

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA FACULTAD DE CIENCIAS



Maestría en Biotecnología



Vehiculización del aptámero Sgc8c utilizando materiales nanoestructurados para su aplicación en imagenología molecular

Lic. María Romina Castelli Pedriel

Tutores

Dr. Hugo Cerecetto Departamento de Radiofarmacia, CIN, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay Dra. Victoria Calzada Departamento de Radiofarmacia, CIN, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay Dra. Romina Glisoni Instituto de Nanobiotecnología NANOBIOTEC UBA-CONICET Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, Argentina

Tribunal

Dr. Gonzalo Moratorio Laboratorio de Virología Molecular, CIN, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay Dr. Matías Möller Laboratorio de Fisicoquímica Biológica, IQB, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay Dra. Hebe Durán Comisión Nacional de Energía Atómica, Instituto de Nanociencia y Nanotecnología, Argentina

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis tutores Dr. Hugo Cerecetto, la Dra. Victoria Calzada y la Dra. Romina Glisoni, por la oportunidad, su confianza, dedicación y apoyo.

Agradecerle al Dr. Pablo Cabral, por su tiempo y asesoramiento.

Agradecerle a Marcelo Fernández, por su colaboración y apoyo en los estudios de biodistribución.

A Estefanía Sicco, por su colaboración con los estudios realizados en células.

A Ana Paula Arévalo, por brindarme soporte con el equipamiento para la toma imágenes moleculares.

Agradecerle al Dr. Ricardo Faccio, la Dra. Iris Miraballes y al Dr. Manuel Ibarra, por su apoyo en diferentes técnicas y su disposición.

Agradecer a Nicolás Martínez Ríos de MR Pharma, por el soporte y conocimiento, y otorgarme los liposomas para la realización del presente trabajo.

A la Agencia Nacional de Investigacion e Innovación por otorgarme la beca de maestría para poder llevar a cabo el proyecto, a la Comisión de Posgrado en Biotecnología y al Programa de movilidad e intercambios académicos, de la Comisión Sectoria de Investigación Científica, por financiarme la pasantía en la Universidad de Buenos Aires.

Especialmente agradecer a mi familia, por acompañarme en este camino.

A mis amigas, por estar siempre, por brindarme sus consejos y apoyo.

A mis compañeras y compañeros del CIN.

TABLA DE CONTENIDO

A	AGRADECIMIENTOS1						
L	LISTA DE ABREVIATURAS6						
ÍN	NDICE DE FIGURAS10						
ÍN	DICE DE TABLAS17	7					
1.	RESUMEN20)					
2.	INTRODUCCIÓN22	2					
	2.1 CÁNCER	3					
	2.1.1 Incidencia y mortalidad	3					
	2.1.2 LINFOMA	ł					
	2.1.3 PTK7	7					
	2.2 IMAGENOLOGÍA MOLECULAR)					
	2.2.1 IMAGENOLOGÍA ÓPTICA	2					
	2.2.2 IMAGENOLOGÍA DE FLUORESCENCIA	3					
	2.2.3 Agentes de imagenología molecular	7					
	2.2.3.1 Sondas fluorescentes: generadores de imagen	3					
	2.2.3.1.1 Alexa Fluor 647)					
	2.2.3.2 Aptámeros: moléculas de reconocimiento41	L					
	2.2.3.2.1 Sgc8c	ł					
	2.3 NANOMEDICINA	5					
	2.3.1 Aplicaciones	7					
	2.3.2 Entrega pasiva y entrega activa	3					
	2.3.3 LIPOSOMAS	<u>)</u>					

	2.3.4 MICELAS POLIMÉRICAS	54
3.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	61
	3.1 HIPÓTESIS	62
	3.2 OBJETIVO GENERAL	62
	3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	63
	4.1 VEHICULIZACIÓN DE SGC8C-ALEXA FLUOR 647	64
	4.1.1 PREPARACIÓN DE SGC8C-ALEXA FLUOR 647	64
	4.1.2 PREPARACIÓN DE SGC8C-ALEXA FLUOR 647 CO-ASOCIADO A NANOSISTEMAS	65
	4.2 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA	58
	4.2.1 DETERMINACIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA Y POTENCIAL ZETA	58
	4.2.2 Análisis de los nanosistemas por Microscopía Electrónica de	
ΤF	ANSMISIÓN	70
	4.2.3 ANÁLISIS DE LOS NANOSISTEMAS POR MICROSCOPÍA DE FUERZA ATÓMICA	70
	4.2.4 ESTABILIDAD EN EL TIEMPO	71
	4.2.5 Estudio de liberación in vitro	71
	4.3. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA	72
	4.3.1 CAPTACIÓN CELULAR POR MICROSCOPÍA CONFOCAL	72
	4.3.2 Estabilidad en suero fetal bovino	73
	4.3.3 BIODISTRIBUCIONES E IMAGENOLOGÍA MOLECULAR	74
	4.3.4 FARMACOCINÉTICA	75
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
	5.1 VEHICULIZACIÓN DE SGC8C-ALEXA FLUOR 647	78
		70

5.1.2 CO-ASOCIACION Y PURIFICACIÓN SGC8C-ALEXA FLUOR 647 A LOS NANOSISTEMAS
5.2. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA
5.2.1 DETERMINACIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA Y POTENCIAL ZETA
5.2.2 Morfología de los nanosistemas por Microscopía de Transmisión
ELECTRÓNICA
5.2.3 Morfología de los nanosistemas por Microscopía de Fuerza Atómica93
5.2.4 ESTABILIDAD EN EL TIEMPO98
5.2.5 Ensayo de liberación in vitro101
5.3. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA105
5.3.1 CAPTACIÓN CELULAR POR MICROSCOPÍA CONFOCAL105
5.3.2 Estabilidad en suero fetal bovino108
5.3.3 BIODISTRIBUCIONES E IMAGENOLOGÍA MOLECULAR110
5.3.4 FARMACOCINÉTICA121
6. CONCLUSIONES125
7. PERSPECTIVAS
8. BIBLIOGRAFÍA

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFM	Microscopía de fuerza atómica (del inglés Atomic Force Microscopy)
ARN	Ácido ribonucleico
CCK4	Quinasa-4 de carcinoma de colon (del inglés Colon Carcinoma Kinasa 4)
CEUA	Comisión de Ética en el Uso de Animales
CL	Clearance de eliminación
СМС	Concentración micelar crítica (del inglés Critical Micelle Concentration)
СТ	Tomografía computada (del inglés Computed Tomography)
D	Coeficiente de difusión traslacional
DE	Desvío estándar
D_h	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión de luz dinámica (del inglés Dynamic Light Scattering)
Dsh	Del inglés Dishevelled
Dv	Dosis (ROI/µL)
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
EPR	Efecto de permeabilidad y retención mejorada (del inglés Enhanced Permeability and Retention)
ErbB	Factor de crecimiento epidérmico (del inglés epidermal growth factor)
FGFR	Receptor del factor de crecimiento fibroblástico (del inglés Fibroblast Growth Factor Receptor)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (del inglés Fluorescein IsoThioCyanate)
Fz7	Receptor frizzled 7 (del inglés Frizzled receptor 7)
HLB	Balance hidrofílico-lipofílico (del inglés Hydrophilic Lipophilic Balance)

- **HPLC** Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (del inglés *High Performance Liquid Chromatography*)
- **HPLC-RP** Cromatografía Líquida de Alta Eficacia de fase reversa (del inglés *High Performance Liquid Chromatography-Reverse Phase*)
- **ICG** Indocianina verde (del inglés *Indocyanine Green*)
- **InsR** Receptor de insulina (del inglés *Insulin Receptor*)
- IR Índice de refracción
- Iv Intravenosa
- KLG (del inglés Kinase Like Gene)
- LH Linfoma Hodgkin
- LNH Linfoma no Hodgkin
- LPS Liposomas libres preformados
- LPS separado por columna
- LPS-sonda LPS co-asociado a la sonda
- LPS-sonda-c LPS-sonda separado por columna (LPS-sonda-columna)
- MB Azul de metileno (del inglés *Methylene Blue*)
- MPs Micelas poliméricas (del inglés *Polymeric Micelles*)
- MPs-c MPs separada por columna
- MPs-sonda MPs co-asociadas a la sonda
- MRI Imagenología de Resonancia Magnética (del inglés Magnetic Resonance Imaging)
- **MRT** Tiempo medio de residencia (del inglés *Mean Residence Time*)
- **MT1-MMP** Metaloproteinasa de matriz tipo 1 (del inglés *Membrane Type 1-Matrix MetalloProteinase*)
- **NADH** Nicotinamida adenina dinucleótido (del inglés *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*)
- **NIH** Instituto Nacional de Salud (del inglés *National Institute of Health*)
- NIR Región del infrarrojo cercano (del inglés Near InfraRed)

- **nRTKs** Tirosinquinasa no receptora o citosólica (del inglés *non-Receptor Tyrosine Kinase*)
- OMS Organización Mundial de la Salud
- **OTK** (del inglés *Off Track Kinase*)
- PCP Polaridad planar celular (del inglés *Planar Cell Polarity*)
- **PCR** Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction*)
- **PDGFR**Receptor del factor de crecimiento de plaquetas (del inglés *Platelet-Derived*
Growth Factor Receptors)
- **PDI** Índice de polidispersión (del inglés *PolyDispersity Index*)
- **PEG/PEO** Polietilenglicol/Polietilenóxido (del inglés *PolyEthyleneGlycol/PolyEthylene Oxide*)
- **PET** Tomografía de emisión de positrones (del inglés *Positron Emission Tomography*)
- **PET-CT** Tomografía de emisión de positrones (del inglés *Positron Emission Tomography Computed Tomography*)
- PMs Pesos moleculares
- **PTK7** Proteína tirosinquinasa 7 (del inglés *Protein Tyrosine Kinase 7*)
- **Q** *Clearance* intercomartimental
- Rack1Receptor para la quinasa 1 activada (del inglés Receptor For Activated C
Kinase 1)
- **RMN** Resonancia Magnética Nuclear (del inglés *Resonance Magnetic Nuclear*)
- **ROI** Región de interés (del inglés *Regions Of Interest*)
- **RTK** Receptor tirosinquinasa (del inglés *Receptor Tyrosine Kinase*)
- **RT-PCR** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (del inglés *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)
- **SELEX** Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (del inglés *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*)

SFB Suero fetal bovino

Sonda	Sgc8c-Alexa Fluor 647
-------	-----------------------

- **SPECT-CT** Tomografía computada de emisión de fotón único (del inglés *Single Photon Emission-Computed Tomography*)
- **T-ALL** Células T de leucemia linfoblástica aguda (del inglés *T cell-Acute Lymphoblastic Leukemia*)
- **TEM** Microscopía electrónica de transmisión (del inglés *Transmission Electron Microscopy*)
- US Ultrasonido
- UV Ultravioleta
- V1 Volumen del compartimiento central
- V2 Volumen del compartimiento periférico
- VEGFRReceptor del crecimiento vascular endotelial (del inglés Vascular Endothelial
Growth Factor Receptors)
- **VPC** Verificación visual predictiva (del inglés *Visual Predictive Check*)
- **VSS** Volumen de distribución estacionario (del inglés *Steady state volume of distribution*)
- **Z-potencial** Potencial-zeta

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ubicación de LNH en cada etapa26
Figura 2	Diagrama de Jablonski, esquema de los procesos de fluorescencia
	y fosforescencia
Figura 3	Estructura de la indocianina verde (A) y del azul de metileno (B) 36
Figura 4	Esquema de agente imagenológico sencillo (A) y con linker (B), junto
	a su blanco molecular
Figura 5	Estructura de fluoresceína (A) y tetrametilrodamina (B) 39
Figura 6	Estructura de isotiocianato de fluoresceína (FITC) 39
Figura 7	Espectro de emisión de la serie Alexa Fluor (Thermofisher) 40
Figura 8	Estructura de un derivado de Alexa Fluor 647 utilizado para
	derivatizar nucleófilos
Figura 9	Espectro de emisión/excitación de Alexa Fluor 647 (Thermofisher) 41
Figura 10	Estructura de los aptámeros Sgc8 (A) y Sgc8c (B) 45
Figura 11	Nanomedicinas. Tipos de nanopartículas utilizadas en investigación y
	clínica (A). Esquema de nanopartículas PEGiladas con y sin ligando
	(B)
Figura 12	Entrega pasiva (A). Entrega pasiva de nanoestructuras (A-1). Esquema

	de la influencia del tamaño, en la retención en el tejido tumoral (A-2).
	Entrega activa (B). Nanoestructuras cargadas con ligandos situados en su
	superficie, se unen a receptores sobreexpresados en las células tumoral
	(B-1) o células endoteliales angiogénicas (B-2) 51
Figura 13	Esquema de captación e internalización de nanosistemas
Figura 14	Clasificación de LPS según su estructura lamelar53
Figura 15	Esquema de preparación de LPS según lamelaridad 54
Figura 16	Esquema de formación espontánea de MPs en medio acuoso 55
Figura 17	Estructura molecular general de poloxámeros y poloxaminas formadoras
	de MPs
Figura 18	Esquema de técnicas de preparación de MPs60
Figura 19	Estructura de Sgc8c-Alexa Fluor 647
Figura 20	Sistemas de separación usados: columna qEV IZON (izquierda) y
	microcones 10 kDa y 30 kDa (derecha)
Figura 21	Sistemas de liberación a base de MPs (10% p/v): T908-libre (izquierda),
	T908-sonda (centro), sonda-libre (derecha) (A). Sistemas de liberación in
	vitro en agitador (B)
Figura 22	Cromatograma de HPLC-RP de control de la derivatización de Sgc8c-
	Alexa Fluor 647, con columna C18. En la parte superior, se observa el

- Figura 25 Perfil de elución en agua, de la sonda-libre (22 μg/mL), LPS-libre y LPSsonda (22 μg/mL, relación 1:10000), mediante una columna de exclusión vesicular qEV. Medición de intensidad de fluorescencia (IF672/647) de las fracciones de 0,5 mL, eluidas de la columna......81

- Figura 30 Microscopías AFM de fase (A), topográficas 3D (B) y gráfico de amplitud (C), de sonda-libre, LPS-libre y LPS-sonda (soporte de mica)

- Figura 34Perfiles de liberación in vitro de la sonda-libre, LPS-sonda y T908-sonda (10 %p/v), a intervalos pre-establecidos de tiempo: 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 20, 24, 25 y 27

horas.	Todas	las	preparacion	es se	ensaya	on a	una	concentración	de 50	µg/mL
de son	da									103

- Figura 38 Gráfico de estabilidad en suero fetal bovino (SFB) de sonda-libre y LPSsonda a 0,5, 2 y 24 horas de incubación, medido en porcentaje de intensidad de fluorescencia (% IF) en los diferentes rangos de masa molecular (≥ 30 kDa, 10 a 30 kDa y < a 10 kDa) 108</p>
- Figura 39 Gráfico de biodistribución de LPS-sonda-columna (LPS-sonda-c) a 0,5,
 2, 24 horas post inyección, control con sonda-libre, a 2 h post-inyección en ratones BALB/c con tumor de linfoma inducido A20 (n=5).....111

- Figura 41 Gráfico de biodistribución de T908-sonda (10% p/v) a 0,5, 2, 24 h post inyección y control con sonda-libre a 2 h post-inyección en ratones
 BALB/c con tumor de linfoma inducido A20 (n=5) 115

- Figura 46 Imagen ex vivo de los órganos disecados en ratón BALB/c con tumor de linfoma inducido A20, 0,5 horas post inyección de T908-sonda (10% p/v), tomada con el equipo In-Vitro MS FX Pro (Bruker). En círculo amarillo,

con	la	letra	"T",	se	indica	el	tumor	у	en	naranja	у	con	la	letra	"R"
riño	nes	5													119

- Figura 47 Imagen ex vivo de los órganos disecados (en A se muestran todos los órganos, en B se extrae de la misma imagen intestino y estómago) en ratón BALB/c con tumor de linfoma inducido A20, 2 horas post inyección de T908-sonda (10% p/v), tomada con el equipo In-Vitro MS FX Pro (Bruker). En círculo amarillo, con la letra "T", se indica el tumor y en gris, con la letra "I" intestino y con la "E" estómago...... 119

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Resumen de las isoformas de PTK7 humano.
Tabla 2	Técnicas imagenológicas, ventajas y desventajas.
Tabla 3	Imagenología oncológica y nanomedicina.
Tabla 4	Copolímeros comerciales formadores de MPs y sus características estructurales.
Tabla 5	Relación LPS:sonda y porcentaje de sonda co-asociada a LPS.
Tabla 6	Esquema de MPs-libres (F127-libre, T1307-libre y T908-libre) y MPs-sonda.
Tabla 7	Caracterización de los sistemas libres y co-asociados a la sonda, por DLS.
Tabla 8	Esquema representativo de co-asociación LPS-sonda, relación sonda:LPS y
	porcentaje de sonda co-asociada a los LPS.
Tabla 9	Estudio de separación de sonda-libre de LPS-sonda (22 μ g/mL, relación
	1:10000), mediante una columna de exclusión vesicular qEV y agua como fase
	móvil agua. Medición de intensidad de fluorescencia (IF672/647) y absorbancia
	a 650 nm, de las fracciones de 0,5 mL, eluidas de la columna.
Tabla 10	Z-average, diámetro hidrodinámico (Dh), índice de polidispersión (PDI) y
	potencial Zeta (Z-potencial) de LPS-columna y LPS-libres a diluciones 1:10 y
	1:50, determinados por DLS, en agua y PBS, a 25 °C. Los cálculos se expresan
	como la media de cada parámetro ± DE.
Tabla 11	7 average diámetro hidrodinámico (Dh) índice de polidionercián (DDI) y

Tabla 11 Z-average, diámetro hidrodinámico (Dh), índice de polidispersión (PDI) y potencial Zeta (Z-potencial) de de LPS-columna (LPS-c) y LPS-libres a diluciones 1:10 y 1:50, determinados por DLS, en agua y PBS, a 37 °C. Los cálculos se expresan como la media de cada parámetro ± DE.

- Tabla 12 Z-average, diámetro hidrodinámico (Dh), índice de polidispersión (PDI) y potencial Zeta (Z-potencial) de LPS-sonda (25 y 50 μg/mL de sonda), determinados por DLS, en agua a 37 °C. Los cálculos se expresan como la media de cada parámetro ± DE.
- Tabla 13 Z-average, diámetro hidrodinámico (Dh), índice de polidispersión (PDI) y potencial Zeta (Z-potencial) de LPS-columna co-asociado a sonda (LPS-sonda-c) y LPS-columna (LPS-c), determinados por DLS, en agua a 25 y 37 °C. Los cálculos se expresan como la media de cada parámetro ± DE.
- Tabla 14 Diámetro hidrodinámico (Dh), índice de polidispersión (PDI) y potencial Zeta (Z-potencial) de MPs (10% p/v): F127, T1307 y T908, libres y co-asociados a la sonda, determinados por DLS, en agua y PBS a 25 °C. Los cálculos se expresan como la media de cada parámetro ± DE.
- Tabla 15Tamaños de las nanoestructuras libres y co-asociados a la sonda, medianteTEM.
- **Tabla 16**Z-average, diámetro hidrodinámico (Dh), índice de polidispersión (PDI) y
potencial Zeta (Z-potencial) a 0, 24 y 72 horas, de LPS-sonda (50 μ g/mL) en en
agua-ultrapurificada, determinados por DLS, a 25 °C, en el plan estabilidad. Los
cálculos se expresan como la media de cada parámetro ± DE.
- Tabla 17 Diámetro hidrodinámico (Dh), índice de polidispersión (PDI) y potencial Zeta (Z-potencial) como parámetros de control en la estabilidad in vitro de las MPs (F127, T1307 y T908, 10% p/v) co-asociadas a la sonda (50 μg/mL) a tiempos:
 0, 24 y 72 horas, determinados por DLS, en agua-ultrapurificada y PBS, a 25°C. Los cálculos se expresan como la media de cada parámetro ± DE.

- Tabla 18Z-average, diámetro hidrodinámico (Dh), índice de polidispersión (PDI) y
potencial Zeta (Z-potencial) de la sonda-libre (50 μ g/mL), determinados por
DLS, en agua-ultrapurificada a 25 °C, en el plan estabilidad. Los cálculos se
expresan como la media de cada parámetro ± DE.
- **Tabla 19**Datos obtenidos de la concentración de la sonda vs absorbancia (650 nm) para
la construcción de la curva de calibración de la sonda, en agua-ultrapurificada.
- Tabla 20 Estudio de estabilidad en suero fetal bovino (SFB) de la sonda-libre y LPSsonda a 0,5, 2 y 24 horas de incubación, medido en porcentaje de intensidad de fluorescencia (% IF) en los diferentes rangos de masa molecular (≥ 30 kDa, 10 a 30 kDa y < a 10 kDa).</p>
- Tabla 21 Biodistribución LPS-sonda-columna a 0,5, 2, 24 h post inyección y control con sonda-libre a 2 h post-inyección en BALB/c con tumor de linfoma inducido A20 (n=5). Relaciones tumor/órgano a 0,5, 2, 24 h post inyección. Valores informados en ROI.
- Tabla 22 Biodistribución de T908-sonda (10% p/v) a 0,5, 2, 24 horas post inyección y control con sonda-libre a 2 h post-inyección en BALB/c con tumor de linfoma inducido A20 (n=4). Relaciones tumor/órgano a 0,5, 2, 24 h post inyección.
- Tabla 23 Parámetros farmacocinéticos estudiados en la sonda-libre (Fórmula 0) y T908-sonda (10% p/v), en ratones BALB/c normales (n=5), a 0,08, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 6, 18, 24 y 48 h post-inyección.

1. RESUMEN

Resumen

La imagenología molecular permite la caracterización, visualización y seguimiento de procesos biológicos. Es una metodología no invasiva, fundamental para el diagnóstico de cáncer ya que brinda información sin perturbar el entorno tumoral. En este sentido, es sustancial contar con agentes imagenológicos que proporcionen información clara sobre la patología en estudio.

Los aptámeros, son oligonucleótidos de ADN o ARN, que se unen con alta especificidad y afinidad a su molécula blanco. A su vez, carecen de toxicidad, no son inmunogénicos, son de rápida producción y bajo costo. Estas características, los posicionan como biomoléculas interesantes para el desarrollo de nuevos agentes de imagen y otras plataformas biotecnológicas. Sgc8c, es un aptámero con alta afinidad por el receptor PTK7, el cual se encuentra sobreexpresado en cáncer de colon, próstata, mama, leucemia, pulmón y linfoma.

Los liposomas y las micelas poliméricas son excelentes nanosistemas para el transporte y la optimización de las propiedades biofarmacéuticas de moléculas activas, siendo que favorecen la estabilidad y la biodisponibilidad de éstas en el organismo, manteniendo el reconocimiento por sus blancos moleculares.

Es así que, el presente trabajo, versó sobre el estudio de la co-asociación del aptámero Sgc8c funcionalizado con el fluoróforo Alexa Fluor 647, a liposomas preformados altamente estables y a micelas poliméricas biocompatibles y termosensibles, a base del poloxámero F127 y de las poloxaminas T1307 y T908, para su aplicación en imagenología molecular. Se realizó la caracterización fisicoquímica exhaustiva de los nanosistemas libres y co-asociados a la sonda, los estudios de estabilidad *in vitro* y finalmente, se procedió a la evaluación biológica, estudiando la farmacocinética y la biodistribución en modelos de ratones portadores de tumores.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 CÁNCER

El cáncer es una enfermedad de diversas causas, en donde cambios en los genes, afectan las funciones de las células, incidiendo básicamente en su división y crecimiento. Los cambios en los genes pueden ser hereditarios o generados por factores ambientales. Éstos son básicamente: sustancias químicas, exposición frecuente a radiaciones y situaciones de estrés (National Cancer Institute [NCI], 2021). Las modificaciones celulares generadas por cambios genéticos suceden a nivel de los proto-oncogenes, genes reparadores del ADN y genes supresores tumorales. Cuando hay mutaciones a nivel de los proto-oncogenes, ya sea debido a alteraciones o a un aumento de su actividad, no pueden regular ni controlar el crecimiento ni los procesos habituales de muerte celular. Cuando hay modificaciones a nivel de los genes reparadores de ADN, las mutaciones que no pudieron ser reparadas por estos, generan células mutadas, provocando sucesivas mutaciones, obteniéndose muy probablemente una célula cancerosa. Finalmente, los supresores tumorales, cuando se encuentran alterados, no van a poder controlar el crecimiento ni la división celular, por ende, se puede generar un crecimiento celular exacerbado. A su vez, la proliferación rápida de células anormales puede extenderse más allá de los límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o diseminarse a otros órganos, proceso denominado metástasis (NIC, 2021).

2.1.1 Incidencia y mortalidad

El cáncer, es la segunda causa de muerte en el mundo, según lo reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2021). En Uruguay, también se sitúa como la segunda causa de muerte, luego de las enfermedades cardiovasculares (Ministerio de Salud Pública [MSP], 2021). Debido a estos números, es fundamental la

generación de nuevos enfoques y desarrollos para el tratamiento y diagnóstico de esta patología (Global Cancer Observatory, 2021).

Uno de los factores más importantes en la sobrevida del paciente es el avance de la enfermedad al momento del diagnóstico. Si bien se está realizando un gran trabajo a nivel de prevención, muchos países carecen de datos de la población con dicha enfermedad, lo cual genera dificultad para la implementación de políticas de lucha contra el cáncer. Esta problemática sumada al diagnóstico tardío lleva a que el inicio del tratamiento suceda en etapas ya avanzadas de la enfermedad, lo cual lleva a una menor tasa de sobrevida del paciente.

La clasificación y el nombre de los diferentes tipos de cáncer, está dado generalmente por el tipo de tejido y órgano en dónde se originan. Como ser, los carcinomas se originan en las células epiteliales, los sarcomas en los huesos y tejido blando, como ser el tejido adiposo, el tejido fibroso, los vasos linfáticos y los sanguíneos. El mieloma múltiple se origina a partir de células plasmáticas, cuando son anormales se denominan células de mieloma y se acopian en la médula ósea. Los tumores cerebrales y de la médula espinal tienen origen en las células del tejido nervioso, en donde el nombre del tumor surge a partir del tipo celular. Los melanomas se originan en células capaces de producir melanina (melanocitos), y a su vez, los linfomas surgen en los linfocitos (T o B) (NIC, 2021).

2.1.2 Linfoma

La incidencia de linfoma en Uruguay representa el 9,6% del total de los cánceres y 3,0% de muertes, ubicándose en el octavo tipo de cáncer con mayor incidencia y mortalidad en Uruguay (Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer, 2021).

En el cáncer del tipo linfoma, el sistema linfático se encuentra afectado. El sistema linfático es una gran red de ganglios y vasos linfáticos, cuya función es defender al organismo frente a

infecciones y neoplasias. Por los vasos linfáticos, circula la linfa, la cual contiene linfocitos B y T. Los linfocitos B, son los responsables de la producción de anticuerpos y los linfocitos T, se encargan de destruir los virus y las células extrañas y estos a su vez activan a los linfocitos B, para la producción de anticuerpos. Los ganglios linfáticos se ubican en zona submandibular, cervical, axilar, inguinal y poplítea. En ellos, se produce la maduración y la activación de los linfocitos. A su vez, el bazo y el timo también forman parte del sistema linfático. En el bazo, ocurre la producción de linfocitos, almacenamiento de glóbulos rojos y linfocitos, filtración de la sangre y destrucción de glóbulos rojos viejos. En el timo, sucede la maduración de los linfocitos T y su multiplicación (NIC, 2021).

En base a los tipos celulares involucrados, el linfoma se clasifica en dos grandes grupos, linfoma Hodgkin (LH) y no Hodgkin (LNH). El LH, se caracteriza por la presencia de células de Reed-Sternberg, las cuales proceden generalmente de las células B de los centros germinales (Matasar y Zelenetz, 2008). En el LNH, hay alteración en los linfocitos B y otros tipos celulares. Las alteraciones en las células B, representan el 15% en el LH y el 80% en el LNH. El LNH abarca desde la etapa I a la IV, en la etapa I y II se encuentran afectados grupos de ganglios linfáticos en el mismo lado (superior o inferior) en relación al diafrágma, mientras que a partir de la etapa III, se encuentran afectados tanto el lado superior e inferior respecto al diafragma, como se observa en la **Figura 1** (The Leukemia & Lymphoma Society® [LLS], 2021). Independientemente del estadio, los cánceres abarcan escasa y alta malignidad, los de escasa, involucran un crecimiento lento de las células alteradas y en los cánceres con alta malignidad, el crecimiento de las células malignas es rápido. Dentro de los LNH de células B, la mitad corresponde a linfomas difusos de células B grandes, luego en orden de prevalencia, se encuentra el linfoma folicular, el linfoma de la zona marginal, linfoma de Burkitt y linfoma del mediastino (Donnou, 2012). El linfoma difuso de células B grandes es la forma más común y agresiva de los LNH, y tiene su origen en los linfocitos B maduros. Debido a que solamente el 40% de los pacientes tratados responden al tratamiento habitual, se pudo evidenciar la existencia de varios tipos de linfoma difuso de células B grande. Clasificándose entonces en: células B del centro germinal, activadas o derivadas del timo. Estos pueden diferenciarse según el estado de maduración o activación del linfocito B y el tipo de mutación (Alizadeh, 2000).



Figura 1. Ubicación de LNH en cada etapa. Extraído de LLS, 2021.

El diagnóstico del linfoma está basado en la historia y exámenes clínicos del paciente. Se requiere: hemograma completo, funcional y enzimograma hepático, análisis de orina, biopsias de ganglio y médula ósea con inmunohistoquímica y mielograma. A su vez, imagenología rayos X de tórax, abdomen y pelvis, tomografía computarizada (CT), resonancia magnética (RM), tomografía de emisión de positrones con 18-fluordesoxiglucosa (¹⁸FDG-PET), ecografías y valoración cardiovascular (Nesse, 2008). El tratamiento inicia en el momento del

diagnóstico. Generalmente, se trata con una quimioterapia conformada de cuatro o más fármacos, conocida como CHOP (Ciclofosfamida (Cytoxan®), Hidroxidoxorrubicina (Doxorrubicina), Vincristina (Oncovin®) y Prednisona). Acompañándose en casos más avanzados, con Rituximab (Rituxan®) y/o radioterapia en el sector afectado. Para evaluar continuar con los tratamientos, se realiza ¹⁸F-PET. Esta quimioterapia intensiva con múltiples fármacos puede ser muy eficaz en casos de linfoma agresivo, y el resultado puede ser la cura (Nesse, 2008; LLS, 2021).

2.1.3 PTK7

Las proteínas tirosinquinasas (PTKs), son enzimas que transfieren un grupo fosfato proveniente de ATP a residuos aminoacídicos de tirosina, modulando de esta forma, numerosas actividades celulares, actuando en las cascadas de señalización intracelular. Se subdividen en PTKs citosólicas o no receptoras (nRTKs) y en receptores de PTK (RTKs) (Butti, 2018).

Los RTK, presentan un rol fundamental en las vías de señalización celular. Regulan las vías de proliferación, diferenciación, migración y sobrevida celular, entre otras. Los RTK, poseen un dominio extracelular (N-terminal) de unión al ligando y un dominio quinasa intracelular, que se une y fosforila el sustrato, siendo el responsable de la actividad catalítica. Los receptores son activados por la unión al ligando, produciendo la dimerización del receptor. Generando una cascada de señales a nivel intracelular, lo cual resulta en numerosos cambios celulares (Kung, Chen, y Robinson 1998; Regad, 2015; Butti, 2018).

La familia de los RTK, se subdivide, en función de la similitud del dominio tirosinquinasa, del dominio extracelular o su organización génica (Chen y Hung, 2015). Las 20 subfamilias, incluyen, el receptor del factor de crecimiento de plaquetas (PDGFR), receptor del crecimiento vascular endotelial (VEGFR), receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR), receptor del factor de insulina (InsR), factor de crecimiento epidérmico (ErbB, que incluye al receptor del factor

de crecimiento epidérmico (EGFR), la proteína tirosinquinasa 7 (PTK7), entre otros (Butti, 2018).

El PTK7, fue identificado en células de cáncer de colon, siendo denominado quinasa-4 de carcinoma de colon (CCK4) (Mossie, 1995). Este receptor está altamente conservado en diferentes especies, encontrándose entre ellas, en Drosophila con las siglas OTK (del inglés *Off Track Kinase*) y en pollos como KLG (del inglés *Kinase Like Gene*) (Cafferty, 2004; Peradziryi, Tolwinski, y Borchers, 2012; Lhoumeau, 2015). La región extracelular, está constituida por siete dominios extracelulares tipo inmunoglobulinas, una región transmembrana y un dominio catalítico tirosinquinasa inactivo (conservado evolutivamente). Por este motivo es considerado una pseudoquinasa (Lee, Strunk, y Spritz, 1993; Mossie, 1995; Jung, 2002).

El gen PTK7 humano, se encuentra en la región 6p21.1-p12.2 del cromosoma, organizado en 20 exones. Se han detectado cinco isoformas del receptor PTK7 humano (**Tabla 1**) y dos en ratón, una de 100 y otra de 140 kDa, compartiendo un 92.6 % de identidad (Jung, 2002; Jung, 2004).

Tabla 1. Resumen de las isoformas de PTK7 humano. Adaptado dehttp://atlasgeneticsoncology.org/Genes/PTK7ID41901ch6p21.html

	ARNm (pb)	Pérdida de exones	Aminoácidos	PM (kDa)	Estructura
Isoforma 1	3213	-	1070 118.5 Entera		Entera
Isoforma 2	3093	10	1030	114	Pérdida de la mitad del loop Ig6
Isoforma 3	3045	8, 9 y 10	1014	103.7	Pérdida del loop Ig5, y parte del Ig6
Isoforma 4	2823	12 y 13	940	112.4	Pérdida del loop Ig7
Isoforma 5	2451	16 al 20	816	90	Pérdida del dominio tirosinquinasa

Se ha reportado que el dominio extracelular, puede ser escindido por la metaloproteasa MT1-MMP (metaloproteinasa de matriz tipo 1), afectando la polaridad planar celular (PCP) y la migración celular (Golubkov, 2010; Lichtig, 2019). A su vez, en base a estas pérdidas funcionales, se ha demostrado que el rol de PTK7 es crucial para el desarrollo embrionario a nivel del tubo neural como cardíaco, en vertebrados (Caddy, 2010; Lhoumeau, 2015; Berger, 2017; Lichtig, 2019).

PTK7 se encuentra implicado en las vías de señalización Wnt canónica y no canónica Wnt/PCP, interactuando con los receptores Wnt y sus ligandos (Caddy, 2010; Hayes, 2013; Berger, Wodarz, y Borchers, 2017). A su vez, es capaz de unirse a las proteínas β -catenina y Dishevelled (Dsh), formando un complejo Dsh-Rack 1-Fz7 (el receptor para la quinasa C activada y el receptor frizzled 7, respectivamente) implicado en la vía no canónica (Shnitsar y Borchers, 2008; Wehner, 2011). La interacción con β -catenina sugiere que PTK7 también participa en la vía Wnt canónica. Sin embargo, el papel de PTK7 como activador o inhibidor de la señalización canónica de Wnt sigue siendo controvertido (Puppo, 2011; Peradziryi, 2012).

Asimismo, PTK7 interactúa con VEGFR1 teniendo un rol fundamental en la angiogénesis, en la reparación epidérmica y en la tumorigénesis (Shin, 2008; Lee, 2011). La sobreexpresión de PTK7, ha sido reportada en cáncer de colon (Mossie, 1995), cáncer de mama (Speers, 2009), cáncer de pulmón, (Tian, 2016), leucemia mieloide aguda, leucemia linfoide aguda (Müller-Tidow, 2004), melanoma (Easty, 1997; Calzada, 2017), carcinoma de ovario, cáncer de próstata, linfoma (Calzada, 2017), glioma, liposarcoma (Zhang, 2014; Liu, 2015), entre otros.

2.2 IMAGENOLOGÍA MOLECULAR

La imagenología molecular es la visualización, caracterización y medición de procesos biológicos a nivel celular y molecular en los seres humanos y en otros seres vivos. Incluye normalmente imágenes en 2D o 3D, teniendo la posibilidad de cuantificar las variaciones que

ocurren en el tiempo (Weissleder y Mahmood, 2001). Por otro lado, las imágenes convencionales, proveen información anatómica y fisiológica del paciente, a través de fuentes de radiación externa (Calzada, 2019). Las modalidades usadas en imagenología molecular, incluyen: Tomografía computada de emisión de fotón único (SPECT), Tomografía de emisión de positrones (PET) e Imagenología óptica (OI). Aunque también pueden ser usadas las siguientes técnicas: Ultrasonido (US), Tomografía Computarizada (CT), Imagenología de Resonancia Magnética (MRI) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Cada técnica tiene sus ventajas y desventajas en el marco de la imagenología molecular, por lo que es importante conocerlas para poder aplicarlas (**Tabla 2**). Las herramientas imagenológicas, han hecho posible que el diagnóstico temprano sea una realidad cada vez más alcanzable (Calzada, 2020). Se suelen utilizar sondas de imagenología molecular, que constan de dos componentes: un componente de reconocimiento molecular y un componente generador de imagen.

El procedimiento general para un estudio de imagenología molecular, consiste en administrar al paciente la sonda imagenológica. Posteriormente, se espera un tiempo a que dicha sonda sea captada diferencialmente en la zona de la patología y finalmente se realiza la adquisición de la imagen externamente a través de un equipo de imagenología.

De esta forma, se puede tener una mejor comprensión sobre lo que sucede en el organismo desde el punto de vista celular y molecular en su contexto y, por ende, una caracterización de la enfermedad y un diagnóstico certero de forma no invasiva. Esto incide directamente sobre el tratamiento a ser aplicado al paciente y también en el seguimiento del mismo. La gran ventaja de las técnicas de imagenología molecular, *versus* las convencionales, es que se puede caracterizar y cuantificar los procesos biológicos a nivel molecular. A su vez, la adquisición de imágenes es uniforme, con buena resolución espacial y temporal, contando con procedimientos automatizados en la clínica (dependiendo de los ajustes que se necesiten realizar a nivel técnico) (Gibson, Hebden, y Arridge, 2005). A nivel experimental, se suelen realizar

modificaciones de los parámetros, buscando los mejores resultados, para poder optimizar los protocolos, logrando un método robusto (Willmann, 2008).

Técnica imagenológica	Detección	Ventajas	Desventajas		
		Alta sensibilidad	Riesgo de radiación		
PET	Rayos γ	Sin límite de penetración en los tejidos	Alto costo		
		Cuantitativa	-		
		Alta sensibilidad	Riesgo de radiación		
SPECT	Rayos γ	Sin límite de penetración en los tejidos	Baja resolución espacial		
		Alta resolución espacial	Riesgo de radiación		
CT convencional	Rayos X	Sin límite de penetración en los tejidos	No cuantitativa		
		Imagen en tiempo real	Baja resolución espacial		
US convencional	Ondas ultrasónicas	Bajo costo	Análisis técnico- dependiente		
		Alta resolución espacial	Baja sensibilidad		
MRI convencional	Campo magnético	Sin límite de penetración en los tejidos	Costo elevado		
		-	Largo tiempo de adquisición		
		Alta sensibilidad	Baja profundidad de penetración		
OI	Ultravioleta (UV) – Infrarrojo (IR)	Bajo costo	Autofluorescencia		
		Imagen en tiempo real	-		

Tabla 2. Técnicas imagenológicas, ventajas y desventajas. Adaptado de Lee, 2012.

2.2.1 Imagenología óptica

La imagenología óptica, es una de las técnicas de la imagenología molecular más estudiada y utilizada, in vitro e in vivo. Se basa en la detección de la transmisión de luz (fotones) a través del tejido biológico (Cassidy, 2005), en un rango de longitudes de onda desde el UV hasta el IR. El pasaje de fotones a través de los tejidos biológicos está afectado por los procesos de absorción y dispersión. En la absorción, la energía asociada a la frecuencia del fotón coincide con la energía de transición dentro del tejido, resultando en la disminución de energía del fotón. En la difracción, la luz incide sobre los átomos del tejido, generando aceleración e irradiación sobre los electrones de los átomos, por lo que la luz se desvía de su camino inicial (Cassidy, 2005; Dang, 2019).

Las estrategias de imagenología óptica se basan en el uso de luminiscencia o fluorescencia, siendo la fluorescencia la más aplicada (Martelli, 2016). Para la adquisición de la imagenología por fluorescencia, un fluoróforo es excitado con un láser y la luz es detectada mediante una cámara apropiada (Calzada, 2019).

En el rango de longitudes de onda del infrarrojo cercano (650 – 1000 nm), la interferencia de fondo es mínima debido a la baja absorción en los tejidos en dicha región (Alberti, 2012). Por ello, la imagenología óptica utiliza longitudes de onda del NIR para aplicaciones in vivo (Condeelis y Weissleder, 2010), utilizando los fluoróforos adecuados (Haque, 2017), que otorguen alto contraste de imagen, y una penetración más profunda y uniforme en el tejido (Zhao, 2018).

Esta modalidad de imágenes es utilizada principalmente en patologías a nivel superficial (Boschi y De Sanctis, 2017) y en órganos expuestos quirúrgicamente, ya que el nivel de penetración de los fotones en el tejido es limitado (Müller, 2012). Han surgido prometedoras modalidades de imágenes ópticas, que incluyen la tomografía de coherencia óptica, la

endoscopía de fluorescencia y la microendoscopía confocal (Dhawan, 2010). Las mismas tienen un significativo potencial, debido a su característica no invasiva, siendo además portátiles y rentables, para aplicaciones biomédicas que abarcan niveles tisulares, celulares y moleculares (Ntziachristos, 2006).

2.2.2 Imagenología de fluorescencia

La imagenología de fluorescencia, se basa en la emisión de luz de una sustancia, a partir de los estados electrónicos excitados. Dependiendo de la naturaleza del fenómeno, la luminiscencia se divide en fluorescencia y fosforescencia (Lakowicz, 2006).

La fluorescencia es un proceso en el cual la absorción y emisión suceden a través de estados electrónicos singuletes, permitidos. En los estados excitados singuletes, hay un electrón en estado excitado apareado con otro electrón de spin opuesto en estado basal. Cuando el electrón en estado excitado retorna al estado basal, lo realiza mediante una transición permitida y emitiendo un fotón. Todo el proceso de fluorescencia, sucede en un tiempo entre 10⁻¹⁰ y 10⁻⁷ segundos.

En cambio, el proceso de fosforescencia, ocurre a partir de estados electrónicos tripletes. El electrón en estado excitado, tiene el mismo spin que el electrón en estado basal, por lo tanto, es una transición no permitida y los rangos de tiempo de emisión son más lentos de 10⁻³ y 1 segundo. La transición entre multiplicidad de spin se denomina cruce intersistema (Lakowicz, 2006). El diagrama de Jablonski (**Figura 2**), representa lo que sucede en los procesos de fluorescencia y fosforescencia (Lakowicz, 1994).



Figura 2. Diagrama de Jablonski, esquema de los procesos de fluorescencia y fosforescencia. Aadaptado de Lakowicz, 1994.

En el esquema se encuentran representados los niveles energéticos, basal (S_0) y excitados (S_1 , S_2) y los estados vibracionales por cada nivel (líneas en color gris) (**Figura 2**). Cuando a una sustancia se le aplica energía, ésta podria ser excitada absorbiendo un fotón, en donde un electrón pasa de un nivel basal (S_0) a un nivel excitado (S_1).

Los electrones, luego de ser excitados pueden relajarse y volver al estado basal de forma radiativa o no radiativa, dependiendo del ambiente en el que se encuentren. La transición no radiativa sucede mediante radiación de calor por conversión interna. La transición radiativa se da por la fluorescencia a una determinada longitud de onda (Lakowicz, 2006).

En la fluorescencia, el electrón que se encuentra en un nivel excitado y nivel vibracional alto, cede parte de su energía a otros orbitales de la molécula en forma de vibración, pasando a un nivel excitado de menor vibración, proceso no radiativo. En el proceso de conversión interna, esta energía es disipada rápidamente debido a colisiones inelásticas. Posteriormente, el electrón

pasa a un estado basal, emitiendo un fotón, proceso radiativo. Finalmente, el electrón realiza otro decaimiento no radiativo hacia el nivel basal de menor vibración (Vishwanath y Ramanujam, 2011).

El corrimiento de Stokes, surge a partir de la diferencia de energía entre el proceso de excitación (absorción) y emisión, debido a los procesos no radiativos. La energía del fotón que fue absorbido requiere mayor energía que la emitida, por ende, la longitud máxima de excitación será menor que la de emisión (Lakowicz, 2006).

Las moléculas fluorescentes se denominan fluoróforos. Estos se encuentran de forma natural y de forma sintética. Cada fluoróforo, tiene una longitud de onda de absorción y emisión característica. Según la aplicación, se utilizará un determinado fluoróforo. Una de las aplicaciones, es en el campo de la imagenología óptica de fluorescencia (Moreno, 2020).

La imagenología de fluorescencia es una poderosa herramienta, de bajo costo, versátil, y con una penetración en el tejido del rango de mm-cm. Una de las aplicaciones más recientes, es la cirugía guiada por imagen de infrarrojo cercano (NIR) en donde a tiempo real, el médico visualiza específicamente las zonas afectadas tras exponer dicho tejido a una fuente de excitación adecuada (Taruttis y Ntziachristos, 2012). Esto depende de la existencia de fluoróforos NIR aprobados por la FDA (Administración de Medicamentos y Alimentos) y la EMEA (Agencia Europea de Medicamentos). Actualmente se encuentran aprobados la indocianina verde (ICG) y el azul de metileno (MB) (**Figura 3**), y están siendo utilizados satisfactoriamente en la clínica (Desmettre, Devoisselle, y Mordon, 2000; Boni, 2014).


Figura 3. Estructura de la indocianina verde (A) y del azul de metileno (B).

La imagenología de fluorescencia puede clasificarse en directa e indirecta: (a) Imagenología de fluorescencia directa, implica el uso de una sonda fluorescente que se dirige a un sitio específico, como ser un receptor o una enzima. Dentro de la imagenología fluorescente directa, las sondas pueden clasificarse como activas o activables. Las sondas activas, son fluoróforos que se adhieren a un ligando específico con alta afinidad para un objetivo puntual (Ramjiawan,2000). Las sondas activables, son moléculas con un fluorocromo cuencheado, el cual es activado mediante una modificación química para la emisión de luz (Funovics, Weissleder, y Tung, 2003). Por otro lado, (b) Imagenología de fluorescencia indirecta, surge de la evolución de técnicas utilizadas de genes reporteros. Implica la introducción de un transgen (gen reportero) en la célula y que este codifique para una proteína fluorescente que produce la proteína reportera. Se coloca entonces, dicha secuencia cerca del promotor que se quiere expresar, de forma que cuando este se active, la proteína fluorescente se transcriba. La cual, puede ser detectada mediante imagenología óptica. Esta técnica es utilizada para el estudio de la expresión y regulación génica (Tsien, 1998).

36

A nivel de investigación, hoy en día, es posible tener conocimiento de la biodistribución de fluorescencia en los órganos y tejidos, de pequeños animales ya sea a nivel ex vivo como invivo.

2.2.3 Agentes de imagenología molecular

La generación de imágenes moleculares depende en gran medida del desarrollo de agentes de imagenología que sean específicos, características fundamentales en el desarrollo de imágenes moleculares (Weissleder y Mahmood, 2001). Cabe destacar, que la administración de dichos agentes, se realiza a bajas concentraciones, por lo cual no tiene acción farmacológica. En general, los agentes de imagenología molecular constan de dos partes: la molécula biológicamente activa que establece el reconocimiento por su blanco y el generador de la imagen el cual permite la detección externa, para la evaluación del proceso en forma cuali- o cuantitativa (**Figura 4, A**). A veces, se realiza una modificación química sobre la molécula de reconocimiento o se agrega un espaciador o linker, para conectar la biomolécula con el agente generador de imagen (**Figura 4, B**) (Chen, 2014; Lv, 2018).



Figura 4. Esquema de agente imagenológico sencillo (A) y con linker (B), junto a su blanco molecular.

En los últimos años, se ha logrado un gran avance en el desarrollo de agentes imagenológicos. Ya sea por la versatilidad de biomoléculas, como por el componente generador de imágenes (Weissleder y Mahmood, 2001; Ntziachristos, 2006; Willmann, 2008). Dentro de las moléculas de reconocimiento, se encuentran: moléculas pequeñas, péptidos, anticuerpos, aptámeros, proteínas, ADN o nanopartículas. Las mismas deben presentar: alta afinidad, especificidad, rápida eliminación, estabilidad, no ser tóxicas y no ser inmunogénicas. Por otra parte, el componente generador de imágen, abarca radionucleidos, agentes de contraste y fluoróforos. Los mismos deben generar imágenes con bajo ruido (no generar señales inespecíficas) y amplificar la señal de reconocimiento molécula-blanco molecular. En cuanto a dicho blanco molecular, en cáncer, se busca que el mismo esté involucrado en la vía de señalización, encontrarse en el microambiente tumoral, básicamente que dicho blanco esté representado en mayor medida en la patología que en tejido sano. Los blancos moleculares pueden ser: péptidos, proteínas, hormonas, toxinas, carbohidratos o ADN (Willmann, 2008; Luo, 2011).

2.2.3.1 Sondas fluorescentes: generadores de imagen

Las sondas fluorescentes pueden dividirse en intrínsecas o extrínsecas. Las intrínsecas, poseen fragmentos estructurales que fluorescen naturalmente, como ser NADH, flavina, aminoácidos aromáticos, clorofila, entre otros. A las extrínsecas, se le agrega un fragmento que le proporciona la fluorescencia, cuando carece de esta o para cambiar sus propiedades espectrales. Ejemplos de los fragmentos incorporados son: la rodamina, la fluoresceína, cloruro de dansilo, entre otros (Lakowicz, 2006).

Los primeros fluoróforos en ser sintetizados fueron la fluoresceína (von Baeyer, 1871) y la tetrametilrodamina (TMR) (Industria Ceresole, 1887), **Figura 5** (Lavis, 2017).



Figura 5. Estructura de fluoresceína (A) y tetrametilrodamina (B).

Se han realizado modificaciones químicas sobre ambas estructuras, para modificar las propiedades y obtener diversas sondas fluorescentes, con diferentes longitudes de onda.

Las sondas fluorescentes son conocidas principalmente como marcadores de biomoléculas. Los bioconjugados con fluorescencia pueden ser, anticuerpos, oligonucleótidos y moléculas pequeñas, entre otros. Existen diversas aplicaciones para dichas sondas fluorescentes, como ser inmunofluorescencia, seguimiento de fármacos, diagnóstico de patologías, entre otras. La unión de la molécula fluorescente a la molécula de elección debe ser estable. Por ello, se ha funcionalizado la fluoresceína con un grupo isotiocianato en la posición 5, generando el isotiocianato de fluoresceína (FITC), **Figura 6**, permitiendo la unión covalente con los aminos libres de la molécula de interés (Lavis, 2017).



Figura 6. Estructura de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Lavis 2017).

2.2.3.1.1 Alexa Fluor 647

A su vez, se ha desarrollado una amplia variedad de moléculas fluorescentes, derivadas inicialmente de la rodamina, como lo es la familia de la Alexa Fluor, otorgando un gran rango de longitudes de onda de emisión y excitación (**Figura 7**) (Panchuk-Voloshina, 1999; Berlier, 2003).



Figura 7. Espectro de emisión de la serie Alexa Fluor (Thermofisher).

Alexa Fluor 647 (**Figura 8**), presenta un espectro de excitación/emisión de 650/668 (**Figura 7, ítem 15 y Figura 9**). Fluoróforos con alta longitud de onda, tienen mayor capacidad de penetración óptica en los tejidos y menor autofluorescencia en los tejidos generando menor interferencia de fondo (background). Ambos requisitos son claves para su uso como agentes de imagen in vivo (Berlier, 2003; Luo, 2011). Alexa Fluor 647, ha sido reportado en el desarrollo de agentes imagenológicos en cáncer a nivel pre-clínico y como potencial uso en cirugías guiadas (Saccomano, 2016; Calzada, 2017; Comeo, 2020; Kantamneni, 2020).



Figura 8. Estructura de un derivado de Alexa Fluor 647 utilizado para derivatizar nucleófilos.



Figura 9. Espectro de emisión/excitación de Alexa Fluor 647 (Thermofisher).

2.2.3.2 Aptámeros: moléculas de reconocimiento

Los aptámeros, son oligonucleótidos simple hebra (ADNs o ARN) con una estructura tridimensional caracterizada por bucles, tallos u horquillas. Tienen la capacidad de unirse a un blanco definido a través de enlaces no-covalentes (van der Waals, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas) con alta afinidad y especificidad. Estos blancos abarcan:

proteínas virales, bacterias, toxinas, proteínas de membrana expresadas en células tumorales, moléculas pequeñas, iones, entre otros (Mayer, 2009; Musumeci, 2017; Calzada, 2020).

Se mencionaron por primera vez en 1990 por Ellington y colaboradores, al examinar la interacción del ARN con sus ligandos. Denominaron aptámeros, del latín "*aptus*", encastrar, a secuencias individuales de ARN (Ellington y Szostak, 1990). Gold y Turek en 1990, describieron en forma paralela la metodología que utiliza librerías de oligonucleótidos, para seleccionar aptámeros (Tuerk y Gold 1990; Gold, 1995).

Los aptámeros, son seleccionados a partir de bibliotecas masivas mediante la metodología llamada Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX) (Tuerk y Gold 1990). Es importante que previo a la realización de dicha técnica, se decida si se utilizará ARN o ADN. Esto se debe, a diferencias en la estabilidad y composición química (Calzada, 2020).

El SELEX, consiste en varias rondas de selección y amplificación a partir de una biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos. Un pool de oligonucleótidos simple hebra (cantidad de secuencias mayor a 1 x 10^{14}) son incubados con el blanco molecular y posteriormente se realiza la remoción de las secuencias no unidas. Las secuencias que poseen reconocimiento con el blanco, son aisladas y amplificadas, y el pool enriquecido es expuesto nuevamente a una nueva ronda de selección. Finalmente se realiza la secuenciación y caracterización individual de las variantes que presentan mayor afinidad. Por lo tanto, SELEX, por sus características técnicas, permite obtener aptámeros con alta especificidad y afinidad por su blanco, con una constante de disociación (K_d) del orden pM y nM (Kinghorn, 2017). (Calzada, 2020; Odeh, 2020).

Hoy en día, los aptámeros son utilizados en varias aplicaciones biomédicas como ser: terapia, biosensores, diagnóstico e imagenología molecular (Famulok y Mayer, 2011). Dado que los aptámeros son oligonucleótidos estructurados, presentan enlaces intramoleculares y estructuras

complejas de tipo g-cuádruplex en algunos casos (Hasegawa, 2016). Esto otorga una estabilidad intrínseca a la molécula en comparación a oligonucleótidos convencionales. Además de ser muy estables en un gran rango de pH y temperatura, pueden ser modificados químicamente para generar diversas funcionalidades, así como para prolongar su estabilidad biológica (Adachi y Nakamura, 2019), lo cual los hace muy versátiles. Es posible realizar modificaciones químicas sobre la estructura de los aptámeros y la forma en que son transportados, para mejorar la farmacocinética (Kovacevic, Gilbert, y Jilma, 2018), sin afectar la unión con su blanco. Estas modificaciones se pueden generar a nivel de los fosfatos, en los extremos 3' y 5' terminal, en la conformación de la estructura tridimensional, diferentes tipos de soporte para su transporte en nanopartículas, entre otros cambios ampliamente reportados (Famulok y Mayer, 1999; Remaut, 2005; Radom, 2013; Eilers, Witt, y Walter, 2020; Odeh, 2020).

Los aptámeros son sintetizados químicamente, lo cual es una ventaja desde el punto de vista del costo en su producción y de la reproducibilidad técnica, así como en la calidad de los mismos.

Desde el punto de vista de aplicaciones in vivo, son no inmunogénicos y no tóxicos (Sicco, 2020). A su vez, tienen pesos moleculares bajos (menores a 15000 Da), lo que permite una rápida penetración en los tejidos (Borbas, 2007).

Por todo lo anterior, los aptámeros se sitúan como interesantes componentes para sondas moleculares al compartir características deseables de los péptidos y anticuerpos, como sondas de imagenología molecular. Los anticuerpos monoclonales se han utilizado ampliamente como ligandos para el direccionamiento molecular debido a su alta afinidad, especificidad y variada disponibilidad de direccionamiento (Hwang, 2010). Sin embargo, debido a la larga residencia de los anticuerpos en la sangre, la obtención de imágenes in vivo se da con bajos valores

blanco/no blanco, lo cual repercute en la calidad de la misma. Por otra parte, los péptidos, presentan rápida depuración sanguínea, alta penetración en tejido y son no inmunogénicos (Zhao, 2018). Sin embargo, existe una disminución en la afinidad por el blanco y el escalado de producción de péptidos, requiere tiempo e infraestructura adecuada (Erak, 2018).

Los aptámeros tienen una afinidad similar a la de los anticuerpos, no son inmunogénicos y no son tóxicos. A nivel de penetración en los tejidos, depuración sanguínea y tamaño, se encuentran entre medio de los anticuerpos y los péptidos. Se pueden obtener rápidamente, a costo moderado y alta estabilidad a diferentes pH y temperaturas, lo cual les otorga versatilidad (Liu, 2017). Todas estas características recientemente mencionadas, posicionan a los aptámeros en el campo de la biotecnología e imagenología molecular, como biomoléculas atractivas para el desarrollo de nuevos agentes imagenológicos.

2.2.3.2.1 Sgc8c

Sgc8 es un aptámero de ADN simple hebra de 88 bases (**Figura 10, A**). Fue seleccionado mediante la variable cell-SELEX, cuyo blanco fueron células T de leucemia linfoblástica aguda (T-ALL) (Shangguan, 2006). El Sgc8 presentó una K_d de 0.80 ± 0.09 nM, mostrando alta afinidad y especificidad por un blanco en la superficie celular presente en las células de T-ALL (en las líneas celulares estudiadas: CCRF-CEM, Molt-4, Sup-T1 y Jurkat), menor afinidad en células B (SUP-B15) y sin afinidad por células B de linfoma (Ramos y Toledo) y mieloma (U266) (Shangguan, 2006).



Figura 10. Estructura de los aptámeros Sgc8 (A) y Sgc8c (B). Adaptado de Shangguan, 2007.

Finalmente se dilucidó que Sgc8 se une específicamente al receptor PTK7, sobreexpresado en la línea celular utilizada, CCRF-CEM. Existe una fuerte interacción del Sgc8 con el receptor PTK7 (Shangguan, 2008; Leitner, 2017) y a su vez, se ha comprobado su internalización mediante endocitosis. La internalización ocurre luego de la unión a la proteína, siendo una interacción receptor-dependiente (Xiao, 2008).

Con el objetivo de conocer las estructuras de reconocimiento del aptámero Sgc8 por su blanco, se realizaron una serie de modificaciones. Obteniéndose, que una de las secuencias truncadas del Sgc8, el Sgc8c (**Figura 10, B**), presenta una K_d igual a 0,78 nM, siendo muy similar a la del Sgc8. Por lo tanto, la secuencia Sgc8c, de 41 bases, es la mínima secuencia de aptámero requerida para una unión con alta afinidad y especificidad por su blanco (Shangguan, 2007).

Debido a la especificidad de unión del sgc8c por el PTK7 y que el Sgc8c no se une a células que no sobreexpresan dicho receptor (como el caso de las células B de linfoma: Ramos y

Toledo), el Sgc8c, es una biomolécula de reconocimiento de gran interés en el campo de la imagenología molecular, en el desarrollo de nuevos agentes imagenológicos.

A su vez, se han realizado estudios en donde fármacos convencionales para el tratamiento del cáncer como la Doxorrubicina y la Cytarabina son vehiculizados en Sgc8c. El Sgc8c, permite dirigir los fármacos convencionales específicamente hacia células tumorales otorgando un mayor efecto en la célula blanco y la disminución de la toxicidad al evitar la célula no blanco (Huang, 2009; Fang, 2019; Le, 2020). Por otro lado, Sgc8c puede modificarse con un componente imagenológico, como ser un fluoróforo, para visualizar la unión de la biomolécula por su blanco. Por lo que, al presentar una unión específica por su blanco, las imágenes presentan bajas señales inespecíficas (Huang, 2009; Calzada, 2017; Duan, 2018; Wan, 2019; Eilers, Witt, y Walter, 2020).

2.3 NANOMEDICINA

En diciembre del 2002, el NIH anuncia un programa de 4 años para nanociencia y nanotecnología en medicina. Identificando tres áreas claves para la nanomedicina: estructuras y dispositivos cuyo tamaño se encuentre entre 1 y 100 nm, que confieran aportes novedosos en el diagnóstico, tratamiento o prevención. En segundo lugar, la identificación de estructuras nanométricas con significancia médica. Y finalmente, nanosistemas biológicos con aplicación clínica (The Lancet, 2003).

Debido al creciente interés por las nanotecnologías aplicadas en la medicina, surgió un nuevo campo, denominado nanomedicina. La nanomedicina, se considera como una disciplina interfacial entre la nanotecnología y la medicina, y no como una subespecialidad de ellas (Freitas, 2002).

2.3.1 Aplicaciones

La nanomedicina se basa en investigar los mecanismos patológicos, en mejorar estudios diagnósticos y tratamientos moleculares, en desarrollar y entregar drogas, con el fin de aliviar el dolor, preservar y mejorar la salud animal, utilizando herramientas moleculares y nanotecnológicas. En la **Tabla 3**, se describen algunas de las áreas de estudio de la nanomedicina (Freitas, 2005).

Los nanomateriales, según la Comisión Europea, son objetos de 1 a 100 nm aproximadamente (máximo 200 nm), al menos en una de sus dimensiones (European Commission. Directorate General for Research and Innovation, 2012). Este concepto es controversial en el área de la nanomedicina y aún no hay un único criterio establecido. Ya que, en contraposición de la dimensión acotada de 1 a 100 nm, en la nanomedicina el límite superior es de 1000 nm. Esto se debe a que la nanomedicina, tiene como objetivo mejorar y optimizar las propiedades de los materiales para su interacción con las células y los tejidos, para permitir por ejemplo la difusión pasiva de cierta entidad hacia un tumor en la barrera hemato-encefálica o su biodisponibilidad (Wagner, Hüsing, y Gaisser, 2008).

Las aplicaciones más frecuentes en la nanomedicina son el tratamiento de patologías y la imagenología molecular. Abarcando principalmente el cáncer y las enfermedades infecciosas (Etheridge, 2013). Uno de los beneficios que ofrecen las estructuras a escala nano en la medicina es la capacidad para lograr mejores perfiles de biodistribución, siendo posible gracias a un buen diseño de los nanosistemas.

Un aspecto muy importante al trabajar con nanosistemas en seres vivos, es tener en cuenta el objetivo, para utilizar la vía de administración más adecuada. Las vías de administración de productos reportados, es del 73% de administración intravenosa (iv), el 15% a la aplicación

47

tópica y el 12 % repartido entre la inyección muscular e intersticial, administración oral, oftálmica, nasal y en aerosol (Etheridge, 2013).

Tabla 3. Imagenología oncológica y nanomedicina. Adaptado de Freitas, 2005.

Materiales nan	oestructurados	Sitios de unión artificiales	Control de la superficie				
Péptidos cíclicos	Nanofibras	Anticuerpos artificiales	Superficies artificiales: adhesivas, no-adhesivas				
Dendrímeros	Nanoshells	Enzimas artificiales	Superficies biocompatibles				
Fullerenos	Nanotubos de carbono	Receptores artificiales	Biofilms				
Portadores funcionales de drogas	Quantum dots		Patrones de superficie (contacto guiado)				
Escaneo por MRI	Nanoemulsiones		Revestimientos				
Herramientas	y diagnóstico	Nanoterapéuticos	Transporte de drogas				
Imagenología molecular	Monitoreo	Nanopartículas antibacteriales y antivirales	Encapsulación de drogas				
Aplicaciones diagnósticas	Nanosensores - Biochips	Terapia fotodinámica	Biofármacos				
Biosensores y biodetectores	Imagenología	Productos farmacéuticos a base de fullerenos	Descubrimiento de medicamentos				
Microscopía y sistemas endoscópicos	Microarrays de proteínas	Radiofármacos	Drogas inteligentes				
Biotecnología	y biorobótica	Medicina molecular	Investigación biológica				
Terapia viral	Nanobiotecnología	Terapia génica	Nanobiología				
Clonado y células madre	Ingeniería de tejidos	Farmacogenómica	Nanociencia en ciencias de la vida				
Órganos artificiales	Híbridos basados en virus						

2.3.2 Entrega pasiva y entrega activa

A lo largo de los años se han desarrollado nanomateriales, para su aplicación en el diagnóstico y tratamiento de cáncer, basándose en la entrega activa y pasiva. Los materiales biocompatibles

utilizados principalmente son micelas poliméricas, liposomas, dendrímeros y nanoemulsiones (**Figura 11**) (Danhier, Feron, y Préat, 2010).

Una forma de entrega pasiva, se basa en el efecto de permeabilidad y retención mejorada (EPR). El efecto EPR, fue descrito por Maeda en 1986. Consiste en la permeabilidad aumentada de los vasos sanguíneos tumorales y una retención aumentada de las nanomedicinas en los tumores (Matsumura y Maeda, 1986), principalmente en tumores sólidos. Siendo una de las causas de la retención, el drenaje linfático pobre. Se ha observado de forma experimental que el material particulado de entre 20 y 200 nm de diámetro, puede extravasar los tejidos, acumulándose en el espacio intersticial de los tumores atravesando los poros endoteliales (10 a 1000 nm) y permanecer allí durante un tiempo prolongado, ya que no hay drenaje linfático.



Figura 11. Nanomedicinas. Tipos de nanopartículas utilizadas en investigación y clínica (A). Esquema de nanopartículas PEGiladas con y sin ligando (B). Adaptado de Danhier, Feron, y Préat, 2010.

Al contrario de lo sucede en la entrega pasiva de fármacos (**Figura 12, A**), la entrega activa (**Figura 12, B**) se basa en el uso de ligandos específicos (anticuerpos, péptidos o aptámeros)

que puedan interactuar con la superficie de la nanopartícula y unirse específicamente a los receptores sobreexpresados en el blanco molecular (Danhier, 2016; Monterrubio, 2017; Blachman, 2020; Mattera, 2020). En el esquema de la Figura 12 A-2, se observa la influencia del tamaño que poseen las nanoestructuras en comparación a los fármacos "libres", en la retención en el tejido tumoral. En la entrega pasiva de nanosistemas, estos, alcanzan los tumores a través de la vasculatura permeable circundante al tumor. Sin embargo, los fármacos se difunden libremente tanto dentro y fuera de los vasos sanguíneos, llegando al tumor bajas concentraciones. Por lo tanto, si se cargan las nanoestructuras con el fármaco, estos no tienden a volver al torrente sanguíneo debido a su gran tamaño, generándose una acumulación progresiva en el tumor. En la entrega activa (Figura 12, B), hay un direccionamiento al tumor o microambiente tumoral, ya que los ligandos situados en la superficie de las nanoestructuras se unen a receptores sobreexpresados en las células tumoral (Figura 12 B-1) o células endoteliales angiogénicas (Figura 12 B-2) (Danhier, Feron, y Préat, 2010; Danhier, 2016). Las nanopartículas dirigidas activamente al receptor, se internalizan en las células a través de la endocitosis (Figura 13). La eficacia de este tipo de entrega, se debe al reconocimiento e internalización celular (Davis, Chen, y Shin, 2008; Lammers, 2012; Danhier, 2016).



Figura 12. Entrega pasiva (A). Entrega pasiva de nanoestructuras (A-1). Esquema de la influencia del tamaño, en la retención en el tejido tumoral (A-2). Entrega activa (B). Nanoestructuras cargadas con ligandos situados en su superficie, se unen a receptores sobreexpresados en las células tumoral (B-1) o células endoteliales angiogénicas (B-2). Adaptado de Danhier, Feron, y Préat, 2010.



Figura 13. Esquema de captación e internalización de nanosistemas. Adaptado de Davis, 2008.

Uno de los principales objetivos en el diseño de nanosistemas que sean adecuados, seguros y eficaces, es conocer el tamaño, la carga del ligando y la morfología. Las técnicas para conocer

dichas propiedades son: dispersión de luz dinámica (DLS), microscopía de fuerza atómica (AFM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), *cryo*-TEM, potencial zeta, *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA), resonancia magnética nuclear (RMN), espectrofotometría visible y de fluorescencia.

2.3.3 Liposomas

Una de las nanoestructuras de mayor empleo en nanomedicina, son los liposomas (LPS). Estos sistemas de entrega de fármacos, se desarrollaron hace más de 50 años (Kingsley et al. 2006). Los LPS son estructuras esféricas (40 - 400 nm), formadas por una bicapa lipídica, constituidos por una o varias capas concéntricas, que rodean el espacio acuoso (Figura 14). Compuestos fosfolípidos, fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina como por У fosfatidiletanolamina, presentan características ventajosas frente a otros sistemas de administración de fármacos (Davis, 2008; Allen, 2013). Son biocompatibles, carecen de inmunogenicidad, se autoensamblan, sirven como sistemas de carga de agentes hidrofílicos e hidrofóbicos, mejorando la solubilidad, aumentando la cantidad de carga y protegiendo la droga del medio externo. Por otra parte, los LPS reducen la toxicidad de la droga y mejora la penetración en los tejidos (Immordino, Dosio, y Cattel, 2006). Como desventaja, presentan baja eficiencia de encapsulación, liberación rápida de drogas solubles en medio acuoso cuando se encuentran en la sangre y baja estabilidad de almacenamiento. Sin embargo, mediante modificaciones estructurales, la estabilidad de los LPS puede mejorarse considerablemente (Van Tran, Moon, y Lee, 2019).

Los LPS son nanosistemas muy versátiles y se encuentran aceptados por la FDA. Actualmente existen productos insertados en el mercado para su uso clínico como el Doxil®, Ambisome®, Marqibo®, Onivyde™, Epaxal®, entre otros (Bulbake, 2017). Tienen la capacidad de actuar como vehículo de diversas moléculas, cargadas en el espacio intravesicular (moléculas

hidrofílicas), como en su bicapa lipídica (moléculas hidrofóbicas) (Vahed, 2017). Las características de los LPS, están determinadas por los lípidos que los componen, tamaño, tipo de preparación y carga superficial. Para otorgar mayor estabilidad y aumentar el tiempo de circulación en sangre, se fijan en la superficie, polímeros como el polietilenglicol (PEG). Además, para su direccionamiento específico, se conjugan a ligandos activos como anticuerpos u otras entidades como los aptámeros (Duan, 2018; Barba, 2019). La clasificación de los LPS según su estructura lamelar se divide en: (a) Vesículas unilamelares. Vesículas unilamelares pequeñas (SUV), poseen el mínimo tamaño vesicular posible, tamaños comprendidos preferentemente entre 20 y 40 nm. Tienen una sola bicapa lipídica, con un único compartimiento acuoso encerrado por dicha bicapa. Vesículas unilamelares de tamaño intermedio (IUV), con diámetros del orden de los 100 nm y, Vesículas unilamelares grandes (LUV), con diámetros entre 100 y 400 nm. (b) Vesículas multilamelares (MLV). Están constituidas por varias lamelas internas, presentan un diámetro de 500 nm a varios micrones y (c) Vesículas multivesiculares. Son liposomas, rodeados por una vesícula liposomal (Immordino, Dosio, y Cattel, 2006; Khan, 2013; Akbarzadeh, 2013).



Figura 14. Clasificación de LPS según su estructura lamelar. Adaptado de Jesorka y Orwar, 2008.

A su vez, los liposomas pueden clasificarse según el método de preparación (**Figura 15**). La preparación puede realizarse mediante métodos como fase reversa, extrusión, ciclos de deshidratación/rehidratación, ciclos de congelación/descongelación, sonicado y diálisis. Obteniéndose, diferentes tipos de liposomas, de estructuras unilamelares o multilamelares de diversos tamaños (Immordino, Dosio, y Cattel, 2006; Jesorka y Orwar, 2008; Khan, 2013).



Figura 15. Esquema de preparación de LPS según lamelaridad. Adaptado de Jesorka y Orwar, 2008.

2.3.4 Micelas poliméricas

En los últimos tiempos, las micelas poliméricas (MPs), han tomado gran protagonismo en el campo de la nanomedicina como potenciales sistemas para la administración y liberación controlada de fármacos, proteínas y distintas biomoléculas, dirigidas hacia un blanco específico, agentes imagenológicos, terapia génica y otras aplicaciones, otorgando versatilidad en la forma de liberación de la entidad de interés (Cuestas, 2013; Glisoni 2014a, 2014b, 2015; Lecot 2020a, 2020b; Movassaghian, Merkel, y Torchilin, 2015; Catuogno, Esposito, y De Franciscis, 2016).Estas MPs presentan una serie de ventajas *in vitro* e *in vivo* frente a las micelas convencionales entre ellas, incrementan la estabilidad, la solubilidad de drogas

hidrofóbicas y aumentan el tiempo de éstas en circulación (Cuestras, 2013; Glisoni, 2014a, 2014b, 2015; Lecot 2020a, 2020b; Cagel, 2017). Además, los co-polímeros que las conforman poseen características que las hacen interesantes, a destacar: una adecuada biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja o nula inmunogenicidad y toxicidad (Lee, 2012).

Las MPs están conformadas por copolímeros anfifílicos que se autoensamblan espontáneamente en dispersión acuosa a partir de una Concentración Micelar Crítica (CMC) (Cuestras, 2013; Glisoni, 2014a, 2014b, 2015; Lecot 2020a, 2020b). Los copolímeros anfifílicos, presentan un bloque hidrofóbico y un bloque hidrofílico. Una vez se autoensamblan en medio acuoso, el bloque hidrofóbico forma parte del core o núcleo y el bloque hidrofílico conforma la periferia o shell/corona micelar (**Figura 16**) (van Nostrum, 2004; Torchilin, 2007).



Figura 16. Esquema de formación espontánea de MPs en medio acuoso.

Los bloques hidrofílicos (a base de PEO) son los responsables de la solubilidad en el medio acuoso, la interfaz con la periferia y la interacción con moléculas de superficie para su aplicación en entrega activa. Los bloques hidrofóbicos (que pueden ser de distinta naturaleza: polipropilenglicol (PPO), poliaminoácidos, polióxido de butileno, polifosfolípidos y poliésteres (Mahmud, 2007), en cambio, son los responsables de la interacción con las moléculas hidrofóbicas para mejorar su solubilidad (Nakanishi, 2001).

Según el diseño de las MPs, pueden ser utilizadas para la entrega de moléculas mediante entrega activa o pasiva. Para su aplicación en entrega activa, se adhieren/adsorben o conjugan covalentemente moléculas a la superficie, como ser grupos de distinta naturaleza: ácido fólico, hialurónico, aptámeros, anticuerpos específicos o moléculas químicas de bajo peso molecular, como los azúcares reconocibles por receptores del tipo lectinas o *Lectin Like Receptors* que se encuentran sobre-expresados en diversos tejidos y en ciertos tipos celulares (Cuestras, 2013, Glisoni, 2015; Lecot 2020c), para ser reconocidas por un blanco específico. Se han realizado ensayos clínicos en fase IV, para el tratamiento de cáncer de mama con Paclitaxel cargado en PMs a base de PEO-poli (D, L-ácido láctico) (PEO-PDLLA) (Genexol-PM®) (Shin, Tam, y Kwon, 2016). Se han desarrollado implantes para el tratamiento de sarcoma mediante braquiterapia a partir de la liberación a bajas dosis de ¹⁰⁹Pd recubierto de co-polímero (CivaSheet®) (Seneviratne, 2017).

Actualmente se encuentran disponibles 8 estudios clínicos de Fase III que utilizan MPs para el tratamiento de cáncer de ovario, gastrointestinal y hepatocarcinoma. A su vez, se encuentra en Fase II, el ONM-100, una MP conjugada covalentemente a ICG, para la obtención de imágenes de fluorescencia intraoperatoria, en pacientes con tumores sólidos, estudiados en cáncer de mama, esofágico, colorectal (Mundra, 2015; Voskuil, 2020; OncoNano Medicine, Inc. 2021).

El grupo de investigación del Instituto de Nanobiotecnología y del Depto. De Tecnología Farmacéutica (FFyB-UBA) viene trabajando hace años en la producción de MPs termosensibles o a base de copolímeros tribloque de PEO-PPO-PEO. En función de la cadena principal del bloque, se clasifican en dos familias (Gaucher, 2005; Sosnik, 2009; Glisoni y Sosnik, 2014): *(i)* tribloque lineal de PEO-PPO-PEO o poloxámeros lineales del tipo Pluronic® (**Figura 17**), o *(ii)* tetrabloque de PEO-PPO-PEO unidos por una cadena etilendiamina central o poloxaminas (de 4 brazos) Tetronic® (**Figura 17**). A su vez, se dividen en convencionales presentando bloques PEO hidrofilícos en los extremos y del tipo reversas, cuando las

extremidades de las cadenas terminan en bloques hidrofóbicos del tipo PPO, éstas últimas más utilizadas en la incorporación de moléculas de ARN o ADN a su estructura. A su vez, las poloxaminas son pH dependiente debido a su cadena central etilendiamina.

Poloxámero



 $\begin{array}{c} \mathsf{CH}_3\\ \downarrow\\\mathsf{HOCH}_2\mathsf{-}\mathsf{CH}_2\mathsf{-}\{\mathsf{O}\mathsf{-}\mathsf{CH}_2\mathsf{-}\mathsf{CH}_2\mathsf{-}\mathsf{CH}_2\mathsf{-}\mathsf{C}\mathsf{H}_2\mathsf{C}\mathsf{C}\mathsf{H}_2\mathsf{C}\mathsf{C}\mathsf{H}_2\mathsf{-}\mathsf{C}\mathsf{H}_2\mathsf{C}\mathsf{C}\mathsf{H}_2\mathsf{C}\mathsf{$

Figura 17. Estructura molecular general de poloxámeros y poloxaminas formadoras de MPs. Adaptado de Álvarez-Lorenzo, Sosnik, y Concheiro 2011.

Los copolímeros a base PEO-PPO-PEO, se encuentran aprobados por la FDA para su uso extendido en humanos y se encuentran disponibles comercialmente en un amplio espectro de pesos moleculares (PMs) y relación óxido de etileno/óxido de propileno (**Tabla 4**). La nomenclatura de los poloxámeros abarca las letras F, P o L, en relación a los estados físicos y PMs de los copolímeros, siendo: escamas/sólido (del inglés *flake*) de PM elevado, pasta (del inglés *paste*) de PM intermedio o líquido (del inglés *liquid*) de PM bajo, según corresponda. Estas letras, están seguidas por un código numérico, el cual está relacionado con sus parámetros estructurales y de balance hidrofilia/lipofilia (HLB). El primer número o los dos primeros, se relacionan con el peso molecular y el número de terminación, indica el porcentaje de PEO, en donde a mayor componente de PEO, mayor hidrofilicidad del polímero, por lo que aumenta el

HLB (Alexandridis y Alan Hatton, 1995; Bodratti y Alexandridis, 2018). Estos sistemas coloidales son estables, biocompatibles, bioeliminables y pueden ser congelados/descongelados, liofilizados y posteriormente re-dispersos en medios acuosos, conservando sus propiedades fisicoquímicas y estabilidad, a destacar, su tamaño de partícula en dispersión. Estas características las convierten en nanoestructuras altamente atractivas en la industria biofarmacéutica, a comparación de los LPS, que poseen mayores dificultades en la conservación y procesamiento, como ya hemos mencionado anteriormente.

Por otra parte, según su aplicación, como ser entrega activa, se realizan modificaciones en los polímeros, adhiriendo en la superficie de las micelas, entidades químicas o biológicas dirigidas a un blanco específico (van Nostrum, 2004; Kaygisiz y Synatschke, 2020; Cuestras, 2013; Glisoni, 2015; Lecot, 2020c).

Tabla	4 .	Copolímeros	comerciales	formadores	de	MPs	y s	sus	características	estructurales.
Adapta	ado	de Álvarez-L	orenzo, Sosn	ik, y Conche	iro,	2011	•			

Copolímero	PM (Da)	Promedio de unidades de PEO	Promedio de unidades de PPO	HBL	CMC (mM)
Pluronic [®]					
L10	3200	7.3	49.7	12-18	
L35	1900	21.6	16.4	18 - 23	5.3
F38	4600	83.6	15.9	> 24	
L42	1630	7.4	22.5	7 - 12	
L43	1850	12.6	22.4	7 - 12	2.2
L44	2200	20.0	22.8	12 - 18	3.6
L61	2000	4.55	31.0	1-7	0.11
L62	2500	11.4	34.5	1-7	0.40
L64	2900	26.4	30.0	12-18	0.48
P65	3400	38.6	29.3	12 - 18	
F68	8400	152.7	29.0	> 24	0.48
F77	6600	105.0	34.1	> 24	
L81	2750	6.3	42.7	1-7	0.023
P84	4200	38.2	43.5	12 - 18	0.071
P85	4600	52.3	39.7	12-18	0.065
F87	7700	122.5	39.8	> 24	0.091
F88	11400	207.3	39.3	> 24	0.25
L92	3650	16.6	50.3	1-7	0.088
F98	13000	236.4	44.8	> 24	0.077
L101	3800	8.6	59.0	1-7	0.0021
P103	4950	33.8	59.7	8 - 12	0.0061
P104	5900	53.6	61.0	12 - 18	0.0034
P105	6500	73.9	56.0	12-18	
F108	14600	265.5	50.3	> 24	0.022
L121	4400	10.0	68.3	1-7	0.0010
L122	5000	22.2	69.0	1-7	
P123	5750	39.2	69.4	7 - 12	0.0044
F127	12,600	200.5	65.2	18 - 23	0.0028
Tetronic®					
304	1650	15.0	17.1	12 - 18	6.06
901	4700	10.7	72.9	1-7	1.48
904	6700	60.9	69.3	12 - 18	1.04
908	25000	454.5	86.2	> 24	0.40
1107	15000	238.6	77.6	18 - 23	0.46
1301	6800	15.5	105.5	1-7	0.15
1307	18000	286.4	93.1	> 24	0.56
150R1	7900	20.0	116.0	1-7	0.09

Es relevante destacar que las técnicas de preparación de MPs comúnmente empleadas son de fácil manufactura y se basan en el equilibrio simple (método directo), diálisis, emulsión aceite en agua, hidratación de película y liofilización, como las principales y más empleadas (**Figura 18**) (Gaucher, 2005). Las propiedades de las MPs, como su diámetro hidrodinámico (D*h*) distribución de tamaños (índice de polidispersión, PDI), potencial-Zeta, agregación, y su morfología, son necesarias para conocer su comportamiento fisicoquímico y biológico (Lorenzo, Concheiro, y Sosnik, 2015).



Figura 18. Esquema de técnicas de preparación de MPs. Adaptado de Gaucher, 2005.

Para finalizar, es de destacar que la selección del tipo de poloxámero o poloxamina en este tipo de estudio **dependerá de las propiedades del antígeno, aptámero, proteína o biomolécula activa a co-asociar,** encontrando una mayor interacción con moléculas hidrófilas solubles cuando los polímeros tienen un mayor porcentaje de PEO, mientras que las biomoléculas hidrofóbicas con regiones transmenbrana interactuarían mejor con polímeros con un mayor % de PPO (Todd, Balusubramanian & Newman, 1998).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

La co-asociación Sgc8c-ALEXA647 con liposomas pegilados preformados y micelas poliméricas incrementaría su tiempo medio de residencia in vivo y favorecía la acumulación en el tumor por efecto EPR e ingreso a la célula por targeting activo al receptor PTK7 sobreexpresado en tumores de linfoma.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Estudios de vehiculización y co-asociación de un derivado fluorescente del aptámero Sgc8c, utilizando materiales nanoestructurados de diferente composición y posterior evaluación biológica.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(A) Estudios de vehiculización/co-asociación de la sonda Sgc8c-Alexa Fluor 647 en nanosistemas: liposomas preformados (LPS) y micelas poliméricas (MPs) a base de poloxámero Pluronic® (F127) y poloxaminas Tetronic® (T1307 y T908).

(B) Caracterización fisicoquímica de los sistemas co-asociados.

(C) Evaluación biológica de los sistemas co-asociados selección del sistema óptimo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Vehiculización de Sgc8c-Alexa Fluor 647

4.1.1 Preparación de Sgc8c-Alexa Fluor 647

El aptámero Sgc8c, modificado en el extremo 5' con un grupo aminohexilo (-(CH₂)₆-NH₂) (13 kDa, 5'-/6-AM/ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT GTA CGG TTA GA -3', Sgc8-c-NH₂) fue comprado en IDT Technologies (Integrated DNA Technologies, Coralville-USA), posteriormente fue conjugado con Alexa Fluor 647® succinimidil éster (Alexa647-NHS, Figura 8) adquirida en Thermo Fisher Scientific (A-20006, Thermo Fisher Scientific, Waltham-USA), mediante el protocolo reportado previamente por Calzada et al., 2017. Luego, se procedió a realizar la purificación del Sgc8-c-NH-Alexa Fluor 647 (Sgc8c-Alexa Fluor 647) (Figura 19), utilizando Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) (Agilent 1200 Series Infinity Star, Santa Clara-USA) en fase reversa (HPLC-RP) con una columna C-18 Kinetex, 5 µm, 150 mm x 4.6 mm (00F-4605-E0, Phenomenex,), con una fase móvil de trietilamina 50 mM, pH 7.5 / 5% de acetonitrilo (disolvente A) y metanol (disolvente B), flujo 1 mL/min. El gradiente utilizado fue de A: B (90:10) en tiempo inicial, de A:B (83:17) a tiempo 6 minutos, de A:B (78:22), de A:B (40:60) a tiempo 26 hasta 30 min. La detección se realizó por UV a 260 nm y 650 nm. Finalmente, el Sgc8c-Alexa Fluor 647 se liofilizó sin ningún agregado (Biobase BK-FD10 PT) y se almacenó a -20 °C. La cuantificación final del producto aislado se realizó por espectrofotometría UV en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603 a una longitud de onda (λ) de 260nm, E: 397600L.mol⁻¹.cm⁻¹.



Figura 19. Estructura de Sgc8c-Alexa Fluor 647.

4.1.2 Preparación de Sgc8c-Alexa Fluor 647 co-asociado a nanosistemas

La co-asociación de Sgc8c-Alexa Fluor 647 (sonda) se realizó por incubación de ésta, a: (i) liposomas pegilados preformados (LPS) y a (ii) micelas poliméricas prístinas (MPs) a base de poloxámero (F127) y poloxaminas (T1307 y T908), durante tiempos adecuados.

Preparación de nanoestructuras:

Los liposomas preformados (LPS) a base de colesterol (2 mg/mL), fosfatidilcolina hidrogenada de soja (6 mg/mL) y fosfatidiletanolamina anclada a polietilenglicol (4 mg/mL), fueron otorgados gentilmente por MR-Pharma S.A (Argentina).

Los copolímeros formadores de MPs a base de poloxámero Pluronic® 127 (F127, 12.6 kDa, PEO 70 % peso total, HLB 18) y poloxaminas Tetronic® 1307 (T1307, 18 kDa, PEO 70 % peso, HLB 27) y 908 (T908, 25 kDa, 80 % peso PEO, HLB 31) fueron donados por BASF Corporation (New Milford CT, EE. UU). Para la preparación de las MPs 10% p/v, se masó el copolímero, se agregó el 70% del volumen final de agua MilliQ estéril, pH 7, y se dejó

hidratando durante toda la noche en frío (4°C). Luego se llevó a volumen final, con agua MilliQ, a temperatura ambiente.

Preparación de Sgc&c-Alexa Fluor 647 co-asociado a liposomas preformados. Para estudiar la co-asociación de Sgc&c-Alexa Fluor 647 (sonda) a los liposomas preformados (LPS-sonda), se realizó la incubación de la sonda junto a los LPS en diferentes relaciones molares sonda:LPS. Las relaciones estudiadas fueron 1:10, 1:100, 1:500, 1:5000, 1:5500 y 1:10000 (**Tabla 5**).

Se procedió al calentamiento de los LPS durante 30 minutos a 60°C y se filtraron por membrana de 0,22 µm. Se agregó 1 mL de los LPS preformados (ver **Tabla 5**) a temperatura ambiente, a la sonda previamente liofilizada en las cantidades correspondientes. Se agitó durante 30 minutos a 4 rpm en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, partiendo del sistema crudo (LPS-sonda), se procedió a la separación de la sonda-libre, de la sonda co-asociada a los liposomas (LPS-sonda-columna), utilizando una columna de exclusión vesicular qEVoriginal de 70 nm (IZON), fase móvil agua MiliQ pH 7 y PBS pH 7,4. La fase móvil PBS M pH 7,4 se utilizó para las relaciones 1:10, 1:1000 y 1:5500 (ver **Tabla 5**, indicado con *) y agua MiliQ pH 7 se utilizó para las relaciones 1:10000 y 1:5000 (ver **Tabla 5**, indicado con **). Se estudió el perfil de elución de los LPS y de la sonda libre. Finalmente, las fracciones colectadas (0,5 mL) se midieron por intensidad de fluorescencia (IF) ($\lambda_{Em/Ex}$ 675/640) y por absorbancia a $\lambda = 650$ nm, en placas de 96 pocillos (655101, Greiner), en el equipo Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific). Se realizó la curva de calibración de IF con Alexa Fluor 647 en buffer TRIS 50,0 mM pH 8, con concentraciones de 0.04, 0.1, 0.5, 1.0 y 2.0, 3.0 y 5.0 µM.

1 mL */**

1 mL *

 Tabla 5. Relación LPS:sonda y porcentaje de sonda co-asociada a LPS.

Sonda: LPS	1:10	1:100	1:5000	1:5500	1:10000
Sonda	50 µg/mL	50 µg/mL	50 µg/mL	44 µg/mL	22 µg/mL

Nota: * Fase móvil para ese sistema PBS/ ** Fase móvil para ese sistema agua MilliQ

 $2 \mu L/mL *$

LPS (17,4 mM)

Preparación de la sonda Sgc8c-Alexa Fluor 647 co-asociada a MPs a base de F127, T1307

20 µL/mL *

1 mL **

y T908. La co-asociación de la sonda a MPs (MPs-sonda), se llevó adelante mediante incubación de la sonda (Sgc8c-Alexa Fluor 647) previamente liofilizada (50,0 μg; **Tabla 6**) al nanosistema preformado (1mL, 10% p/v). Las MPs se prepararon en agua MilliQ estéril pH 7,0 y en PBS 0,01 M pH 7,4. Posteriormente, se agitó en agitador magnético, durante 30 minutos a 4 rpm, en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, partiendo del sistema crudo (MPs-sonda), se procedió a la separación de la sonda-libre, de la sonda co-asociada, por columna de exclusión vesicular qEV (IZON) de 70 nm, fase móvil PBS.

MPs (10% p/v)	Concentración de Sonda (µg/mL)
F127	0
F127-sonda	50
T1307	0
T1307-sonda	50
T908	0
T908-sonda	50

Tabla 6. Esquema de MPs-libres (F127-libre, T1307-libre y T908-libre) y MPs-sonda.

Estudios de separación de la sonda-libre no co-asociada a los nanosistemas. Se procedió a estudiar por columna de exclusión vesicular, qEVoriginal (IZON, 70 nm) y por microcones con un corte de 10 kDa (MRCPRT010, Microcon®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y 30 kDa (MRCF0R030, Microcon®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) (Figura 20), la separación de la sonda imagenológica, libre, no co-asociada a los nanosistemas de estudio (LPS

y MPs). A los sistemas sometidos a este proceso los llamaremos sonda-columna (sonda-c), LPS-columna (LPS-c) y MPs-columna (MPs-c), de ahora en adelante.



Figura 20. Sistemas de separación usados: columna qEV IZON (izquierda) y microcones 10 kDa y 30 kDa (derecha).

4.2 Caracterización fisicoquímica

4.2.1 Determinación de tamaño de partícula y potencial Zeta

El diámetro hidrodinámico (D_h), el índice de polidispersión (PDI) y el potencial-zeta (Z-pot), de la sonda libre (50 µg/mL), los nanosistemas libres, la sonda co-asociada a LPS y MPs (10% p/v), fueron preparadas según el apartado **4.1.2** y analizadas por Dispersión dinámica de luz láser (DLS, Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, UK), provisto de un láser He-Ne (633 nm) y un correlator digital, modelo ZEN3600, en el Instituto NANOBIOTEC (FFyB-UBA, Buenos Aires-Argentina) (ver **Tabla 7**). Las mediciones fueron realizadas a 25 °C y 37 °C, a un ángulo de dispersión de 173° y una posición fija de luz láser de 4.65 mm.

Nanosistemas	Concentración de Sonda (µg/mL)	
F127	0	
F127-sonda	50	
T1307	0	
T1307-sonda	50	
T908	0	
T908-sonda	50	
LPS	0	
LPS-sonda	50	
LPS-columna	0	
LPS-sonda-columna	22	
Sonda	50	

Tabla 7. Caracterización de los sistemas libres y co-asociados a la sonda, por DLS.

En esta metodología la intensidad de la luz dispersada producida por las partículas fluctúa a una velocidad dependiente del tamaño de las partículas. Por ello, el análisis de la intensidad de dichas fluctuaciones genera el coeficiente de difusión de la partícula y a partir de éste se determina el tamaño hidrodinámico de la partícula. Se mide la difusión de la partícula debido al movimiento Browniano y se lo relaciona con el tamaño de la misma. El parámetro calculado se define como el coeficiente de difusión traslacional (D). El tamaño de la partícula se calcula a partir de dicho coeficiente mediante la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Donde, d(H) es el diámetro hidrodinámico; D es el coeficiente de difusión traslacional, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y η es la viscosidad. Mediante la resolución de Mie de las ecuaciones de Maxwell se puede transformar la distribución por intensidad en distribución por volumen y número. Aunque estas últimas no pueden usarse para informar sobre el tamaño de partícula ya que son estimadas a partir de la primera.

El Z-pot de los nanosistemas-libres y nanosistemas-sonda, fueron medidos a 25 y 37°C. Los índices de refracción (IR) utilizados fueron de 1,48 (LPS) y 1,33 (MPs) y la viscosidad de

0,8869 cP. Cada muestra se preparó tres veces, en idénticas condiciones y se realizaron al menos 6 corridas de cada una.

4.2.2 Análisis de los nanosistemas por Microscopía Electrónica de Transmisión

Los nanosistemas libres y co-asociados se prepararon frescos en agua MilliQ (ver apartado 4.2.1, Tabla 7), fueron analizados utilizando un microscopio de transmisión electrónica (ZEISS EM109 TEM, Oberkochen, Alemania) equipado con una cámara CCD digital ES1000W ErlangshenTM de alta velocidad y asequible de 11 megapíxeles (Modelo 785, Gatan GmbH, München, Alemania) del Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios de Microscopía Electrónica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires-Argentina. Las muestras (10 µL) se depositaron sobre una membrana de rejilla de carbón recubierta con una resina acrílica hidrófila (LR) blanca (LRW) de baja viscosidad y se dejaron reposar durante 5 minutos previo al análisis. Después de la incubación, el exceso de muestra se adsorbió con papel de filtro y se dejó secar durante 10 minutos. Luego, la rejilla se cubrió con una gota de acetato de uranilo (UA; 50 mL, 2 % p/v en agua desionizada, pH 7,0 - 7,5) durante 180 segundos. Finalmente, las rejillas se secaron al aire, a temperatura ambiente, durante 15 minutos y se analizaron. Las imágenes se realizaron a 80 kV y a temperatura ambiente y se procesaron con el software TEM AutoTuneTM (Gatan Digital Micrograph® software, Gatan GmbH). El diámetro de las MPs y los LPS co-asociados a la sonda, se estimó utilizando el software ImageJ.

4.2.3 Análisis de los nanosistemas por Microscopía de Fuerza Atómica

Mediante microscopía de fuerza atómica se estudió la morfología y topografía de la coasociación de los LPS y MPs a la sonda (**Tabla 7**). Se utilizó mica y silicio como soporte, depositando 2-5 μ L de muestra. Las muestras de LPS-libre y LPS-sonda, se utilizaron sin dilución. Para las MPs libres y MPs-sonda, se efectuó una dilución 1/300. Posteriormente, se realizó el secado con gas N₂. Las medidas se efectuaron por tapping y con un cantiléver de silicio con recubrimiento reflex, una constante de elasticidad de 42 N/m y frecuencia de 285 Hz. Posteriormente, se colocó la muestra en el equipo (Alpha 300-RA, WITec GmbH, Ulm, Germany), iniciando en una escala de 5 μ m y posteriormente, a escalas de nm. Para el análisis de las muestras y el procesamiento de imágenes, se utilizó el Project FOUR 4.0 WITec.

4.2.4 Estabilidad en el tiempo

Se evaluó la estabilidad de los nanosistemas co-asociados a la sonda (50 µg/mL), preparados según apartado **4.1.2**, almacenados a 4 °C en oscuridad, a los tiempos 0, 24 y 72 horas. Se analizó por DLS (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, UK), en el Instituto NANOBIOTEC - Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires-Argentina. El ángulo de dispersión fue de 173° y una posición fija de luz láser de 4,65 mm. Todas las muestras fueron medidas a 25 y 37°C. Los parámetros preestablecidos como el IR fueron de 1,48 (LPS) y 1,33 (MPs) y la viscosidad de 0,8869 cP. Cada muestra se preparó tres veces, en idénticas condiciones y se realizaron al menos 6 corridas de cada una. Se estudió el *D*_h, el PDI y el potencial-zeta, de cada muestra.

4.2.5 Estudio de liberación in vitro

Para el ensayo de liberación se eligieron dos nanosistemas: LPS-sonda y T908-sonda (10% p/v, 50 μ g/mL) (ver preparación, apartado **4.1.2**), utilizando una membrana de diálisis de 14 kDa (Spectra/Por® Dialysis Membrane. MWCO 14000), con un volumen interior de 2 mL y exterior de 7,5 mL de agua MilliQ (para los LPS-sonda) o PBS pH 7,4 (para T908-sonda). La liberación, se realizó en tubos FalconTM de 50 mL, recubiertos con papel de aluminio en agitación constante y temperatura ambiente (**Figura 21**). La diálisis se realizó por un período de 44 horas, tomándose una muestra de 500 μ L a los tiempos 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 4, 24,
25, 28, 30 y 44 horas. Finalmente se midió la absorbancia de la sonda libre, los nanosistemas libres y la sonda co-asociada a LPS y MPs, a 650 nm, en el espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu 1800 en el Instituto NANOBIOTEC-FFyB-UBA, Buenos Aires-Argentina. El contenido extraído fue devuelto luego de la medición. A su vez, a las 24 horas, se realizó recambio de medio exterior a la membrana. Como controles, se realizó la diálisis de los nanosistemas libres (T908 y LPS) y sonda libre.



Figura 21. Sistemas de liberación a base de MPs (10% p/v): T908-libre (izquierda), T908-sonda (centro), sonda-libre (derecha) (A). Sistemas de liberación in vitro en agitador (B).

4.3. Caracterización biológica

4.3.1 Captación celular por Microscopía Confocal

La línea celular tumoral A20 fue incubada con la sonda-libre y co-asociada a los nanosistemas y observadas por microscopía confocal (Zeiss LSM 800, software ZEN Blue 2.3 y módulo AiryScan Processing). Para ello, previamente la línea celular A20 (modelo murino de linfoma de células B, ratón *Mus musculus*, TIB 208, ATCC), se creció en suspensión y el medio de cultivo (RPMI-STA, Capricorn Scientific, Alemania) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina y 0,05 mM de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich). El

medio se retiró por centrifugación a 800 rpm por 5 min, posteriormente las células se suspendieron en PBS 1X, pH 7,4 y fueron centrifugadas nuevamente y resuspendidas en medio de cultivo.

El estudio se llevó a cabo tras la incubación de la sonda-libre y la sonda co-asociada a LPS, F127, T1307 y T908 (ver apartado 4.2.1, **Tabla 7**) con 5000 células a 37 °C a los tiempos 0,25, 0,5 y 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células se centrifugaron a 1800 rpm por 3 min, y se quitó el medio de cultivo. Las células se lavaron con PBS 1X, pH 7,4, y se centrifugaron a 1800 rpm por 3 min. Posteriormente, las células fueron fijadas en formaldehido al 4 %, 15 minutos y lavadas con PBS 1X, pH 7,4, como se describió anteriormente. Las células se montaron en el portaobjeto, se centrifugaron a 800 rpm por 4 minutos a 4 °C y finalmente se realizaron las marcaciones adicionales usando el marcador endosomal temprano Rab5 (anticuerpo primario de conejo, 1:100, C8B1 mAb 3547, Cell Signaling Technology, USA), con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa 488 (1:500, ab 150077 Abcam, USA) y con marcador nuclear Hoechst 33342 (1:100, InmunoChemestry Technologies, LLC). Los preparados fueron realizados usando medio de montaje (ProLong®) y las imágenes fueron adquiridas en microscopio confocal Zeiss LSM 800, láseres 405, 488 y 640 nm, en la Plataforma de Microscopía Confocal y Epifluorescencia del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), MEC, Montevideo-Uruguay.

4.3.2 Estabilidad en suero fetal bovino

Se realizó estabilidad en SFB, de la sonda libre y co-asociada a LPS (LPS-sonda) (sin separación por columna). La sonda (50 µg/mL) se lavó con agua MilliQ estéril y se filtró por microcon de 10 kDa (MRCPRT010, Microcon®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) durante 15 minutos a 13000 rpm. Se incubó la sonda libre y LPS-sonda con el SFB a 37 °C, a los tiempos 0,5, 2 y 24 horas. Posteriormente, se filtró por microcon de 30 kDa (MRCPRT030,

Microcon®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) durante 15 minutos a 13000 rpm. Se recuperó lo que pasó por lo membrana y se filtró por microcon de 10 kDa durante 15 minutos a 13000 rpm. Las fracciones mayores a 30 kDa, entre 10 y 30 kDa y menor a 10 kDa, se midieron por IF ($\lambda_{Em/Ex} 675/640$) y por absorbancia a $\lambda = 260$ y 650 nm, en placas de 96 pocillos (655101, Greiner), en el equipo Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific).

4.3.3 Biodistribuciones e imagenología molecular

Los estudios de biodistribución por imagen ex vivo, fueron realizados en ratones BALB-c normales (6 a 8 meses de edad) proporcionados por la Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo-Uruguay. El modelo tumoral murino fue generado en dichos ratones BALB-c, los cuales fueran inoculados con una inyección subcutánea de 0,2 mL de $5x10^5$ células A20 (modelo murino de linfoma de células B). Una vez que el tumor fue palpable en aproximadamente 15 días, los animales estuvieron prontos para el experimento. Cada ratón se inyectó con una única dosis de sonda-libre, LPS-sonda-c y T908-sonda, en bolo por vía intravenosa (200 µL). Pasado el tiempo de biodistribución 0,5, 2 y 24 h (n=5), los grupos de ratones fueron sacrificados por dislocación cervical (protocolo aprobado por la CEUA, #595). Finalmente, los órganos disectados se pesaron y se adquirieron las imágenes ex vivo con el equipo In-Vitro MS FX Pro (Bruker) del Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias-UdelaR, Montevideo-Uruguay, con el modo rayos-X y de fluorescencia (λ_{Ex} 650).

El análisis de las imágenes fue realizado mediante la adquisición de la región de interés (ROI, del inglés Regions Of Interest), tomando como dato means/área, con el programa Bruker MI SE.

Materiales y Métodos

4.3.4 Farmacocinética

Para realizar los estudios farmacocinéticos se seleccionó la co-asociación T908-sonda (10% p/v). Para ello, una única dosis de sonda-libre o T908-sonda (10% p/v, 50 µg/mL) de 0,2 mL, fue administrada a ratones hembra BALB-c normales (6 a 8 meses de edad) (20-25 g) por vía intravenosa en bolo (n=5). Los animales fueron dispuestos en una jaula metabólica. Se colectaron muestras de sangre del globo ocular (30 µL), a 0,08, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 6, 18, 24 y 48 horas post-inyección, y se dispusieron en placa de 96 pocillos (Greiner, modelo 655101) con EDTA.2Na (450 µg/µL). Tras la última recolección se adquirió una imagen de la placa en el equipo imagenológico In-Vitro MS FX Pro (Bruker), (filtro de emisión 650 nm), del Centro de investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias-UdelaR, Montevideo-Uruguay y del Instituto Pasteur, Montevideo-Uruguay. Para la obtención de los valores de la región de interés (ROI, *del inglés Regions Of Interest*), se tomó el dato means/área y se realizó el procesamiento de datos con el programa Bruker MI SE.

Para los cálculos de la dosis (Dv) de la sonda nanovehiculizada (ROI/ μ L), se estimó a partir del ROI, considerando la cantidad de sangre y la dilución usada en la medición del ROI. Se tomaron 30,0 μ L de sangre, se diluyeron con 18,0 μ L de EDTA.2Na, siendo el volumen final de 48 μ L. De esta disolución se toman 30,0 μ L para medir la fluorescencia.

$$Dv = (ROI / 30) \times (48 / 30)$$

Se utilizaron diferentes herramientas para diagnosticar la bondad del ajuste y la validez del modelo: predicciones individuales y observaciones en función del tiempo y la verificación visual predictiva (VPC). En donde se simulan perfiles farmacocinéticos en base al modelo obtenido y se compara gráficamente la distribución de predicciones con la distribución y observaciones. El software utilizado para los análisis farmacocinéticos fue MonolixSuite 2020R1 (Lixoft, SimulationsPlus). El protocolo para manipulación con animales de experimentación de laboratorio, fue previamente aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA, #595).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Vehiculización de Sgc8c-Alexa Fluor 647

5.1.1 Preparación de Sgc8c-Alexa Fluor 647

Se logró la obtención derivatizado Sgc8c-Alexa Fluor 647 (sonda), mediante la conjugación del aptámero Sgc8-c-NH₂ con el fluoróforo Alexa Fluor 647®. Luego de la derivatización se controló por RP-HPLC, con columna C18 y con detección UV-vis a 260 nm y a 650 nm, obteniéndose los cromatogramas que se muestran en la **Figura 22.** A continuación, se procedió a la purificación de la sonda, la que en las condiciones de trabajo posee un tiempo de retención característico de 24 minutos. En paralelo, se realizó control por RP-HPLC del derivado del fluoróforo utilizado para la derivatización (**Figura 23**), Alexa647-NHS. Finalmente, luego de la purificación, se liofilizó el producto y se lo resuspendió en agua milliQ, para su cuantificación de la sonda por espectrofotometría al medir con una longitud de onda de 260 nm. El porcentaje de sonda pura obtenida fue del 56 %, el mismo se calculó en relación a la masa obtenida en la derivatización, medida por espectrofotometría. El cromatograma de la sonda purificada se observa en la **Figura 24**.



Figura 22. Cromatograma de HPLC-RP de control de la derivatización de c, con columna C18. En la parte superior, se observa el cromatograma por UV (UV_B) a 650 nm y en la parte inferior, el cromatograma por UV (UV_A) a 260nm.



Figura 23. Cromatograma de HPLC-RP de Alexa647-NHS, con columna C18. En la parte superior, se observa el cromatograma por UV (UV_B) a 650 nm y en la parte inferior, el cromatograma por UV (UV_A) a 260nm.



Figura 24. Cromatograma de HPLC-RP de Sgc8c-Alexa Fluor 647 purificado, con columna C18. En la parte superior, se observa el cromatograma por UV (UV_B) a 650 nm y en la parte inferior, el cromatograma por UV (UV_A) a 260nm.

5.1.2 Co-asociacion y purificación Sgc8c-Alexa Fluor 647 a los nanosistemas

Co-asociación y purificación de LPS-sonda

Se realizó la co-asociación de la sonda a los LPS en diferentes relaciones sonda:LPS. Las relaciones estudiadas fueron 1:10, 1:100, 1:500, 1:5000, 1:5500 y 1:10000 (Tabla 8). Asimismo, evaluar la existencia de fluorescencia en la fracción liposomal, lo cual podría entenderse como una co-asociación, y también evaluar si existe excedente de sonda-libre sin co-asociar a los nanosistemas a los efectos de eliminarla y que no interfiera en los ensayos posteriores. Como control, se realizó la evaluación de los LPS-libre y de la sonda-libre de forma independiente, se midió la absorbancia e intensidad de fluorescencia (Tabla 9 y Figuras 25-27). Los LPS-libre eluyeron en los primeros 5,0 mL (fracciones 6 a 10) y la sonda-libre entre los 7,0 y 9,0 mL (fracciones 14 a 18), mostrado en la **Tabla 9**. En las relaciones 1:10 y 1:100, no se observó co-asociación de la sonda en los liposomas. Sin embargo, para las relaciones 1:10000, 1:5500 y 1:5000, se observa una co-asociación del 44%, 48% y 79%, respectivamente (Tabla 8). Nótese, que, para los objetivos establecidos en este trabajo, no es necesario purificar el excedente de LPS-libre o MPs-libre. Además, mediante esta metodología de purificación no es posible hacerlo; según se observa en los resultados, los LPS-libres y los LPS-sonda eluyen en las mismas fracciones. Sin embargo, la exclusión vesicular parece ser eficiente en la separación de la sonda-libre de los nanosistemas LPS-sonda, si bien deberá tenerse en cuenta si la dilución obtenida al ser eluidos es adecuada para el trabajo posterior. La relación 1:5000 parecería la más adecuada para el trabajo sin purificación debido a que hay solamente un 21% de sonda-libre, pero a futuro podrían probarse otras condiciones que impliquen la no purificación del nanosistema.

Tabla 8. Esquema representativo de co-asociación LPS-sonda, relación sonda:LPS y porcentaje de sonda co-asociada a los LPS.

1:100 1:10 1:5000 1:5500 1:10000 **Relación sonda:LPS** Sonda $50 \,\mu g/mL$ $50 \,\mu g/mL$ $50 \,\mu g/mL$ $44 \,\mu g/mL$ $22 \,\mu g/mL$ LPS (17,4 mM) 2 µL/mL * 20 µL/mL * 1 mL ** 1 mL * 1 mL */** Sonda-LPS 0% 2% 79% 48% 44%

Nota: * Fase móvil para ese sistema PBS/ ** Fase móvil para ese sistema agua MilliQ

Tabla 9. Estudio de separación de sonda-libre de LPS-sonda (22 μ g/mL, relación 1:10000), mediante una columna de exclusión vesicular qEV y agua como fase móvil agua. Medición de intensidad de fluorescencia (IF_{672/647}) y absorbancia a 650 nm, de las fracciones de 0,5 mL, eluidas de la columna.

Fracción	Intensida 672/	d de Fluor 647 (IF672)	escencia	Abso	rbancia 6 (Abs650nm	50 nm
(0,5 mL)	Sonda-libre 22 µg/mL	LPS-libre	LPS-sonda 22 µg/mL	Sonda-libre 22 µg/mL	LPS-libre	LPS-sonda 22 µg/mL
1	36	8	46	0,003	0,000	0,012
2	1	52	1	0,000	0,000	0,003
3	0	0	25	0,001	0,000	0,000
4	0	0	14	0,004	0,000	0,000
5	0	27	0	0,001	0,000	0,000
6	0	0	0	0,000	0,000	0,000
7	0	23	164	0,001	0,044	0,071
8	0	180	1044	0,006	0,209	0,218
9	10	245	1534	0,002	0,163	0,169
10	58	158	1376	0,004	0,072	0,092
11	200	54	995	0,008	0,041	0,058
12	445	237	601	0,018	0,029	0,038
13	747	142	414	0,026	0,016	0,027
14	975	86	304	0,039	0,019	0,019
15	1035	0	199	0,042	0,008	0,011
16	831	78	142	0,033	0,009	0,001
17	582	57	130	0,025	0,006	0,008
18	488	23	101	0,018	0,006	0,005
19	181	0	1190	0,009	0,002	0,004
20	168	0	362	0,005	0,001	0,002
21	30	0	716	0,004	0,001	0,002
22	31	5	563	0,003	0,000	0,000
23	126	40	151	0,013	0,000	0,000
24	42	0	8	0,005	0,000	0,000
25	9	27	36	0,001	0,000	0,000
26	0	0	19	0,005	0,000	0,000
27	0	0	0	0,000	0,000	0,000
28	0	8	15	0,000	0,000	0,000



Figura 25. Perfil de elución en agua, de la sonda-libre (22 μ g/mL), LPS-libre y LPS-sonda (22 μ g/mL, relación 1:10000), mediante una columna de exclusión vesicular qEV. Medición de intensidad de fluorescencia (IF_{672/647}) de las fracciones de 0,5 mL, eluidas de la columna.



Figura 26. Perfil de elución en agua, de la sonda-libre ($22 \mu g/mL$), LPS-libre y LPS-sonda ($22 \mu g/mL$, relación 1:10000), mediante una columna de exclusión vesicular qEV. Medición de absorbancia a 650 nm de las fracciones de 0,5 mL, eluidas de la columna.



Figura 27. Perfil de elución de la sonda-libre (50 μ g/mL) y LPS-sonda (50 μ g/mL, relación 1:5000), mediante una columna de exclusión vesicular qEV. Medición de intensidad de fluorescencia (IF_{672/647}) de las fracciones de 0,5 mL, eluidas de la columna.

Co-asociación y purificación de MPs-sonda

La co-asociación entre la sonda y las MPs (10% p/v) a base de F127, T1307 y T908 se realizó con 50 µg/mL de la sonda (ver apartado **4.1.2**). En el análisis mediante columna de exclusión vesicular (qEV) y PBS 1X de fase móvil, se observó un solo pico de elución MPs-sonda (fracción 23 a 25), diferente a la sonda (fracción 17 a 18), medidos por IF ($\lambda_{Em/Ex} 675/640$) y absorbancia ($\lambda = 650$ nm). En este análisis no se observó ningún pico que indique una co-asociación. Por lo tanto, esto no permitió asegurar la co-asociación, pero tampoco descartarla, ya que la dilución propia de la técnica afectaría la CMC de las micelas y provocando que se desensamblen. Esto además tiene sustento en que las MPs son eluidas en fracciones altas. La exclusión vesicular entonces no sería una metodología adecuada en este caso, ni para observar la co-asociación ni para purificar la sonda-libre.

5.2. Caracterización fisicoquímica

5.2.1 Determinación de tamaño de partícula y potencial Zeta

Caracterización de liposomas preformados libres (LPS). En primer lugar, se llevó a cabo la caracterización exhaustiva de los LPS-libres (otorgados gentilmente por MR Pharma S.A.) a diferentes concentraciones, en agua MilliQ estéril y en PBS 1X. Z-average, diámetro hidrodinámico (D_h), índice de polidispersión (PDI) y Z-potencial, fueron estudiados por DLS a 25 y 37°C. Los resultados se muestran en las **Tablas 10 y 11**, y los valores fueron expresados como la media \pm desvío estándar (DE). Se estudiaron los LPS-libres a diferente dilución en agua (1:10 y 1:50), considerando que los mismos serán enfrentados a una dilución *in vivo*, posterior a su administración.

El tamaño de partícula se obtiene a partir de la función de correlación usando varios algoritmos. I) El análisis de cumulantes donde se ajusta una exponencial simple a la función de correlación para obtener el tamaño promedio (diámetro Z-Average) y una estimación del ancho de la distribución (PDI). PDI es una medida aproximada del grado de agregación. II) Análisis de CONTIN donde se ajusta una exponencial múltiple a la función de correlación para obtener la distribución de tamaños de partículas. El análisis de CONTIN provee información numérica y gráficos de distribución de tamaño. Así, el valor de Z-Average se puede emplear para informar un valor promedio, pero, es inadecuado para dar una descripción completa de la distribución de tamaños, por lo tanto, se informarán también los picos obtenidos y su porcentaje en intensidad. El Z-potencial, es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre las partículas. Puede servir como aproximación para inferir la estabilidad de las partículas. **Tabla 10.** Z-average, diámetro hidrodinámico (D_h), índice de polidispersión (PDI) y potencial Zeta (Zpotencial) de LPS-columna y LPS-libres a diluciones 1:10 y 1:50, determinados por DLS, en agua y PBS, a 25 °C. Los cálculos se expresan como la media de cada parámetro ± DE.

Dispersante	Sistemas	Z-average (nm)	$\begin{array}{c} D_h (\mathbf{nm}) \\ (\pm \mathbf{DE}) \end{array}$	% Intensidad (±DE)	PDI (±DE)	Z-Potencial (mV) (±DE)
	LPS-libres	189,8 (6,3)	249,3 (20,2)	100,0 (0,0)	0,403 (0,031)	-35,2 (0,6)
	LPS (1:10)	168,6 (0,2)	225,5 (15,1)	100,0 (0,0)	0,408 (0,055)	-57,1 (1,3)
H ₂ O	LPS (1:50)	167,8 (2,5)	196,8 (6,0)	100,0 (0,0)	0,390 (0,040)	-34,9 (0,5)
	LPS-columna	171,6 (3,2)	213,0 (15,7)	100,0 (0,0)	0,379 (0,017)	-64,9 (0,8)
DDC	LPS (1:10)	169,8 (1,3)	204,3 (12,9)	100,0 (0,0)	0,306 (0,034)	NA
r b s	LPS (1:50)	168,5 (1,0)	229,3 (22,6)	100,0 (0,0)	0,310 (0,026)	NA

NA: no aplica. Para las medidas en PBS, no se toman medidas de potencial Zeta.

A partir de los resultados obtenidos, se observó que los LPS-libres presentaron un tamaño de $249,0 \pm 20,2$ nm y 256,6 ± 17,6 nm, con potencial Z -35,2 ± 0,6 mV y -33,5 ± 0,7 mV, medidos a 25 °C y 37 °C, respectivamente. El tamaño, con un adecuado desvío estándar y valores de potenciales por debajo de -30 mV, indican que todos los LPS tanto a 25 y 37 °C, presentan una formulación estable (**Tabla 10** y **11**), siendo la más estable debido a su potencial de -64,9 ± 0,8 mV, la formulación LPS-columna.

Respecto a las diluciones de trabajo, se obtuvo que el tamaño de los LPS-libres diluidos en agua (1:50 y 1:10) se encuentra en el rango de 196,8 \pm 6,0 nm a 225,5 \pm 15,1 nm y 181,9 \pm 10,8 nm a 209,9 \pm 22,7 nm, a 25 °C y 37 °C, respectivamente. El PDI se mantiene constante con una leve variación según la fase móvil utilizada. Por lo cual, cambios en las diluciones, temperatura de análisis y fase móvil utilizada, genera diferencias en el tamaño y la agregación de los LPS.

Tabla 11. Z-average, diámetro hidrodinámico (D_h), índice de polidispersión (PDI) y potencial Zeta (Zpotencial) de de LPS-columna (LPS-c) y LPS-libres a diluciones 1:10 y 1:50, determinados por DLS, en agua y PBS, a 37 °C. Los cálculos se expresan como la media de cada parámetro \pm DE.

	Sistemas	Z-average (nm)	$D_h (\mathbf{nm})$ (± D E)	% Intensidad (±DE)	PDI (±DE)	Z-Potencial (mV) (±DE)
	LPS-libres	202,1 (11,5)	256,6 (17,6)	100,0 (0,0)	0,404 (0,056)	-33,5 (0,7)
	LPS (1:10)	178,2 (1,4)	209,9 (22,7)	100,0 (0,0)	0,424 (0,045)	-47,4 (1,2)
H ₂ O	LPS (1:50)	199,2 (30,2)	181,9 (10,8)	100,0 (0,0)	0,412 (0,040)	-50,3 (5,6)
	LPS-c	184,2 (7,7)	221,1 (14,6)	100,0 (0,0)	0,420 (0,045)	-60,7 (1,0)
DDC	LPS (1:10)	172,1 (6,8)	205,9 (6,3)	100,0 (0,0)	0,311 (0,070)	NA
r b s	LPS (1:50)	201,0 (1,6)	290,2 (35,7)	100,0 (0,0)	0,470 (0,083)	NA

NA: no aplica. Para las medidas en PBS, no se toman medidas de potencial Zeta.

En cuanto a los Z-potenciales, la formulación de los LPS-columna (ver apartado **5.1.2**) fue la que presentó resultados de -64,9 \pm 0,8 mV y -60,7 \pm mV, a 25 °C y 37 °C, respectivamente, siendo la formulación más estable en comparación con el resto. Los LPS diluidos en PBS (1:10 y 1:50) a 25 °C, mostraron un tamaño de 204,3 \pm 12,9 nm y 229,3 \pm 22,6 nm, un PDI de 0,306 \pm 0,034 y 0,310 \pm 0,026, y un Z-potencial de -8,49 \pm 0,81 mV y -8,23 \pm 0,80 mV, respectivamente. El Z-potencial, con valores entre -30 y + 30 mV, nos indica que dichos LPS no se encuentran estabilizados, formando agregaciones, por ende, trabajar en PBS, no sería recomendable. Esto ha sido observado previamente por nuestro grupo al intentar eluir en PBS a traves de la columna de exclusión vesicular por lo cual se descarta que sea artefacto de la técnica sino más bien un efecto del PBS sobre los LPS.

Liposomas preformados co-asociados a la sonda

Una vez realizada la caracterización exhaustiva de los LPS-libres en distintas condiciones (ver más arriba), se procedió a la caracterización de los LPS-sonda. Por DLS se estudiaron dos

formulaciones LPS-sonda, modificando la cantidad de la sonda: 25 y 50 μ g/mL (**Tabla 12**). Posteriormente, se realizó la separación por columna de la sonda-libre no asociada, y se optó por una de las formulaciones (ver apartado 5.2.1), con lo que se prosiguió con dicha muestrapurificada para la caracterización por DLS (**Tabla 13**). Se evaluó el diámetro hidrodinámico (D_{*h*}), Z-average, índice de polidispersión (PDI) y Z-potencial. Los resultados se muestran en las **Tablas 12 y 13**, y se expresan como la media ± DE.

Tabla 12. Z-average, diámetro hidrodinámico (D_h), índice de polidispersión (PDI) y potencial Zeta (Zpotencial) de LPS-sonda (25 y 50 μ g/mL), determinados por DLS, en agua a 25 y 37 °C. Los cálculos se expresan como la media de cada parámetro ± DE.

Sistemas	Temp. (°C)	Concentració sonda (µg/mI	n Z-average L) (nm)	D_h (nm) (±DE)	% Intensidad (±DE)	PDI (±DE)	Z-Potencial (mV) (±DE)
LPS-sonda	25	25	191,0 (7,1)	255,1 (19,3)	100,0 (0,0)	0,421 (0,070)	-25,2 (0,7)
LPS-sonda	25	50	236,4 (8,2)	263,9 (8,4)	100,0 (0,0)	0,601 (0,072)	-31,3 (0,5)
LPS-sonda	37	25	208,7 (14,5)	237,0 (14,3)	100,0 (0,0)	0,385 (0,017)	-23,9 (0,7)
LPS-sonda	37	50	176,2 (17,0)	192,0 (18,9)	100,0 (0,0)	0,151 (0,056)	-28,9 (0,7)

A partir de los resultados obtenidos, se observó que los LPS-sonda-columna (LPS-sonda-c, separados por columna de exclusión vesicular), presentaron mayor tamaño de partícula que los LPS-libres y carga superficial con mayor negatividad, lo cual implicaría una mayor estabilidad por parte del sistema co-asociado. El PDI, para LPS-sonda-c $(0,363 \pm 0,033 \text{ y } 0,391 \pm 0,043, 25 \text{ y } 37 \text{ °C}$ respectivamente) es menor que para LPS-c $(0,379 \pm 0,017 \text{ y } 0,420 \pm 0,045, 25 \text{ y } 37 \text{ °C}$ respectivamente). Estos resultados son consistentes ya que muchos sistemas liposomales se estabilizan a través de la co-asociación o carga con diversas sustancias (**Tabla 13**).

Tabla 13. Z-average, diámetro hidrodinámico (D_h), índice de polidispersión (PDI) y potencial Zeta (Zpotencial) de LPS-columna co-asociado a sonda (LPS-sonda-c) y LPS-columna (LPS-c), determinados por DLS, en agua a 25 y 37 °C. Los cálculos se expresan como la media de cada parámetro ± DE.

Sistemas	Temp. (°C)	Concentración sonda (µg/mL)	Z-average (nm)	$D_h (\mathbf{nm})$ (±DE)	% Intensidad (±DE)	PDI (±DE)	Z- Potencial (mV) (± DE)
Sonda-libre	25	50	12,9 (2,2)	26,6 (3,4)	100,0 (0,0)	0,417 (0,114)	-12,8 (2,6)
LPS-c	25	0	171,6 (3,2)	213,0 (15,7)	100,0 (0,0)	0,379 (0,017)	-64,9 (0,8)
LPS-sonda-c	25	11	186,6 (4,8)	241,4 (19,1)	100,0 (0,0)	0,363 (0,033)	-64,9 (0,8)
Sonda-libre	37	50	11,8 (0,2)	42,1 (11,8)	100,0 (0,0)	0,405 (0,016)	-8,0 (0,7)
LPS-c	37	0	184,2 (7,7)	221,1 (14,6)	100,0 (0,0)	0,420 (0,045)	-60,7 (1,0)
LPS-sonda-c	37	11	203,9 (6,0)	226,1 (19,3)	100,0 (0,0)	0,391 (0,043)	-64,0 (2,9)

Micelas poliméricas libres y co-asociadas a sonda imagenológica

Las MPs-libres y MPs-sonda, se prepararon según apartado **4.1.2** y se realizaron las determinaciones de los parámetros de interés por DLS: diámetro hidrodinámico (D_h), Z-average, índice de polidispersión (PDI) y potencial Z, a 25 y 37°C. Se muestran, las medidas realizadas a 25 °C en la **Tabla 14**. Los diámetros hidrodinámicos a 37°C, se encontraron dentro de los mismos rangos analizados a 25 °C, con lo que no se han incorporado al manuscrito de tesis.

Se observó variaciones en el tamaño de partícula de las MPs co-asociadas a la sonda en comparación con las MPs-libres. Los tamaños de las MPs menores a 10 nm corresponden a unímeros, como se puede apreciar en la columna de pico 1, de la **Tabla 14**.

Los valores de PDI en las MPs 10 % p/v a base de Tetronic®, T1307 y T908, son mayores a 0,700, en el caso de las mediciones en agua MilliQ, esto indica que hay una amplia distribución en dicha población. En cambio, el PDI de T1307 y T908 libres, medidas en PBS, mejora

notoriamente. Esto se debe a la neutralización de los grupos nitrógeno de la cadena central de etilendiamina de las poloxaminas con el PBS, favoreciendo su micelización.

También se puede observar que el PDI de las MPs a base de T1307 y T908 co-asociadas con la sonda, en agua MilliQ, presentan valores más aceptables, respecto a las MPs-libres, indicando que la presencia de la sonda las estabiliza. Los poloxámeros, F127 10% p/v libres, presentaron dos grupos de tamaños $5,3 \pm 0,2$ nm y 44,1 $\pm 3,1$ nm, siendo este último el mayoritario. En cambio, en las F127 co-asociadas a la sonda, se observó una única población de 31,8 \pm 7,3 nm, sin variaciones en el PDI ni en el potencial Zeta.

Finalmente, mediante esta metodología, podemos notar cambios en los parámetros de los nanosistemas con y sin presencia de sonda, indicando la posible co-asociación de los mismos.

Tabla 14. Diámetro hidrodinámico (D_h), índice de polidispersión (PDI) y potencial Zeta (Z-potencial) de las MPs al 10% p/v: F127, T1307 y T908, libres y co-asociadas a la sonda, determinados por DLS, en agua y PBS a 25 °C. Los cálculos se expresan como la media de cada parámetro ± DE.

Sistemas libres y cargados (25°C)		Concentración	Pic	o 1	Pie	co 2	— PDI	7 Potencial
		sonda (µg/mL)	D _h (nm) (± DE)	% Intensidad (± DE)	D _h (nm) (± DE)	% Intensidad (± DE)	(± DE)	(mV) (± DE)
	F127 – libre (H2O)	0	5,3 (0,2)	13,3 (0,8)	44,1 (3,1)	86,4 (1,3)	0,473 (0,013)	-3,7 (0,3)
	F127 – sonda (H2O)	50	31,8 (7,3)	100,0 (0,0)	-	-	0,447 (0,058)	-3,0 (0,8)
	T1307 – libre (H2O)	0	5,6 (0,2)	43,1 (0,6)	46,3 (1,7)	56,9 (0,8)	0,789 (0,018)	-5,0 (0,3)
MPs	T1307 – sonda (H2O)	50	30,1 (8,1)	100 (0,0)		-	0,419 (0,030)	-4,0 (0,7)
(10 % p/v)	T1307 – libre (PBS)	0	6,9 (0,5)	46,3 (0,6)	64,4 (1,8)	53,7 (1,5)	0,551 (0,081)	NA
	T1307 – sonda (PBS)	50	24,0 (3,2)	81,2 (8,8)	170,5 (58,0)	18,8 (6,0)	0,459 (0,080)	NA
	T908 – libre (H2O)	0	6,4 (0,3)	100,0 (0,0)	-	-	0,726 (0,244)	-7,9 (0,6)
	T908 – sonda (H2O)	50	7,7 (0,6)	65,8 (1,1)	121,8 (27,3)	34,2 (3,6)	0,467 (0,065)	-3,4 (0,5)
	T908 - libre (PBS)	0	6,2 (0,8)	39,8 (0,5)	174,3 (23,1)	35,2 (0,7)	0,502 (0,076)	NA
	T908 – sonda (PBS)	50	10,7 (0,1)	93,6 (1,3)	166,4 (9,1)	6,4 (0,4)	0,447 (0,018)	NA

Nota: NA, No es adecuado medir el potencial Zeta en PBS, debido a la oxidación de las celdas de Z-potencial con el buffer.

5.2.2 Morfología de los nanosistemas por Microscopía de Transmisión Electrónica

Para el estudio de TEM, se realizó la observación de las nanoestructuras libres y co-asociadas a la sonda. A su vez, como control, se realizó la observación de la sonda libre. De esta forma, se complementó la caracterización de las MPs y los liposomas (libres y co-asociados a la sonda), por una técnica complementaria al DLS y a la purificación por exlusión vesicular. La TEM, brinda información morfológica y estructural de la muestra. Se logró la visualización con buena resolución de las MPs (con y sin sonda), con una escala de 20 a 200 nm y una magnificación de 30000X, 50000X, 85000X, 140000X y 250000X. Igualmente, para los liposomas preformados (con y sin sonda), se utilizó una escala de 200 a 500 nm, con un aumento de 3000X, 7000X, 12000X, 20000X y 30000X.

A partir de las imágenes adquiridas, se observaron tamaños nanométricos y estructuras esféricas (**Tabla 15**) de las nanoestructuras-libres y nanoestructuras-sonda. A su vez, se distinguió diferencia de tamaño y tipo de distribución del tamaño (nanopartículas del mismo sistema, de tamaño similar o variable) entre las nanoestructuras libres y co-asociados a la sonda imagenológica (**Figuras 28** y **29**).

En el caso de los LPS-libres y LPS-sonda se observa gran variabilidad en el tamaño y no es posible observar cambios que indiquen la co-asociación. Sin embargo, los tamaños observados se correlacionan con los datos obtenidos previamente por DLS. Nótese que la distribución de tamaño es muy amplia y esto puede deberse a la presencia de exceso de LPS en la preparación. El sistema de secado de muestra y vacío de la técnica también puede afectar la visualización de la co-asociación. A futuro está previsto realizar un crio-TEM de los nanosistemas.

En el caso de las MPs, al ser incubadas con la sonda se observan morfologías más pequeñas, un efecto de contracción, modificaciones en la morfología al co-asociarse a moléculas han sido reportados en la literatura previamente (Glisoni, 2014). Dicho resultado es observado principalmente para los nanosistemas F127 y T908.

Tabla 15. Tamaños de las nanoestructuras libres y co-asociados a la sonda, mediante TEM.

Nanosistemas	Diámetro (nm)	Distribución de tamaño Promedio ± DE (nm)
LPS	150 a 475	222 ± 86
LPS-sonda	137 a 478	221 ± 107
F127	61 a 523	283 ± 145
F127-sonda	14 a 49	32 ± 10
T1307	49 a 209	131 ± 54
T1307-sonda	39 a 265	122 ± 69
T908	34 a 126	81 ± 25
T908-sonda	26 a 98	68 ± 22



Figura 28. Micrografías TEM de sonda-libre (50 μg/mL) (A), LPS-libre (B) y LPS-sonda (50 μg/mL)(C). Aumento: 30000X. Barra de escala: 200 nm. No se observa la sonda-libre por TEM.



Figura 29. Micrografías TEM de MPs libres (10% p/v): F127 (A), T1307 (B) y T908 (C). Micrografías TEM de MPs-sonda (10% p/v, 50 μ g/mL): F127-sonda (D), T1307-sonda (E) y T908-sonda (F). Aumento: 85000X. Barra de escala: 100 nm.

5.2.3 Morfología de los nanosistemas por Microscopía de Fuerza Atómica

Asimismo, se estudió la morfología de las nanoestructuras libres, nanoestructuras-sonda y sonda libre, mediante AFM. Las MPs-libres y MPs-sonda fueron observadas, realizando una dilución 1/300, utilizando un soporte de sílice. Los LPS-libres y LPS-sonda-columna se observaron utilizando soporte de mica. De esta forma, se complementa la caracterización de los nanosistemas libres y co-asociados a la sonda de imágen, brindando información estructural y morfológica de los mismos en profundidad.

En las Figuras 30, 31 y 32, se observan las imágenes obtenidas por AFM, de la sonda libre, los LPS-libres y MPs-libres y co-asociados a la sonda. Se observaron diferencias morfológicas entre las nanoestructuras-libres y las nanoestructuras-sonda. La sonda observada por AFM (soporte mica) mostró estructuras lineales, con picos de altura variable, hasta 4,3 nm. Los LPSlibres tienen una estructura en forma similar a una roseta, esféricos, con un ancho de hasta 400 nm y altura de 238 nm (Figura 28, C). Los LPS-sonda, mostraron estructuras más pequeñas que los LPS-libres, en el entorno de 25 nm, de centro esférico y en los bordes rodeados de estructuras de altura variable con forma de picos. A su vez, se puede observar las variaciones de la amplitud en los diferentes sistemas. En la Figura 30, se observa también los gráficos de amplitud de la sección longitudinal en el eje de las Y, de la primera estructura. En el mismo se observa la diferencia de voltaje entre la primera parte de la estructura y la segunda, denotando diferente composición de material. En la Figura 31, se observan las imágenes de la sonda libre, T908-libre y T908-sonda (10 % p/v, 50 µg/mL), dilución 1:300. Se observó una reducción de tamaño de las T908-sonda en comparación con T908-libres, presentando las primeras un diámetro de hasta 212 nm y las segundas entre 319 y 616 nm. A su vez, se observó diferencias de alturas entre ambos sistemas, siendo casi el doble (hasta 70 nm) para el sistema co-asociado con la sonda.

En cuanto a las MPs a base de F127 y T1307, libres y co-asociadas a la sonda (10% p/v, 50 μ g/mL), dilución 1:300 (**Figura 32**), se puede destacar que la morfología de los sistemas coasociados, presenta en la región central de las estructuras un núcleo esférico y en la periferia estructuras similares a pétalos. Éstas se diferencian notoriamente de los sistemas-libres, sugiriendo la ubicación de la sonda en la superficie de las mismas. A su vez, esta diferencia de composición, se observó en los gráficos de amplitud que los sistemas cargados presentan un voltaje característico y repetitivo a lo largo de los sistemas. Por lo tanto, en las microscopías por AFM, se observó diferencias morfológicas relevantes, tanto de amplitud, como de tamaño de partícula, entre los nanosistemas-libres y nanosistemas indicando también la co-asociación.

Es de destacar, que en los LPS-sonda y T908-sonda (10% p/v), se evidenció una contracción de los sistemas al compararlos con los nanosistemas-libres. En las MPs (10% p/v): F127-sonda y T1307-sonda, se apreció una región central rodeada de estructuras de diferente composición. Cabe mencionar, que se observaron diferencias al cambiar el soporte de mica o sílice, en cuanto a la morfología de la sonda libre (**Figura 30** y **31**, **A**). A su vez, el estudio de las MPs en soporte sílice pudo llevarse a cabo, no así en una primera instancia en mica. Por lo tanto, está planificado realizar microscopía AFM de MPs, en soporte de mica modificando la dilución a modo tratar de unificar el mismo soporte para los nanosistemas en estudio.



Figura 30. Microscopías AFM de fase (A), topográficas 3D (B) y gráfico de amplitud (C), de sondalibre, LPS-libre y LPS-sonda (soporte de mica).



Figura 31. Microscopías AFM de fase (A), topográficas 3D (B) y gráfico de amplitud (C), de sondalibre (50 μg/mL), F127-libre y F127-sonda (10% p/v, 50 μg/mL), dilución 1:300 (soporte de sílice).



Figura 32. Microscopías AFM de fase (A), topográficas 3D (B) y gráfico de amplitud (C), de T1307libre (10% p/v), T1307-sonda (10 % p/v, 50 μ g/mL), T908-libre (10 % p/v) y T908-sonda (10 % p/v, 50 μ g/mL), dilución 1:300 (soporte de sílice).

5.2.4 Estabilidad en el tiempo

El estudio de estabilidad *in vitro* a 4°C de (i) sonda-libre (50 µg/mL) y (ii) nanosistemas-sonda: LPS-sonda, T1307-sonda y T908-sonda (10% p/v, 50 µg/mL), se realizó hasta las 72 horas, mientras que para F127-sonda (10% p/v, 50 µg/mL), se realizó hasta las 24 horas, por la posterior desestabilización del sistema que ya se evidenciaba. La estabilidad se estudió por DLS, a través del seguimiento de los parámetros críticos de control de calidad de los nanosistemas: Z-average, diámetro hidrodinámico, PDI y potencial Zeta, como se observa en los resultados desplegados en las **Tablas 16 a 18.** Los LPS-sonda, se analizaron sin purificación por columna, teniendo en cuenta el almacenamiento de la sonda imagenológica, previo a su administración. Como se observa en la **Tabla 16**, el Z-potencial de la formulación se mantiene estable, a lo largo del tiempo, al igual que el tamaño y el PDI.

Tabla 16. Z-average, diámetro hidrodinámico (D_h), índice de polidispersión (PDI) y potencial Zeta (Zpotencial) a 0, 24 y 72 horas, de LPS-sonda (50 μ g/mL) en agua-ultrapurificada, determinados por DLS, a 25 °C, en el plan estabilidad. Los cálculos se expresan como la media de cada parámetro ± DE.

Sistema (25 °C)	Tiempo (h)	Z-average (nm)	$D_h(\mathbf{nm})$ (±DE)	% Intensidad (±DE)	PDI (±DE)	Z-Potencial (mV) (±DE)
	0	236,4 (8,2)	263,9 (8,4)	100,0 (0,0)	0,601 (0,072)	-31,3 (0,5)
LPS-sonda	24	230,3 (6,4)	328,6 (78,0)	100.0 (0.0)	0,583 (0,071)	-30,7 (0,6)
	72	257,3 (21,0)	324,8 (52,9)	100,0 (0,0)	0,543 (0,129)	-26,1 (1,2)

Las MPs-sonda a base de poloxaminas (10% p/v), mostraron un PDI cercano a 0,7 indicando inestabilidad a las 24 horas, manteniéndose en el mismo rango hasta las 72 horas, como se observa en la **Tabla 17**.

Las T908-sonda (10% p/v), al cabo de las 72 horas se observó un tamaño de 495,4 \pm 52,6 nm y de 7,9 \pm 1,7 nm, mientras que hasta las 24 horas mostraron tamaños de hasta 13,1 \pm 0,2 nm. Las T1307-sonda (10% p/v), mostraron una distribución de tamaño estable en el tiempo, de 215,6 \pm 4,3 nm y 8,9 \pm 3,0 nm a las 72 horas (**Tabla 17**).

Tabla 17. Diámetro hidrodinámico (Dh), índice de polidispersión (PDI) y potencial Zeta (Z-potencial) como parámetros de control en la estabilidad in vitro de las MPs (F127, T1307 y T908, 10% p/v) co-asociadas a la sonda (50 μ g/mL) a tiempos: 0, 24 y 72 horas, determinados por DLS, en agua-ultrapurificada y PBS, a 25°C. Los cálculos se expresan como la media de cada parámetro \pm DE.

Nota: NA, No es a	idecuado medir	el potencial	Zeta en	PBS, d	debido a	la oxidació	on de las	celdas	de Z-
potencial con el bu	ıffer.								

MD.		Р	ico 1		Pico 2		Z-	
MPS (10 % p/v)	Tiempo (h)	$D_h(\mathbf{nm})$ (± D E)	% Intensidad (± DE)	<i>Dh</i> (nm) (± DE)	% Intensidad (± DE)	PDI (± DE)	Potencial (mV) (± DE)	
F127-sonda	0	31,8 (7,3)	100,0 (0,0)	-	-	0,447 (0,058)	-3,0 (0,8)	
(H ₂ O)	24	73,4 (26,1)	100,0 (0,0)	-	-	0,572 (0,079)	-3,8 (0,5)	
	0	24,0 (3,2)	81,2 (8,8)	170,5 (58,0)	18,8 (6,0)	0,459 (0,080)	NA	
T1307-sonda (PBS)	24	237,2 (5,7)	89,6 (0,8)	8,6 (2,1)	10,4 (0,8)	0,797 (0,099)	NA	
	72	215,6 (4,3)	91,6 (1,6)	8,9 (3,0)	8,4 (1,0)	0,549 (0,081)	NA	
	0	10,7 (0,1)	93,6 (1,3)	166,4 (9,1)	6,4 (0,4)	0,447 (0,018)	NA	
T908-sonda (PBS)	24	13,1 (0,2)	100,0 (0,0)	-	-	0,614 (0,052)	NA	
-	72	495,4 (52,6)	89,8 (4,3)	7,9 (1,7)	10,2 (1,5)	0,666 (0,055)	NA	

F127-sonda (10% p/v), desplegó aproximadamente el doble de tamaño de partícula a las 24 horas (**Tabla 17**), mientras que el PDI y el Z-potencial se mantuvieron dentro de los intervalos, en el transcurso del tiempo. La sonda-libre mantuvo un tamaño a lo largo de las 72 horas, presentando un potencial zeta en el rango de -11,8 a -21,4 mV, debido a su estructura y tamaño (datos no mostrados).

Tabla 18. Z-average, diámetro hidrodinámico (D_h), índice de polidispersión (PDI) y potencial Zeta (Zpotencial) de la sonda-libre (50 μ g/mL), determinados por DLS, en agua-ultrapurificada a 25 °C, en el plan estabilidad. Los cálculos se expresan como la media de cada parámetro ± DE.

Sistema (25 °C)	Tiempo (h)	Z-average (nm)	$D_h(\mathbf{nm})$ (±DE)	% Intensidad (±DE)	PDI (±DE)	Z-Potencial (mV) (±DE)
	0	12,6 (1,8)	27,6 (3,4)	100,0 (0,0)	0,415 (0,093)	-12,8 (1,0)
Sonda libre	24	13,6 (3,0)	14,6 (3,0)	100.0 (0.0)	0,584 (0,087)	-21,4 (1,0)
	72	14,2 (2,9)	15,0 (3,2)	100,0 (0,0)	0,590 (0,047)	-11,8 (0,4)

5.2.5 Ensayo de liberación in vitro

Se estudió la liberación de la sonda-libre y de dos nanosistemas-sonda: LPS-sonda y T908sonda. Se realizó una curva de calibración de la sonda libre (**Tabla 19** y **Figura 33**), midiendo absorbancia a 650 nm, obteniéndose una muy buena correlación entre concentración y absorbancia (y = 0.0157 x - 0.0021; $\mathbb{R}^2 = 1$). Debido a la baja concentración de sonda, se estudió la relación masa de la sonda (μ g) en función del volumen final, obteniendo entonces, una relación de 13,3 para una masa de 100,0 μ g de sonda en 7,5 mL de volumen final, quedando entonces, las mediciones de absorbancia dentro de los intervalos inferiores y superiores de la curva de calibración de la misma. Por lo tanto, se seleccionó una co-asociación final de la sonda de 50 μ g/mL. Siendo el volumen interior de la membrana de diálisis de 2 mL y volumen exterior de 7,5 mL. **Tabla 19.** Datos obtenidos de la concentración de la sonda vs absorbancia (650 nm) para la construcción de la curva de calibración de la sonda, en agua-ultrapurificada.

Masa Sonda (µg)	Concentración sonda (µg/mL)	Abs 650 nm	Relación masa sonda/vol. final (µg/mL)
0,0	0,0	0,0	0,0
2,5	5,0	0,076	5,0
5,0	10,0	0,154	10,0
10,0	20,0	0,314	20,0
20,0	40,0	0,627	40,0
30,0	60,0	0,936	60,0
40,0	80,0	1,261	80,0



Figura 33. Curva de calibración de sonda-libre. Concentración ($\mu g/mL$) en función de absorbancia medida a 650 nm.

En primer lugar, se estudió la liberación de la sonda-libre como control de liberación adecuada de la misma, a través del poro de la membrana de diálisis (cut off 14 kDa) y se observó una liberación del 18,2% de la sonda a los 15 minutos, mientras que se encontró liberado aproximadamente un 43,5% de la sonda a las 24 h. Posterior a este tiempo, se realizó un recambio de medio de liberación exterior, para evitar la saturación del mismo y mantener las

condiciones *sink* del ensayo. El % de sonda liberado acumulado a las 3 h del recambio fue de 55,5% (ver **Figura 34**). Podemos concluir que se libera aproximadamente hasta el 60% de la sonda entre las 24 y las 48 h de tiempo. Asimismo, LPS-sonda mostró un perfil de liberación más lento que la sonda, con un 2,5% de sonda liberada a los 30 minutos. A las 17 h, el porcentaje acumulado de sonda liberada fue de 9%, siendo de 9,7% a las 24 h. Posterior al recambio de medio a las 27 horas, la liberación de la sonda alcanzó el 10% final (ver **Figura 34**). T908-sonda (10% p/v, 50 μg/mL), mostró un perfil de liberación de sonda muy lento (0,3% a los 30 minutos), llegando a su máximo de liberación del 3,1% a las 3 h, aún posterior al recambio total del medio exterior (24 horas) (ver **Figura 34**).

Téngase en cuenta que las MPs en este ensayo sufren una dilución 1:5 en el medio de liberación manteniendo su estructura micelar, por no encontrarse por debajo de la CMC (2,7% p/v final). Al comparar el porcentaje liberado acumulado de T908-sonda y sonda-libre, se observó una difusión del 52,3% de la sonda-libre, en comparación con la sonda co-asociada a T908 a las 27 horas, este retraso de tiempos favorecería al targeting pasivo con la posterior entrega de la sonda en el microambiente tumoral.



Figura 34. Perfiles de liberación in vitro de la sonda-libre, LPS-sonda y T908-sonda (10 % p/v), a intervalos pre-establecidos de tiempo: 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 20, 24, 25 y 27 horas. Todas las preparaciones se ensayaron a una concentración de 50 µg/mL de sonda.

Nota: no se continuó el ensayo a tiempos mayores, ya que no se observó cambios en la absorbancia, manteniéndose el % de liberación de la sonda, a pesar de los recambios de medio pertinentes que aseguraron las *condiciones sink* del ensayo.

Según lo esperado, los resultados para el LPS-sonda y MPs-sonda muestran una liberación de primer orden y no un efecto Burst (*o meseta*). Asimismo, este perfil hace pensar también acerca de la existencia de la co-asociación y cómo podrían comportarse estos sistemas en un entorno biológico/tumoral.

5.3. Caracterización biológica

5.3.1 Captación celular por Microscopía Confocal

Las imágenes obtenidas por Microscopía Confocal de la sonda libre y las nanoestructurassonda, se observan en las **Figuras 35**, **36** y **37**, respectivamente. Las células A20, se incubaron por 15, 30 y 60 minutos con la sonda-libre, LPS-sonda y MPs (10% p/v): F127-sonda, T1307sonda y T908-sonda. El marcador nuclear (Hoechst 33342), el marcador endosomal temprano (Rab 5-Alexa 488) y el generador de imagen de la sonda (Alexa 647), se visualizaron con láseres 405 (azul), 488 (verde) y 640 nm (magenta), respectivamente. Las imágenes observadas en las **Figuras 35**, **36** y **37**, son el resultado de la superposición de las señales obtenidas a 405, 488 y 640, procesamiento realizado con el software ImageJ.

Se observó captación en la línea celular A20, tanto de la sonda-libre como de LPS-sonda y MPs-sonda. A los 15 minutos, se apreció la co-localización de la sonda (libre y co-asociada a las nanoestructuras) con el endosoma, observándose la superposición de señales con color blanco. La acumulación de la sonda en la célula parece notarse más rápido para los nanosistemas T1307-sonda y T908-sonda (**Figura 35**).

A los 30 minutos, se observó agrupamientos de la sonda más notorios en los nanosistemas en comparación a la sonda-libre. Para los nanosistemas LPS-sonda esto podría explicar el patrón de roseta observado por TEM. A los 60 minutos, los nanosistemas se visualizaron de forma más acentuada, en comparación con la sonda-libre. Principalmente en el nanosistema F127-sonda. Se enfatiza que han sido seleccionadas las imágenes más representativas.

Por lo anterior, se destaca que la co-asociación de la sonda con las nanoestructuras podría estár compartiendo la vía endosomal como ingreso a las células, favorenciendo a su vez la captación en las células.

105



Figura 35. Imagen de Microscopía Confocal de células A20, incubadas 15 minutos con la sonda-libre, LPS-sonda y MPs (10% p/v): F127-sonda, T1307-sonda y T908-sonda.



Figura 36. Imagen de Microscopía Confocal de células A20, incubadas 30 minutos con la sonda-libre, LPS-sonda y MPs (10% p/v): F127-sonda, T1307-sonda y T908-sonda.


Figura 37. Imagen de Microscopía Confocal de células A20, incubadas 60 minutos con la sonda-libre, LPS-sonda y MPs (10% p/v): F127-sonda, T1307-sonda y T908-sonda.

5.3.2 Estabilidad en suero fetal bovino

La estabilidad de LPS-sonda-c en SFB, se realizó a las 0,5, 2 y 24 horas. Los resultados obtenidos de % IF de cada rango de masa molecular, se aprecian en la **Tabla 20** y **Figura 38**. El mayor % IF tanto de la sonda-libre como LPS-sonda, se obtuvo en la fracción correspondiente a masas mayores e iguales a 30 kDa. Esta relación de % IF y masa, se mantiene en todos los tiempos de incubación. Al cabo de 24 h, se observa una diferencia en la distribución de % IF entre la fracción de 10 a 30 kDa y la menor a 10 kDa, al comparar la sonda libre y LPS-sonda. En la estabilidad de la sonda-libre, el % de intensidad de fluorescencia a las

24 h fue de 14,8% en la fracción de 10 a 30 kDa, mientras que el % de intensidad de fluorescencia fue de 3,3% en la fracción menor a 10 kDa. En cuanto a la estabilidad de LPSsonda, se obtuvo un % de intensidad de fluorescencia de 7,6 %, tanto para la fracción de 10 a 30 kDa, como para la menor a 10 kDa.

Tabla 20. Estudio de estabilidad en suero fetal bovino (SFB) de sonda-libre y LPS-sonda a 0,5, 2 y 24 h de incubación, medido en % de intensidad de fluorescencia (% IF) en los diferentes rangos de masa molecular (\geq 30 kDa, 10 a 30 kDa y < a 10 kDa).

		≥ 30 kDa	10 - 30 kDa	< 10 kDa		
Tiempo (h)	Muestra		% IF			
0.5	Sonda	97,6	1,5	0,8		
0,5	LPS-sonda-c	91,1	5,5	3,5		
2	Sonda	96,1	2,6	1,4		
Ζ	LPS-sonda-c	89,5	4,0	6,5		
24	Sonda	81,9	14,8	3,3		
24	LPS-sonda-c	84,8	7,6	7,6		
100 9(80 10 80 10 80 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10	nda 0,5 h option 5 onto	all Some Some	LAN BANKA AN	 ≥ 30 kDa 10 - 30 kDa < 10 kDa 		

Figura 38. Gráfico de estabilidad en suero fetal bovino (SFB) de sonda-libre y LPS-sonda a 0,5, 2 y 24 horas de incubación, medido en % de intensidad de fluorescencia (% IF) en los diferentes rangos de masa molecular (≥ 30 kDa, 10 a 30 kDa y < a 10 kDa).

En base a los resultados obtenidos, se observa que el comportamiento de la sonda-libre y LPSsonda, es similar, dónde no es observable una marcada fragmentación de la sonda, debido a los bajos % de IF, en todos los tiempos analizados. Por lo tanto, se puede inferir una buena estabilidad de la sonda co-asociada a los LPS.

Con las MPs no pudieron realizarse estos estudios debido a que el sistema coloidal generado resulta ser lo suficiente estable para no poder utilizar este tipo de filtros. El estudio por exclusión molecular en HPLC podría ser una opción para evaluar a futuro, si el nanosistema resiste la dilución causada por la metodología.

5.3.3 Biodistribuciones e imagenología molecular

LPS-sonda y sonda-libre

Los estudios de biodistribución de LPS-sonda-c (LPS-sonda separados por columna) en ratones BALB/c portadores de linfoma a 0,5, 2 y 24 horas post-inyección, se resumen en la **Tabla 21.** La biodistribución de LPS-sonda-c mostró señal de fluorescencia a nivel renal y hepático principalmente. Al comparar LPS-sonda-c con sonda-libre, no se observan diferencias significativas a nivel de eliminación, 2 h post-inyección. Resultó interesante que no se observe una diferencia significativa entre la captación de fluorescencia a nivel hepático, de LPS-sondac en relación con sonda-libre, ya que hubiera sido esperable que los LPS tengan mayor afinidad por dicha vía de eliminación y que la fluorescencia en dicho órgano sea más notoria (Kingsley, 2006).

También se observa tanto para la sonda-libre como para LPS-sonda-c, que hay principalmente señal a nivel renal ($1041,8 \pm 380,1$ y $884,4 \pm 283,1$ ROI, respectivamente) y algo de captación a nivel tumoral sin mostrar diferencias significativas entre los sistemas estudiados 2 horas post-inyección (14,3% y 12,1% ROI, respectivamente). Se observan diferencias significativas

mediante el análisis entre los tiempos 0,5 y 2 horas post-inyección de LPS-sonda-c (p=0,02). En cuanto a las relaciones tumor/sangre, se mantienen de forma similar en comparación sondalibre y LPS-sonda (**Figura 40**). Lo mismo sucede con las relaciones tumor/músculo, tumor/riñones y tumor/hígado, al comparar LPS-sonda-c con la sonda libre. Por lo tanto, al no ser significativamente diferentes los resultados de sonda co-asociada a LPS y de sonda libre (**Figuras 39** y **40**) se puede inferir que la co-asociación no promueve cambios en el comportamiento biológico. Asimismo, las relaciones ya mencionadas tienden a disminuir en el tiempo para el sistema de la sonda co-asociada a LPS.

Tabla 21. Biodistribución LPS-sonda-columna a 0,5, 2, 24 h post inyección y control con sonda-libre a 2 h post-inyección en BALB/c con tumor de linfoma inducido A20 (n=5). Relaciones tumor/órgano a 0,5, 2, 24 h post inyección. Valores informados en ROI.

Órgano/Tejido	0,5 h			2	2 h			24 h			2 h control		
						R	OI						
Sangre	284,7	±	134,6	207,6	±	74,1	281,7	±	11,8	210,4	±	3,7	
Tiroides	256,9	±	109,2	232,3	±	91,4	188,0	\pm	2,1	210,4	±	17,3	
Cerebro	297,2	±	63,4	325,5	±	40,8	237,9	±	11,2	297,5	±	13,3	
Hueso	611,4	±	214,3	427,9	±	84,1	209,4	±	12,4	402,0	±	58,7	
Bazo	317,3	±	92,3	289,4	±	6,8	238,1	±	22,2	377,1	±	74,5	
Hígado	743,8	±	60,0	642,0	±	18,9	397,9	±	48,1	653,9	±	31,0	
Riñones	935,3	±	192,2	884,4	±	283,1	719,2	±	219,6	1041,8	±	380,1	
Pulmón	698,7	±	359,0	388,8	±	126,1	212,6	±	22,3	495,8	±	139,8	
Corazón	330,9	±	173,2	253,7	±	77,8	166,9	±	25,6	255,9	±	27,4	
Músculo	540,5	±	242,9	311,6	±	100,4	147,2	±	20,4	399,6	±	68,8	
Tumor	1042,8	±	65,9	544,5	±	139,1	338,1	±	30,6	723,0	±	242,9	
	Captación relación Tumor/órgano												
Tumor/sangre	4,18	±	2,21	2,75	±	0,88	1,00	±	0,29	3,43	±	1,09	
Tumor/riñones	1,15	±	0,31	0,63	±	0,06	0,51	±	0,20	0,70	±	0,02	
Tumor/pulmones	1,75	±	0,99	1,18	±	0,31	1,61	±	0,32	1,45	±	0,08	
Tumor/hígado	1,41	±	0,20	0,84	±	0,20	0,85	±	0,08	1,12	±	0,42	

0,17

 \pm

2,35

1,89

0,93

 \pm

0,54

 \pm

1,78

1,10

 \pm

Tumor/músculo

2,18



Figura 39. Gráfico de biodistribución de LPS-sonda-columna (LPS-sonda-c) a 0,5, 2, 24 horas post inyección, control con sonda-libre, a 2 h post-inyección en ratones BALB/c con tumor de linfoma inducido A20 (n=5).

Nota: *Valores significativamente diferentes a 2 h post-inyección LPS-sonda-c y 0,5 h LPS-sonda-c (p=0,02). ^{ns} No hay significancia estadística entre 2 h post-inyección LPS-sonda-c y sonda-libre.



Figura 40. Gráficos de relación tumor/sangre, tumor/riñones, tumor/hígado y tumor/músculo. Biodistribución de LPS-sonda-c a 0,5, 2, 24 h post inyección, con control sonda-libre, a 2 h postinyección en ratones BALB/c con tumor de linfoma inducido A20 (n=5).

MPs-sonda y sonda-libre

Los estudios de biodistribución de T908-sonda (10% p/v) se resumen en la **Tabla 22.** Los estudios a 0,5, 2 y 24 h post-inyección mostraron una rápida distribución en ratones portadores de linfoma (**Figura 41**). La señal de fluorescencia fue superior en los riñones (160,31 ± 93,98, $41,78 \pm 7,32$ y 25,40 ± 2,80 a 0,5, 2 y 24 horas respectivamente) y en el hígado (92,49 ± 10,21, $46,70 \pm 17,62$ y 20,44 ± 4,14 a 0,5, 2 y 24 horas respectivamente), comparado con el resto de los órganos. Se observó una diferencia significativa en la señal de fluorescencia a las 2 h post-

inyección de T908-sonda (10 % p/v) en comparación con la sonda-libre, en riñones (41,78 ± 7,32 y 198,47 ± 81,93, respectivamente) e hígado (46,70 ± 17,62 y 72,82 ± 8,00, respectivamente. A su vez, como se muestra en la **Figura 42**, a las 2 h post-inyección, T908-sonda (10% p/v) presentó mayor relación tumor/músculo (2,36 ± 0,67) y tumor/riñones (1,49 ± 0,67), en comparación con la sonda-libre (1,69 ± 0,79 y 0,56 ± 0,34, respectivamente), aunque no significamente diferentes (p=0,2). La relación tumor/sangre, 2 h post-inyección, fue considerablemente mayor en la sonda-libre (5,17 ± 1,68) en comparación con T908-sonda (10 % p/v) (3,99 ± 1,25), aunque nuevamente significativamente no-diferentes (p = 0,5).

Los resultados de las biodistribuciones mostraron mayor captación renal en comparación con los demás órganos, en la mayoría de los tiempos estudiados, lo cual indica que T908-sonda (10% p/v) se eliminaría preferentemente por vía urinaria. Dicho comportamiento es esperado, debido a su PM es ~25 kDa y se encuentra ampliamente descrita su eliminación renal (Stolnik, 1995, Lecot 2020c). A su vez, se observó menor eliminación renal a las 2 h post-inyección de T908-sonda (10% p/v) en comparación con la sonda-libre, indicando que T908-sonda se mantiene más tiempo en el organismo, consistente con su mayor circulación sistémica que ha sido ampliamente descrito (Glisoni 2014, Lecot 2020c). Dicho resultado, es consecuente con la obtención de una relación tumor/sangre menor en T908-sonda (10% p/v), respecto a la sonda-libre, indicando que T908-sonda permanecería más tiempo en circulación que la sondalibre. La relación tumor/hígado es mayor en T908-sonda lo cual es esperable, debido a que las MPs presentan como característica cierta eliminación hepática (Movassaghian, 2015). T908sonda en ratones BALB/c portadores de linfoma, presentó una adecuada eliminación renal y una captación tumoral significativa respecto al resto de los tejidos. Las diferencias entre T908sonda y sonda-libre, fueron significativas en cuanto a la eliminación renal y el tiempo de circulación en el animal. Por lo tanto, se puede sugerir que la co-asociación de la sonda a MPs a base de T908 (10 % p/v), por un lado, favorece la entrega activa debido a la interacción de la

sonda con el receptor PTK7 y, por otro lado, una entrega pasiva por el tamaño nanométrico de los nanosistemas micelares, propiamente dichos.

Un seguimiento a tiempos mayores de los nanosistemas co-asociados nos permitiría poder confirmar el aumento del tiempo de circulación. Un mayor número de animales también sería adecuado para estudios futuros dado que las variaciones entre datos son grandes. A su vez una marcación con radioisótopos como ⁶⁷Ga, reportado previamente, podría ser adecuada para tener mayor sensibilidad en la metodología y menos interferencia de fondo debido a la autofluorescencia de tejido y restos de alimento en órganos como intestino y estómago.

Tabla 22. Biodistribución de T908-sonda (10% p/v) a 0,5, 2, 24 horas post inyección y control con sonda-libre a 2 h post-inyección en BALB/c con tumor de linfoma inducido A20 (n=4). Relaciones tumor/órgano a 0,5, 2, 24 h post inyección.

Órgano/Tejido	0,5 h			2	2 h			24 h			2 h control		
						R	OI						
Sangre	33,69	±	11,34	16,75	±	2,29	4,76	±	0,44	17,66	±	4,50	
Tiroides	50,10	±	14,29	28,16	\pm	17,00	2,30	\pm	0,31	50,51	\pm	19,51	
Cerebro	26,82	±	2,10	24,16	\pm	7,59	17,04	\pm	3,11	49,51	±	7,34	
Hueso	70,71	±	21,74	26,67	±	6,00	12,63	±	0,30	63,97	±	0,52	
Bazo	23,83	±	7,27	10,79	±	1,00	7,07	±	1,59	35,95	±	0,38	
Hígado	92,49	±	10,21	46,70	±	17,62	20,44	±	4,14	72,82	±	8,00	
Riñones	160,31	±	93,98	41,78	±	7,32	25,40	±	2,80	198,47	±	81,93	
Pulmón	76,74	±	20,90	27,48	±	3,86	20,64	±	2,26	89,69	±	0,66	
Corazón	30,79	±	7,61	14,52	±	4,39	7,22	±	2,39	40,72	±	9,35	
Músculo	44,96	±	8,84	26,33	±	0,96	16,51	±	1,50	61,53	±	16,35	
Tumor	136,06	±	31,49	55,03	±	18,30	29,31	±	0,79	97,54	±	20,70	
		Relación captación Tumor/órgano											
Tumor/sangre	4,49	±	1,41	3,99	±	1,25	6,09	±	0,55	5,17	±	1,68	
Tumor/riñones	0,89	±	0,35	1,49	±	0,67	1,17	±	0,17	0,56	±	0,34	
Tumor/pulmones	1,83	±	0,48	1,91	±	1,00	1,43	±	0,13	1,09	±	0,22	
Tumor/hígado	1,47	±	0,26	0,83	±	0,15	1,47	±	0,30	1,36	±	0,43	
Tumor/músculo	1,96	±	0,74	2,36	±	0,67	1,78	±	0,17	1,69	\pm	0,79	



Figura 41. Gráfico de biodistribución de T908-sonda (10% p/v) a 0,5, 2, 24 h post inyección y control con sonda-libre a 2 h post-inyección en ratones BALB/c con tumor de linfoma inducido A20 (n=5). Nota: *Valores significativos 0,5 y 2 horas post-inyección de T908-sonda (p=0,02). ^{ns} No hay significancia estadística entre 2 h T908-sonda y sonda-libre (p=0,2).



Figura 42. Gráficos de relación tumor/sangre, tumor/riñones, tumor/hígado y tumor/músculo. Biodistribución de T908-sonda (10% p/v) a 0,5, 2, 24 h post inyección y control con sonda-libre a 2 h post-inyección en BALB/c con tumor de linfoma inducido A20 (n=5).

Para el estudio *in vivo* del comportamiento de la sonda libre, T908-sonda (10 % p/v) y LPSsonda, se realizaron imágenes ex vivo debido a que la autofluorescencia de tejidos y pelaje del animal no permitían realizar el estudio con animal entero.

Los ratones BALB/c, inoculados con células A20, fueron sacrificados mediante dislocación cervical, a 0,5, 2 y 24 horas post-inyección. Los órganos fueron disecados, como se muestra en la **Figura 43**. Las imágenes que se observan a continuación en las **Figuras 44** a **47**, fueron tomadas ex vivo con el equipo In-Vitro MS FX Pro (Bruker) del Centro de Investigaciones

Nucleares. Las imágenes se adquirieron a los tiempos anteriormente mencionados en modo de rayos-X y fluorescencia (con un láser de excitación de 650 nm (λ_{Ex} 650)).



Figura 43. Esquema de los órganos disectados de ratón BALB/c con tumor de linfoma inducido A20, para su posterior toma de imágenes ex vivo con el equipo In-Vitro MS FX Pro (Bruker).

La captación del sistema LPS-sonda a la media hora (**Figura 44**), es mayor a nivel del tumor en comparación con el resto de los órganos. A las 2 horas post-inyección, se observa principalmente captación a nivel tumoral, de hígado y vejiga (**Figura 45**).

En el sistema T908-sonda (10 % p/v), se observó una captación a nivel renal y tumoral a la media hora post-inyección, observándose a las dos horas una captación sustancialmente mayor en tumor en comparación con el resto de los órganos, como se muestra en la **Figura 46 y 47**. Dicha captación a nivel renal es la esperada para MPs debido a su filtración a nivel renal (Lecot, 2020c). La captación en intestino y estómago puede estar relacionada a la ingesta de ración con alto contenido de componentes que aumenten la señal de fluorescencia (Lecot, 2020c).



Figura 44. Imagen ex vivo de los órganos disecados en ratón BALB/c con tumor de linfoma inducido A20, 0,5 horas post inyección de LPS-sonda, tomada con el equipo In-Vitro MS FX Pro (Bruker). En círculo amarillo y con la letra T, se indica el tumor.



Figura 45. Imagen ex vivo de los órganos disecados en ratón BALB/c con tumor de linfoma inducido A20, 2 h post inyección de LPS-sonda (A) y control de sonda-libre (B), tomada con el equipo In-Vitro MS FX Pro (Bruker). En círculo amarillo y con la letra "T", se indica el tumor, en naranja y con la letra "V" vejiga y con "H" hígado.



Figura 46. Imagen ex vivo de los órganos disecados en ratón BALB/c con tumor de linfoma inducido A20, 0,5 horas post inyección de T908-sonda (10% p/v), tomada con el equipo In-Vitro MS FX Pro (Bruker). En círculo amarillo, con la letra "T", se indica el tumor y en naranja y con la letra "R" riñones.



Figura 47. Imagen ex vivo de los órganos disecados (en A se muestran todos los órganos, en B se extrae de la misma imagen intestino y estómago) en ratón BALB/c con tumor de linfoma inducido A20, 2 h post-inyección de T908-sonda (10% p/v), tomada con el equipo In-Vitro MS FX Pro (Bruker). En círculo amarillo, con la letra "T", se indica el tumor y en gris, con la letra "I" intestino y con la "E" estómago.

5.3.4 Farmacocinética

En base a los resultados obtenidos hasta el momento, el estudio farmacocinético fue realizado para el sistema T908-sonda (10% p/v). Se evaluó la sonda libre (fórmula 0) y T908-sonda (10% p/v) (Fórmula 1) en ratones BALB/c normales (n=5), a 0,08, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 6, 18, 24 y 48 h post-inyección. Se obtuvo un modelo farmacocinético bicompartimental (**Figura 48**) con eliminación lineal. Obteniéndose el volumen del compartimiento central (V1), volumen del compartimiento periférico (V2), *clearance* intercompartimental (Q) y *clearance* de eliminación (CL) (**Tabla 23**). Se obtuvo un volumen de distribución estacionario (VSS) significativamente diferente T908-sonda y sonda-libre, de 72,0 \pm 13,2 mL y 39,7 \pm 13,04 mL, respectivamente. A su vez, el tiempo medio de residencia (MRT) en el organismo de T908-sonda (10% p/v) fue de 6,0 \pm 1,8 horas y para la sonda-libre de 2,9 \pm 1,0 horas.

T908-sonda afecta el volumen de distribución periférico, permaneciendo más tiempo en el organismo, respecto a la sonda-libre. Este tipo de comportamiento es esperable en las micelas poliméricas, ya que, por su tamaño, pueden ser reabsorbidas a nivel sanguíneo. Adecuándose a un modelo bicompartimental, comprobado mediante el ajuste individual y el VPC (**Figura 49** y **50**), al comparar la simulación del modelo con las observaciones (medidas realizadas de Dv en escala logarítmica).



Figura 48. Esquema de modelo bicompartimental.

Tabla 23. Parámetros farmacocinéticos estudiados en la sonda-libre (Fórmula 0) y T908-sonda (10% p/v; Fórmula 1), en ratones BALB/c normales (n=5), a 0,08, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 6, 18, 24 y 48 h post-inyección.

Nota: los valores *, se desestiman para el cálculo de MRT (h) promedio ya que son significativamente diferentes.

n	Fórmula	CL	V1 (µL)	Q	V2 (µL)	VSS (µL)	MRT (h)
1	1	22027,1	15694,5	41723,9	67241,5	82936,0	3,8
2	1	13213,9	12626,8	34046,5	70886,6	83513,4	6,3
3	1	3185,6	5649,4	24117,5	46025,1	51674,5	16,2*
4	1	12987,9	13616,2	41553,8	62063,1	75679,3	5,8
5	1	8194,6	11943,8	46370,8	54329,3	66273,1	8,1
6	0	3425,0	5617,3	29742,0	16348,2	21965,5	6,4*
7	0	11947,3	10916,9	55659,4	32395,2	43312,1	3,6
8	0	31532,4	17978,8	43733,9	28971,2	46950,0	1,5
9	0	15335,5	21544,4	49822,9	33317,4	54861,8	3,6
10	0	10178,5	9480,0	26876,5	21803,9	31283,9	3,1



Figura 49. Gráficos de bondad de ajuste individual para el modelo farmacocinético de la sonda-libre y el sistema T908-sonda (10% p/v).



Figura 50. Gráfico de simulación mediante VPC, de perfiles farmacocinéticos de la sonda-libre y T908sonda (10% p/v), en base al modelo bicompartimental obtenido. Se compara gráficamente la distribución de predicciones (puntos negros, mediana: ---) con la distribución de observaciones (puntos azules, mediana: —). Nota: sombra azul, es el intervalo de predicción para la mediana, obtenido a partir de simulaciones del modelo.

6. CONCLUSIONES

Conclusiones

La co-asociación de la sonda y nanoestructuras preformadas resulta interesante por la facilidad de la técnica, pero principalmente porque ninguno de los componentes es modificado y facilitaría la interacción únicamente a nivel superficial. Si bien no se conoce la naturaleza de esta interacción, la misma podría facilitar la disponibilidad del aptámero para el ingreso a la célula, lo cual no ha sido descrito previamente con aptámeros.

Hay varias posibles ventajas de la co-asociación de un aptámero a una nanoestructura: (i) la protección de un aptámero frente a la degradación por nucleasas, (ii) sumar al direccionaamiento activo, el ingreso al microambiente tumoral mediante targeting pasivo, (iii) aumentar el tiempo de circulación, (iv) mejorar las vías de eliminación. Por otro lado, una nanoestructura co-asociada a un aptámero incluye: (v) su direccionamiento activo, (vi) la posibilidad de vehiculizar fármacos a nivel del core.

En este trabajo, se han aplicado gran parte de las metodologías disponibles a nuestro alcance para comprobar la co-asociación. Esto sumado a los estudios farmacocinéticos, indican cambios que nos acercan a nuestra hipótesis y responden parte de las preguntas realizadas.

Se caracterizaron exhaustivamente LPS y MPs, libres y co-asociadas con el aptámero Sgc8c marcado con Alexa 647. Los nanosistemas obtenidos mostraron un adecuado tamaño hidrodinámico, distribución de tamaño y potencial Zeta, e indicaron ser estables en el tiempo. Además, se realizaron estudios de caracterización por AFM y TEM de los nanosistemas-libres y de los nanosistemas-sonda, mostrando notorias diferencias morfológicas, que confirman dicha co-asociación.

Asimismo, todos los sistemas fueron evaluados *in vitro* en la línea celular A20 (modelo murino de linfoma de células B). Las biodistribuciones e imágenes en ratones BALB/c portadores de linfoma inducido A20, evidenciaron acumulación en los tumores, para LPS-sonda y en mayor medida para T908-sonda (10% p/v).

126

Finalmente, MPs a base de T908-sonda (10% p/v), mostró mayor permanencia en circulación en los ensayos en animales portadores de tumor, respecto a la sonda-libre.

7. PERSPECTIVAS

Perspectivas

Mediante la mejora de las plataformas tecnológicas en estudio, se podría optimizar la coasociación o carga de la sonda a los nanosistemas de manera más eficiente, incluyendo estudios de purificación y análisis mediante HPLC, estudios de espectrometría de masas, NTA, anisotropía, entre otros. A su vez, sería interesante profundizar incluyendo un estudio comparativo de conjugación covalente nanosistemas-sonda.

Independientemente, también sería muy interesante probar la vehiculización de algún fármaco como dasatinib (Sicco, 2021) con un agente terapéutico para su uso como potenciales agentes teragnósticos, por lo que la acción híbrida de acciones farmacológicas otorgaría un valor agregado a dichos estudios.

Para los estudios in vivo, un mayor número de animales o una sonda radioactiva serían más adecuados para complementar y mejorar la caracterización biológica de los nanosistemas. La evaluación a tiempos más cortos y más largos también sería muy interesante para poder analizar los cambios generados por el nanosistema. Todo esto redundaría, en el involucramiento de nuevos ensayos *in vitro*, *in vivo* y nuevas caracterizaciones a nivel fisicoquímico.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, T., y Nakamura, Y. (2019). Aptamers: A Review of Their Chemical Properties and Modifications for Therapeutic Application. *Molecules*, 24(23), 4229. http://doi:10.3390/molecules24234229
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., & Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters*, 8(1), 102. https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102
- Alberti, C. (2012). From molecular imaging in preclinical/clinical oncology to theranostic applications in targeted tumor therapy. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 16,* 925–933. *Nanoscale Research Letters, 8*(1), 102. https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102
- Alexandridis, P., & Alan Hatton, T. (1995). Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: Thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *96*(1), 1-46. https://doi.org/10.1016/0927-7757(94)03028-X
- Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J. I., Yang, L., Marti, G. E., Moore, T., Hudson, J., Lu, L., Lewis, D. B., Tibshirani, R., Sherlock, G., ... Staudt, L. M. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403(6769), 503-511. https://doi.org/10.1038/35000501
- Allen, T., Cullis, P. (2013). Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. Advanced Drug Delivery Reviews. 65 (1), 36–48. https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037

Alvarez-Lorenzo, C., Sosnik, A., & Concheiro, A. (2011). PEO-PPO Block Copolymers for

Passive Micellar Entrega and Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Therapy. *Current Drug Targets*, *12*(8), 1112-1130.

- Barba, A. A., Bochicchio, S., Dalmoro, A., & Lamberti, G. (2019). Lipid Delivery Systems for Nucleic-Acid-Based-Drugs: From Production to Clinical Applications. *Pharmaceutics*, 11(8), 360. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080360
- Berger, H., Wodarz, A., & Borchers, A. (2017). PTK7 Faces the Wnt in Development and Disease. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 5, 31. https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00031
- Berlier, J. E., Rothe, A., Buller, G., Bradford, J., Gray, D. R., Filanoski, B. J., Telford, W. G., Yue, S., Liu, J., Cheung, C.-Y., Chang, W., Hirsch, J. D., Beechem, J. M., Haugland, R. P., & Haugland, R. P. (2003). Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: Fluorescence of the dyes and their bioconjugates. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, *51*(12), 1699-1712. https://doi.org/10.1177/002215540305101214
- Blachman, A., Funez, F., Saavedra, S., Lazaro-Martinez, J., Camperi, S., Glisoni, RJ., Sosnik,
 A, Calabrese, G. (2020). Targeted Anti-Inflammatory Peptide IRW Delivery in Injured
 Endothelial Cells Using Dermatan Sulfate/Chitosan Polyelectrolyte Complex
 Nanomaterials. *Carbohydrate Polymers, 230*, 115610.
 https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115610
- Bodratti, A., & Alexandridis, P. (2018). Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. Journal of Functional Biomaterials, 9, 11. https://doi.org/10.3390/jfb9010011
- Boni, L., David, G., Mangano, A., Dionigi, G., Rausei, S., Spampatti, S., Cassinotti, E., &
 Fingerhut, A. (2014). Clinical Applications of Indocyanine Green (ICG) Enhanced
 Fluorescence in Laparoscopic Surgery. *Surgical endoscopy*, 29. https://doi.org/10.1007/s00464-014-3895-x

132

- Borbas, K. E., Ferreira, C. S. M., Perkins, A., Bruce, J. I., Missailidis, S. (2007). Design and Synthesis of Mono- and Multimeric Targeted Radiopharmaceuticals Based on Novel Cyclen Ligands Coupled to Anti-MUC1 Aptamers for the Diagnostic Imaging and Targeted Radiotherapy of Cancer. *Bioconjugate Chemistry*, 18(4), 1205–1212. http://doi:10.1021/bc0700741
- Boschi, F. y De Sanctis, F. (2017). Overview of the optical properties of fluorescent nanoparticles for optical imaging. *European Journal of Histochemistry*, *61* (3), 2830. http://doi:10.4081/ejh.2017.2830
- Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N., & Khan, W. (2017). Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics*, 9(2). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012
- Butti, R., Das, S., Gunasekaran, V. P., Yadav, A. S., Kumar, D., & Kundu, G. C. (2018).
 Receptor tyrosine kinases (RTKs) in breast cancer: Signaling, therapeutic implications and challenges. *Molecular Cancer*, *17*(1), 34. https://doi.org/10.1186/s12943-018-0797-x
- Caddy, J., Wilanowski, T., Darido, C., Dworkin, S., Ting, S. B., Zhao, Q., Rank, G., Auden, A., Srivastava, S., Papenfuss, T. A., Murdoch, J. N., Humbert, P. O., Boulos, N., Weber, T., Zuo, J., Cunningham, J. M., & Jane, S. M. (2010). Epidermal wound repair is regulated by the planar cell polarity signaling pathway. *Developmental cell*, *19*(1), 138-147. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.06.008
- Cafferty, P. (2004). The receptor tyrosine kinase Off-track is required for layer-specific neuronal connectivity in Drosophila. *Development*, 131(21), 5287-5295. https://doi.org/10.1242/dev.01406
- Cagel, M., Tesan, F. C., Bernabeu, E., Salgueiro, M. J., Zubillaga, M. B., Moretton, M. A., & Chiappetta, D. A. (2017). Polymeric mixed micelles as nanomedicines: Achievements

and perspectives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *113*, 211-228. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.12.019

Calzada, V. (2020). Aptamers in Diagnostic and Molecular Imaging Applications. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, *174*, 141-160. https://doi.org/10.1007/10_2019_115

- Calzada, V., Moreno, M., Newton, J., González, J., Fernández, M., Gambini, J. P., Ibarra, M., Chabalgoity, A., Deutscher, S., Quinn, T., Cabral, P., & Cerecetto, H. (2017).
 Development of new PTK7-entrega aptamer-fluorescent and -radiolabelled probes for evaluation as molecular imaging agents: Lymphoma and melanoma in vivo proof of concept. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(3), 1163-1171. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.12.026
- Cassidy, P. & Radda, G. (2005) Molecular imaging perspectives. *Journal Royal Society Interface 2:133–144*. doi:10.1098/rsif.2005.0040
- Catuogno, S., Esposito, C. L., & De Franciscis, V. (2016). Aptamer-Mediated Targeted
 Delivery of Therapeutics: An Update. *Pharmaceuticals*, 9(4), 69.
 https://doi.org/10.3390/ph9040069
- Chen, M.-K., & Hung, M.-C. (2015). Proteolytic cleavage, trafficking, and functions of nuclear receptor tyrosine kinases. *The FEBS journal*, 282(19), 3693-3721. https://doi.org/10.1111/febs.13342
- Chen, Z.-Y., Wang, Y.-X., Lin, Y., Zhang, J.-S., Yang, F., Zhou, Q.-L., & Liao, Y.-Y. (2014).
 Advance of molecular imaging technology and targeted imaging agent in imaging and therapy. *BioMed Research International*, 2014, 819324.
 https://doi.org/10.1155/2014/819324
- Comeo, E., Kindon, N. D., Soave, M., Stoddart, L. A., Kilpatrick, L. E., Scammells, P. J., Hill, S. J., & Kellam, B. (2020). Subtype-Selective Fluorescent Ligands as Pharmacological

Research Tools for the Human Adenosine A2A Receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(5), 2656-2672. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01856

- Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer. *Situación Epidemiológica del Uruguay en relación al Cáncer mayo* 2020. (26 de enero de 2021). https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/Situacion-Epidemiologica-del-Uruguay-en-relacion-al-Cancer--Mayo-2020-uc108
- Condeelis, J. y Weissleder, R. (2010). In vivo imaging in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2,* a003848. http://doi: 10.1101/cshperspect.a003848
- Cuestas, ML., Glisoni, RJ., Mathet, V., Sosnik, A. (2013). Lactosylated-poly(ethylene oxide)poly(propylene oxide) block copolymers for potential active drug targeting: Synthesis and physicochemical and self-aggregation characterization. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(1), 1-21. https://doi.org/10.1007/s11051-012-1389-0
- Danhier, F. (2016). To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *Journal of Controlled Release*, 244, 108-121. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.015
- Danhier, Fabienne, Feron, O., & Préat, V. (2010). To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor entrega of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal* of Controlled Release, 148(2), 135-146. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.027
- Davis, M. E., Chen, Z. (Georgia), & Shin, D. M. (2008). Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(9), 771-782. https://doi.org/10.1038/nrd2614
- Desmettre, T., Devoisselle, J.-M., & Mordon, S. (2000). Fluorescence Properties and Metabolic Features of Indocyanine Green (ICG) as Related to Angiography. *Survey of ophthalmology*, 45, 15-27. https://doi.org/10.1016/S0039-6257(00)00123-5

Dhawan, A. P., D'Alessandro, B., & Fu, X. (2010). Optical Imaging Modalities for Biomedical

Applications. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, *3*, 69–92. http://doi:10.1109/rbme.2010.2081975

- Donnou, S., Galand, C., Touitou, V., Sautès-Fridman, C., Fabry, Z., & Fisson, S. (2012).
 Murine Models of B-Cell Lymphomas: Promising Tools for Designing Cancer
 Therapies. Advances in Hematology, 2012, 1-13. https://doi.org/10.1155/2012/701704
- Duan, S., Yu, Y., Lai, C., Wang, D., Wang, Y., Xue, D., Hu, Z., & Lu, X. (2018). Vincristine-Loaded and sgc8-Modified Liposome as a Potential Targeted Drug Delivery System for Treating Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, *14*(5), 910-921. https://doi.org/10.1166/jbn.2018.2530
- Easty, D. J., Mitchell, P. J., Patel, K., Flørenes, V. A., Spritz, R. A., & Bennett, D. C. (1997). Loss of expression of receptor tyrosine kinase family genes PTK7 and SEK in metastatic melanoma. *International Journal of Cancer*, 71(6), 1061-1065. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19970611)71:6<1061::aid-ijc24>3.0.co;2-f
- Eilers, A., Witt, S., & Walter, J. (2020). Aptamer-Modified Nanoparticles in Medical Applications. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 174, 161-193. https://doi.org/10.1007/10_2020_124
- *El cáncer—Instituto Nacional del Cáncer* (nciglobal,ncienterprise). (2011, abril 25). [CgvHomeLanding]. https://www.cancer.gov/espanol/cancer
- Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, *346*(6287), 818-822. https://doi.org/10.1038/346818a0
- Erak, M., Bellmann-Sickert, K., Els-Heindl, S., & Beck-Sickinger, A. G. (2018). Peptide chemistry toolbox Transforming natural peptides into peptide therapeutics. *Bioorganic* & *medicinal* chemistry, 26(10), 2759-2765. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.01.012

Etheridge, M. L., Campbell, S. A., Erdman, A. G., Haynes, C. L., Wolf, S. M., & McCullough,

136

J. (2013). The big picture on nanomedicine: The state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *9*(1), 1-14. https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.05.013

- European Commission. Directorate General for Research and Innovation. (2012). Nanotechnologies : principles, applications, implications and hands on activities (a compendium for educators). Publications Office. https://data.europa.eu/doi/10.2777/76945
- Famulok, M., & Mayer, G. (1999). Aptamers as tools in molecular biology and immunology. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 243, 123-136. https://doi.org/10.1007/978-3-642-60142-2_7
- Famulok, M., y Mayer, G. (2011). Aptamer Modules as Sensors and Detectors. Accounts of Chemical Research, 44(12), 1349–1358. doi:10.1021/ar2000293
- Fang, Z., Wang, X., Sun, Y., Fan, R., Liu, Z., Guo, R., & Xie, D. (2019). Sgc8 aptamer targeted glutathione-responsive nanoassemblies containing Ara-C prodrug for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Nanoscale*, *11*(47), 23000-23012. https://doi.org/10.1039/C9NR07391D
- Freitas, R. A. (2002). The future of nanofabrication and molecular scale devices in nanomedicine. *Studies in Health Technology and Informatics*, 80, 45-59.
- Freitas, Robert A. (2005). What is nanomedicine? *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *1*(1), 2-9. https://doi.org/10.1016/j.nano.2004.11.003
- Funovics, M., Weissleder, R., & Tung, C.-H. (2003). Protease sensors for bioimaging. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 377(6), 956-963. https://doi.org/10.1007/s00216-003-2199-0
- Gaucher, G., Dufresne, M.-H., Sant, V. P., Kang, N., Maysinger, D., & Leroux, J.-C. (2005). Block copolymer micelles: Preparation, characterization and application in drug

delivery. Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society, 109(1-3), 169-188. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.034

- Gibson, A. P., Hebden, J. C., & Arridge, S. R. (2005). Recent advances in diffuse optical imaging. *Physics in Medicine and Biology*, 50(4), R1-43. https://doi.org/10.1088/0031-9155/50/4/r01
- Glisoni, R. J., Quintana, S., Molina, M., Calderón, M., Moglioni, A. G., & Sosnik, A. (2015).
 Chitosan-g-oligo(epsilon-caprolactone) polymeric micelles: Microwave-assisted synthesis and physicochemical and cytocompatibility characterization. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(24), 4853-4864. https://doi.org/10.1039/C5TB00594A
- Glisoni, R. J., & Sosnik, A. (2014a). Encapsulation of the antimicrobial and immunomodulator agent nitazoxanide within polymeric micelles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(6), 4670-4682. https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8647
- Glisoni, RJ., & Sosnik, A. (2014b). Novel poly (ethylene oxide)-co-poly(propylene oxide) copolymer-glucose conjugate by microwave-assisted ring opening of a sugar lactone. *Macromolecular Bioscience, 14*(11), 1639-1651. ttps://doi.org/10.1002/mabi.201400235

Global Cancer Observatory. (2021). Recuperado 26 de enero de 2021, de https://gco.iarc.fr/

- Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O., & Yarus, M. (1995). Diversity of oligonucleotide functions. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 763-797. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.003555
- Golubkov, V. S., Chekanov, A. V., Cieplak, P., Aleshin, A. E., Chernov, A. V., Zhu, W., Radichev, I. A., Zhang, D., Dong, P. D., & Strongin, A. Y. (2010). The Wnt/Planar Cell Polarity Protein-tyrosine Kinase-7 (PTK7) Is a Highly Efficient Proteolytic Target of Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase: IMPLICATIONS IN CANCER AND EMBRYOGENESIS**This work was supported, in whole or in part, by National

Institutes of Health Grants CA83017 and CA77470 (to A. Y. S.). *Journal of Biological Chemistry*, 285(46), 35740-35749. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.165159

- Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M. T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., & Langer, R. (1994).
 Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* (New York, N.Y.), 263(5153), 1600–1603. https://doi.org/10.1126/science.8128245
- Haque, A., Faizi, M. S. H., Rather, J. A., & Khan, M. S. (2017). Next generation NIR fluorophores for tumor imaging and fluorescence-guided surgery: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(7), 2017–2034. https://doi:10.1016/j.bmc.2017.02.061
- Hasegawa, H., Savory, N., Abe, K., y Ikebukuro, K. (2016). Methods for Improving Aptamer Binding Affinity. *Molecules*, 21(4), 421. https://doi.org/10.3390/molecules21040421
- Hayes, M., Naito, M., Daulat, A., Angers, S., & Ciruna, B. (2013). Ptk7 promotes noncanonical Wnt/PCP-mediated morphogenesis and inhibits Wnt/-catenin-dependent cell fate decisions during vertebrate development. *Development*, 140(10), 2245-2245. https://doi.org/10.1242/dev.096974
- Huang, Y.-F., Shangguan, D., Liu, H., Phillips, J. A., Zhang, X., Chen, Y., & Tan, W. (2009).
 Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, *10*(5), 862-868. https://doi.org/10.1002/cbic.200800805
- Hwang, D. W., Ko, H. Y., Lee, J. H., Kang, H., Ryu, S. H., Song, I. C., Lee, D. S., Kim, S. (2010). A nucleolin-targeted multimodal nanoparticle imaging probe for tracking cancer cells using an aptamer. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine, 51*(1), 98–105. https://doi.org/10.2967/jnumed.109.069880
- Immordino, M. L., Dosio, F., & Cattel, L. (2006). Stealth liposomes: Review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International*

Bibliografía

Journal of Nanomedicine, 1(3), 297-315.

- Ioannidis, J. P. A., Kim, B. Y. S., & Trounson, A. (2018). How to design preclinical studies in nanomedicine and cell therapy to maximize the prospects of clinical translation. Nature Biomedical Engineering, 2(11), 797–809. doi:10.1038/s41551-018-0314-y
- Jesorka, A., & Orwar, O. (2008). Liposomes: Technologies and analytical applications. *Annual Review of Analytical Chemistry (Palo Alto, Calif.)*, *1*, 801-832. https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112747
- Jung, J. W., Ji, A. R., Lee, J., Kim, U. J., & Lee, S. T. (2002). Organization of the human PTK7 gene encoding a receptor protein tyrosine kinase-like molecule and alternative splicing of its mRNA. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1579(2-3), 153-163. https://doi.org/10.1016/s0167-4781(02)00536-5
- Jung, J.-W., Shin, W.-S., Song, J., & Lee, S.-T. (2004). Cloning and characterization of the full-length mouse Ptk7 cDNA encoding a defective receptor protein tyrosine kinase. *Gene*, 328, 75-84. https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.12.006
- Kantamneni, H., Barkund, S., Donzanti, M., Martin, D., Zhao, X., He, S., Riman, R. E., Tan, M. C., Pierce, M. C., Roth, C. M., Ganapathy, V., & Moghe, P. V. (2020). Shortwave infrared emitting multicolored nanoprobes for biomarker-specific cancer imaging in vivo. *BMC Cancer*, 20(1), 1082. https://doi.org/10.1186/s12885-020-07604-8
- Kaygisiz, K., & Synatschke, C. V. (2020). Materials promoting viral gene delivery. *Biomaterials Science*, 8(22), 6113-6156. https://doi.org/10.1039/D0BM01367F
- Khan, I., Elhissi, A., Shah, M., Alhnan, M. A., & Ahmed, W. (2013). 9—Liposome-based carrier systems and devices used for pulmonary drug delivery. En J. P. Davim (Ed.), *Biomaterials and Medical Tribology* (pp. 395-443). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1533/9780857092205.395

Kim, M., Kim, D. M., Kim, K. S., Jung, W., Kim, D. E. (2018). Applications of Cancer Cell-

140

Specific Aptamers in Targeted Delivery of Anticancer Therapeutic Agents. *Molecules*, 23(4), 830. https://doi.org/10.3390/molecules23040830

- Kinghorn, A. B., Fraser, L. A., Lang, S., Shiu, S., Tanner, J. A. (2017). Aptamer Bioinformatics. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2516. https://doi.org/10.3390/ijms18122516
- Kingsley, J. D., Dou, H., Morehead, J., Rabinow, B., Gendelman, H. E., & Destache, C. J. (2006). Nanotechnology: A focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Journal* of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology, 1(3), 340-350. https://doi.org/10.1007/s11481-006-9032-4
- Kovacevic, K. D., Gilbert, J. C., & Jilma, B. (2018). Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of aptamers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 134, 36-50. https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.10.008
- Kung, H. J., Chen, H. C., & Robinson, D. (1998). Molecular profiling of tyrosine kinases in normal and cancer cells. *Journal of Biomedical Science*, 5(2), 74-78. https://doi.org/10.1007/BF02258359
- Lakowicz, J. R. (1994). *Topics Fluorescence Spectroscopy*. (4.^a ed.). Springer US.
- Lakowicz, J. R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy (3.^a ed.). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4
- Lammers, T., Kiessling, F., Hennink, W. E., & Storm, G. (2012). Drug targeting to tumors:
 Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 161(2), 175-187.
 https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.063
- Lavis, L. D. (2017). Teaching Old Dyes New Tricks: Biological Probes Built from Fluoresceins and Rhodamines. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 825-843. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044839

- Le, J., Xu, J., Zheng, J., Li, B., Zheng, T., Lu, Y., Shen, W., Kudryavtseva, A. V., Katanaev,
 V. L., Shao, J., & Jia, L. (2020). One nanometer self-assembled aptamer-DNA dendrimers carry 350 doxorubicin: Super-stability and intra-nuclear DNA comet tail. *Chemical Engineering Journal*, 388, 124170. https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124170
- Lecot, N., Glisoni, RJ., Oddone, N., Benech, J., Fernandez-Lomonaco, M., Cabral, P., Sosnik,
 A. (2020a). Glucosylated Polymeric Micelles Actively Target Curcumin to a Breast
 Cancer Model. *Advanced Therapeutics*, 4(1), 2000010.
 https://doi.org/10.1002/adtp.202000010
- Lecot, N., Rodríguez, G., Stancov, V., Fernández, M., González, M., Glisoni, RJ., Cabral, P., Cerecetto, H. (2020b). Development of fluorescent- and radio-traceable T1307polymeric micelles as biomedical agents for cancer diagnosis: biodistribution on 4T1 tumor-bearing mice. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, BJPS-2019-1055.
- Lecot, N. (2020c). Desarrollo de formulaciones nanoestructuradas portadoras de fenazinas para su aplicación en oncología. (Tesis de Doctorado en Ciencias Médicas). Universidad de la República.
- Lee, D.-E., Koo, H., Sun, I.-C., Ryu, J. H., Kim, K., & Kwon, I. C. (2012). Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2656-2672. https://doi.org/10.1039/C2CS15261D
- Lee, H. K., Chauhan, S. K., Kay, E., & Dana, R. (2011). Flt-1 regulates vascular endothelial cell migration via a protein tyrosine kinase-7–dependent pathway. *Blood*, 117(21), 5762-5771. https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-306928
- Lee, S. T., Strunk, K. M., & Spritz, R. A. (1993). A survey of protein tyrosine kinase mRNAs expressed in normal human melanocytes. *Oncogene*, *8*(12), 3403-3410.

Leitner, M., Poturnayova, A., Lamprecht, C., Weich, S., Snejdarkova, M., Karpisova, I.,

Hianik, T., & Ebner, A. (2017). Characterization of the specific interaction between the DNA aptamer sgc8c and protein tyrosine kinase-7 receptors at the surface of T-cells by biosensing AFM. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *409*(11), 2767-2776. https://doi.org/10.1007/s00216-017-0238-5

- Lhoumeau, A.-C., Martinez, S., Prébet, T., & Borg, J.-P. (2015). The PTK7 Receptor Family.
 En D. L. Wheeler & Y. Yarden (Eds.), *Receptor Tyrosine Kinases: Family and Subfamilies* (pp. 539-558). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-11888-8_11
- Lichtig, H., Cohen, Y., Bin-Nun, N., Golubkov, V., & Frank, D. (2019). PTK7 proteolytic fragment proteins function during early Xenopus development. *Developmental Biology*, 453(1), 48-55. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.05.007
- Liu M, Yu X, Chen Z, Yang T, Yang D, Liu Q, Du K, Li B, Wang Z, Li S, Deng Y, He N. (2017). Aptamer selection and applications for breast cancer diagnostics and therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1):81. http://doi: 10.1186/s12951-017-0311-4.
- Liu, Q., Zhang, C., Yuan, J., Fu, J., Wu, M., Su, J., Wang, X., Yuan, X., & Jiang, W. (2015). PTK7 regulates Id1 expression in CD44-high glioma cells. *Neuro-Oncology*, 17(4), 505-515. https://doi.org/10.1093/neuonc/nou227
- Lorenzo, C. A., Concheiro, A., & Sosnik, A. (2015). Micelas poliméricas para encapsulación, vectorización y cesión de fármacos. En H. C. de Sousa, M. E. M. Braga, & A. Sosnik, *Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos avançados* (1.ª ed., pp. 183-217). Imprensa da Universidade de Coimbra. https://doi.org/10.14195/978-989-26-0881-5_5
- Luo, S., E, Z., Y, S., T, C., & C, S. (2011). A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging. *Biomaterials*, 32(29), 7127-7138. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.06.024
- Lv, W., Shen, Y., Yang, H., Yang, R., Cai, W., Zhang, J., Yuan, L., Duan, Y., & Zhang, L. (2018). A Novel Bimodal Imaging Agent Targeting HER2 Molecule of Breast Cancer. *Journal of Immunology Research*, e6202876. https://doi.org/10.1155/2018/6202876
- Mahmud, A., Xiong, X.-B., Aliabadi, H. M., & Lavasanifar, A. (2007). Polymeric micelles for drug targeting. *Journal of Drug Targeting*, 15(9), 553-584. https://doi.org/10.1080/10611860701538586
- Martelli, C., Lo Dico, A., Diceglie, C., Lucignani, G., Ottobrini, L. Optical imaging probes in oncology. *Oncotarget*. 7(30), 48753-48787. https://doi: 10.18632/oncotarget.9066.
- Matasar, M., y Zelenetz, A. (2008). Overview of lymphoma diagnosis and management. Radiologic Clinics of North America, 46(2), 175-198, vii. http://doi.org/10.1016/j.rcl.2008.03.005
- Mattera, V., Pereyra Gerber, F., Glisoni, RJ., Ostrowski, M., Verstraeten, S., Pasquini, J., Correale J. (2020) Extracellular vesicles containing the apotransferrin receptor as nanocarriers of transferrin. *Journal of neurochemistry*, 155(3), 327-338. https://doi.org/10.1111/jnc.15019
- Matsumura, Y., y Maeda, H. (1986). A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Research*, *46*(12 Part 1), 6387-6392.
- Mayer, G. (2009). The chemical biology of aptamers. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 48(15), 2672-2689. https://doi.org/10.1002/anie.200804643
- Ministerio de Salud Pública. *División Estadística. Estadísticas de mortalidad*. (26 de enero de 2021). https://uins.msp.gub.uy/defunciones.html
- Monterrubio, C., Paco, S., Olaciregui, NG., Pascual-Pasto, G., Vila-Ubach, M., Cuadrado-Vilanova, M., Ferrandiz, MM., Castillo-Ecija, H., Glisoni, RJ., Kuplennik, N., de Torres, C., Lavarino, C., V Cheung, N-K., Mora, J., Sosnik, A., Montero Carcaboso,

A. (2017). Targeted drug distribution in tumor extracellular fluid of GD2-expressing neuroblastoma patient-derived xenografts using SN-38-loaded nanoparticles conjugated to the monoclonal antibody 3F8. *Journal of Controlled Release, 255*, 108-119. doi:10.1016/j.jconrel.2017.04.016

- Moreno, M. J., Ling, B., Stanimirovic, D. B. (2020). In vivo near-infrared fluorescent optical imaging for CNS drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 15(8), 903-915. doi:10.1080/17460441.2020.1759549
- Mossie, K., Jallal, B., Alves, F., Sures, I., Plowman, G. D., & Ullrich, A. (1995). Colon carcinoma kinase-4 defines a new subclass of the receptor tyrosine kinase family. *Oncogene*, 11(10), 2179-2184.
- Movassaghian, S., Merkel, O. M., & Torchilin, V. P. (2015). Applications of polymer micelles for imaging and drug delivery. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology, 7(5), 691-707. https://doi.org/10.1002/wnan.1332
- Müller, J., Wunder, A., y Licha, K. (2012). Optical Imaging. Recent Results in Cancer Research, 221–246. https://doi:10.1007/978-3-642-10853-2_7
- Müller-Tidow, C., Schwäble, J., Steffen, B., Tidow, N., Brandt, B., Becker, K., Schulze-Bahr,
 E., Halfter, H., Vogt, U., Metzger, R., Schneider, P. M., Büchner, T., Brandts, C.,
 Berdel, W. E., & Serve, H. (2004). High-throughput analysis of genome-wide receptor
 tyrosine kinase expression in human cancers identifies potential novel drug targets. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(4), 1241-1249. https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-0954-03
- Mundra, V., Peng, Y., Rana, S., Natarajan, A., & Mahato, R. (2015). Micellar formulation of indocyanine green for phototherapy of melanoma. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 220. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.029

145

- Musumeci, D., Platella, C., Riccardi, C., Moccia, F., & Montesarchio, D. (2017). Fluorescence Sensing Using DNA Aptamers in Cancer Research and Clinical Diagnostics. *Cancers*, 9(12), 174. https://doi.org/10.3390/cancers9120174
- National Cancer Institute. (26 de enero de 2021). About Cancer. https://www.cancer.gov/about-cancer
- National Cancer Institute. (26 de enero de 2021). *Lymphoma*. https://www.cancer.gov/types/lymphoma
- Nakanishi, T., Fukushima, S., Okamoto, K., Suzuki, M., Matsumura, Y., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., & Kataoka, K. (2001). Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, (1-3), 295-302. https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00341-8
- Ntziachristos, V., & Chance, B. (2001). Probing physiology and molecular function using optical imaging: Applications to breast cancer. *Breast Cancer Research: BCR*, 3(1), 41-46. https://doi.org/10.1186/bcr269
- Ntziachristos, Vasilis. (2006). Fluorescence molecular imaging. *Annual Review of Biomedical Engineering*, *8*, 1-33. https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095831
- Odeh, F., Nsairat, H., Alshaer, W., Ismail, M. A., Esawi, E., Qaqish, B., Bawab, A. A., & Ismail, S. I. (2020). Aptamers Chemistry: Chemical Modifications and Conjugation Strategies. *Molecules*, 25(1), 3. https://doi.org/10.3390/molecules25010003
- OncoNano Medicine, Inc. (2021). A Phase 2a, Single-dose, Open-label Study to Evaluate Diagnostic Performance, Safety & Timing of Postdose Imaging of ONM-100, an Intraoperative Fluorescence Imaging Agent for the Detection of Cancer, in Patients With Solid Tumors Undergoing Routine Surgery (Clinical trial registration N.^o NCT03735680). clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03735680

- Organización Mundial de la Salud. Uruguay. (26 de enero de 2021). https://www.who.int/countries/ury/es/
- Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R. P., Bishop-Stewart, J., Bhalgat, M. K., Millard, P. J., Mao, F., Leung, W. Y., & Haugland, R. P. (1999). Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 47(9), 1179-1188. https://doi.org/10.1177/002215549904700910
- Peradziryi, H., Tolwinski, N., & Borchers, A. (2012a). The many roles of PTK7: A versatile regulator of cell-cell communication. Archives of biochemistry and biophysics. https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.12.019
- Peradziryi, H., Tolwinski, N. S., & Borchers, A. (2012b). The many roles of PTK7: A versatile regulator of cell-cell communication. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 524(1), 71-76. https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.12.019
- Puppo, F., Thomé, V., Lhoumeau, A.-C., Cibois, M., Gangar, A., Lembo, F., Belotti, E., Marchetto, S., Lécine, P., Prébet, T., Sebbagh, M., Shin, W.-S., Lee, S.-T., Kodjabachian, L., & Borg, J.-P. (2011). Protein tyrosine kinase 7 has a conserved role in Wnt/β-catenin canonical signalling. *EMBO Reports*, 12(1), 43-49. https://doi.org/10.1038/embor.2010.185
- Radom, F., Jurek, P. M., Mazurek, M. P., Otlewski, J., & Jeleń, F. (2013). Aptamers: Molecules of great potential. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1260-1274. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.007
- Ramjiawan, B., Maiti, P., Aftanas, A., Kaplan, H., Fast, D., Mantsch, H. H., & Jackson, M. (2000). Noninvasive localization of tumors by immunofluorescence imaging using a single chain Fv fragment of a human monoclonal antibody with broad cancer specificity. *Cancer*, 89(5), 1134-1144. https://doi.org/10.1002/1097-

0142(20000901)89:5<1134::AID-CNCR23>3.0.CO;2-3

- Regad, T. (2015). Targeting RTK Signaling Pathways in Cancer. *Cancers*, 7(3), 1758-1784. https://doi.org/10.3390/cancers7030860
- Remaut, K., Lucas, B., Braeckmans, K., Sanders, N. N., Demeester, J., & De Smedt, S. C. (2005). Protection of oligonucleotides against nucleases by pegylated and nonpegylated liposomes as studied by fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Controlled Release*, *110*(1), 212-226. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.048
- Saccomano, M., Dullin, C., Alves, F., & Napp, J. (2016). Preclinical evaluation of near-infrared (NIR) fluorescently labeled cetuximab as a potential tool for fluorescence-guided surgery. *International Journal of Cancer*, 139(10), 2277-2289. https://doi.org/10.1002/ijc.30277
- Seneviratne, D., McLaughlin, C., Todor, D., Kaplan, B., & Fields, E. C. (2017). The CivaSheet: The new frontier of intraoperative radiation therapy or a pricier alternative to LDR brachytherapy? *Advances in Radiation Oncology*, 3(1), 87-91. https://doi.org/10.1016/j.adro.2017.10.005
- Shangguan, D., Cao, Z., Meng, L., Mallikaratchy, P., Sefah, K., Wang, H., Li, Y., & Tan, W.
 (2008). Cell-Specific Aptamer Probes for Membrane Protein Elucidation in Cancer
 Cells. *Journal of proteome research*, 7(5), 2133-2139.
 https://doi.org/10.1021/pr700894d
- Shangguan, D., Li, Y., Tang, Z., Cao, Z. C., Chen, H. W., Mallikaratchy, P., Sefah, K., Yang, C. J., & Tan, W. (2006). Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(32), 11838-11843. https://doi.org/10.1073/pnas.0602615103
- Shangguan, D., Tang, Z., Mallikaratchy, P., Xiao, Z., & Tan, W. (2007). Optimization and Modifications of Aptamers Selected from Live Cancer Cell Lines. *ChemBioChem*, 8(6),

Bibliografía

603-606. https://doi.org/10.1002/cbic.200600532

- Shi, Y., van der Meel, R., Chen, X., & Lammers, T. (2020). The EPR effect and beyond: Strategies to improve tumor targeting and cancer nanomedicine treatment efficacy. *Theranostics*, 10(17), 7921-7924. https://doi.org/10.7150/thno.49577
- Shin, D. H., Tam, Y. T., & Kwon, G. S. (2016). Polymeric micelle nanocarriers in cancer research. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 10(3), 348-359. https://doi.org/10.1007/s11705-016-1582-2
- Shin, W.-S., Maeng, Y.-S., Jung, J.-W., Min, J.-K., Kwon, Y.-G., & Lee, S.-T. (2008). Soluble PTK7 inhibits tube formation, migration, and invasion of endothelial cells and angiogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371(4), 793-798. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.168
- Shnitsar, I., & Borchers, A. (2008). PTK7 recruits dsh to regulate neural crest migration. Development (Cambridge, England), 135(24), 4015-4024. https://doi.org/10.1242/dev.023556
- Sicco, E., Baez, J., Ibarra, M., Fernández, M., Cabral, P., Moreno, M., Cerecetto, H., & Calzada, V. (2020). Sgc8-c Aptamer as a Potential Theranostic Agent for Hemato-Oncological Malignancies. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 35(4), 262– 270. https://doi.org/10.1089/cbr.2019.3402
- Sicco, E., Almeida, L., Moreno, M., Calzada, V., Cerecetto, H. (2021). Chemical conjugations of Sgc8-c with the lymphoma drug dasatinib to generate selective biotherapeutics. *Aptamers*. 000-000. (Aceptado)
- Sosnik, A., Khan, O. F., Butler, M., & Sefton, M. V. (2009). Poloxamine Hydrogels: From low Cell Adhesion Substrates to Matrices with Improved Cytocompatibility for Tissue Engineering Applications. En R. Barbucci (Ed.), *Hydrogels: Biological Properties and Applications* (pp. 79-96). Springer Milan. https://doi.org/10.1007/978-88-470-1104-

Bibliografía

5_8

- Speers, C., Tsimelzon, A., Sexton, K., Herrick, A. M., Gutierrez, C., Culhane, A., Quackenbush, J., Hilsenbeck, S., Chang, J., & Brown, P. (2009). Identification of novel kinase targets for the treatment of estrogen receptor-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(20), 6327-6340. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1107
- Sun H., y Zu Y. (2015). A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and Its Application. *Molecules*, 20(7), 11959-80. http://doi/10.3390/molecules200711959.
- Stolnik, S., Illum, L., & Davis, S. S. (1995). Long circulating microparticulate drug carriers. Advanced Drug Delivery Reviews, 16(2-3), 195–214. http:// doi:10.1016/0169-409x(95)00025-3
- Taruttis, A., y Ntziachristos, V. (2012). Translational Optical Imaging. American Journal of Roentgenology, 199(2), 263–271. http://doi:10.2214/ajr.11.8431
- The Lancet. (2003). Nanomedicine: Grounds for optimism, and a call for papers. *The Lancet*, *362*(9385), 673. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14238-9
- Tian, X., Yan, L., Zhang, D., Guan, X., Dong, B., Zhao, M., & Hao, C. (2016). PTK7 overexpression in colorectal tumors: Clinicopathological correlation and prognosis relevance. *Oncology Reports*, 36(4), 1829-1836. https://doi.org/10.3892/or.2016.4983
- Todd, C. W., Balusubramanian, M., & Newman, M. J. (1998). Development of adjuvant-active nonionic block copolymers. *Advanced drug delivery reviews*, 32(3), 199–223. https://doi.org/10.1016/s0169-409x(98)00011-8
- Torchilin, V. P. (2007). Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives. *Pharmaceutical Research*, 24(1), 1-16. https://doi.org/10.1007/s11095-006-9132-0
- Tsien, R. Y. (1998). The Green Fluorescent Protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67(1), 509-544. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509

- Tuerk, C., & Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249(4968), 505-510. https://doi.org/10.1126/science.2200121
- van Nostrum, C. F. (2004). Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy. Advanced Drug Delivery Reviews, 56(1), 9-16. https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.07.013
- Van Tran, V., Moon, J.-Y., & Lee, Y.-C. (2019). Liposomes for delivery of antioxidants in cosmeceuticals: Challenges and development strategies. *Journal of Controlled Release*, 300, 114-140. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.03.003
- Voskuil, F.J., Steinkamp, P.J., Zhao, T., van der Vegt, B., Koller, M., Doff, JJ., Jayalakshmi,
 Y., Hartung, JP., Gao, J., Sumer, BD., Witjes, MJH., van Dam, GM., & the SHINE study group. (2020). Exploiting metabolic acidosis in solid cancers using a tumor-agnostic pH-activatable nanoprobe for fluorescence-guided surgery. *Nat Commun*, *11*, 3257. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16814-4
- Vishwanath, K., & Ramanujam, N. (2011). Fluorescence Spectroscopy In Vivo. En R. A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (p. a0102.pub2). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/9780470027318.a0102.pub2
- Wagner, V., Hüsing, B., & Gaisser, S. (2008). Nanomedicine—Drivers for Development and Possible Impacts (JRC46744) [EUR - Scientific and Technical Research Reports].
 OPOCE. https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/11111111/2859
- Wan, L.-Y., Yuan, W.-F., Ai, W.-B., Ai, Y.-W., Wang, J.-J., Chu, L.-Y., Zhang, Y.-Q., & Wu, J.-F. (2019). An exploration of aptamer internalization mechanisms and their applications in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 16(3), 207-218. https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1575808

Wehner, P., Shnitsar, I., Urlaub, H., & Borchers, A. (2011). RACK1 is a novel interaction

partner of PTK7 that is required for neural tube closure. *Development (Cambridge, England)*, 138(7), 1321-1327. https://doi.org/10.1242/dev.056291

- Weissleder, R., & Mahmood, U. (2001). Molecular Imaging1. *Radiology*. https://doi.org/10.1148/radiology.219.2.r01ma19316
- Willmann, J. K., van Bruggen, N., Dinkelborg, L. M., & Gambhir, S. S. (2008). Molecular imaging in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(7), 591-607. https://doi.org/10.1038/nrd2290
- Xiao, Z., Shangguan, D., Cao, Z., Fang, X., & Tan, W. (2008). Cell-specific internalization study of an aptamer from whole cell selection. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 14(6), 1769-1775. https://doi.org/10.1002/chem.200701330
- Zhao, J., Chen, J., Ma, S., Liu, Q., Huang, L., Chen, X., Lou, K., Wang, W. (2018). Recent developments in multimodality fluorescence imaging probes. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(3), 320–338. https://doi:10.1016/j.apsb.2018.03.010
- Zhang, H., Wang, A., Qi, S., Cheng, S., Yao, B., & Xu, Y. (2014). Protein Tyrosine Kinase 7 (PTK7) as a Predictor of Lymph Node Metastases and a Novel Prognostic Biomarker in Patients with Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), 11665-11677. https://doi.org/10.3390/ijms150711665
- Zhao, N., Qin, Y., Liu, H., Cheng, Z. (2018). Tumor-Targeting Peptides: Ligands for Molecular Imaging and Therapy. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 18(1), 74–86. doi:10.2174/1871520617666170419143459
- Zununi Vahed, S., Salehi, R., Davaran, S., & Sharifi, S. (2017). Liposome-based drug codelivery systems in cancer cells. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 71, 1327-1341. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.073