

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, FACULTAD DE CIENCIAS
Centro de Investigaciones Nucleares (CIN)

**“Investigación y desarrollo
de distintas estrategias para
la marcación de sistemas
liposomales con ^{99m}Tc ”**

Tesina de Grado de la Licenciatura en Bioquímica

Nicole Valerie Lecot Calandria

Noviembre 2011

Tutores:

Dr. Williams Porcal (Laboratorio de Química Orgánica, IQB, Facultad de Ciencias, UdelaR).

Dr. Pablo Cabral (Área Radiofarmacia, CIN, Facultad de Ciencias, UdelaR).

ÍNDICE

1. RESUMEN	4
2. OBJETIVO	5
3. INTRODUCCIÓN	6
3.1 CÁNCER	8
3.1.1. Angiogenésis tumoral	10
3.1.2. Nanotecnología y cáncer	13
3.1.3. Angiogénesis como “blanco de los liposomas”	14
3.2. LIPOSOMAS	15
3.2.1. Propiedades de los liposomas	15
3.2.2. Liberación controlada de fármacos	16
3.2.3. Liposomas convencionales	17
3.2.4. Liposomas de larga vida media en circulación	18
3.2.5. Liposomas y nódulos linfáticos	20
3.2.6. Formación de los liposomas por agitación y extrusión	20
3.2.7. Vías de administración de los liposomas	22
3.3. TÉCNICAS DE IMAGEN MOLECULAR	22
3.4. RADIOFÁRMACOS	24
3.4.1 Química del ^{99m}Tc	24
3.4.2 Radiofármacos de ^{99m}Tc	26
3.4.3 Estrategias de marcación con ^{99m}Tc	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS	31
4.1 MATERIALES	31
4.2 EQUIPOS	32
4.3 SÍNTESIS ORGÁNICA	33
4.3.1 Síntesis de Agentes Bifuncionales	33
4.3.1.1 Proceso sintético de Suc-HYNIC-hidrazona	33
4.3.1.2 Proceso sintético de Estearilamida-HYNIC-hidrazona	35

4.3.1.3 Proceso sintético de HYNIC-TFA	35
4.3.2 Preparación de liposomas	36
4.3.2.1 Formación de las vesículas por extrusión	36
4.3.2.2 Caracterización de liposomas	36
4.3.2.3 Distribución de tamaño	37
4.3.2.4 Optimización de la Marcación con ^{99m} Tc	37
4.3.2.5 Estabilidad in vitro de ^{99m} Tc-HYNIC-liposomas	38
4.3.2.6 Biodistribuciones Biológicas	38
4.3.2.7 Estudio centellográfico	39
5. RESULTADOS	40
5.1 SÍNTESIS DE AGENTES BIFUNCIONALES	40
5.1.1 Síntesis de Suc-HYNIC-hidrazona	40
5.1.2 Síntesis de Estearilamida-HYNIC-hidrazona	42
5.1.3 Síntesis de HYNIC-TFA	44
5.2 Obtención y caracterización de las formulaciones liposomales	45
5.3 Relación de Tricina/ SnF ₂	46
5.4 Controles de estabilidad de ^{99m} Tc-HYNIC-Liposomas	46
5.5 Estudios de biodistribución	49
5.5.1 Estudio de biodistribución en ratones C57BL/6 normales	49
5.5.2 Estudio de biodistribución en ratones portadores de Melanoma	53
5.6 Estudios centellográficos	56
6. DISCUSIÓN	57
7. CONCLUSIÓN	60
8. BIBLIOGRAFÍA	61
9. AGRADECIMIENTOS	66

1. RESUMEN

Los liposomas son sistemas supramoleculares autoensamblables nanoparticulados, formados por una o varias capas fosfolipídicas encerrando un volumen acuoso. Dependiendo del tamaño de estos, se pueden dirigir selectivamente a compartimientos determinados del organismo, como ser una formación tumoral. En base a esta propiedad, la presente propuesta de trabajo involucró la I+D de estrategias de formulación y marcación de liposomas con el radionucleido ^{99m}Tc y su evaluación primaria *in vivo* como potenciales radiofármacos de diagnóstico oncológico.

En el presente trabajo nos planteamos llevar a cabo una síntesis asistida por microondas de un derivado lipídico esterilamida adecuadamente unido al ligando bifuncional HYNIC, lo cual nos permitiría tanto la formación del sistema liposomal como posteriormente una marcación estable con el radionucleido ^{99m}Tc .

Los derivados del azaheterociclo HYNIC son ampliamente utilizados como agentes bifuncionales en la síntesis de radiofármacos con ^{99m}Tc . Dado que el grupo hidrazino libre de HYNIC es altamente nucleofílico y presenta una alta susceptibilidad a dar reacciones de oxidación por acción de la luz, es necesario prevenir la descomposición o degradación del conjugado mediante una adecuada protección de este grupo. En este sentido, la utilización de los grupos protectores hidrazona y trifluoroacetilo (TFA) tienen como ventaja que su formación puede darse eficientemente en un medio anhidro y posteriormente durante el proceso de radiomarcado en medio acuoso se lleva a cabo la desprotección y formación del complejo con ^{99m}Tc *via* hidrazino libre en un solo paso.

A partir del derivado estearilamida-HYNIC-hidrazona se obtuvieron dos formulaciones liposomales presentando ambas tamaño nanométrico. Las marcaciones con ^{99m}Tc presentaron una pureza radioquímica superior al 90%, siendo estables *in vitro* por al menos 24 h post marcado. Se hicieron estudios *in vivo* de biodistribución en ratones normales y portadores de melanoma, los cuales mostraron estabilidad del radiomarcado *in vivo* y acumulación tumoral. Con respecto a este último punto, se pudo evidenciar mediante imágenes centellográficas en ratones portadores de melanoma inducido una adecuada acumulación tumoral para ambas formulaciones liposomales marcadas con ^{99m}Tc .

Así, estas nanoestructuras presentan un alto potencial como agente de diagnóstico de procesos tumorales por métodos no invasivos, siendo los datos obtenidos muy alentadores para continuar con esta línea de investigación.

2. OBJETIVO

El objetivo de éste trabajo es evaluar distintas estrategias de formulación y marcación de sistemas liposomales con ^{99m}Tc como potenciales radiofármacos para diagnóstico oncológico.

3. INTRODUCCIÓN

La palabra "**nanotecnología**" es usada extensivamente para definir las ciencias y técnicas que se aplican a un nivel de nanoescala, esto es una medida extremadamente pequeña "nano" que permite trabajar y manipular las estructuras moleculares y sus átomos. El desarrollo de esta disciplina se produce a partir de las propuestas de Richard Feynman (1). A continuación se describe una breve cronología acerca de la historia de la nanotecnología:

Fecha	Acontecimiento
Los años 40	Von Neuman estudia la posibilidad de crear sistemas que se auto-reproducen como una forma de reducir costes.
1959	Richard Feynmann habla por primera vez en una conferencia sobre el futuro de la investigación científica: "A mi modo de ver, los principios de la Física no se pronuncian en contra de la posibilidad de maniobrar las cosas átomo por átomo".
1966	Se realiza la película "Viaje alucinante" que cuenta la travesía de unos científicos a través del cuerpo humano. Los científicos reducen su tamaño al de una partícula y se introducen en el interior del cuerpo de un investigador para combatir el tumor que le esta afectando. Por primera vez en la historia, se considera esto como una verdadera posibilidad científica. La película es un gran éxito.
1985	Se descubren los buckminsterfullerenes
1989	Se realiza la película "Cariño he encogido a los niños", una película que cuenta la historia de un científico que inventa una máquina que puede reducir el tamaño de las cosas utilizando láser.
1996	Sir Harry Kroto gana el Premio Nobel por haber descubierto fullerenes

1997	Se fabrica la guitarra más pequeña el mundo. Tiene el tamaño aproximadamente de una célula roja de sangre.
1998	Se logra convertir a un nanotubo de carbón en un nano lápiz que se puede utilizar para escribir
2001	James Gimzewski entra en el libro de récords Guinness por haber inventado la calculadora más pequeña del mundo

www.euroresidentes.com/futuro/nanotecnologia/diccionario/nanomedicina.htm

Dentro de la Nanotecnología, una de las áreas de mayor desarrollo ha sido la nanomedicina, esta es una de las vertientes más prometedoras dentro de los potenciales nuevos avances tecnológicos en la medicina. Podríamos aventurar una definición ubicándola como rama de la nanotecnología que daría la posibilidad de tratar enfermedades desde el interior del cuerpo a nivel celular o molecular.

Se considera que determinados campos pueden ser objeto de una legítima revolución, especialmente en: la monitorización (imágenes), reparación de tejidos, el control de la evolución de las enfermedades, defensa y mejora de los sistemas biológicos humanos; ya sea en el diagnóstico, tratamiento y prevención, alivio del dolor, administración de fármacos a las células, etc. Todos ellos constituirían nuevos avances tecnológicos en la medicina que la posicionarían en una nueva era científica (2).

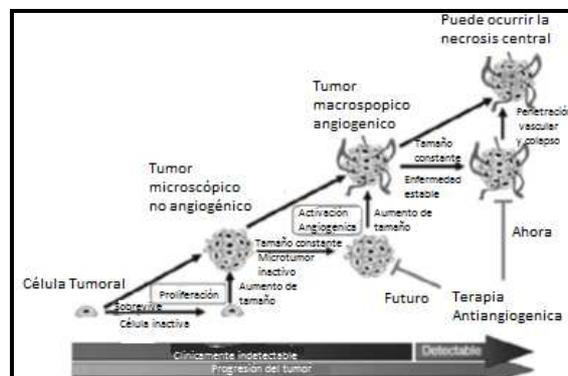
En la actualidad, esta área presenta un gran desarrollo en aplicaciones biomédicas, especialmente en tecnología farmacéutica como sistemas de liberación controlada de fármacos. Estos sistemas se caracterizan en cuanto a sus propiedades de vectorizar fármacos, péptidos, genes y radionucleidos dirigidos a células o tejidos específicos. El tamaño nanométrico de estos sistemas les posibilita atravesar las barreras biológicas, aumentando la tolerancia, captura y transporte tisular, tornándolos eficientes para la liberación de fármacos hacia sitios específicos como hígado, cerebro y pulmones. En particular, se han descrito aplicaciones para el transporte de radionucleidos en forma selectiva a determinados sitios del organismo de manera de poder realizar diagnóstico a través de imágenes centellográficas o radioterapia dirigida debido a las altas actividades específicas que se podrían lograr en estos sistemas (3).

3.1 CÁNCER

El cáncer se caracteriza por presentar un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos. El cáncer, que puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal, no es una enfermedad única sino un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y célula de origen. Existen varios cientos de formas distintas, siendo tres los principales subtipos:

- Los sarcomas, estos proceden del tejido conectivo como huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo.
- Los carcinomas, los que proceden de tejidos epiteliales como la piel o los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales, y de los tejidos glandulares de la mama y próstata. Los carcinomas incluyen algunos de los cánceres más frecuentes. Los carcinomas de estructura similar a la piel se denominan carcinomas de células escamosas. Los que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas.
- Las leucemias y los linfomas, que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras.

Los tumores pueden ser clasificados como benignos o malignos, a los primeros no se los considera como cancerígenos dado que las células no tienen la capacidad de invasión y destrucción de otros órganos. En los segundos, sus células si poseen la capacidad de invasión de los tejidos circundantes y de esta forma tienen la capacidad de diseminarse en otros órganos del cuerpo, formando de esta forma los tumores secundarios (metástasis) (4).



Esquema 1. Pasos limitantes en la progresión tumoral. (Darren W.Davis, Roy S. Herbst, James L. Abbruzzese. (2007). Antiangiogenic Cancer Therapy,CRC Press. 1: 4-6.).

El cáncer lo constituye todo tumor maligno que se caracteriza por una multiplicación anormal y desordenada de células, las cuales tienen la característica de invadir los tejidos adyacentes (metástasis). El principal atributo de los tumores malignos es su capacidad de diseminación fuera del lugar de origen. La invasión de los tejidos vecinos puede producirse por extensión o infiltración, o a distancia, produciendo crecimientos secundarios conocidos como metástasis. La localización y vía de propagación de las metástasis varían en función del tumor primario. Cuanto más agresivo y maligno es un tumor, menos recuerda a la estructura del tejido del que procede, pero la tasa de crecimiento tumoral depende no sólo del tipo celular y grado de diferenciación, sino también de factores dependientes del huésped. Una característica de malignidad es la heterogeneidad celular del tumor. Debido a las alteraciones en la proliferación celular, las células cancerosas son más susceptibles a las mutaciones.

Además, es considerado como una afección causada por mutaciones en el ADN, que las células no son capaces de reparar, provocando de esta forma alteraciones en su funcionamiento normal que provocarán cambios morfológicos y una proliferación celular descontrolada. Esto estimula la transformación de las células normales en anormales, denominadas comúnmente como, “células tumorales malignas”.

Dichas células tumorales posteriormente experimentan cambios progresivos en su fenotipo y atravesarán por tres etapas distintas:

I) La primera etapa, se caracteriza por un aumento de la tasa de proliferación celular y un descenso en la tasa de apoptosis, causando de esta forma un aumento de la masa tumoral.

II) En la segunda etapa, ocurre una invasión del tejido que rodea dicha masa tumoral y acontece el proceso conocido con el nombre de “angiogénesis”, este proceso es clave para el posterior crecimiento del cáncer. Para que un tumor pueda seguir desarrollándose hacia un fenotipo maligno y mortal es necesario el reclutamiento y el mantenimiento de su propio suministro sanguíneo para así lograr evadir la inanición y superar la falta de distribución de oxígeno y nutrientes, proceso conocido como “angiogénesis tumoral” (5,6). La angiogénesis conducirá a la siguiente etapa.

III) La tercera etapa consiste en la neo-vascularización del tumor, provocando su crecimiento rápido y promoviendo la formación de metástasis. Las metástasis son una migración anormal de las células tumorales desde el sitio tumoral primario, vía sanguínea o linfática, hacia los órganos dístales con la consecuente formación de los tumores secundarios (7). Este último

proceso, por lo general, causa la muerte del enfermo por medio de la disrupción de la función de los órganos vitales o sistemas.

3.1.1. Angiogenesis tumoral

La generación de nuevos capilares desde vasos sanguíneos preexistentes es llamado angiogenesis. El proceso de angiogenesis toma lugar durante la embriogenesis y en el adulto, por ejemplo, en el sistema reproductivo de la mujer y en repetidas lastimaduras.

Adicionalmente, la angiogenesis ocurre en condiciones patológicas como cáncer, degeneración de la mácula, psoriasis y artritis reumatoidea. La angiogenesis y la progresión del tumor están estrechamente vinculadas. Las células tumorales dependen de la angiogenesis porque su crecimiento y expansión requiere oxígeno y nutrientes, los cuales pueden estar disponibles a través de la vasculatura angiogénica.

Estudios del desarrollo tumoral han mostrado que una alteración en la llegada de sangre puede notoriamente afectar el crecimiento de tumor y la formación de metástasis. Así, una disminución en la perfusión de sangre resulta en una regresión del tumor. Diferentes células y factores estimulantes juegan su papel en la angiogenesis.

Algunas de las células involucradas son: las células endoteliales, linfocitos, macrófagos y mastocitos. Los dos factores preangiogénicos con mayor nivel son: el de crecimiento vascular (VEGF) y el de crecimiento de fibroblastos (EGF). Ambos, células y factores juegan diferentes roles durante la angiogenesis del tumor (8). El proceso consta de dos fases: activación y formación. Durante la fase de activación, los factores de crecimiento son producidos.

Cuando condiciones como la hipoxia están presentes en el tejido tumoral, las células comienzan a producir el factor de hipoxia inducible (HIF-1) el cual induce angiogenesis. En una primera etapa, la membrana basal de vasos preexistentes es degradada por proteasas (Figura 1).

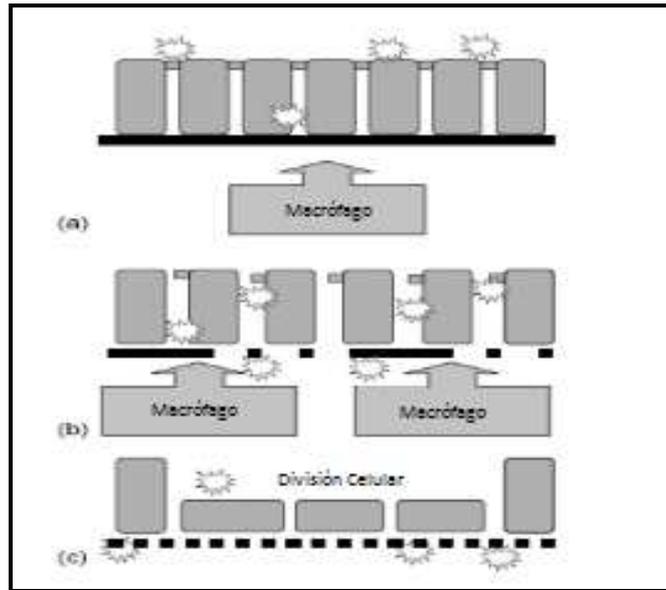


Figura 1- Efecto de estímulos químicos pro inflamatorio en la barrera epitelial.

(a) Una variedad de estímulos puede iniciar la liberación de citoquinas pro- inflamatorias (ej, $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$) de los macrófagos y otras células. La predisposición genética puede amplificar estas respuestas. (b) La liberación de citoquinas pro inflamatorias actúan abriendo las uniones estrechas (UE), permitiendo la entrada adicional de más factores estimulantes, en consecuencia, atrayendo más células asociadas a la inflamación. (c) La inflamación crónica provoca la ruptura de la membrana basal, la pérdida de función de las UE y desorganización de la característica de tejido epitelial con un estado pre neoplásico.

Luego de la disrupción de la membrana, las células endoteliales que cubren la pared interna del vaso sanguíneo son habilitadas a migrar desde el vaso preexistente hacia la zona angiogénica proliferante. Durante la fase de formación, las células endoteliales, luego de la migración, son estructuradas en tubos para formar estructuras similares a los capilares, las cuales maduran a formas funcionales y luego la afluencia de sangre es iniciada (Figura 2).

A - Durmiente/latente.

B - Separación/destacamento

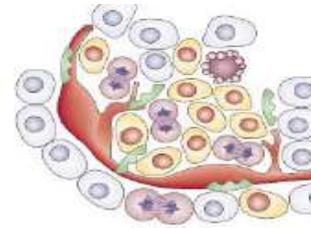
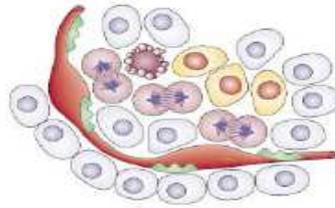
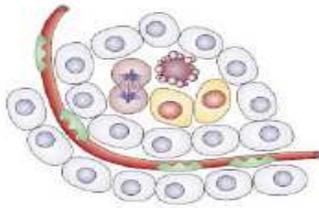
C - Inicio de la

Perivascular y dilatación

brotación

Vascular.

angiogénica.



D - Brotación continua:

E - Vasculatura Tumoral

Formación de nuevos vasos

Y Maduración; reclutamiento

de células perivasculares

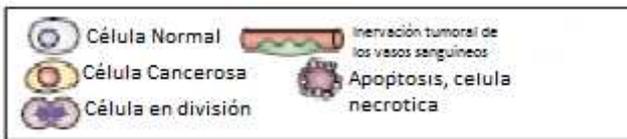
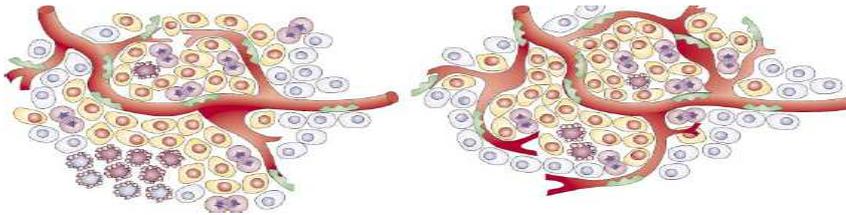


Figura 2- El “cambio angiogénico”. El cambio angiogénico es un paso discreto en el desarrollo tumoral que puede ocurrir en diferentes etapas de la vía de progresión tumoral, en función de la naturaleza del tumor y su microambiente. La mayoría de los tumores comienzan a crecer como nódulos (durmientes) avasculares (A) hasta que llegan a un nivel de equilibrio entre células proliferantes y apoptóticas. La iniciación de la angiogénesis, o del “cambio angiogénico”, tiene que ocurrir para garantizar el crecimiento exponencial del tumor. El cambio comienza con el destacamento perivascular y la dilatación de los vasos (B), seguido de la brotación angiogénica (C), la formación y maduración de nuevos vasos sanguíneos, y el reclutamiento de células perivasculares (D). La formación de vasos sanguíneos continuará mientras el tumor crezca, y los vasos sanguíneos alimenten específicamente las áreas hipóxicas y necróticas del tumor para proporcionarle los nutrientes y oxígeno esenciales. (Bergers G and Benjamín LE. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Rev Cancer* 3: 401-409).

3.1.2. Nanotecnología y cáncer

La nanotecnología tiene gran potencial de investigación en cáncer, pudiendo mejorar estudios moleculares con imágenes, la detección temprana, prevención y tratamiento.

El uso de dichas herramientas permitirá que investigadores puedan estudiar y alterar los múltiples sistemas que fallan en el proceso del cáncer e identificar “puntos clave de obstrucción” bioquímicos y genéticos hacia los cuales se puedan dirigir con mayor eficacia nuevas terapias moleculares.

En el estudio molecular con imágenes y detección temprana, la nanotecnología puede tener un impacto al cambiar el paradigma de cómo los investigadores clínicos detectarán el cáncer en sus primeros estadios. La nanotecnología se está usando para detectar biomarcadores, lo cual puede ayudar a investigadores en el estudio molecular con imágenes de lesiones malignas y permitir a los médicos ver células y moléculas que no son detectables por métodos convencionales de estudios de imágenes. Además, el desarrollo de nanopartículas fotoluminiscentes podrían ayudar a oncólogos a distinguir entre células cancerosas y normales (14,15).

En prevención y control los avances impulsados por iniciativas del INC (Instituto Nacional del Cancer) en proteómica y bioinformática facilitarán que investigadores identifiquen marcadores de susceptibilidad de cáncer y lesiones precancerosas. Por otra parte, la nanotecnología podría ser aplicada para crear dispositivos capaces de señalar cuando dichos marcadores aparecen en el organismo y administrar sustancias para invertir cambios pre- malignos o destruir aquellas células que podrían convertirse en cancerígenas (16).

En el área terapéutica, debido a su capacidad multifuncional, las nanoestructuras pueden ser dirigidos selectivamente y contener altas concentraciones de fármacos lo que posibilita concentraciones terapéuticas adecuadas en las formaciones tumorales.

Es posible que la nanoterapia “inteligente” pueda proveer a los investigadores clínicos la habilidad para calcular cuánto tiempo toma la liberación de un fármaco anti tumoral, administrar múltiples fármacos en secuencia a intervalos regulados o a distintas áreas del organismo (9).

3.1.3. Angiogénesis como “blanco de los liposomas”

Las estrategias de dianas o blancos dirigidas con nanopartículas comprenden únicas y peculiares propiedades de los tumores. Dos de dichas propiedades son la vasculatura aberrante y el ambiente metabólico propio producido por un suplemento insuficiente de sangre debido a dicha vasculatura. La neovascularización es un prometedor sitio blanco de nanopartículas. Una vez que el tumor alcanza un tamaño de 1 cm^3 necesita de vasculatura para tener un aporte de oxígeno y remover los productos para su supervivencia. Los tumores sólidos típicamente crecen a un paso tan rápido que la función de la vasculatura comienza a fallar al tratar de mantener los requerimientos metabólicos locales. Esta situación, sumada a la presión reducida de oxígeno y bajo pH da como resultado una pérdida en el clearance de ácidos, lo cual está asociado a los centros necrosados de los tumores grandes. Estudios han mostrado que las células tumorales logran adaptarse satisfactoriamente a crecer en estas condiciones, proveyendo de ésta manera características únicas que deben ser explotadas para alcanzar los tumores.

Frecuentemente, las células tumorales constan con una mayor glicólisis que un metabolismo oxidativo para la producción de energía. Este hecho es consistente con la reducida presión de oxígeno o la pobre perfusión en los tumores. Estas condiciones podrían resultar en la formación de ácido glicólico y productos que no están siendo efectivamente drenados por el pobre torrente sanguíneo a través de los capilares de la vasculatura tumoral. En consecuencia, afortunadamente, los tumores tienen vasos sanguíneos más débiles que los vasos normales. De ahí que un mecanismo favorecido para alcanzar los tumores es tomar la ventaja de la natural debilidad de los vasos sanguíneos tumorales para ciertas nanopartículas como ser los liposomas. Este sistema de transporte alcanza la localización simplemente por acumulación pasiva (17) (Figura 3).

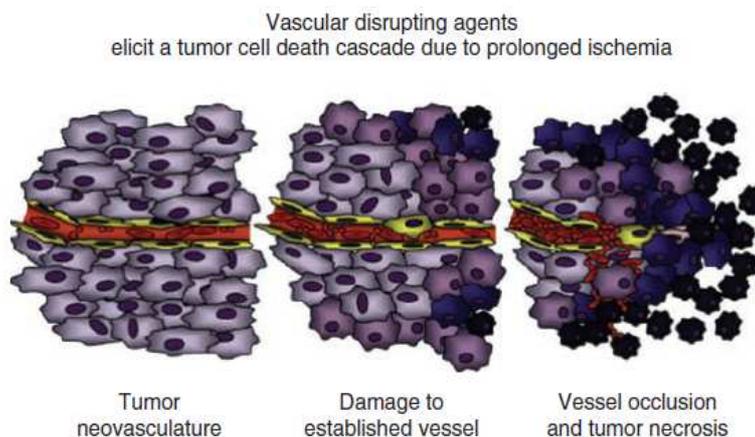


Figura 3. Etapas del crecimiento tumoral

3.2. LIPOSOMAS

3.2.1. Propiedades de los liposomas

Los liposomas son estructuras supramoleculares autoensamblables formados por bloques anfipáticos, los fosfolípidos. La bicapa fosfolipídica crea una estructura que encierra uno o varios espacios acuosos capaces de incorporar moléculas hidrofílicas o ligeramente hidrofóbicas, tanto neutras como con carácter ácido/base débil.

Los liposomas presentan varias ventajas sobre otros sistemas o tecnologías de liberación controlada de fármacos SLCF (estrategias dirigidas a controlar la distribución temporal y/o espacio-temporal de un fármaco en el cuerpo). Son sistemas que no están en equilibrio termodinámico, por lo que son capaces de resistir cambios en las condiciones del medio. Por ejemplo no se desmantelan ante la dilución, al menos dentro de un rango amplio de concentraciones de lípidos, y se autoensamblan independientemente de la cantidad de fosfolípidos presentes en el medio, sin necesitar una concentración crítica para su formación. Contrariamente, las micelas (otro tipo de SLCF) se hallan en equilibrio termodinámico por lo que un pequeño cambio en las condiciones del medio causa importantes transformaciones en estos sistemas.

Los liposomas también pueden funcionar como estructuras “gatillables”, cambiando sus propiedades físicas, como la permeabilidad de la bicapa, la fase de la membrana y/o la integridad de la estructura, en respuesta a pequeños estímulos externos. Este es el caso de los liposomas pH-sensibles que se agregan, desestabilizan y/o fusionan ante el descenso del pH, o los liposomas catiónicos que cambian su estructura al interactuar con los ácidos nucleicos.

La estructura liposomal puede ser racionalmente diseñada con extrema versatilidad, por ejemplo:

a) Seleccionando la naturaleza química de los lípidos componentes, empleando cadenas acíclicas de fosfolípidos de distinto número de átomos de C, las que a su vez pueden ser lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas y variando la carga y tamaño del grupo polar.

b) Controlando el número de lamelas (bicapas lipídicas) en las vesículas.

c) Reduciendo y homogeneizando, cuando fuera necesario, el tamaño medio de la población vesicular.

d) Anclando a la superficie liposomal diferentes moléculas de bajo peso molecular o polímeros. La naturaleza química y la relación de las mezclas lipídicas utilizadas para preparar los liposomas determinarán la carga neta de la vesícula (a una fuerza iónica determinada), la fluidez de la membrana y por lo tanto la exposición de defectos hidrofóbicos en la superficie. La lamellaridad y el tamaño de la población liposomal obtenida dependerán de los métodos de preparación, que son en general, sencillos.

En resumen, los liposomas tienen un gran poder de solubilización y capacidad de incorporar fármacos de distintas características físico-químicas. Adicionalmente son no tóxicos y en general a diferencia de lo que ocurre con las micro o nano partículas poliméricas, los lípidos que componen los liposomas se degradan de manera segura sin generar sub-productos tóxicos.

Los liposomas pueden transportar diversas sustancias entre el exterior y el interior de la célula, como medicamentos y cosméticos. Incluso se utilizan en biotecnología y en algunos casos de terapia génica para introducir genes de un organismo en otro diferente (3).

El desarrollo racional de liposomas es fundamental para poder desarrollar una forma farmacéutica eficaz para el tratamiento a cual se vaya a dirigir. Además y con especial énfasis el desarrollo de formulaciones liposomales como herramientas en el campo de la imagenología molecular a través de la obtención de nuevos potenciales radiofármacos de diagnóstico.

3.2.2. Liberación controlada de fármacos

Para la mayoría de los fármacos de uso habitual existe un compromiso entre eficacia y efectos tóxicos. Enumeraremos a continuación algunos de los factores que limitan el comportamiento óptimo de un fármaco:

a) Las bajas concentraciones sanguíneas obtenidas luego de la administración oral pueden resultar en parte, de su dificultad para atravesar el epitelio intestinal. Una vez absorbidos, la mayor parte de los fármacos se inactivan por acción de enzimas hepáticas. Este “efecto de primer paso” implica que se deban administrar altas dosis para obtener niveles terapéuticos.

b) Los fármacos administrados por vía endovenosa (e.v.) son de elevado costo, se aplican con dificultad (no pueden ser auto-administrados) y son poco aceptados por los pacientes, sobre todo para tratamientos crónicos.

Ambas rutas de administración (oral y e.v.) generan niveles fluctuantes del fármaco en sangre, y esto es potencialmente peligroso. Por ejemplo, muchos agentes terapéuticos desarrollados

recientemente son extremadamente potentes y por lo tanto, debe controlarse cuidadosamente sus dosis para prevenir toxicidades.

c) La ausencia de selectividad sobre blancos terapéuticos se evidencia en áreas diversas como la quimioterapia del cáncer y la inmunología; los fármacos citostáticos dañan tanto las células malignas como aquellas células normales que se dividen rápidamente.

d) La desaparición prematura de los fármacos, ya sea porque son rápidamente capturados por tejidos que no son sus blancos terapéuticos o porque son metabolizados y excretados, impide que ejerzan su acción.

Por otro lado, los recientes avances en la comprensión de la estructura tridimensional de los fármacos y la relación estructura-actividad podrían contribuir a crear nuevas entidades moleculares capaces de actuar sobre sus blancos de manera específica, sin generar reacciones adversas. Sin embargo, estos fármacos diseñados específicamente y testeados *in vitro* por lo general fallan cuando son probados *in vivo*, lo que pone de manifiesto la importancia que tiene el poder direccionar un fármaco desde su portal de entrada hasta su sitio de acción y controlar las interacciones que median este proceso.

A partir de la incorporación en sistemas transportadores o vehículos (como los liposomas, dendrímeros, etc), han disminuido los efectos tóxicos de los fármacos y al mismo tiempo mejorado su actividad terapéutica (3,4).

3.2.3. Liposomas convencionales.

Los liposomas convencionales característicamente están compuestos de fosfolípidos (neutros y/o con carga neta negativa) y/o colesterol. Pueden variar en tamaño, composición lipídica, carga superficial, número y fluidez de las bicapas fosfolipídicas.

De acuerdo a su tamaño y lamelaridad, a su vez los liposomas se clasifican en (Tabla 1):

a) Vesículas multilamelares grandes (MLV), con un diámetro entre 500 nm y varios micrones; con varias lamelas internas.

b) Vesículas unilamelares grandes (LUV), con diámetros entre 100 y 400 nm.

c) Vesículas unilamelares de tamaño intermedio (IUV), con diámetros del orden de los 100 nm

d) Vesículas unilamelares pequeñas (SUV), que poseen el mínimo tamaño vesicular posible, pudiendo presentar diámetros entre 12 nm (lecitina de soja pura en solución salina) y 25 nm (dipalmitoil fosfatidilcolina, DPPC).

Tabla 1. Clasificación de los liposomas

Número de bicapas		Diámetro	Propiedades
Unilaminares (liposomas formados por una única bicapa)	SUV (vesículas unilaminares de pequeñas dimensiones) 	20-80 nm	<ul style="list-style-type: none"> - Debido a su elevado radio de curvatura, una elevada proporción de fosfolípidos se halla en la monocapa externa - Presentan una importante relación superficie/lípido - Dado que el porcentaje de encapsulación es bajo, no se recomienda para moléculas hidrosolubles
	LUV (vesículas unilaminares de grandes dimensiones) 	80 nm-1 µm	<ul style="list-style-type: none"> - Presentan una elevada capacidad de encapsulación - El elevado volumen del compartimento interno permite la encapsulación de moléculas hidrosolubles con eficacia
Plurilaminares (liposomas formados por varias bicapas)	MLV (vesículas multilaminares) 	400 nm- varios µm	<ul style="list-style-type: none"> - Existen variantes de MLV, tales como: <ul style="list-style-type: none"> • REV (Reverse-phase Evaporation Vesicles)  • SPLV (Stable Plurilamellar Vesicles)  • MVL µmultivesicular Liposomes 

Los liposomas pueden ser administrados por distintas rutas y la vía de entrada determinará su destino *in vivo*. Cuando la vía de administración es la intravenosa (i.v.) los sucesos de mayor importancia luego de la inyección de liposomas son: la dilución que sufren en sangre y su rápida eliminación de circulación por desestabilización mediada por proteínas plasmáticas y/o por fagocitosis.

3.2.4. Liposomas de larga vida media en circulación.

En situaciones donde la permeabilidad vascular se halla incrementada, los liposomas convencionales son rápidamente capturados mayoritariamente por el hígado y bazo.

Esta rápida y eficiente eliminación de los liposomas en circulación sanguínea ha dificultado su aplicación al tratamiento de una variedad de enfermedades donde existen otros tejidos blancos distintos a los órganos ya mencionados. Sin embargo, desde principio de los años 90 el advenimiento de formulaciones liposomales que pueden circular durante más tiempo en el torrente sanguíneo revivió el interés por los liposomas como SLCF. Los liposomas de larga vida

media en circulación tienen mayores posibilidades de extravasar hacia los tejidos donde la permeabilidad de la pared vascular está localmente aumentada. Como ya se mencionó, las regiones de aumento de permeabilidad capilar incluyen áreas patológicas como los tumores sólidos y sitios de infección e inflamación. En estos casos luego de extravasar, los liposomas se acumulan en la vecindad de células blanco, que en su mayoría no son fagocíticas. Allí los liposomas pueden actuar como bombas de liberación del fármaco encapsulado o bien ser endocitados si son lo suficientemente pequeños; esta estrategia se conoce como “blanco pasivo (o tarjeting, en inglés)”.

La forma más sencilla de obtener liposomas de larga vida media en circulación es unir covalentemente un polímero hidrofílico como el polietilenglicol (PEG) o ácidos polisiálicos a la superficie externa de los liposomas. Los liposomas cubiertos con PEG se denominan “stealth” o “estéricamente estabilizados”. El primer término se refiere a su capacidad de evadir el Sistema Retículo Endotelial (SRE), el segundo al mecanismo de estabilización estérica responsable del aumento de la vida media en sangre de estas partículas.

Datos experimentales indican que los liposomas cubiertos con PEG de larga vida media en circulación deben tener preferentemente un orden de tamaños entre 70 a 200 nm y contener de 3 a 7 % molar de metoxi-PEG 2000 (peso molecular del PEG) unido al fosfolípido diestearoil fosfatidiletanolamina (DSPE) o dipalmitoil-etanolamina (DPPE)(18, 19,20,21). La incorporación de altas concentraciones de colesterol (por sobre 30%) a las membranas liposomales puede aumentar la protección superficial otorgada por el PEG, debido a un aumento de la fuerza en la cohesión de la bicapa y por lo tanto, una reducción en la formación de fases separadas en las lamelas (22). La vida media en circulación de estas vesículas es de 15 a 24 h en roedores y hasta 45 h en humanos.

Hasta hoy, estas son las partículas de larga circulación que han rendido resultados más alentadores. Además de los derivados lipídicos del PEG, se han desarrollado otros materiales alternativos para prolongar el tiempo de circulación de los liposomas, como por ejemplo derivados fosfatidilgliceroles y fosfolipídicos de los polímeros anfífilicos polivinil pirrolidona, polivinil alcohol, poli 2-metil-2-oxazolino, poli 2-etil-2-oxazolino poliacrilamida y N-(2-hidroxilpropil) metacrilamida (24,25,26,27,28,30). También es posible recubrir liposomas con derivados de la quitina, como carboximetilquitina y carboximetil /glicoquitina (23).

La adsorción de carboximetilquinina (peso molecular 101000) sobre la superficie de liposomas neutros resultó en la estabilización electrostática de las vesículas y también proporciona una barrera efectiva frente a la adsorción de proteínas del plasma (23), pero no se ha evaluado su comportamiento *in vivo*.

3.2.5. Liposomas y nódulos linfáticos

Además de su rol protector en circulación sanguínea, la estabilización estérica también tiene utilidad en la administración por otras rutas, por ejemplo, cuando los liposomas son inyectados vía intramuscular (i.m.) o vía subcutánea (s.c.) quedan en el sitio de inyección funcionando como depósitos de fármacos. Partículas menores de 100 nm drenan atravesando las paredes delgadas y fenestradas de la microvasculatura linfática hacia los nódulos linfáticos. Allí son eliminados por los macrófagos de los senos medulares y de la para corteza (30,31), aunque la localización linfática de las partículas depende del flujo en los vasos linfáticos y de la integridad de los nódulos linfáticos (32). El drenaje de la mayoría del material particulado desde los sitios intersticiales, generalmente toma tiempos largos debido a la floculación en los sitios de inyección como así también por las interacciones de la partícula con la matriz extracelular. El drenaje lento podría hacer a las partículas susceptibles a la fagocitosis en el sitio de inyección. Para eliminar este problema, los liposomas se estabilizaron estéricamente con polímeros hidrofílicos, de un modo similar a los liposomas de larga vida media en circulación (33). Las partículas drenadas escapan de la eliminación macrofágica y alcanzan la circulación sistémica donde permanecerán por períodos prolongados (33,34).

3.2.6. Formación de los liposomas por agitación y extrusión

Los films de vesículas multilamelares de lípidos secos depositados en las paredes de un balón se forman a partir de la adición de un exceso de fase acuosa y agitación mecánica. Cuando los films de lípidos secos son hidratados, la lámina absorbe y crece bajo la forma de finos tubos de lípidos. Por lo general no se separan del soporte, solamente con la agitación mecánica (por medio de un vortex, agitador, etc) se logra que los finos tubos de lípidos se quiebren y expongan sus regiones hidrofóbicas, lo que lleva a la formación del liposoma propiamente dicho (MLV).

Las MLV sin procesar tienen un uso muy limitado en la investigación debido a factores como su gran diámetro, heterogeneidad de tamaño (típicamente de 0.5 a 10 μ m), multi-compartimentos internos (ver tabla anterior), bajos volúmenes de atrapamiento e irreproducibilidad de un experimento a otro, lo que ha llevado a la necesidad de recurrir a la extrusión.

Aproximadamente el 10% del total de los lípidos en una preparación de MLV están presentes en la monocapa de la bicapa externa. Un modelo más deseable es el cual simples bicapas encierran un espacio acuoso para formar una vesícula con un radio suficientemente grande, por el cual el 50% de los lípidos totales de membrana se encuentran en la monocapa exterior, la definición típica de una LUV, la cual mejor representa la microscópica bicapa lipídica que forma la membrana plasmática o la de los organelos celulares. Posteriormente el pasaje secuencial de los liposomas a través de filtros de un poro definido genera vesículas unilamelares grandes con un diámetro definido que dependerá del diámetro de poro del filtro. La extrusión puede ser aplicable a una gran variedad de tipos y texturas de lípidos(3). Trabaja directamente sobre vesículas MLV sin la necesidad de una secuencial reducción de tamaño. El tiempo del proceso está en el orden de los minutos y está solamente limitado por la concentración de lípidos.

En el mercado, para trabajar con pequeños volúmenes de preparación de LUV (típicamente menores a 1 ml), se encuentran instrumentales que se pueden adquirir en Avanti Polar Lípidos (12), contruidos con jeringas y soportes para filtros. Como ejemplo, el dispositivo que se utilizó en éste trabajo consiste en dos jeringas Hamilton conectadas por un soporte para filtro, permitiendo el pasaje de la muestra. Empleando ésta técnica, una suspensión diluida de liposomas puede ser pasada a través del filtro para reducir el tamaño de vesícula. Este método presenta la limitación de la presión que puede ser tolerada por el filtro y la jeringa, así como también por la presión que puede ser ejercida de forma manual. Los filtros que han sido seleccionados para la reducción de tamaño de la preparación liposomal son aquellos fabricados de policarbonato, otros materiales alternativos han sido utilizados, pero los elegidos han demostrado ser inertes, duraderos y fáciles de acoplar al soporte sin dañarlos.

A pesar que el preciso mecanismo biofísico de la formación de las vesículas por extrusión este siendo discutido, está claro que las capas concéntricas de una típica MLV, que son apretadas bajo la presión ejercida por el poro del filtro, sufren una ruptura y vuelta a soldar de la membrana. A través de ciclos sucesivos de pasaje de una suspensión de MLV a través de filtros con un poro de 100 nm produce una población homogénea de vesículas con un diámetro de 100 nm usualmente luego de 11 pasajes.

Una práctica común que es introducir ciclos de congelamiento y descongelamiento previo a la extrusión, esto aumenta la proporción de vesículas unilamelares. Diversos estudios han demostrado que esta práctica causa lamelaridad interna en las MLV que tienden a separarse y

vesicularizarse, lo cual probablemente reduce el número de asociaciones por cercanía de las membranas forzadas al pasar juntas a través del poro (3).

3.2.7. Vías de administración de los liposomas

Cuando el blanco terapéutico es un tejido profundo, los liposomas solo pueden acceder a los mismos a través del torrente sanguíneo utilizando las vías de administración más atractivas (oral y tópica), donde los liposomas no ingresan a circulación sistémica. Las principales desventajas de la administración intravenosa (aun siendo la ruta principal de administración liposomal) son su costo y el requerimiento de hospitalización para ser administradas. Sin embargo, debe recalcar que la principal ventaja ofrecida por la transformación de un fármaco libre en su formulación liposomal inyectable es el aumento significativo de su índice terapéutico. Es importante poder ampliar la ventana terapéutica de fármacos que para ejercer su acción requieran de altas dosis o tratamientos prolongados. Es el caso de fármacos con baja selectividad que causan efectos colaterales muy serios y la terapia debe discontinuarse, sobre todo en tratamientos de enfermedades mortales. Hay que tener presente que el cambio de un fármaco libre a su forma liposomal debe ser adecuadamente ventajosa, por ejemplo en reducir las duraciones de tratamiento, aumentar la efectividad o en reducir efectos colaterales y posibilitar el suministro de dosis más altas. En otras palabras, los liposomas deben mejorar la actuación del fármaco libre, para superar las desventajas de la administración intravenosa y del superior costo (3).

3.3. TÉCNICAS DE IMAGEN MOLECULAR

Múltiples son las técnicas de imágenes utilizadas para el abordaje del cáncer. Las imágenes forman parte esencial de los protocolos clínicos, brindando información morfológica, estructural, metabólica y funcional. Actualmente el rol de la imagenología se centra en el screening y seguimiento de la enfermedad, mientras que su rol a futuro se relaciona con aspectos presintomáticos, así como con el desarrollo de terapias dirigidas y menos invasivas. La mayoría de los equipos de imagenología clínica se basan en la interacción de radiación electromagnética con los tejidos y fluidos.

Entre las técnicas que usan radiación electromagnética distinguimos aquellas que utilizan radiación electromagnética no ionizante, como la resonancia magnética nuclear; y aquellas que utilizan radiaciones ionizantes; entre las que encontramos los rayos X y tomografía

computada, rayos gama en la centellografía, tanto la tomografía de fotón único (SPECT: del inglés Single photon emission computed tomography), como la tomografía de emisión de positrones (PET: del inglés photon emission tomography). Los diferentes sistemas varían en sus propiedades de interacción con la materia y presentan diferente sensibilidad y resolución espacial y temporal.

La habilidad de identificar características moleculares de los distintos tipos de tumores in vivo es clave para la comprensión del proceso tumoral sin la perturbación del medio biológico, aportando de esta forma información complementaria a la obtenida por los métodos tradicionales. Es por esto último que la identificación de biomarcadores tumorales y su detección a través del uso de técnicas de imagenología molecular son de gran importancia (36, 37).

En el abordaje de esta tesis, la tomografía computarizada de emisión de fotones únicos (SPECT), es la técnica utilizada ya que nos provee la localización de la fuente de radioactividad en el cuerpo. El tiempo necesario para adquisición de una imagen está comprendido entre 2 segundos y 20 minutos, dependiendo del proceso al cual se le toma la imagen, la cantidad y actividad del radionucleido administrado. El tiempo requerido para una imagen de SPECT es por lo general mayor que para una imagen planar o centellográfica debido a que la cámara debe rotar alrededor del paciente.

El uso de radionucleidos emisores gamma es particularmente ventajoso ya que se pueden tomar imágenes con una gamma cámara. Con éste tipo de imágenes la biodistribución dinámica puede ser monitoreada de una forma no invasiva, usando un computador dispuesto para la toma de imágenes centellográficas con las cuales se analiza y se calcula las curvas de biodistribución de los distintos órganos. Las imágenes centellográficas han dado prueba de ser una herramienta muy útil para mostrar el desarrollo de liposomas como agentes de diagnóstico (17). En particular, esta modalidad de imagen puede ser usada en las siguientes áreas: distribución de liposomas en el organismo; monitoreo de la respuesta terapéutica seguida luego de la administración de liposomas encapsulando fármacos e investigación de la respuesta fisiológica asociada a la administración del liposoma.

3.4. RADIOFÁRMACOS

Un radiofármaco es una sustancia química definida, que contiene átomos radiactivos en su estructura, y que por su forma farmacéutica y tipo de radiación, es apto para ser administrado en seres humanos con fines de diagnóstico o terapia. En general, un radiofármaco consta de dos partes bien diferenciadas: la molécula vector a la que se une el radionucleido y que condiciona la ruta metabólica del radiofármaco dentro del organismo y el radionucleido propiamente dicho que emite radiación permitiendo la detección externa del radiofármaco y la valoración del proceso estudiado cualitativa y/o cuantitativamente.

En su mayoría son compuestos orgánicos o inorgánicos con composición definida, que van desde moléculas simples y péptidos a un grado de complejidad mayor como los anticuerpos monoclonales o sus fragmentos.

Un radiofármaco para diagnóstico, requiere que su pureza radioquímica (PRQ) sea mayor a 90 %, puesto que la inyección de una mezcla diversa de especies del radionucleido disminuye la captación en el órgano blanco, y aumenta innecesariamente la dosis de la radiación en órganos no blancos. En caso de que el radiofármaco sea de terapia se exige una PRQ mayor a 95%. Los radiofármacos de diagnóstico son predominantemente complejos metálicos. Los mismos son de particular interés por su amplio rango de propiedades químicas y nucleares (tipo de radiación, período de semidesintegración, gran capacidad de coordinación, etc).

Para el uso de técnicas centellográficas planares o SPECT las moléculas son marcadas con radionucleidos emisores gamma puros, siendo el más comúnmente utilizado el ^{99m}Tc . En el caso de PET (Tomografía de emisión de positrones) la molécula es marcada con un radionucleido emisor de positrones como por ejemplo ^{11}C , ^{18}F , ^{68}Ga los que por aniquilación producen fotones de 511 KeV (38).

3.4.1 Química del ^{99m}Tc

El ^{99m}Tc es el radionúclido más usado en medicina nuclear, es un emisor puro de rayos gamma con periodo de semidesintegración de seis horas. Esto es una gran ventaja en relación a la temática de radiofármacos derivados de sistemas liposomales ya que permite hacer estudios de farmacocinética y biodistribución del liposoma en modelos *in vivo*.

El tecnecio es el elemento número 43 de la tabla periódica, es un metal de la segunda serie de transición y pertenece al grupo VIIB. Todos los nucleidos del Tc son radiactivos, con periodos de semidesintegración desde 5 segundos (^{102}Tc) hasta 2.6×10^6 años (^{97}Tc). Toda la aplicación biomédica se basa en el isotopo $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Posee estados de oxidación que van desde el -1 al +7. Los estados inorgánicos más estables son como ion pertecneciato (TcO_4^-) presentando estado de oxidación +7 y dióxido de tecnecio (TcO_2) con estado de oxidación +4. Los restantes estados de oxidación son más inestables y difíciles de obtener en forma libre, presentándose principalmente bajo la forma de complejos de coordinación. El ion TcO_4^- , la especie más estable en solución acuosa, se forma cuando el Tc metálico es disuelto en agua regia o en HNO_3 y también cuando soluciones que contienen Tc en diferentes estados de oxidación son tratados con oxidantes como: H_2O_2 , Cl_2 , Ce(VI) , HNO_3 , etc. Es la forma química bajo la cual se obtiene el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a partir de generadores de ^{99}Mo .

La química del tecnecio es dominada por la formación de complejos en los cuales el metal deficiente de electrones actúa como aceptor de electrones provenientes de átomos o grupos funcionales capaces de donar una par de electrones. El $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es producto del decaimiento $\hat{\alpha}^-$ del ^{99}Mo , de acuerdo al esquema de decaimiento que se muestra en la figura 4.

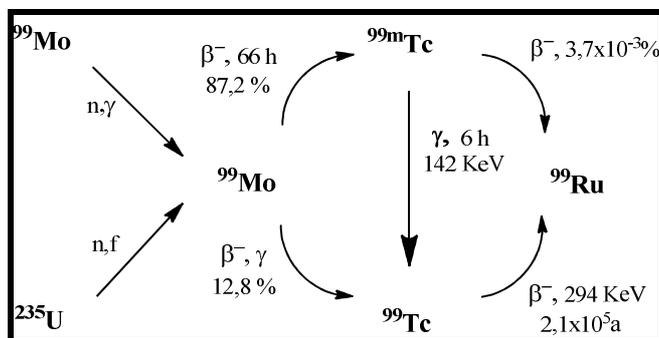


Figura 4. Esquema de decaimiento del ^{99}Mo y del $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Se obtiene a partir de un generador $^{99}\text{Mo}-^{99\text{m}}\text{Tc}$, que consiste en una columna de adsorción de alumina en la cual el ^{99}Mo está adsorbido bajo forma de $^{99}\text{MoO}_4^-$. El $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es eluido de la columna con de NaCl 0.9% en forma de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$. Trabajando en condiciones ascépticas se obtiene $^{99\text{m}}\text{Tc}$ en forma de solución estéril, apirógeno y libre de portador. Es debido a sus propiedades y a la accesibilidad del generador, que es de uso corriente en medicina nuclear (39).

3.4.2 Radiofármacos de ^{99m}Tc

La obtención de la mayoría de los radiofármacos de ^{99m}Tc involucra la reducción del Tc (VII) a uno o más de los estados de oxidación menores. Bajo estos estados de oxidación el ^{99m}Tc es capaz de unirse a un gran número de moléculas orgánicas e inorgánicas bajo la forma de complejos de coordinación, lográndose obtener compuestos marcados de aplicación en medicina nuclear. Las excepciones a este tipo de radiofármacos son el propio TcO_4^- y el ^{99m}Tc -azufre coloidal en el cual el tecnecio mantiene su estado de oxidación, formando el Tc_2O_7 . Los estados reducidos de Tc pueden obtenerse por tratamiento de la solución del ion pertechnetato con una gran variedad de agentes reductores, entre ellos HCl concentrado, mezcla de HCl-HI-KI ácido ascórbico y Sn^{2+} , entre otros.

De todos los sistemas de reducción, el más ampliamente usado para el marcado de radiofármacos con ^{99m}Tc y el utilizado en este trabajo, es el ion estannoso (Sn^{2+}), en solución acuosa, ácida o no según el caso. Las ventajas que presenta, entre otras, son la baja toxicidad, buen poder reductor y posibilidad de efectuar el marcado de un gran número de moléculas con buen rendimiento. Se lo puede utilizar bajo la forma de haluro (cloruro o fluoruro) o bajo la forma de complejo con ligandos como tartrato, pirofosfato, etc (40).

Una vez reducido a estos estados de oxidación menores, el Tc es capaz de unirse a un gran número de moléculas orgánicas e inorgánicas bajo la forma de complejos de coordinación. Debido a que durante este proceso se puede obtener una mezcla de estados reducidos del Tc, es de gran importancia controlar las condiciones de reacción de modo de obtener en mayor proporción la especie de interés.

En la marcación es deseable un alto porcentaje de actividad del tecnecio en la forma química establecida, en relación a la actividad total presente de dicho radionucleido. Pueden estar presentes impurezas radioquímicas debido a varias causas como descomposición del producto final (química o radiolítica), reacciones incompletas y/o competitivas durante la marcación, lo que ocasionaría patrones de biodistribución diferentes al esperado, disminución de la calidad en el momento de la toma de imágenes lo que conllevaría a problemas a la hora de la interpretación diagnóstica. También es importante evitar la formación de especies hidrolizadas del Tc como lo es el TcO_2 óxido hidratado, ya que además de disminuir el rendimiento del marcado, puede interferir en el procedimiento diagnóstico. Por lo tanto en la mayoría de las preparaciones con ^{99m}Tc , al final pueden estar presentes por lo menos tres especies radiactivas:

- ^{99m}Tc libre bajo la forma de $^{99m}\text{TcO}_4^-$, que no ha sido reducido por el agente reductor empleado.
- ^{99m}Tc reducido que no reaccionó con el agente quelante y se encuentra como $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{nH}_2\text{O}$
- ^{99m}Tc bajo la forma deseada

De éstas se deben minimizar las dos primeras, de tal forma que la principal fracción de radiactividad este bajo la forma unida a la molécula de interés.

3.4.3 Estrategias de marcación con ^{99m}Tc

Dentro de las estrategias de marcado podemos distinguir entre: marcado directo, método de los quelantes preformados y marcado indirecto mediante el uso de agentes bifuncionales. El marcado directo de los liposomas consiste en el uso de un agente reductor y la unión el ^{99m}Tc de manera eficiente formando enlaces ^{99m}Tc -lipido. Cabe destacar que la unión del agente bifuncional (ABF) puede ser realizada antes o después de la unión del ^{99m}Tc . Unas de las limitaciones de este método es baja estabilidad del liposoma in vivo lo cual dificulta mucho su aplicación como rutina en la clínica. Otro de los métodos utilizados es el método de quelantes preformados que consiste en la formación de un complejo de ^{99m}Tc con un ABF y posteriormente este complejo se conjuga con el liposoma (38). En este caso se requieren dos pasos de síntesis que incluyen manipulación del radionucleido. El marcado indirecto consiste en el uso de un agente bifuncional que permite la una unión del ^{99m}Tc a la biomolécula, en nuestro caso el liposoma.

La elección del agente bifuncional está determinada por la naturaleza y estado de oxidación del radiometal. Una cuidadosa selección permite retener la afinidad de la biomolécula por el blanco molecular ya que se evita la introducción del radiometal en la molécula (10).

En el presente trabajo, la estrategia de marcación seleccionada fue el marcado indirecto. En la misma se seleccionó como ABF a HYNIC, un derivado heterocíclico de 6-hidrazinopiridina desarrollado por Abrams y colaboradores; y como co-ligando se utilizó Tricina. La naturaleza exacta del complejo ^{99m}Tc -HYNIC-Biomolécula no es clara, dos modelos básicos han sido propuestos (11):

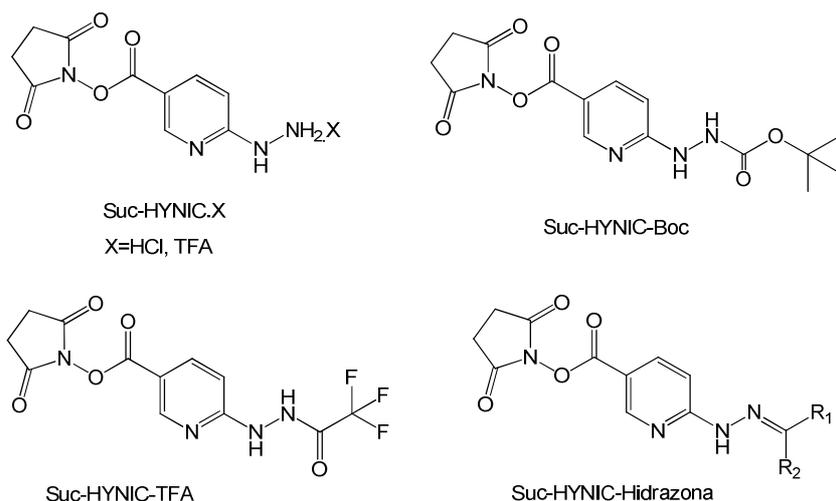
- El átomo de ^{99m}Tc se une al grupo funcional hidrazino a través de su N terminal, siendo el resto de los sitios de coordinación ocupados por átomos provenientes del co-ligando (41).

- El átomo de ^{99m}Tc es coordinado a través del N Terminal de la hidrazina y el N de la piridina, el resto de los sitios son ocupados por los átomos provenientes del co-ligando.

El Suc-HYNIC es un agente bifuncional ampliamente utilizado en la marcación de proteínas y biomoléculas pequeñas que incluyen péptidos, análogos de somatostatina, liposomas y oligonucleótidos (12). En el presente trabajo los derivados de HYNIC propuestos poseen el grupo 3-N-Hidroxisuccinimidil carbonil-6-hidrazinopiridina (Suc-HYNIC), grupo activante del extremo carboxilo del HYNIC, necesario para la unión de un grupo amino de la biomolécula seleccionada.

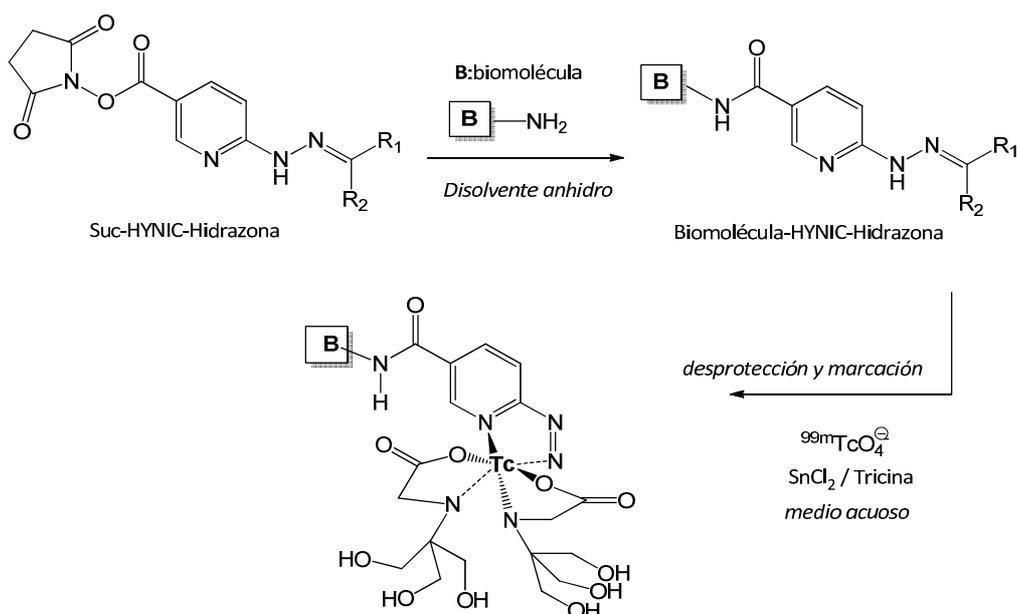
Por otra parte, el grupo hidrazino libre presente tanto en derivados de HYNIC como en conjugados HYNIC-biomolécula presenta una alta susceptibilidad a dar reacciones de oxidación por acción de la luz. Debido a este tipo de reacciones las cuales pueden provocar la descomposición del agente bifuncional, este debe ser almacenado a bajas temperaturas en frascos ámbar y preferentemente bajo la forma de una sal (generalmente clorhidrato o trifluoroacetato). En el mismo sentido, un grupo hidrazino libre es altamente nucleofílico, por lo que puede dar reacciones con moléculas electrófilas. Por ejemplo reacciones con aldehídos y cetonas presentes en muchos materiales plásticos y consigo mismo en el caso del derivado Suc-HYNIC el cual presenta un agrupamiento éster activado en su estructura, conduciendo a reacciones de polimerización. Este tipo de reacciones no deseadas puede hacer muy difícil mantener la pureza y estabilidad del complejo HYNIC-biomolécula durante el proceso de síntesis. Para prevenir la descomposición o degradación del conjugado se han logrado sintetizar diferentes derivados de HYNIC los cuales presentan al grupo hidrazino adecuadamente protegido. Los principales grupos protectores utilizados son el t-butoxicarbonil (Boc), trifluorometilcarbonil (TFA) y agrupamientos hidrazona (ver Esquema 2) (42). Recientemente han sido publicados trabajos donde se describe derivados peptídicos que incorporan al ligando bifuncional HYNIC adecuadamente derivatizado con un grupo trifluoroacetilo. Estos conjugados fueron marcados directamente y eficientemente con ^{99m}Tc bajo condiciones reductivas con $\text{SnCl}_2 / ^{99m}\text{TcO}_4^-$.

Así, tanto el derivado HYNIC-TFA como HYNIC-hidrazona se desprotegerían bajo las condiciones de marcación con el radionucleido ^{99m}Tc en medio acuoso. Esto es una ventaja frente a otros grupos protectores, como por ejemplo Boc, para el cual la desprotección requiere de un paso adicional de síntesis previo a la marcación.



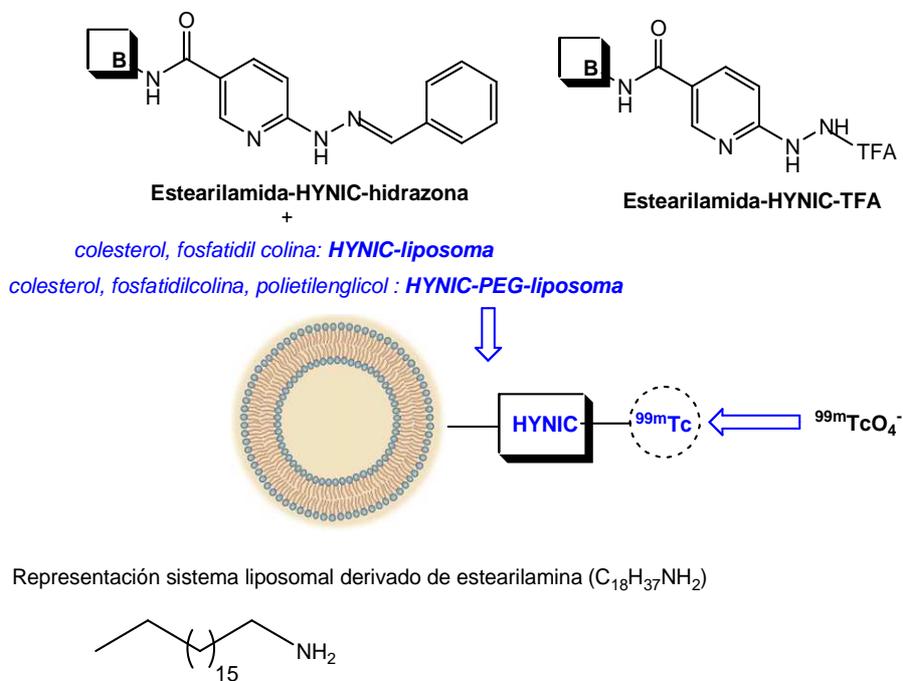
Esquema 2. Principales grupos protectores del grupo hidrazino.

La formación de hidrazonas como grupos protectores utilizados en la formación de conjugados de HYNIC-biomolécula tiene como ventaja que su formación puede darse eficientemente en un medio anhidro y posteriormente durante el proceso de radiomarcado en medio acuoso se lleva a cabo la desprotección y formación del complejo con ^{99m}Tc vía hidrazino libre en un solo paso (Esquema 3) (43). El rendimiento de la formación del complejo entre el ^{99m}Tc con el ligando bifuncional y co-ligando depende ampliamente de la cinética de la hidrólisis de la hidrazona, así como de la concentración total del conjugado de HYNIC-biomolécula en la mezcla de reacción. Cuanto mayor sea el grado de hidrólisis de la hidrazona, mayor será el número de grupos hidrazino libres disponibles para coordinarse al ^{99m}Tc .



Esquema 3. Estrategia de marcación con el agente bifuncional HYNIC-hidrazona.

En el caso de esta tesina la estrategia elegida para la formación y marcación de liposomas con ^{99m}Tc se inicia con la obtención de los derivados Suc-HYNIC-hidrazona y Suc-HYNIC-TFA debidamente activados para ser conjugados a estearilamina como lípido derivatizable (Esquema 4) (44,45,49,50,51).



Esquema 4. Estrategia de formulación y marcación de los liposomas a través de HYNIC-estearilamida.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

Se emplearon los siguientes reactivos y materiales:

Nitrógeno gaseoso de alta pureza (AGA); Tricina, SnF₂, L-Cisteína (Sigma-Aldrich); DMSO, Trietilamina, Acetato de Etilo (J. T. Baker); H₂O bidestilada; columnas de exclusión molecular PD-10 Sephadex (Amersham Biosciences); NaCl (Fluka-Garantie); Acetona (May & Baker); EtOH (BioPak), HCl (36,5-38,0%) (Merck); ITLC-SG (Pall Corporation); Whatman 1 mm (Whatman International Ltd); Generador ⁹⁹Mo-^{99m}Tc (TecnoNuclear), Ácido 6-cloronicotínico, hidrato de hidrazina (50-60% N₂H₄), di-ter-butil dicarbonato (97%), dicitclohexilcarbodimida (99%) (Sigma-Aldrich), y Éter Sulfúrico (Química Gamma), Acido Trifluoroacético (Sigma-Aldrich). Cloroformo y Metanol seco (Sigma-Aldrich). Fosfatidilcolina, Polietilenglicol 4000 (PEG-4000), Colesterol (Avanti Polar Lipids). Equipo de extrusión: jeringas Hamilton, soporte para filtros, filtros de 100 y 400 nm (Avanti Polar Lipids).

Los estudios de biodistribución e imágenes se desarrollaron en ratones C57BL/6, entre 6 y 10 semanas de edad, los cuales son mantenidos en condiciones de macro y microambiente adecuadas para la especie según normas nacionales e internacionales vigentes. Los animales de experimentación fueron mantenidos bajo un estricto protocolo de supervisión el cual permite cuantificar el probable sufrimiento con el fin de permitir aplicar medidas correctivas. Se consideraron 5 variables: evolución del peso corporal, aspecto, comportamiento no provocado, comportamiento en respuesta a la manipulación y relación peso corporal sobre el tamaño del tumor (53).

Se desarrolló un modelo animal de melanoma por inoculación de células tumorales. La línea celular de melanoma murino B16-F1 se obtuvo de la colección American Type Culture Collection y se mantiene en el medio de Dulbecco modificación Eagle (DMEM) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (PAA Laboratories GmbH) y glutamina 2 mM (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany). Para todos los experimentos se utilizarán 32 ratones C57BL/6 de seis semanas de edad. Los melanomas son inducidos en los ratones por administración subcutánea de 2.5×10^5 células de melanoma

B16-F1 en 0.1 mL de buffer fosfato salino (PBS). Luego de dos semanas de la inoculación, cuando los tumores son palpables los ratones se encuentran listos para comenzar los estudios de biodistribución y centellográficos. Los tumores, cuando son palpables no deben superar en peso el 10% del ratón. En este protocolo de inducción tumoral los criterios de punto final a utilizar son:

1. Tamaño máximo del tumor de 10% del peso corporal en el momento de la inyección, calculado usando la fórmula:

Masa (mg) = volumen del tumor (mm^3) = $(2d \times D)/2$ donde d and D son el más corto y el más largo diámetro en mm, respectivamente.

2. Diámetro medio del tumor no exceda 20mm en ratones ($\text{media} = (d + D)/2$).

3. Ulceración del tumor sin tener en cuenta del tamaño

4.2 EQUIPOS

Se emplearon los siguientes equipos:

Calibrador de dosis Capintec CRC7, Contador de centelleo sólido de pozo: detector de cristal de NaI(Tl) de 3"x3" asociado a un analizador monocanal ORTEC), Gamma cámara (Sopha cámara, DXR rectangular) del, Centro de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas, Liofilizador (Heto). Sistema de presión reducida Büchi. Medidor de tamaño de partícula (Coulter LS 230). Microonda multimodo (WX-4000, EU Chemical Instrument Co.)

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

4.3 SÍNTESIS ORGÁNICA

4.3.1 Síntesis de Agentes Bifuncionales

Los grados de avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinan por Cromatografía en Capa Fina (CCF). Se utiliza sílicagel con indicador fluorescente sobre placas de poliéster (Alugram® Sil G/UV254) u óxido de aluminio con indicador fluorescente sobre placas de poliéster (Poligram® Alox N/UV254).

Las fases móviles usadas han sido mezclas (en distintas proporciones) de acetato de etilo- éter de petróleo, éter etílico-éter de petróleo y diclorometano-metanol.

Los cromatogramas se revelan por alguno de los siguientes métodos:

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

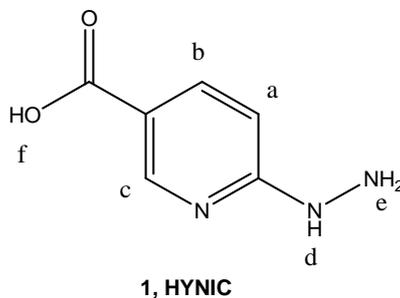
Para las Cromatografía en Columna (CC), se utiliza sílicagel (Kieselgel, tamaño 0.063-0.2 mm, J. T. Baker) o alúmina (Merck, 70-230 mesh).

4.3.1.1 Proceso sintético de Suc-HYNIC-hidrazona

La síntesis se llevó a cabo a través de una técnica modificada basada en la síntesis de 3-N-Hidroxisuccinimidil carbonil-6-hidrazinopiridina clorhidrato desarrollada por Abrams & et al (10). Durante este trabajo, se han estudiado distintas condiciones de reacción basadas en la aplicación de radiación de microondas utilizando un reactor comercial multimodo, con el fin de mejorar los rendimientos y reducir tiempos de reacción.

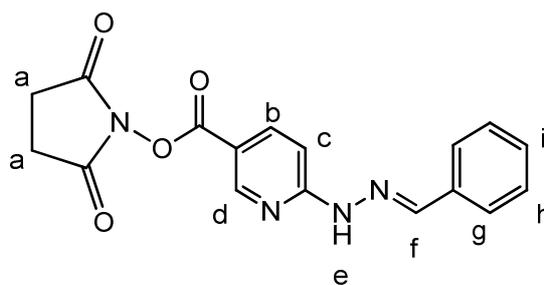
3-Carboxi-6-hidrazinopiridina (1, HYNIC). Una mezcla de Acido 6-cloronicotínico (1,0 g, 6,35 mmol), hidrazina monohidrato (3,17 g, 0,063 mol) y H₂O (3.5 mL) se coloca en un tubo de teflón cerrado herméticamente, se coloca en la cavidad del reactor de microonda multimodo y se calienta 160 °C durante 5 min (300W). Posteriormente la mezcla se enfría y se acidifica a pH 5.5 por el agregado lento de HCl 12M. El precipitado formado se filtra a vacío, se lava con

etanol, éter y se coloca en desecador durante 24 hs obteniéndose 0.92g (89%) de un sólido color crema, el cual se utiliza en el próximo paso sin otra purificación. $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d_6) δ : 7.09 (d, $J = 9.2$ Hz, 1Ha), 8.00 (dd, $J_1 = 2.4$ Hz, $J_2 = 7.6$ Hz, 1Hb), 8.62 (d, $J = 2.4$ Hz, 1Hc), 8.55 (d, $J = 2.4$ Hz, 1Hd), 9.90 (d, $J = 1.2$ Hz, 1Hf).



3-N-Hidroxisuccinimidilcarbonil-6-(2-benziliden)hidrazinilpiridina (2, Suc-HYNIC-hidrazona).

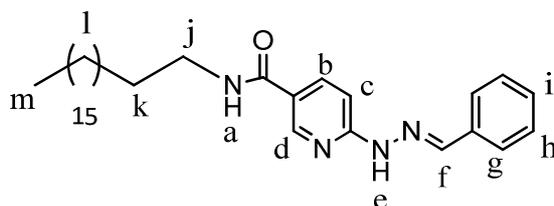
Dentro de un reactor de teflón se coloca una solución de **1** (0.2 g, 1.3mmol) en DMF (6 mL) y se le añade benzaldehído (0.14 mL, 1.5 mmol). El reactor se coloca en la cavidad del microonda multimodo a 100 °C durante 10 min (300W). Posteriormente se deja enfriar hasta temperatura ambiente y seguidamente se agrega diciclohexilcarbodiimida (DCC) (0.148 g, 0.715 mmol) y N-Hydroxisuccinimida (NHS) (0.075 g, 0.65 mmol) y la mezcla se vuelve a colocar en la cavidad del microonda multimodo a 100 °C durante 10 min (300W). Seguidamente se deja enfriar hasta temperatura ambiente y el DCU formado se filtra y se lava con 3mL de AcOEt. A continuación la fase orgánica se lava con H_2O (40.0 mL) y se lleva a cabo extracciones con AcOEt (8 X10.0 mL). La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 , se filtra y evapora el disolvente a presión reducida. Al residuo obtenido se agregan 3 mL de una mezcla Hexano: AcOEt (1:1) y el precipitado formado se filtra y se coloca en desecador durante 24 h, obteniéndose 58.2 mg (23%) del producto **4** como un sólido color crema. $^1\text{H RMN}$ (DMSO-d_6) δ : 2.89 (s, 4Ha), 7.39-7.48 (m, 3Hi+h), 7.44 (d, $J = 7.6$ Hz, 1Hc), 7.73 (dd, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz, 2Hg), 8.19 (dd, $J_1 = 2.4$ Hz, $J_2 = 8.8$ Hz, 1Hb), 8.20 (s, 1Hf), 8.81 (d, $J = 2.4$ Hz, 1Hc), 11.86 (s, 1He). $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO-d_6) δ (ppm): 26.2 (Ca), 105.9 (Cc), 129.5 (Ch+i), 139.8 (Cb), 144.0 (Cf), 152.9 (Cd), 170.9 (CON), 172.7 (COO).



2, Suc-HYNIC-Hidrazona

4.3.1.2 Proceso sintético de Estearilamida-HYNIC-hidrazona

6-(2-benzilidenhidrazinil)-N-estearil nicotinamida (3). A una solución de estearilamina (0.1g, 0.36 mmol) en una mezcla DMSO: Cloroformo (5:1) 6 mL, se añade **2** (0.11g, 0.32 mmol). La mezcla de reacción se coloca en un tubo de teflón cerrado herméticamente y se coloca en la cavidad del reactor de microonda multimodo (WX-4000, EU Chemical Instrument Co) trabajando a una potencia de 100 W por 5 minutos. Seguidamente a la mezcla de reacción se añade H₂O (40mL) y se extrae con AcOEt (6 X10.0 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y evapora el disolvente a presión reducida. Al residuo obtenido se agregan 3 mL de una mezcla Hexano: AcOEt (1:1) y el precipitado formado se filtra y coloca en desecador durante 24 h, obteniéndose 50 mg de sólido color beige claro. ¹H RMN (CDCl₃) δ: 0.88 (t, J = 6.4 Hz, H_{m+m'}), 1.27 (s, H_{l+l'}), 1.60-1.73 (m, H_{k+k'}), 3.44-3.51 (m, H_{j+j'}), 6.01 (sa, H_{a+a'}), 7.38-7.45 (m, H_{h,i,c+h',i',c'}), 7.70 (d, J = 6.8 Hz, H_{g+g'}), 7.83 (s, H_{f+f'}), 7.86 (dd, J = 2.4 Hz, J = 8.8 Hz, H_b), 8.03 (dd, J = 2.0 Hz, J = 8.4 Hz, H_b), 8.44 (d, J = 2.0 Hz, H_d), 8.56 (d, J = 1.6 Hz, H_d), 8.70 (sa, H_{e+e'}). ¹³C NMR (CDCl₃) (ppm): 13.3, 24.6, 29.3, 39.4, 48.8, 106.2, 120.4, 126.1, 128.5, 134.5, 141.0, 145.7, 149.2, 153.5.

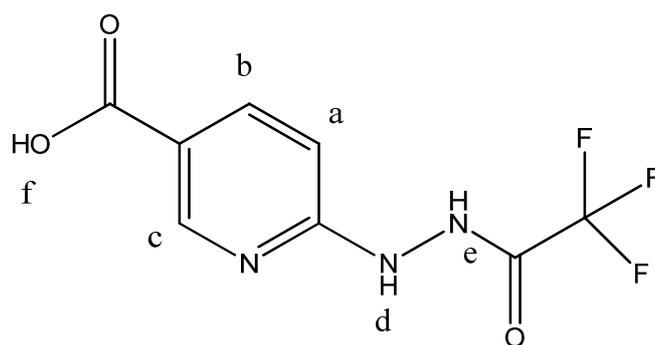


3, Estearilamida-HYNIC-Hidrazona

4.3.1.3 Proceso sintético de HYNIC-TFA

3-N-Hidroxisuccinimidilcarbonil-6-(2-trifluoroacetil)hidrazinilpiridina (4, HYNIC-TFA)

A mezcla de **1** (0.1 g, 0.65 mmol) y TFA (2 equiv) en CH₂Cl₂ (5 mL) fue irradiada en un tubo de teflón sellado a 95°C por 10 min. Luego de enfriar a temperatura ambiente, el sólido resultante fue aislado por filtración, lavado con CH₂Cl₂, hexano y secado a vacío para rendir HYNIC-TFA como un sólido amarillo (0.125g, 77%). ¹H RMN (DMSO-d₆) δ (ppm): 6.89 (d, J = 9.2 Hz, 1H, H-a), 8.09 (dd, J = 2.0 Hz, J = 8.8 Hz, 1H, H-b), 8.64 (d, J = 1.6 Hz, 1H, H-c), 9.92 (bs, 2H, NH); ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 109.23 (C-5), 113.01 (C=O-CF₃, q, J = 297 Hz), 118.91 (C-3), 139.59 (C-4), 148.02 (C-2), 158.18 (C=O-CF₃, q, J = 31 Hz), 158.58 (C-6), 166.29 (COOH).



HYNIC-TFA

4.3.2 Preparación de liposomas

HYNIC-liposoma: se prepararon por el método de “hand-shaken”, utilizando 9 mg de fosfatidilcolina, 4 mg de colesterol (Sigma Aldrich) y 1 mg de HYNIC-estearilamina, se agregó en un balón con 2ml cloroformo-metanol (2: 1 v / v) para su solubilización. Se rotaevaporó a vacío en un baño de agua a 60 ° C a 120 rpm por 45 min.

Luego el film obtenido fue hidratado con 5 ml de agua bidestilada, a 60 ° C y 120 rpm por 60 minutos, cabe destacar que para facilitar que se levante en menor tiempo de hidratación, se puede agregar agitadores a la solución de lípidos.

HYNIC-PEG-liposoma: se utilizó la misma metodología mencionada anteriormente con el agregado de 1 mg de 1,2-sn-dimiristoil glicero fosfoetanolamina-3-metoxi-N (polietilenglicol-5000) para la obtención de la formulación liposomal.

4.3.2.1 Formación de las vesículas por extrusión

Se toma 1 mL de la suspensión de liposomas con una de las jeringa Hamilton, se colocan en el extrusor y se realizan 11 pasajes a través de cada uno de los filtros (100 y 400 nm), haciendo el primer pasaje por el filtro con poro de mayor tamaño, la temperatura del extrusor así como también la de los liposomas se debe mantener a 60 °C. En este procedimiento, nos aseguramos la formación de liposomas unilamelares.

4.3.2.2 Caracterización de liposomas : Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

DSC se realizó con el dispositivo DSC 50 Shimadzu previamente calibrado con Indio. Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado. Se usaron frascos de aluminio

herméticamente sellados que fueron preparados para la obtención del secado por congelación liposomal (de 5 mg). Las muestras fueron analizadas a 1 ° C / min desde 5 ° C hasta 60 ° C, tomando como referencia un frasco de aluminio vacío.

Los cambios de entalpía y temperaturas de transición características se calcularon utilizando un sistema de software de análisis térmico TA-50 de WSI.

4.3.2.3 Distribución de tamaño

La distribución de tamaño se realizó por difracción de luz láser y la dispersión de la luz polarizada usando un analizador de tamaño de partículas Coulter Counter Multisizer, los índices d_{3,2} y d_{4,3} fueron determinados. El d_{4,3} representa el diámetro medio ponderado en volumen, mientras que el d_{3,2} es el diámetro medio volumen-superficie de las gotas de la emulsión, ambos expresados en nanómetros (nm).

4.3.2.4 Optimización de la Marcación con ^{99m}Tc

La eficiencia del marcado se evaluó para cada caso determinando el porcentaje de formación de ^{99m}Tc-Liposomas (^{99m}Tc-Lip) a través de la determinación de pureza radioquímica. Para discriminar las 3 especies radioquímicas presentes, que son: ^{99m}Tc-Lip., ^{99m}TcO₄⁻, ^{99m}Tc reducido/ hidrolizado se cuantificaron estas posibles impurezas radioquímicas por medio de sistemas cromatográficos de fácil empleo.

Se utilizaron cantidades fijas de dispersión liposomal (0.4 ml) y de ^{99m}TcO₄⁻ (0,9 y 0,8 ml ésta última para el marcado con 0,3 ml de F₂Sn, con una actividad de 1-7 mCi), variando la cantidad de agente reductor : 0,1 , 0,2 y 0,3 ml de solución de F₂Sn 0,69 mg/ml (69, 138 y 207 µg/ml respectivamente).

Los sistemas cromatográficos utilizados fueron: ITLC-SG / NaCl 0,9% donde los liposomas marcados tienen un Rf de 0 así como también el ^{99m}TcO₂.nH₂O y el ^{99m}TcO₄⁻ con un Rf de 1. El otro sistema fue: ITLC-SG / piridina: ácido acético: agua (3:5:1,5v/v). Los liposomas marcados en éste sistema tienen un Rf de 0,8 -1, el ^{99m}TcO₄⁻ un Rf de 1 y el ^{99m}TcO₂.nH₂O un Rf de 0.

La estabilidad del marcado se evaluó por medio de los mismos métodos cromatográficos para cada caso en solución de marcado por 24 horas a temperatura ambiente.

4.3.2.5 Estabilidad in vitro de ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas

Para comprobar la estabilidad de las distintas formulaciones liposomales marcadas con ^{99m}Tc , se controlaron hasta 24 horas postmarción, utilizando los sistemas mencionados anteriormente. También se realizó cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna PD 10 eluyendo con 0,9% de NaCl, en la cual se colectaron fracciones de 0,5 mL.

La estabilidad de los complejos formados con ^{99m}Tc fueron evaluados mediante un ensayo de competencia con cisteína, para lo cual los ^{99m}Tc -liposomas (0.5 mL) fueron tratados con 0.5 mL de distintas soluciones de L-Cisteína (0.1, 10, 30 mM). Las distintas mezclas se incubaron por 3 horas a 37°C. Una gota (1-2 μL) de mezcla cisteína-liposoma se sembró en los distintos sistemas cromatográficos mencionados previamente a los tiempos de 1 y 3 h. La actividad de cada fracción de la tira fue medida en un contador de centelleo sólido.

4.3.2.6 Biodistribuciones Biológicas

La evaluación biológica del ^{99m}Tc -HYNIC-Liposoma y de ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-Liposoma se llevó a cabo mediante la realización de estudios de biodistribución a las 1 hs (n =4) y 3 hs (n =4) en ratones C57BL/6 normales y con ratones portadores de melanoma. El procedimiento utilizado se detalla a continuación:

- a) Se administra la formulación liposomal marcada con ^{99m}Tc por vía intravenosa a través de la vena caudal con una actividad de aproximadamente 130 μCi en 0.1mL.
- b) Una vez transcurrido el tiempo de biodistribución 1 y 3 hs, se sacrifican los animales por dislocación cervical.
- c) El tumor como los tejidos de interés fueron extirpados siendo los órganos pesados y su actividad fue medida en un detector de centelleo sólido.
- d) Se calcula el % de actividad/gramo y el % actividad de cada órgano.

También se realizaron estudios de biodistribución en ratones normales C57BL/6 a 1 y 3 horas postinyección de ^{99m}Tc -liposomas $0.37 \pm 0.07 \text{ MBq}$ ($10 \pm 2 \mu\text{Ci}$). Los mencionados ratones se encontraban previamente inoculados (30 min antes) con 0.75 y 1.5 mg de liposomas fríos, para

evaluar el efecto de la dosis liposomal. Se realizó el estudio con 4 ratones por punto, por cantidad pre inyectada y por formulación liposomal. Luego de transcurrido el tiempo de biodistribución los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, y sus órganos y/o tejidos pesados y medida su actividad. Los resultados se expresan en porcentaje de dosis inyectada (%Act).

4.3.2.7 Estudio centellográfico

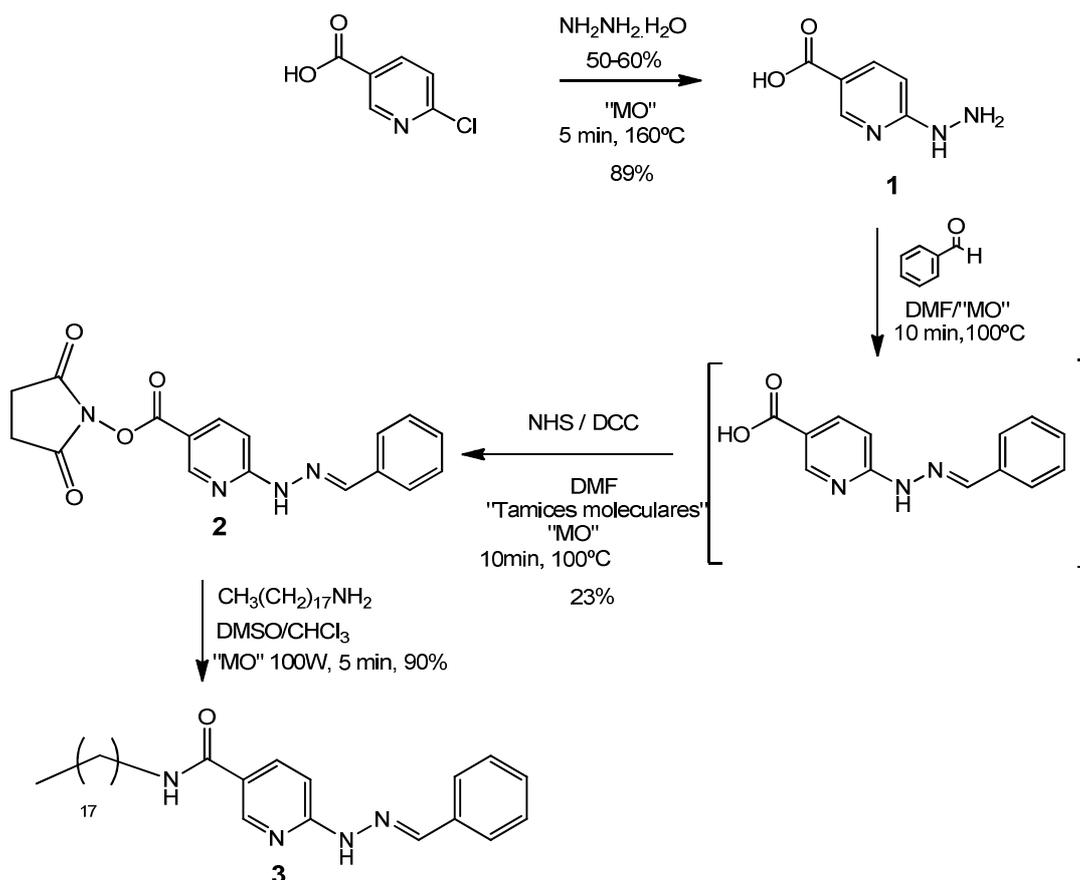
Se realizaron estudios centellográficos en ratones C57BL/6 normales y portadores de melanoma. Los ratones fueron inyectados a través de la vena de la cola con 120 μ Ci en 0,1 mL. Las imágenes fueron adquiridas 4 horas post inyección por una gamma cámara Sopa. Las imágenes fueron colectadas por una matriz de 128 x128 con una magnificación de 0.2.

5. RESULTADOS

5.1 SÍNTESIS DE AGENTES BIFUNCIONALES

5.1.1 Síntesis de Suc-HYNIC-hidrazona

El primer paso de la síntesis consistió en la obtención del derivado hidrazino piridina 1 mediante una sustitución nucleofílica aromática (S_NAr) donde el átomo de cloro es desplazado por hidrazina. El carbono en posición 6 en el anillo de piridina se encuentra activado en su electrofilia por la presencia de un grupo aceptor de electrones, grupo carboxilo en posición *para*, y por formar parte del sistema heterocíclico. Así, se obtiene el derivado de piridina 1 en excelente rendimiento y corto tiempo de reacción bajo calentamiento de microondas a 160°C (Esquema 5).



Esquema 5. Síntesis asistida por microondas utilizada para la obtención del derivado estearilamida-HYNIC-hidrazona

Seguidamente el grupo hidrazino en **2** es protegido mediante formación de una hidrazona, a través de la reacción de condensación del grupo hidrazino con benzaldehído. La reacción fue llevada a cabo bajo calentamiento de microondas en DMF como disolvente, donde la formación del producto intermedio fue constatada por medio de cromatografía en capa fina. El paso siguiente consistió en la activación del grupo ácido carboxílico (aumentando la reactividad o electrofilia del carbonilo) por la formación del éster **2**, mediante reacción del intermedio en presencia de N-hidroxisuccinimida (NHS) y dicitlohexilcarbodiimida (DCC) bajo calentamiento de microondas. En estas condiciones el éster activado **2** fue obtenido en bajo rendimiento (23%), lo cual se puede deber a la presencia de agua en el disolvente de reacción, provocando una hidrólisis de la hidrazona y/o del éster activado. El derivado Suc-HYNIC-hidrazona **2** se caracterizó mediante experimento de ^1H -RMN (Figura 5). En este espectro se visualiza la presencia de un solo isómero geométrico de los dos posibles mediante la reacción de formación del agrupamiento hidrazona (isómeros cis y trans).

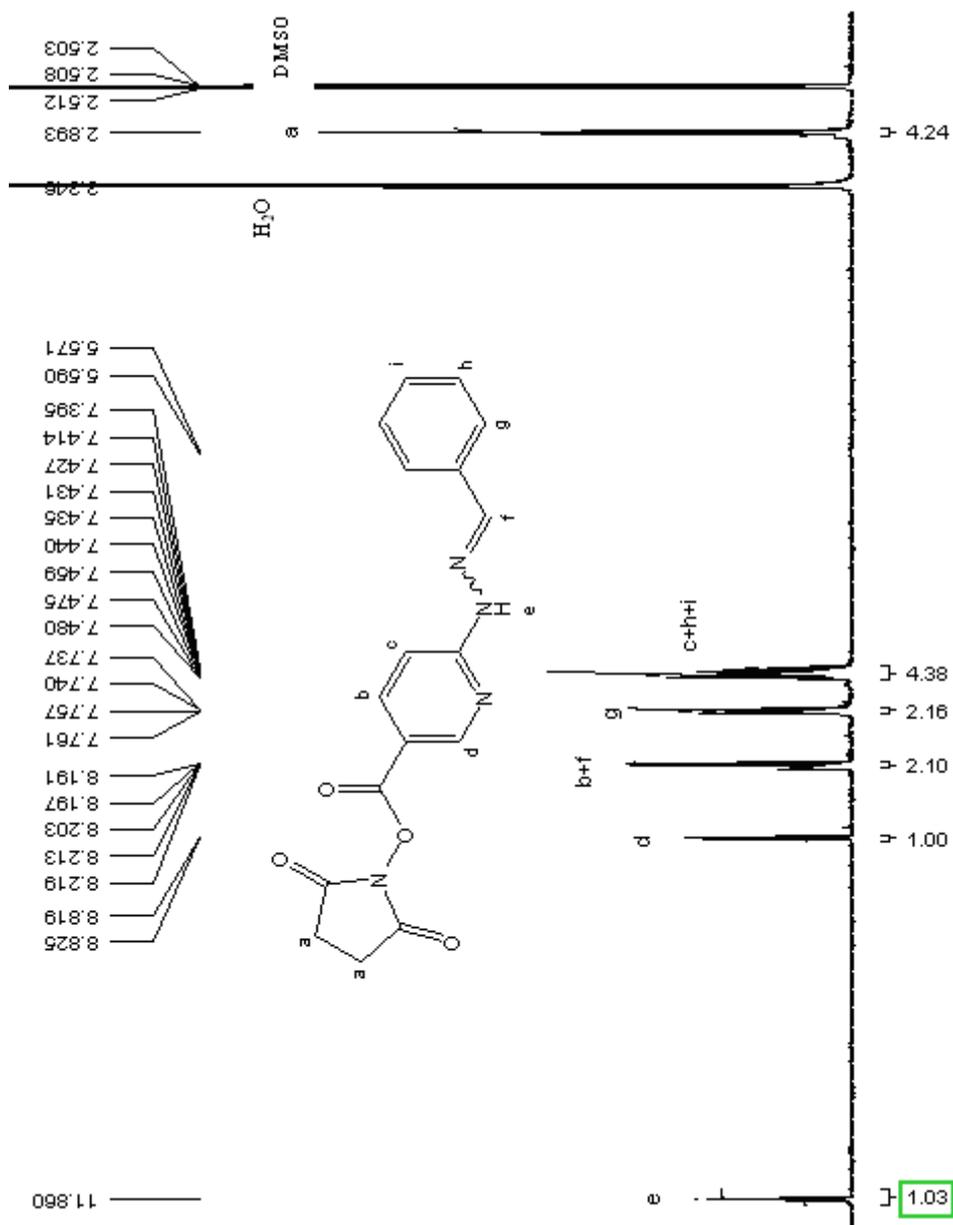


Figura 5. Espectro de ¹H-RMN DMSO-d₆ del compuesto 2

5.1.2 Síntesis de Estearilamida-HYNIC-hidrazona

La síntesis del derivado estearilamida-HYNIC-hidrazona **3** se llevo a cabo a través de una metodología descrita en literatura con algunas modificaciones (Esquema 5) (12, 42).

Así, la estearilamida **3** se obtuvo en excelente rendimiento por reacción del éster activado **2** en presencia de estearilamina, empleando una mezcla de DMSO/CHCl₃ (5:1) como disolvente.

La reacción se llevo a cabo en un corto período de tiempo bajo calentamiento por microonda utilizando un reactor comercial multimodo. La estearilamida **3** se caracterizó mediante experimentos de ^1H -RMN (Figuras 6 y 7), de correlación H-H (COSY) y de correlación heteronuclear (HSQC y HMBC). En el espectro de ^1H -RMN del producto **3** se observan, principalmente en la zona de protones aromáticos (Figura 6), señales correspondientes a una mezcla de isómeros geométricos trans y cis, con una relación aproximada 2:1.

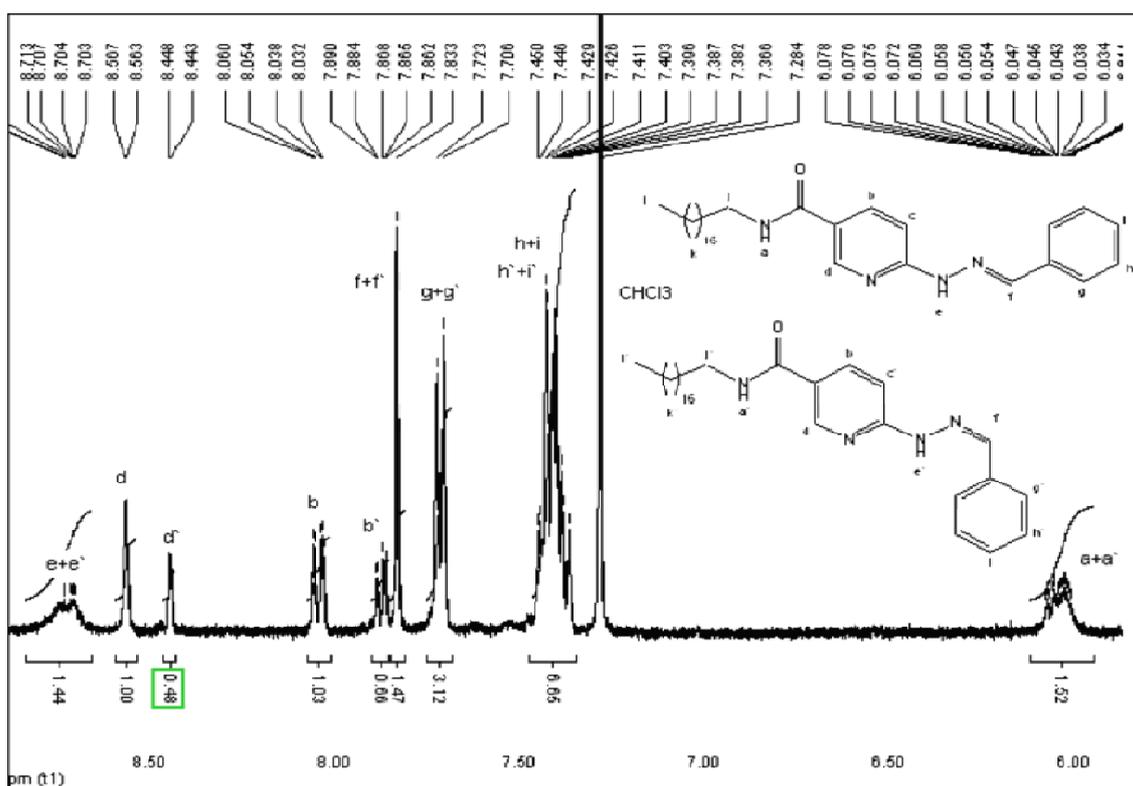


Figura 6. Ampliación del espectro de ^1H -RMN del derivado **3** en CDCl_3 correspondiente a la zona entre 6.0-9.0ppm

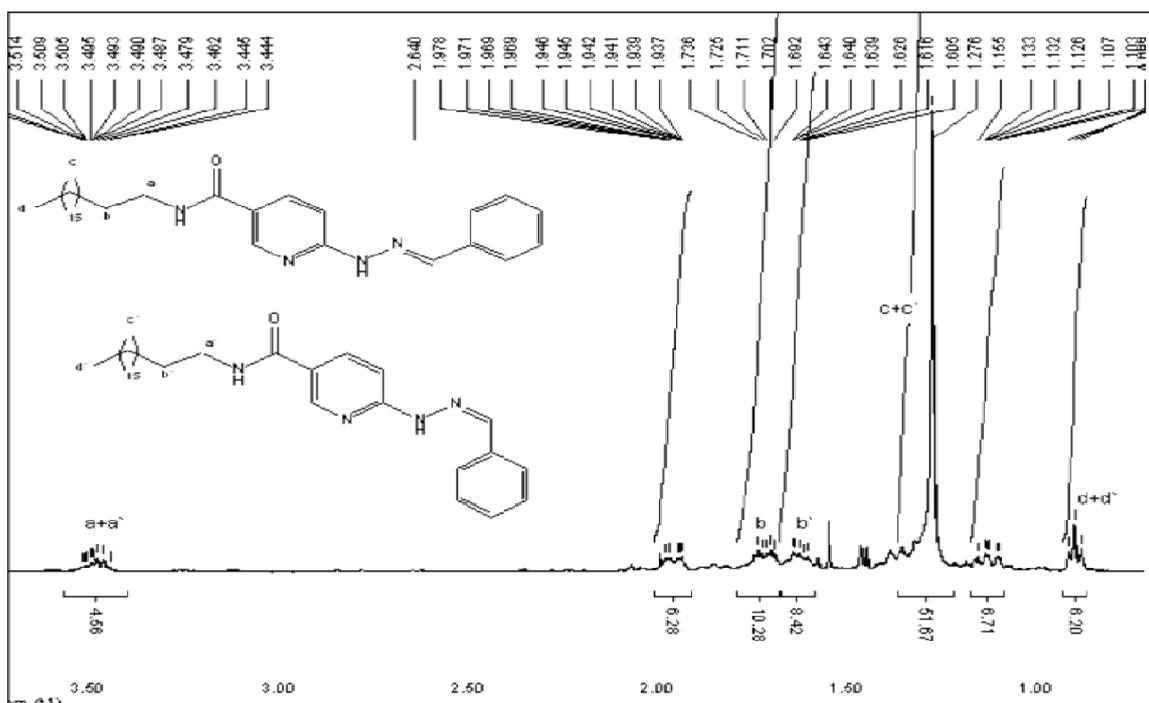
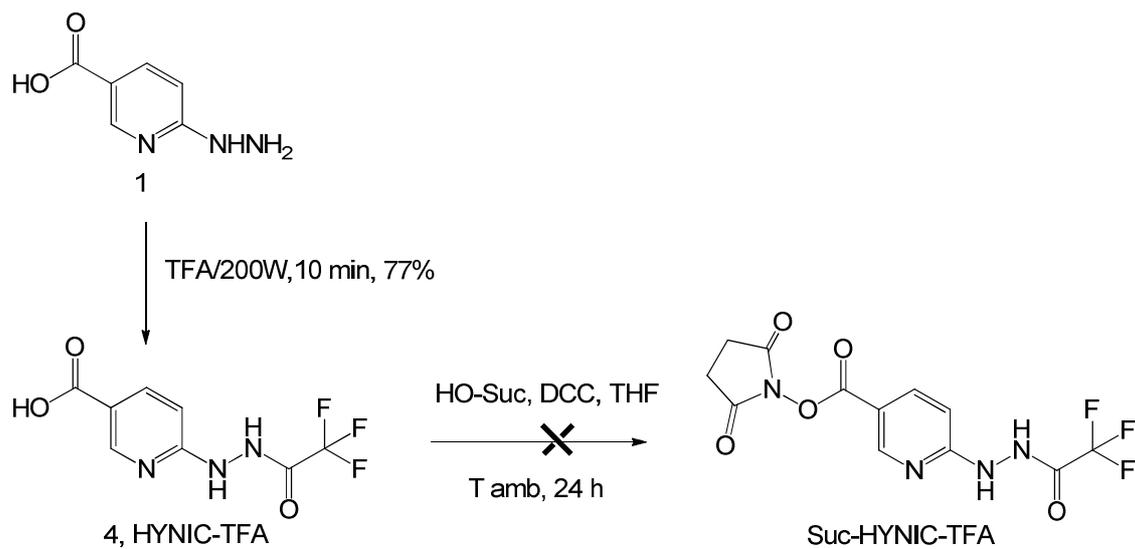


Figura 7. Ampliación del espectro de ^1H -RMN del derivado **3** en CDCl_3 correspondiente a la zona entre 0.0-3.5ppm

5.1.3 Síntesis de HYNIC-TFA

Hay varios reactivos que se pueden utilizar para la introducción de grupos trifluoroacetilo, tales como el anhídrido trifluoroacético, benzotriazol (trifluoroacetil), triflatotrifluoroacetil y N-(trifluoroacetil) succinimida (49). En este contexto, los informes recientes describen procedimientos adecuados para la N-trifluoroacetilación de aminas utilizando ácido trifluoroacético (TFA) como reactivo trifluoroacetilante (50,51). En esta línea, hay un trabajo previo que demuestra una directa trifluoroacetilación de anilinas utilizando TFA y promovido por radiación de microondas (52). Dado que generalmente se requieren altas temperaturas y largos tiempos para esta reacción, consideramos un método asistido por radiación de microondas para la N-trifluoroacetilación de la hidrazina **1** con TFA. Cuando la hidrazina **1** fue tratada con TFA (2 equiv) en CH_2Cl_2 por 10min bajo calentamiento de microondas (95°C, 200W) el producto deseado se obtuvo en buen rendimiento (77%) (Esquema 6). Para la obtención del análogo Suc-HYNIC-TFA se ensayó el paso sintético utilizado en la obtención del Suc-HYNIC-hidrazona (Esquema 5). Lamentablemente bajo estas condiciones no fue posible obtener el derivado de interés (Esquema 6).



Esquema 6. Metodología sintética utilizada para la obtención de Suc-HYNIC-TFA

5.2 Obtención y caracterización de las formulaciones liposomales

En la figura 8, se presentan los resultados obtenidos mediante la calorimetría diferencial de barrido, para determinar el tamaño de los liposomas obtenidos luego del proceso de extrusión para la formulación de **(a)** HYNIC-Liposomas y **(b)** HYNIC-PEG-liposomas

Los HYNIC-liposomas presentan una relación media de volumen-superficie (D 3,2) de 0,122 nm como se puede apreciar en la Figura 8a. La formulación HYNIC-PEG-liposoma posee un tamaño D 3,2 de 0,128 nm.

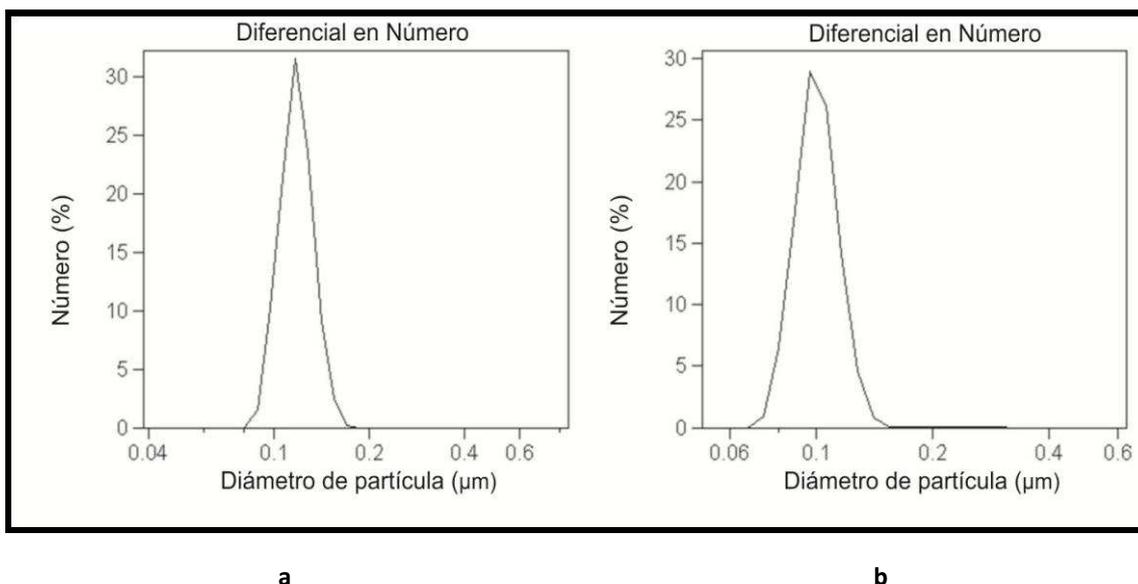


Figura 8. Distribución del tamaño de partícula en Coulter Counter Multisizer, de: (a) HYNIC-Liposomas y (b) HYNIC-PEG-liposomas

5.3 Marcación de liposomas con ^{99m}Tc : relación de Tricina (coligando) / SnF_2 (agente reductor)

Se probaron diferentes relaciones de Tricina y SnF_2 , y se determinó la pureza radioquímica (PRQ) de las distintas marcaciones a los 20 minutos post marcación. Las mejores relaciones fueron 8/6 y 7/6 mg de Tricina y SnF_2 respectivamente, resultando en eficiencias de marcado superiores al 90%, siendo la relación 7/6 la que alcanzó una PRQ del 94%. Purezas radioquímicas superiores al 86 % fueron observadas en todos los casos, con niveles de actividad entre 148- 259 MBq.

5.4 Controles de estabilidad de ^{99m}Tc -HYNIC-Liposomas y ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-Liposomas

Los controles cromatográficos realizados sobre ITLC-SG y Whatman 1 resultaron que tanto el ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas como el ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposomas presentan una PRQ mayor al 90% a temperatura ambiente, en solución, por un período de 24h.

En los controles realizados por exclusión molecular (figura 9 y 10) para ambas clases de liposomas se presenta un pico mayoritario en el entorno a las fracciones 6 y 7 donde con los mismos sistemas cromatográficos utilizados previamente se constata la identidad de los liposomas marcados.

Para el ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas se observa una alta estabilidad incluso para la concentración más alta de cisteína (30mM), presentando una pureza radioquímica superior al 80% a las 3 horas (figura 11) frente a todas las concentraciones ensayadas.

Para el ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposomas se observa que a la hora la PRQ es superior al 80% para las concentraciones de 0.1 y 10mM de Cisteína, mientras que para la concentración de 30mM es del 76%. A las 3 horas estos liposomas presentan una transquelación superior a la de sus análogos convencionales, mostrando una PRQ superior al 70 % para las tres concentraciones estudiadas, siendo la concentración de 0.1 mM la que presenta una menor transquelación con un 20 %, comparado a un 21% y 29% de las concentraciones de 10 y 30mM respectivamente.

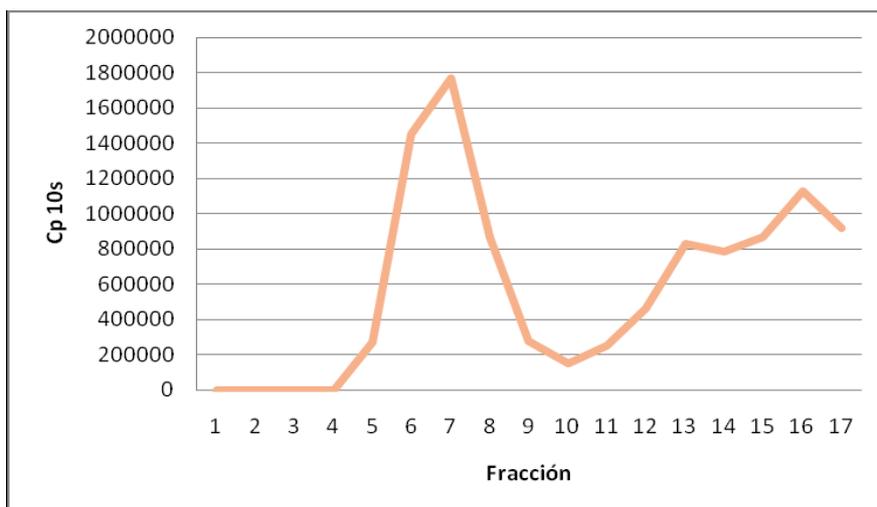


Figura 9. Control de marcación de ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas utilizando columna Pd-10 G-25, se eluye con NaCl 0,9 % y se toman fracciones de 0,5 ml.

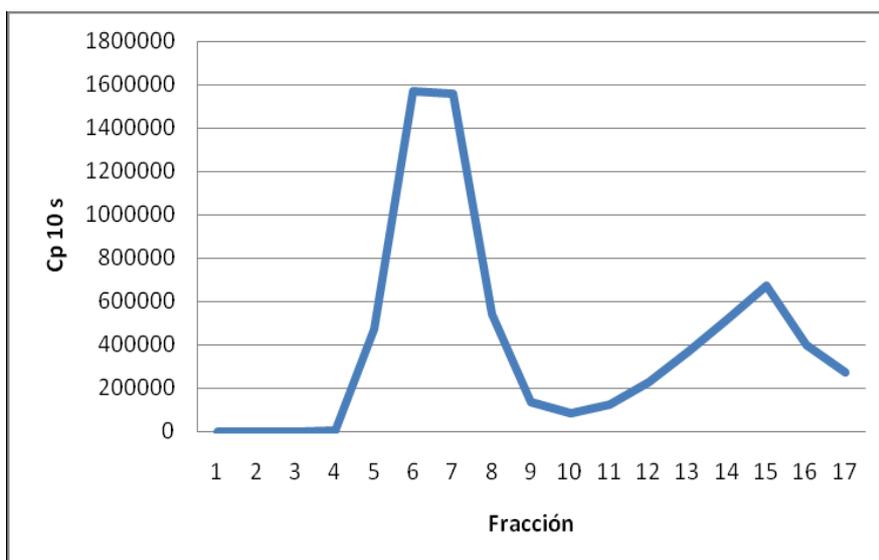


Figura 10. Control de marcación de ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposomas utilizando columna PD-10 G-25, se eluye con NaCl 0,9 % y se toman fracciones de 0,5 mL.

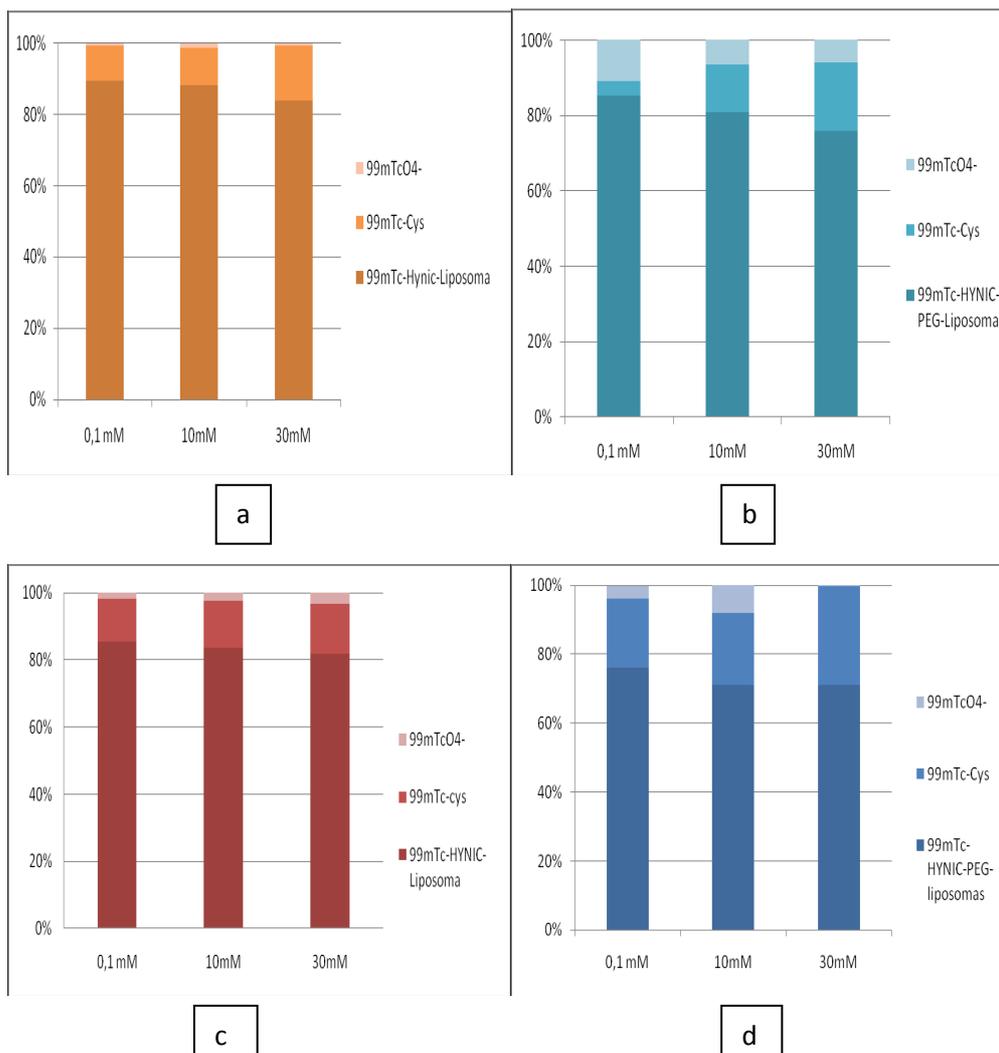


Figura 11. Estudio de estabilidad *in vitro* de ^{99m}Tc - HYNIC-liposomas y sus análogos pegilados, frente a concentraciones crecientes de cisteína (0,1, 10 y 30 mM) a 1 y 3 horas. a: Estabilidad ^{99m}Tc - HYNIC-liposomas a 1h. **b:** Estabilidad ^{99m}Tc - HYNIC-PEG-liposomas a 1h. **c:** Estabilidad ^{99m}Tc - HYNIC-liposomas a 3h. **d:** Estabilidad ^{99m}Tc - HYNIC-PEG-liposomas a 3h.

5.5 Estudios de biodistribución

5.5.1 Estudio de biodistribución en ratones C57BL/6 normales

Los estudios de biodistribución en ratones normales C57BL/6 para las dos composiciones liposomales se muestran en las figuras 12 y 13. Para los liposomas pegilados se observa una más lenta depuración sanguínea que para los liposomas convencionales.

Se observa también que la captación hepática menor para los liposomas peguilados que para los convencionales a los mismos tiempos, y lo mismo se observa en la captación a nivel del bazo. Tanto las biodistribuciones de los liposomas estéricamente estabilizados como para convencionales muestran baja captación en tiroides y en estómago, lo que nos habla de que ambas formulaciones presentan estabilidad *in vivo* (al no ver actividad en los órganos citados descartamos la presencia de $^{99m}\text{TcO}_4^-$).

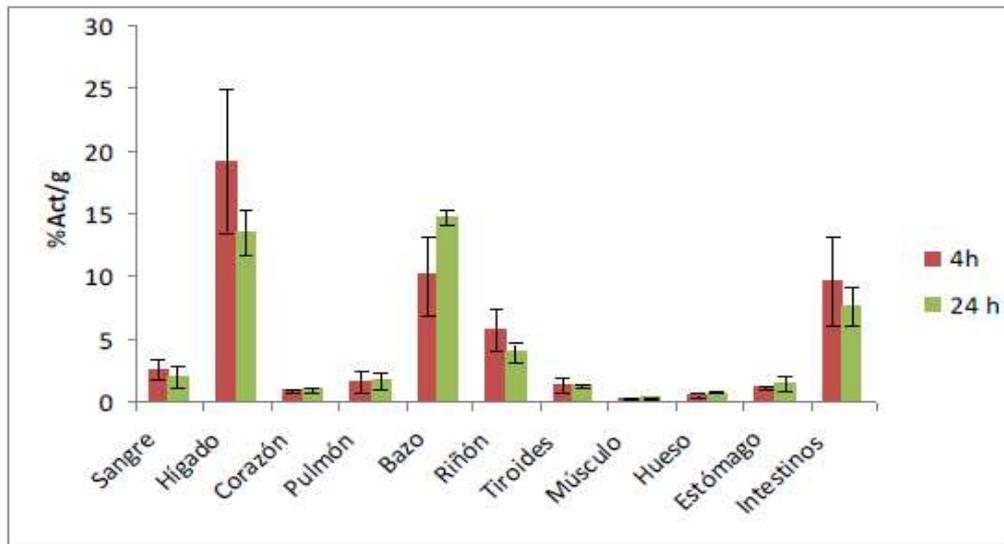


Figura 12. Estudio de biodistribución en ratones C57BL/6 normales, a distintos tiempos post inyección de $^{99m}\text{Tc-HYNIC-liposomas}$. Resultados expresados como %Act/g de tejido u órgano.

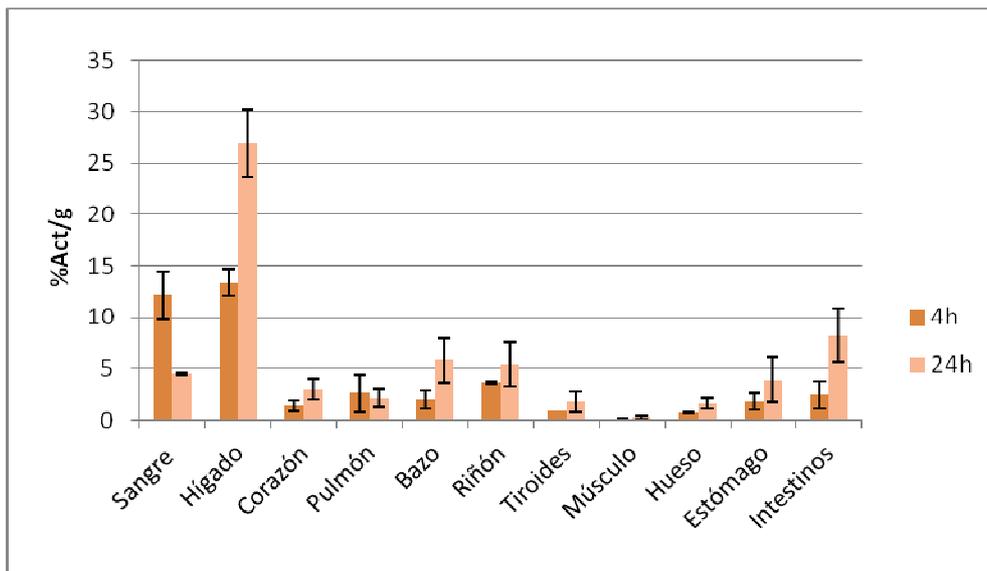


Figura 13. Estudio de biodistribución en ratones C57BL/6 normales, a distintos tiempos post inyección de $^{99m}\text{Tc-HYNIC-PEG-liposomas}$. Resultados expresados como %Act/g de tejido u órgano.

En el estudio de variación de la biodistribución a distintas dosis de liposomas fríos, para los grupos de ratones con bloqueo se presenta una marcada disminución en la captación hepática respecto al grupo de ratones C57BL/6 sin bloqueo (tabla 2).

Una tendencia similar se observa para bazo donde la captación a medida que aumenta la dosis de liposomas fríos disminuye, en un orden de 2 y 3 veces mayor en los grupos sin bloqueo respecto a los grupos con bloqueo de 0.75 y 1,5 mg respectivamente.

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

Con respecto a las relaciones entre la captación hepática y eliminación urinaria transcurridas tres horas, se denota que para los grupos con bloqueo y sin bloqueo, al aumentar la concentración de liposomas fríos la captación hepática disminuye. Sin embargo, en la eliminación renal se observa una mayor actividad a mayor concentración de liposomas fríos.

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

Tabla 2. Estudio de la variación en la biodistribución ensayando distintas cantidades de liposomas “fríos” previo a la inoculación de ^{99m}Tc-HYNIC-liposomas en ratones C57BL/6 normales. Los resultados se expresan en %Act.

Con respecto a los liposomas peguilados, se puede distinguir que a 1 hora (tabla 3) la captación hepática de los no bloqueados es mayor respecto el grupo de 0.75 y 1.5 mg.

Un observación similar se realiza en la captación del bazo donde los grupos con bloqueo de 0.75 y 1,5 mg presentan una captación menor respecto a los no bloqueados.

Se observa que el aumento de eliminación por vía urinaria es más importante que la disminución de la captación hepática, si bien esta última es indicativa de un bloqueo efectivo.

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

1hora						
Sin boqueo		0.75 mg		1.5 mg		
Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	
SANGRE	0,004	0,001	0,01	0,001	0,001	0,001
HIGADO	35,170	4,301	20,64	3,917	14,538	5,691
CORAZON	0,459	0,090	1,46	0,371	0,182	0,069
PULMON	0,836	0,272	1,25	0,507	0,438	0,237
BAZO	3,733	0,320	1,59	0,517	0,805	0,560
RIÑON	2,392	0,481	4,81	0,529	3,746	1,613
TIROIDES	0,193	0,078	0,38	0,090	0,344	0,058
MUSCULO	0,075	0,014	0,02	0,008	0,004	0,003
HUESO	0,001	0,000	0,61	0,148	0,141	0,031
ESTOMAGO	1,983	0,110	1,95	0,508	1,387	0,884
INTESTINOS	6,152	0,734	9,42	3,038	10,742	5,030
vejiga +orina	22,906	3,033	29,82	7,916	39,720	12,753

3horas						
Sin boqueo		0.75 mg		1.5 mg		
Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	
SANGRE	0,004	0,002	0,005	0,002	0,007	0,006
HIGADO	25,773	12,744	23,083	9,936	22,305	12,405
CORAZON	0,226	0,038	1,005	0,269	0,409	0,209
PULMON	0,404	0,239	1,261	0,031	0,869	0,442
BAZO	2,326	0,090	1,331	0,536	1,159	0,738
RIÑON	2,412	0,527	4,522	1,242	3,247	0,785
TIROIDES	0,213	0,096	0,522	0,247	0,191	0,126
MUSCULO	0,064	0,024	0,033	0,015	0,077	0,050
HUESO	0,137	0,031	0,479	0,053	0,223	0,069
ESTOMAGO	0,901	0,567	2,800	1,374	0,641	0,253
INTESTINOS	9,498	3,921	9,895	4,215	15,459	4,506
vejiga +orina	52,228	18,193	36,674	13,311	21,590	10,017

Tabla 3. Estudio de la variación en la biodistribución ensayando distintas cantidades de liposomas “fríos” previo a la inoculación de ^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposomas. Los resultados se expresan en %Act.

5.5.2 Estudio de biodistribución en ratones portadores de Melanoma

En cuanto a la biodistribución de ^{99m}Tc-HYNIC-liposomas en ratones C57BL/6 portadores de melanoma (Figura 14) se observa el mismo patrón de biodistribución que para los ratones normales (figura 9), con un alto porcentaje de captación en hígado y en bazo a las 4 y 24 horas.

A las cuatro horas se observa una relación tumor sangre de 0.4 y una relación tumor músculo de 5, mientras que a las 24 horas esta última aumenta a 8. La relación tumor/sangre aumenta significativamente alto a las 24 horas (figura 15).

En la biodistribución en ratones portadores de melanoma a 4 horas post inyección de ^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposomas (Figura 16) se observa una actividad en sangre (11.4%), superior a la de sus análogos convencionales, la captación hepática es igualmente alta.

Las relaciones tumor/sangre y tumor/músculo que presentan los liposomas pegilados a 4 horas son de 0.2 y 6.4 respectivamente, mientras que a las 24 horas aumenta las relación tumor/sangre a 1.4 y se observa una ligera disminución en la relación tumor/músculo adquiriendo un valor de a 4.2 (figura 17).

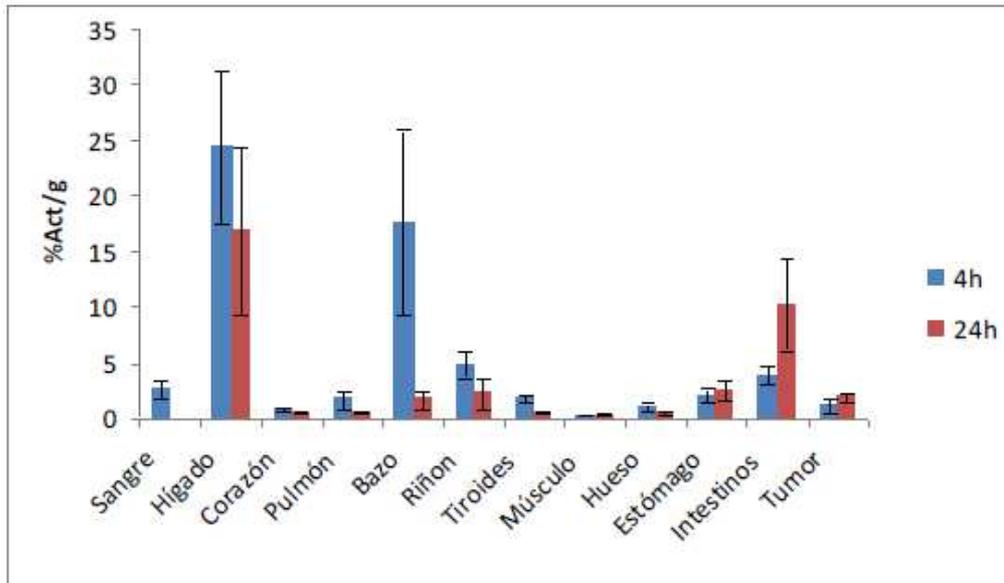


Figura 14. Biodistribución a 4 y 24 horas de ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas en ratones C57BL/6 con melanoma inducido por células B16F1.

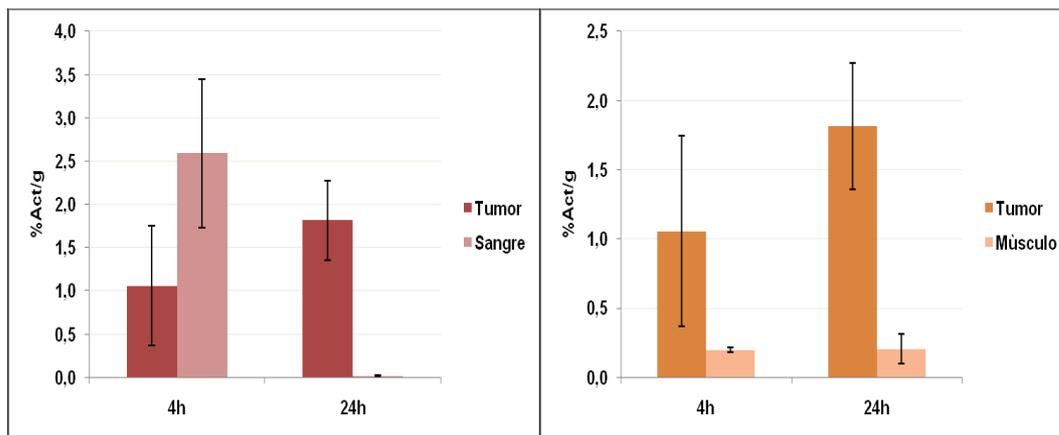


Figura 15. Relación T/NT a 4 y 24 horas de ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas en ratones C57BL/6 con melanoma inducido por células B16F1.

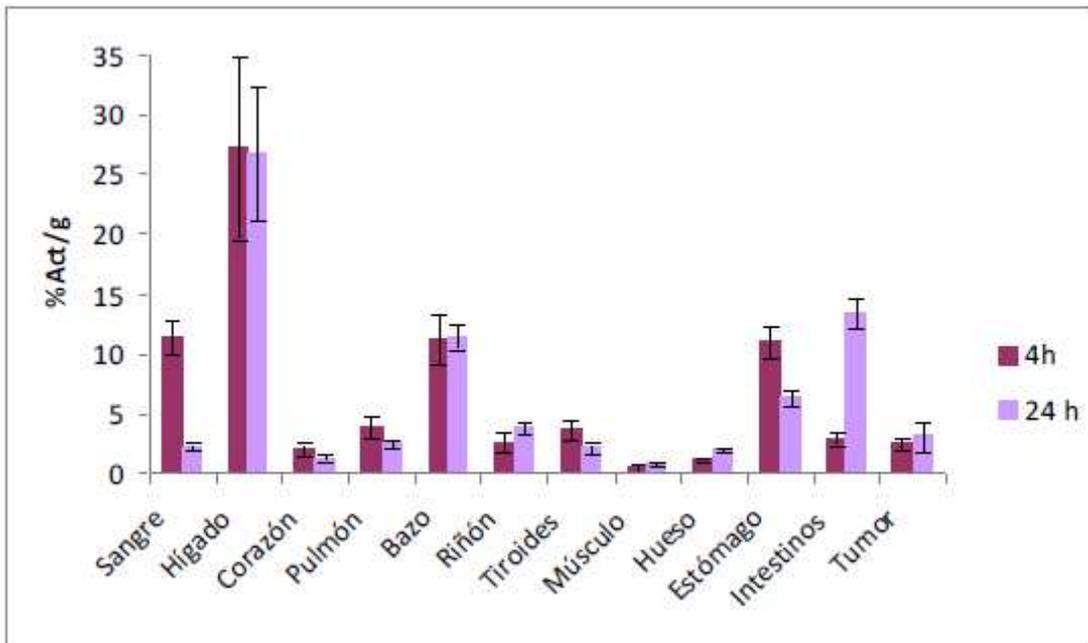


Figura 16. Biodistribución de ^{99m}Tc-HYNC-PEG-liposomas en ratones C57BL/6 portadores de melanoma.

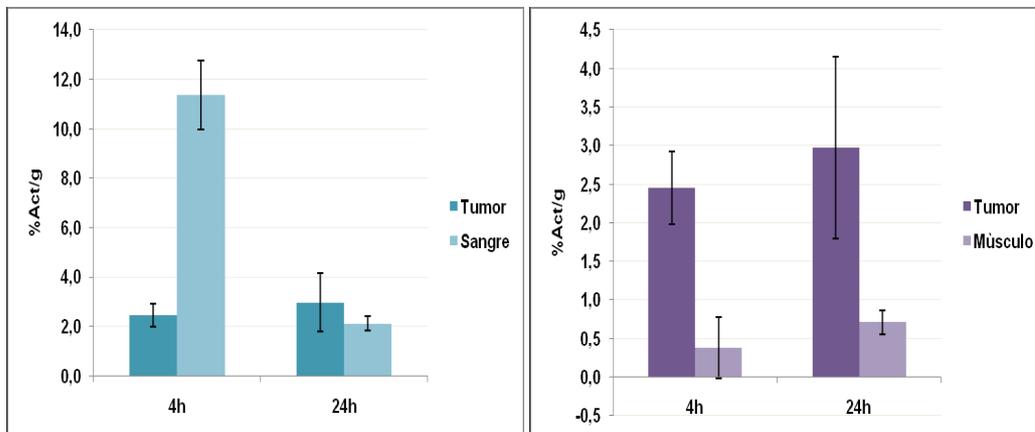


Figura 17. Relación T/NT a 4 y 24 horas de ^{99m}Tc-HYNC-PEG-liposomas en ratones C57BL/6 con melanoma inducido por células B16F1

5.6 Estudios centellográficos

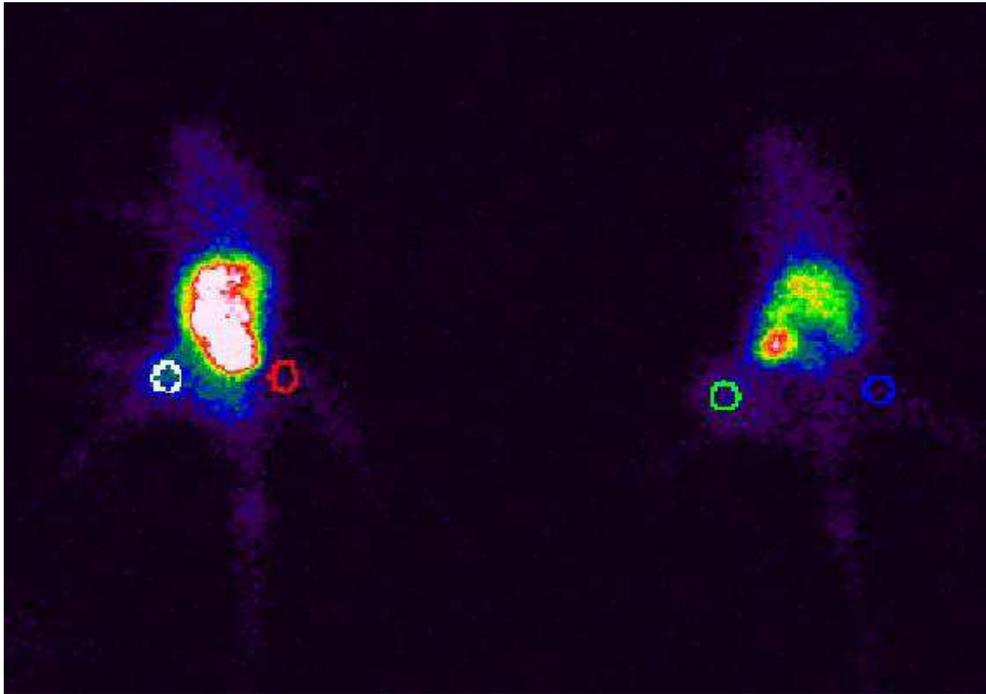


Figura 18. Estudio centellográfico a 4 horas post inyección de ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas en ratones C57BL/6 con melanoma inducido por células B16F1.

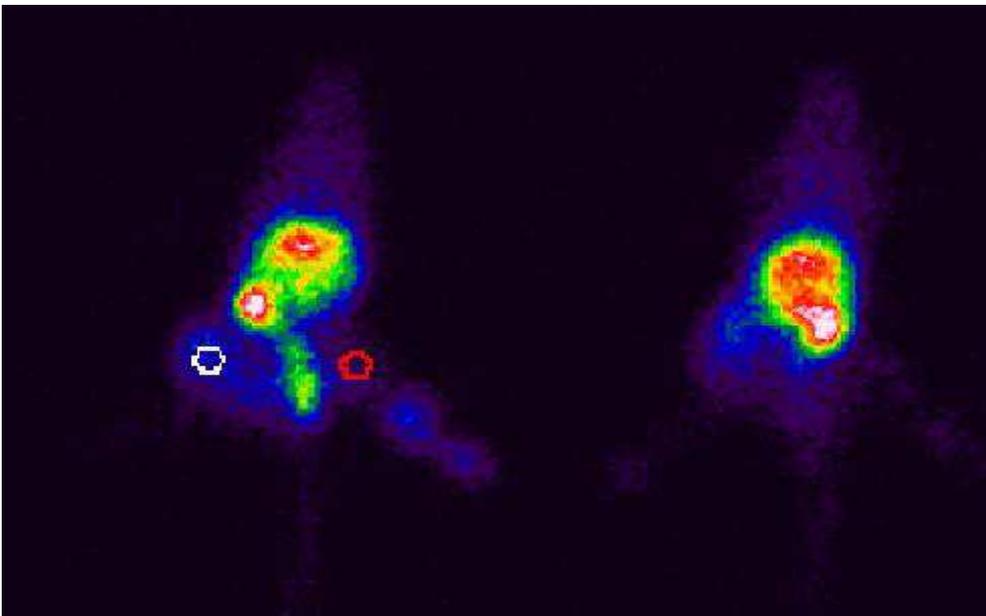


Figura 19. Estudio centellográfico en ratones C57BL/6 con melanoma a 4h post inyección de 124 μCi de ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposomas.

En los estudios centellográficos de ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas en ratones C57BL/6 portadores de melanoma, la relación de actividad entre el tumor (ROI) y su contra lateral background (NT) es: $T/NT = 130/85 = 1.5$ y en el otro ratón con menor actividad inyectada (derecha), es de: $T/NT = 21/7 = 3.0$ (figura 18).

Para sus análogos pegilados (figura 19) la relación T/NT que presentan es de $290/68 = 4.3$.

6. DISCUSIÓN

Dentro de las aplicaciones diagnósticas utilizando liposomas, una de las estrategias utilizadas es su marcación con radionucleidos emisores gamma como el ^{99m}Tc . En este sentido, el ^{99m}Tc es el radionucleido más ampliamente utilizado debido a sus óptimas características y su disponibilidad comercial.

El lípido estearilamina derivatizado al ligando bifuncional HYNIC fue obtenido eficientemente y en cortos tiempos de reacción mediante el empleo de radiación de microondas. En este sentido, hemos llevado a cabo una síntesis asistida por microondas de un derivado lipídico esterilamida adecuadamente unido a HYNIC-hidrazona, que nos permitió tanto la formación de un sistema liposomal como una marcación estable con el radionucleido ^{99m}Tc .

En el presente trabajo se obtuvieron formulaciones liposomales estables, las cuales se pudieron caracterizar, demostrándose que presentaban tamaño nanométrico (Figura 8). Se lograron obtener para ambas formulaciones purzas radioquímicas superiores al 90%, siendo estables en el tiempo, incluso a 24 horas presentando una pureza en el entorno del 80%.

En el estudio de estabilidad *in vitro* se enfrentaron los liposomas marcados a diferentes concentraciones de cisteína (la elección de este competidor se realizó de acuerdo a lo reportado en bibliografía (46), este ensayo es un buen predictor de la estabilidad *in vivo* de la molécula marcada. De estos estudios se puede concluir que los liposomas convencionales derivatizados con HYNIC presentan una mayor estabilidad frente a sus pares pegilados (figura 9, 10, 11), lo que demuestra que la estabilidad otorgada por la pegilación es meramente *in vivo*, otorgándose a que presentan impedimento estérico ante las opsoninas plasmáticas.

Al comparar el comportamiento *in vivo* de el ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas frente a los ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposomas (figura 12 y 13, respectivamente) en ratones normales, parecería que los

liposomas pegilados presentan mayor captación hepática (lo cual se contradice con lo encontrado en bibliografía (47), dado que tendrían “mayor reconocimiento por el sistema MSP (Sistema Fagocítico Mononuclear)”, pero en realidad son metabolizados más lentamente que los convencionales por lo que permanecen más tiempo en el organismo, cumpliendo el objetivo para el cual fueron sintetizados.

La metabolización se ve reflejada también por una mayor eliminación urinaria, se puede observar dicho comportamiento en los graficas de % Act (no se muestran), donde los HYNIC liposomas a 4 h presentan un 48% aprox. de eliminación urinaria y a las 24 horas un 81% aprox., mientras que los HYNIC-PEG liposomas muestran un 12% y 23 % a las 4 y 24 h respectivamente. Esta eliminación urinaria mayor se podría explicar porque los HYNIC-liposomas son metabolizados de forma más rápida y lo eliminado por orina se trataría de fragmentos de lípidos marcados.

En el estudio del comportamiento *in vivo*, se observa también una eliminación urinaria mayor en los grupos de ratones inyectados con una mayor dosis de bloqueo (tabla 2 y 3), para ambas formulaciones liposomales a 1 hora post inyección.

A este mismo tiempo tanto para los ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas como para sus análogos pegilados, se observa una alta captación en hígado y en bazo para el grupo de ratones sin bloqueo (tabla 2 y 3), lo que se puede deber a la captura de los liposomas por las células Kupffer dispuestas en el hígado y sistema retículo endotelial.

La captación por el hígado a las 3 horas post inyección, en el grupo sin bloqueo, es menor en los liposomas convencionales con respecto a los pegilados (lo que concuerda con lo mencionado en bibliografía (48), donde la incorporación del polímero PEG prevendría la opsonización y posterior captura por las células de Kupffer.

Tomando en conjunto los datos de los estudios de biodistribución y centellográficos obtenidos para ambas clases de liposomas, se puede denotar que para el ^{99m}Tc - HYNIC-liposomas la relación tumor/sangre se encuentra elevada a las 4 h post inyección (figura 15), hora a la que se realizó la imagen centellográfica, lo que podría explicar la relación moderada con respecto a su contralateral (1.5) (figura 18). Pensamos que se podría obtener mejores resultados si se tomaran imágenes a tiempos mayores post inyección.

Por otra parte, la moderada relación obtenida por el ROI (figura 18), no es coherente con la relación tumor/ músculo (5) obtenida a 4 horas por esta clase de liposomas (Figura 15). Esto podría deberse a una baja captación por el tumor en la imagen que se muestra, atribuyéndolo a que el tamaño de la masa tumoral es un factor importante en la captación de los nano

objetos, ya que si el tumor alcanza un tamaño grande genera centros necróticos. Otro factor importante es que la imagen se realizó en una cámara para humanos, siendo lo ideal realizarlo en una cámara de animales donde la resolución es mejor para reactivos biológicos de menor tamaño, por la menor distancia entre los cristales de detección y el animal de experimentación.

En cuanto al ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposomas, comparado con sus análogos convencionales se observa un clearance sanguíneo más lento, comparando los niveles de actividad a 4 y 24 horas (figura 14 y 16). Cabe destacar que la relación tumor/sangre a 24 horas no es tan marcada como para ^{99m}Tc -HYNIC-liposomas, siendo coherente con la hipótesis de que la pegilación previene la eliminación de los liposomas de sangre, manteniendo así una actividad en pool sanguíneo mayor a 24 horas.

Sin embargo, al comparar la relación tumor/músculo a 4 horas (Figura 17) con respecto a la formulación sin pegilación (Figura 15) se puede apreciar que es mayor (6.4 vs 5 respectivamente) siendo coherente también con lo observado en la imagen centellográfica, donde la comparación del ROI con la contralateral es de 4.3 (figura 19), mientras que para los convencionales (figura 18) se observaba una relación de 1,5.

Estos datos tomados en conjunto hace de los liposomas marcados a través de HYNIC-estearilamina potenciales candidatos para el diagnóstico imagenológico de melanoma.

7. CONCLUSIÓN

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

Los liposomas fueron capaces de acumularse con alta especificidad en los tumores de melanoma inducidos con células B16F1, pudiendo ser detectados de manera no invasiva.

Los liposomas marcados a través de estearilamina-HYNIC-hidrazona presentan un buen potencial como agentes de imágenes tumorales.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. http://www.euroresidentes.com/futuro/nanotecnologia/nanotecnologia_que_es.html
2. www.euroresidentes.com/futuro/nanotecnologia/diccionario/nanomedicina.html
3. Morilla, M.J; Romero, E.L. Tesis doctoral Maria José Morilla. Parte del capítulo 1. (2003) Copyright UNQ.
4. <http://www.monografias.com/trabajos12/cance/cance.shtml>
5. Folkman, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? (1990) *J. Natl Cancer Inst.* **82**(1):4-6.
6. Folkman, J; Heymach, J; Kalluri, R. Tumor angiogenesis. (2006) 7th edition Hamilton. Ontario; B. B.C. Decker. 157-191.
7. Zetter, B. Angiogenesis and tumor metastasis. (1998) *Annu. Rev. Med.* 49:407-424.
8. Radall, J; Mrsny. Active Targeting Strategies in Cancer with a Focus on Potential Nanotechnology Applications. (1999) *Nanotechnology for Cancer Therapy*.
9. http://nano.cancer.gov/resource_center/tech_background.asp
10. Rennen, H; Boerman, O; Koenders, et al. Labeling Proteins with Tc-99m via Hydrazinonicotinamide (HYNIC): Optimization of the Conjugation Reaction. (2000) *Nuclear Medicine & Biology*. 27: 599-604.
11. King, R; Surfraz, M; Biagini, S; et al. How do HYNIC-Conjugated peptides bind technetium? Insights from LC-MS and stability studies. (2008) *Dalton Tans.* 43: 4998-5007.
12. Abrams, M. J; Juweid, M; TenKate, C. I; Schwartz, D. A; Hauser, M. M; Gaul, F. E; Fucello, A. J; Rubin, R; Strauss, H. W; Fischman, A. J. Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. (1990) *J. Nucl. Med.* 31: 2022-2028.

13. Babich, J; Solomon, H; et al. Technetium-99m labeled hydrazino nicotinamide derivatized chemotactic peptide analogues for imaging focal sites of bacterial infections. (1993) *J. Nucl. Med.* 34: 1964-1974.
14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20160097>
15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20160077>
16. http://nano.cancer.gov/objects/pdfs/Cancer_Nanotechnology_Plan-508.pdf
17. Gregoriadi, G. *Liposome Technology 3* third Edition. Interactions of Liposomes with the Biological Milieu. (2007) Informa Healthcare USA, Inc.3; 113-122.
18. Klibanow, A.I ; Maruyama K; Torchilin VP; Huaang L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes.(1990) *FEBS Lett* 268;235-237.
19. Lasic, D.D; Papahadjopoulos D (Eds). *Medical Applications of Liposomes.* (1998) Elsevier.
20. Allen, T.M; Chonn, A. Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system.(1987) *FEBS Lett* 223:42-46.
21. Woodle, M ; Lasic, D; Sterically stabilized liposomes.(1992) *BiochimBiophys Acta.* 1113:171-199.
22. Bedu-Addo, F; Tang, P; Xu, Y; Huang, L. Effects of Polyethyleneglycol Chain Length and Phospholipid acyl chain composition on the interaction of polyethyleneglycol-phospholipid conjugates with phospholipid: Implications in liposomal drug delivery. (1996) *Pharmaceutical Research.* 1365; 710-717.
23. Mobed, M. ; Chang, T.M.S. Colloidal Stability of Physically-Stabilized Carboxymethylchitin-Coated Liposomes and Sterically Stabilized Stealth Liposomes for Biological Applications. (1998) *Biomaterials*, 19(13); 1167-1177.
24. Torchilin, V.P; Shtilman, M.I; Trubeyskoy, V.S; Whiteman K; Milstein AM. Amphiphilic vinyl polymers effectively prolong liposome circulation time in vivo. (1994) *Biochim Biophys Acta* 1195:181–184.

25. Torchilin, V.P; Trubetskoy V.S; Whiteman, K.; Caliceti, P; Ferruti, P; Veronese, F.M. New synthetic amphiphilic polymers for steric protection of liposomes in vivo. (1995) *J Pharm Sci* 84:1049–1053.
26. Maruyama, K; Okuizumi, S; Ishida, O; Yamauchi, H; Kikuchi, H; Iwatsuru, M. Phosphatidylpolyglycerols prolong liposome circulation in vivo. (1994) *Int J Pharm* 111:103–107.
27. Woodle, M.C; Engbers, C.M; Zalipsky, S. New amphiphilic polymer-lipid conjugates forming long-circulating reticuloendothelial system-evading liposomes. (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:493–496.
28. Takeuchi, H; Toyoda, T; Toyoboku, H; Yamamoto, H; Hino, T; Kawashima, Y. Improved stability of doxorubicin-loaded liposomes by polymer coating. (1996) *Proc Int Symp Control Rel Bioact Mater* 23:409–410.
29. Whiteman, K.R; Subr, V; Ulbrich, K; Torchilin V.P. Attachment of HPMA derivatives to the liposome surface makes them long-circulating. (1999) *Proc Int Symp Control Rel Bioact Mater* 26:1064–1065.
30. Moghimia, S.M; Bonnemainb, B. Subcutaneous and intravenous delivery of diagnostic agents to the lymphatic system: applications in lymphoscintigraphy and indirect lymphography. (1999) *Advanced Drug Delivery Reviews, Elsevier.* 37: 295–312.
31. Wiessleder, J.F; Heautot, B.K; Schaffer, N; Nossiff, M.I; Papisov, A.A; Bogdanov, T.J; Brady, MR. Lymphography: study of a high lymphotropic agent. (1994) *Radiology.* 191: 225–230.
32. Moghimi, S.M; Rajabi-Siahboomi, A.R. Advanced colloid-based systems for efficient delivery of drugs diagnostic agents to the lymphatic tissues. (1996) *Prog Biophys. Mol. Biol.* 65:221-249.
33. Moghimi, S.M; Hawley, A.E; Christy, N.M; Gray, T; Llum, I; Davis, S.S. Surface engineered nanospheres with enhanced drainage into lymphatics and uptake by macrophages of the regional lymph nodes. (1994) *FEBS Lett* 344:25-30.

34. Oussoren, C; Storm, G. Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection: III. Influence of surface modification with poly(ethyleneglycol). (1997) *Pharm Res* 14:1479–1484.
36. Kurdziel, KA; Ravizzini, G. The evolving role of nuclear molecular imaging in cancer. (2008) *Expert Opin Med Diagn.* 2(7):829-842.
37. Mankoff, D. Molecular imaging as a tool for translating breast cancer science. (2008) *Breast Cancer Research.* 10(Suppl 1): S3.
38. Liu, S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target specific delivery of metallic radionuclides. (2008) *Advanced drugs delivery reviews.* 60: 1347-1370.
39. Yoshihara, K ; Omori, T. *Technetium and Rhenium: Their Chemistry and Its Applications.* (1996) Springer.
40. *Technetium-99m Radiopharmaceuticals: Manufacture Of Kits.* International Atomic Energy Agency, Viena 2008. Technicals Reports Series No. 466, Capítulo 2.
41. King, R; Surfraz, M; Biagini, S; et al. How do HYNIC-Conjugated peptides bind technetium? Insights from LC-MS and stability studies. (2008) *Dalton Tans.* 43: 4998-5007.
42. Harris T.D; Sworin, M; Neal, W; Rajopadhye, M; Damphousse P.R; Glowacka, D; Poirier, M.J; Yu, K. Synthesis of Stable Hydrazones of a Hydrazinonicotinyl-Modified Peptide for the Preparation of ^{99m}Tc-Labeled Radiopharmaceuticals. (1999) *Bioconjugate Chem.* 10: 808-914.
43. Liu, S; Edwards, D.S; Tc-99m-labelling small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. (1999) *Chem Rev.* 99: 2235-2268.
44. Laverman, P; Dams, E.Th. M; Oyen, W; Storm, G; Koenders, E.B; Prevost, R; van der Meer, J; Corstens, F; Boerman, O. A Novel Method to Label Liposomes with ^{99m}Tc by the Hydrazino Nicotinyl Derivative. (1999) *The Journal Nuclear Medicine.* Vol 40. 1; 192-197.

45. Judge, L.M; O`Leary, D.J; Fujii, G; Skenes, C; Paquette, T; Proffitt, R.T. A Hydrazino Nicotinamide Derivative of Cholesterol for Radiolabelling Liposomes with ^{99m}Tc.(1999) J. Labelled Cpd. Radiopharm. 42: 23-28.
46. Decristoforo, C; Mather, S.J. Technetium-99m somatostatin analogues: effect of labelling methods and peptide sequence. (1999) European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. Volume 26, 8: 869-876.
47. Elbayoumi, Ta; Torchilin, V.P. Use of Radiolabeled Liposomes for Tumor Imaging. In Bulte JWM, Modo M (eds) (2007). Nanoparticles in Biomedical Imaging, vol. 102, Springer New York, 211-236.
48. Castro, E. A. Las drogas liposomales. (1999) Rev. Acad. Colomb. Cienc. 23(89): 625-634.
49. Lopez, S.E.; Perez, Y.; Restrepo, J.; Salazar, J.; Charris, J. Trifluoroacetylation of arylamines using poly-phosphoric acid trimethylsilylester (PPSE).(2007) J. Fluorine. Chem. 128: 566-569.
50. Ohtaka, J.; Sakamoto, T.; Kikugawa, Y. A one-pot procedure for trifluoroacetylation of arylamines using trifluoroacetic acid as a trifluoroacetylating reagent. (2009) Tetrahedron Lett. 50: 1681-1683.
51. Kim, J-G.; Jang, D.O. Trifluoroacetylation of amines with trifluoroacetic acid in the presence of trichloroacetonitrile and triphenylphosphine.(2010) Tetrahedron Lett. 5: 683-685.
52. Salazar, J.; Lopez, S.E.; Rebollo, O. J.(2003) Fluorine. Chem. 124, 111.
53. Morton, DB; Griffiths, P. (1985) Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animal and hypothesis for assessment.(1985). Veterinary record. 116: 431-436.

9. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas a aquellas personas que han contribuido a la realización de esta tesis:

A mi tutores de tesis Williams Porcal y Pablo Cabral por haberme brindado la posibilidad de realizar este trabajo, por sus consejos, por sus horas de trabajo brindadas, y por las oportunidades que me dieron para crecer como persona.

A Mirel Cabrera por su dedicación y generosidad a la hora de transmitirme su conocimiento; a todos y cada uno de los compañeros del grupo, muy especialmente a Marcelo Fernández y a Fernanda García, por su ayuda en el laboratorio y gran apoyo.

A Juan Pablo Gambini y Alejandra Medrano por toda su colaboración.

También agradecer a mi familia en especial Gabriela, Carlos y Maxi por ser los pilares de mi vida.

A mis amigos de toda la vida y a Gastón por siempre apoyarme en todo momento.

Gracias a todos!

Nicole