



# “Síntesis, caracterización y evaluación biológica de nanosistemas dendriméricos para el tratamiento del cáncer de mama”

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas.  
Opción: Biología Celular y Molecular

**Lic. Natalia Oddone**  
**Laboratorio de Señalización Celular y Nanobiología**  
**IIBCE (Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable)**

**Tutor: Dr. Juan Claudio Benech**  
**Co-tutor: Dr. Pablo Cabral**

## Agradecimientos:

Quisiera agradecer a mis compañeros del Laboratorio de Señalización Celular y Nanobiología por haberme apoyado durante estos años como estudiante de maestría. Este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración de un grupo interdisciplinario. Gracias a la conformación de este equipo, he podido acceder a equipamientos tales como el de espectroscopía infrarroja (Laboratorio de Biomateriales, Facultad de Ciencias), Resonancia Magnética Nuclear y z-Sizer (Laboratorio de Biomateriales, Facultad de Ciencias y Laboratorio de Biotecnología del Instituto Polo Tecnológico de Pando). Quisiera agradecer a Eduardo Méndez y a Santiago Botasini por haberme ayudado a realizar las medidas de infrarrojo y a interpretar los resultados obtenidos mediante esta técnica. Este análisis fue fundamental para la caracterización de uno de los nanosistemas dendriméricos. A Nicole Lecot y a Hugo Cerecetto por haber facilitado la realización de los análisis de RMN (Resonancia Magnética Nuclear) y por la interpretación de los espectros obtenidos. A Hugo Cerecetto por haber guiado el trabajo relacionado a la marcación de los dendrímeros PAMAM G4.5 con el fluoróforo, FITC. A Helena Pardo y a Santiago Botasini por haber realizado los análisis de tamaño y carga de los nanosistemas dendriméricos en sus respectivos lugares de trabajo. A mi tutor, Juan Claudio Benech por haberme guiado e impulsado a continuar, a haber ayudado a encontrar soluciones a los problemas que surgieron durante los estudios que se realizaron en el marco de este trabajo. A Pablo Cabral por haber guiado los estudios relacionados a la caracterización fisicoquímica de los nanosistemas dendriméricos. A Marcelo Fernández y a Gabriela Kramer por haber colaborado con el trabajo con los animales. A Marcos Tassano y a Luciana Kovacs por haber colaborado con la marcación de los dendrímeros PAMAM G4 con  $^{99m}\text{Tc}$  y con los estudios de biodistribución.

También quisiera agradecer al Centro de Nanotecnología, química y física de materiales (CINQUIFIMA) del Espacio Interdisciplinario de la UdelaR, del cual formo parte. Este centro ha formado una red de investigadores provenientes de distintas áreas que tienen como línea de investigación principal la de la Nanotecnología. Esta red de investigadores hizo posible el trabajo interdisciplinario, el cual es fundamental para llevar a cabo proyectos de investigación y de postgrado en el campo de la Nanotecnología.

## Índice

Resumen .....	6
1. Introducción .....	7
1.1. Cáncer de mama. ....	7
1.1.1. Incidencia y mortalidad. ....	7
1.1.2. Factores de riesgo. ....	8
1.2. Quimioterapia. Limitaciones de la quimioterapia. ....	11
1.2.1. Fármacos estabilizadores de Microtúbulos. Taxanos: Paclitaxel y Docetaxel..	12
1.3. Sistemas de entrega de fármacos. Nanotecnología y Nanomedicina. ....	14
1.3.1. Patofisiología de la vasculatura tumoral. ....	15
1.3.2. Efecto “EPR” y Nanomedicina. ....	16
1.3.3. “Drug Delivery” o entrega dirigida de Docetaxel (DTX). ....	17
1.3.4. Nanoformulaciones basadas en PTX y DTX. ....	18
1.4. Dendrímeros. ....	19
1.4.1. Dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM). ....	21
1.4.2. Nanomedicinas basadas en dendrímeros .....	23
2. Objetivo .....	25
2.1. Objetivos específicos .....	25
3. Materiales y Métodos .....	25
3.1. Estudio de la captación intracelular de dendrímeros PAMAM G4-FITC por células 4T1 y MDA-MB-231. ....	25
3.1.1. Marcación de dendrímeros PAMAM G4 con $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ . ....	26
3.1.2. Biodistribución de dendrímeros PAMAM G4- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ en ratones BALB/c normales y ratones BALB/c con tumor mamario. ....	26
3.1.3. Estudio de captación tumoral de dendrímeros PAMAM G4-FITC en ratones BALB/c con tumor de mama inducido con células 4T1. ....	27
3.2. Estudio de citotoxicidad de dendrímeros PAMAM G4 y dendrímeros PAMAM G4.5 en células 4T1, MDA-MB-231 y BJ. ....	27
3.3. Conjugación de dendrímeros PAMAM G4.5 con piperacina-Boc. ....	28
3.3.1. Desprotección de Boc y conjugación de PAMAM G4.5 con Fluoresceína Isotiocianato (FITC). ....	28
3.3.2. Medida de tamaño de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacina-FITC. ....	29
3.3.3. Caracterización por $^1\text{H}$ RMN de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacina y dendrímeros PAMAM G4.5-piperacina-FITC. ....	29

3.3.4. Estudio de citotoxicidad y de captación de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC en células 4T1.....	29
3.3.5. Estudios de imagenología <i>ex vivo</i> de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC en ratones Balb-c con tumor mamario inducido con células 4T1.....	29
3.4. Encapsulación de DTX en dendrímeros PAMAM G4.5. ....	30
3.4.1. Cuantificación de dendrímeros PAMAM G4.5-DTX por HPLC.....	30
3.4.2. Caracterización de dendrímeros PAMAM G4.5-DTX por espectroscopía infrarroja.....	30
3.4.3. Evaluación de la efectividad antitumoral de dendrímeros PAMAM G4.5-DTX. ....	31
4. Resultados .....	31
4.1. Captación de dendrímeros PAMAM G4-FITC por células 4T1 y MDA-MB-231. ...	31
4.1.2. Biodistribución de dendrímeros PAMAM G4- <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> en ratones BALB/c normales y con tumor mamario inducido con células 4T1.....	32
4.1.3. Captación tumoral de dendrímeros PAMAM G4-FITC en ratones BALB/c con tumor mamario inducido con células 4T1. ....	35
4.2. Citotoxicidad de dendrímeros PAMAM G4 y dendrímeros PAMAM G4.5. ....	36
4.3. Caracterización de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacina y dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC por <sup>1</sup> H RMN.....	38
4.3.1. Medida de tamaño y potencial z de los dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC por z-sizer. ....	39
4.3.2. Citotoxicidad de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC en células 4T1. ....	39
4.3.3. Captación de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC en células 4T1..	40
4.3.4. Captación de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC por imagenología de fluorescencia <i>ex vivo</i> en ratones BALB/c con tumor mamario.....	41
4.4. Encapsulación y cuantificación de DTX en dendrímeros PAMAM G4.5.....	41
4.4.1 Caracterización de dendrímeros PAMAM G4.5-DTX por espectroscopía infrarroja.....	43
4.4.2. Estudio de la eficacia antitumoral <i>in vitro</i> de dendrímeros PAMAM G4.5-DTX. ....	44
5. Discusión .....	45
5.1. Captación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de dendrímeros PAMAM G4-FITC.....	45
5.2. Citotoxicidad de dendrímeros PAMAM G4 y dendrímeros PAMAM G4.5.....	46
5.3. Obtención y caracterización de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC. ...	47
5.3.1. Captación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC	49

---

5.4. Encapsulación de DTX en dendrímeros PAMAM G4.5 y caracterización fisicoquímica de dendrímeros PAMAM G4.5-DTX.....	50
5.4.1. Estudio de la eficacia antitumoral de dendrímeros PAMAM G4.5-DTX. ....	50
6. Conclusiones.....	51
7. Perspectivas. ....	52
8. Bibliografía .....	52

## Resumen

El cáncer de mama es el cáncer más común en mujeres de todo el mundo, presentándose un millón de nuevos casos por año. Dentro de los tratamientos sistémicos adyuvantes que acompañan a la cirugía mamaria, está la quimioterapia y el tratamiento hormonal. La eficacia de la quimioterapia está limitada a una inadecuada concentración de la droga en el tejido tumoral y/o a los efectos tóxicos en los tejidos normales. La baja solubilidad en agua es también una limitante que tienen muchos fármacos anticancerígenos para una óptima aplicación clínica. El Docetaxel (DTX) es una droga estabilizadora de microtúbulos que induce la apoptosis celular, y es de uso común en el tratamiento del cáncer de mama. La única formulación comercial de DTX (Taxotere®) disponible, basada en mezclas de surfactantes y co-solventes (Tween 80 y etanol), se asocia con serios efectos adversos. Los sistemas de entrega de fármacos basados en nanopartículas pueden mejorar la entrega de fármacos poco solubles, reducir la acumulación no específica, mejorar la farmacocinética e incrementar las concentraciones de droga en los tejidos de interés. En tumores sólidos, los vehículos de tamaño nanométrico pueden ingresar a los tumores pasivamente por medio del efecto “EPR” (efecto de permeabilidad y retención). Este efecto es consecuencia de la patofisiología de los vasos sanguíneos tumorales, los cuales presentan un endotelio defectuoso con espacios entre las células endoteliales. Asimismo, como el drenaje linfático en el tejido tumoral es poco eficiente, lo que representa un “callejón sin salida” biológico para las nanopartículas, las nanopartículas se acumulan de forma pasiva. Los dendrímeros son polímeros esféricos de tamaño nanométrico ampliamente usados como sistemas de entrega de fármacos. En este trabajo se emplearon dendrímeros PAMAM (poliamidoamina) para la síntesis y desarrollo de nanosistemas dendriméricos como potenciales agentes de entrega de DTX. Los nanosistemas dendriméricos PAMAM G4-FITC y PAMAM G4.5-piperacínil-FITC fueron captados por células tumorales mamarias *in vitro* y por el tumor mamario *in vivo*. Los dendrímeros PAMAM G4 (catiónicos) sin FITC resultaron ser citotóxicos en las líneas celulares empleadas. En cambio, los dendrímeros PAMAM G4.5 (aniónicos) no presentaron citotoxicidad a las concentraciones estudiadas. En base a estos resultados, para la encapsulación de DTX, se emplearon únicamente los dendrímeros PAMAM G4.5. El nanosistema dendrimérico PAMAM G4.5-DTX fue caracterizado y evaluado biológicamente. La caracterización indicó que el DTX interacciona con la cavidad interna de los dendrímeros PAMAM G4.5, lo que demuestra su encapsulación en estas estructuras. El nanosistema presentó una eficacia antitumoral similar a la del DTX libre en células de tumor mamario. Asimismo, en células no tumorales, el nanosistema desarrollado resultó ser menos citotóxico que el DTX libre. En conclusión, el presente trabajo es pionero en el estudio de la captación de dendrímeros PAMAM G4.5 (marcados con fluoróforos) en líneas celulares y a nivel tumoral, así como también en la encapsulación de DTX en esta clase de dendrímeros.

## 1. Introducción

### 1.1. Cáncer de mama.

El cáncer de mama es el cáncer más común que afecta a mujeres de todo el mundo con un millón de nuevos casos cada año <sup>1-3</sup>. El cáncer de mama comprende el 18% de todos los tipos de cáncer y constituye la segunda causa de muerte en mujeres <sup>2,3</sup>. En el 2008, alrededor de 1.4 millones de mujeres fueron diagnosticadas con cáncer de mama y más de 450.000 mujeres murieron por esta enfermedad. Una proporción significativa de pacientes son diagnosticadas en las primeras etapas de cáncer de mama. En las primeras etapas de cáncer de mama, las pacientes disponen de distintas opciones de tratamiento. La mayoría de las pacientes recién diagnosticadas pueden optar entre dos opciones de cirugía: a) cirugía conservadora de mamas con radioterapia o b) mastectomía <sup>1</sup>. Luego de la cirugía se requiere de una terapia sistémica adyuvante. Dentro de los tratamientos sistémicos adyuvantes están la quimioterapia y el tratamiento hormonal. Ambos mejoran significativamente la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia total. Sin embargo, estos tratamientos sistémicos adyuvantes se asocian con la aparición de efectos adversos, los cuales pueden impactar negativamente en el estilo de vida de las pacientes <sup>1</sup>.

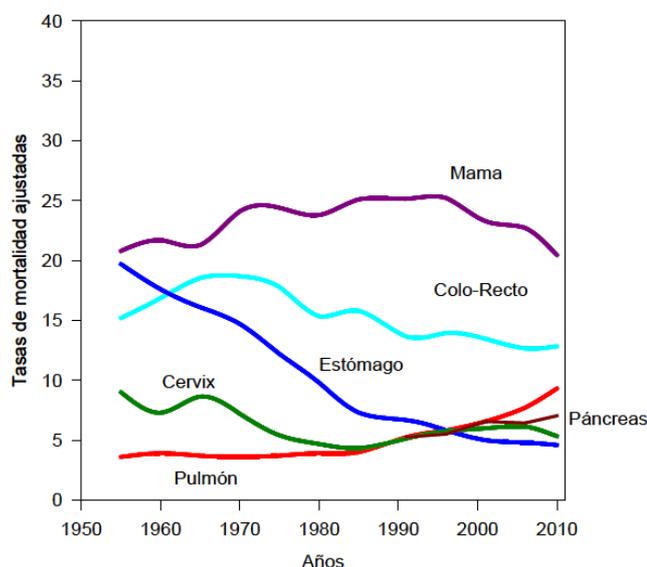
#### 1.1.1. Incidencia y mortalidad.

Las muertes por cáncer constituyen aproximadamente un cuarto (23.8%) del total de las defunciones registradas en Uruguay cada año. Estas cifras corresponden al 2010. En términos generales, el riesgo de padecer o morir por cáncer depende dramáticamente de la edad. No obstante, el intrincamiento del fenómeno de la transformación maligna con los procesos de envejecimiento, la influencia de los agentes externos así como también el rol de las eventuales vulnerabilidades genéticas, muestra la notoria complejidad del problema <sup>4</sup>.

La incidencia registrada por el Registro Nacional de Cáncer en el período 2006-2010 fue de 74.277 casos incidentes de tumores malignos, esto representa un promedio de unos 14.855 casos nuevos cada año. En el contexto internacional, Uruguay ocupa el quintil de mayor incidencia, confirmando la importancia del problema en el perfil sanitario del país (estimaciones realizadas por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) de la OMS denominado GLOBOCAN – 2012, difundido en diciembre de 2013) <sup>2</sup>.

En mujeres, el cáncer de mama es el tipo de cáncer que posee tanto la mayor tasa de incidencia como de mortalidad. En el quinquenio 2006-2010 se diagnosticaron en promedio cada año 1840 casos nuevos y se registraron más de 660 muertes anuales por esta causa <sup>4</sup>.

Las tendencias en la mortalidad por cáncer de mama a largo plazo en Uruguay, indican que luego de un aumento en la última mitad del siglo pasado, a partir de mediados de los 90' comienza un descenso sostenido de la tasa estandarizada de la mortalidad por cáncer de mama (**Figura 1**)<sup>4</sup>.



**Figura 1. Tendencias en la mortalidad por cáncer en mujeres uruguayas a largo plazo, 1953-2010.** Tasas ajustadas por edad a la población mundial por 100.000 habitantes. Fuente: Registro Nacional de Cáncer<sup>4</sup>.

### 1.1.2. Factores de riesgo.

**Edad.** El riesgo de desarrollar cáncer de mama aumenta con la edad. Existe una relación entre la edad y el estado del receptor de estrógeno (ER). La incidencia de cáncer de mama ER-positivo incrementa con la edad. Este patrón contrasta con la incidencia de cáncer de mama ER-negativo, el cual incrementa hasta la edad de 50, pero luego permanece constante<sup>2</sup>. La incidencia de cáncer de mama es del doble cada 10 años antes de la menopausia, cuando la tasa de incremento disminuye dramáticamente. En comparación con el cáncer de pulmón, la incidencia de cáncer de mama es mayor a edades más jóvenes<sup>3</sup>.

**Edad de la primera menstruación.** Las mujeres que tuvieron su primera menstruación antes de los 12 años de edad, tienen un riesgo mayor de desarrollar cáncer de mama que las mujeres cuya primera menstruación ocurrió después de los 13 años. Esto se debe a que las primeras tienen una mayor exposición a los estrógenos durante su vida. Después de la primera menstruación, los niveles de estrógeno totales en el cuerpo son más altos y permanecen así durante los años reproductivos de la mujer<sup>2</sup>.

**Edad del primer embarazo (a término).** Las mujeres que no se han embarazado y las que tuvieron su primer embarazo después de los 35 años de edad, tienen un mayor

riesgo de desarrollar cáncer de mama en comparación con las mujeres cuyo primer embarazo lo tuvieron antes o durante la década de los 20<sup>2,3</sup>.

**Edad de la menopausia.** Las mujeres cuya menopausia se manifiesta luego de los 55 años de edad, tienen un riesgo de desarrollar cáncer de mama mayor que las mujeres cuya menopausia se manifiesta a los 45 años<sup>3</sup>. Cada año de retraso en la menopausia corresponde a un incremento del 3% en el riesgo de adquirir cáncer de mama<sup>2</sup>.

**Amamantamiento.** El amamantamiento parece tener un efecto protector respecto al desarrollo de cáncer de mama. El efecto protector del amamantamiento parece aplicarse primariamente a mujeres pre-menopáusicas. El efecto protector es también mayor para las mujeres portadoras de la mutación BRCA1 (gen de predisposición al cáncer de mama), las cuales disminuyen el riesgo en un 32% al cabo de un año de amamantamiento. El amamantamiento suprime la ovulación y puede reducir el riesgo de contraer cáncer de mama debido a la disminución en el tiempo de exposición a los estrógenos.

A nivel celular, el amamantamiento puede causar la diferenciación terminal de las células epiteliales mamarias. Esta diferenciación hace que las células sean menos susceptibles a los efectos de los carcinógenos o mutaciones durante el ciclo celular<sup>2</sup>.

**Terapia de reemplazamiento hormonal.** El uso actual de la terapia hormonal post-menopáusica está asociada con un incremento del riesgo de cáncer de mama en una relación dosis-respuesta relacionada con la duración de su uso<sup>2</sup>. Este riesgo es mayor para la terapia hormonal combinada (estrógeno/progesterona) que para la terapia sólo con estrógenos<sup>2,3</sup>. A través de un meta-análisis se calculó una probabilidad de incremento del riesgo del 7,6 % por año de terapia de reemplazamiento hormonal<sup>2</sup>.

La terapia de reemplazamiento hormonal incrementa la densidad mamaria y reduce la sensibilidad y especificidad del “screening” mamario. Los tumores diagnosticados en mujeres que siguen una terapia de reemplazamiento hormonal tienden a ser menos avanzados clínicamente que aquellos diagnosticados en mujeres que nunca han seguido esta terapia. Si bien esta terapia está asociada a un incremento del riesgo de cáncer de mama, los datos actuales sugieren que la misma no incrementa la mortalidad por cáncer de mama<sup>3</sup>.

**Factores genéticos.** La historia familiar o predisposición genética al cáncer, es la responsable de hasta un 10% de los casos de cáncer de mama en los países occidentales. El factor de riesgo de cáncer de mama originado por la historia familiar está bien documentado. La mayoría de los tumores de mama de origen genético, se desarrollan antes de los 65 años<sup>3</sup>. Por ejemplo, mujeres cuya madre o hermana estuvieron afectadas, tienen un riesgo de desarrollar cáncer de mama del doble respecto al de la población general<sup>2,3</sup>. El riesgo incrementa entre cuatro y cinco veces si dos parientes de primer grado desarrollan la enfermedad. Muchas familias afectadas por cáncer de mama muestran haber desarrollado múltiples tumores atribuibles a la misma mutación heredada, como: tumores de ovario, colon, próstata y otros<sup>3</sup>. Las pacientes que tienen una mayor probabilidad de portar una mutación genética que las predispone al cáncer de mama, son aquellas que manifiestan cáncer de mama

bilateral, que desarrollan una combinación de cáncer de mama y otros cánceres epiteliales, y mujeres que adquieren la enfermedad a una edad temprana <sup>2,3</sup>.

La herencia de ciertos genes explica, en parte, este riesgo. Las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 se heredan con un patrón autosómico dominante. Esta herencia se ve evidenciada aproximadamente en un 5 a 10% de los diagnósticos <sup>2</sup>. Estos genes son los responsables de una proporción sustancial de familias de muy alto riesgo, como por ejemplo, aquellas que presentaron cuatro o más cánceres de mama entre parientes cercanos <sup>3</sup>.

Una mutación por delección en cualquiera de los dos genes aumenta el riesgo relativo de desarrollar cáncer de mama en unas 10 veces. Un estudio prospectivo de mujeres con mutaciones en los genes BRCA, mostró un riesgo acumulativo de desarrollar cáncer de mama a la edad de 70 años del 60% y 55% para las portadoras del gen BRCA1 y BRCA2, respectivamente. La prevalencia de ambos genes en la población general varía entre regiones geográficas y etnias, pero en general es baja (0.4% a 0.7% para BRCA1, 1% a 3% para BRCA2). Si bien la prevalencia de estos genes es baja, la penetrancia es alta. Tanto BRCA1 como BRCA2, son genes que están involucrados en la reparación por recombinación homóloga de las roturas de doble hebra del ADN. Las deficiencias en esta función contribuyen a la tumorigénesis <sup>2</sup>.

P53 es otro gen con alta penetrancia que tiene conexión con el cáncer de mama. Las mutaciones en p53 están asociadas con el síndrome de Li-Fraumeni <sup>5</sup>, el cual incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de mama, leucemia, cáncer de pulmón y cerebro. Mujeres con este síndrome presentan un 50 % de riesgo de adquirir cáncer de mama a los 60 años de edad. El síndrome de Li-Fraumeni y las malignidades asociadas a p53, pueden explicar hasta un 7% de todos los cánceres de mama diagnosticados en la mujer que se manifiestan antes de los 40 años de edad. Los tumores de mama con síndrome de Li-Fraumeni son predominantemente ER/PR/HER2-positivos <sup>2</sup>.

Otros genes se han asociado a un mayor riesgo de adquirir cáncer de mama. A diferencia de los anteriormente mencionados, estos genes tienden a ser de baja penetrancia y contribuyen menos al cáncer de mama. Muchos de estos genes están involucrados en las vías de reparación del ADN, mantenimiento de la integridad del genoma y los “checkpoints” del ciclo celular. Mutaciones en ATM, BRIP1, CHEK2, NBS1, PALB2 y RAD50 están asociadas con un incremento del riesgo de cáncer de mama de 2 a 4 veces mayor. La incidencia de mutaciones en estos genes es baja (de alrededor de 1% o menos). Si bien los estudios para elucidar los genes responsables de la tumorigénesis en cáncer de mama continúan, se conoce que existe una gran heterogeneidad de las mutaciones entre los tumores individuales <sup>2</sup>.

**Factores epigenéticos.** El silenciamiento de los genes supresores de tumores inducido por metilación, es el principal mecanismo epigenético que conduce a la inactivación de estos genes. La metilación de regiones ricas en el dinucleótido CpG en promotores de genes es especialmente relevante para el silenciamiento de genes importantes en el control del crecimiento. Algunos de los genes reportados en cáncer de mama que se someten a hipermetilación, están involucrados en la regulación del ciclo celular (p16, CCND2), adhesión celular (CDH1), reparación del ADN (BRCA1) y señalización celular

(ER and RARb2). La identificación de estos genes ha ayudado a elucidar la patogénesis molecular del cáncer de mama por medio de la indicación de cuales vías de control de crecimiento están afectadas. Estudios específicos de la hipermetilación del ADN en tumores, puede tener valor en la detección temprana del cáncer de mama empleando muestras de lavado ductal<sup>6</sup>.

**Enfermedades de mama benignas.** Mujeres que hayan tenido hiperplasia epitelial atípica presentan un riesgo de 4 a 5 veces mayor que el de aquellas que nunca han presentado cambios proliferativos en las mamas. Aquellas mujeres que hayan manifestado estos cambios y una historia de cáncer de mama familiar (pariente de primer grado) presentan un incremento de nueve veces en el riesgo. Mujeres con quistes palpables, fibroadenomas complejos, papilomas ductales, adenosis esclerótica, e hiperplasia epitelial moderada o florida tienen un riesgo apenas mayor de desarrollar cáncer de mama. Este aumento, sin embargo, no es significativo clínicamente<sup>3</sup>.

**Exposición a las radiaciones.** En mujeres adolescentes expuestas a la radiación durante la segunda guerra mundial, se observó un riesgo de cáncer de mama del doble respecto al de la población general. La radiación ionizante también aumenta el riesgo, especialmente cuando la exposición a esta radiación ocurre durante la formación rápida de la mama. El empleo de la mamografía de “screening” ha disminuido la mortalidad por cáncer de mama en mujeres mayores de 50 años<sup>3</sup>.

## 1.2. Quimioterapia. Limitaciones de la quimioterapia.

La resistencia celular a la quimioterapia constituye el principal factor que explica la baja respuesta a este tratamiento por parte del paciente con cáncer de mama metastásico<sup>11,12</sup>.

Los fármacos empleados para el tratamiento del cáncer, frecuentemente implican el uso de moléculas pequeñas tales como agentes alquilantes (busulfán), anti-metabolitos (gemcitabina), anti-microtúbulos (paclitaxel, docetaxel, vincristina), inhibidores de topoisomerasas (etopotecan), e inhibidores citotóxicos (doxorubicina). Estas moléculas citotóxicas además de matar células cancerígenas altamente proliferativas, también matan otras células proliferativas de la médula ósea, el tracto gastrointestinal, y células de los folículos pilosos, conduciendo respectivamente a la aparición de efectos adversos comunes tales como la disfunción del sistema inmune, inflamación y ulceración del tracto gastrointestinal, y la pérdida del cabello<sup>13</sup>. La eficacia de la quimioterapia está limitada a una inadecuada concentración de la droga en el tejido tumoral y/o a los efectos tóxicos en tejidos normales<sup>14,15</sup>. La baja solubilidad en agua es también una limitante que tienen muchos fármacos anticancerígenos para una óptima aplicación clínica<sup>16</sup>.

### 1.2.1. Fármacos estabilizadores de Microtúbulos. Taxanos: Paclitaxel y Docetaxel.

Una clase de fármacos comúnmente usados en el tratamiento del cáncer de mama son los agentes estabilizadores de microtúbulos, también conocidos como inhibidores de microtúbulos<sup>11</sup>. Estos agentes, inducen la apoptosis celular, y son los quimioterapéuticos más ampliamente usados para el tratamiento de varios tipos de cáncer<sup>17</sup>.

Los microtúbulos cumplen un rol central en la división celular y en otras funciones celulares relevantes, y por lo tanto constituyen un importante blanco en el desarrollo de fármacos anticancerígenos. El mecanismo de acción primario de los taxanos es el de promover el ensamblaje de la tubulina en microtúbulos estables, inhibiendo su despolimerización. Este mecanismo de acción empleado por los taxanos, es distinto al empleado por otros agentes antimicrotúbulos, los cuales previenen el ensamblaje de los mismos<sup>18</sup>.

El Paclitaxel (PTX) y el Docetaxel (DTX) son fármacos antimitóticos que pertenecen a la familia de los taxanos. Tanto el PTX como el DTX son efectivos contra un amplio rango de malignidades como: cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de próstata, cáncer gástrico y cáncer de cabeza y cuello<sup>11,17,19,20</sup>. Las tasas de respuesta observadas en tratamientos de cáncer de mama de primera línea con estas fármacos, están entre un 25 y 69 %<sup>11</sup>.

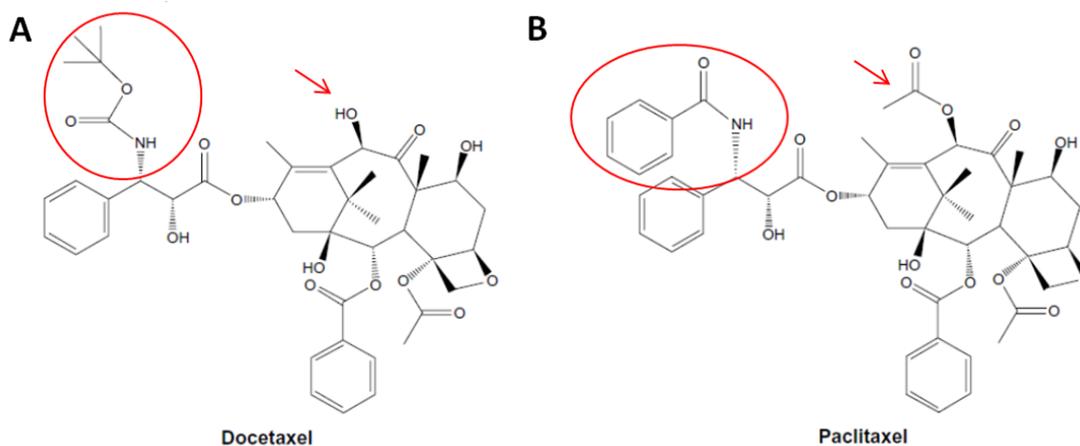
Pese a lo anterior, los taxanos son altamente hidrofóbicos. Esta propiedad fisicoquímica influye negativamente en sus aplicaciones clínicas. La toxicidad inespecífica de los taxanos sobre órganos normales, conduce a la aparición de efectos adversos en pacientes (depresión de la médula ósea, reacciones de hipersensibilidad, neutropenia febril, enfermedad gastrointestinal y toxicidad a la piel)<sup>16</sup>.

El DTX fue descubierto en la década del 80' por Pierre Potier, en el marco de una investigación destinada a mejorar la producción de taxol. El DTX fue preparado por semisíntesis a partir de un compuesto precursor inactivo aislado de las agujas del árbol de tejo europeo, *Taxus Baccata*<sup>21,22</sup>.

El DTX posee un amplio espectro de actividad antitumoral y características preclínicas únicas comparadas con otros agentes quimioterapéuticos, incluyendo el PTX. Aunque el DTX tiene un mecanismo de acción antitumoral similar al del PTX, el DTX posee una afinidad por el sitio de unión a los microtúbulos considerablemente mayor<sup>21,23</sup>. En varias líneas celulares (murinas y humanas), se ha encontrado que el DTX exhibe una citotoxicidad de 1.3 a 12 veces mayor en comparación con la del PTX. Estudios *in vivo* con modelos tumorales murinos y xenógrafos mostraron un patrón similar. Además, a diferencia del PTX, el DTX exhibe una farmacocinética lineal, y debido a las diferencias en el eflujo de fármacos, el DTX permanece retenido intracelularmente por un período de tiempo mayor<sup>18</sup>.

El DTX es estructuralmente similar al PTX excepto por el éster de *tert*-butilo carbamato de la cadena lateral del propionato de fenilo y del grupo funcional hidroxilo en el

carbono 10 (**Figura 1A**). Debido a su estructura química, el DTX es más soluble en agua que el paclitaxel <sup>21</sup>.



**Figura 2. Estructuras químicas de las moléculas de DTX y PTX.** Los grupos químicos presentes en las moléculas de DTX y PTX que son distintos entre sí, están marcados con círculos y flechas. Imagen adaptada de Zhang y colaboradores <sup>21</sup>.

La acción antitumoral del DTX radica en la hiperestabilización de los microtúbulos, donde el DTX se une preferencialmente a la subunidad beta de la tubulina en los microtúbulos y promueve el ensamblaje de la tubulina en microtúbulos estables, mientras que simultáneamente impide su despolimerización <sup>19,21,22</sup>.

La formación de microtúbulos estables corrompe el equilibrio dinámico normal entre polimerización y despolimerización dentro del sistema de microtúbulos, que conduce al bloqueo del ciclo celular en la fase G2/M y posteriormente a la muerte celular <sup>20,21</sup>. Además de inhibir la despolimerización de los microtúbulos, el DTX induce la expresión de numerosos genes involucrados en procesos celulares. Por lo tanto el docetaxel muestra una actividad antitumoral significativa contra un amplio espectro de tumores <sup>18,21</sup>.

Si bien el DTX es más soluble que el PTX, ambos taxanos presentan una solubilidad en agua extremadamente baja, de 7  $\mu\text{g/mL}$  y de 1  $\mu\text{g/mL}$  para el DTX y el PTX, respectivamente. La formulación de estos agentes, está basada en mezclas de surfactantes y co-solventes <sup>20</sup>. Actualmente, la única formulación comercial disponible de DTX es el Taxotere<sup>®</sup> (Sanofi-Aventis, Bridgewater, NJ, USA), la cual está compuesta por 40 mg/mL de DTX y 1040 mg/mL de Tween 80 (polisorbato 80). Previo a su administración se requiere de una dilución adicional con 13% de etanol <sup>21</sup>.

Las soluciones pre-mezcladas son estables por 8 horas a temperatura ambiente o bajo refrigeración, en tanto que la solución de administración es estable por 4 horas a temperatura ambiente. Estas soluciones se almacenan durante un corto tiempo debido al riesgo potencial de que se precipite la solución de administración. La

precipitación de la solución de administración puede darse debido a factores tales como la insuficiente mezcla de las soluciones, temperatura, y excesiva agitación <sup>21</sup>.

Los efectos adversos causados por el DTX han opacado su uso clínico. En primer lugar, el DTX al igual que la mayoría de los agentes quimioterapéuticos, se distribuye por el cuerpo de manera inespecífica. En segundo lugar, como se mencionó anteriormente, el DTX a ser administrado se solubiliza por medio del empleo de sustancias nocivas para el organismo (Tween 80 y etanol) <sup>17,24</sup>.

Así, a pesar de su amplio uso en el tratamiento de varios tipos de cáncer, el Taxotere está asociado con serios efectos adversos, incluyendo reacciones de hipersensibilidad aguda, retención de fluidos acumulativa, neurotoxicidad, toxicidad musculoesquelética, neutropenia febril, toxicidad en las uñas, mialgia, estenosis del ducto nasolacrimal y astenia <sup>17,20,21</sup>. Estudios de fase II del Taxotere en el tratamiento de varios tumores sólidos mostraron que los efectos adversos más frecuentes fueron: alopecia (81%), leucocitopenia grado III-IV, leucocitopenia de corta duración (66%), reacciones en la piel (52%), y reacciones de hipersensibilidad (26%) <sup>21</sup>.

### 1.3. Sistemas de entrega de fármacos. Nanotecnología y Nanomedicina.

Lograr que los agentes quimioterapéuticos alcancen una concentración local adecuada en el sitio del tumor, y que al mismo tiempo minimicen los efectos adversos causados por su inespecificidad, constituyen la principal restricción de la medicina contemporánea. Para ello, se requiere del desarrollo de nuevas formulaciones denominadas sistemas de liberación de fármacos (“drug delivery systems”) <sup>17,25</sup>.

Las propiedades clave que deben de tener los sistemas de entrega de droga son: biocompatibilidad, estabilidad en el torrente sanguíneo y posibilidad de incrementar la dosis acumulada en el tumor. La estabilidad de estos sistemas en la circulación puede mejorarse por medio de estrategias que minimicen la unión de proteínas, y de esta forma evadir el sistema inmune. Una estrategia común empleada con la finalidad de incrementar el tiempo de circulación de los sistemas de entrega de droga, es el recubrimiento con polietilenglicol (PEG). El incremento del tiempo de circulación puede conducir a un incremento de la acumulación tumoral por el efecto “EPR”, del cual se hablará en la sección 1.3.2. <sup>13</sup>.

La nanotecnología ofrece la posibilidad de crear sistemas de entrega de fármacos, con el fin de reducir los efectos adversos no deseados (de la administración sistémica de fármacos), incrementar la acumulación tumoral y mejorar la eficacia de los tratamientos <sup>13</sup>.

A través del desarrollo de la nanotecnología, los nanomateriales diseñados para trabajar como sistemas de entrega de fármacos, están siendo cada vez más usados en el campo de la nanomedicina (término que resulta de la conjunción de la nanotecnología y la medicina) <sup>26</sup>.

Las nanopartículas son materiales con tamaños que van entre 10 y 1000 nm, cuyas propiedades fisicoquímicas cambian respecto a los materiales de tamaño macro de la misma composición. Tales propiedades hacen que las nanopartículas sean de gran atractivo para desarrollos comerciales y médicos<sup>27</sup>.

Se han desarrollado nanopartículas con la finalidad de ser empleadas para la entrega de fármacos convencionales, proteínas recombinantes, vacunas y ácidos nucleicos. Las nanopartículas presentan un tamaño similar al de muchas moléculas biológicamente relevantes<sup>25</sup>. Las nanopartículas están compuestas, por lo general, por componentes no tóxicos, biodegradables y con capacidades de carga variables que dependen del tipo de nanosistema. Tienen un pequeño tamaño de partícula, exhiben una circulación prolongada, y pueden ser dirigidos a los sitios de acción requeridos en el cuerpo. Las principales ventajas de las nanopreparaciones es que pueden mejorar la entrega de fármacos con características de solubilidad y estabilidad adversas, reducir la acumulación no específica y toxicidad de los fármacos, mejorar la farmacocinética y la biodisponibilidad, e incrementar las concentraciones locales de fármaco en los tejidos blanco<sup>28</sup>.

Los nanosistemas son capaces de modificar las propiedades fisicoquímicas de los compuestos asociados (como por ejemplo: potenciar la solubilidad acuosa y mejorar el índice terapéutico)<sup>25</sup>. La toxicidad de una droga puede reducirse a través de la conjugación de una pro-droga de activación local a la superficie de nanopartículas, o por su encapsulación también en nanopartículas<sup>13</sup>. Para la entrega de agentes terapéuticos dirigidos a tumores, varios tipos de nanosistemas pueden ser empleados: micelas, liposomas, dendrímeros, nanotubos de carbono, nanocristales, nanopartículas poliméricas y otros<sup>28</sup>.

### 1.3.1. Patofisiología de la vasculatura tumoral.

Un rasgo característico de la patofisiología tumoral está constituido por el endotelio de los vasos sanguíneos tumorales, el cual es defectuoso, existiendo espacios entre las células endoteliales<sup>19,29</sup>. Los vasos sanguíneos tumorales están caóticamente ramificados, están presentes en altas densidades, tienen la característica de ser inmaduros y se encuentran dilatados<sup>19</sup>.

Los espacios intercelulares presentes en el endotelio de los vasos sanguíneos no solo influyen en el ambiente interno de los tumores (y tal vez en la tasa de angiogénesis), sino que también gobiernan el acceso de las terapias con anticuerpos, vectores de terapia génica y sistemas de liberación de fármacos, a las células tumorales<sup>29</sup>.

La mayoría de los vasos tumorales tienen diámetros irregulares y un patrón de ramificación anormal, que no entra en la clasificación habitual de arteriolas, capilares, y vénulas. Los vasos tumorales, al igual que los vasos normales, presentan células endoteliales, pericitos y membrana basal. Sin embargo, estos componentes presentan

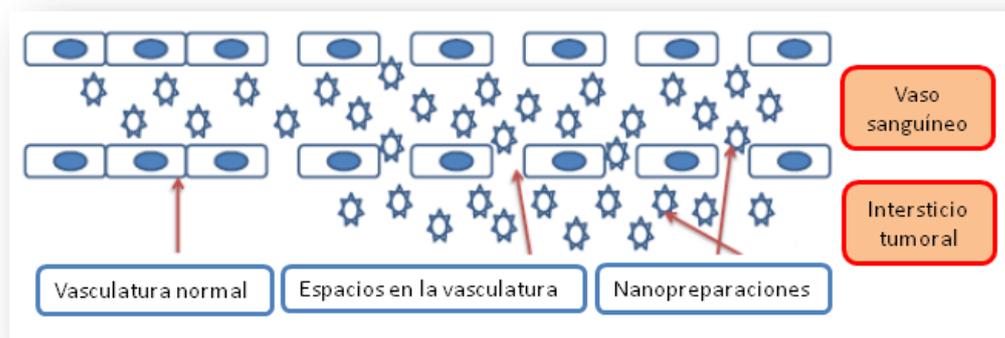
anormalidades. Las células endoteliales no forman una monocapa normal, y por lo tanto, no cumplen adecuadamente con su función de barrera, están desorganizadas y presentan formas irregulares. Las células endoteliales de algunos vasos tumorales se solapan unas con las otras, proyectándose hacia el lumen. Las células también tienen interconexiones flojas y aperturas intercelulares puntuales. Dichas aperturas son probablemente las responsables de la mayor parte de los agujeros de la vasculatura tumoral. La membrana basal, si bien está presente en la vasculatura tumoral, su asociación con células endoteliales y pericitos es frágil, y consiste de múltiples capas que son redundantes<sup>29</sup>.

### 1.3.2. Efecto “EPR” y Nanomedicina.

El propósito de un vehículo es aumentar la especificidad de la droga a los tumores. En tumores sólidos, los vehículos de tamaño nanométrico pueden ingresar a los tumores pasivamente por medio del efecto “EPR” (del inglés “enhanced permeability and retention effect” que significa efecto de la permeabilidad y retención)<sup>28</sup>. Este efecto es resultado de la patofisiología de la vasculatura tumoral, explicada en la sección anterior.

Las nanopartículas que circulan en el torrente sanguíneo no podrán extravasar a la mayor parte de los tejidos (a excepción del sistema reticuloendotelial (RES) del hígado), pero si podrán extravasar a los tejidos tumorales (**Figura 2**). Como el drenaje linfático en el tejido tumoral es poco eficiente, lo que representa un “callejón sin salida” biológico para las nanopartículas, las nanopartículas se acumulan de forma pasiva<sup>19,28</sup>. Uno de los resultados más importantes que surgen del empleo de los sistemas de entrega de droga basados en nanopartículas, es el de disminuir los efectos no deseados de los quimioterapéuticos inespecíficos (moléculas terapéuticas pequeñas estándar), debido a una mejora en la especificidad y la eficacia antitumoral. Estos sistemas de entrega de droga o nanosistemas para el tratamiento de tumores sólidos, están alcanzando su aplicación clínica<sup>19,30</sup>.

Dos ejemplos de nanosistemas aprobados clínicamente para el tratamiento de tumores sólidos son Doxil® y Abraxane®. El Doxil, es una nanoformulación de Doxorubicina convencional, aprobada para el tratamiento del sarcoma de Kaposi. Abraxane® es una nanoformulación de Paclitaxel aprobada para el tratamiento del cáncer de mama metastásico. Ambos nanosistemas mejoran los perfiles de seguridad, debido a la eliminación de los excipientes irritantes tales como P80 (Polisorbato 80) o Cremophor (Taxotere y Taxol, respectivamente) y a la reducción de la biodistribución no específica en tejidos sensibles (ejemplo: reducción de la cardiotoxicidad con Doxil®)<sup>19</sup>.



**Figura 2. Efecto de permeabilidad y retención (“EPR”).** Debido a la presencia de espacios en la vasculatura en el microambiente tumoral y a un drenaje linfático ineficiente, el efecto “EPR” se observa para nanopreparaciones con distribuciones de tamaño de hasta 400 nm. Imagen adaptada de Patel y colaboradores<sup>31</sup>.

### 1.3.3. “Drug Delivery” o entrega dirigida de Docetaxel (DTX).

Con el fin de incrementar la captación de docetaxel por los tejidos tumorales, mejorar el índice terapéutico y reducir la aparición de efectos adversos en los tejidos normales, se están empleando estrategias para la entrega dirigida de Docetaxel<sup>21</sup>. Estas estrategias incluyen el uso de liposomas, ciclodextrinas, NPs poliméricas, conjugados polímero-droga, micelas, dendrímeros, y NPs inorgánicas<sup>20,21</sup>.

El “targeting” o direccionamiento de una droga puede clasificarse dentro de dos categorías: “targeting” pasivo y “targeting” activo. El “targeting” pasivo depende del efecto “EPR”, que se refiere a la acumulación de agentes macromoleculares y nanovehículos en tejidos tumorales sólidos, los cuales tienen características patofisiológicas únicas, como fue descrito en las secciones anteriores, incluyendo una amplia angiogénesis, hipervasculatura, arquitectura vascular defectiva, y drenaje linfático defectuoso<sup>21</sup>.

El “targeting” activo depende primero del efecto “EPR”, a través del cual el nanosistema se acumula en los tumores, y segundo, de la interacción específica del nanosistema con las células tumorales a través de uniones antígeno-anticuerpo o ligando-receptor<sup>21</sup>.

Debido a las propiedades de las nanoformulaciones desarrolladas, como tamaño nanométrico único y alta relación superficie-volumen, la nanotecnología juega un rol importante en la entrega de DTX. En primer lugar, la solubilidad en agua del DTX puede mejorarse significativamente por medio de su conjugación a nanomateriales o encapsulación en nanovehículos. Además, los nanovehículos pueden proteger al DTX del medio que los rodea, modificando sus propiedades farmacocinéticas y conduciendo a una mejor eficacia terapéutica. Las nanoformulaciones administradas por vía intravenosa, protegen al DTX de la acción enzimática y evitan su rápida

eliminación por el sistema renal. De este modo, el tiempo del nanosistema en circulación se prolonga, y la oportunidad de que se acumule en el tumor aumenta. Además, los nanovehículos pueden escapar de las paredes agujereadas de la vasculatura tumoral y acumularse en los tejidos tumorales, que frecuentemente carecen de un drenaje linfático efectivo, a través del efecto “EPR”. Otros tejidos con paredes endoteliales agujereadas, hígado y bazo, comúnmente contribuyen a la captación de los nanosistemas. La residencia de los macrófagos en estos tejidos es la responsable de la pérdida de la mayoría de los nanosistemas inyectados<sup>21</sup>.

La modificación de la superficie de los nanovehículos con PEG (polietilenglicol), reduce su captación por el sistema retículo endotelial, y por lo tanto prolonga el tiempo de circulación. El direccionamiento activo, a través de la modificación superficial de los nanovehículos con ligandos específicos, puede incrementar la acumulación selectiva del DTX en los tumores.

De esta forma, por medio de la aplicación de los sistemas de entrega de fármacos nanotecnológicos, los efectos adversos y la toxicidad sistémica del DTX pueden reducirse, al mismo tiempo que ocurre una mejora significativa de la eficacia terapéutica.<sup>21</sup>

#### 1.3.4. Nanoformulaciones basadas en PTX y DTX.

A pesar de los progresos que se han hecho en cuanto al desarrollo de nanosistemas de entrega de DTX, el Taxotere sigue siendo la única formulación comercial disponible para su uso clínico. Las nanomedicinas aprobadas por la FDA (“Food and Drug Administration”) están resumidas en la **Tabla 1**. La mayoría de las investigaciones actuales siguen estando en fase de laboratorio. No obstante, varias nanomedicinas con DTX están en ensayos clínicos y se espera que lleguen al mercado<sup>13,21</sup>.

Si bien los nanosistemas aprobados por la FDA para su uso clínico poseen un alto potencial de incrementar la biodisponibilidad, la solubilidad de la droga, el direccionamiento activo, entre otros, aún existen barreras y desafíos por resolver. Algunos de estos desafíos son el de la seguridad, problemas en la manufactura y control de calidad de las nanoformulaciones. Se requiere, por lo tanto, de mayores investigaciones para que las nanoformulaciones de DTX lleguen a la clínica y se apliquen comercialmente<sup>13,21</sup>.

Aunque hasta el momento no se dispone de ninguna nanoformulación para la entrega de DTX (aprobada por la FDA), se dispone de una nanoformulación para la entrega de PTX, Abraxane® (American BioScience, Inc., Santa Monica, CA). Abraxane® es un nanosistema formado por PTX asociado a albúmina ( $\approx 130$  nm), que fue aprobado para el tratamiento del cáncer de mama metastásico.

Plataforma	Clase	droga	d (nm)	razón droga/vehículo	Problema asociado
Brentuximab vedotin	ADC	Monometil auristatina E	≈ 10	≤ 8	La Monometil auristatina es muy tóxica para emplearla en su forma libre
Trastuzumab emtansine	ADC	Mertansina	≈ 10	≤ 8	La Metarsina es muy tóxica para ser empleada en su forma libre
Doxil	Liposoma	Doxorubicina	100	10.000-15.000	Toxicidad de la droga y efectos adversos cardíacos
DaunoXome	Liposoma	Daunorubicina	50	≈10.000	Toxicidad de la droga y efectos adversos cardíacos
Marqibo	Liposoma	Vincristina	100	≈10.000	Toxicidad de la droga y efectos adversos cardíacos
Abraxane	Carrier proteico	Paclitaxel	130	>10.000	Supera la muy baja solubilidad del paclitaxel

**Tabla 1: Lista de nanomedicinas aprobadas por la FDA (“Food and Drug administration”).** ADC es la clase de anticuerpos conjugados a drogas. Imagen adaptada de Dawidczyk et al <sup>13</sup>.

Una nanoformulación que actualmente está en ensayos clínicos para su aplicación en cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario recurrente y cáncer colorectal, es Opaxio™ (CT-2103, Cell Therapeutics, Inc., Seattle, WA). Opaxio™ es un conjugado de PTX y poli- ácido glutámico <sup>20</sup>.

#### 1.4. Dendrímeros.

Los polímeros sintéticos pueden dividirse en cuatro clases de estructuras: lineales, reticuladas, ramificadas, y dendríticas. Las primeras tres estructuras poliméricas se han estudiado ampliamente. La cuarta clase comprende los dendrímeros y sus derivados. Estas estructuras difieren de los polímeros lineales típicos ya que su arquitectura es extremadamente precisa y controlada <sup>32</sup>.

Los dendrímeros son una clase única de polímeros sintéticos que fueron reportados por primera vez por Vögtle y colaboradores en 1978 <sup>21,25,32</sup>. El término “dendrímero” que deriva de “dendron”, que en griego significa “árbol” y de “meros” que significa “parte” <sup>32</sup>, describe la arquitectura de esta clase emergente de polímeros macromoleculares caracterizados por sus estructuras tridimensionales regulares y ramificadas <sup>21,32</sup>.

Los dendrímeros han sido ampliamente estudiados como agentes de entrega de fármacos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos, ácidos nucleicos y como agentes de imagenología. Los dendrímeros poseen propiedades que los hacen atractivos para estas aplicaciones. Estas propiedades son: tamaño y peso molecular bien definido,

monodispersión, multivalencia, número de cavidades internas disponibles, alto grado de ramificación, y alto número de grupos funcionales de superficie<sup>21,25,32</sup>.

Las fármacos pueden encapsularse en los espacios vacíos entre las ramificaciones, o bien conjugarse a los grupos funcionales de superficie de los dendrímeros de manera covalente o no covalente<sup>21</sup>.

Un dendrímero típico consiste de tres componentes: un “core” iniciador (también llamado “core” focal), una capa interior (generaciones) compuesta de unidades repetidas radialmente enlazadas al “core” iniciador, y múltiples grupos funcionales de superficie<sup>21,25,30,32</sup>.

La síntesis de los dendrímeros puede llevarse a cabo por métodos divergentes o convergentes, dependiendo de la dirección de la síntesis<sup>21,30</sup>.

El método divergente de síntesis de dendrímeros, introducido por Tomalia, procede a partir del “core” central y continúa hacia la periferia, mientras que el método convergente, desarrollado por Hawker and Fréchet, procede a partir de la superficie en dirección al “core” interior<sup>21</sup>.

El número de grupos de superficie de un dendrímero depende del número de ciclos de ramificación, los tamaños de los dendrímeros se expresan en número de ramificaciones o generaciones. Por lo tanto un dendrímero con dos ciclos de ramificación, es un dendrímero de generación 2 (G2). Un dendrímero con dos ciclos y medio de ramificación (terminal), se conoce como dendrímero de media generación (G2.5)<sup>28</sup>.

Los dendrímeros pueden diseñarse de forma versátil, mediante la elección de grupos de superficie que reduzcan su citotoxicidad, potencien el transporte transepitelial y promuevan su interacción con moléculas acopladas tales como sondas fluorescentes. Los grupos químicos en la superficie de los dendrímeros, pueden funcionalizarse fácilmente con un amplio rango de grupos químicos biológicamente relevantes, que los hace ideales en aplicaciones de entrega de fármacos<sup>28,32,33</sup>. Las propiedades de superficie pueden controlar también el “clearance” y la biodistribución de los dendrímeros en el cuerpo<sup>32</sup>.

Los dendrímeros poseen rasgos únicos comparados con los polímeros lineales, ramificados y entrelazados, que son las siguientes:

- a) peso molecular uniforme<sup>25,34,35</sup>,
- b) arquitectura tridimensional<sup>25</sup>,
- c) con el incremento del número de generación, el tamaño y el diámetro incrementan sistemáticamente también<sup>25</sup>,

d) un volumen hidrodinámico más pequeño y volumen molecular más bajo en comparación con polímeros lineales de pesos moleculares similares. Los dendrímeros se caracterizan por tener relaciones superficie/volumen enormes que pueden alcanzar hasta  $1000 \text{ m}^2/\text{g}$ <sup>25,34,35</sup>.

e) los grupos periféricos determinan la solubilidad de los dendrímeros<sup>25,34,35</sup>,

f) la estructura de los dendrímeros de generaciones más altas (con superficies densamente empaquetadas y cavidades internas) confiere la posibilidad de encapsular varias moléculas huésped pequeñas debido al espacio flexible que se crea dentro de las cavidades de los bloques de construcción dendrítica<sup>25</sup>

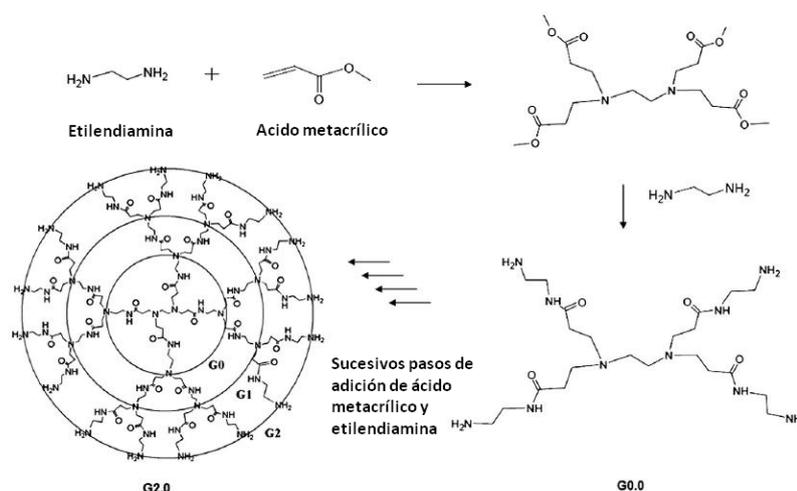
g) los dendrímeros de generaciones más altas, a pesar de la gran cantidad de grupos periféricos, no presentan enredo de cadenas que es una característica clara de los polímeros lineales<sup>25</sup>.

El tipo de “core” iniciador determina la forma del dendrímero. Por ejemplo, los dendrímeros con “core” de amonio son esféricos, mientras que los dendrímeros de alquilenamina presentan forma elipsoidal. Las propiedades macroscópicas de los dendrímeros están definidas también por los grupos funcionales periféricos (los cuales pueden reaccionar con el medio externo a la molécula)<sup>25</sup>.

Una excelente uniformidad estructural, multivalencia, arquitectura molecular bien definida, solubilidad en agua, alto grado de ramificación y composición química variable, son propiedades que hacen que los dendrímeros posean rasgos únicos los cuales contribuyen a un interés intensificado en este campo<sup>25</sup>.

#### 1.4.1. Dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM).

Los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM), constituyen la primer familia de dendrímeros que fue sintetizada, caracterizada y comercializada<sup>25,36,37</sup>. La molécula que forma el “core” puede ser de amonio o de etilendiamina (EDA). La síntesis de los dendrímeros de poliamidoamina a partir de un “core” de EDA consiste en dos etapas: una primera etapa de adición de moléculas de acrilato a una molécula de EDA, seguida por una etapa de amidación con etilendiamina. Esta reacción resulta en la obtención de la generación cero (G0) de dendrímero (**Figura 3**). Esta generación posee cuatro grupos amino libres que pueden reaccionar con monómeros de acrilato y moléculas de etilendiamina para dar lugar a dendrímeros de generaciones G mayores (**Figura 3**)<sup>25</sup>.



**Figura 3.** Esquema de la síntesis de dendrímeros PAMAM a partir de una molécula de EDA. Imagen adaptada de Sadekar y colaboradores<sup>38</sup>.

Los dendrímeros PAMAM de generación completa tienen grupos amino terminales, mientras que los de media generación, tienen grupos carboxilo terminales. Los dendrímeros de generación completa tienen una alta densidad de grupos cargados positivamente, siendo ideales para la entrega de ácidos nucleicos (por ejemplo RNA de interferencia o DNA), mientras que los de media generación tienen múltiples cargas negativas<sup>28</sup>.

Las generaciones de dendrímeros PAMAM (G0 a G10), están disponibles comercialmente como una solución en metanol o agua. Las propiedades físicas de los dendrímeros cambian de acuerdo al número de generación. El diámetro de las moléculas dendríticas incrementa de forma lineal con el incremento de la generación de dendrímero. El número de grupos terminales se duplica con cada generación de dendrímero. Las relaciones entre número de generación y peso molecular, diámetro y número de grupos de superficie están representadas en la **Tabla 2**<sup>25</sup>.

Cuanto mayor y más ramificado es el dendrímero, su forma se asemeja más a una estructura globular. Cuando el número de generación de dendrímero se incrementa, el empaquetamiento de sus ramas también lo hace. En cierto punto, debido a la falta de espacio, los dendrímeros no pueden seguir creciendo. Este estado es conocido como “efecto starburst”. Este efecto se observa en dendrímeros PAMAM a partir de la generación 10<sup>25</sup>.

Los dendrímeros PAMAM se asemejan en tamaño y contorno a algunas proteínas globulares básicas. Por ejemplo, los dendrímeros de generaciones tres, cuatro y cinco, se asemejan en tamaño y forma a la insulina, citocromo C y hemoglobina,

respectivamente. Además, algunos grupos funcionales encontrados ampliamente en las proteínas, están también presentes en los dendrímeros PAMAM (amino, carboxilo, hidroxilo). De manera similar a las proteínas, los dendrímeros pueden adoptar conformaciones nativas (más apretadas) o desnaturalizadas (extendidas). Estas conformaciones dependen de la polaridad, fuerza iónica y pH del solvente. Los dendrímeros de G0 a G2, poseen una forma altamente asimétrica y tienen una estructura más abierta que los dendrímeros de generaciones más altas <sup>25</sup>.

Generación	Parámetros físicos y estructurales		
	Peso Molecular (Daltons)	Diámetro (Å)	Grupos Superficiales
G0	517	15	4
G1	1430	22	8
G2	3256	29	16
G3	6909	36	32
G4	14215	45	64
G5	28826	54	128
G6	58048	67	256
G7	116493	81	512
G8	233383	97	1024
G9	467162	114	2048
G10	934720	135	4096

**Tabla 2. Parámetros físicos y estructurales de los dendrímeros PAMAM.** El diámetro de las generaciones de dendrímeros PAMAM está expresado en Armstrong (Å). Imagen adaptada de Szymanski y colaboradores <sup>25</sup>.

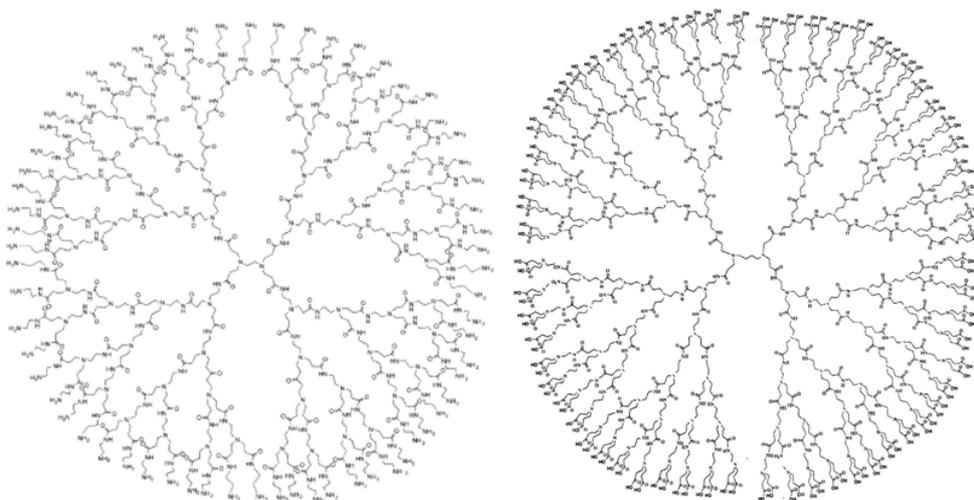
#### 1.4.2. Nanomedicinas basadas en dendrímeros

Actualmente no se cuenta con ninguna nanoformulación de aplicación clínica de DTX basada en dendrímeros. Un estudio preclínico llevado a cabo por Sylvania Platinum Ltd (Hamilton-Bermuda) de dendrímeros-DTX, mostró una mejora en la solubilidad en agua, el tiempo de circulación, y la eficacia en el tratamiento del cáncer de mama en comparación con el Taxotere. Esta nanoformulación fue aprobada para continuar con ensayos clínicos de fase I/II <sup>21</sup>.

Se ha desarrollado un nanoconjugado dendrítico con P80, anclado a dendrímeros de polipropilenimina (PPI) para la entrega de DTX a tumores cerebrales. Los dendrímeros DTX-P80-PPI, en comparación tanto con DTX y la nanoformulación DTX-PPI, mostraron una mejora de la eficacia antitumoral y de la penetración a estos tumores <sup>39</sup>.

En este trabajo nos proponemos estudiar dos tipos de dendrímeros PAMAM: dendrímeros PAMAM G4 y dendrímeros PAMAM G4.5, como potenciales agentes de entrega de DTX en cáncer de mama. Los primeros, poseen grupos amino de superficie,

mientras que los segundos poseen grupos carboxilo. En la **Figura 4** se muestra una representación esquemática de ambos tipos de dendrímeros, tamaño, peso molecular y número de grupos de superficie.



	Dendrímeros PAMAM G4	Dendrímeros PAMAM G4.5
Tamaño (nm)	≈ 4,5	≈ 5,4
Peso Molecular (Da)	14.215	26.251,86
Grupos químicos de superficie, Número de grupos	Amino, 64	Carboxilo, 128

**Figura 4:** Representación esquemática y características fisicoquímicas de dendrímeros PAMAM G4 y dendrímeros PAMAM G4.5 (Sigma- Aldrich Co.).

Previo al desarrollo de nanosistemas dendriméricos para la entrega de DTX, es necesario conocer como interaccionan estos dendrímeros a nivel *in vitro* e *in vivo*. Es importante conocer si son captados por células de tumor mamario y por un modelo animal con tumor mamario. Nuestro grupo ya ha trabajado con dendrímeros PAMAM G4 y estudiado su interacción con cultivos primarios de células miometriales humanas. Para ello, los dendrímeros fueron conjugados covalentemente con el fluoróforo FITC (Fluoresceina Isotiocianato), y el nanosistema dendrimérico desarrollado, dendrímero PAMAM G4-FITC, caracterizado fisicoquímicamente<sup>40</sup>.

## 2. Objetivo

Desarrollo, caracterización y evaluación *in vitro* e *in vivo* de nanosistemas basados en dendrímeros PAMAM, como potenciales vehículos para la entrega de DTX en tumores mamarios.

### 2.1. Objetivos específicos

1. Estudiar la captación de dendrímeros PAMAM G4 en células de tumor mamario murino y humano, así como también la biodistribución y la captación a nivel tumoral en cortes histológicos de ratones BALB/c con tumor mamario.
2. Evaluar la citotoxicidad de dendrímeros PAMAM G4 y dendrímeros PAMAM G4.5 en células tumorales.
3. Conjugar (covalentemente) dendrímeros PAMAM G4.5 con FITC, estudiar su citotoxicidad, y la captación *in vitro* e *in vivo* de estos dendrímeros en células tumorales y en tumores de ratones BALB/c con tumor mamario.
4. Encapsular Docetaxel (DTX) en dendrímeros PAMAM G4.5, cuantificar y caracterizar el nanosistema dendrímero PAMAM G4.5-DTX obtenido y evaluar su eficacia antitumoral en células tumorales.

## 3. Materiales y Métodos

### 3.1. Estudio de la captación intracelular de dendrímeros PAMAM G4-FITC por células 4T1 y MDA-MB-231.

Para estudiar la captación de los dendrímeros PAMAM G4-FITC, primeramente las células 4T1 ó MDA-MB-231 se decoloraron con Tripsina- EDTA termostatzada a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se resuspendieron en 10 mL de RPMI con 5% de SFB y 100 U/L penicilina/100 g/L estreptomycin, y se pasaron a un tubo de centrifuga. Las células se centrifugaron a 800 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se retiró y el pellet se disoció mecánicamente y se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo completo hasta la no visualización de grumos o acúmulos celulares. El número de células se calculó por conteo en cámara de Neubauer.

Se colocaron  $5 \times 10^3$  células 4T1 o  $1,5 \times 10^5$  células MDA-MB-231 sobre cubreobjetos dispuestos en placas de 6 pocillos. Los pocillos se completaron con 2 mL de medio de

cultivo. Al cabo de las 24 h de incubación en estufa a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, se agregaron dendrímeros PAMAM G4-FITC ([PAMAM G4-FITC]<sub>final</sub>= 1 µg/mL) a los pocillos correspondientes (a excepción de los pocillos control de cada línea celular), y las células se incubaron por 24 h. Al término de este tiempo, las células se lavaron 3 veces con PBS 1x y se fijaron 15 minutos a 4°C con PFA (paraformaldehído) 3 %. Las células se lavaron 3 veces con PBS 1x e incubaron 10 minutos con 1 µg/mL de DAPI (Sigma-Aldrich Co.). Las células sobre los cubreobjetos se montaron colocando una gota de medio de montaje (ProLong Antifade Kit (P7481) de Molecular Probes-Invitrogen) sobre los portaobjetos. Las muestras se observaron al microscopio láser confocal (MLC), por medio del empleo de los láseres 488 nm para la observación de los dendrímeros PAMAM G4-FITC, y 405 nm para la observación del DAPI (marcador de núcleo celular).

### 3.1.1. Marcación de dendrímeros PAMAM G4 con <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>.

Se eluyó el generador de <sup>99m</sup>Tc y se agregaron al kit de tricarbonilo (IsoLinkTM Carbonyl Labeling Agent), 5-30 mCi (1 mL aproximadamente) de actividad. El agregado de actividad al kit se realizó por medio de jeringa, de manera de evitar la incorporación de oxígeno al vial. La mezcla se colocó en un baño a 100°C y se incubó por 30 minutos. Se dejó enfriar y posteriormente se le agregó una cantidad suficiente de HCl 0,1 M para llevar el pH a 7 (aprox. 500 µL). Se agregaron 500 µL de <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub> a 1 mg de dendrímeros PAMAM G4 (Sigma- Aldrich Co.). Al cabo de 15-30 minutos de reposo, se agregó 1 mL de NaCl 0,9%. Como con el agregado de dendrímeros PAMAM G4, el pH aumento a 10-11, se ajustó pH hasta pH neutro.

### 3.1.2. Biodistribución de dendrímeros PAMAM G4-<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub> en ratones BALB/c normales y ratones BALB/c con tumor mamario.

Los estudios de biodistribución se realizaron empleando ratones BALB/c normales y portadores de tumor mamario (inducido con células 4T1) de 8 semanas de edad. Los tumores de mama se obtuvieron por medio de la inyección de 7 x 10<sup>5</sup> células 4T1 en la grasa mamaria derecha. Para los experimentos se emplearon ratones con tumor de mama con diez días post-inyección de células tumorales.

En ambos casos, se inyectaron 50 µL de dendrímeros PAMAM G4-<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub> por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical a las 24 h post- inyección de dendrímeros PAMAM G4-<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>. Tanto el tumor como los tejidos y órganos de interés fueron extirpados, pesados y su actividad fue medida en un contador de centelleo sólido (ORTEC). La actividad captada en los tejidos normales y tejido tumoral fue expresada como porcentaje de actividad inyectada (% actividad) y porcentaje de actividad inyectada por gramo (% actividad/g).

### 3.1.3. Estudio de captación tumoral de dendrímeros PAMAM G4-FITC en ratones BALB/c con tumor de mama inducido con células 4T1.

Para estudiar la captación de los dendrímeros PAMAM G4 por las células del tejido de tumor de mama, se inyectaron 9,8 mg/kg de dendrímeros PAMAM G4-FITC por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Los dendrímeros PAMAM G4-FITC se prepararon de acuerdo a Oddone y colaboradores<sup>40</sup>. A las 24 h post-inyección de dendrímeros PAMAM G4-FITC, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, y se procedió a la extirpación del tumor de mama. El tumor se cortó en pedazos pequeños de aproximadamente 1 cm x 1 cm, se fijó con PFA 3% y crioprotegió con sacarosa 15% y 30%, respectivamente. Una vez crioprotegidas, las muestras se incubaron con sacarosa 30% y medio de congelamiento tisular (Jung) en una relación 1:1 por 1 h y luego con medio de congelamiento por el mismo período. Finalmente se procedió al armado del bloque, colocando la muestra en un molde embebido en medio de congelamiento. La muestra se guardó a - 20°C hasta su solidificación. Una vez solidificado el bloque, se realizaron cortes por crióstato (Slee Mainz 2 Cryostat Mev) de 5 µm de espesor. Los cortes se analizaron por MLC, empleando los láseres 405 nm y 488 nm para la observación de los núcleos celulares y dendrímeros PAMAM G4-FITC, respectivamente.

### 3.2. Estudio de citotoxicidad de dendrímeros PAMAM G4 y dendrímeros PAMAM G4.5 en células 4T1, MDA-MB-231 y BJ.

La evaluación de la viabilidad celular y citotoxicidad de los dendrímeros PAMAM G4 y los dendrímeros PAMAM G4.5 in vitro, se realizó empleando células de tumor mamario murino 4T1, células humanas de tumor mamario humano MDA-MB-231, y una línea celular de fibroblastos humanos provenientes de piel normal BJ (ATCC). Estos estudios se realizaron mediante el ensayo de MTT, de acuerdo al método descrito por Mosmann, 1983<sup>41</sup>.

Se procedió a sembrar  $5 \times 10^3$  células 4T1 y  $1,5 \times 10^5$  células MDA-MB-231 o BJ, respectivamente, en una placa de 96 pocillos. Una vez sembradas, las células se incubaron en estufa a 37°C por un periodo de 24 h. Al término de este periodo, se agregaron distintas concentraciones de dendrímeros PAMAM G4 o de dendrímeros PAMAM G4.5 a los pocillos correspondientes. Las células se incubaron en estufa a 37°C por 48 h. Al cabo de este tiempo, se agregó una solución de medio de cultivo completo con MTT (0,5 mg/mL) a cada pocillo. La placa se incubó en estufa a 37°C por 1 h. El medio de cultivo con el MTT (Sigma- Aldrich Co.) se removió y los cristales púrpura de formazán se disolvieron mediante el agregado de DMSO a cada uno de los pocillos. La lectura de la absorbancia se realizó en un lector de placas (Varioskan), midiendo a 570 nm. La absorbancia de los pocillos control se tomó como 100% de viabilidad y se calcularon los porcentajes de viabilidad celular de las células tratadas con las distintas concentraciones de dendrímeros. La fórmula empleada para este cálculo fue la

siguiente:  $\text{Abs } M \times 100 / \text{Abs } C$ , donde M es la muestra y C el control. Se realizó un gráfico de % de viabilidad celular en función de concentración de dendrímeros y se calculó el IC50 (concentración de inhibición 50). Los datos utilizados son el promedio  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ). Los valores de IC50 se determinaron a partir de un ajuste no lineal de la curva dosis-respuesta sigmoidal (GraphPad Prism 5.00.288 software).

### 3.3. Conjugación de dendrímeros PAMAM G4.5 con piperacina-Boc.

En matraz de fondo redondo se colocaron 150  $\mu\text{L}$  de dendrímeros PAMAM G4.5 al 5% en MeOH (7,5 mg). El MeOH se evaporó a vacío. Luego se procedió al agregado de 1,65 mg de EDC disuelto en 130  $\mu\text{L}$  de buffer PBS 1X (relación molar 30:1 EDC: dendrímero). La mezcla se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y luego se agregaron 1,6 mg de piperacina-Boc (*N*-(*t*-butiloxicarbonil)piperacina) disuelta en 130  $\mu\text{L}$  de DMSO (relación molar 30:1 piperacina-Boc: dendrímero). Esta mezcla se incubó por 3 h en las mismas condiciones de temperatura y agitación. Al término de la incubación, la mezcla se filtró por columna de gel filtración PD-10, empleando agua Mili-Q como fase móvil. Se recolectaron fracciones de 500  $\mu\text{L}$ . Las mismas se controlaron por TLC, encontrándose que el producto fue recolectado en las fracciones 5-9. Dichas fracciones se juntaron y posteriormente se liofilizaron (BW-18B Freeze dryer Bluewave industry Co., Ltd).

#### 3.3.1. Desprotección de Boc y conjugación de PAMAM G4.5 con Fluoresceína Isotiocianato (FITC).

Se obtuvieron aproximadamente 5 mg de G4.5-Piperacina-Boc. El producto se disolvió con 325  $\mu\text{L}$  de MeOH y luego se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . En un segundo vial se mezclaron 26  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y 1  $\mu\text{L}$  de TFA. El contenido de ambos viales se mezcló y agitó durante 1 h en plancha con agitación magnética. A la mezcla se le agregó 1 mg de  $\text{NaHCO}_3$  y se agitó por 15 minutos. El sobrenadante se colocó en otro vial. Este procedimiento se repitió dos veces más, agregando 100  $\mu\text{L}$  de MeOH cada vez. El MeOH se eliminó por rotavaporación (BUCHI Rotavapor®) y se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de buffer PBS 1x y 1 mg de FITC (Sigma- Aldrich Co.) disuelto en 60  $\mu\text{L}$  de DMSO. La mezcla se incubó por 24 h y purificó por columna de gel filtración PD-10, empleando agua MiliQ como fase móvil. Se recolectaron fracciones de 500  $\mu\text{L}$ . Las mismas se controlaron por TLC, encontrándose que el producto fue recolectado entre las fracciones 5-9. Estas fracciones se juntaron y el FITC no unido covalentemente, se separó de la suspensión de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacina-FITC, por centrifugación en filtros de centrifuga de 10 kDa (Microcon®). La centrifugación se hizo 3 veces a 12.000 rpm por 10 minutos, agregando al filtro de centrifuga un volumen de agua de dos veces el volumen de la muestra cada vez. La disolución obtenida fue liofilizada.

### 3.3.2. Medida de tamaño de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC.

El tamaño de partícula y la distribución de tamaños de los dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC se midió por dispersión dinámica de la luz, DLS (“Dynamic Light Scattering”) así como también se midió el potencial z (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK). Los dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC se diluyeron previo a la medida con agua Mili-Q y la muestra se pasó por filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ . Los valores obtenidos corresponden al resultado de 5 medidas.

### 3.3.3. Caracterización por $^1\text{H}$ RMN de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacina y dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC.

Los espectros se adquirieron en un espectrómetro Bruker DPX-400 (400 MHz), empleando agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) como disolvente. Los corrimientos químicos de protón se presentan en ppm ( $\delta$ ) usando tetrametilsilano (TSM) como cero. Los espectros fueron registrados a temperatura ambiente.

### 3.3.4. Estudio de citotoxicidad y de captación de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC en células 4T1.

Para el estudio de citotoxicidad de los dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC se siguió el mismo procedimiento que en la sección 3.2 de materiales y métodos. Asimismo, para los estudios de captación de los dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC, se siguió el mismo procedimiento que en la sección 3.1 de materiales y métodos. La concentración de dendrímeros G4.5-piperacilin-FITC empleada fue de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### 3.3.5. Estudios de imagenología *ex vivo* de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC en ratones Balb-c con tumor mamario inducido con células 4T1.

Se realizó un estudio de captación tumoral de dendrímeros PAMAM G4.5 por medio de la inyección intravenosa de 34,2 mg/kg de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC. A las 24 h post-inyección se procedió a extraer corazón, hígado, bazo, pulmones, riñones y tumor. Los mismos se dispusieron en una placa de petri, la cual se colocó dentro del equipo de imagenología de fluorescencia para ratones (*In vivo* MSF X PRO, Bruker). La fluorescencia de los órganos mencionados se midió con una longitud de onda de excitación y de emisión de 480 nm y 535 nm, respectivamente.

### 3.4. Encapsulación de DTX en dendrímeros PAMAM G4.5.

Para la encapsulación de DTX en dendrímeros PAMAM G4.5 se empleó una relación de DTX: dendrímero PAMAM G4.5 de 30:1. Para ello, se rotavaporaron 500  $\mu$ L de una solución de dendrímeros PAMAM G4.5 al 5% en MeOH (Sigma- Aldrich Co.). Este volumen equivale a 25 mg de dendrímeros PAMAM G4.5. A continuación se agregaron 23 mg de DTX diluido en 10 mL de MeOH. La mezcla se agitó en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente por 24 h. Al término de este tiempo de incubación, el MeOH se evaporó a vacío y se agregaron 5 mL de H<sub>2</sub>O miliQ y se procedió a la agitación por otras 24 h en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, el sobrenadante se filtró con una membrana de polipropileno (PTFE) de 0,2  $\mu$ m, de forma de eliminar los precipitados de DTX no encapsulado en los dendrímeros.

#### 3.4.1. Cuantificación de dendrímeros PAMAM G4.5-DTX por HPLC.

La cuantificación de DTX encapsulado en el nanosistema: dendrímero PAMAM G4.5-DTX, se realizó por HPLC (Agilent Technologies Inc. 1200 Infinity Series equipado con un detector GABI Star). Se usó un método en gradiente, empleando una columna C18 de fase reversa de 5  $\mu$ m y 4.6 x 150 mm. La Fase móvil A consistió en agua destilada y 0.14 % de ácido 2,2,2-trifluoroacético (TFA). La fase móvil B consistió en acetonitrilo (ACN) y 0,14% de TFA. El gradiente transcurrió de 100 % a 0 % de fase móvil A hasta los 20 minutos, y de 0% a 100% de fase móvil A de 20 a 22 minutos. La velocidad de flujo fue de 1.0 mL/min y las longitudes de onda de detección empleadas fueron de 210 y 275 nm, respectivamente. Para la cuantificación se corrieron tres inyecciones de DTX (estándar) de 0,2 mg/mL de concentración y tres inyecciones de dendrímeros PAMAM G4.5-DTX. Las corridas cromatográficas se analizaron y se tomaron las áreas de los picos correspondientes al DTX (los cuales se identificaron por sus espectros). El cálculo de la concentración se realizó aplicando la siguiente fórmula:  $C_M = (C_{st}) * (A_M) / A_{st}$ , donde  $C_M$  corresponde a la concentración de DTX en la muestra (dendrímeros PAMAM G4.5-DTX),  $C_{st}$  a la concentración del estándar (DTX), y  $A_M$  y  $A_{st}$  a las áreas de los picos (que presentaron un espectro característico de DTX) de la muestra y del estándar, respectivamente.

#### 3.4.2. Caracterización de dendrímeros PAMAM G4.5-DTX por espectroscopía infrarroja.

Las muestras se prepararon mezclando DTX, dendrímeros PAMAM G4.5-DTX o dendrímeros PAMAM G4.5 con KBr (sal altamente purificada que no presenta absorción en el infrarrojo). Las mezclas se trituraron y prensaron en prensa hidráulica aplicando una fuerza de 10 TON. Las pastillas así formadas se colocaron en el equipo

de infrarrojo (Pike Crush IR) y los espectros fueron registrados a temperatura ambiente.

### **3.4.3. Evaluación de la efectividad antitumoral de dendrímeros PAMAM G4.5-DTX.**

La evaluación de la efectividad antitumoral *in vitro* de los dendrímeros PAMAM G4.5-DTX, se realizó en células 4T1 y MDA-MB-231 (ATCC) mediante el ensayo de MTT. También se analizó la citotoxicidad de este nanosistema en células BJ (ATCC).

Se procedió a sembrar  $5 \times 10^3$  células 4T1 y  $1,5 \times 10^5$  células MDA-MB-231 o BJ, respectivamente, en una placa de 96 pocillos. Una vez sembradas, las células se incubaron en estufa a 37°C por un periodo de 24 h. Al término de este periodo, se agregaron distintas concentraciones de DTX, dendrímeros PAMAM G4.5-DTX y dendrímeros PAMAM G4.5 a los pocillos correspondientes. Las células se incubaron en estufa a 37°C por 48 h. Al cabo de este tiempo, se agregó una solución de medio de cultivo completo con MTT (0,5 mg/mL in PBS) a cada pocillo. La placa se incubó en estufa a 37°C por 1 h. El medio de cultivo con el MTT fue removido y los cristales púrpura de formazán se disolvieron mediante el agregado de DMSO a cada uno de los pocillos. La lectura de la absorbancia se realizó en un lector de placas (Varioskan), midiendo a 570 nm. Las absorbancias de los pocillos control se tomaron como 100% de viabilidad y de calcularon los porcentajes de viabilidad celular de las células tratadas con las distintas concentraciones de DTX, dendrímeros PAMAM G4.5-DTX y dendrímeros PAMAM G4.5. Se realizó un gráfico de % de viabilidad celular en función de concentración de dendrímeros y se calculó el IC50 (concentración de inhibición 50). Los datos utilizados son el promedio  $\pm$  desviación estándar (n=3). Los valores de IC50 se determinaron a partir de un ajuste no lineal de la curva dosis-respuesta sigmoidal (GraphPad Prism 5.00.288 software). Los análisis estadísticos se hicieron empleando 2way Anova (GraphPad Prism 5.00.288 software).

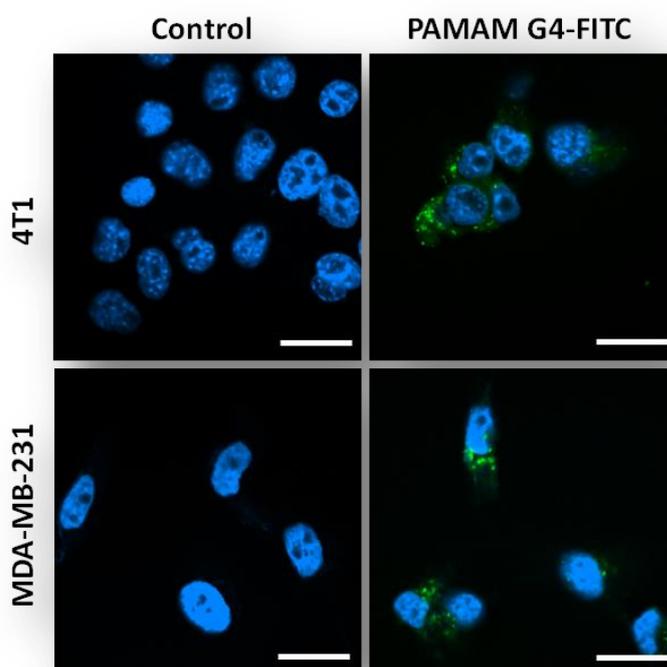
## **4. Resultados**

### **4.1. Captación de dendrímeros PAMAM G4-FITC por células 4T1 y MDA-MB-231.**

La captación de los dendrímeros PAMAM G4 se estudió en dos líneas celulares de tumor mamario, 4T1 y MDA-MB-231 (murino y humano, respectivamente). Se empleó la línea celular murina 4T1 por ser una línea altamente metastásica, que constituye un

modelo de cáncer de mama humano de estadio IV<sup>9</sup>. Asimismo, empleamos la línea celular MDA-MB-231 humana, por su alta capacidad metastásica<sup>10</sup>.

Para el estudio de la captación de dendrímeros PAMAM G4 por estas líneas celulares, se emplearon dendrímeros PAMAM G4-FITC desarrollados previamente por nuestro grupo<sup>40</sup>. Se encontró que los dendrímeros PAMAM G4-FITC fueron captados por estas células. A las 24 h de incubación, los dendrímeros PAMAM G4-FITC se distribuyeron a nivel perinuclear (alrededor del núcleo celular) sin ingreso al núcleo celular (**Figura 5**)



**Figura 5.** Imagen de MLC de Células 4T1 y MDA-MB-231 control e incubadas por 24 h con dendrímeros PAMAM G4-FITC. Verde: G4-FITC, Azul: DAPI. Magnificación: 60x. Barra se escala: 20  $\mu$ m

#### 4.1.2. Biodistribución de dendrímeros PAMAM G4-<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub> en ratones BALB/c normales y con tumor mamario inducido con células 4T1.

El modelo de cáncer de mama empleado en este trabajo, fue el modelo de ratones BALB/c con tumor mamario inducido con células 4T1. El carcinoma mamario con células 4T1 es un modelo de tumor murino altamente maligno y poco inmunogénico que se asemeja al cáncer de mama avanzado en humanos<sup>7</sup>. El tumor de mama primario inducido con estas células en ratones BALB/c, puede hacer metástasis espontáneas a partir del tumor primario a sitios distantes incluyendo nódulos linfáticos, hígado, pulmones, cerebro y huesos. El patrón de estas metástasis espontáneas es análogo al que se presenta en pacientes con cáncer de mama<sup>8</sup>

Para el estudio de biodistribución de los dendrímeros PAMAM G4 se procedió a marcar los dendrímeros con  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ . El conjugado resultante: dendrímero PAMAM G4- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$  fue desarrollado y caracterizado previamente por nuestro grupo de investigación <sup>42</sup>. Los dendrímeros PAMAM G4- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$  fueron inyectados por vía intravenosa en ratones BALB/c normales y portadores de tumor mamario. Al cabo de las 24 h post-inyección, se recolectaron los órganos y se midió su actividad. La biodistribución de los dendrímeros PAMAM G4- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$  en ratones con tumor mamario fue similar a la biodistribución observada en ratones normales, presentando además captación por parte del tumor (**Figuras 6 y 7**). Todos los datos están expresados en % de actividad y % de actividad/g, respectivamente. Los porcentajes de actividad/g observados para hígado, riñones y tumor fueron de 20.8 %, 27.4 % y 2.86 %, respectivamente. A nivel tumoral, el porcentaje de actividad/g fue de 3.6 veces mayor que el del músculo circundante, donde el porcentaje de actividad/g fue de 0.8 % (**Figura 7**).

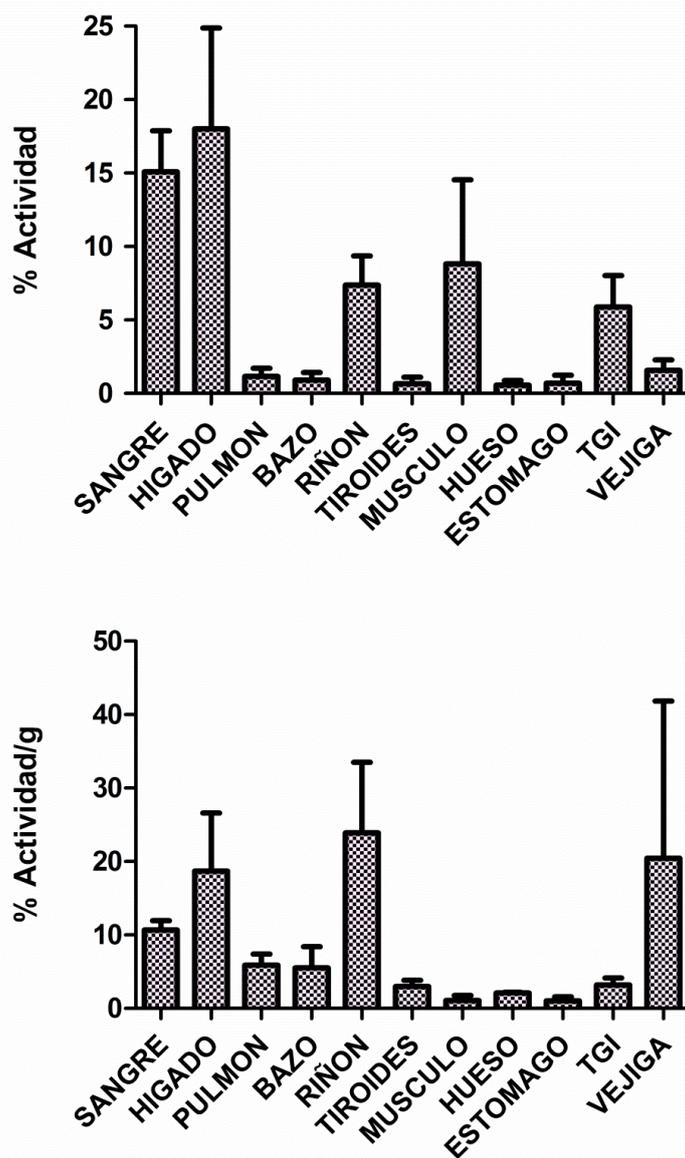


Figura 6. Estudio de Biodistribución a las 24 h post-inyección de dendrímeros PAMAM G4-FITC en ratones BALB/c normales. En el gráfico superior e inferior se muestran los porcentajes de actividad y los porcentajes de actividad por gramo de los diferentes órganos, respectivamente. TGI: tracto gastrointestinal.

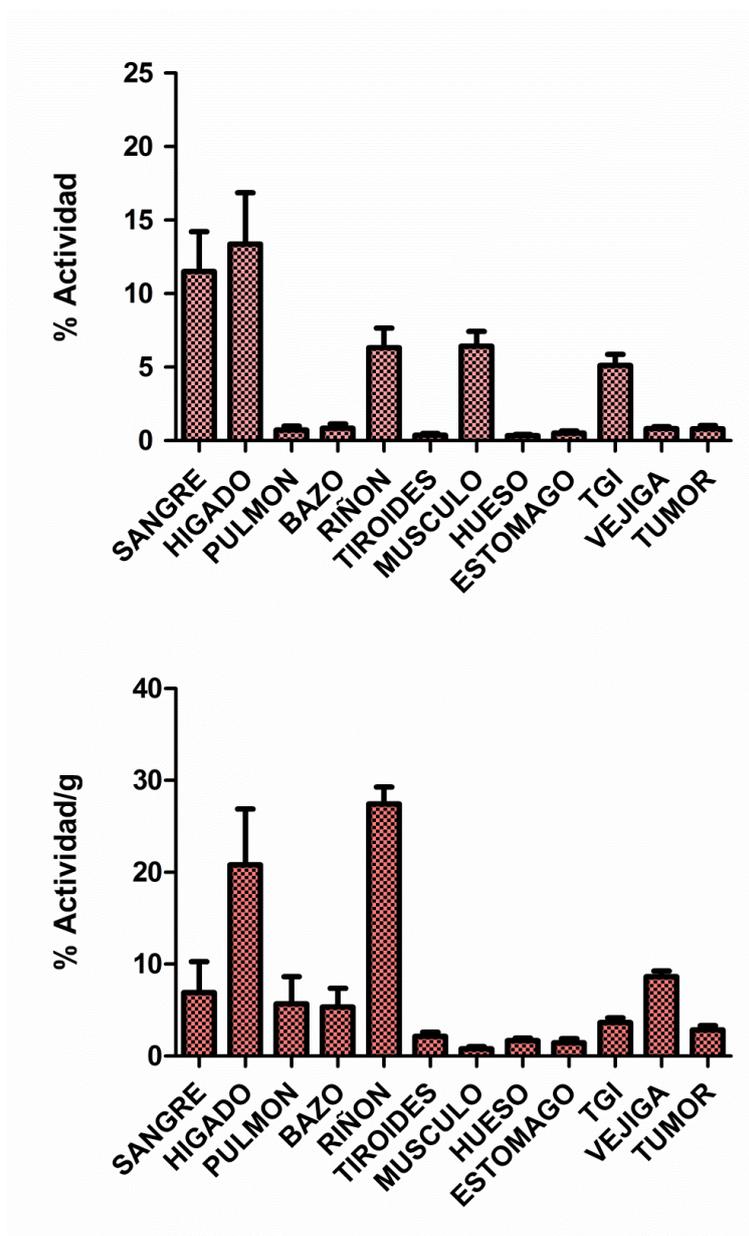
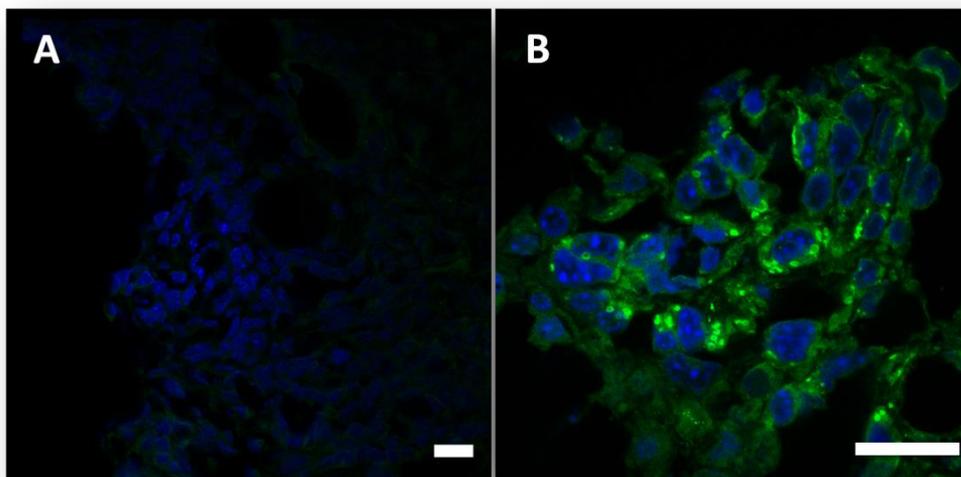


Figura 7. Estudio de Biodistribución a las 24 h post-inyección de dendrímeros PAMAM G4-FITC en ratones BALB/c con tumor mamario. En el gráfico superior e inferior se muestran los porcentajes de actividad y los porcentajes de actividad por gramo de los diferentes órganos y el tumor, respectivamente. TGI: tracto gastrointestinal.

#### 4.1.3. Captación tumoral de dendrímeros PAMAM G4-FITC en ratones BALB/c con tumor mamario inducido con células 4T1.

El análisis por microscopía confocal de los cortes histológicos de tumores mamarios provenientes de ratones BALB/c (con tumor mamario inducido con células 4T1)

tratados con dendrímeros PAMAM G4-FITC, mostraron una distribución perinuclear por parte de los mismos sin ingreso al núcleo celular (**Figura 8**).



**Figura 8.** Imagen de MLC de sección de tumor mamario de ratones BALB/c con tumor a las 24 h post-inyección de dendrímeros PAMAM G4-FITC. A) Control. Magnificación: 60x. Barra se escala: 20  $\mu\text{m}$ . B) Magnificación: 150x. Barra se escala: 50  $\mu\text{m}$ . Verde: G4-FITC, Azul: DAPI.

#### 4.2. Citotoxicidad de dendrímeros PAMAM G4 y dendrímeros PAMAM G4.5.

Para la evaluación de la citotoxicidad de los dendrímeros PAMAM G4, se emplearon dos líneas celulares tumorales y una línea celular normal de fibroblastos normales de piel humana, BJ. Esta línea celular se empleó como control de línea celular normal.

La evaluación de la citotoxicidad de los dendrímeros PAMAM G4 tanto en las líneas celulares tumorales como en la línea celular normal, mostró que los dendrímeros PAMAM G4 resultaron ser tóxicos a bajas concentraciones (**Figura 9**). Este efecto citotóxico fue notoriamente mayor en células 4T1 (**Figura 9**). Los valores de IC50 calculados para estos dendrímeros fueron de 1,29  $\mu\text{M}$ ; 15,5  $\mu\text{M}$  y 7,14  $\mu\text{M}$  para las líneas celulares 4T1, MDA-MB-231 y BJ, respectivamente.

Los dendrímeros PAMAM G4.5 no presentaron citotoxicidad para ninguna de las líneas celulares empleadas al tiempo de incubación y concentraciones empleadas (**Figura 10**). En base a estos resultados se decidió continuar los estudios únicamente con los dendrímeros PAMAM G4.5.

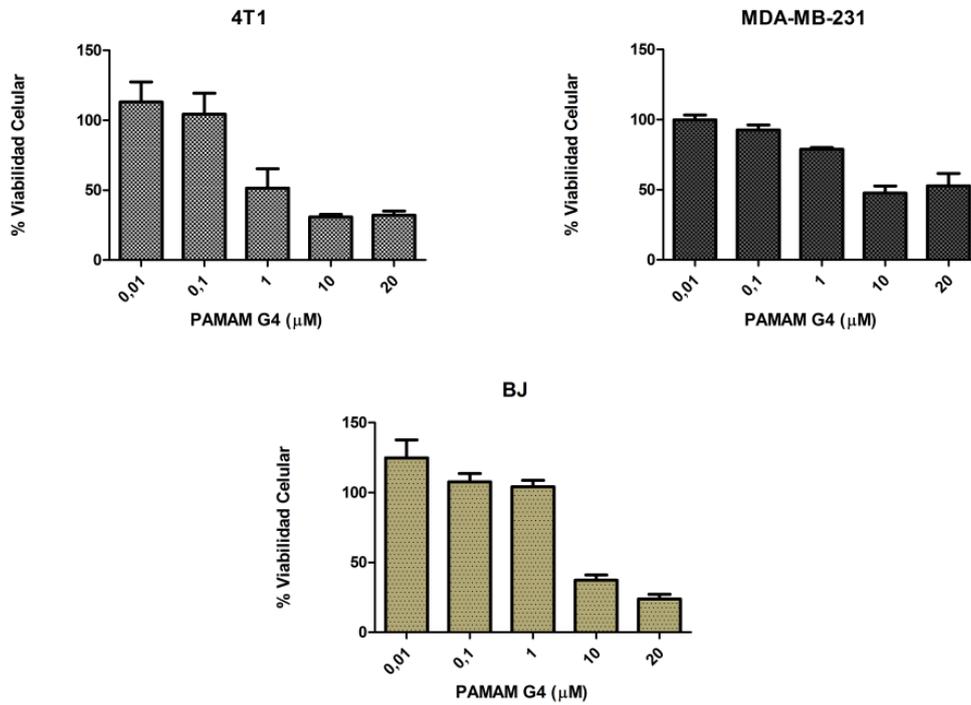


Figura 9: Estudios de Viabilidad Celular de los dendrímeros PAMAM G4 a las 48 h de incubación en las siguientes líneas celulares: 4T1, MDA-MB-231 y BJ.

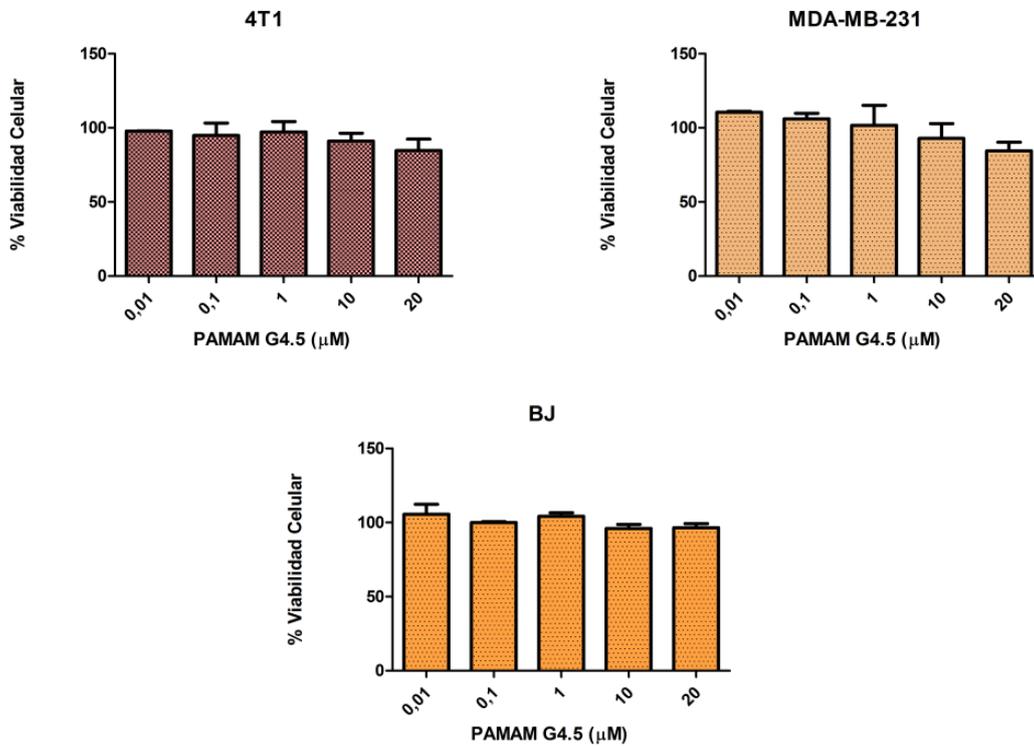
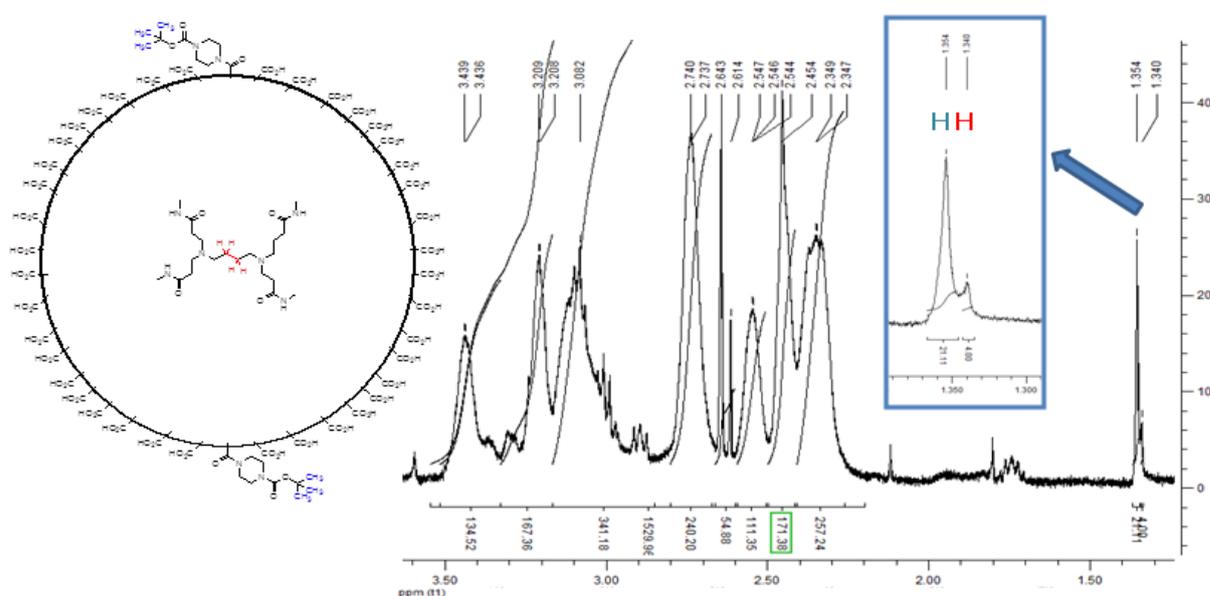


Figura 10: Estudios de Viabilidad Celular de los dendrímeros PAMAM G4.5 a las 48 h de incubación en las siguientes líneas celulares: 4T1, MDA- MB- 231 y BJ.

### 4.3. Caracterización de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacina y dendrímeros PAMAM G4.5-piperacina-FITC por $^1\text{H}$ RMN.

La señal a 1,354 ppm (**H**, **Figura 11**) en el espectro  $^1\text{H}$  RMN, que corresponde a los protones de los grupos metilo del grupo *t*-butilo de la piperacina N- monoprotectada (piperacina-Boc), confirma la formación de la amida deseada. Por otro lado, la señal a 1,340 ppm (**H**, **Figura 11**) se corresponde a los protones de los grupos metileno en el corazón de los dendrímeros PAMAM G4.5 (**Figura 11**).

A partir del dato de integración, obtenido en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN, se confirma que la funcionalidad piperacina, unida covalentemente, se incorporó a los dendrímeros PAMAM G4.5 en una relación de dos moléculas de piperacina-Boc por molécula de dendrímero PAMAM G4.5 (**Figura 11**).



**Figura 11.** Sección del espectro de  $^1\text{H}$  RMN de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacina. El espectro se obtuvo a temperatura ambiente.

La integración de la señal a 1,34 ppm (**H**, **Figura 12**) en el espectro  $^1\text{H}$  RMN, que se corresponde a los protones de los grupos metileno de los dendrímeros PAMAM G4.5, permiten confirmar (como se esperaba por la estequiometría de la reacción anterior) que la unión de moléculas de FITC por dendrímero es de 2:1. Para estimar este aspecto, se consideró la presencia e integración de las señales correspondientes a los protones aromáticos a 6.5 (**H**, **Figura 12**) y 7.0 ppm (**H**, **Figura 12**) del fragmento FITC en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN.

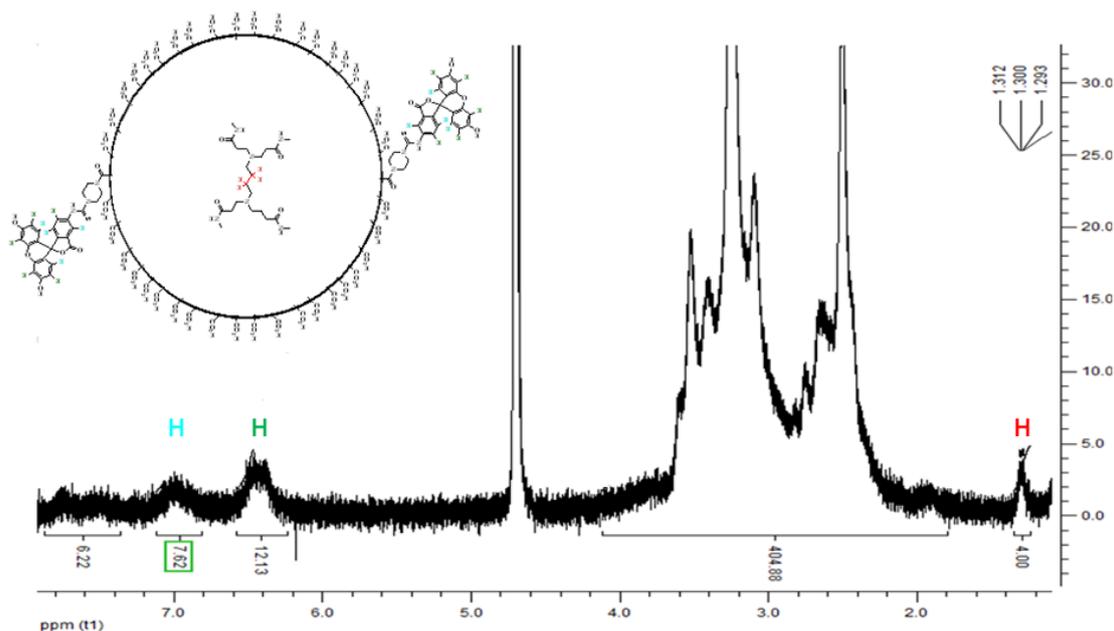


Figura 12. Sección del espectro de  $^1\text{H}$  RMN de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC. El espectro se obtuvo a temperatura ambiente.

#### 4.3.1. Medida de tamaño y potencial z de los dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC por z-sizer.

El tamaño de las nanopartículas, Pdl (índice de polidispersión) y el potencial z de los dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC (disueltos en agua Mili-Q), fueron analizados por z-sizer, obteniéndose un tamaño hidrodinámico de  $96,3 \pm 1,4$  nm, con un Pdl de  $0,0296 \pm 0,02$  y un potencial z de  $-19,52 \pm 0,16$  mV.

#### 4.3.2. Citotoxicidad de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC en células 4T1.

La citotoxicidad de los dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC desarrollados y caracterizados en este trabajo, fue evaluada en la línea celular 4T1. Los dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC se incubaron por 24 h en estas células y resultaron no ser citotóxicos para las mismas a las concentraciones evaluadas.

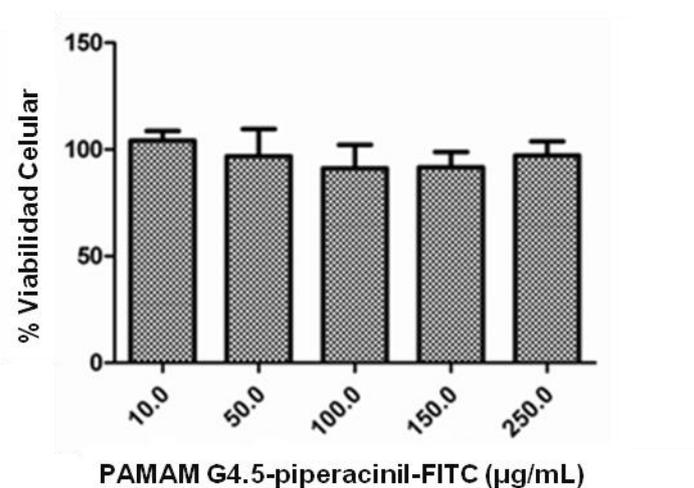


Figura 13. Estudio de viabilidad celular de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC en células 4T1.

#### 4.3.3. Captación de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC en células 4T1.

La captación de los dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC fue evaluada en células 4T1 a las 24 h de incubación. Al igual que los dendrímeros PAMAM G4-FITC, los dendrímeros PAMAM G4.5-FITC fueron captados por las células, presentando una distribución perinuclear, sin ingreso al núcleo celular.

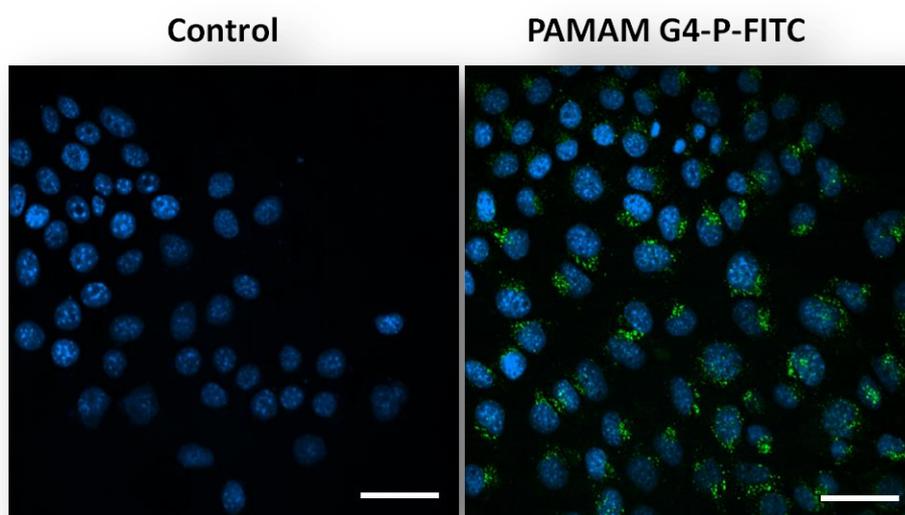
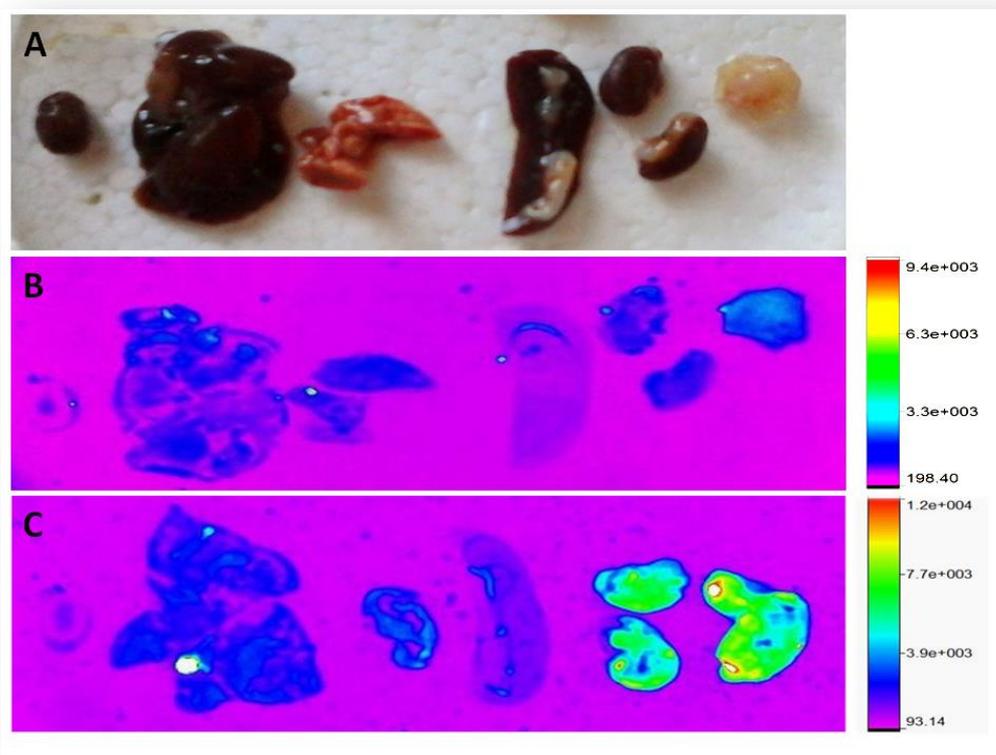


Figura 14: Imagen de MLC de células 4T1 incubadas con dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC. A) Control. B) Células tratadas con dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC por 24 h. Magnificación: 40X. Verde: dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC, Azul: DAPI. Escala: 50 µm

#### 4.3.4. Captación de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacínil-FITC por imagenología de fluorescencia *ex vivo* en ratones BALB/c con tumor mamario.

La captación de los dendrímeros PAMAM G4.5-piperacínil-FITC por parte del tumor, fue estudiada por medio de la inyección vía intravenosa de estos dendrímeros en ratones BALB/c con tumor mamario. Se encontró captación por parte del tumor, cierta captación hepática y captación renal (**Figura 15**).

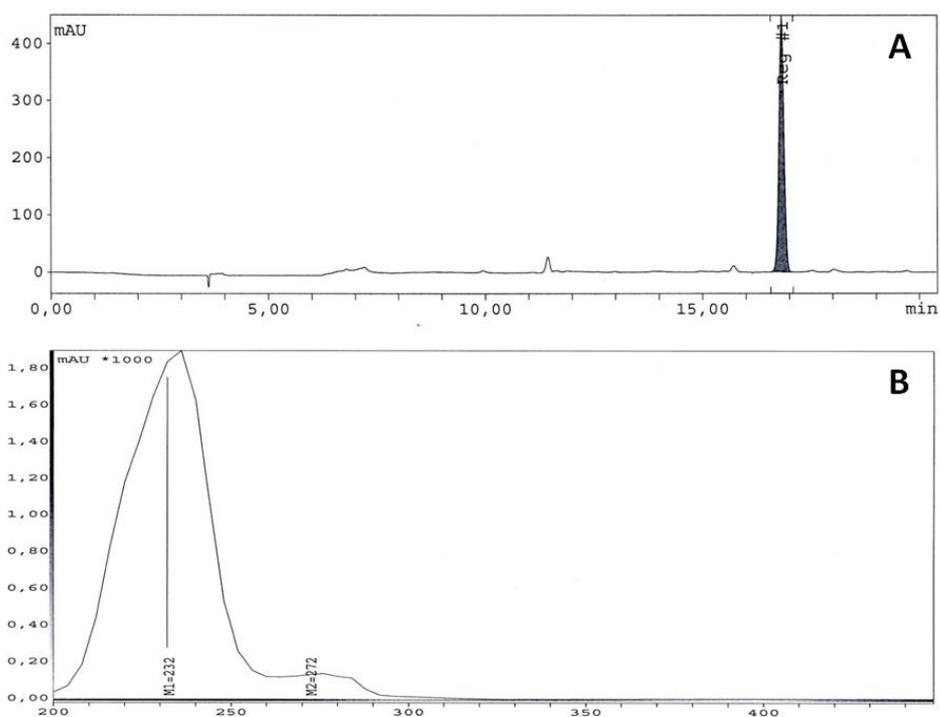


**Figura 15. Imagenología de fluorescencia *ex vivo* de órganos representativos de ratones BALB/c con tumor mamario. A)** Imagen de los órganos extirpados de un ratón BALB/c con tumor mamario sin inyección (Control) **B)** Imagen de fluorescencia *ex vivo* de los órganos extirpados de un ratón BALB/c con tumor mamario sin inyección (Control) **C)** Imagen de fluorescencia *ex vivo* de los órganos extirpados de un ratón BALB/c con tumor mamario a las 24 h post-inyección de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacínil-FITC. Los órganos de izquierda a derecha: corazón, hígado, pulmones, bazo, riñones y tumor. Las imágenes se tomaron con:  $\lambda$  exc.: 480 nm y  $\lambda$  em.: 535 nm.

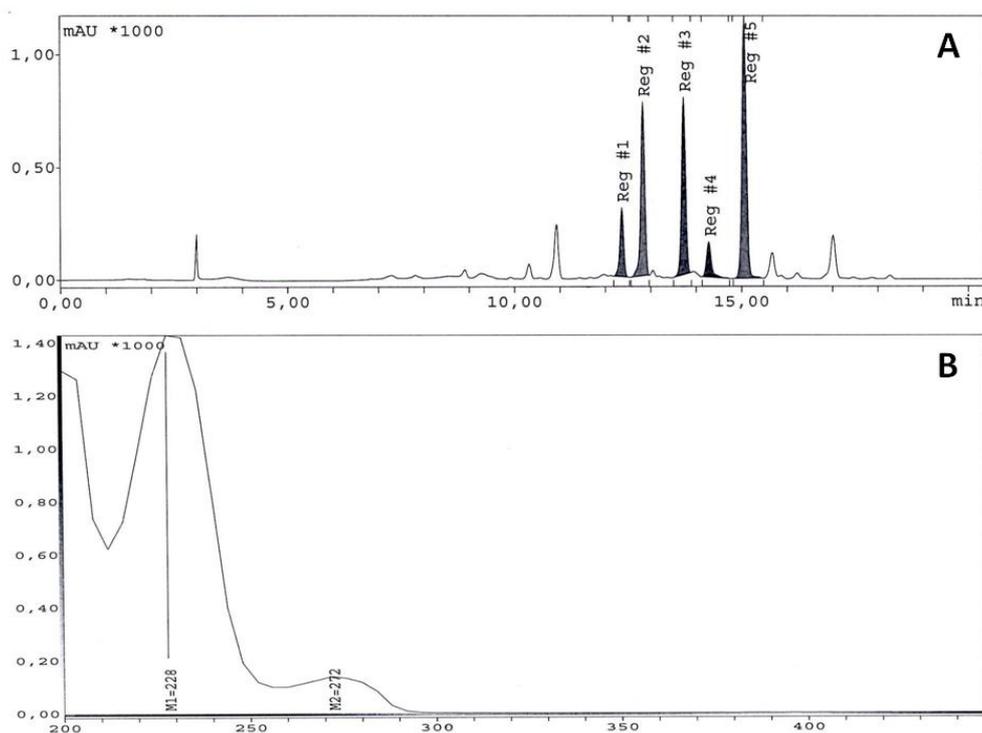
#### 4.4. Encapsulación y cuantificación de DTX en dendrímeros PAMAM G4.5.

Las dos preparaciones de dendrímeros PAMAM G4.5-DTX se cuantificaron por HPLC. Para ello se realizaron tres inyecciones de un estándar de DTX y se tomaron las áreas

del DTX en el cromatograma. El DTX eluyó con un tiempo de retención de 16,8 min. (**Figura 16**). Asimismo, se registró el espectro de DTX (**Figura 16**). Luego se realizaron tres inyecciones de G4.5-DTX y se tomaron las áreas de los picos cuyos espectros coinciden con el de DTX. Los tiempos de retención fueron de 12,37; 12,83; 13,73; 14,28 y 15,07 minutos (**Figura 17**). Los picos corresponden a distintas interacciones entre dendrímeros PAMAM G4.5 y DTX. Como se describió en la sección 3.4.1. de materiales y métodos, para el cálculo de la concentración de DTX en los dendrímeros PAMAM G4.5 se empleó la fórmula  $C_M = (C_{st}) \cdot (A_M) / A_{st}$ , donde la concentración de DTX<sub>st</sub> empleada fue de 0,2 mg/mL, el área de DTX<sub>st</sub> es el promedio de las áreas tomadas del cromatograma de cada inyección (**Figura 16**), y el área de la muestra es el promedio del área total tomada del cromatograma de cada inyección (**Figura 17**). La concentración de DTX obtenida con la primera preparación fue de 2,83 mM y la relación molar DTX: dendrímero de 14,8. Los resultados obtenidos de concentración de DTX y relación molar de DTX: dendrímero fueron de 3,49 mM y 18,3; respectivamente.



**Figura 16: Cromatograma de HPLC de DTX y espectro de DTX.** A) Cromatograma de DTX. El tiempo de retención de DTX fue de 16,82 min. B) Espectro UV de DTX, donde están indicados los máximos de absorción del DTX.



**Figura 17: Cromatograma de HPLC y espectro de DTX de dendrímeros PAMAM G4.5-DTX.** A) Cromatograma de G4.5-DTX. Los picos corresponden a distintas interacciones de PAMAM G4.5 con DTX. Los tiempos de retención fueron de 12,37; 12,83; 13,73; 14,28 y 15,07 minutos. B) Espectro UV presentado por uno de los picos del cromatograma, el cual indica la presencia de DTX.

#### 4.4.1 Caracterización de dendrímeros PAMAM G4.5-DTX por espectroscopía infrarroja.

Para comprender los cambios que ocurren por la interacción de DTX con los dendrímeros PAMAM G4.5 por infrarrojo, se registraron los siguientes espectros: dendrímero PAMAM G4.5, DTX, y dendrímero PAMAM G4.5-DTX (**Figura 18**).

El dendrímero PAMAM G4.5 presenta 3 bandas de absorción que no se superponen con las señales de DTX:  $1402\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al estiramiento simétrico del grupo carboxilato (externo), y las señales correspondientes a la amida secundaria (N-H),  $1558\text{ cm}^{-1}$ , y al grupo carbonilo,  $1637\text{ cm}^{-1}$ . A partir de estos resultados se deduce que la forma sólida del dendrímero PAMAM G4.5 (que fue empleada en este análisis) se encuentra bajo la forma de carboxilato.

Después de la interacción con DTX, la posición de las bandas de absorción centradas en  $1402$  y  $1637\text{ cm}^{-1}$  no se modifican, mientras que la banda centrada en  $1558\text{ cm}^{-1}$  se mueve a energías más altas, localizándose ahora en  $1588\text{ cm}^{-1}$ . Esto indica que el DTX se unió al grupo N-H de la amida secundaria interna, desestabilizándola.

Finalmente se observa que la relación de intensidades entre las señales para el grupo carbonilo y el N-H de la amida se modifica después de la interacción con DTX, pasando

de una relación 0.7:1 a 0.9:1. Esto está de acuerdo con el hecho que DTX se una específicamente al N-H del dendrímico.

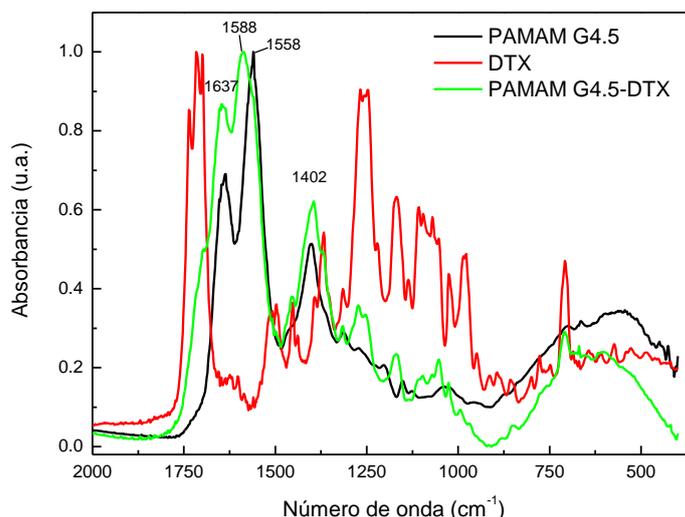
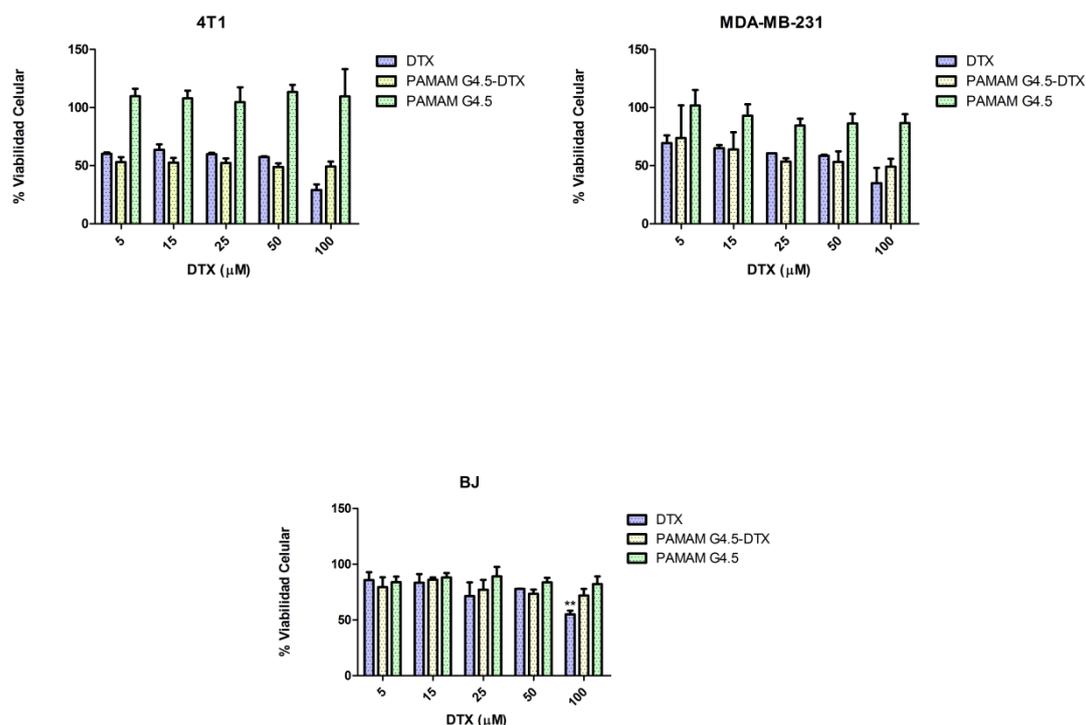


Figura 18: Espectro de Infrarrojo superpuesto de dendrímeros PAMAM G4.5 (negro), DTX (rojo) y dendrímeros PAMAM G4.5-DTX (verde). En la figura se indica la región del espectro que va de 2000 a 300  $\text{cm}^{-1}$  de número de onda.

#### 4.4.2. Estudio de la eficacia antitumoral *in vitro* de dendrímeros PAMAM G4.5-DTX.

La eficacia antitumoral observada para el DTX y los dendrímeros PAMAM G4.5-DTX en las líneas celulares de tumor mamario, 4T1 y MDA-MB-231 fue similar (Figura 19). Por otro lado, ambos tratamientos resultaron ser citotóxicos en la línea celular normal de fibroblastos, BJ. Los dendrímeros PAMAM G4.5 no fueron tóxicos a ninguna de las concentraciones ni líneas celulares estudiadas. Este resultado se corresponde con los resultados obtenidos a partir del ensayo de citotoxicidad con estos dendrímeros (Figura 9). En la línea celular normal de fibroblastos, se observó una diferencia significativa de la citotoxicidad a la concentración de 100  $\mu\text{M}$  de DTX. El DTX resultó ser más citotóxico que el dendrímico PAMAM G4.5-DTX (Figura 19).

Se calcularon los IC50 de dendrímeros PAMAM G4.5-DTX y DTX en las líneas celulares tumorales, 4T1 y MDA-MB-231, así como también en la línea celular de fibroblastos normales, BJ. Los IC50 para el DTX y G4.5-DTX obtenidos en las líneas celulares tumorales fueron menores que en la línea celular normal (Tabla 3).



**Figura 19:** Eficacia antitumoral *in vitro* de DTX, dendrímeros PAMAM G4.5-DTX y dendrímeros PAMAM G4.5 a las 48 h de incubación. El ensayo de eficacia antitumoral se realizó por MTT en las siguientes líneas celulares: 4T1, MDA-MB-231 y BJ, respectivamente. Los asteriscos (\*\*) indican una diferencia significativa en % Viabilidad celular de DTX y dendrímeros PAMAM G4.5-DTX con un  $P < 0.01$ .

	4T1	MDA-MB-231	BJ
<b>DTX (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>50,7</b>	<b>78,2</b>	<b>&gt; 100</b>
<b>G4.5-DTX (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>54,4</b>	<b>75,3</b>	<b>&gt; 100</b>

**Tabla 3:** Valores de IC50 de DTX y dendrímeros PAMAM G4.5-DTX calculados para las líneas celulares: 4T1, MDA-MB-231 y BJ, respectivamente.

## 5. Discusión

### 5.1. Captación *in vitro* e *in vivo* de dendrímeros PAMAM G4-FITC.

La elección primaria de los dendrímeros PAMAM G4 como posibles vehículos de DTX para tumor mamario, se basó en que en nuestro laboratorio ya se había desarrollado el nanosistema dendrímérico PAMAM G4-FITC<sup>40</sup>.

Los dendrímeros PAMAM G4-FITC como se muestra en la **Figura 5** fueron captados por las células 4T1 y MDA-MB-231, mostrando una distribución perinuclear sin ingreso al núcleo celular. Estos resultados *in vitro* se corresponden con los obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación, en células de cultivo primario de miometrio humano<sup>40</sup>, y por otros grupos de investigación en distintos tipos celulares como B16f10 (células de melanoma murino), A549 (carcinoma de pulmón humano) y Caco-2 (células de adenocarcinoma de colon humano)<sup>33,43-45</sup>.

Por otro lado se estudió la biodistribución de los dendrímeros PAMAM G4 y su captación a nivel del tejido tumoral (**Figura 7 y 8**). Para el estudio de biodistribución se emplearon dendrímeros PAMAM G4-<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>, los cuales se inyectaron por vía intravenosa en ratones BALB/c sin tumor y con tumor mamario inducido con células 4T1, respectivamente. En ratones normales se observó una alta captación hepática y eliminación por el sistema renal a las 24 horas post-inyección (**Figura 6**). La excreción de los dendrímeros depende de la generación dendrimérica y el carácter de los grupos funcionales. Los dendrímeros de generaciones bajas se excretan rápidamente por los riñones. En general, cuanto mayor es el peso molecular del dendrímero, mayor es el tiempo que está en circulación en comparación con los quelatos para imagen como el Gadolinio-DTPA (Gd-DTPA)<sup>25</sup>. Los dendrímeros PAMAM de generaciones bajas asociados a Gd, fueron eliminados rápidamente de la circulación sanguínea a través de los riñones. En cambio, solo el 20% de la dosis administrada de Gd asociada con los dendrímeros PAMAM G4, fue excretada durante los dos primeros días<sup>25</sup>.

En ratones BALB/c con tumor, al igual que en ratones BALB/c sin tumor, también se observó captación hepática y eliminación renal. Se encontró que hubo captación por parte del tumor en estos ratones (**Figura 7**). Esta captación fue corroborada por medio del análisis de cortes histológicos de tumores provenientes de ratones BALB/c con tumor inyectados con dendrímeros PAMAM G4-FITC (**Figura 8**)

## 5.2. Citotoxicidad de dendrímeros PAMAM G4 y dendrímeros PAMAM G4.5

La citotoxicidad de las nanopartículas depende de parámetros tales como morfología, relación superficie/volumen, tamaño, grupos funcionales, hidrofobicidad, carga y área de superficie (en términos de rugosidad y porosidad). Estos parámetros influyen en la capacidad de producir especies reactivas del oxígeno (ROS), determinar sitios de unión para los receptores, y en la dispersión y agregación de las nanopartículas. La citotoxicidad frecuentemente se debe a la contaminación, solubilidad y liberación de compuestos tóxicos, y adsorción de compuestos. Por otro lado, parámetros biológicos tales como el tipo celular usado para el estudio y las condiciones de exposición (densidad celular, concentración de partícula, composición del medio, temperatura), también influyen en la citotoxicidad<sup>46</sup>.

La utilización de dendrímeros en la medicina y farmacia están limitados por su toxicidad. La toxicidad de los dendrímeros se atribuye principalmente a la interacción de las cargas catiónicas de la superficie de los dendrímeros con membranas biológicas

cargadas negativamente. Esto conduce a la disrupción y deterioro de la membrana. La toxicidad de los dendrímeros puede estar caracterizada generalmente por hemólisis, citotoxicidad y toxicidad hematológica<sup>21</sup>.

En este trabajo se caracterizó la toxicidad de los dendrímeros PAMAM G4 y dendrímeros PAMAM G4.5 por medio de la evaluación de la citotoxicidad. A partir de estos estudios, se encontró que los dendrímeros PAMAM G4 resultaron ser citotóxicos para las líneas celulares de tumor mamario murino y humano (4T1 y MDA-MB-231, respectivamente) (**Figura 9**).

Para estos estudios se incluyó la línea celular BJ de fibroblastos humanos de piel, como control de células normales *in vitro*. Asimismo, se encontró citotoxicidad por parte de los dendrímeros PAMAM G4 en esta línea celular (**Figura 9**). Este resultado coincide con lo que se conoce de la literatura en relación a los dendrímeros catiónicos. La citotoxicidad de los dendrímeros PAMAM G4 encontrada puede asociarse a la carga y densidad de carga de estos dendrímeros<sup>46</sup>. El recubrimiento de los grupos catiónicos con polietilenglicol (PEGilación)<sup>46</sup> o por funcionalización disminuye la citotoxicidad<sup>46,47</sup>. Previamente nuestro grupo ha trabajado con dendrímeros PAMAM G4 funcionalizado con FITC<sup>40</sup>. La citotoxicidad del conjugado dendrímero PAMAM G4-FITC, fue estudiada en células de cultivo primario de miometrio humano, y no se encontró citotoxicidad por parte del mismo a las concentraciones y tipo celular estudiados. La disminución en el número de cargas positivas, como consecuencia de la unión de moléculas de FITC a los dendrímeros PAMAM G4, puede explicar este resultado. Dado que la actividad citotóxica de los dendrímeros PAMAM G4 no fue específica para células tumorales, el desarrollo de un nanosistema que utilice este tipo de dendrímero para la entrega de DTX, pierde significancia.

Además de estudiar la citotoxicidad de los dendrímeros PAMAM G4, cargados positivamente, se estudió la citotoxicidad de otro tipo de dendrímeros, cargados negativamente: dendrímeros PAMAM G4.5. Estos dendrímeros no resultaron ser citotóxicos para las tres líneas celulares estudiadas (**Figura 10**). Este resultado coincide con lo encontrado en la literatura, ya que en general se establece que la citotoxicidad de los dendrímeros PAMAM decrece cuando los grupos amino son neutralizados con grupos acetilo<sup>46</sup>.

Para poder utilizar los dendrímeros PAMAM G4.5 como sistemas de entrega de DTX, es necesario conocer si los mismos son internalizados por las células tumorales, así como también su biodistribución y captación tumoral. Para ello, al igual que en el caso de los dendrímeros PAMAM G4, fue necesario recurrir a la marcación de estos dendrímeros con un fluoróforo.

### 5.3. Obtención y caracterización de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacilin-FITC.

Como los grupos carboxilo de los dendrímeros PAMAM G4.5 no pueden unirse directamente a FITC, se procedió a hacer síntesis orgánica empleando una molécula “linker”, piperacina *N*-monoprotégida. Esta molécula tiene la particularidad de ser

bifuncional: presenta dos grupos amino, uno libre y otro *N*-monoprotegido (**Figura 22**). Los dendrímeros van a interactuar primeramente con el grupo amino libre de la piperacina, para luego en una segunda etapa, unirse al FITC a través del segundo grupo amino. Al cabo de la primera reacción covalente de los dendrímeros PAMAM G4.5 con la piperacina *N*-monoprotegida, caracterizamos los dendrímeros PAMAM G4.5-piperacinil-Boc (producto intermediario) por RMN, encontrándose que se unieron dos moléculas de piperacina *N*-monoprotegida por dendrímero. Al cabo de esta primera reacción, se procedió a desproteger el grupo amino de la piperacina *N*-monoprotegida, quedando el grupo amino libre para la conjugación con FITC. El nanosistema obtenido, dendrímero PAMAM G4.5-piperacinil-FITC, fue caracterizado por RMN, encontrándose una estequiometría de dos moléculas de FITC por molécula de dendrímero. El análisis por DLS y potencial z mostraron que este nanosistema presentó tamaño nanométrico ( $96,3 \pm 1,4$  nm) y carga negativa ( $-19,52 \pm 0,16$  mV). Se midió también el índice de polidispersión (Pdl) del nanosistema, este índice es una medida de la distribución de tamaños (Pdl, un valor que está entre 0 y 1). Un Pdl de 0 indica un monodispersión ideal de la formulación mientras que un Pdl de 1 demuestra grandes variaciones en el tamaño de las partículas <sup>48</sup>. El índice de polidispersión obtenido fue cercano a 0 ( $0,0296 \pm 0,02$ ), por lo tanto el nanosistema resultó tener una distribución de tamaños monodispersa.

Kitchens y colaboradores estudiaron la captación de dendrímeros PAMAM de media generación (G1.5-G3.5) en células Caco-2, y para ello procedieron a marcar los dendrímeros con FITC. Estos investigadores emplearon una técnica de marcación con FITC similar a la empleada en este trabajo, con la diferencia que en lugar de usar piperacina como molécula “linker”, emplearon etilendiamina. Las razones molares de EDC: dendrímero y de etilendiamina: dendrímero fueron distintas a las empleadas en este trabajo (ver sección 3.3). Cabe destacar que los tiempos de incubación con EDC primero y con la molécula “linker” después, fueron similares. Al igual que en este trabajo, la incubación de los dendrímeros con FITC se hizo “overnight” <sup>49</sup>.

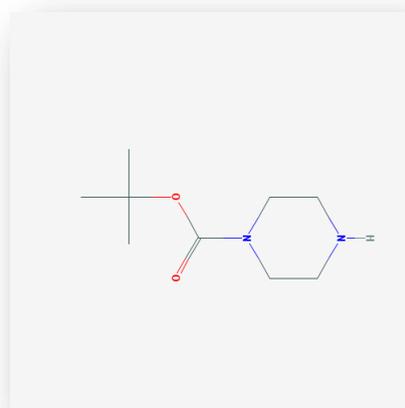


Figura 20: Estructura de la molécula “linker”, Piperacina-Boc, empleada para conjugar FITC a los dendrímeros PAMAM G4.5 <sup>50</sup>.

### 5.3.1. Captación *in vitro* e *in vivo* de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacini-FITC

Se realizaron experimentos *in vitro* de citotoxicidad y de captación de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacini-FITC en células 4T1. No se encontró citotoxicidad por parte del nanosistema desarrollado y se observó captación por parte de los mismos en células 4T1 (**Figuras 14 y 15**). Es importante resaltar, que no hemos encontrado en la literatura especializada ningún resultado *in vitro* relacionado con la captación de dendrímeros PAMAM G4.5 (marcados con fluoróforos) en líneas celulares. Sin embargo, como fue mencionado en la sección 5.3, Kitchens y colaboradores estudiaron la captación de dendrímeros PAMAM de media generación (G1.5-G3.5) derivatizados con FITC, en células Caco-2 <sup>49</sup>.

Nuestro trabajo también es pionero en el estudio de la captación de los dendrímeros PAMAM G4.5 a nivel tumoral. Este estudio se realizó por imagenología de fluorescencia a través de la inyección intravenosa de dendrímeros PAMAM G4.5-piperacini-FITC en ratones BALB/c con tumor mamario inducido. A las 24 h post-inyección, algunos órganos característicos fueron extirpados y se realizaron imágenes *ex vivo* de estos órganos. Como se discutió en la sección 5.1, las propiedades farmacocinéticas de los dendrímeros dependen de la generación dendrímica y del carácter de los grupos funcionales. Los dendrímeros PAMAM G4.5-piperacini-FITC presentaron captación a nivel tumoral y eliminación por el sistema renal (**Figura 15**). Cierta captación hepática pudo observarse a partir de las imágenes *ex vivo* de ratones BALB/c con tumor mamario (**Figura 15**).

Sería posible utilizar los dendrímeros PAMAM G4.5-piperacina-Boc (dendrímeros conjugados a la molécula “linker”) para obtener imágenes de fluorescencia del tumor *in vivo*. En este caso, sería necesario marcar dichos dendrímeros con fluoróforos que operen en la región del infrarrojo cercano (fluoróforos NIR) del espectro electromagnético<sup>51</sup>. La baja absorción de la luz que exhiben los tejidos en esta ventana espectral, hace posible que atravesase varios centímetros<sup>51</sup>. En nuestro caso, la señal de fluorescencia emitida por el FITC, no puede atravesar la piel y pelos del ratón, y por lo tanto no puede ser detectada. Younghoom y colaboradores acoplaron los fluoróforos Cy3 o Cy5 a dendrímeros PAMAM G5 y G6, como agentes de imagenología<sup>52</sup>. Uno de los objetivos fundamentales del presente trabajo, era verificar que el nanosistema desarrollado era capaz de ingresar en las células tumorales y ser captado por el tumor. Con el nanosistema dendrímico PAMAM G4.5-piperacini-FITC estos objetivos fueron cumplidos. No se pudo desarrollar un nanosistema para poder obtener imágenes del tumor *in vivo*, ya que se contaba únicamente con el fluoróforo FITC. Tavassolian y colaboradores, encapsularon 6-cumarina en nanopartículas de poli(l-γ-glutamil-glutamina) para investigar la captación de las mismas en el modelo de tumor mamario murino inducido con células 4T1 por imagenología de fluorescencia *in vivo* y *ex vivo*<sup>53</sup>.

Los resultados obtenidos con las líneas celulares tumorales y las imágenes *ex vivo*, sugieren fuertemente que el nanosistema ingresa a las células de los tejidos tumorales. La prueba definitiva de esto, sería realizar cortes histológicos del tumor y su estudio

por microscopia láser confocal, de ratones con tumor inyectados con el nanosistema (como se hizo en el caso de dendrímeros PAMAM G4-FITC).

#### 5.4. Encapsulación de DTX en dendrímeros PAMAM G4.5 y caracterización fisicoquímica de dendrímeros PAMAM G4.5-DTX.

El DTX se encapsuló en dendrímeros PAMAM G4.5, se cuantificó el DTX encapsulado, y calculó la relación de moléculas de DTX por dendrímero.

Con el fin de investigar los cambios estructurales del nanosistema PAMAM G4.5-DTX, se empleó espectroscopía infrarroja de forma de caracterizar la interacción entre los dendrímeros PAMAM G4.5 y DTX (**Figuras 18**). Se encontró la presencia de interacciones hidrofóbicas entre el DTX y los grupos funcionales en el interior de los dendrímeros PAMAM G4.5. Este resultado confirma que el docetaxel se encuentra encapsulado en estos dendrímeros. Este resultado coincide con lo obtenido por Prieto y colaboradores, que estudiaron la interacción de los dendrímeros PAMAM G4.5 con el antipsicótico Risperidona<sup>34</sup>.

##### 5.4.1. Estudio de la eficacia antitumoral de dendrímeros PAMAM G4.5-DTX.

Se evaluó comparativamente la eficacia antitumoral *in vitro* de los dendrímeros PAMAM G4.5-DTX respecto al DTX no encapsulado, no encontrándose diferencias significativas en la acción antitumoral de los tratamientos en ambas líneas celulares de tumor mamario (4T1 y MDA-MB-231) (**Figura 19**). Este resultado coincide con el observado en otros trabajos con nanopartículas con DTX encapsulado. Ostacolo y colaboradores, los cuales encapsularon DTX en micelas basadas en copolímeros, encontraron que el DTX encapsulado indujo muerte celular y que fue similar a la del DTX. Este estudio fue realizado en las líneas celulares humanas de cáncer de próstata, DU145 y PC3, y de cáncer de mama, MDA-MB-468 y MCF-7<sup>54</sup>. Otros autores estudiaron comparativamente la acción antitumoral *in vitro* de nanopartículas de polietilenglicol-policaprolactona (mPEG-PCL) con DTX y Taxotere® en una línea celular de hepatocarcinoma, H22. Los mismos encontraron una actividad antitumoral similar del DTX encapsulado en comparación con Taxotere®, concluyendo que luego de la encapsulación en nanopartículas, el DTX mantuvo su actividad farmacológica<sup>16</sup>.

También fue evaluada la citotoxicidad del DTX y de los dendrímeros PAMAM G4.5-DTX en la línea celular de fibroblastos normales (BJ), encontrándose que tanto el DTX como el G4.5-DTX resultaron ser citotóxicos. Sin embargo, a 100 µM de concentración de DTX, se encontró una diferencia significativa en la citotoxicidad. El DTX resultó ser más citotóxico a esta concentración que los dendrímeros PAMAM G4.5-DTX (**Figura 19**). Este resultado indica que el nanosistema desarrollado presenta efecto antitumoral, que es funcional, y menos tóxico en células normales que en tumorales.

Hay pocos estudios realizados con dendrímeros PAMAM G4.5, ya sea respecto a la caracterización de su ingreso a las células (como fue mencionado en las secciones anteriores de la discusión) o de encapsulación o conjugación de fármacos. Un estudio realizado con dendrímeros PAMAM de media generación como vehículos de la droga antitumoral cisplatino, incluyendo los dendrímeros PAMAM G4.5, fue realizado. Los nanosistemas dendrímero-cisplatino fueron evaluados *in vitro* en tres líneas celulares de cáncer de ovario e *in vivo* en un modelo xenógrafo de cáncer de ovario. Se encontró que los dendrímeros-cisplatino tuvieron una eficacia antitumoral *in vitro* moderada y una eficacia antitumoral *in vivo* más alta que con dosis altas de cisplatino <sup>28</sup>. En un estudio reciente, se encapsuló Risperidona (droga antipsicótica) en estos dendrímeros. El nanosistema resultante fue evaluado en un modelo de zebrafish. Se analizaron los cambios morfológicos en el cerebro de larvas tratadas con Risperidona y dendrímeros-Risperidona. A diferencia de la Risperidona, que afectó significativamente la morfología de este órgano, los dendrímeros-Risperidona no mostraron causar ningún efecto sobre el mismo <sup>34</sup>. Otros estudios de encapsulación de fármacos con dendrímeros se han hecho, empleando dendrímeros de media generación y generaciones completas y la droga antidiurética, furosemide <sup>55</sup>.

## 6. Conclusiones

Los nanosistemas dendriméricos PAMAM G4-FITC fueron captados por células tumorales mamarias *in vitro* y por el tumor mamario *in vivo*. A diferencia de los dendrímeros PAMAM G4, los dendrímeros PAMAM G4.5 no mostraron ser citotóxicos a las concentraciones estudiadas. En base a estos resultados, estos últimos fueron empleados como nanovehículos de DTX para el posible tratamiento del cáncer de mama. De esta forma, se desarrolló primeramente un nanosistema dendrímero PAMAM G4.5-piperacilin-FITC, para evaluar su captación por células y tejido tumoral. Este nanosistema también fue captado por células tumorales mamarias *in vitro* y por el tumor mamario *in vivo*. Los dendrímeros PAMAM G4.5-DTX fueron caracterizados fisicoquímicamente y biológicamente en células tumorales y normales. El nanosistema dendrimérico resultó ser funcional, ya que presentó eficacia antitumoral en las líneas celulares de tumor mamario estudiadas. Si bien la eficacia antitumoral presentada por este nanosistema fue similar a la presentada por el DTX no encapsulado, el nanosistema resultó ser menos citotóxico que el DTX libre en células normales de fibroblastos. En conclusión, se pudo obtener un nanosistema dendrímero PAMAM G4.5-DTX con potencial uso para la entrega de DTX a tumores mamarios. Se requiere de estudios en modelos animales que demuestren una eficacia antitumoral mayor y/o una disminución de los efectos adversos, por parte de este nanosistema, en comparación con la formulación de DTX ya existente.

## 7. Perspectivas.

Como perspectiva de este trabajo está la de estudiar la eficacia antitumoral *in vivo* en un modelo xenógrafo de ratones “Nude” (ratones inmunodeprimidos) con tumor mamario inducido con células MDA-MB-231, que como se mencionó anteriormente son altamente metastásicas. La selección de este modelo xenógrafo, está basada en la capacidad metastásica de la línea celular MDA-MB-231 y a los trabajos en la literatura que emplean este modelo para estudios de eficacia antitumoral de DTX y nanopartículas asociadas a DTX. Como el proceso tumoral en estos animales ocurre a partir de un implante de células de tumor mamario humano, este modelo xenógrafo es considerado de relevancia clínica<sup>56</sup>. Este punto es parte de un proyecto financiado por la ANII. El protocolo de experimentación animal presentado a la comisión de ética del Instituto Pasteur de Montevideo, fue recientemente aprobado. Se evaluará el tamaño de tumor y la sobrevida en cuatro grupos de animales: DTX, dendrímeros PAMAM G4.5-DTX, dendrímeros PAMAM G4.5 y control salino. Por otro lado se analizará el índice de apoptosis en cortes histológicos provenientes de tumores de animales tratados y se evaluará la toxicidad sistémica a partir de muestras de sangre. Como resultado se espera obtener una mayor eficacia antitumoral por parte del nanosistema dendrímero PAMAM G4.5-DTX en comparación con el DTX libre. Se espera también una menor toxicidad sistémica por parte de este nanosistema en los ratones.

Otra perspectiva interesante, sería la de desarrollar un nanosistema compuesto por DTX encapsulado en dendrímeros PAMAM G4.5 marcado con un fluoróforo que permita la obtención de imágenes *in vivo*. De esta forma, con el mismo nanosistema podría realizarse tratamiento y control por imagenología del nanosistema acumulado en el tumor. Este nanosistema actuaría como un agente teragnóstico (de terapia y diagnóstico).

## 8. Bibliografía

1. Hamelinck, V. C. *et al.* Patients' preferences for surgical and adjuvant systemic treatment in early breast cancer: A systematic review. *Cancer Treat. Rev.* **40**, 1005–1018 (2014).
2. Ban, K. a & Godellas, C. V. Epidemiology of breast cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **23**, 409–22 (2014).
3. Mcpherson, K., Steel, C. M. & Dixon, J. M. Breast cancer — epidemiology , risk factors , and genetics Risk factors for breast cancer. **321**, (2000).
4. Comisión Honoraria de Lucha contra el cáncer. EN RELACION AL CANCER. Mayo 22014. (2014).

5. Frebourg, T. *et al.* Germ-Line p53 Mutations in Li-Fraumeni Syndrome Families with. 608–615 (1995).
6. Li, S., Rong, M. & Iacopetta, B. DNA hypermethylation in breast cancer and its association with clinicopathological features. *Cancer Lett.* **237**, 272–280 (2006).
7. Chen, L. *et al.* Rejection of metastatic 4T1 breast cancer by attenuation of Treg cells in combination with immune stimulation. *Mol. Ther.* **15**, 2194–2202 (2007).
8. Pulaski, B. a & Ostrand-Rosenberg, S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr. Protoc. Immunol.* **Chapter 20**, Unit 20.2 (2001).
9. Smith, M. C. P. CXCR4 Regulates Growth of Both Primary and Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res.* **64**, 8604–8612 (2004).
10. Van der Horst, E. H. *et al.* Metastatic properties and genomic amplification of the tyrosine kinase gene ACK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 15901–15906 (2005).
11. McGrogan, B. T., Gilmartin, B., Carney, D. N. & McCann, A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1785**, 96–132 (2008).
12. Puztai, L. & Hortobagyi, G. N. High-dose chemotherapy: how resistant is breast cancer? *Drug Resist. Updat.* **1**, 62–72 (1998).
13. Dawidczyk, C. M., Russell, L. M. & Searson, P. C. Nanomedicines for cancer therapy: state-of-the-art and limitations to pre-clinical studies that hinder future developments. *Front. Chem.* **2**, 69 (2014).
14. Liu, Q. *et al.* Enhanced antitumor efficacy, biodistribution and penetration of docetaxel-loaded biodegradable nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **430**, 350–8 (2012).
15. Tao, W. *et al.* Docetaxel-loaded nanoparticles based on star-shaped mannitol-core PLGA-TPGS diblock copolymer for breast cancer therapy. *Acta Biomater.* **9**, 8910–20 (2013).
16. Liu, Q. *et al.* Enhanced antitumor efficacy, biodistribution and penetration of docetaxel-loaded biodegradable nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **430**, 350–8 (2012).
17. Liu, B. *et al.* The antitumor effect of novel docetaxel-loaded thermosensitive micelles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **69**, 527–34 (2008).
18. Herbst, R. S. & Khuri, F. R. Mode of action of docetaxel – a basis for combination with novel anticancer agents. *Cancer Treat. Rev.* **29**, 407–415 (2003).

19. Ernsting, M. J. *et al.* A docetaxel-carboxymethylcellulose nanoparticle outperforms the approved taxane nanoformulation, Abraxane, in mouse tumor models with significant control of metastases. *J. Control. Release* **162**, 575–81 (2012).
20. Mugabe, C. *et al.* Development and *in vitro* characterization of paclitaxel and docetaxel loaded into hydrophobically derivatized hyperbranched polyglycerols. *Int. J. Pharm.* **404**, 238–49 (2011).
21. Zhang, L. & Zhang, N. How nanotechnology can enhance docetaxel therapy. *Int. J. Nanomedicine* **8**, 2927–41 (2013).
22. Luo, Y. *et al.* Docetaxel loaded oleic acid-coated hydroxyapatite nanoparticles enhance the docetaxel-induced apoptosis through activation of caspase-2 in androgen independent prostate cancer cells. *J. Control. Release* **147**, 278–88 (2010).
23. Tavassolian, F. *et al.* Targeted poly (L- $\gamma$ -glutamyl glutamine) nanoparticles of docetaxel against folate over-expressed breast cancer cells. *Int. J. Pharm.* **467**, 123–38 (2014).
24. Ma, M. *et al.* A novel lipid-based nanomicelle of docetaxel: evaluation of antitumor activity and biodistribution. *Int. J. Nanomedicine* **7**, 3389–98 (2012).
25. Szymanski, P., Markowicz, M. & Mikiciuk-Olasik, E. Nanotechnology in Pharmaceutical and Biomedical Applications: Dendrimers. *Nano* **06**, 509–539 (2011).
26. Carneiro, M. L. B. *et al.* Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer. *J. Nanobiotechnology* **11**, 4 (2013).
27. Medina, C., Santos-Martinez, M. J., Radomski, a, Corrigan, O. I. & Radomski, M. W. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br. J. Pharmacol.* **150**, 552–8 (2007).
28. Kirkpatrick, G. J., Plumb, J. a, Sutcliffe, O. B., Flint, D. J. & Wheate, N. J. Evaluation of anionic half generation 3.5-6.5 poly(amidoamine) dendrimers as delivery vehicles for the active component of the anticancer drug cisplatin. *J. Inorg. Biochem.* **105**, 1115–22 (2011).
29. Mcdonald, D. M. & Baluk, P. Significance of Blood Vessel Leakiness in Cancer Significance of Blood Vessel Leakiness in Cancer 1. 5381–5385 (2002).
30. Wijagkanalan, W., Kawakami, S. & Hashida, M. Designing dendrimers for drug delivery and imaging: Pharmacokinetic considerations. *Pharmaceutical Research* **28**, 1500–1519 (2011).

31. Patel, N. R., Pattni, B. S., Abouzeid, A. H. & Torchilin, V. P. Nanopreparations to overcome multidrug resistance in cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 1748–62 (2013).
32. Oliveira, J. M., Salgado, A. J., Sousa, N., Mano, J. F. & Reis, R. L. Dendrimers and derivatives as a potential therapeutic tool in regenerative medicine strategies—A review. *Prog. Polym. Sci.* **35**, 1163–1194 (2010).
33. Perumal, O. P., Inapagolla, R., Kannan, S. & Kannan, R. M. The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers. *Biomaterials* **29**, 3469–76 (2008).
34. Prieto, M. J. *et al.* Optimization and *in vivo* toxicity evaluation of G4.5 PAMAM dendrimer-risperidone complexes. *PLoS One* **9**, e90393 (2014).
35. Prieto, M. J., Temprana, C. F., del Río Zabala, N. E., Marotta, C. H. & Alonso, S. D. V. Optimization and *in vitro* toxicity evaluation of G4 PAMAM dendrimer-risperidone complexes. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 845–50 (2011).
36. Esfand, R. & Tomalia, D. a. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov. Today* **6**, 427–436 (2001).
37. Wolinsky, J. B. & Grinstaff, M. W. Therapeutic and diagnostic applications of dendrimers for cancer treatment. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1037–55 (2008).
38. Sadekar, S. & Ghandehari, H. Transepithelial transport and toxicity of PAMAM dendrimers: implications for oral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 571–88 (2012).
39. Gajbhiye, V. & Jain, N. K. The treatment of Glioblastoma Xenografts by surfactant conjugated dendritic nanoconjugates. *Biomaterials* **32**, 6213–25 (2011).
40. Oddone, N. *et al.* Cell uptake mechanisms of PAMAM G4-FITC dendrimer in human myometrial cells. *J. Nanoparticle Res.* **15**, 1776 (2013).
41. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **65**, 55–63 (1983).
42. Tassano, M. R. *et al.* Development of  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -dendrimer-FITC for cancer imaging. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 5598–601 (2011).
43. Kitchens, K. M., El-Sayed, M. E. H. & Ghandehari, H. Transepithelial and endothelial transport of poly (amidoamine) dendrimers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 2163–76 (2005).

44. Kolhe, P. Drug complexation, *in vitro* release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers. *Int. J. Pharm.* **259**, 143–160 (2003).
45. Seib, F. P., Jones, A. T. & Duncan, R. Comparison of the endocytic properties of linear and branched PEIs, and cationic PAMAM dendrimers in B16f10 melanoma cells. *J. Control. Release* **117**, 291–300 (2007).
46. Fröhlich, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **7**, 5577–91 (2012).
47. Ciolkowski, M. *et al.* Surface modification of PAMAM dendrimer improves its biocompatibility. *Nanomedicine* **8**, 815–7 (2012).
48. Ling, Y., Wei, K., Luo, Y., Gao, X. & Zhong, S. Dual docetaxel/superparamagnetic iron oxide loaded nanoparticles for both targeting magnetic resonance imaging and cancer therapy. *Biomaterials* **32**, 7139–50 (2011).
49. Kitchens, K. M., Kolhatkar, R. B., Swaan, P. W., Eddington, N. D. & Ghandehari, H. Transport of poly(amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers: Influence of size, charge and fluorescent labeling. *Pharm. Res.* **23**, 2818–26 (2006).
50. 1-Boc-piperazine @ pubchem.ncbi.nlm.nih.gov at <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Boc-piperazine#section=Top>>
51. Ntziachristos, V. Fluorescence molecular imaging. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **8**, 1–33 (2006).
52. Kim, Y., Kim, S. H., Tanyeri, M., Katzenellenbogen, J. a & Schroeder, C. M. Dendrimer probes for enhanced photostability and localization in fluorescence imaging. *Biophys. J.* **104**, 1566–75 (2013).
53. Tavassolian, F. *et al.* Targeted poly (L- $\gamma$ -glutamyl glutamine) nanoparticles of docetaxel against folate over-expressed breast cancer cells. *Int. J. Pharm.* **467**, 123–38 (2014).
54. Ostacolo, L. *et al.* *In vitro* anticancer activity of docetaxel-loaded micelles based on poly(ethylene oxide)-poly(epsilon-caprolactone) block copolymers: Do nanocarrier properties have a role? *J. Control. Release* **148**, 255–63 (2010).
55. Devarakonda, B., Otto, D. P., Judefeind, A., Hill, R. a & de Villiers, M. M. Effect of pH on the solubility and release of furosemide from polyamidoamine (PAMAM) dendrimer complexes. *Int. J. Pharm.* **345**, 142–53 (2007).
56. Kerbel, R. S. *et al.* Preclinical recapitulation of antiangiogenic drug clinical efficacies using models of early or late stage breast cancer metastasis. *Breast* **22 Suppl 2**, S57–65 (2013).

