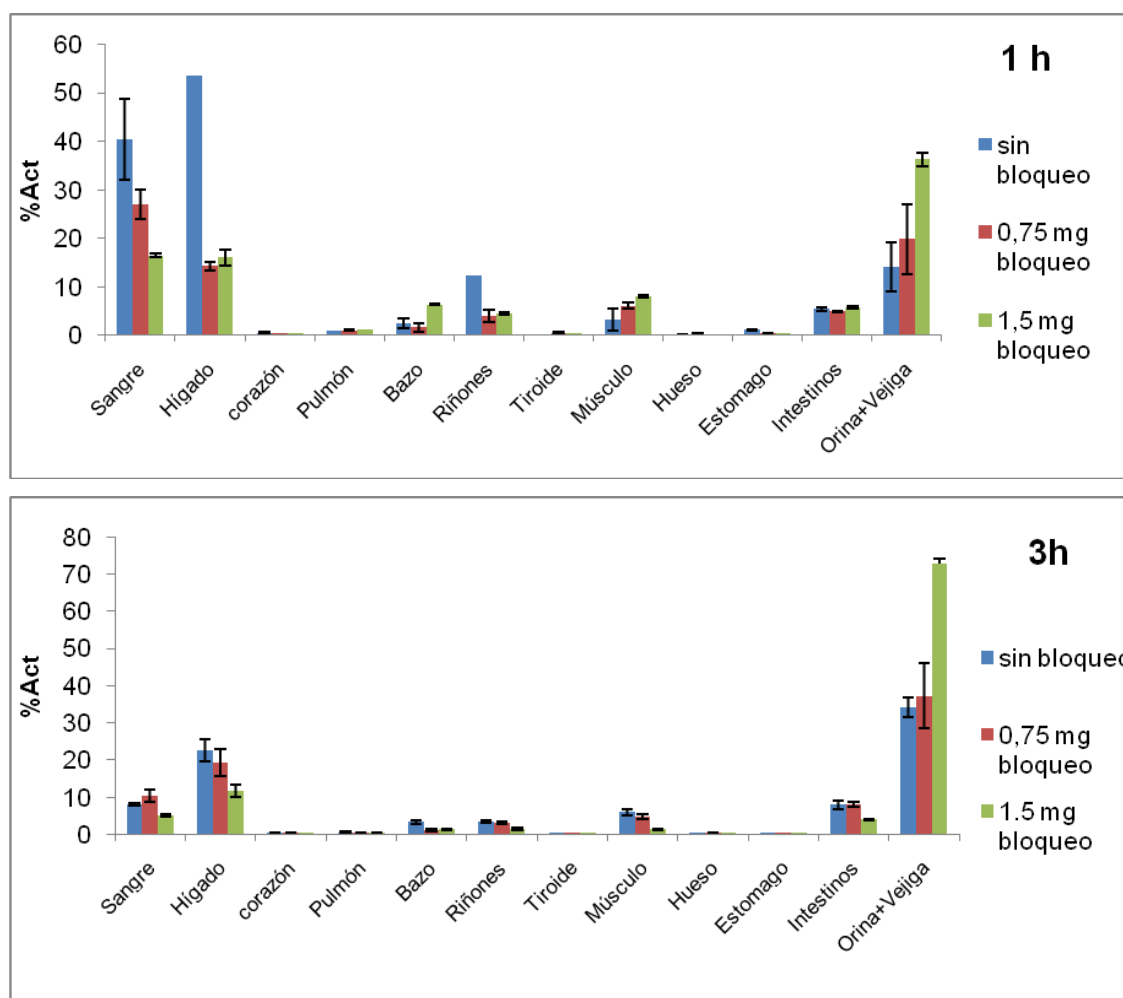


Figura 1.12. Biodistribución en ratones con y sin bloqueo del sistema retículo endotelial, con administración de cantidades crecientes de liposomas fríos previo a la inyección de ^{99m}Tc -PEG-DTPA-liposomas. Los valores se expresan en %Act. (promedio $\pm$ desviación estándar, $n=5$)

1.3.6. Metabolización

La pureza radioquímica es de un 86%, obteniéndose un 3,8% que se corresponde a reducido hidrolizado (discriminado en el sistema de ITLC-SG/Pyr-AcOH-H₂O) y un 10% de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ obtenido este porcentaje de los sistemas de Whatman 1/MEC y ITLC-SG/NaCl 0,9%.

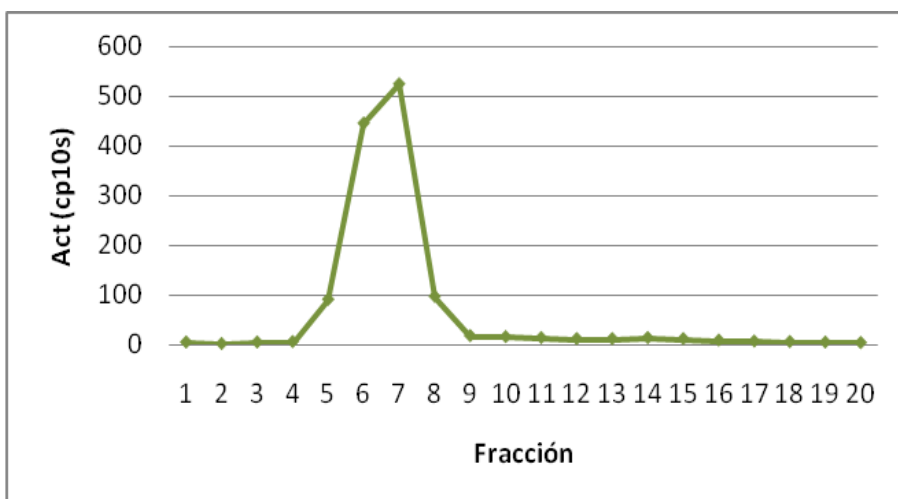


Figura 1.13 Cromatografía de exclusión molecular de ^{99m}Tc -PEG.DTPA-liposomas de la cual se tomaron las fracciones 6 y 7 para administrar en los ratones C57 black normales.

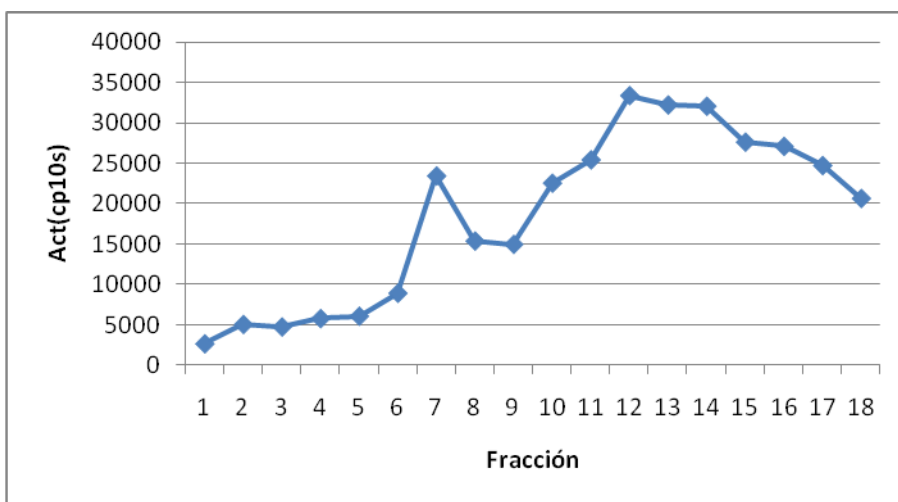


Figura 1.14. Cromatografía de exclusión molecular de la orina de ratones C57 black normales que recibieron una dosis de 70 μCi de ^{99m}Tc -DTPA-PEG-liposomas.

Cómo se observa el perfil no se corresponde a liposomas marcados, tratándose de fragmentos de éstos marcados y no de pertechnetato como se demostró por los sistemas cromatográficos, donde se determinó que un 86% del ^{99m}Tc permanece unido a lípidos derivatizados con DTPA.

1.3.7. Imagen centellográfica

Los resultados fueron compatibles con los datos cuantitativos obtenidos como se describe anteriormente en los estudios de biodistribución.

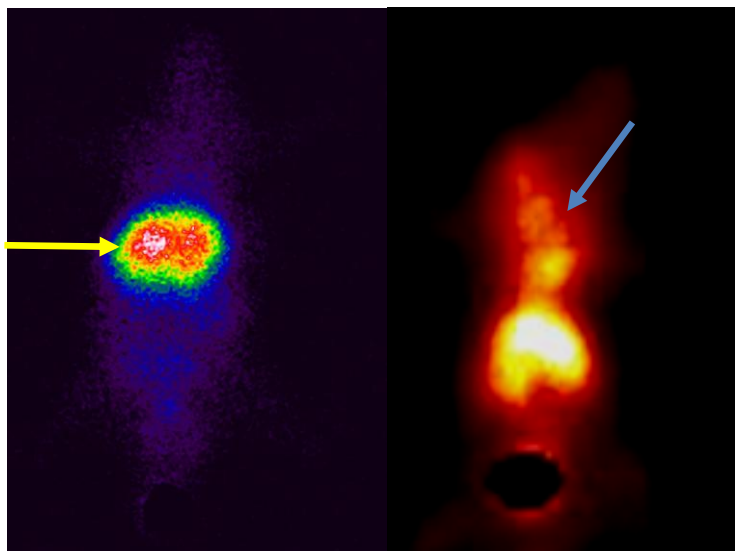


Figura 1.15. Imagen centellográfica de ^{99m}Tc -DTPA-liposomas en ratón C57 black normal (izquierda) y portador de melanoma (derecha) a 4 h post inyección.

La flecha amarilla señala el hígado, nótese que no hay actividad a nivel de vejiga dado que la orina fue extraída por estimulación manual. La flecha azul indica la zona donde se encuentra localizado el tumor

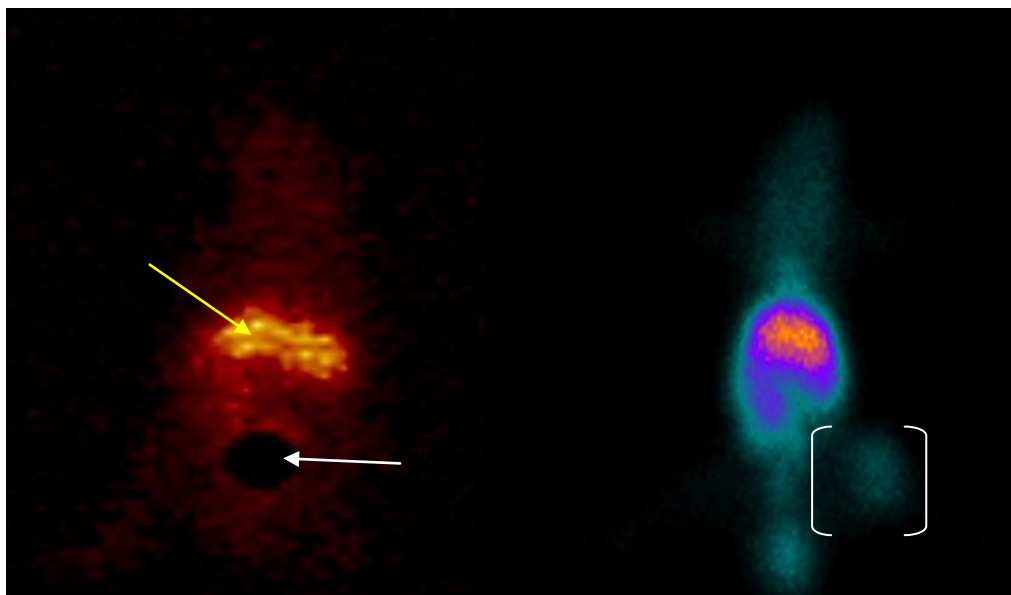


Figura 1.16. Imágen centellográfica de raton C57 black normal (izquierda) y portador de melanoma (derecha) a 4 h post inyección de ^{99m}Tc -PEG-DTPA-liposomas.

Las flechas blanca y amarilla señalan el hígado y la vejiga (presenta una máscara) respectivamente. Los paréntesis en blanco muestran la zona donde se encuentra localizado el tumor.

1.4. Discusión

Los liposomas se han utilizado como vehículos de transporte desde los 70's y en particular su aplicación como transportadores de agentes para imagenología, en todas sus modalidades, tiene una larga historia (Tiwari y col., 2006; Ganta y col., 2008; Richardson y col., 1977). En la actualidad incluso se utilizan en clínica (Goyal y col., 2005).

En los primeros estudios en los que se utilizaban los liposomas como agentes de imagen, se empleaba el método de marcado directo, utilizando cloruro estannoso como agente reductor de manera de asociar el ^{99m}Tc en un estado de oxidación menor (al VII) con la superficie liposomal. Subsecuentemente se demostró que esta metodología de marcado es inestable *in vivo* y por tanto condujo a nuevos desarrollos para producir una marcación más efectiva (Phillips, 1999).

En el presente trabajo, los liposomas fueron diseñados de manera de permitir su conjugación con DTPA y así unir el radionucleído ^{99m}Tc en forma estable. Para este propósito, se utilizó un lípido derivatizado con DTPA (1,2- dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-DTPA) en la composición de los liposomas (convencionales y pegilados). Ambas clases de liposomas se obtuvieron por el método de hand shaken y se realizó la evaluación química y física; fueron caracterizados por distribución de tamaños, cuantificación de lípidos totales y DSC.

El marcado se realizó utilizando fluoruro estannoso como agente reductor y el proceso fue reproducible, rápido y fácil de realizar siendo la pureza radioquímica superior al 90% para ambos tipos de liposomas. Cabe destacar que un método óptimo de marcado es aquel que genera un radiofármaco estable con la menor cantidad posible de agente reductor (Reddy, L.H. y col., 2005). Los controles del marcado se realizaron por diferentes estrategias: sistemas cromatográficos y de exclusión molecular, obteniéndose resultados comparables para ambos métodos. Estas estrategias nos permitieron separar las potenciales impurezas radioquímicas presentes.

Para estudiar la estabilidad *in vitro* de los liposomas radiomarcados, se desafiaron frente a concentraciones crecientes de cisteína, tratando de esta manera emular lo que pudiera suceder a nivel de las proteínas sanguíneas, se observó que no hay transquelación significativa durante el curso del estudio para las concentraciones de 0,1 y 10 mM (figura 1.7) siendo esta última 1000 veces superior a la cantidad que se encuentra en plasma (Brattström MD y col., 1994).

Estos últimos resultados verifican la alta estabilidad de los liposomas radiomarcados frente a una molécula modelo que tiene gran afinidad por el ^{99m}Tc .

En los estudios de biodistribución en ratones normales tanto para los liposomas convencionales como para pegilados, se observa una depuración sanguínea apreciable (Laverman P. y col., 2001; Storm G. y col., 1995; Hwang K.J. y col., 1980) con eliminación hepática y renal. La eliminación renal puede ser explicada por el hecho de que los liposomas son metabolizados en el organismo y el radionucleido permanece unido a pequeños fragmentos de lípidos que puedan ser filtrados por el glomérulo (Harashima H. y col., 1993). No se trataría de una desestabilización de la marca radioactiva puesto que cuando el radiocompuesto no es estable *in vivo*, es apreciable una captación en tiroides y estómago y esto no se observa en el estudio. La hipótesis planteada fue estudiada extrayendo la orina de ratones previamente inoculados con ^{99m}Tc -PEG-DTPA-liposomas y siendo evaluada por distintos sistemas cromatográficos y por exclusión molecular, donde no se encontraron liposomas radiomarcados en la orina (figura 1.14).

Para estudiar como cambia la biodistribución de los liposomas en función de la dosis inyectada, se realizaron tres estudios utilizando distintas cantidades de liposomas fríos previo a la inyección de los liposomas estéricamente estabilizados que son los que se esperan tener mayor tiempo de circulación. Se observaron cambios en la depuración sanguínea y una disminución en la captación hepática a medida que se aumentó la cantidad de liposomas fríos. También se verificó un aumento en la eliminación renal, coherente con la hipótesis de una desestabilización del liposoma y comienzo de una saturación hepática.

Los liposomas marcados fueron evaluados en ratones con melanoma. Esta clase de tumor es apropiada para este tipo de estudios debido a su alta irrigación sanguínea, el mecanismo de acumulación de los liposomas es por extravasación a través de la vasculatura con fenestraciones y por el proceso de inducción angiogénico producido en la periferia tumoral, (Ishida O. y col., 1999).

El desarrollo de liposomas con un tiempo de residencia circulatorio mayor, aumenta la posibilidad de estar en contacto con el tumor y por tanto acumularse. Se ha informado previamente que los liposomas derivatizados con PEG, presentan una vida media plasmática mayor (Yuan F.G. y col., 1994). Sin embargo, cuando la circulación sanguínea de los liposomas se prolonga para aumentar la captación tumoral, un

clearance más lento entorpecería la visualización a tiempos cortos, produciendo imágenes de menor calidad al tener un background del pool sanguíneo elevado (Hamoudeha M. y col., 2008). Por el contrario en este trabajo, las imágenes centellográficas realizadas a 4h post inyección de ^{99m}Tc -PEG-DTPA-liposomas en concordancia con las biodistribuciones en ratones con melanoma, muestran gran captación hepática, figura 1.15 y 1.16 (como en los ratones normales y sus análogos convencionales) y una apreciable captación tumoral. Esto es coherente con un rápido clearance sanguíneo, apropiado para una dosis baja de lípidos, dado que en medicina nuclear es común administrar pequeñas cantidades a nivel de trazas (Laverman, P. y col., 2000). Por tanto se puede concluir que el comportamiento *in vivo* de los liposomas es dependiente de la dosis de liposomas administrada.

Se han realizado trabajos donde se alude a un óptimo marcado de liposomas para la realización de imágenes centellográficas con ^{99m}Tc (Ogihara-Umeda Izumi y col., 1996) donde el marcado se realizó por medio de la encapsulación del ^{99m}Tc unido a HMPAO, de esta manera el nanovector se encuentra marcado pero lo restringimos únicamente al fin de la centellografía, mientras que al marcarlo en superficie tenemos la posibilidad de encapsular algún fármaco y realizar la evaluación *in vivo* de diferentes formulaciones farmacéuticas utilizando los liposomas como transportadores. Es así que el método desarrollado para marcar en superficie los DTPA-Liposomas y sus análogos estéricamente estabilizados demostró ser efectivo y estable *in vivo*, pudiendo ser transferido a una formulación farmacéutica. A su vez esta metodología puede ser extendida para realizar marcaciones con ^{177}Lu de manera de combinar diagnóstico y terapia para el tratamiento del cáncer si bien estudios dosimétricos deberían llevarse a cabo para determinar esta posibilidad.

Bibliografía

- Brattström M.D., Lindgren A., Israelsson B., Lindgren A., Israelsson B., Andersson A. y Hultberg B.; 1994. Homocysteine and cysteine: determinants of plasma levels in middle-aged and elderly subjects. *Journal of Internal Medicine*, 236(6): 633–641.
- Belhaj-Tayeb H., Briane D., Vergote J., Cao A., Moretti J. ; 2003. In vitro and in vivo study of ^{99m}Tc -MIBI encapsulated in PEG-liposome: a promising radiotracer for tumor imaging. *Eur. J. Nucl. Molec. Imaging*, 30: 502-509.
- Chanda Mithu, Suzuki Kentaro, Chang-Sok Oh, Mendez Richard, Kurihara Hiroaki, Dong-fang Yu, Kohanim Saady, Gelovani Jerry y Yang David; 2008 . Synthesis, biodistribution, and imaging of ^{68}Ga -DTPA-BP in normal and bone metastasis rodent models. *J. Nucl. Med., Meeting Abstracts* 49: 289.
- Dams E., Oyen W., Boerman O., Storm G., Laverman P., Kok P., Buijs W., Bakker H., Van der Meer J. y Corstens F.; 2000. ^{99m}Tc -PEG Liposomes for the Scintigraphic Detection of Infection and Inflammation: Clinical Evaluation. *J. Nucl. Med.*, 41: 622-630.
- Fenske D. B., Maurer N., y Cullis, P. R.; 2003. Encapsulation of weaklybasic drugs, antisense oligonucleotides, and plasmid DNA within large unilamellar vesicles for drug delivery applications. In *Liposomes: A Practical Approach*, 167-91 (V. P. Torchilin and V. Weissig, eds.) Oxford University Press, Oxford, UK.
- Gann Ting, Chih-Hsien Chang, Hsin-ElWang, y Te-Wei Lee; 2010. Nanotargeted Radionuclides for Cancer Nuclear Imaging and Internal Radiotherapy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 953537, 17.
- Ganta S., Devalapally H., Shahiwala A. y Amiji M.; 2008. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery, *J Cont Release*, 126(3):187-204.
- Goyal P., Goyal K., Kumar S.G., Singh A., Katare O.M.P. y Mishra D.N.; 2005. Liposomal drug delivery systems. *Clinic. Appl. Acta. Pharm.*, 55: 1-25
- Hamoudeh M., Kamleh M. A., Diab R., y Fessi H; 2008. Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(12)1329–1346.
- Harashima H., Kume Y., Yamane C. y Kiwada H.; 1993. Kinetic modeling of liposome degradation in blood circulation. *Bioph & Drug Dispo*, 14: 265-270.
- Harrington K. J., Mohammadtaghi S., Uster P. S. y col.; 2001.Efective targeting of solid tumors in patients with locally advanced cancers by radiolabeled pegylated liposomes. *Clinical Cancer Research*, 7(2): 243–254.

Hauser W., Atkins H. L., Nelson K. G., y Richards P.; 1979. Technetium-99m-DTPA: A New radiopharmaceutical for Brain and Kidney Scanning. *Radiology*, 94:679-684.

Hwang K.J., Luk K. y Beaumier P; 1980. Hepatic uptake and degradation of unilamellar sphingomyelin/cholesterol liposomes: A kinetic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030-4034.

Irma A.J.M., Bakker-Woudenberg; 2002. Long-circulating sterically stabilized liposomes as carriers of agents for treatment of infection or for imaging infectious foci. *Intern. J. Antimicrob. Agents.*, 19 :299-311.

Ishida O., Maruyama K., Sasaki K. y Iwatsuru M.; 1999. Size-dependent extravasation and interstitial localization of polyethyleneglycol liposomes in solid tumor-bearing mice, *Inter. J. Pharma.*, 190: 49-56.

Jasanada François, Urizzi Pascale, Souchard Jean-Pierre, Le Gaillard Francis, Favre Gilles, y Nepveu Françoise; 1996. Indium-111 Labeling of Low Density Lipoproteins with the DTPA-Bis (stearylamine): Evaluation as a Potential Radiopharmaceutical for Tumor Localization. *Bioconjugate Chem.*, 7 (1): 72–81.

Koukourakis M.I., Koukouraki S., Fezoulidis I., Kelekis N., Kyrias G., Archimandritis S. y Karkavitsas N.; 2000. High intratumoural accumulation of stealth® liposomal doxorubicin (Caelyx®) in glioblastomas and in metastatic brain tumour. *British Journal of Cancer*, 83(10):1281–1286.

Laverman P., Carstens M., Boerman O., Dams E., Oyen W., Rooijen N., Corstens F., y Storm G.; 2001. Factors Affecting the Accelerated Blood Clearance of Polyethylene Glycol-Liposomes upon Repeated Injection. *JPET*, 298:607–612.

Laverman P., Brouwers A., Dams E., Oyen W., Storm G., Rooijen N.V., Cortens F. y Boerman O.; 2000. Preclinical y Clinical Evidence for Disappearance of Long-Circulating Characteristics of Polyethylene Glycol Liposomes at Low Lipid Dose. *J. Pharma. Exp. Ther.*, 293:996-1001.

Lingappa Mohanambe, Song Hong, Thompson Sarah, Bruchertseifer Frank, Morgenstern Alfred, y Sgouros George; 2010. Immunoliposomal Delivery of ²¹³Bi for α -Emitter Targeting of Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res*, doi:10.1158/0008-5472.

Mathias Carla J., Hubers David, Low Philip S. y Green Mark A.; 2001. Synthesis of [99mTc]DTPA-Folate and Its Evaluation as a Folate-Receptor-Targeted Radiopharmaceutical. *Bioconjugate Chem.*, 11 (2):253–257.

Mitra A., Nan A., Line B. R., y Ghandehari H.; 2006. Nanocarriers for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 12(36): 4729–4749.

Ogihara-Umeda Izumi, Sasaki Ton, Shuji Kojima y Nishigori Hideo; 1996. Optimal Radiolabeled Liposomes for Tumor Imaging. *The Journal of Nuclear Medicine*, 37 (2): 326-332.

Papahadjopoulos D., Allen T. M., Gabizon A., Mayhew E., Huang S. K., Lee K.D., Woodle M.C., Lasic D.D. y Redemann C.; 1991. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 11460-11464.

Phillips W.; 1999. Delivery of gamma-imaging agents by liposomes, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 37: 13-32.

Reddy, L.H., Sharma, R.K., Chuttani, K., Mishra, A., Murthy, R.S.R.; 2005. Influence of administration route on tumour uptake and biodistribution of etoposide loaded solid lipid nanoparticles in Dalton's lymphoma tumor bearing mice. *J. Control. Release*, 105: 185-198.

Reimer P., Rummeny E. J., Daldrup H. E., Hesse T., Balzer T., Tombach B. y Peters P.E; 1997. Enhancement characteristics of liver metastases, hepatocellular carcinomas, and hemangiomas with Gd-EOB-DTPA: preliminary results with dynamic imaging. *Eur. Radiol.*, 2: 275-280.

Richardson V.J., Jeyasingh K., Jewkes R.F., Ryman B.E.; 1977. Properties of [^{99m}Tc] technetium labelled liposomes in normal and tumor bearing rats. *Biochem.Soc.Trans.*, 5: 290-291.

Shokeen M., Fettig N. M., y Rossin R; 2008. Synthesis, in vitro and in vivo evaluation of radiolabeled nanoparticles. *Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 52: 267-277 .

Storm G., Belliot S.O., Deamen T., Lasic D.D.;1995.Surface modification of nanoparticles to oppose up take by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug. Del. Rev.*, 17:31-48.

Tiwari Sandip B.; Amiji Mansoor ; 2006. A Review of Nanocarrier-Based CNS Delivery Systems, *Current Drug Delivery*, 3:219-232.

Vladimir P Torchilin y Wolkmar Weissig (2003) Encapsulation of weakly- basic drugs, antisense oligonucleotides and plasmid DNA within large unilamellar vesicles for drug delivery applications (David B Fenske, Norbert Maurer y Pieter R Cullis)pp167-188, *Liposomes*,Oxford University press/Oxford New York.

Yuan F.G., Leunig M., Huang S.K., Berk D.A. y Papahadjopoulos D.; 1994. Microvascular Permeability and Interstitial Penetration of Sterically Stabilized (Stealth) Liposomes in a Human Tumor Xenograft. *Cancer Res.*, 54; 3352.

Maestría en Química

Lic. Mirel Cabrera

Capítulo 2

“HYNIC-Liposomas y sus análogos estéricamente estabilizados marcados
con ^{99m}Tc ”

Director Dra. Henia Balter

Área de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, 2009-2011

2.1. Introducción

En el desarrollo de nuevos radiofármacos de diagnóstico, la principal premisa es la capacidad de incorporar radionucleídos disponibles con características óptimas de decaimiento en las moléculas trazadoras. Con respecto a esto, el ^{99m}Tc se ha convertido en el radionucleido más ampliamente utilizado como se mencionó en la introducción general (Jurisson S.S., Lydon J.D., 1999) y algunas formas químicas de éste se emplean en el diagnóstico a través de imágenes realizadas anualmente en la mayoría de los hospitales (Nicolini M., Mazzi U., 2002).

Sin embargo, una desventaja del ^{99m}Tc , es su química dado que es un metal, en oposición al ^{123}I y al ^{18}F no puede directamente sustituir un átomo de hidrógeno de la biomolécula, así como tampoco puede remplazar otros componentes comunes de las moléculas orgánicas como ser C, O ó N. En consecuencia, en el diseño de agentes de diagnóstico por lo general conlleva un importante desarrollo en la química de coordinación del radiometal.

En el mismo sentido, el diseño de los radiofármacos con ^{99m}Tc requiere de nuevas estrategias de marcado que apunten al mantenimiento de la actividad biológica ya que esta puede verse enormemente afectada por la presencia de un complejo de tecnecio; por lo tanto, el sitio de acción, tamaño, carga y lipofilicidad del conjugado y también la longitud del espaciador, son todos aspectos que deben ser tenidos en cuenta para optimizar al máximo la unión al blanco (Liu S.; Edwards, DS, 1999). Los radionucleidos metálicos son de particular interés en el desarrollo de radiofármacos debido a su amplio rango de propiedades y su gran capacidad de coordinación. Varias estrategias de marcado se han desarrollado para permitir la unión del ^{99m}Tc a diferentes biomoléculas. Dentro de las estrategias de marcado podemos distinguir entre: marcado directo, método de los quelantes preformados y marcado indirecto mediante el uso de agentes bifuncionales (BFC) (Liu S., 2005). La elección del agente bifuncional está determinada por la naturaleza y estado de oxidación del radionucleido. En este sentido, un derivado azaheterocíclico de 6-Hidrazinopiridina, conocido como HYNIC, es ampliamente utilizado como agente bifuncional en la síntesis de radiofármacos con ^{99m}Tc (Figura 2.1). Este último consiste en la formación de un complejo biomolécula-BFC, que luego es marcado directamente con $^{99m}\text{TcO}_4^-$, en presencia de un agente

reductor (generalmente $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y un coligando (tricina, EDDA y ácido nicotínico entre otros) (Meszaros, L.K. y col., 2010). Las ventajas de utilizar HYNIC como BFC son su alta eficiencia de marcado y el hecho de que se pueden lograr altas actividades específicas.

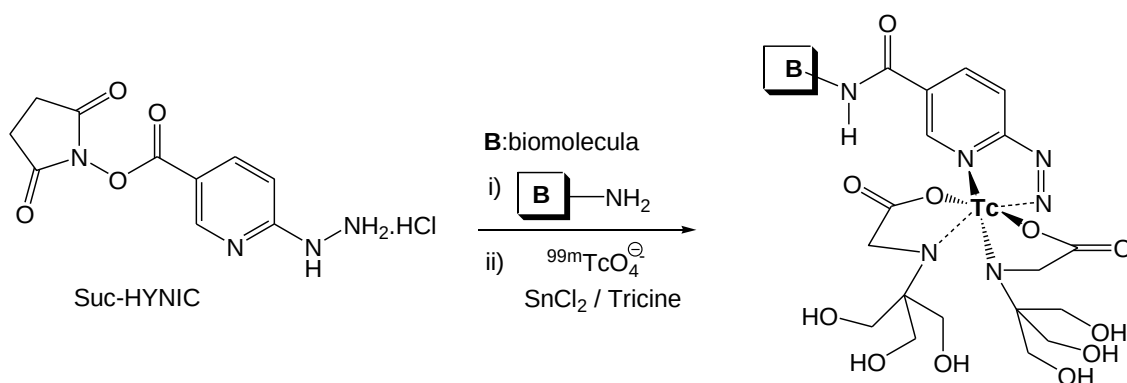


Figura 2.1. Formación del complejo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-tricina. En este caso se representa a HYNIC como un ligando bidentado.

Estudios llevados a cabo hasta el momento proponen que HYNIC actuaría como un ligando monodentado (coordinación con el átomo de N del grupo hidrazina) y/o bidentado (coordinación con los átomos de N del grupo hidrazina y anillo de piridina), siendo en ambos casos el resto de los sitios de coordinación ocupados por los átomos provenientes del co-ligando (Abrams M. J. y col., 1990). Esto generalmente resulta en la formación de una mezcla de complejos de coordinación junto al co-ligando apropiado, mediante la formación de mezcla de isómeros. Por ejemplo un complejo formado por un ligando ternario $[\text{Tc}(\text{HYNIC-BM})(\text{tricina})(\text{TPPTS})]$, HYNIC actúa como ligando monodentado debido a la presencia de los coligandos tricina y trifenil fosfina (Liu S y col., 1999). Debido a la naturaleza asimétrica de la unión de la tricina tridentada al $^{99\text{m}}\text{Tc}$, diferentes isómeros de coordinación pueden llegar a formarse (Figura 2.2). Si HYNIC actúa como ligando monodentado en el complejo se pueden formar diferentes isómeros conformacionales debido a la libre rotación en el agente quelante. Esto podría explicar la presencia de tres diferentes isómeros, los cuales se interconvierten en solución a temperaturas elevadas.

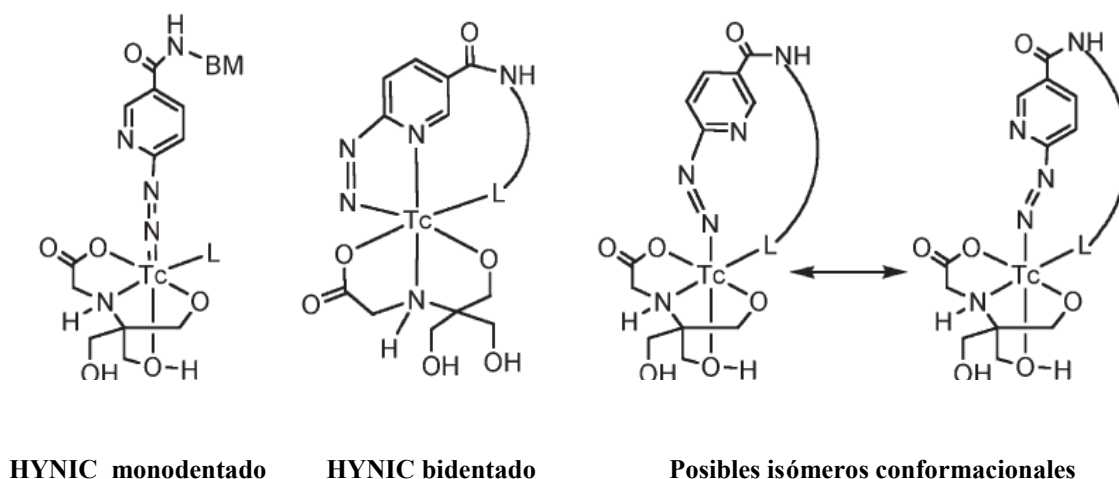


Figura 2.2. Posibles estructuras de complejos ^{99m}Tc -HYNIC-Tricina (Liu Shuang, 2005)

La tricina es uno de los co-ligandos más utilizados debido a la generación de complejos con alta pureza radioquímica, actividades específicas altas (al tratarse de péptidos) en un tiempo de reacción corto (Babich, J.W y col., 1995). En este sentido, la tricina se ha utilizado para realizar marcaciones con ^{99m}Tc a través de HYNIC de distintos polipéptidos, anticuerpos monoclonales (Steffen M. G y col., 1999), seroalbumina humana (Verbeke K. y col., 1995), fragmentos Fab's (Ultee M. E. y col., 1997), anexina V (Blankenberg F. G. y col., 1998) y péptidos quimiotácticos (van der Laken C. J. y col., 1997). Se ha propuesto que el estado de oxidación del ^{99m}Tc en el complejo es +5 (Larson S.K. y col, 1995).

El 3-*N*-Hidroxisuccinimidil carbonil-6-hidrazinopiridina (Suc-HYNIC, Figura 2.1), que presenta un agrupamiento éster activado para la unión a grupos aminos de la biomolécula, constituye uno de los más atractivos agentes bifuncionales que se utiliza hoy en día para la marcación de diversas biomoléculas con ^{99m}Tc , ya sea para la visualización de tumores, sitios de infección y trombosis (Masahiro Ono y col., 2001). Un ejemplo de ello lo constituye el $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{HYNIC-TOC})(\text{EDDA})_n]$, el cual se encuentra en fase clínica como un radiofármaco para el diagnóstico de tumores positivos para el receptor de somastotatina (Libo Chen y col., 2009). En los últimos años los sistemas con el complejo terciario (HYNIC-BM, tricina, y TPPTS) se han utilizado como una plataforma tecnológica para el marcado con ^{99m}Tc de una

gran variedad de pequeñas biomoléculas. Esto incluye el antagonista del receptor de plaquetas GPIIb/IIIa para imágenes de trombosis, péptidos quimiotácticos, antagonistas de receptor de LTB₄, IL-8 para la detección de infección e inflamación y análogos de somatostatina para adquisición de imágenes tumorales. Cabe destacar que en el caso del antagonista del receptor de LTB₄ también se ha marcado con ¹⁸F a través de la formación de una hidrazona permitiendo así la adquisición de imágenes PET de los sitios de infección. (Huub J.J.M. Rennen y col., 2007).

Cuando se hace reaccionar por ejemplo a Suc-HYNIC con una biomolécula (por ej. proteína, poli péptido ó glicopéptido) en un medio neutro o levemente básico, HYNIC reacciona con grupos nucleofílicos como ser los ε-aminos de los residuos de lisina o residuos *N*-terminal, con la formación de un conjugado que presenta grupos hidrazinopiridina libres.

Un grupo hidrazino libre presente tanto en derivados de HYNIC como en conjugados HYNIC-biomolécula presenta una alta susceptibilidad a dar reacciones de oxidación por acción de la luz. Debido a este tipo de reacciones las cuales pueden provocar la descomposición del agente bifuncional, este debe ser almacenado a bajas temperaturas en frascos ámbar y preferentemente bajo la forma de una sal (generalmente clorhidrato o trifluoroacetato). En el mismo sentido, un grupo hidrazino libre es altamente nucleofílico, por lo que puede dar reacciones con moléculas electrófilas. Por ejemplo reacciones con aldehídos y cetonas presentes en muchos materiales plásticos y consigo mismo en el caso del derivado Suc-HYNIC, el cual presenta un agrupamiento éster activado en su estructura, conduciendo a reacciones de polimerización.

Este tipo de reacciones no deseadas puede hacer muy difícil mantener la pureza y estabilidad del complejo HYNIC-biomolécula durante el proceso de síntesis. Para prevenir la descomposición o degradación del conjugado se han logrado sintetizar diferentes derivados de HYNIC los cuales presentan al grupo hidrazino adecuadamente protegido. Los principales grupos protectores utilizados en este sentido son el *t*-butoxicarbonil (Boc), trifluorometilcarbonil (TFA) y agrupamientos hidrazona (Figura 2.3). (Harris T.D. y col., 1998). La formación de hidrazonas como grupos protectores utilizados en la formación de conjugados de HYNIC-biomolécula tiene como ventaja que su formación puede darse eficientemente en un medio anhidro y posteriormente durante el proceso de radiomarcado en medio acuoso se lleva a cabo la desprotección y

formación del complejo con ^{99m}Tc vía hidrazino libre en un solo paso (Figura 2.4) (Edwards DS y col., 1999). El rendimiento de la formación del complejo entre el ^{99m}Tc con el ligando bifuncional y co-ligando depende ampliamente de la cinética de la hidrólisis de la hidrazona, así como de la concentración total del conjugado de HYNIC-biomolécula en la mezcla de reacción. Cuanto mayor sea el grado de hidrólisis de la hidrazona, mayor será el número de grupos hidrazino libres disponibles para coordinarse al ^{99m}Tc , por tanto aumentara el rendimiento de marcado del complejo formado con ^{99m}Tc . Sin embargo la hidrólisis no necesita ser completa, dado que hay comúnmente 50-100 equivalentes del conjugado Biomolécula-HYNIC-hidrazona en exceso por equivalente de tecnecio en la reacción.

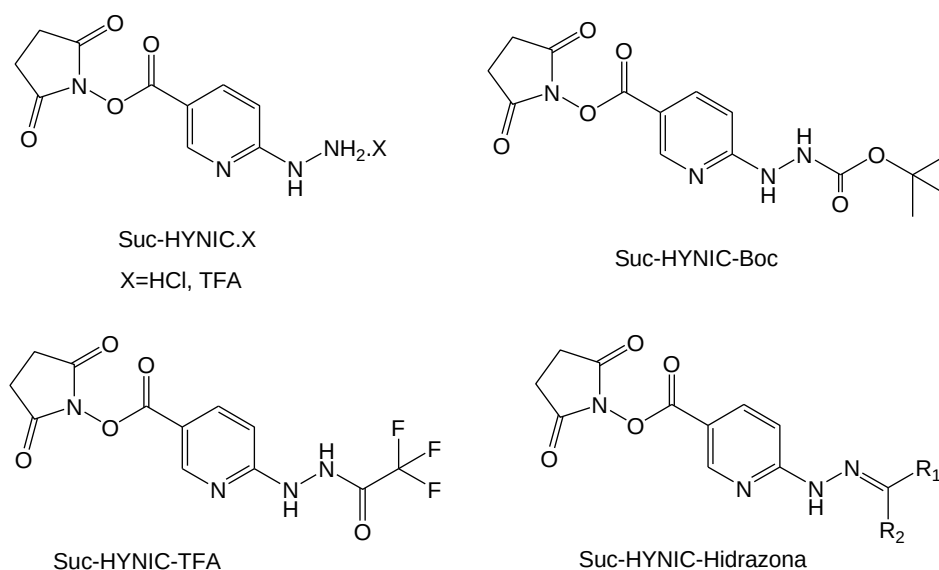


Figura 2.3. Principales grupos utilizados en la protección el grupo hidrazino.

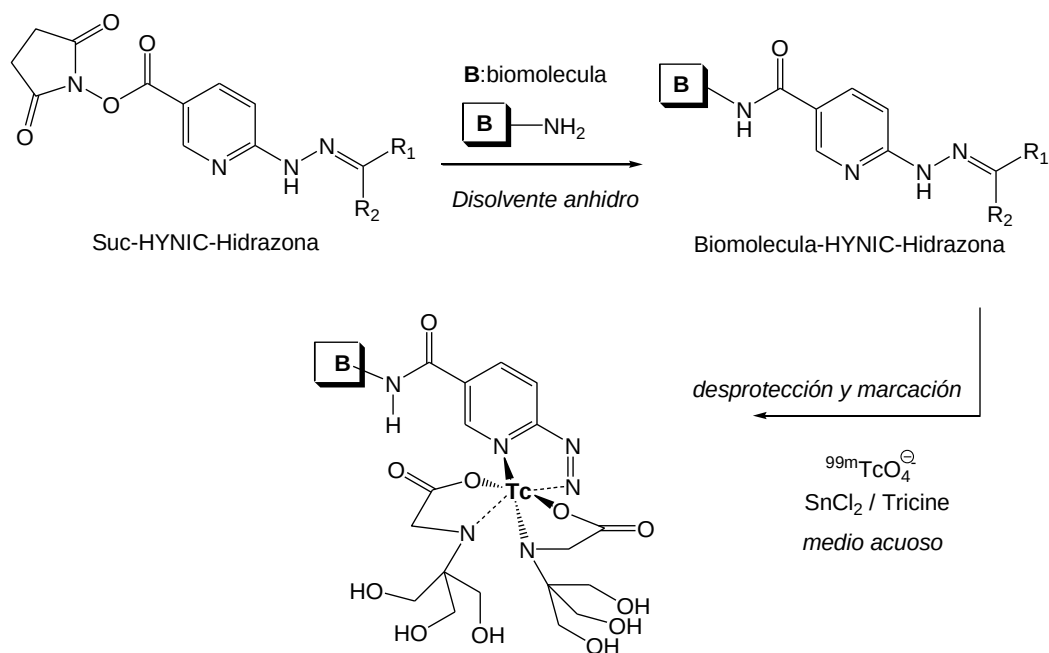


Figura 2.4. Desprotección y marcación con ^{99m}Tc de HYNIC- biomolécula utilizando tricina como coligando.

En el caso específico de marcación de liposomas Laverman y col. desarrollaron la marcación de éstos a través de un derivado de HYNIC conjugado a distearoil fosfatidiletanolamina (DSPE), el cual es agregado a la formulación del liposoma durante su manufactura. (Peter Laverman y col., 1999). En el caso de esta tesis una de las estrategias elegidas para la marcación de liposomas con ^{99m}Tc fue a través de un derivado de Suc-HYNIC-hidrazona conjugado a estearilamina (Figura 2.5).

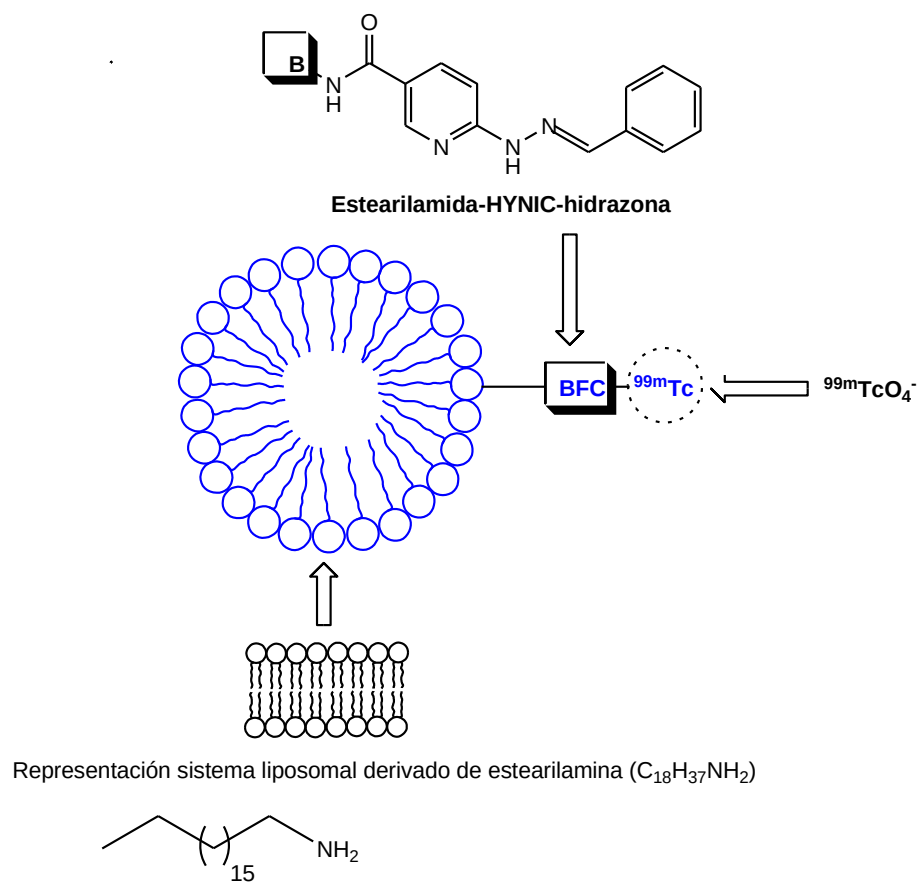


Figura 2.5. Estrategia de marcación de los liposomas a través de HYNIC-estearilamadia

2.2. Desarrollo experimental

2.2.1. Síntesis Orgánica

2.2.1.1. Generalidades

En este capítulo se detallan los procedimientos experimentales de obtención de los compuestos intermediarios y final de 6-(2-benzilidenhidrazinil)-N-estearil nicotinamida y el análisis espectroscópico de los compuestos obtenidos por síntesis orgánica convencional.

Los grados de avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinan por Cromatografía en Capa Fina (CCF). Se usa sílicagel con indicador fluorescente sobre placas de poliéster (Alugram® Sil G/UV254) u óxido de aluminio con indicador fluorescente sobre placas de poliéster (Poligram® Alox N/UV254). Las fases móviles usadas han sido mezclas (en distintas proporciones) de acetato de etilo y éter de petróleo, éter etílico y éter de petróleo y diclorometano y metanol.

Los cromatogramas se revelan por alguno de los siguientes métodos:

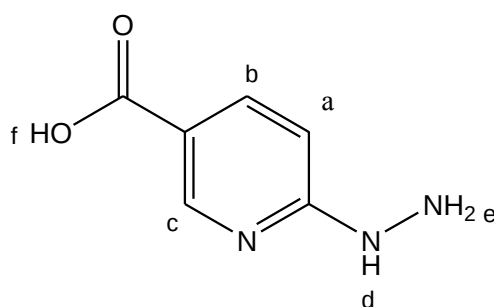
- Exposición a la luz ultravioleta (254 nm).
- Exposición a vapores de yodo
- Asperjado con una mezcla de etanol: ácido sulfúrico: anisaldehído (95:4:1) (v/v/v) y posterior quemado.

Para las Cromatografía en Columna (CC), se utiliza sílicagel (Kieselgel, tamaño 0.063-0.2 mm, J. T. Baker) o alúmina (Merck, 70-230 mesh)

Los espectros de ^1H -RMN se realizan en un equipo Bruker DPX 400 (400 MHz) utilizando los disolventes indicados en cada caso y Tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico son descritos en unidades de δ (ppm) y las multiplicidades según s: singulete, d: doblete, dd: doblete de doblete, t: triplete, c: cuarteto, q: quinteto, m: multiplete, sa: señal ancha.

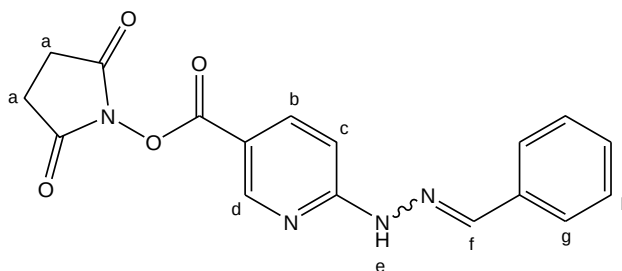
2.2.1.2. Síntesis de Estearilamida-HYNIC-hidrazona

3-Carboxi-6-hidrazinopiridina (2). Una mezcla de Acido 6-cloronicotínico (1) (2g, 12.75 mmol) e hidrazina monohidratada (13 mL, 0.135 mol) se calienta a 100 °C durante 4 hs. La mezcla se enfría y se destila a presión reducida para dar un sólido blanco. El sólido se disuelve en la mínima cantidad de agua y se acidifica a pH 5.5 por el agregado de HCl 12M. El precipitado formado se filtra a vacío, se lava con etanol, éter y se coloca en desecador durante 24 hs, obteniéndose 1.6 g (77 %) de un sólido color crema, el cual se utiliza en el próximo paso sin otra purificación. ^1H NMR (DMF) δ : 7.09 (d, $J = 9.2$ Hz, 1Ha), 8.00 (dd, $J_1 = 2.4$ Hz, $J_2 = 7.6$ Hz, 1Hb), 8.62 (d, $J = 2.4$ Hz, 1Hc), 8.55 (d, $J = 2.4$ Hz, 1Hd), 9.90 (d, $J = 1.2$ Hz, 1Hf). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 105.87 (C-5), 114.94 (C-3), 139.07 (C-4), 151.09 (C-2), 160.61 (C-6), 167.26 (COOH).

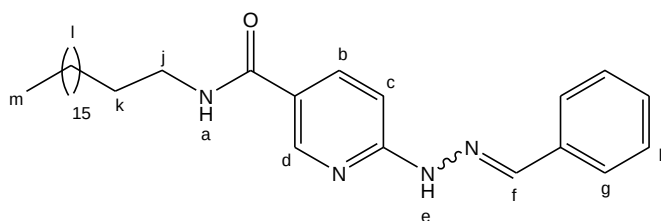


3-N-Hidroxisuccinimidilcarbonil-6-(2-benziliden)hidrazinilpiridina (4). A una solución de **2** (0.2 g, 1.3mmol) en DMF (6 mL) se le añade benzaldehído (0.14 mL, 1.5 mmol) y se coloca durante 45 minutos a 60 °C con agitación. Seguidamente se agrega DCC (0.148 g, 0.715 mmol) y N-Hydroxisuccinimida (0.075 g, 0.65 mmol) y la mezcla se coloca con agitación a temperatura ambiente durante 12 horas. El DCU formado se filtra y se lava con 3mL de AcOEt. A continuación la fase orgánica se lava con H_2O (40.0 mL) y se lleva a cabo extracciones con AcOEt (8 X10.0 mL). La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 , se filtra y evapora el disolvente a presión reducida. Al residuo obtenido se agregan 3 mL de una mezcla Hexano: AcOEt (1:1) y el precipitado formado se filtra y se coloca en desecador durante 24 h, obteniéndose 58.2 mg (23%) del producto **4** como un sólido color crema. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ : 2.89 (s, 4Ha), 7.39-7.48 (m, 3Hi+h), 7.44 (d, $J = 7.6$ Hz, 1Hc), 7.73 (dd, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz, 2Hg), 8.19 (dd, $J_1 = 2.4$ Hz, $J_2 = 8.8$ Hz, 1Hb), 8.20 (s, 1Hf), 8.81 (d, $J = 2.4$ Hz, 1Hc), 11.86

(s, 1He). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 26.2 (Ca), 105.9 (Cc), 129.5 (Ch+i), 139.8 (Cb), 144.0 (Cf), 152.9 (Cd), 170.9 (CON), 172.7 (COO).



6-(2-benzilidenhidrazinil)-N-estearil nicotinamida (5). A una solución de estearilamina (0.05g, 0.126 mmol) en una mezcla DMSO: Cloroformo (5:1) 6 mL, se añade **4** (0.05g, 0.126 mmol). La mezcla de reacción se coloca en un tubo de teflón cerrado herméticamente y se coloca en la cavidad del reactor de microonda multimodo (WX-4000, EU Chemical Instrument Co) trabajando a una potencia de 100 W por 5 minutos. Seguidamente a la mezcla de reacción se añade H_2O (40mL) y se extrae con AcOEt (6 X10.0 mL). La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 , se filtra y evapora el disolvente a presión reducida. Al residuo obtenido se agregan 3 mL de una mezcla Hexano: AcOEt (1:1) y el precipitado formado se filtra y coloca en desecador durante 24 h, obteniéndose 50 mg de sólido color beige claro. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 0.88 (t, $J = 6.4$ Hz, $\text{Hm}+\text{m}'$), 1.27 (s, $\text{Hl}+\text{l}'$), 1.60-1.73 (m, $\text{Hk}+\text{k}'$), 3.44-3.51 (m, $\text{Hj}+\text{j}'$), 6.01 (sa, $\text{Ha}+\text{a}'$), 7.38-7.45 (m, $\text{Hh}, \text{i}, \text{c}+\text{h}', \text{i}', \text{c}'$), 7.70 (d, $J = 6.8$ Hz, $\text{Hg}+\text{g}'$), 7.83 (s, $\text{Hf}+\text{f}'$), 7.86 (dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.8$ Hz, Hb'), 8.03 (dd, $J = 2.0$ Hz, $J = 8.4$ Hz, Hb), 8.44 (d, $J = 2.0$ Hz, Hd'), 8.56 (d, $J = 1.6$ Hz, Hd), 8.70 (sa, $\text{He}+\text{e}'$). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm): 13.3, 24.6, 29.3, 39.4, 48.8, 106.2, 120.4, 126.1, 128.5, 134.5, 141.0, 145.7, 149.2, 153.5,



2.2.2. Preparación de los liposomas

Dos mezclas de lípidos (Tabla 1) fueron disueltas en una mezcla cloroformo: metanol (2:1). Los solventes fueron evaporados por medio de un rotavapor (Büchi R-124) a 60°C, 120 rpm hasta sequedad. Los lípidos fueron resuspendidos en agua destilada tanto para los estudios in vitro como in vivo. Luego la solución se tomó en una jeringa Hamilton de 1 mL y fue extruida 11 veces a 60°C por un filtro de polycarbonato de 400 nm (Avanti Polar Lipids). Posteriormente se realiza la misma operación pero por un filtro de 100 nm. El tamaño de partícula fue determinado por difracción de luz láser y dispersión de luz polarizada utilizando un analizador de partículas Coulter Counter Multisizer (Coulter Electronics Ltd.), fueron determinados los índices d_{3,2} y d_{4,3}.

2.2.3. Marcado de los liposomas con ^{99m}Tc

2.2.3.1. Solución Sn/tricina

Para la preparación de la solución reductora, todos los solventes empleados fueron previamente purgados con N₂ gas. Se estudiaron las siguientes relaciones de SnF₂ /Tricina 6/7, 6/8 y 9/10 mg/mg, para optimizar el % de marcación.

- a. En dos viales distintos se pesan la tricina y el SnF₂.
- b. Se disuelve la tricina en 0.8 mL de agua.
- c. Se determina el pH de la solución de tricina (debe ser aprox. 4.5) y se desplaza el oxígeno de la misma con corriente de nitrógeno.
- d. Se adiciona 0.05 mL de HCl 2.0 M para acidificar la solución
- e. En el otro vial se solubiliza el SnF₂ en 0.5 ml de HCl 2.0 M y 0.05 mL de esta solución se incorporan al vial que contiene la solución de tricina.
- f. Se adiciona NaCl 0.9% c.s.p 10 mL.

Se adicionó ^{99m}TcO₄⁻ recién eluido y con no más de 24 h de interelución 148-370 MBq (4-10mCi) a la mezcla conteniendo la suspensión liposomal derivatizada con el agente bifuncional (2 mL), el co-ligando y el agente reductor. La mezcla fue incubada con la actividad por 20 min a temperatura ambiente.

El progreso de la reacción fue monitoreado por los sistemas: ITLC/NaCl 0.9%(Rf de ^{99m}Tc -tricina y $^{99m}\text{TcO}_4^- = 0.9-1.0$, mientras Rf de las otras especies =0.0) Whatman 1/2-Butanona (Rf $^{99m}\text{TcO}_4^- = 0.9-1.0$, mientras el Rf de las otras especies =0.0) ; ITLC/Pyr-AcOH-H₂O(Rf de $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}=0.0$ mientras el Rf de las otras especies =1.0). También se realizó una cromatografía de exclusión molecular en PD-10 G-25 Sephadex® con NaCl 0.9 % y eluyendo fracciones de 0,5 mL. La fracción mayoritaria donde se encuentra los liposomas es la que se utilizó para los estudios de biodistribución y centellográficos, previo control de la pureza radioquímica de ésta utilizando los mismos sistemas cromatográficos.

Tabla 2.1. Formulaciones estudiadas

	Formulación (mg)				Nombre para los liposomas
	PC	Colesterol	HYNIC-estearilamina	PE-PEG(5000)	
Liposomas					
Liposomas estéricamente estabilizados	9	4	1	2	HYNIC-PEG-liposoma
Liposomas convencionales	9	4	1	0	HYNIC-liposoma

PC: L- α -Fosfatidilcolina (Soy 95 %) Avanti polar Lipids

Colesterol: colesterol,95-98%.Sigma

PE-PEG(5000): 1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-Fosfoestanolamina-N-[Metoxy(Polietilen glicol)-5000] (Sal de amonio) Avanti polar Lipids

HYNIC-estearilamida obtenida por procedimiento sintético

2.2.4. Estabilidad *in vitro*

Los ^{99m}Tc -liposomas (0.5 mL) preparados como se describió previamente fueron agregados a 0.5 mL de distintas soluciones de L-Cisteína (Sigma) (0.1, 10, 30 mM). Las distintas mezclas se incubaron por 3 horas a 37°C. Una gota (1-2 μL) de mezcla cisteína-liposoma se sembró en los distintos sistemas cromatográficos mencionados previamente a los tiempos de 1 y 3 h. La actividad de cada fracción de la tira fue medida en un contador de centelleo sólido: con un cristal de NaI (TI) 3"x3" acoplado a un detector con analizador monocanal ORTEC.

2.2.5. Estudios de biodistribución y centellografía

Todos los estudios en animales fueron llevados a cabo de acuerdo a las recomendaciones de la CHEA. Un total de 80 animales (C57-black, 6-15 semanas, 18-26 g) fueron utilizados durante el curso del estudio. Para la adquisición de imágenes, se estudiaron 6 animales por clase de liposoma (4 portadores de melanoma inducido con células murinas B16F-1 y 2 normales) a los que se le administró una inyección intravenosa de ^{99m}Tc -liposomas 4.55 ± 0.925 MBq/animal (123 ± 25 μCi /animal). Posteriormente, pasadas 4 horas fueron anestesiados con una inyección intramuscular de Ketamina- Xilazina (100-10 mg/ Kg). Las imágenes fueron adquiridas en una gamma-cámara (Modelo Sophy DSX Sopha Medical, Buc, France); conectada en serie con un sistema computacional (Mirage Segami, Columbia, MD), se calcularon las regiones de interés ROI comparando contra la contra lateral de la región donde se presentaba el tumor.

Los estudios de biodistribución se llevaron a cabo luego de la inyección de ^{99m}Tc -liposomas en ratones portadores de melanoma, así como en ratones normales para cada formulación liposomal a 4h 1.85 ± 0.30 MBq (50 ± 8 μCi) y 24 horas 4.44 ± 1.15 MBq (120 ± 31 μCi). Se utilizaron 8 ratones por punto (4 normales y 4 portadores de melanoma). Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, los tejidos y órganos de interés fueron extraídos, lavados con agua destilada para remover el exceso de sangre y pesados. La actividad fue medida utilizando un contador de centelleo sólido (ORTEC). La radioactividad captada por cada órgano se presenta como porcentaje de dosis inyectada por gramo (%DI/g) de tejido u órgano.

2.2.6. Estudio de variación en la biodistribución dependiente de la dosis

Se realizan estudios de biodistribución en ratones normales C57 black a 1 y 3 horas postinyección de ^{99m}Tc -liposomas 0.37 ± 0.07 MBq (10 ± 2 μCi). Los mencionados ratones se encontraban previamente inoculados (30 min antes) con 0.75 y 1.5 mg de liposomas fríos. Se realizó el estudio con 4 ratones por punto, por cantidad pre inyectada y por formulación liposomal. Luego de transcurrido el tiempo de biodistribución los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, y sus órganos y/o tejidos pesados y medida su actividad. Los resultados se expresan en porcentaje de dosis inyectada (%Act).

2.3. Resultados

2.3.1. Síntesis de Estearilamida-HYNIC-hidrazona

La síntesis del derivado estearilamida-HYNIC-hidrazona **5** se llevo a cabo a través de una metodología descrita en literatura con algunas modificaciones (Figura 2.6) (Harris T. et al, 1999; Abrams y col., 1990).

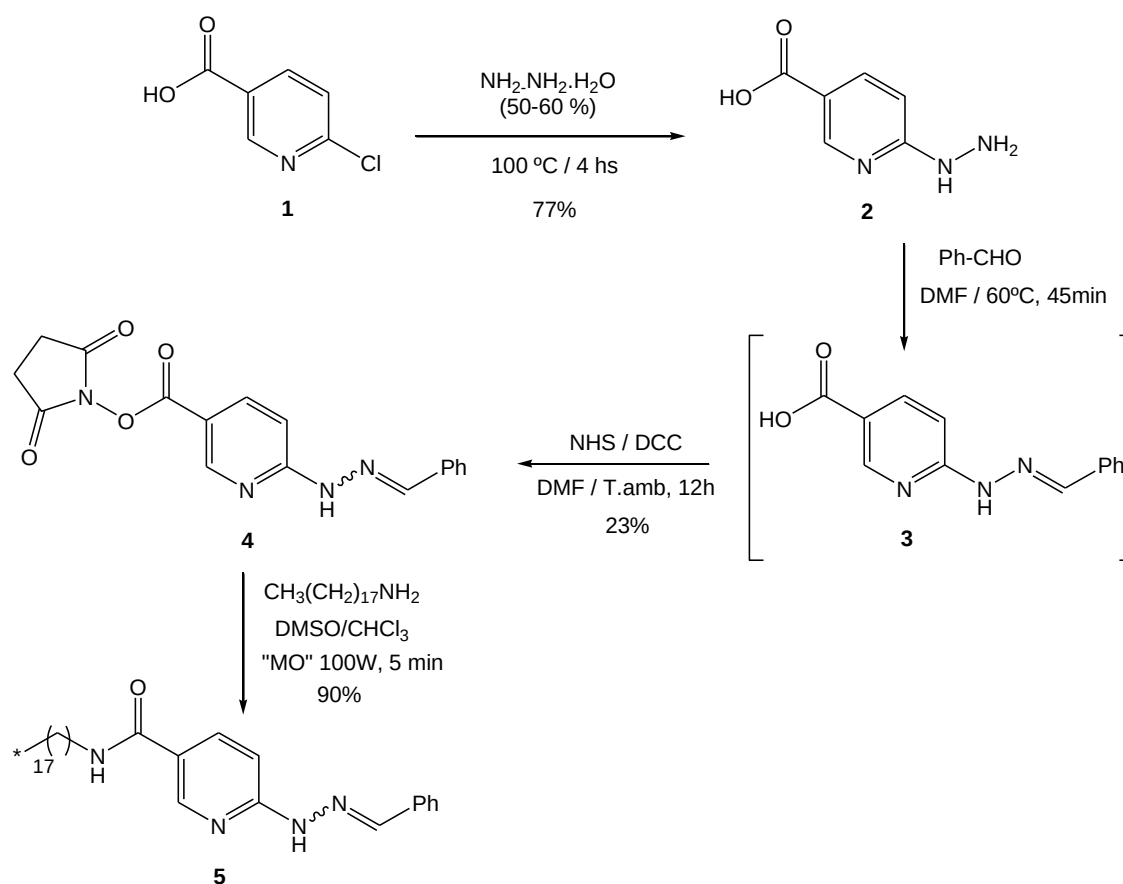


Figura 2.6: Metodología sintética empleada para la obtención de la estearilamida-HYNIC **5**

El primer paso de la síntesis consistió en la obtención del derivado hidrazino piridina **2** mediante una sustitución nucleofílica aromática (S_NAr) donde el átomo de cloro es desplazado por hidrazina. El carbono en posición 6 en el anillo de piridina se encuentra activado en su electrofilia por la presencia de un grupo aceptor de electrones, grupo carboxilo en posición *para*, y por formar parte del sistema heterocíclico. Así, se obtiene el derivado de piridina **2** con buen rendimiento (77%). Seguidamente el grupo hidrazino en **2** es protegido mediante formación de una hidrazona, a través de reacción de condensación del grupo hidrazino con benzaldehído. La reacción fue completa luego de 45 minutos en DMF como disolvente, donde la formación del producto intermedio **3** fue constatada por medio de cromatografía en capa fina.

El paso siguiente consistió en la activación del grupo ácido carboxílico (aumentando la reactividad o electrofilia del carbonilo) por la formación del éster **4**, mediante reacción del ácido **3** en presencia de N-hidroxisuccinimida (NHS) y diciclohexilcarbodiimida (DCC). Bajo estas condiciones el éster activado **4** fue obtenido en bajo rendimiento (23%), lo cual se puede deber a la presencia de agua en el disolvente de reacción, provocando una hidrólisis de la hidrazona y/o del éster activado. El derivado Suc-HYNIC-hidrazona **4** se caracterizó mediante experimento de ¹H-RMN, donde se observan claramente las señales correspondientes a los distintos tipos de protones presentes en las moléculas (Figuras 7a y b). Finalmente la estearilamida **5** se obtuvo en excelente rendimiento por reacción del éster activado **4** en presencia de estearilamina, empleando una mezcla de DMSO/CHCl₃ (5:1) como disolvente. La reacción se llevó a cabo en un corto período de tiempo bajo calentamiento por microonda utilizando un reactor comercial multimodo. La estearilamida **5** se caracterizó mediante experimentos de ¹H-RMN (Figuras 8a y b), de correlación H-H (COSY) y de correlación heteronuclear (HSQC y HMBC). En el espectro de ¹H-RMN del producto **5** se observan, principalmente en la zona de protones aromáticos (Figura 8a), señales correspondientes a una mezcla de isómeros geométricos *trans* y *cis*, con una relación aproximada 2:1.

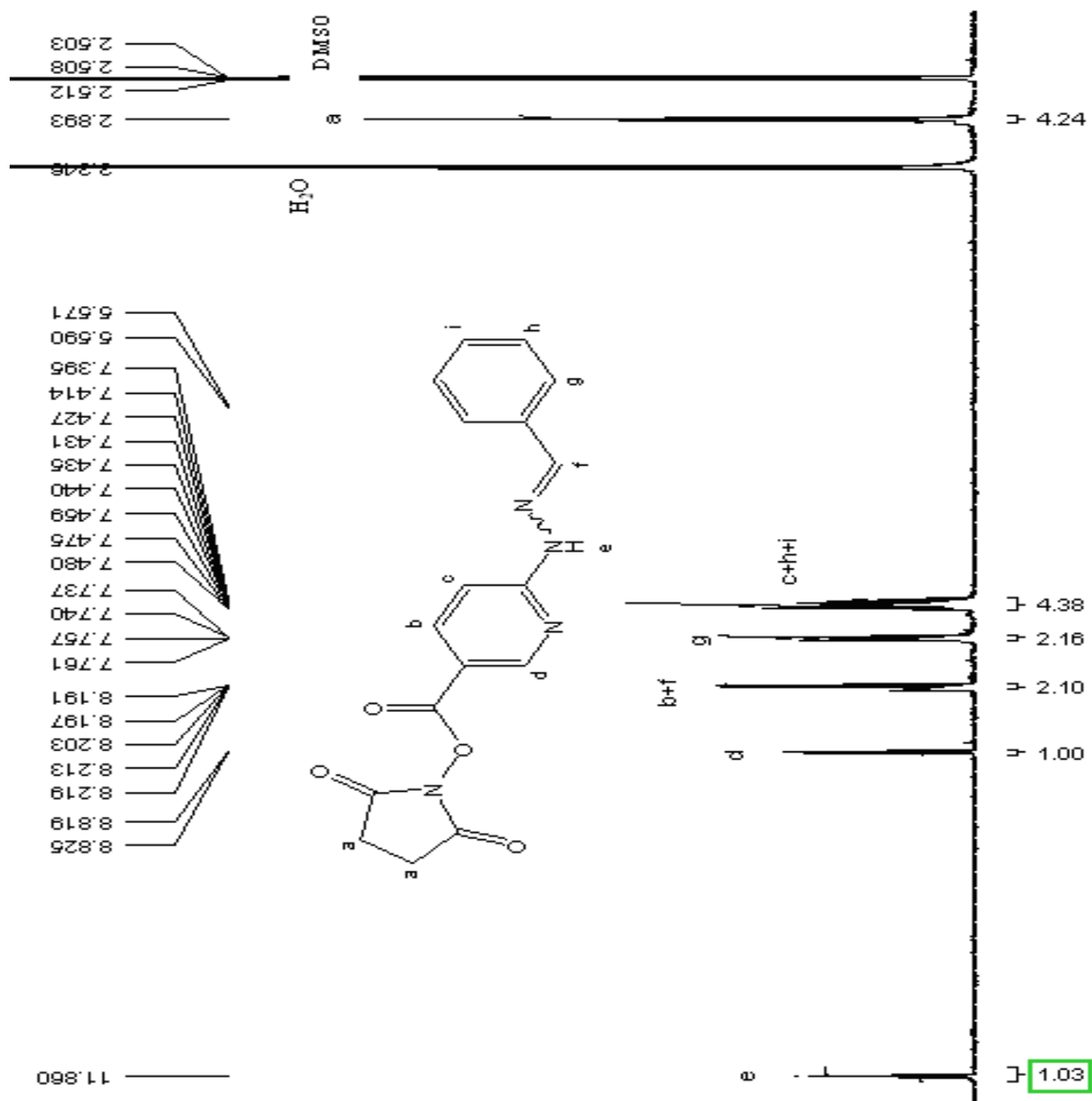


Figura 2.7a: Espectro de ¹H-RMN del derivado 4 en DMSO-d₆.

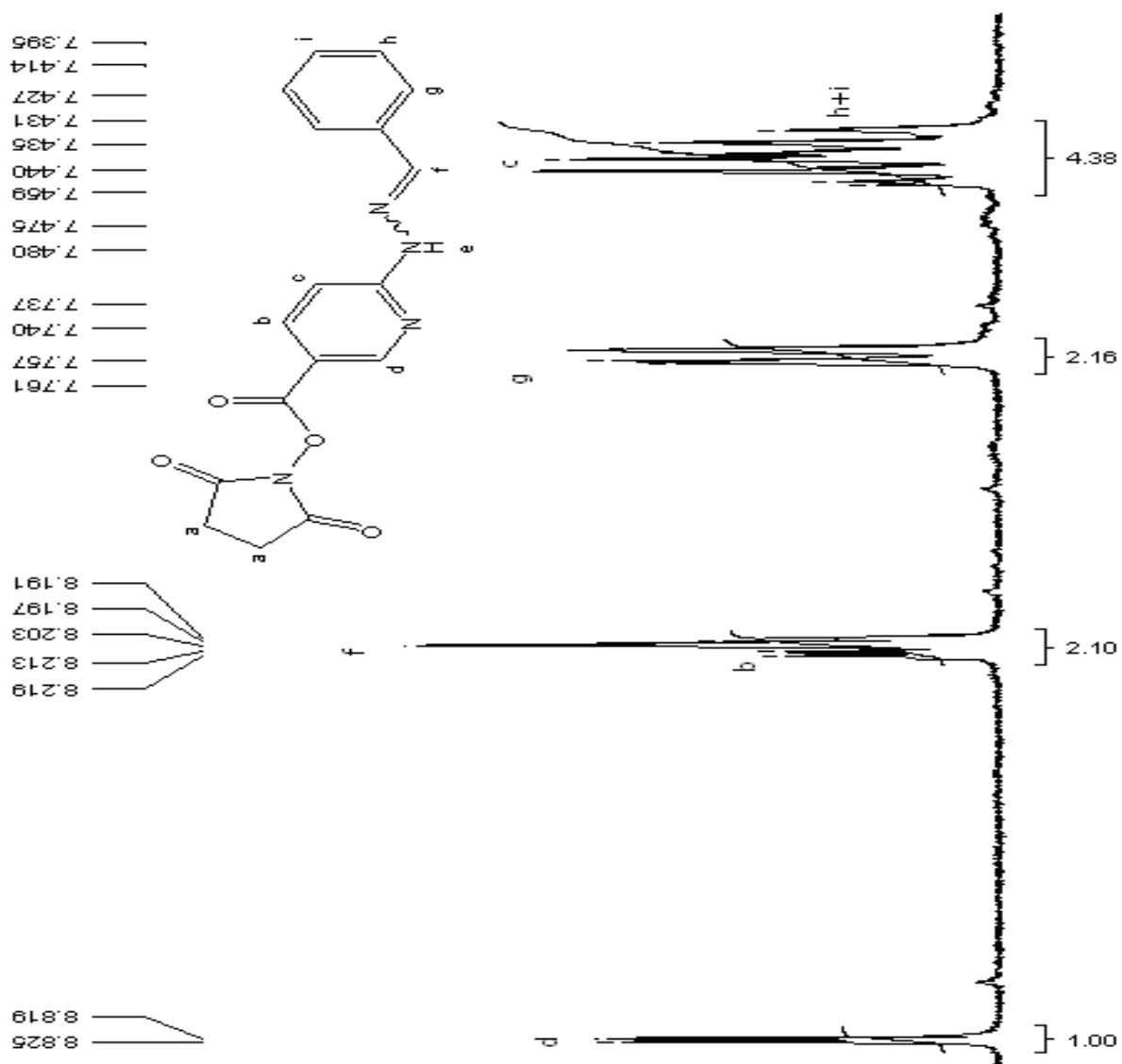


Figura 2.7b: Ampliación del espectro de ^1H -RMN del derivado **4** en DMSO-d_6 correspondiente a la zona entre 7.0-9.0ppm

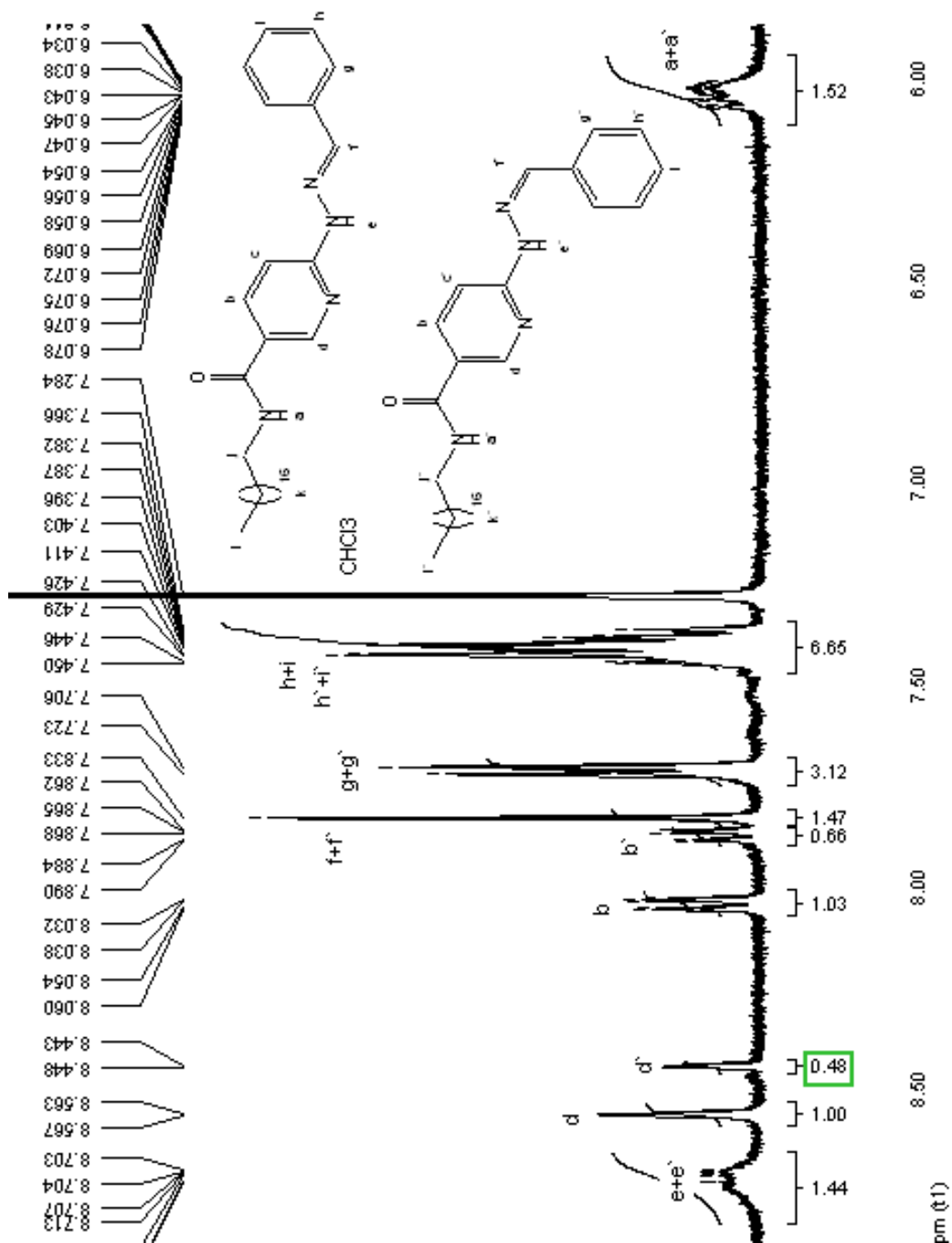


Figura 2.8a: Ampliación del espectro de ^1H -RMN del derivado 5 en CDCl_3 correspondiente a la zona entre 6.0-9.0ppm

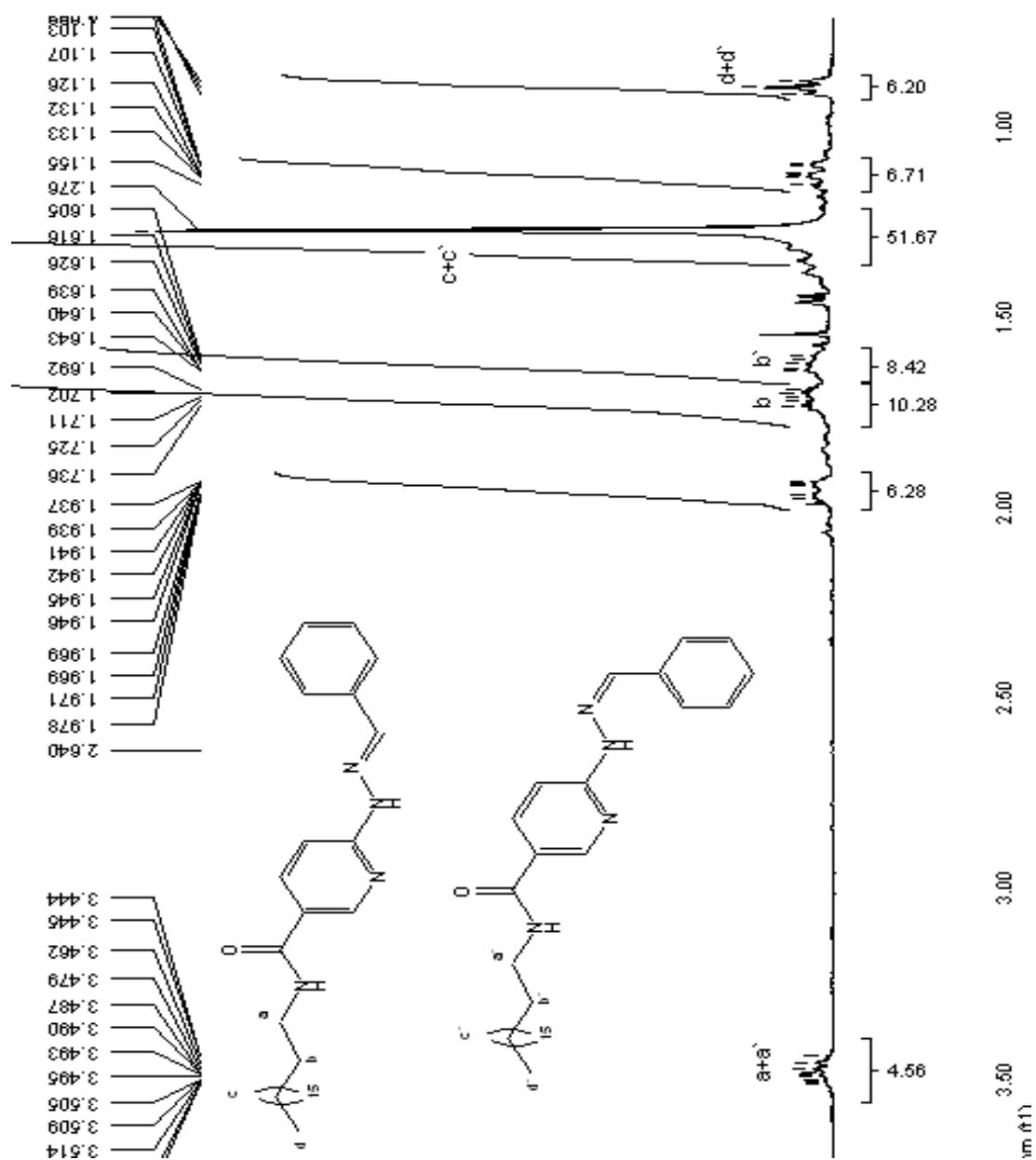


Figura 2.8b: Ampliación del espectro de ^1H -RMN del derivado **5** en CDCl_3 correspondiente a la zona entre 0.0-3.5ppm

2.3.2. Caracterización de liposomas

Los HYNIC-liposomas presentan tamaño nanométrico (figura 2.9) de D 3,2: 0,122, mientras que los HYNIC-PEG-liposomas poseen un tamaño de D 3,2: 0,128

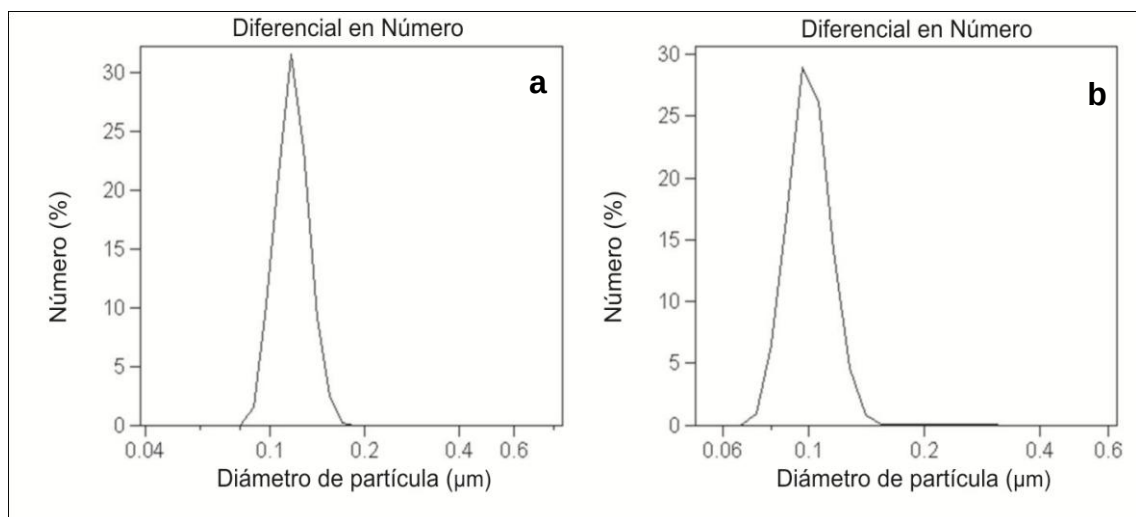


Figura 2.9. Distribución del tamaño de partícula en Coulter Counter Multisizer, de HYNIC-Liposomas (a) y HYNIC-PEG-liposomas (b)

2.3.3. Relación de Tricina/ SnF₂

Se probaron diferentes relaciones de Tricina y SnF₂, y se determinó la pureza radioquímica de las distintas marcaciones a los 20 minutos post marcación. Las mejores relaciones fueron 8/6 y 7/6 mg de Tricina y SnF₂ respectivamente resultando en eficiencias de marcado superiores al 90%, siendo la relación 7/6 la que alcanzó una PRQ del 94%.

Purezas radioquímicas superiores al 86 % fueron observadas en todos los casos, con niveles de actividad entre 148- 259 MBq (4 y 7 mCi).

2.3.4. Controles de estabilidad

Los controles cromatográficos realizados sobre ITLC-SG y Whatman 1 revelaron que tanto el ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas como el ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposomas mantienen una PRQ mayor al 80% a temperatura ambiente, en solución de marcado en un período de 24h. En los controles realizados por exclusión molecular (figura 2.10 y 2.11) para ambas clases de liposomas se presenta un pico mayoritario entorno a las fracciones 6 y 7 donde con los mismos sistemas cromatográficos utilizados previamente se constata la identidad de los liposomas marcados.

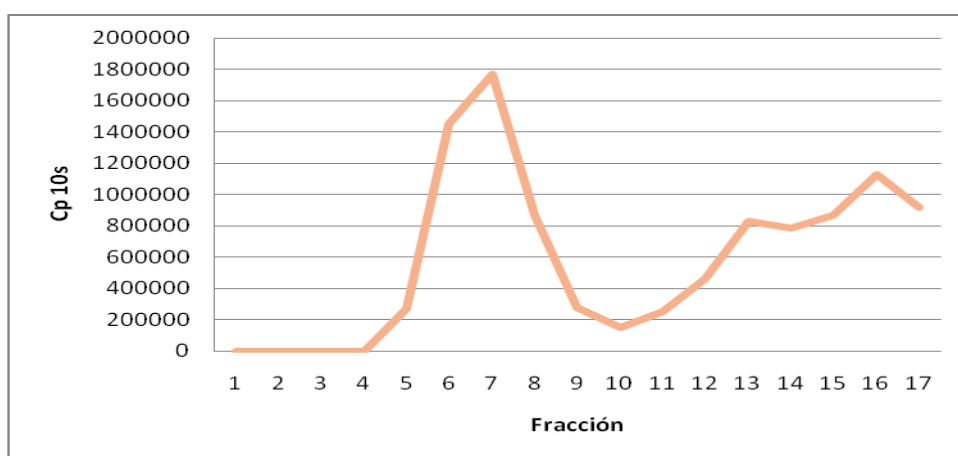


Figura 2.10.Control de marcación de ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas utilizando columna Pd-10 G-25, se eluye con NaCl 0,9 % y se toman fracciones de 0,5 mL.

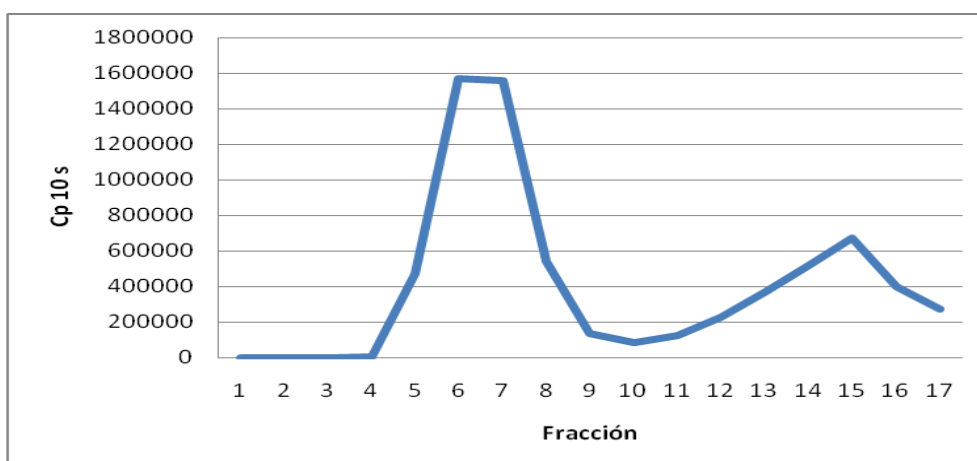


Figura 2.11.Control de marcación de ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposomas utilizando columna PD-10 G-25, se eluye con NaCl 0,9 % y se toman fracciones de 0,5 mL.

2.3.5. Estudio de estabilidad

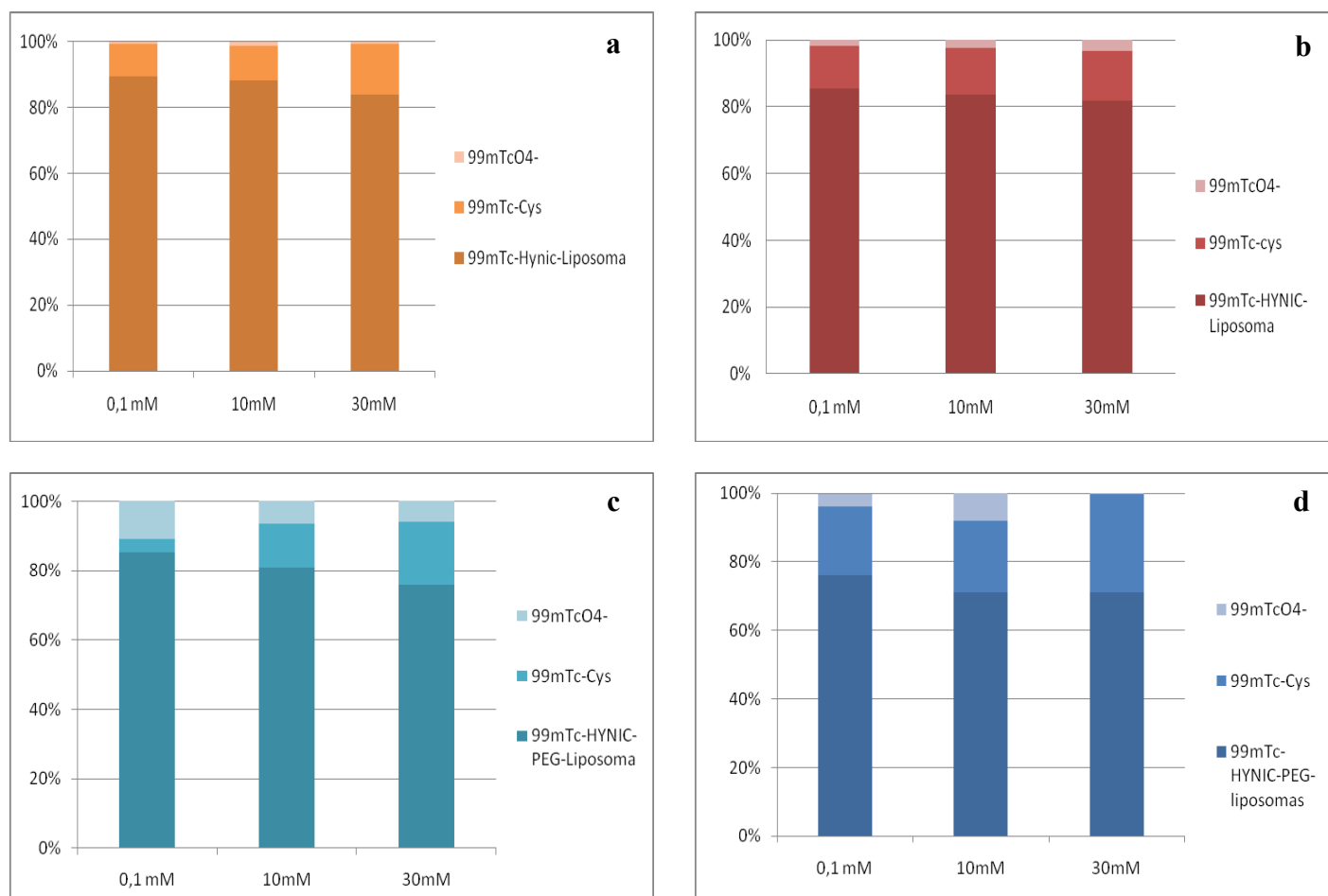


Figura 2.12. Estudio de estabilidad *in vitro* de ^{99m}Tc - HYNIC-liposomas y sus análogos pegilados , frente a concentraciones crecientes de cisteína (0.1, 10 y 30 mM) a 1 y 3 horas. **a:** Estabilidad ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas a 1h.**b:** Estabilidad ^{99m}Tc - HYNIC-liposomas a 3h.**c:** Estabilidad ^{99m}Tc - HYNIC-PEG-liposomas a 1h.**d:** Estabilidad ^{99m}Tc - HYNIC-PEG-liposomas a 3h.

Para el ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas se observa una alta estabilidad incluso para la concentración más alta de cisteína (30 mM), presentando una pureza radioquímica superior al 80% a las 3 horas(figura 2.12) frente a todas las concentraciones ensayadas. Para el ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposomas (se observa que a la hora la PRQ es superior al 80% para las concentraciones de 0.1 y 10 mM de Cisteína, mientras que para la concentración de 30mM es del 76%. A las 3 horas estos liposomas presentan una transquelación superior a la de sus análogos convencionales, mostrando una PRQ superior al 70 % para las tres concentraciones estudiadas, siendo la concentración de

0.1 mM la que presenta una menor transquelación con un 20 %, comparado a un 21% y 29% de las concentraciones de 10 y 30mM respectivamente.

2.3.6. Estudios de biodistribución

Los estudios de biodistribución en ratones normales C57 black para las dos composiciones liposomales se muestran en las figuras 2.13 y 2.14.

Para los liposomas pegilados se observa una caída en el porcentaje de actividad por gramo de sangre de un 63 % a las 24 horas comparada a la actividad en sangre a las 4h;, un aumento en la captación hepática de un 100 % y aumento en bazo ampliamente superior al 100 % al cabo de 24 horas. Para sus pares convencionales derivatizados con HYNIC a las 24 horas post inyección comparado a los valores de 4 h, la depuración sanguínea se ve aumentada en un 25%, la captación en bazo aumenta en un 46% mientras que contrariamente sus análogos pegilados la captación hepática descende en un 30%.

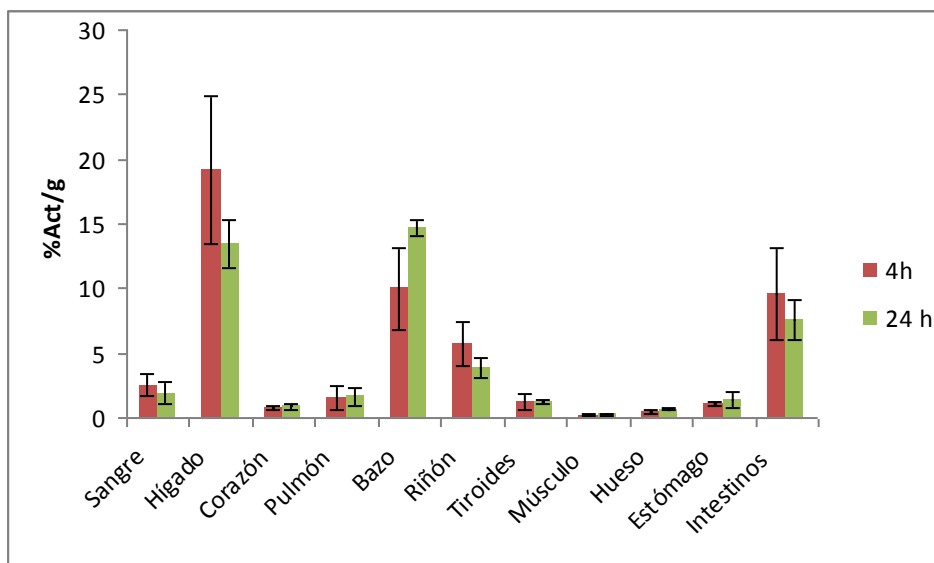


Figura 2.13. Estudio de biodistribución en ratones C57black normales, a distintos tiempos post inyección de ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas. Resultados expresados como %Act/g de tejido u órgano.

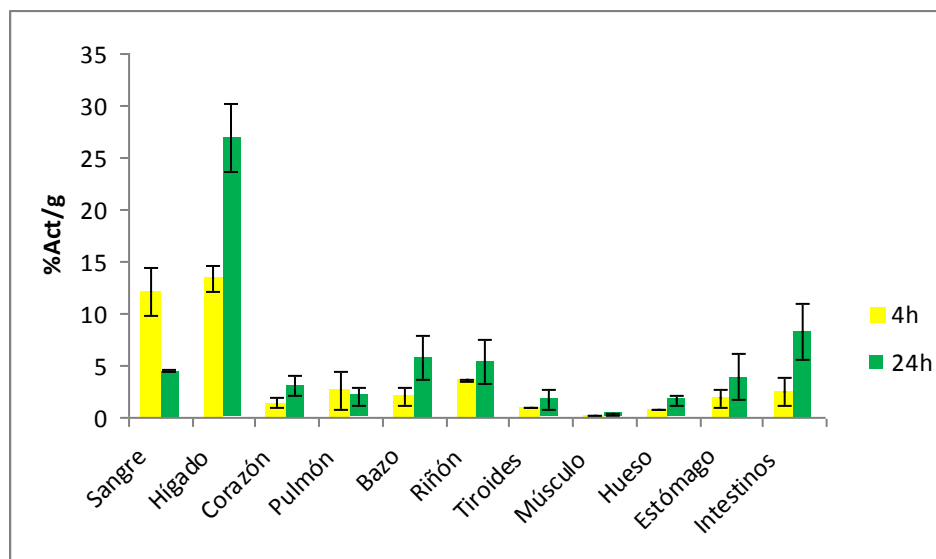


Figura 2.14. Estudio de biodistribución en ratones C57black normales, a distintos tiempos post inyección de ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposomas. Resultados expresados como %Act/g de tejido u órgano.

2.3.7. Estudio de variación de la biodistribución dependiendo de la dosis

Se puede observar (tabla 2.2) ya a la hora un alto clearance sanguíneo de el ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas para cualquiera de las dosis de liposomas fríos administradas.

Para los grupos de ratones con bloqueo se presenta una marcada disminución en la captación hepática respecto al grupo de ratones C57 black sin bloqueo. Una tendencia similar se observa para bazo donde la captación en el grupos sin bloqueo es 2 y 3 veces mayor respecto a los grupos con bloqueo de 0.75 y 1,5 mg respectivamente.

A las 3 horas la captación en hígado en el grupo de ratones sin bloqueo es 1.5 y 3 veces superior en comparación a los grupos con bloqueo de 0.75 y 1.5 mg respectivamente.

Igual tendencia se observa para la captación en bazo, donde los grupos con bloqueo presentan una captación 2 (para el grupo con bloqueo de 0.75 mg) y 5 (grupo con bloqueo de 1.5 mg) veces menor respecto al grupo sin bloqueo.

Con respecto a las relaciones entre la captación hepática y eliminación urinaria transcurridas tres horas, se denota que para los grupos sin bloqueo (52%) y bloqueo de 0.75 mg (35%) la captación hepática es mayor. En cambio en el grupo con una mayor dosis de bloqueo la eliminación urinaria es la vía de eliminación que predomina (34%). También se observa una alta eliminación hepato-biliar a las 3 horas en el grupo con un bloqueo mayor, denotándose en la actividad incrementada en intestino.

Tabla 2.2. Estudio de la variación en la biodistribución ensayando distintas cantidades de liposomas “fríos” previo a la inoculación de ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas en ratones C57black normales. Los resultados se expresan en %Act.

1 hora						
Sin bloqueo			0,75 mg		1,5 mg	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
SANGRE	0,003	0,003	0,012	0,000	0,003	0,000
HIGADO	56,201	3,816	18,495	8,446	22,689	1,900
CORAZON	0,322	0,112	0,346	0,008	0,246	0,070
PULMON	0,383	0,053	1,065	0,218	0,449	0,053
BAZO	3,584	1,125	1,788	1,441	1,106	0,216
RIÑON	2,392	0,226	3,285	0,450	1,713	0,132
TIROIDES	0,357	0,039	1,054	0,195	0,097	0,005
MUSCULO	0,170	0,046	0,115	0,075	0,011	0,006
HUESO	0,179	0,020	0,289	0,008	0,087	0,002
ESTOMAGO	1,933	0,357	4,352	0,783	1,363	0,672
INTESTINOS	3,080	0,040	11,626	0,690	26,890	1,684
vejiga +orina	8,793	2,943	19,498	8,549	26,609	4,763
3 horas						
Sin bloqueo			0,75 mg		1,5 mg	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
SANGRE	0,000	0,000	0,038	0,008	0,001	0,001
HIGADO	51,686	1,635	34,856	5,718	17,357	3,505
CORAZON	0,151	0,035	0,558	0,013	0,152	0,027
PULMON	0,278	0,053	0,962	0,111	0,300	0,022
BAZO	5,636	0,626	2,555	0,386	1,120	0,120
RIÑON	1,364	0,305	2,266	0,483	1,226	0,273
TIROIDES	0,047	0,019	0,594	0,075	0,116	0,026
MUSCULO	0,066	0,017	1,090	0,264	0,012	0,003
HUESO	0,141	0,034	0,510	0,026	0,079	0,006
ESTOMAGO	0,593	0,150	1,464	0,381	0,494	0,041
INTESTINOS	4,960	0,557	9,478	0,264	27,304	0,864
vejiga +orina	21,458	1,384	19,791	3,474	33,696	3,379

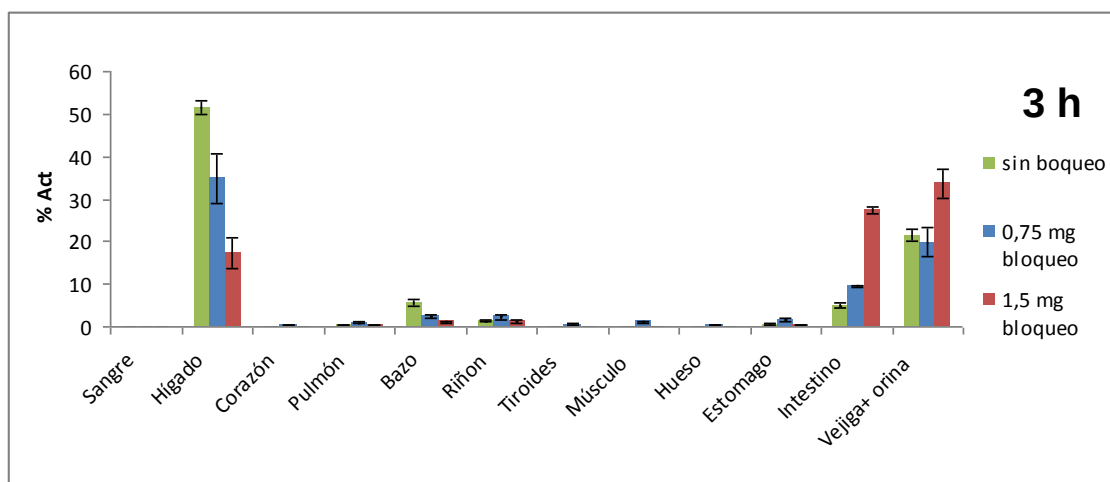


Figura 2.15. Estudio de la variación en la biodistribución ensayando distintas cantidades de liposomas “fríos” previo a la inoculación de ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas en ratones C57black normales. Los resultados se expresan en %Act.

Se puede distinguir que a 1 hora (tabla 2.3) la captación hepática de los no bloqueados es 1.7 y 2.4 veces mayor respecto el grupo de 0.75 y 1.5 mg respectivamente. Una observación similar se realiza en la captación del bazo donde los grupos con bloqueo de 0.75 y 1,5 mg presentan una captación 2.3 y 4.6 veces menor respecto a los no bloqueados.

Se observa que el aumento de eliminación por vía urinaria es más importante que la disminución de la captación hepática si bien esta última es indicativa de un bloqueo efectivo. También se ve incrementada la actividad en intestino en los grupos con bloqueo, pudiendo esto último ser consistente con una eliminación hapatobiliar.

A las tres horas se mantiene la mencionada tendencia, tanto para el grupo de ratones con un bloqueo de 0.75 mg como para los sin bloqueo.

También a las 3 horas se presenta un aumento en la captación de intestino a medida que aumentamos la dosis de liposomas fríos (9,5%, 9,9%, 15,5 % respectivamente).

Tabla 2.3. Estudio de la variación en la biodistribución ensayando distintas cantidades de liposomas “fríos” previo a la inoculación de ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposomas. Los resultados se expresan en %Act.

1hora						
Sin boqueo			0,75 mg		1.5 mg	
Promedio		DS	Promedio		Promedio	
			DS		DS	
SANGRE	0,004	0,001	0,01	0,001	0,001	0,001
HIGADO	35,170	4,301	20,64	3,917	14,538	5,691
CORAZON	0,459	0,090	1,46	0,371	0,182	0,069
PULMON	0,836	0,272	1,25	0,507	0,438	0,237
BAZO	3,733	0,320	1,59	0,517	0,805	0,560
RIÑON	2,392	0,481	4,81	0,529	3,746	1,613
TIROIDES	0,193	0,078	0,38	0,090	0,344	0,058
MUSCULO	0,075	0,014	0,02	0,008	0,004	0,003
HUESO	0,001	0,000	0,61	0,148	0,141	0,031
ESTOMAGO	1,983	0,110	1,95	0,508	1,387	0,884
INTESTINOS	6,152	0,734	9,42	3,038	10,742	5,030
vejiga +orina	22,906	3,033	29,82	7,916	39,720	12,753
3horas						
Sin boqueo			0.75 mg		1.5 mg	
Promedio		DS	Promedio		Promedio	
			DS		DS	
SANGRE	0,004	0,002	0,005	0,002	0,007	0,006
HIGADO	25,773	12,744	23,083	9,936	22,305	12,405
CORAZON	0,226	0,038	1,005	0,269	0,409	0,209
PULMON	0,404	0,239	1,261	0,031	0,869	0,442
BAZO	2,326	0,090	1,331	0,536	1,159	0,738
RIÑON	2,412	0,527	4,522	1,242	3,247	0,785
TIROIDES	0,213	0,096	0,522	0,247	0,191	0,126
MUSCULO	0,064	0,024	0,033	0,015	0,077	0,050
HUESO	0,137	0,031	0,479	0,053	0,223	0,069
ESTOMAGO	0,901	0,567	2,800	1,374	0,641	0,253
INTESTINOS	9,498	3,921	9,895	4,215	15,459	4,506
vejiga +orina	52,228	18,193	36,674	13,311	21,590	10,017

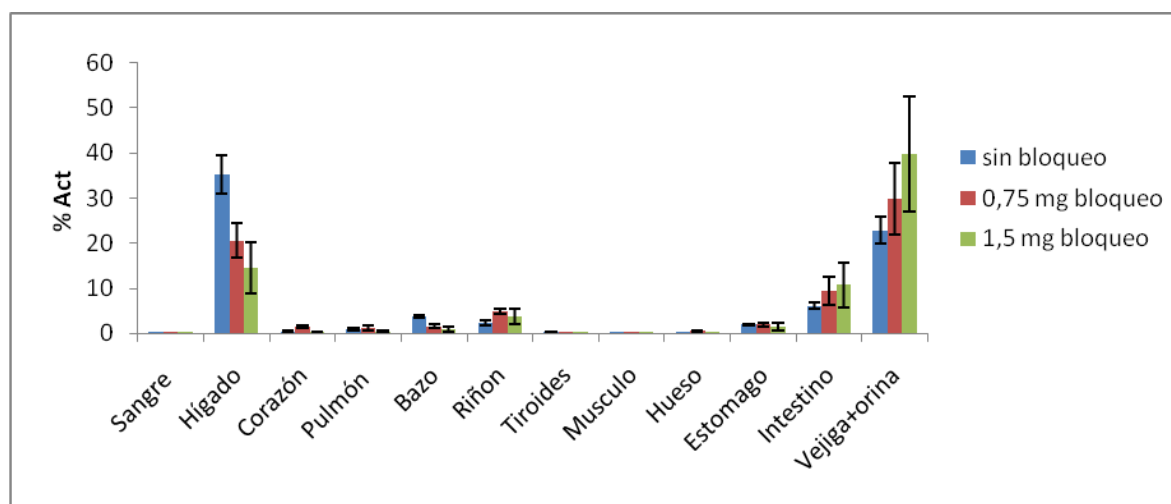


Figura 2.16 Estudio de la variación en la biodistribución a 1 h ensayando distintas cantidades de liposomas “fríos” previo a la inoculación de ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposomas en ratones C57black normales. Los resultados se expresan en %Act.

2.3.8. Estudio de biodistribución en ratones portadores de Melanoma

En cuanto a la biodistribución de ^{99m}Tc -HYNIC- liposomas en ratones C57 black portadores de melanoma (Figura 2.17) se observa el mismo patrón de biodistribución que para los ratones normales (figura 2.13), con un alto porcentaje de captación en hígado y en bazo a 4 y 24 horas. A las cuatro horas se observa una relación tumor sangre de 0.4 y una relación tumor músculo de 5, mientras que a las 24 horas esta última aumenta a 8 y la relación tumor/sangre aumenta significativamente al valor de 113, evidenciando un alto clearance a este tiempo.

En la biodistribución en ratones portadores de melanoma a 4 horas post inyección de ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposomas (Figura 2.19) se observa una actividad en sangre de (11.4 ± 1.40) , superior a la de sus análogos convencionales (2.59 ± 0.86) , la captación hepática es igualmente alta (27%) manteniéndose próxima a este valor a las 24 horas (26%). En cambio el valor % Act/g en sangre a 24 h desciende a un 2% comparado a 11% a las 4h, la captación en bazo mantiene valores incambiados entorno al 11 % tanto a 4 y 24 h, la captación en intestino aumenta de 2.8 ± 0.6 % a las 4 h a valores de 13.3 ± 1.2 % a las 24h. Tomado en conjunto estos datos se podría ratificar que hay otra vía de eliminación además de la hepato biliar que justifique el descenso de la actividad en sangre, sugiriendo una metabolización y eliminación de fragmentos a través de la orina. Las relaciones tumor/sangre y tumor/músculo que presentan los liposomas pegilados a 4 horas son de 0.2 y 6.4 respectivamente, mientras que a las 24 horas

aumenta la relación tumor/sangre a 1.4 y se observa una ligera disminución en la relación tumor/músculo alcanzando un valor de a 4.2.

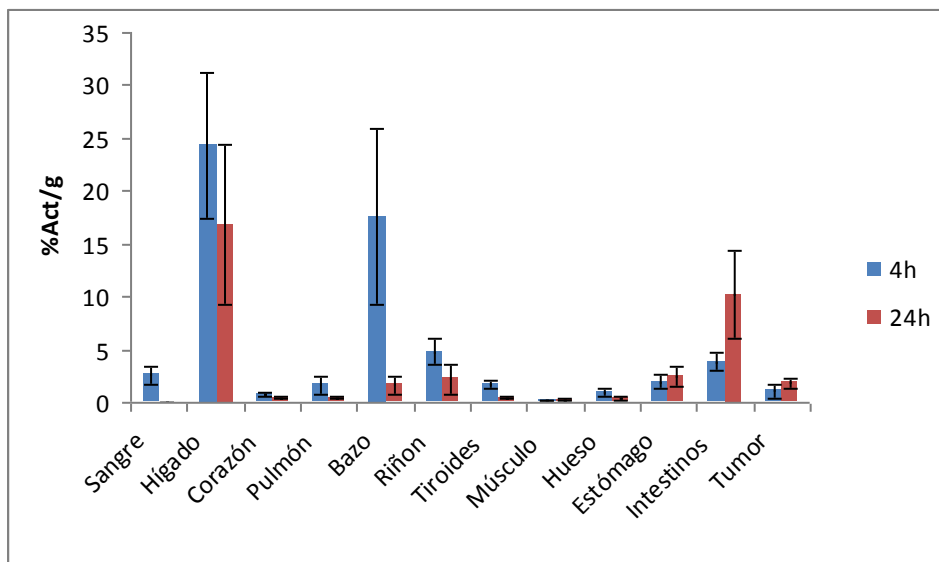


Figura 2.17. Biodistribución a 4 y 24 horas de ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas en ratones C57 black con melanoma inducido por células B16F1.

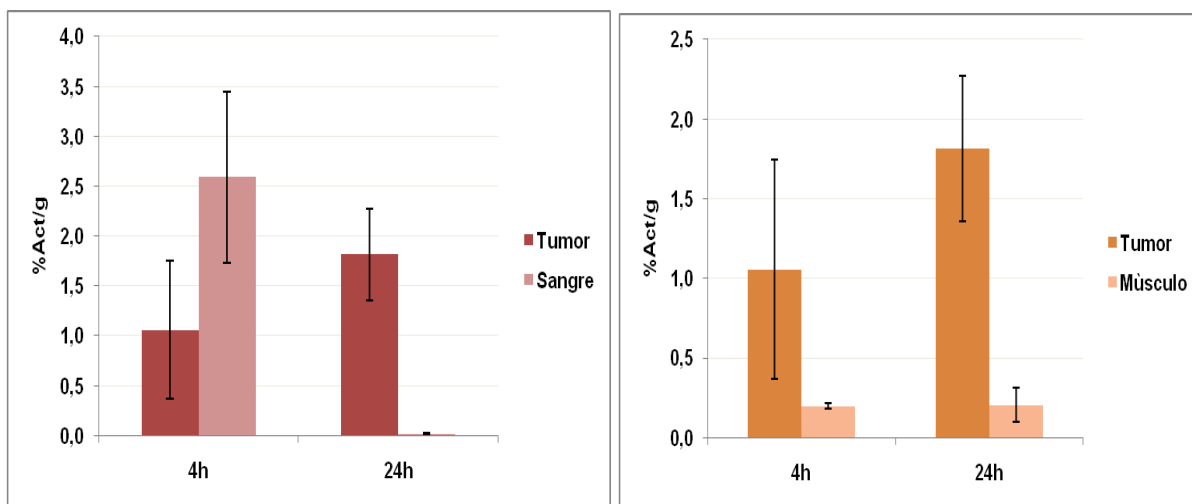


Figura 2.18. Relación T/NT a 4 y 24 horas de ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas en ratones C57 black con melanoma inducido por células B16F1.

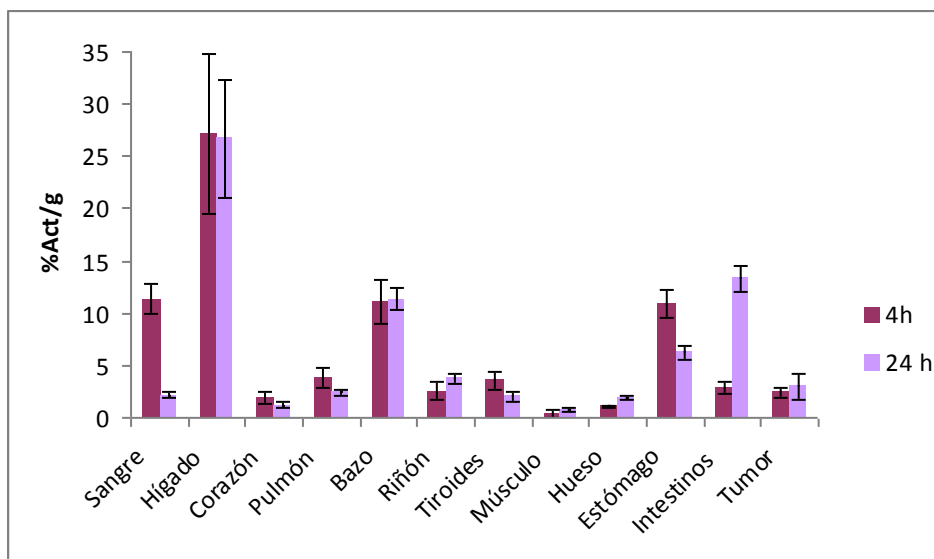


Figura 2.19. Biodistribución de ^{99m}Tc -HYNC-PEG-liposomas en ratones C57 black portadores de melanoma.

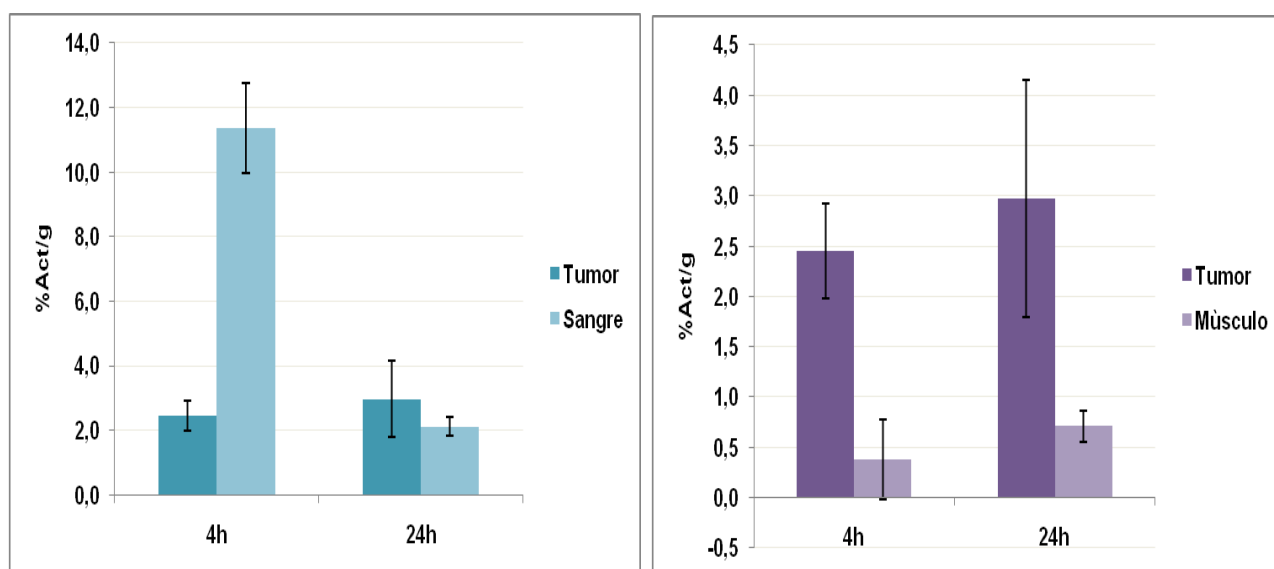


Figura 2.20. Relación T/NT a 4 y 24 horas de ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposomas en ratones C57 black con melanoma inducido por células B16F1.

2.3.9. Estudios centellográficos

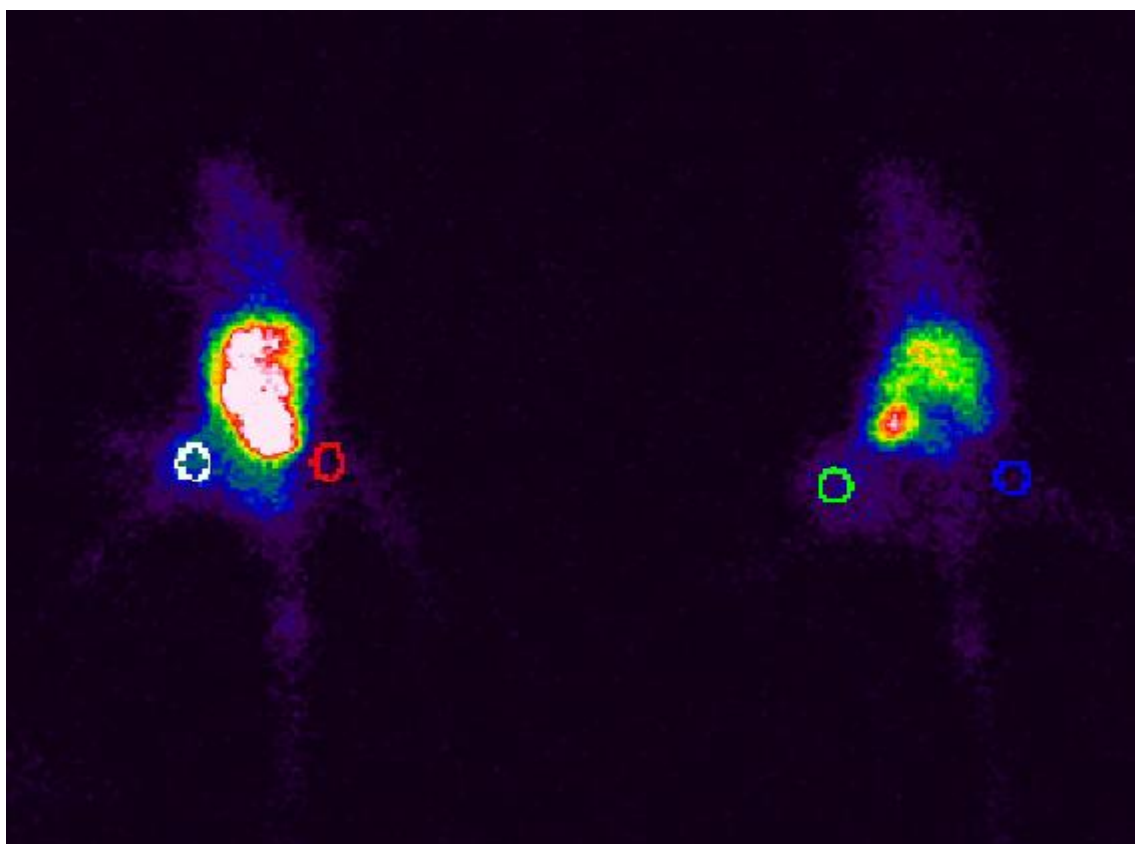


Figura 2.21. Estudio centellográfico a 4 horas post inyección de ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas en ratones C57 black con melanoma inducido por células B16F1.

En los estudios centellográficos de ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas en ratones C57 black portadores de melanoma, la relación de actividad entre la zona de interés (tumor) señalada (ROI) y su contra lateral background (NT) es $T/NT = 130/85 = 1.5$ y en el otro ratón con menor actividad inyectada (derecha), $T/NT = 21/7 = 3.0$ (figura 2.21). Para sus análogos pegilados (figura 2.22) la relación T/NT que presentan es de $290/68 = 4.3$.

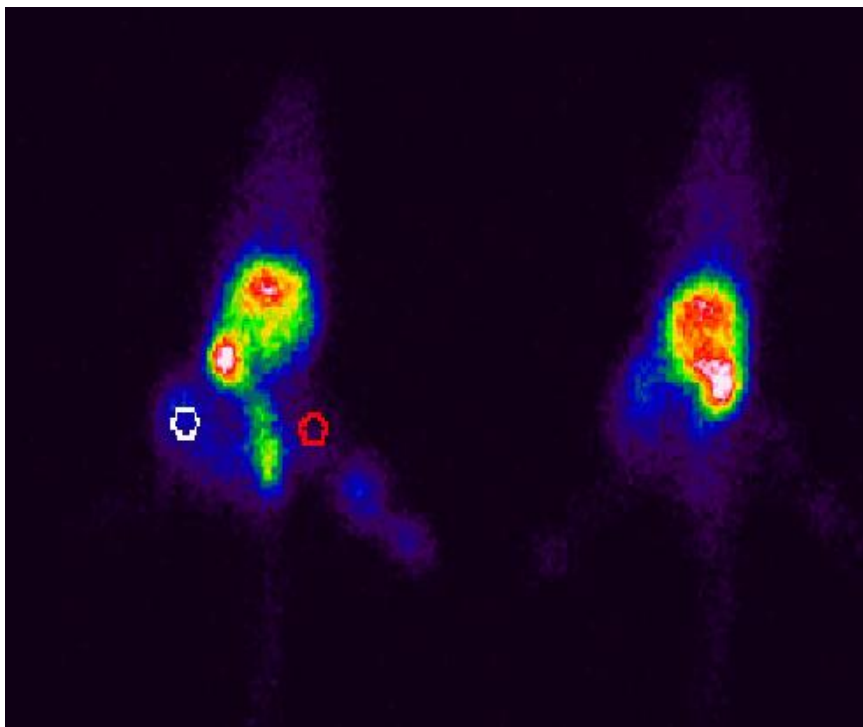


Figura 2.22. Estudio centellográfico en ratones C57 black con melanoma a 4h post inyección de 124 μCi de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-PEG-liposomas.

2.4. Discusión

La aplicación diagnóstica de los liposomas, requiere que estos sean marcados con radionucleidos emisores gamma. Los radionucleidos mas utilizados en la toma de imágenes son: ^{67}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In y ^{123}I . Sin embargo el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es el preferido sobre los otros radionucleidos debido a sus óptimas características y su disponibilidad comercial. Dado que el ^{67}Ga , ^{111}In y ^{123}I son productos de ciclotrón, son más caros y no siempre disponibles en los departamentos de Medicina Nuclear (Peter Laverman y col.,2008).

El método de postmarcaje es el más popular en la síntesis de radiofármacos basados en liposomas, ya que primero se sintetiza el ligando unido a la molécula transportadora y después se une al radioisótopo. El ligando se une a un N-terminal de un péptido, proteína o a los grupos tioles y alcoholes que se encuentran en la molécula transportadora (Mahmood A., Jones A.G., 2003), en este caso tratándose de liposomas.

El agente bifuncional elegido fue el HYNIC, entre sus ventajas se destaca: la posibilidad de unirlo a diferentes coligandos, lo que permite una fácil modificación de la hidrofobicidad y la farmacocinética de pequeñas biomoléculas.

El uso de tricina como coligando para la marcación con HYNIC permite obtener una alta actividad específica, pero es inestable en solución y ofrece múltiples formas isoméricas.

Para preparar complejos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC con una estabilidad en solución mayor se ha utilizado Ácido etilendiaminodiacético, EDDA. En estos estudios el marcado es estable por 12 horas en la mezcla de reacción pero existían por lo menos tres formas isoméricas en solución. Quedando demostrado que utilizando este coligando se aumenta la estabilidad del marcado, aumenta la estabilidad *in vivo* y se reduce la cantidad de isómeros (Liu Shuang., 2005).

También se ha investigado la pureza radioquímica en función de la identidad del coligando (Sangeeta Ray Banerjee y col., 2005), donde se estudiaron distintas formulaciones con tricina, manitol, glucohepatanoato, 2-mercaptopiridina y 2,6-bis(mercaptometil)piridina. Se demostró que los coligandos piridintiol otorgan mejores formulaciones radioquímicas y limitan las especies radiactivas presentes en comparación a los ligandos polihidroxilicos.

En el presente trabajo se obtuvieron formulaciones liposomales estables, las cuales se pudieron caracterizar, demostrándose que presentaban un tamaño nanométrico (figura 2. 9).

Se lograron obtener para ambas formulaciones purezas radioquímicas superiores al 90%, siendo estables en el tiempo, incluso a 24 horas se mantiene la pureza entorno al 80%. En el estudio de estabilidad *in vitro* se enfrentaron los liposomas marcados a diferentes concentraciones de cisteína, la elección de este competidor se realizó de acuerdo a lo reportado en bibliografía (Clemens Decristoforo y Stephen J. Mather, 1999). De estos estudios se puede concluir que los liposomas convencionales derivatizados con HYNIC presentan una mayor estabilidad frente a sus pares pegilados (figura 2.12), demostrando de esta manera que la estabilidad otorgada por la pegilación es meramente *in vivo* dado que presentan impedimento estérico ante las opsoninas plasmáticas.

Al comparar el comportamiento *in vivo* de el ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas frente a los ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposomas (figura 2.13 vs figura 2.14) en ratones normales, si bien parecería que los liposomas pegilados presentan mayor captación hepática, lo cual se contradeciría con lo encontrado en bibliografía (Elbayoumi T.y Torchilin V., 2008) dado que tendrían “mayor reconocimiento por el sistema MSP”, pero en realidad son metabolizados más lentamente que los convencionales por lo que permanecen más tiempo en el organismo cumpliendo el objetivo para el cual fueron sintetizados. La metabolización se ve reflejada también por una mayor eliminación urinaria, se puede observar dicho comportamiento en los graficas de % Act (no se muestran), donde los HYNIC liposomas a 4 h presentan un 48% de eliminación urinaria y a las 24 horas un 81%, mientras que los HYNIC-PEG liposomas muestran un 12% y 23 % a las 4 y 24 h respectivamente. Esta eliminación urinaria mayor se podría explicar de forma similar a lo estudiado en el capítulo 1, donde los HYNIC-liposomas son metabolizados de forma más rápida y lo eliminado por orina se trataría de fragmentos de lípidos marcados.

En el estudio del comportamiento *in vivo* respecto a la dosis inyectada se observa también una eliminación urinaria mayor en los grupos de ratones inyectados con una mayor dosis de bloqueo (tabla 2.2 y 2.3), para ambas formulaciones liposomales a 1 hora post inyección. A este mismo tiempo tanto para los ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas como para sus análogos pegilados, se observa una alta captación en hígado y en bazo para el grupo de ratones sin bloqueo (tabla 2.2 y 2.3) lo que se puede deber a la captura de los liposomas por las células Kupffer dispuestas en el hígado y sistema retículo endotelial. La captación por el hígado a las 3 horas post inyección, en el grupo sin bloqueo, es menor en los liposomas convencionales con respecto a los pegilados lo que concuerda

con lo mencionado en bibliografía (Eduardo A. Castro, 1999) donde la incorporación del polímero PEG prevendría la opsonización y posterior captura en la células de Kupffer.

Tomando en conjunto los datos de los estudios de biodistribución y centellográficos obtenidos para ambas clases de liposomas, se puede denotar que para el ^{99m}Tc - HYNIC-liposomas la relación tumor/sangre se encuentra elevada a las 4 h post inyección (figura 2.17), hora a la que se realizó la imagen centellográfica lo que podría explicar la relación moderada con respecto a su contralateral (1.5)(figura 2.21),quizás pudiéndose obtener mejores resultados si se tomaran imágenes a tiempos mayores post inyección. Por otra parte, la moderada relación obtenida por el ROI, no es coherente con la relación tumor/ músculo (5) obtenida a 4 horas por esta clase de liposomas (Figura 2.17). Esto podría deberse a una baja captación por el tumor en la imagen que se muestra, dado que el tamaño de la masa tumoral es un factor importante en la captación de los nano objetos, puesto que si el tumor alcanza un tamaño grande genera centros necróticos. También la imagen se realizó en una cámara para humanos, siendo lo ideal realizarlo en una cámara de animales donde la resolución es mejor para sujetos más pequeños por la menor distancia entre los cristales de detección y el animal de experimentación.

En cuanto al ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposomas al igual que sus análogos convencionales se observa un clearance sanguíneo mas lento comparando los niveles de actividad a 4 y 24 horas (figura 2.19). Cabe destacar que la relación tumor/sangre a 24 horas (1.4) no es tan marcada como para ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas (113), siendo coherente con la hipótesis de que la pegilación previene la eliminación de los liposomas de sangre, manteniendo así una actividad en pool sanguíneo mayor a 24 horas.

Sin embargo al comparar la relación tumor/músculo a 4 horas (Figura 2.19) con respecto a la formulación sin pegilación (Figura 2.17) se puede apreciar que es mayor (6.4 vs 5 respectivamente) siendo coherente también con lo observado en la imagen centellográfica, donde la comparación del ROI con la contralateral es de 4.3 (figura 2.22) mientras que para los convencionales (figura 2.21) se observaba una relación de 1,5. Esto datos tomados en conjunto hace de los liposomas marcados a través de HYNIC-estearilamina potenciales candidatos para el diagnostico de melanoma.

Como conclusión se puede destacar que con el método de marcación empleado en este capítulo se pueden obtener formulaciones liposomales marcadas con una pureza radioquímica superior al 90% con una alta estabilidad tanto *in vitro* e *in vivo*. Los

liposomas fueron capaces de acumularse con alta especificidad en los tumores de melanoma inducidos con células B16F1 debido al efecto EPR, pudiéndose detectarlos de manera no invasiva. Haciendo de esta manera de los liposomas marcados a través de HYNIC-estarilamina una buena promesa en la toma de imágenes tumorales.

Bibliografía

Abrams M. J., Juweid M., tenKate C. I., Schwartz D. A., Hauser M., Gaul F. E., Fuccello A. J., Rubin R. H., Strauss H. W. y Fischman A. J; 1990. Technetium-^{99m}-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats, J Nucl Med, 31: 2022–2028.

Asahiro Ono, Yasushi Arano, Takahiro Mukai, Tomoya Ueharab, Yasushi Fujioka, Kazuma Ogawa, Shinji Namba, Morio Nakayama, Tsuneo Saga, Junji Konishi, Kazuko Horiuchi, Akira Yokoyama, Hideo Saji, 2001. Plasma protein binding of ^{99m}Tc-labeled hydrazino nicotinamide derivatized polypeptides and peptides .J Nuclear Medicine and Biology, 28: 155–164.

Babich, J.W., Fischman, A.J.; 1995. Effect of “co-ligand” on the biodistribution of ^{99m}Tc-labeled hydrazino nicotinic acid derivatized chemotactic peptides. Nucl. Med. Biol, 22: 25–30.

Blankenberg F. G., Katsikis P. D., Tait J. F., Davis R. E., Naumovski L., Ohtsuki K., Kopiwoda S., Abrams M. J., Darkes M., Robbins R. C., Maecker H. T. y Strauss H. W; 1998. In vivo detection and Imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death, Proc Natl Acad Sci USA, 95: 6349–6354.

Clemens Decristoforo y Stephen J. Mather; 1999. Preparation, ^{99m}Tc-Labeling, and in Vitro Characterization of HYNIC and N3S Modified RC-160 and [Tyr3]Octreotide. Bioconjugate Chem., 10: 431-438.

Eduardo A. Castro; 1999. Las drogas liposomales. Rev.Acad.Colomb.Cienc., 23(89): 625-634.

Edwards D.S., Liu S., Harris A.R., Poirier M.J., Ewels B.A.; 1999. Bioconjugate Chem, 10:803.

Elbayoumi T y Torchilin V.; 2008. Use of Radiolabeled Liposomes for Tumor Imaging. Nanoparticles in Biomedical Imaging, 102(2): 211-23.

Harris TD, Sworin M, Williams N, Rajopadhye M, Damphousse PR, Glowacka D, Poirier MJ, Yu K; 1998. Bioconjugate Chem 10:808.

Harris T., Sworin M., Williams L., Rajopadhey M., Damphousse P., Glowacka D., Poirier M.J., Yu K.; 1999. Synthesis of stable Hydrazones of a Hydrazinonicotinyl-Modified Peptide for the Preparation of ^{99m}Tc -Labeled Radiopharmaceuticals. Bioconjugate Chem, 10:808-814.

Huub J.J.M. Rennen, Peter Laverman, Juliette E.M. van Eerd, Wim J.G. Oyen, Frans H.M. Corstens, Otto C. Boerman; 2007. PET imaging of infection with a HYNIC-conjugated LTB4 antagonist labeled with F-18 via Hydrazone formation. Nuclear Medicine and Biology, 34: 691-695.

Jurisson S.S., Lydon J.D.; 1999. Potential technetium small molecule radiopharmaceuticals. Chem Rev, 99:2205-18.

Larson S.K., Solomon H.F., Caldwell G., Abrams M.J.; 1995. Bioconjugate Chem, 6:635.

Liu Shuang.; 2005. 6-Hydrazinonicotinamide Derivatives as Bifunctional Coupling Agents for ^{99m}Tc -Labeling of Small Biomolecules. Top. Curr. Chem., 252: 117-153

Liu S., Edwards D.S.; 1999. ^{99m}Tc -Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals. Chem. Rev, 99: 2235-2268.

Liu S, Edwards DS, Harris AR, Heminway SJ, Barrett JA.; 1999. Inorg Chem, 38:1326.

Libo Chen, Fang Li, Hongming Zhuang, Hongli Jing, Yanrong Du, y Zhengpei Zeng; 2009. ^{99m}Tc -HYNIC-TOC Scintigraphy Is Superior to ^{131}I -MIBG Imaging in the Evaluation of Extraadrenal Pheochromocytoma. J Nuclear Medicine, 50(3): 3397-400.

Mahmood A., Jones A.G.; 2003. Handbook of Radiopharmaceuticals. Eds. John Wiley & Sons. England, 323 -362.

Masahiro Ono, Yasushi Arano, Takahiro Mukai, Yasushi Fujioka, Kazuma Ogawa, Tomoya Uehara, Tsuneo Saga, Junji Konishi y Hideo Saji; 2001. ^{99m}Tc -HYNIC-derivatized ternary ligand complexes for ^{99m}Tc -labeled polypeptides with low in vivo protein binding. Nuclear Medicine and Biology, 28(3)215-224

Meszaros L.K., Dose A., Biagini S.C.G., Blower P.J.; 2010. Inorg. Chim. Acta, 363: 1059-1069.

Nicolini M., Mazzi U., editors. Technetium, rhenium and other metals in chemistry and nuclear medicine, vol. 6. Padova (Italy) Servizi Grafici Editoriali pnc; 2002.

Peter Laverman, Els Th.M. Dams, Wim J.G. Oyen, Gert Storm, Emile B. Koenders, Richard Prevost, Jos W.M. van der Meer, Frans H.M. Corstens y Otto C. Boerman; 1999. A Novel Method to Label Liposomes with ^{99m}Tc by the Hydrazino Nicotinyl Derivative. J Nuc Med, 40:192-197.

Peter Laverman, Gert Storm, y Otto C. Boerman. Use of Radiolabeled Liposomes for Imaging of Infection and Inflammation. NANOPARTICLES IN BIOMEDICAL IMAGING Fundamental Biomedical Technologies, 2008, Volume 102, Part 2: 237-251.

Sangeeta Ray Banerjee, Kevin P. Maresca, Lynn Francesconi, John Valliant, John W. Babich, Jon Zubiet; 2005. New directions in the coordination chemistry

of ^{99m}Tc : a reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design. *Nuclear Medicine and Biology*, 32: 1–20.

Steffen M. G., Oosterwijk E., Kranenborg M. H. G. C., Manders J. M. B., Debruyne F. M. J., Corstens F. H. M. y Boerman O. C.; 1999. In vivo and in vitro characterizations of three, ^{99m}Tc -labeled monoclonal antibody G250 preparation. *J. Nucl. Med.*, 40: 829–836.

Ultee M. E., Bridger G. J., Abrams M. J., Longley C. B., Burton C. A., Larsen S. K., Henson G. W., Padmanabhan S., Gaul F. E. y Schwartz D. A.; 1997. Tumor imaging with technetium-99m-labeled hydrazinonicotinamide- Fab9 conjugates, *J Nucl Med*, 38: 133–138.

van der Laken C. J., Boerman O. C., Oyen W. J. G., van de Ven M. T. P., Edwards D. S., Barrett J. A., van der Meer J. W. M. y Corstens F. H. M.; 1997. Technetium-99m-labeled chemotactic peptides in acute infection and sterile inflammation, *J Nucl Med*, 38: 1310–1315.

Verbeke K., Hjelstuen O., Debrock E., Cleynhens B., De Roo M. y Verbruggen A.; 1995. Comparative evaluation of ^{99m}Tc -Hynic-HSA and ^{99m}Tc -MAG3-HSA as possible blood pool agents, *Nucl Med Commun*, 16: 942–957.

Maestría en Química

Lic. Mirel Cabrera

Capítulo 3

“DTPA-Arqueosomas marcados con ^{99m}Tc ”

Director Dra. Henia Balter

Área de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, 2009-2011

3.1.Introducción

3.1.1. Arqueosomas

Los liposomas o vesículas formadas por fosfolípidos, son partículas coloidales auto-ensamblantes que se presentaron a partir de la década de 1970 (Bangham AD, 1983) como posibles portadores de productos farmacéuticos, incluyendo vacunas, medicamentos y agentes de diagnóstico. Aunque existen varias formulaciones liposomales ya en el mercado o en ensayos clínicos, una limitación importante para el uso de estos liposomas convencionales es su inestabilidad, especialmente durante el tránsito hacia el sitio de acción (Torchilin VP, 2005).

A pesar de todas las ventajas de los liposomas, es indudable que también tienen limitaciones en cuanto a su utilización como sistemas de liberación, lo que sin duda explica que todavía no sea muy importante el número de formulaciones aprobadas y comercializadas para su uso en humanos. Entre estas limitaciones destaca su comportamiento desfavorable en el medio gastrointestinal, lo que limita las posibilidades que puedan ser administrados por vía oral, excepto que se introduzca alguna modificación sobre la estructura vesicular clásica (por ejemplo el recubrimiento de su superficie con un polímero adecuado), que permita superar este comportamiento inadecuado (Takeuchi H y col., 2005; Wu Z.H y col., 2004). Como consecuencia, la mayor parte de los trabajos publicados se refieren a su utilización por vías de administración parenterales, como la intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal (Simard, P. y col., 2007). Además de un grupo importante de investigadores dedicados a estudiar el empleo de los liposomas como vehículos para la administración tópica cutánea y para la administración transdérmica (El Magharaby y col., 2008).

Los Arqueosomas pueden definirse como liposomas constituido por uno o más de lípidos polares extraídos del dominio Archaea (Arqueobacteria). Aunque las Arqueas y las bacterias son ambas procariotas, las Arqueas están más estrechamente relacionados con el dominio Eucarya que las bacterias (Krieg NR., 2001).

En comparación con liposomas (que se elaboran de éster fosfolípidos), los arqueosomas son relativamente más termoestables, más resistente a la oxidación e hidrólisis química y enzimática

3.1.2. Lípidos de Arqueas

Muchos miembros del dominio Archaea (Boone D. R. y col., 1993; Madigan M. T. and Marrs B. L., 1997), prosperan en entornos hostiles en comparación con los miembros de los dominios Eukarya y bacterias. Las especies de Arquea son anaerobios obligados, como los metanógenos, termoacidófilos creciendo de forma óptima a 55 °C – 80°C a pH con valores inferiores a 3, hipertermófilas creciendo de forma óptima a temperaturas mayores a 80 °C y halófilos extremos que necesitan una concentración 4 M NaCl para su crecimiento óptimo. A pesar de estos requerimientos de crecimiento, especies de Arquea son bastante omnipresentes en la naturaleza (extensiones gastrointestinales de los animales, los seres humanos y los insectos; lagos salados, abajo de los sedimentos de lagos y océanos, aguas de la Antártida y Alaska, etc.) y en ambientes artificiales como digestores anaeróbicos. Ninguna de las especies de Arquea han resultado ser patógenos y las estructuras típicas de membrana externa Gram- que contiene lipopolisacáridos (LPS) no se encuentran en especies de Arquea (Gophna U. et al., 2004; Krishnan L. y col., 2001). Una de las características que ayudan a distinguir entre Archaea y miembros de Eukarya y Bacterias son las singulares estructuras de sus lípidos polares de membrana (Kates, M., 1992; De Rosa M. y Gambacorta, A., 1988).

Las estructuras principales (porción no hidrofóbica) de lípidos polares de Arqueas consisten en unidades de repetición “5-carbono” regularmente ramificadas que forman las cadenas (completamente saturadas con pocas excepciones) que se asocian a los átomos de sn-2, 3 carbono mediante enlaces éter. En contraste con esto, los fosfolípidos bacterianos y eucariotas consisten en cadenas de ácido graso no ramificados (normalmente insaturados) de longitud variable, conectada a los átomos de sn-1, 2 carbono glicéridos de la columna vertebral del glicerol mediante enlaces éster. Las estructuras de los principales lípidos de Archaea consisten en un arqueol estándar (2, 3-di-O-difitanil-sn-glicerol) que consiste de 20 átomos de carbono por cadena de isoprenoide (estructura como en la figura 3.1 A) y sus modificaciones y el caldarqueol estándar (2, 2', 3, 3'-tetra - O dibifitanil-sn-diglicerol) que consta de 40 átomos de carbono por cadena isoprenoide (estructura Cs en la figura 3.1 B)

Los lípidos polares en especies de Archaea podrían consistir exclusivamente de núcleos arqueol o predominantemente de núcleos de caldarqueol, o mezclas de ambos (Sprott, G. D. ,1992; Kates M., 1992). Los grupos cabezales polares (fosfo, glyco, polioliol, amino,

hidroxilo) en lípidos de arqueas son similares a las que se encuentran en la fosfatidilcolina de eucariotas y bacterias, sin embargo, los ester lípidos tan comunes, rara vez se observa en las especies de Archaea. Los Arqueoles son monopolares y los caldarqueoles bipolares. Los extractos de Arquea TPL tienen una carga neta negativa, debido al predominio de grupos cargados negativamente de las cabezas polares (Sprott, G. D., 1992).

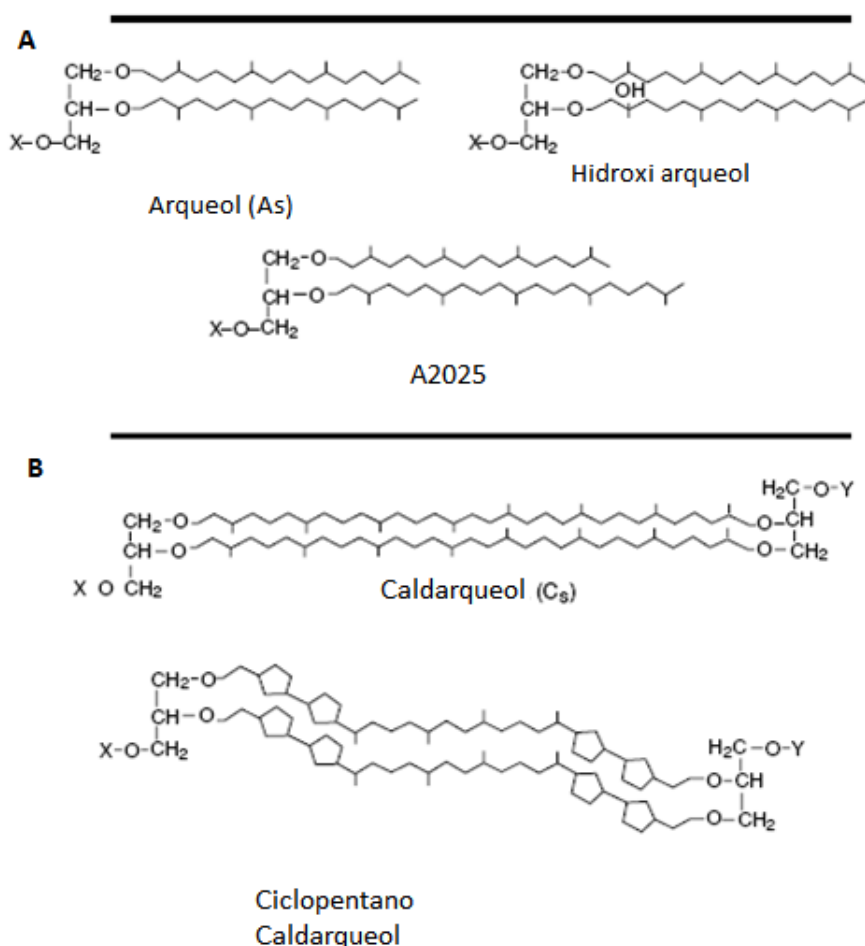


Figura 3.1. A. Estructura lipídica de un arqueol estándar (As) y algunas variantes. B. Estructura lipídica de un caldarqueol (Cs) y algunas variantes. En la figura la nomenclatura se aplica cuando en la estructura lipídica la X e Y se corresponden con protones. Los lípidos polares consisten en la estructura cuando X e Y son sustituidos por cabezas polares (Girishchandra B. Patel y Wangxue Chen, 2006).

3.1.3. Estudios de toxicidad

Anteriores estudios in vitro con arqueosomas unilamelares, constituidos por la fracción de los principales lípidos polares purificados (MPL) de *T. acidophilum*, sugirieron que eran seguros, dado que no afectan las funciones de crecimiento de diversas líneas celulares y macrófagos, así como tampoco afecta la síntesis de ARN, proteínas y la alimentación diaria de ratones inmunosuprimidos suplementados con unos 30 mg MPL lípidos/kg de peso corporal (mezclado con la dieta regular), no teniendo ningún impacto negativo en el peso corporal o la longevidad de ratones (Freisleben H. J y col., 1995). Una evaluación exhaustiva con sonda oral diaria en ratones BALB/c con dosis mucho mayores (55 a 550 mg/kg de peso corporal por día, durante 10 días consecutivos) de arqueosomas vacíos, preparados a partir de 4 especies de Arqueas diferentes, no mostraron ningún efecto adverso respecto de la temperatura corporal, peso corporal, peso relativo (%) de los órganos (corazón, pulmones, hígado, bazo, riñones), enzimas de función hepática y renal, o los parámetros indicativos del metabolismo de proteínas y carbohidratos. Estos resultados son comparables a los obtenidos con (DMPG) y colesterol. Estos estudios demuestran que la administración oral de arqueosomas no es dañina. Los datos sanguíneos (nitrógeno ureico en sangre, glucosa, fosfatasa alcalina, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa) no indican ninguna toxicidad relacionada con la dosis (Omri A. y col., 2003). De los grupos de ratones con dosis alta, se vió aumentado el tamaño del bazo y mostró leves a moderada expansión de la pulpa roja. Observaciones similares se presentaron en ratones con administración i.v. de liposomas convencionales (Freisleben, H. J et al., 1993). El rango de dosis intravenosa con arqueosomas (Omri A. y col., 2003) es similar en el que se evaluaron los liposomas y la mayor dosis de 140 mg/kg/d es ampliamente superior a las dosis previstas en la entrega de fármaco utilizando vehículos liposomales (Storm, G. y col., 1993). Así, excepto por la toxicidad potencial a la dosis más alta (140 mg/kg/d) de arqueosomas de las especies de Arqueas halófilos, los arqueosomas parecen ser relativamente seguros para aplicaciones i.v..

3.1.4. Arqueosomas agente antitumoral?

En modelos murinos tumorales, usando ovoalbúmina (OVA) como antígeno encapsulado, se ha demostrado que la vacunación profiláctica con arqueosomas aumenta la supervivencia a través de la activación de los linfocitos T CD8⁺ antígeno específico (Krishnan L y col., 2003a). Los arqueosomas *M. smithii*-derivados, que contienen antígeno, han demostrado ser capaces de activar la presentación cruzada, un fenómeno que en liposomas convencionales, generalmente no se presenta (Krishnan L y col., 2000). La protección inmune también fue inducida en un estudio de melanoma murino, donde TAAs, TRP-2 o MART-1, fueron usados (Krishnan L y col., 2003b). Estos estudios también demostraron la capacidad intrínseca de los arqueosomas para reclutar células NK en el sitio tumoral.

3.1.5. Comportamiento *in vitro* e *in vivo*

Al igual que los fosfolípidos, los arqueolípidos (Krishnan L y col., 2000) en contacto con agua forman bicapas planas que ante el agregado de energía, se sellan y forman vesículas. Pero debido a la estructura de los lípidos que los forman, los Arqueosomas (ARQ) presentan propiedades fisicoquímicas únicas y diferentes a las membranas de los fosfolípidos convencionales (liposomas). Los ARQ presentan baja permeabilidad a protones y cationes en general, debido a las cadenas fitanilicas, mientras que la permeabilidad al H₂O y otros solutos pequeños depende de la presencia de caldarqueoles. Por otro lado la permeabilidad de liposomas es mayor para ambos tipos de compuestos. Los ARQ poseen superficies hidrofóbicas y desordenadas con baja tensión superficial, mientras las de los liposomas son hidrofílicas con desorden variable y de alta tensión superficial.

Estas propiedades le confieren a los ARQ un comportamiento *in vivo* diferencial. Mientras que los liposomas son más susceptibles a la hidrólisis por la presencia de enlaces ésteres, oxidación por la presencia de insaturaciones y pérdida del contenido, los ARQ tienen mayor resistencia estructural en entornos hostiles.

Por tanto su aplicación (Krishnan L y col., 2000 b) se destaca en la liberación controlada de moléculas en quimioterapia y su rol como adyuvantes (Morilla M.J. y col., 2011), en particular en este trabajo su potencial como transportador de radionuclidos para la toma de imágenes centellográficas.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Síntesis Orgánica

3.2.1.1. Generalidades

En este apartado se detallan los procedimientos experimentales de obtención y el análisis espectroscópico de los compuestos (intermedios y final) obtenidos por síntesis orgánica convencional.

Los disolventes se purifican y secan, previo a su utilización, por métodos convencionales. Los grados de avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinan por cromatografía en capa fina (CCF). Se usa sílicagel con indicador fluorescente sobre placas de poliéster (Alugram® Sil G/UV254) u óxido de aluminio con indicador fluorescente sobre placas de poliéster (Poligram® Alox N/UV254). Las fases móviles usadas han sido mezclas (en distintas proporciones) de acetato de etilo y éter de petróleo, éter etílico y éter de petróleo y diclorometano y metanol.

Los cromatogramas se revelan por alguno de los siguientes métodos:

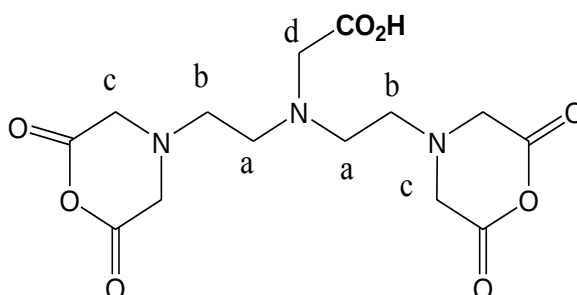
- Exposición a la luz ultravioleta (254 nm).
- Exposición a vapores de yodo

Los espectros de ^1H -RMN se realizan en un equipo Bruker DPX 400 (400 MHz) utilizando los disolventes indicados en cada caso y Tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico son descritos en unidades de δ (ppm) y las multiplicidades según s: singulete, d: doblete, dd: doblete de doblete, t: triplete, c: cuarteto, q: quinteto, m: multiplete, sa: señal ancha.

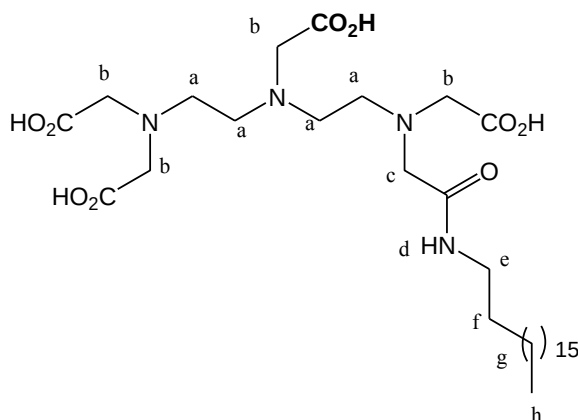
3.2.1.2. Síntesis de Estearilamida-DTPA

Bis Anhídrido del Acido dietilentriaminopentacetico, cDTPA (7). Una mezcla de Acido dietilentriaminopentacetico (0.79g, 2.0 mmol), piridina (1.0 mL, 0.012 mol) y anhídrido acético (0.8 mL, 8.4 mmol) se calienta a 60 °C durante 24 h en atmósfera de N_2 (g). La mezcla se enfría y se obtiene un sólido. El mismo se filtra al vacío, se lava con acetonitrilo, éter y se coloca en desecador durante 24 h, obteniéndose 0.626g (87 %) de un sólido blanco, el cual se utiliza en el próximo paso sin otra

purificación. ^1H NMR (DMSO) δ : 2.95 (t, $J = 5.2$ Hz, 4Hb), 3.11 (t, $J = 5.6$ Hz, 4Ha), 3.46 (s, 8Hc), 3.71 (s, 2Hd).



Mono estearilamida de DTPA (8). A una solución de estearilamina (0.134g, 0.498 mmol) en DMSO 4 mL, se añade **7** (0.178g, 0.498 mmol). La mezcla de reacción se calienta a 80 °C durante 1 h en atmósfera de N_2 (g). Luego se deja con agitación por 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se agregan 9 μL de H_2O y se calienta a 80 °C por 2h. A la mezcla se agregan 4 mL de CH_2Cl_2 y el precipitado formado se filtra, se lava con CH_2Cl_2 y se coloca en desecador durante 24 h, obteniéndose 0,178 g de sólido color beige claro, el cual se utiliza en la siguiente etapa sin otra purificación. ^1H NMR (DMSO, 80°C) δ : 0.86 (t, $J = 6.4$ Hz, 3Hh), 1.27 (s, 30Hg), 1.42 (m, 2Hf), 2.82 (s, 8Ha), 3.09 (m, 2He), 3.37 (s, 2Hc), 3.40 (s, 8Hb), 7.71 (s, 1Hd). ^{13}H NMR (DMSO, 80°C) δ : 15.5 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$), 29.0 ($\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 29.1 ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{15}\text{-}$), 39.1 ($\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 52.3 ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 56.3 ($\text{N-CH}_2\text{-C=O-N}$), 57.2 ($\text{N-CH}_2\text{-C=O-OH}$), 170.0 ($\text{N-CH}_2\text{-C=O-N}$), 173.0 ($\text{N-CH}_2\text{-C=O-OH}$).



3.2.2. Formación de Arqueosomas

Los arqueosomas se prepararon como se describió en los capítulos anteriores por el método de hand shaken. Están constituidos por 11 mg de lípidos extraídos de arqueas (cedidos gentilmente por el laboratorio de la Dra. Eder Romero de UNQ, Argentina), 2 mg de estearilamida-DTPA. Las MLVs obtenidas fueron extruidas 11 veces a 60°C por un filtro de policarbonato de 400 nm (Avanti polar lipids). Posteriormente se realiza la misma operación pero por un filtro de 200 nm. La distribución de tamaño de partícula se determinó por dispersión de luz láser en un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern).

El DSC fue realizado con un dispositivo Shimadzu DSC 50 previamente calibrado con Indio. Todas las determinaciones fueron realizadas en duplicado. Fueron preparados paneles de aluminio herméticamente sellados conteniendo 0.0210 g de arqueosomas en solución. Las muestras fueron escaneadas a 1°C/min desde 5°C hasta 200°C; fue utilizado como referencia un panel de aluminio vacío.

3.2.3. Marcación y controles fisicoquímicos

Los Arqueosomas pre formados fueron marcados con ^{99m}Tc , adicionando 0.3 mL de una solución de SnF_2 (0.69mg/ml) a 2,0 mL de una suspensión de arqueosomas previamente extruidos y $^{99m}\text{TcO}_4^-$ en solución salina 185-259 MBq (5-7 mCi). La mezcla se mantuvo en incubación por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente sin previa purificación se determinó la pureza radioquímica mediante los siguientes sistemas cromatográficos: 3 Muster glasfaser papier N° 6 / NaCl 0.9% (Rf: $^{99m}\text{TcO}_4^-$ =0.9-1.0; demás especies Rf=0.0); 3 Muster glasfaser papier N° 6/ Pyr: AcOH: H₂O (Rf $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ Rf=0.0, demás especies Rf=0.9-1.0); cromatografía de exclusión molecular PD-10 G25 Sephadex, solvente NaCl 0.9%, tomado fracciones de 0.5 mL. A través de los mencionados sistemas se determinó la pureza radioquímica hasta las 24h post marcación a temperatura ambiente.

3.2.4. Controles de estabilidad *in vitro*

Los ^{99m}Tc -arqueosomas (0.4 mL) elaborados como se describió previamente fueron enfrentados a 0.4 mL de distintas soluciones de L-Cisteína (Sigma). Las concentraciones finales obtenidas fueron de 0.1, 10 y 30 mM de L-Cisteína. Las distintas mezclas se incubaron por 3 horas a 37°C. Los controles se realizaron en los siguientes sistemas cromatográficos: 3 Muster glASFaser papier N° 6/ NaCl 0.9% (Rf: $^{99m}\text{TcO}_4^- = 0.9-1.0$, Rf $^{99m}\text{Tc-Cys} = 0.9-1.0$, demás especies Rf = 0.0); 3 Muster glASFaser papier N° 6/ Pyr: AcOH: H₂O (Rf $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ Rf = 0.0, demás especies Rf = 0.9-1.0); Whatman 1/ 2-Butanona (Rf: $^{99m}\text{TcO}_4^- = 0.9-1.0$, demás especies Rf = 0.0). La actividad de cada fracción de la tira fue medida en un contador de centelleo sólido: con un cristal de NaI (Tl) 3"x3" acoplado a un detector con analizador monocanal ORTEC.

3.2.5. Modelo Animal

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a las normas establecidas por la CHEA. Se utilizaron 24 ratones C57 black, pesando 20-32 g, expuestos a ciclos de 12 hora de luz y oscuridad y con libre acceso a agua y alimento estándar para roedores. Se separaron en dos grupos con igual número, a uno de estos grupos se les indujo tumor de melanoma por inoculación de células murinas B16F1 como se describió en el capítulo 1.

3.2.6. Estudios de biodistribución

Se llevaron a cabo luego de la inyección i.v. de ^{99m}Tc -arqueosomas de 6.5 ± 1.2 MBq (176 ± 33 μCi) en ratones portadores de melanoma, así como en ratones normales con tiempos de biodistribución de 4h y 24 horas. Se utilizaron 8 ratones por punto (4 normales y 4 portadores de melanoma). Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, los tejidos y órganos de interés fueron extraídos, lavados con agua destilada para remover el exceso de sangre y pesados. La actividad fue medida utilizando un contador de centelleo sólido. La actividad captada por cada órgano se presenta como porcentaje de dosis inyectada por gramo (%DI/g) de tejido u órgano para normalizar posibles diferencias en el peso de los órganos y tumores en los grupos de ratones. Para calcular la correlación macroscópica entre la distribución de ratones normales y

portadores de melanoma, se compararon la captación de los ^{99m}Tc -arqueosomas expresada como porcentaje de la dosis inyectada %ID.

3.2.7. Estudios Centellográficos

Se adquirieron imágenes centellográficas en ratones C57 black normales y en ratones portadores de melanoma, utilizando una gamma cámara (Modelo Sophy DSX, Sopha Medical, Buc, France; conectada en serie con un sistema computacional, Mirage Segami, Columbia, MD) autotuned para detectar la radiación gamma de 140 keV del ^{99m}Tc . Los ratones fueron inyectados con aproximadamente 22.2 MBq (0,6 mCi) de ^{99m}Tc -Arqueosmas a través de la vena de la cola y se anestesiaron por inyección intraperitoneal de Ketamina- Xilazina (100-10 mg/ Kg) a la hora de obtención de la imagen. Los animales se posicionaron debajo de la gamma cámara a 4 h post administración de los arqueosomas radiomarcados y se realizó la adquisición de la imagen), se calcularon las regiones de interés ROI comparando contra la contra lateral de la región donde se presentaba el tumor.

3.3. Resultados

3.3.1. Síntesis de Estearilamida-DTPA

La obtención del derivado estearilamida-DTPA **8** se llevo a cabo utilizando la metodología sintética que se muestra en la Figura 3.2. El primer paso de la síntesis consistió en la obtención del bis-anhídrido cíclico del ácido dietilentriaminopentacético, cDTPA **7**. Para ello se hizo reaccionar el DTPA **6** en presencia de anhídrido acético y piridina bajo calentamiento a 60°C, obteniéndose el derivado deseado en alto rendimiento (87%) (YanJun Fu y col., 2002). El bis-anhídrido cíclico **7** se caracterizo mediante ¹H-RMN, donde se observan claramente las señales correspondientes a los distintos tipos de protones presentes en la molécula (Figura 3.3).

Seguidamente la mono-estearilamida **8** fue selectivamente generada utilizando una metodología sintética descrita en literatura con algunas modificaciones (Wei Zhang y col., 2010). Así, mediante un primer paso por reacción con un equivalente de estearilamina en DMSO anhidro bajo atmósfera de N₂ y posterior hidrólisis del segundo grupo anhídrido cíclico se obtiene el producto de interés. La estearilamida **8** se caracterizo mediante experimentos de ¹H-RMN, COSY y de correlación heteronuclear (HSQC y HMBC) Figura 3.4.

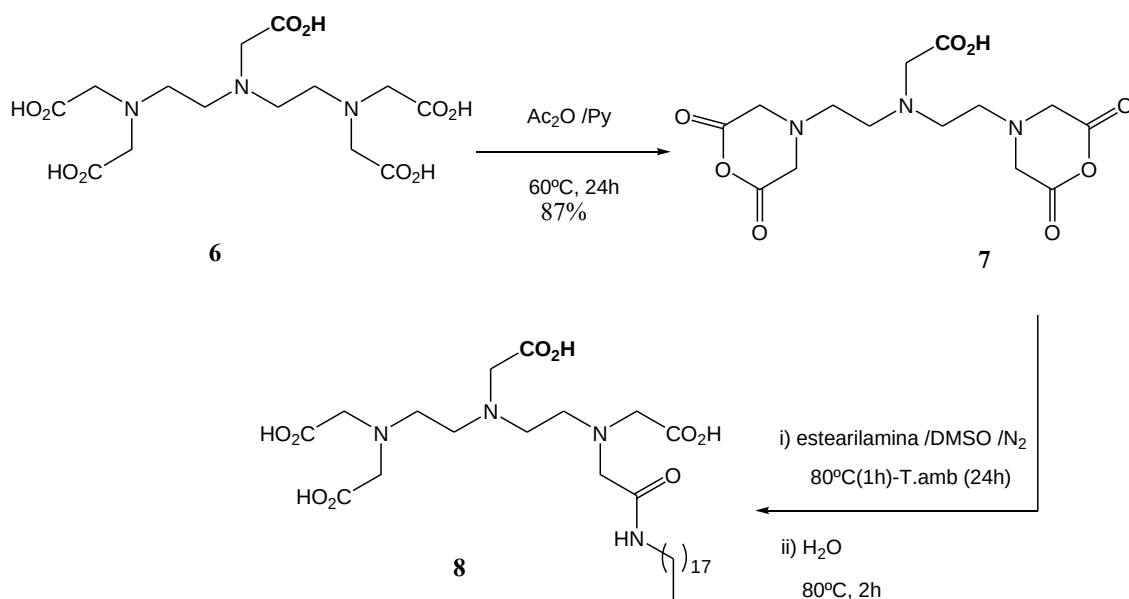


Figura 3.2. Metodología sintética empleada para la obtención de la estearilamida-DTPA **3**

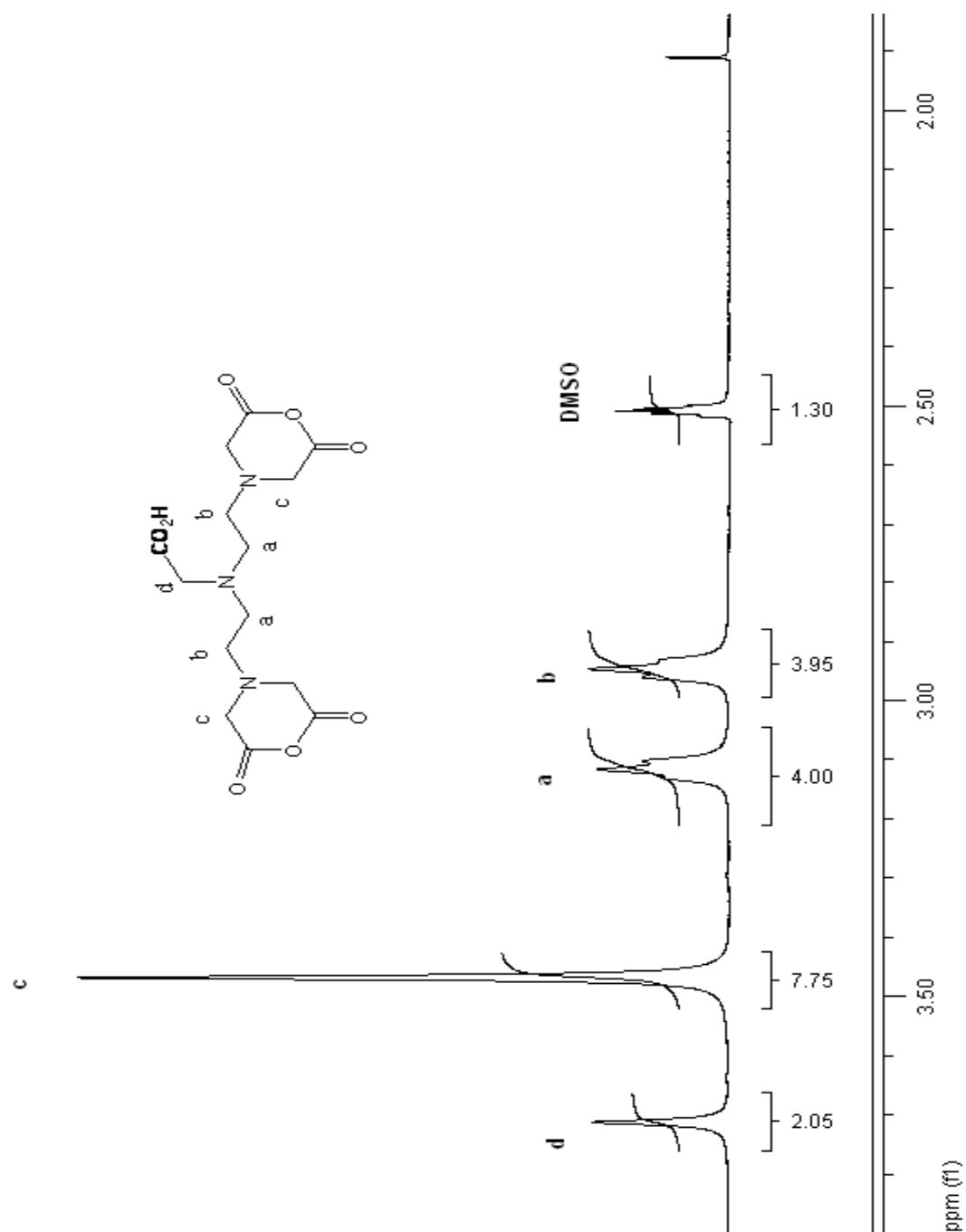


Figura 3.3 Espectro de ^1H -RMN del derivado 7 en DMSO- d_6 .

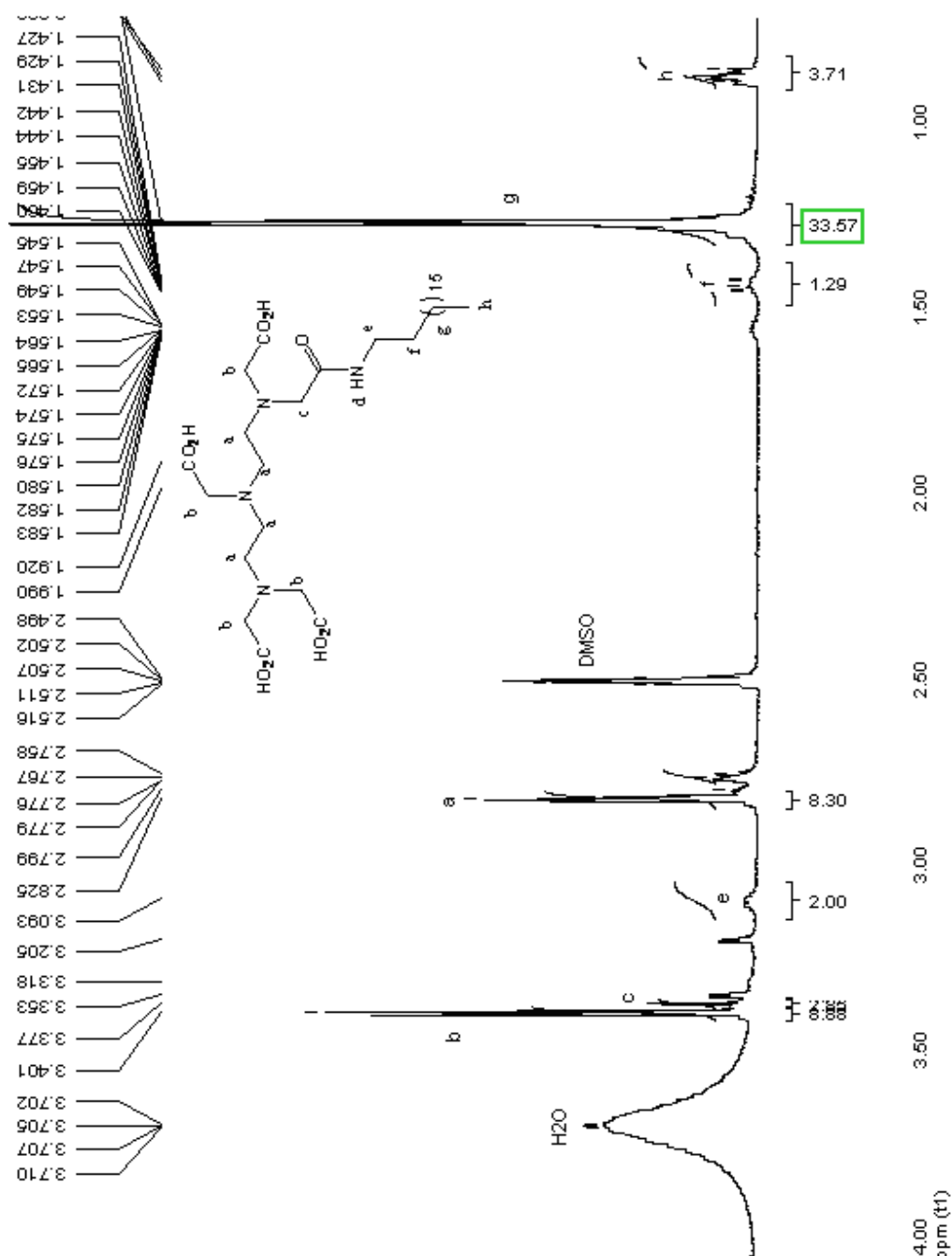


Figura 3.4 Espectro de ^1H -RMN del derivado **8** en DMSO- d_6 (80°C)

3.3.2 Caracterización de los arqueosomas

Los arqueosomas presentan tamaño nanométrico comprendido entre 90 y 120 nm (figura 3.5). La transición de fase para éstos ocurrió a una temperatura de 137.8 °C (figura 3.6).

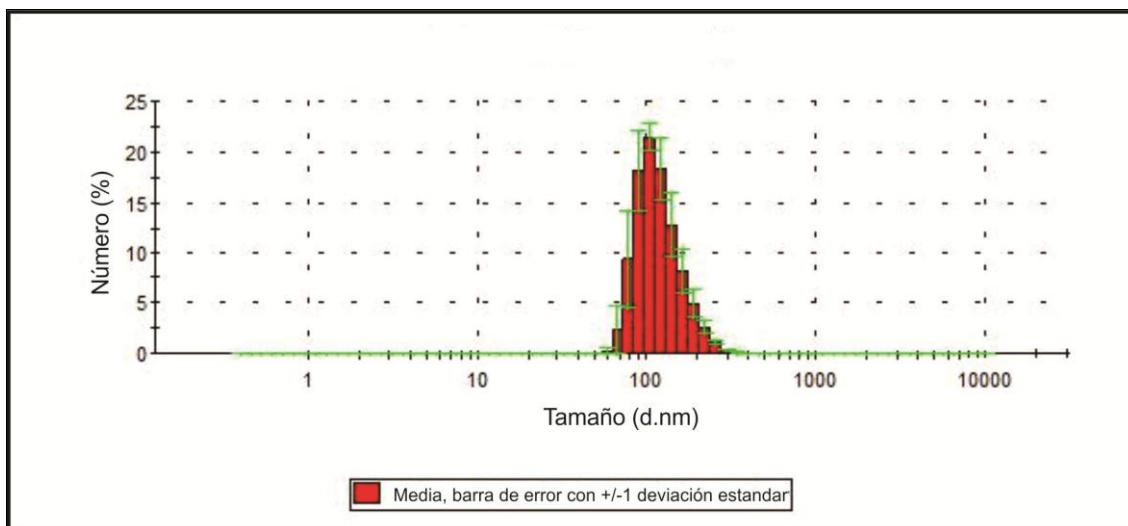


Figura 3.5. Perfil de distribución de tamaño de partícula (porcentaje en número) de los arqueosomas en un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern).

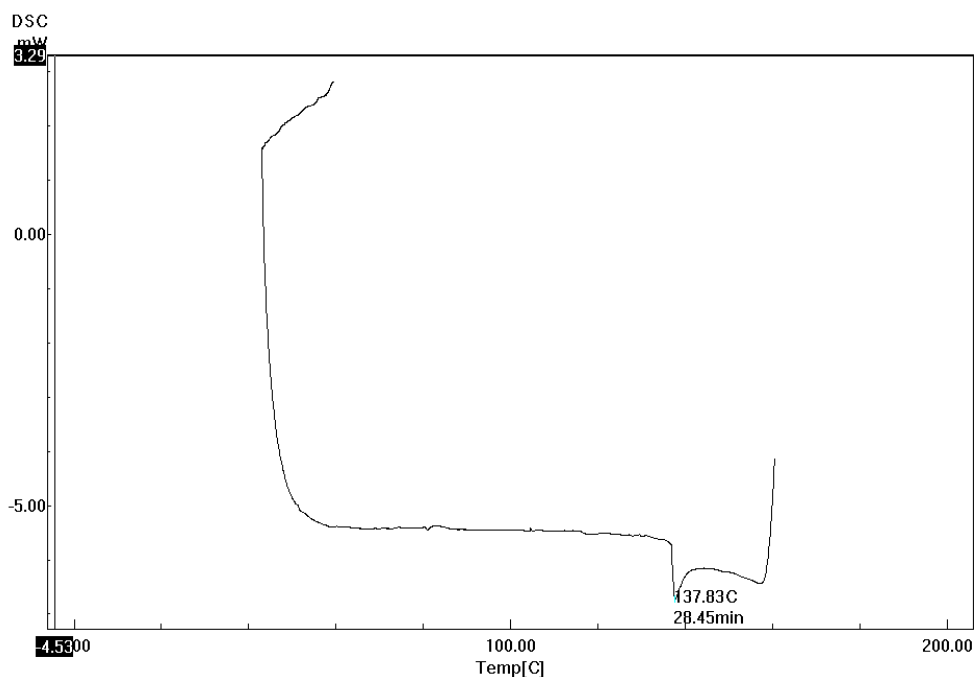


Figura 3.6. DSC representativo de la formulación de los arqueosomas en escaneo calorimétrico. Transición de fase de los arqueosomas Td: 137.83 °C.

3.3.3. Marcado y estabilidad en solución.

La eficiencia del marcado fue superior al 90% para los ^{99m}Tc -DTPA-Arqueosomas, el marcado presentó una pureza radioquímica superior al 80% manteniéndose incluso a las 24 horas post marcación.

En la cromatografía de exclusión molecular (columna PD-10) ambas clases de liposomas se obtuvieron a los 3.0-3.5 mL de elución mientras que el $^{99m}\text{TcO}_4^-$ se obtuvo a los 6.0-6.5 mL.

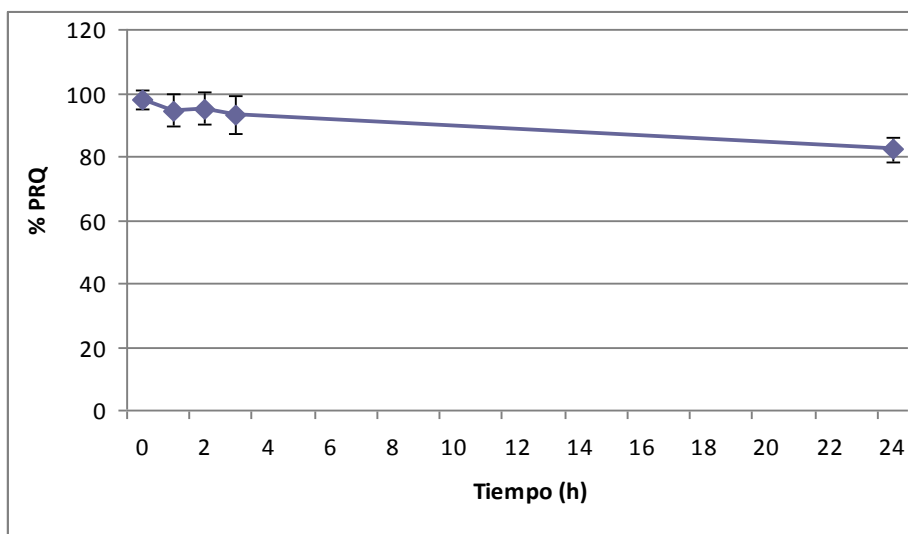


Figura 3.7. Estabilidad de marcado del ^{99m}Tc -DTPA –Arqueosomas en solución en función de tiempo.

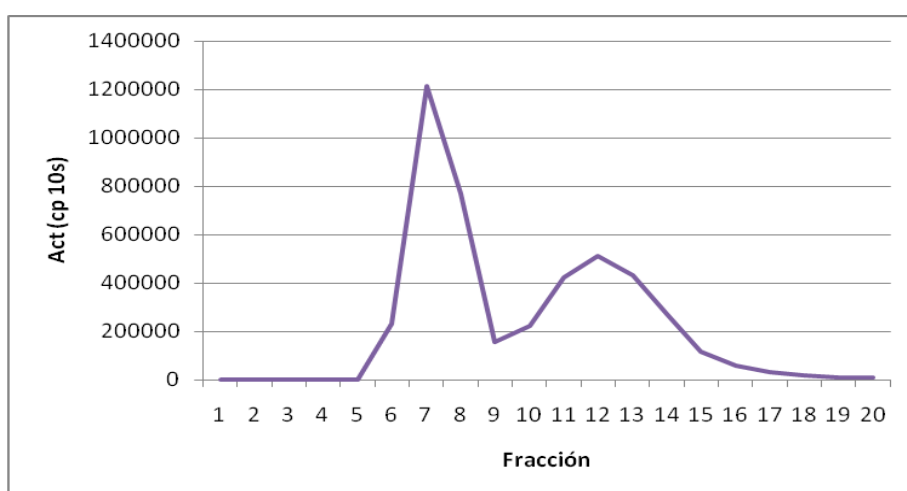


Figura 3.8. Cromatografía de exclusión molecular de ^{99m}Tc -DTPA-Arqueosomas, fracciones de 0.5 mL, se eluye con NaCl al 0.9%.

3.3.4. Estabilidad *in vitro*

La estabilidad de los ^{99m}Tc -DTPA-Arqueosomas en presencia de diferentes concentraciones de cisteína muestra que para la concentración de 0.1 mM el 93% del ^{99m}Tc permanece unido a los arqueosomas incluso a las 3h de incubación. Con concentraciones de cisteína de 10 y 30 mM, el ^{99m}Tc se mantiene unido en un 71 % y 65 % respectivamente a las 3 h, mientras que a la hora permanece unido más del 90 % para todas las concentraciones (figura 3.9).

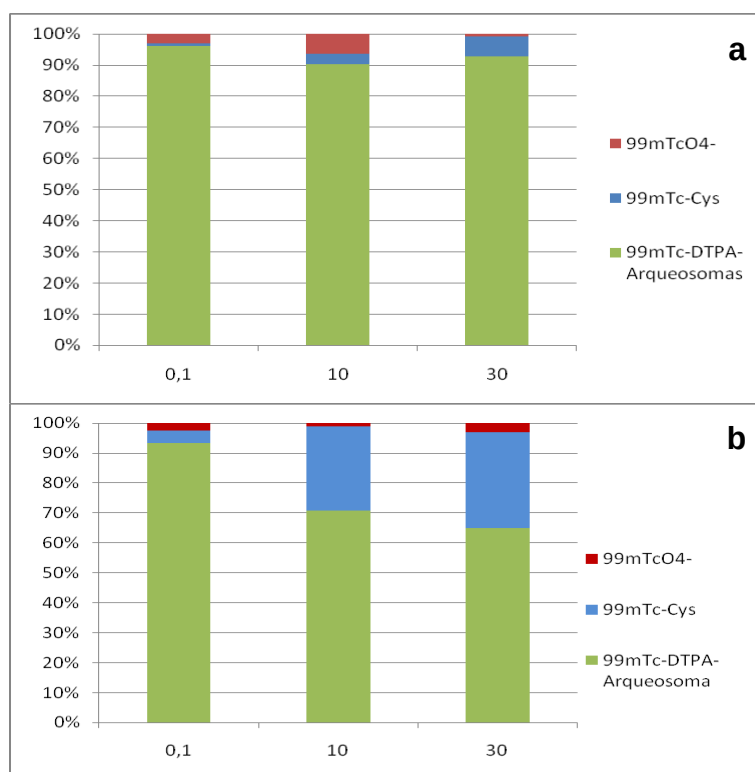


Figura 3.9. Estudio de transquelación a diferentes concentraciones de cisteína para el ^{99m}Tc -DTPA-Arqueosomas a 1h (a) y a 3h (b) de incubación a 37°C.

3.3.5. Estudios de Biodistribución

La biodistribución de los arqueosomas marcados se determinó luego de pesar y medir la actividad de los órganos y tejidos de interés al cabo de transcurrido el tiempo predeterminado para el ensayo.

Los resultados de la biodistribución en ratones normales a 4h y 24h para el ^{99m}Tc -DTPA-Arqueosomas se muestra en la figura 3.10, presentando captación hepática ($17.7\% \pm$

5.4, $25.4\% \pm 4.0$) a 4 y 24h respectivamente. También se observa captación en bazo en los ratones normales ($10.8\% \pm 0.7$, $14.7\% \pm 2.3$) a 4 y 24h respectivamente.

Estos resultados son coherentes con una alta depuración sanguínea a 4 h ($0.93\% \pm 0.37$) manteniéndose obviamente en niveles bajos de actividad a las 24 h ($0.92\% \pm 0.37\%$).

En los ratones con melanoma se presenta el mismo patrón de biodistribución que para los ratones normales, con un alto porcentaje de captación en hígado y en bazo a 4 y 24 horas (Figura 3.11). La eliminación urinaria se ve reflejada por una alta actividad a nivel renal incluso a las 24h ($3.0\% \pm 1.3$).

También se observa una buena captación en tumor, incluso a las 4h, con una relación tumor/musculo de 5; aumentando esta última a 34 al cabo de 24 h.

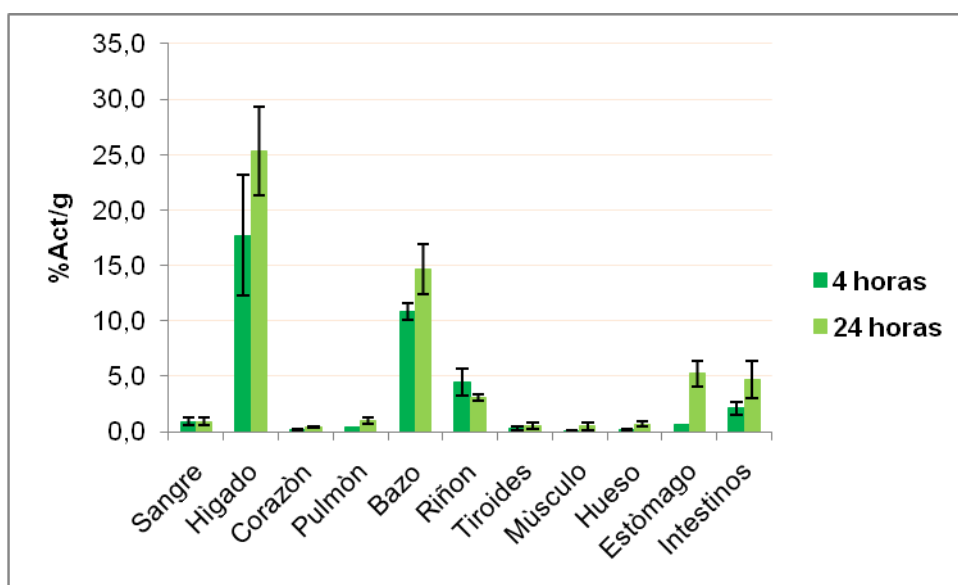


Figura 3.10. Biodistribución en ratones C57 black normales, a distintos tiempos post inyección de ^{99m}Tc -DTPA-Arqueosomas. Resultados expresados como %Act/g de tejido u órgano (n=4).

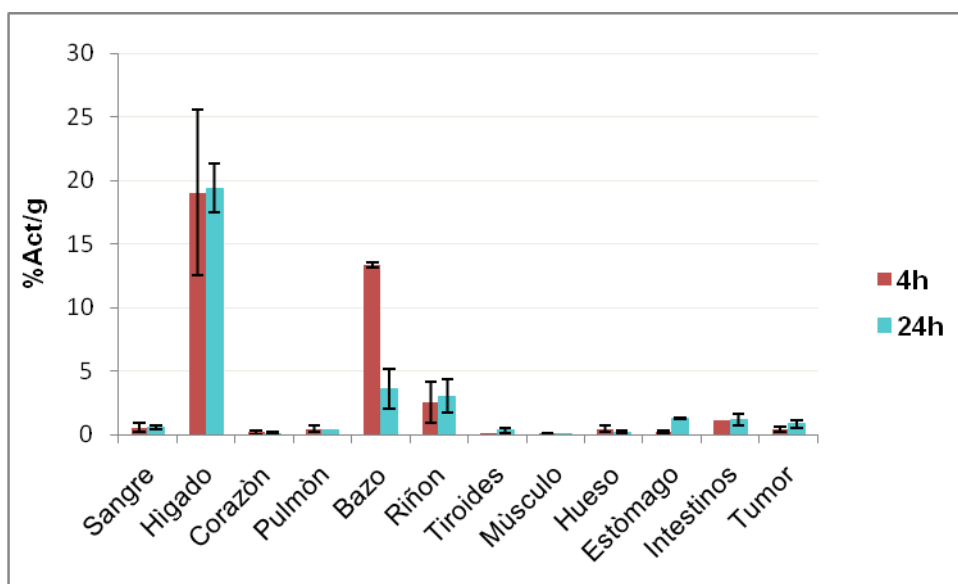


Figura 3.11. Biodistribución a 4 y 24 horas de ^{99m}Tc -DTPA-Arqueosomas en ratones C57 black con melanoma inducido por células B16F1. Resultados expresados como %Act/g de tejido u órgano (n=4).

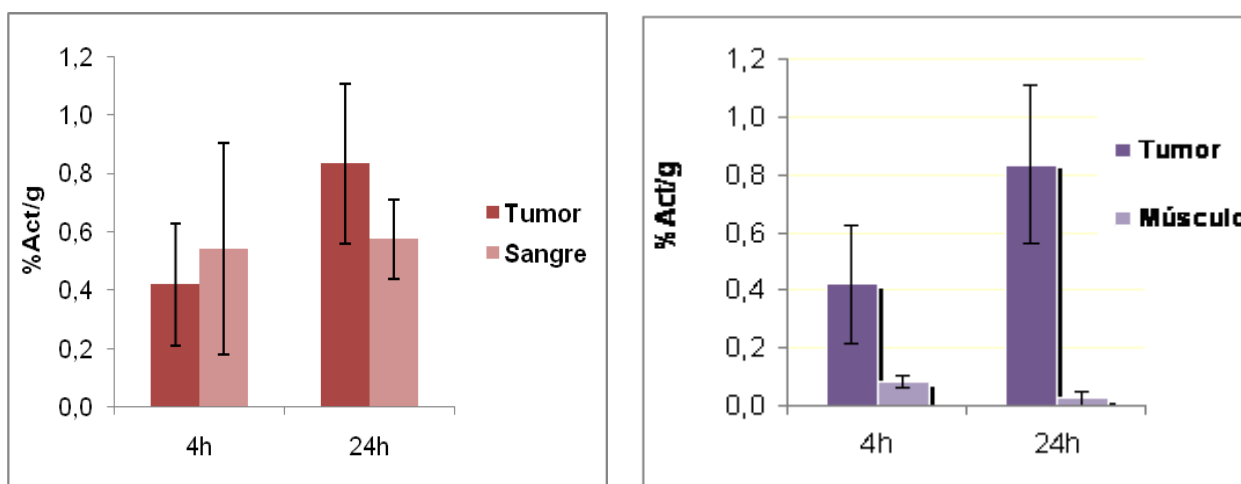


Figura 3.12. Relaciones T/NT a 4 y 24 h de ^{99m}Tc -DTPA-Arqueosomas en ratones C57 black con melanoma inducido por células B16F1.

3.3.6. Estudios centellográficos

En los estudios centellográficos de ^{99m}Tc -DTPA-Arqueosomas en ratones C57 black portadores de melanoma, se observa una relación de cuentas entre la zona de interés (ROI) señalada: tumor (T) y su contra lateral, background (NT) de $T/NT=2984/64 = 46.6$ (figura3.13), siendo coherente con los datos de biodistribución.

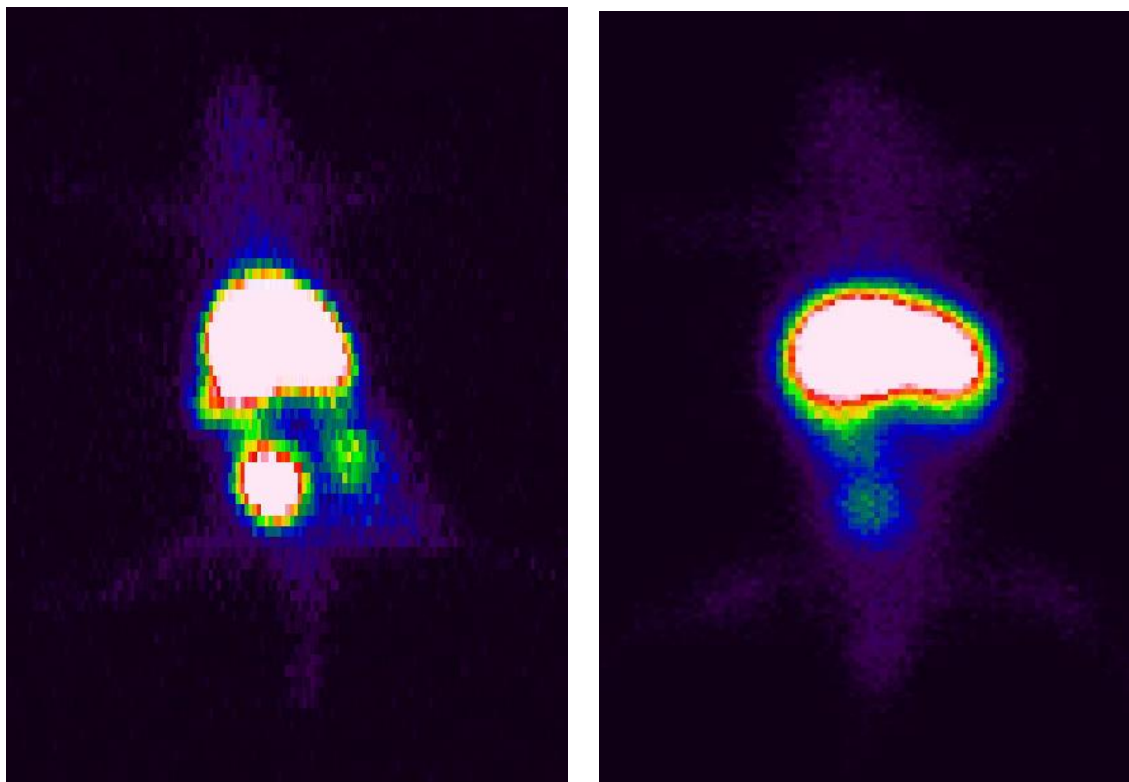


Figura 3.13. Imágenes centellográficas a 4 horas post inyección de ^{99m}Tc -DTPA-Arqueosmas en ratón portador de melanoma inducido por células B16F1(izquierda) y C57 black normal (derecha).

3.4 Discusión

En los estudios realizados se demostró que los arqueosomas se pueden preparar con una metodología similar a la de los liposomas. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) se emplea para determinar la temperatura de inicio de la fusión de las cadenas lipídicas y otras transiciones de fase (R. New, 1994) y el área bajo la curva (es decir, la entalpía, ΔH) es representativa de la cooperatividad del proceso. El DSC (figura 3.6) muestra una transición de fase superior a los 80 °C (cambio donde los lípidos presentan un estado fluido) lo cual puede ser atribuido a la naturaleza ramificada de las cadenas de fitano.

A la hora de realizar la formulación de un liposoma, se debe escoger de forma que su formación se produzca por debajo de la temperatura de transición de fase del bulk de lípidos con el que se trabaja. En cambio los lípidos (éter) polares de las arqueobacterias, pueden ser trabajadas tanto en estado de liquido-cristalino o fluido, por tanto se puede trabajar siempre a temperatura ambiente, en la fase de hidratación, simplificando así el protocolo de preparación. Otra ventaja que presentan estos lípidos, es que no se oxidan en presencia de aire debido a que las cadenas de fitano son saturadas y por tanto pueden ser almacenadas a temperatura ambiente y en presencia de oxígeno; además al caracterizarse por una alta estabilidad térmica y baja permeación de protones (Girishchandra y col., 2006), pueden ser esterilizados por autoclave lo cual representa una ventaja para sus aplicaciones *in vivo*.

La marcación de los DTPA-Arqueosomas se logró por un procedimiento sencillo y a temperatura ambiente, obteniéndose una PRQ superior al 90%, manteniéndose por encima de 80% a 24 h post marcado. El comportamiento de ^{99m}Tc -DTPA-Arqueosomas frente a concentraciones de crecientes de cisteína, demostró su estabilidad para todas las concentraciones estudiadas a 1 hora de incubación, mientras que con la concentración 0.1 mM a 3 horas, la pureza permaneció superior al 90%.

En cuanto a la estabilidad *in vivo* demostraron tener una alta depuración sanguínea debido a su captura por el sistema fagocítico mononuclear (MSP) y no debido a una desestabilización sanguínea producida por las lipoproteínas de alta densidad (HDL), como en el caso de los liposomas, en los que las HDL remueven los fosfolípidos presentes en el lado externo de la bicapa formada por ester – lípidos. La captura por el sistema MSP se evidencia por la alta captación en hígado y en bazo que presentan estos sistemas en ratones normales y portadores de tumor. Se debe destacar que la marca radioactiva propiamente dicha es estable *in vivo*, dado que no se observa una

desestabilización del mercado lo que se evidenciaría con el perfil de biodistribución observado (figura 3.10).

La correlación entre las biodistribuciones y las imágenes centellográficas si bien muestran una buena diferenciación de tejido tumoral y tejido normal, en el grupo de 4 h se observan diferencias cuantitativas en la relación T/NT debido fundamentalmente a la diferencia de la masa tumoral, constatándose que en los tumores de mayor tamaño la captación este parámetro disminuye debido a la necrosis. En el estudio de ratones portadores de melanoma, en comparación con la evidencia obtenida en la centellografía realizada a 4 horas, se puede atribuir que la relación tumor/músculo (T/NT) aproximadamente de 5 en las biodistribuciones de 4h (figura 3.11) es debido a que la masa tumoral con la que se trabajó, era mayor a la que presentó en los ratones de la centellografía y los que se utilizaron para las biodistribuciones a 24 horas. Es aconsejable trabajar con tumores más pequeños (con bazos sanguíneos en neo formación) para que así fueran los resultados más coherentes respecto a la captación tumoral de los arqueosomas y la imagen obtenida. Queda en evidencia que los tumores de aproximadamente 1 cm^3 son los que presentan una mayor captación de estas nanopartículas. Por otra parte el presente estudio, demostró que el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA-Arqueosmas es un excelente radiotrazador para la visualización no invasiva de melanoma, mostrando una acumulación específica en el tumor con una relación tumor/músculo igual a 34 a las 24 horas post inyección y una relación tumor/sangre superior a 1, siendo estos resultados comparables a la captación que puede presentar un anticuerpo monoclonal en un tumor (Pramila Paudyal y col., 2010). Los resultados de biodistribución tanto a 24 h, como los obtenidos en la imagen centellográfica a 4 horas, presentan resultados elevados, en los cuales al comparar el ROI realizado sobre el tumor vs su contra lateral se obtiene una relación de 46. Estos resultados promisorios alientan la continuación de estas investigaciones de este potencial radiofármaco para imágenes centellográficas en modelos de cáncer de melanoma con el objetivo de su formulación como juego de reactivos.

En resumen, el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA-Arqueosmas es un potencial radiotrazador SPECT, tal como surge de estos estudios preclínicos en el modelo animal de melanoma.

Este tipo de tumor constituye una patología en crecimiento en todo el mundo, por tanto sería de gran importancia poder contar con una herramienta para el diagnóstico de manera no invasiva tanto del tumor primario como de sus metástasis.

Bibliografía

- Bangham AD. Liposome Letters. Academic Press: London 1983.
- Boone D. R., Whitman W. B., and Rouviere P. ; 1993. In Methanogenesis, Ferry, J. G. (Ed.), Chapman & Hall, New York, pp. 35-80.
- De Rosa M. and Gambacorta A.; 1988. The lipids of archaeabacteria. *Prog Lipid Res* 27, 153-175.
- El Magharaby, G.M., Barry, B.W. & Williams, A.C.; 2008. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 34: 203-222.
- Freisleben H. J., Bormann J., Litzinger D. C., Lehr F., Rudolph P., Schatton W., y Huang L.; 1995. Toxicity and biodistribution of liposomes of the main phospholipids from the. *Archaeobacterium Thermoplasma acidophilum* in mice. *J. Liposome Res.*, 5: 215-223.
- Freisleben H. J., Neisser C., Hartmann M., Rudolph P., Geck P., Ring K., y Muller E.G.; 1993. Influence of the main phospholipids (MPL) from the *Thermoplasma acidophilum* and of the liposomes from PPLL on living cells: cytotoxicity and mutagenicity. *J. Liposome Res.*, 3: 817-833.
- Girishchandra B. Patel y Wangxue Chen. Archaeosomes as drug and vaccine nanodelivery systems. M.R. Mozafari (ed.), *Nanocarrier Technologies: Frontiers of Nanotherapy*, 17–40. 2006 Springer.
- Gophna U., Charlebois R.L., y Doolittle, W.F.; 2004. Have archaeal genes contributed to bacterial virulence?. *Trends Microbiol.*, 12: 213-219.
- Kates M.; 1992. Archaeobacterial lipids: structure, biosynthesis and function. *Biochem. Soc. Symp.*, 58: 51-72.
- Krieg N.R. Prokaryotic domains. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed., vol. 1, Boone DR and Castenholz RW (Eds), New York: Springer-Verlag, 2001, 21–25.
- Krishnan L., Sad S., Patel G. B., and Sprott G. D.; 2001. Archaeosome Vaccine Adjuvants Induce Strong Humoral, Cell-Mediated, and Memory Responses: Comparison to Conventional Liposomes and Alum. *J. Immunol.*, 166: 1885-1893.
- Krishnan L., Sad S., Patel G.B., Sprott G.D.; 2000. Archaeosomes induce long-term CD8⁺ cytotoxic T cell response to entrapped soluble protein by the exogenous cytosolic pathway, in the absence of CD4⁺ T cell help. *J. Immunol.*, 165: 5177–85.
- Krishnan L., Dicaire C.J., Patel G.B., Sprott G.D.; 2000 **b**. *Infection and Immunity*: 68-54

Krishnan L., Sad S., Patel G.B., Sprott G.D.; 2003**a**. Archaeosomes induce enhanced cytotoxic T lymphocyte responses to entrapped soluble protein in the absence of interleukin 12 and protect against tumor challenge. *Cancer Res.* 63:2526–34.

Krishnan L., Dennis Sprott G.; 2003 **b**. Archaeosomes as self-adjuvanting delivery systems for cancer vaccines. *J. Drug. Target.*, 11:515–24.

Madigan M.T. y Marrs B.L.; 1997. Extremophiles. *Sci. Am.*, 276: 82-87.

Morilla M.J., Mengual D., Cabral P., Cabrera M., Balter H., Defain M.V., Higa L., Roncaglia D., Romero E.; 2011. M Cells Prefer Archaeosomes: An In Vitro/In Vivo Snapshot Upon Oral Gavage in Rats. *Current Drug Delivery*, 8 No. 3.

Omri A., Agnew B. J., y Patel, G.B.; 2003. Short-term repeated dose toxicity profile of archaeosomes administered to mice via intravenous and oral routes. *Int. J. Toxicol.*, 22: 9-23.

Pramila Paudyal, Bishnuhari Paudyal, Hirofumi Hanaoka, Noboru Oriuchi, Yashuhiko Iida, Hiroki Yoshioka, Hideyuki Tominaga, Satoshi Watanabe, Shigeki Watanabe, Noriko S. Ishioka, Keigo Endo; 2010. Imaging and biodistribution of Her2/neu expression in non-small cell lung cancer xenografts with ⁶⁴Cu-labeled trastuzumab PET. *Cancer Science*, 101(4):1045–1050.

R. New. “Liposomes—A Practical Approach,” edited by B. D. H. D. Rickwood, Vol. 58 (IRL Press at Oxford University Press, 1994).

Simard P., Leroux J.C., Allen C. y Meyer O.; 2007. Liposomes for drug delivery. *Nanoparticles for Pharmaceutical Applications*. Domb AJ, Tabata Y, Ravi Kumar MNV (eds). American Scientific Publishers, Stevenson Ranch California, pp 1-62.

Sprott G. D.; 1992. Structures of archaeobacterial membrane lipids. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 24: 555-566.

Storm G., Oussoren C., Peeters P.A.M., y Barenholz Y.; 1993. In *Liposome Technology*. Vol. 3. Interaction of Liposomes with the Biological Milieu., Gregoriadis, G.(Ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 345-383.

Takeuchi H., Matsui Y., Sugihara H., Yamamoto H. y Kawashima Y.; 2005. Effectiveness of submicron-sized chitosan-coated liposomes in oral administration of peptide drugs. *Int. J. Pharm.*, 303: 160-1705.

Torchilin V.P.; 2005. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Rev.*, 4:145-160.

Wei Zhang, Yue Chen, Da Jing Guo, ZhanWen Huang, Liang Cai, Ling He; 2010. The synthesis of a d-glucosamine contrast agent, Gd-DTPA-DG, and its application in cancer molecular imaging with MRI. *Eur. J. Radiol.*, doi:10.1016/j.ejrad.2010.10.021

Wu Z.H., Ping, Q.N., Wei, Y. & Lai, J.M.; 2004. Hypoglycemic efficacy of chitosan-coated insulin liposomes after oral administration in mice. *Acta Pharmacol. Sin.*, 25: 966-972.

YanJun Fu, Sophie Laurent, y Robert N. Muller; 2002. Synthesis of a Sialyl LewisX Mimetic Conjugated with DTPA, Potential Ligand of New Contrast Agents for Medical Imaging. *Eur. J. Org. Chem.*, 3966-3973.

Discusión y conclusiones

Los sistemas nanoparticulados son nuevos y prometedores paradigmas en el tratamiento farmacológico y se utilizan en la terapia génica, la administración de fármacos e estudios por imágenes. Uno de los objetivos de los nanodiagnósticos es identificar la enfermedad en sus etapas tempranas. La imagenología molecular basada en nanopartículas ha establecido una plataforma única para el seguimiento celular, estudios diagnósticos, y seguimiento terapéutico (**Omer Aras y col., 2011**).

En particular en esta tesis, se investigaron diferentes sistemas nanoparticulados marcados con ^{99m}Tc . Para todas las formulaciones estudiadas se lograron obtener PRQ superiores al 90 %; la formulación con estarilamida-HYNIC, permite el empleo de distintos co-ligandos (tricina, EDDA y ácido nicotínico entre otros), permitiendo quizás con la utilización de otros o combinaciones de ellos una mejora en la estabilidad *in vivo* del complejo. En cuanto a la biodistribución se podría esperar que no se viera significativamente afectada por el cambio del coligando debido al carácter tan hidrofóbico de los liposomas. Esto último deberá verificarse a través de futuras investigaciones.

En los estudios de biodistribución en ratones normales tanto para los liposomas convencionales como para pegilados, se observa una depuración sanguínea apreciable con eliminación hepática y renal. En la composición de los HYNIC-PEG-liposomas (12.5 % m/m) en comparación con los DTPA-PEG-liposomas (6.7 % m/m) se formuló con un porcentaje mayor de PEG de los primeros, esperando así una mayor protección estérica y por tanto un tiempo de residencia mayor en sangre. Esta hipótesis se demuestra al tener un porcentaje de actividad por gramo a las 4 h de 12.3 ± 2.3 para los el HYNIC-PEG-liposomas y de 4.9 ± 2.7 para el DTPA-PEG-liposomas, en ratones normales. Igualmente la captación hepática sigue siendo la principal vía de metabolización con la consiguiente eliminación por vía intestinal, inclusive con una alta captación a las 4 h para ambas clases de liposomas. Quizás con un porcentaje mayor de pegilación en la composición del liposoma se logre disminuir esta captación, aunque esta estaría limitada por la posible reacción inmune como surge de trabajos que la evalúan tanto en animales como en humanos que sería causada por la inclusión del polímero PEG en la formulación de liposomas en administración i.v (Tatsuhiko Ishida y Hiroshi Kiwada, 2009).

Por otra parte, la eliminación renal puede ser explicada por el hecho de que los liposomas son metabolizados en el organismo y el radionucleido permanece unido a pequeños fragmentos de lípidos que puedan ser filtrados por el glomérulo. La fragmentación puede deberse a una metabolización ó a una desestabilización debida a la acción de lipoproteínas de alta densidad (HDL), para aseverarlo deben continuarse las investigaciones.

En cuanto a los estudios en ratones portadores de melanoma todas las clases de liposomas estudiadas mostraron tener una captación selectiva por el tumor, lo cual se desprende de las relaciones T/NT tanto en los estudios de biodistribución como en los centellográficos.

En la investigación realizada se demostró que los arqueosomas se pueden preparar con una metodología similar a la de los liposomas, presentando una eficiencia de marcado superior al 90%, también se observó que el ^{99m}Tc -DTPA-Arqueosmas es un excelente radiotrazador para la visualización no invasiva de melanoma, mostrando una acumulación específica en el tumor, pudiendo esto quizás deberse a la presencia de macrófagos en el ambiente tumoral que selectivamente capturen los arqueosomas, no siendo tan importante esta captura para los ester-lípidos presentes en los liposomas. Esta hipótesis debe ser estudiada en profundidad en futuras investigaciones.

Como proyecciones de este trabajo se podría pensar en la evaluación de los arqueosomas como nuevos radiotrazadores para estudios de Ganglio Centinela.

Otra proyección es el empleo de liposomas en una estrategia de mejora del targeting activo de estos, por medio de un sistema triple: anticuerpo-biotinado, avidina, liposomas-biotina, no sólo permitiendo de esta manera una mejora en la captación tumoral de los liposomas, sino la posibilidad de vehicularizar específicamente un fármaco al tumor.

Otra estrategia a estudiar para mejorar la captación tumoral de los liposomas es la co-administración de Valsartán junto a la formulación liposomal (Diop-Frimpong B. y col., 2011). El Valsartán es un antagonista selectivo de los receptores de la angiotensina II (ARA II) de tipo 1 (AT1) y por medio de esta interacción disminuye efectivamente la presión arterial, también bloquea los receptores AT1 en varios tejidos y órganos disminuyendo la vasoconstricción de la aldosterona produciendo un efecto hipotensor. Por tanto a nivel tumoral se espera una hipertensión local, facilitando así que se produzca en mayor medida el efecto EPR.

Como conclusión se puede aseverar que en ésta tesis se investigó la marcación y caracterización de distintos nanosistemas lipídicos. Se desarrollaron dos sistemas de marcación a través de sistemas bifuncionales como lo son el DTPA y el HYNIC, obteniéndose para todos los nanosistemas marcados con ^{99m}Tc , alta pureza radioquímica y estabilidad tanto *in vitro* como *in vivo*. Los sistemas liposomales y los arqueosomas desarrollados, demostraron tener captación selectiva por el modelo tumoral utilizado. Constituyendo así, a estos nanovehículos como potenciales candidatos a radiofármacos para la detección de tumor de melanoma a través de imágenes centellográficas.

Bibliografía

Diop-Frimpong Benjamin, Chauhan Vikash P., Krane Stephen, Boucher Yves, y Rakesh Jain K. (2011). Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. PNAS, 108 (7):| 2909–2914.

Omer Aras, Thorsten Fleiter, Jean Jeudy y Marie-Christine Daniel (2011). Gold nanoparticle imaging agents and uses thereof. U.S. Patent application number: 20110110858.

Tatsuhiro Ishida y Hiroshi Kiwada (2009). Unexpected Reactions by In Vivo Applications of PEGylated Liposomes. T.J. Webster (ed.), Safety of Nanoparticles, Nanostructure Science and Technology, DOI 10.1007/978-0-387-78608-7 6.

Son muchas las personas a las que les debo mi agradecimiento y que sin su colaboración no se podría haber realizado este trabajo.

Gracias a mi tutora Henia Balter, a Pablo Cabral por su entrega y apoyo, a Williams Porcal por su guía y horas invertidas en este trabajo. Muchas gracias a mis compañeros del CIN, en especial a Marcelo Fernández y Nicole Lecot por las largas horas compartidas de ensayos.

Gracias a Alejandra Medrano y María de la Paz Xavier por su ayuda en la caracterización de los liposomas; al Centro de Medicina Nuclear, en especial a Juan Pablo Gambini por la toma de imágenes. Por el mismo motivo agradezco también a Andrea Paolino.

Gracias a María Moreno y Alejandro Chabalgoity por brindarnos las células. Finalmente gracias a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación y a PEDECIBA por el apoyo financiero a este posgrado.