



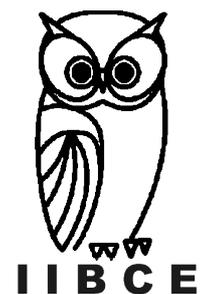
Facultad de Ciencias
Universidad de la República
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Pedeciba Biología

Maestría en Ciencias Biológicas

“Desarrollo, caracterización y estudio de nanosistemas dendriméricos como posibles radiofármacos para el tratamiento del cáncer.”

Lic. Marcos Tassano

Orientador: Dr. Juan. C. Benech



Tribunal:

Dr. Gustavo Folle (Presidente), Departamento de Genética, IIBCE.

Dr. José R. Sotelo, Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos, IIBCE.

Dr. Hugo Cerecetto, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, UdelaR.

Índice

| | |
|---|-----------|
| 1. RESUMEN..... | 4 |
| 2. ABREVIATURAS..... | 7 |
| 3. INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| 3.1 NANOTECNOLOGÍA Y APLICACIONES BIOMÉDICAS..... | 11 |
| 3.1.1 Diagnóstico..... | 12 |
| 3.1.2 Terapia..... | 12 |
| 3.2 CÁNCER, NANOTECNOLOGÍA Y RADIOFÁRMACOS..... | 13 |
| 3.3 DENDRÍMEROS..... | 14 |
| 3.3.1 Arquitectura y composición..... | 16 |
| 3.3.2 Interacciones dendrímero-membrana..... | 18 |
| 3.3.3 Grupos terminales y toxicidad..... | 20 |
| 3.3.4 Farmacocinética..... | 21 |
| 3.3.5 Los dendrímeros se acumulan pasivamente en los tumores..... | 22 |
| 3.3.6 Imagenología utilizando dendrímeros..... | 25 |
| 3.3.7 Incremento del área superficial relativa en dendrímeros..... | 27 |
| 3.3.8 Nanosistemas como radiofármacos para la terapia de tumores..... | 29 |
| 3.4 RADIOMETALES PARA TERAPIA..... | 32 |
| 3.4.1 Diferentes tipos de emisores beta..... | 33 |
| 3.4.2 Agentes bifuncionales para el marcado de moléculas con 186/188Re..... | 35 |
| 3.4.3 Agentes quelantes bifuncionales para el radiomarcado de moléculas con lantánidos..... | 37 |
| 3.5 ¿CÓMO LAS RADIACIONES IONIZANTES AFECTAN A LAS CÉLULAS?..... | 38 |
| 3.5.1 Los efectos biológicos difieren según el tipo de radiación..... | 40 |
| 3.6 LAS RADIACIONES PRODUCEN ABERRACIONES CROMOSÓMICAS..... | 41 |
| 3.6.1 Evaluación del daño cromosómico inducido por radiaciones ionizantes..... | 43 |
| 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 45 |
| 4.1 HIPÓTESIS..... | 46 |
| 4.2 OBJETIVO..... | 46 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 47 |
| 5.1 CONJUGADO Y MARCACIÓN DEL DENDRÍMERO CON 177LU..... | 48 |
| 5.2 CONJUGADO Y MARCACIÓN DEL DENDRÍMERO CON 188RE..... | 49 |
| 5.3 MODELO ANIMAL | 50 |
| 5.4 ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN | 51 |
| 5.5 ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS..... | 51 |
| 5.6 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LAS ABERRACIONES CROMOSÓMICAS (AC)..... | 53 |
| 6. RESULTADOS..... | 54 |
| 6.1 MARCACIÓN DEL DENDRÍMERO CON 177LU..... | 55 |
| 6.2 MARCACIÓN CON 188RE..... | 56 |
| 6.3 CONJUGACIÓN DEL DENDRÍMERO A HYNIC..... | 58 |
| 6.4 EVALUACIÓN BIOLÓGICA..... | 60 |
| 6.5 ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS..... | 63 |
| 6.6 IMÁGENES MICROSCÓPICAS DE LAS ABERRACIONES CROMOSÓMICAS..... | 64 |
| 7. DISCUSIÓN..... | 67 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA..... | 72 |
| 9. AGRADECIMIENTOS..... | 83 |
| 10. APÉNDICE..... | 84 |

1. Resumen

La nanotecnología ha tenido un alto impacto en el campo de la medicina en las últimas décadas y su aplicación en la toma de imágenes y en la terapia contra el cáncer es un nuevo campo en desarrollo.

Los dendrimeros son nanoestructuras poliméricas que poseen propiedades muy convenientes para utilizarlos como transporte de moléculas o radionucleidos, ya que pueden generar fácilmente uniones covalentes en su superficie manteniendo las propiedades “nano” del mismo. Estas propiedades permiten el transporte pasivo de estas estructuras a tejidos tumorales por el *Efecto de Permeabilidad y Retención*, acumulándose en altas proporciones en tumores.

El tratamiento de tumores sólidos con radiofármacos necesita de una dosis lo suficientemente alta para matar las células del tejido tumoral, minimizando el daño en tejidos sanos. Dos radionucleidos candidatos para el tratamiento de tumores sólidos son: a) Lutecio-177 el cual posee 3 emisiones beta (12% 0.176 MeV, 9% 0.384 MeV, y 79% 0.497 MeV) y dos emisiones gamma (6.4% 113 keV y 11% 208 keV) con una vida media de 6.75 días, y b) el Renio-188 que tiene una vida media de 16.98 horas con emisión beta de alta energía ($E_{max}=2.12$ MeV, 85% de abundancia) y fotones gamma de 155 KeV (15% de abundancia). Ambos radionucleidos permiten el tratamiento de tumores a través de sus emisiones beta, y a su vez las emisiones gammas permiten la visualización a través de imagenología. Combinando las propiedades “nano” de los dendrimeros y la capacidad de tratamiento y visualización de los radionucleidos es posible generar un nanosistema capaz de tratar eficazmente los tumores sólidos.

Un método eficaz para cuantificar el daño producto de radiaciones ionizantes en células, es a partir del análisis por microscopía de las aberraciones cromosómicas, mediante el cual se puede calcular la proporción de células que fueron afectadas por la radiación a determinada dosis.

El principal objetivo de este trabajo es el desarrollo, caracterización y estudio de nanosistemas dendriméricos como posibles radiofármacos para el tratamiento del cáncer. Para ello se obtuvo el dendrímero PAMAM (poliamidoamina) generación 4, marcado tanto con ^{177}Lu (rendimiento de marcado mayor al 98%) como con ^{188}Re (rendimiento de marcado 70%) caracterizados tanto química como físicamente. Ambos sistemas fueron estudiados biológicamente utilizando ratones C57 con un modelo tumoral de melanoma (B16F1). Las biodistribuciones tanto en el sistema con ^{177}Lu como con ^{188}Re demostraron una alta depuración sanguínea con alta captación hepática y eliminación renal. También se pudo comprobar una captación apreciable en el tumor (5% de la dosis inyectada).

Para el ensayo de daño celular de las radiaciones ionizantes, se desarrolló un sistema *in vitro* en el cual se disponen las células tumorales B16F1 en una placa de petri incubadas en conjunto con ^{188}Re -dendrímero (15 μCi [0.555 MBq] por 24 horas). Luego se procede a evaluar el daño a través de las aberraciones cromosómicas por microscopía. El ensayo control resultó en un 7% de

metafasas anormales, mientras que el tratado obtuvo un porcentaje de metafasas anormales de 29.50%, correspondiendo tanto a fragmentos (29.25%) como a intercambios (0.25%), confirmando el daño a nivel cromosómico. Por lo tanto se obtuvieron dos tipos de marcados radiactivos estables con emisores beta de nanoestructuras dendriméricas a los cuales se les realizaron estudios biológicos. Se logró un ensayo *in vitro* eficiente para medir de forma cuali- y cuantitativa el daño molecular resultante del tratamiento con un agente radiactivo beta (^{188}Re -dendrímico).

2. Abreviaturas

| | |
|----------|---|
| TFA | 2,2,2-acido trifluoroacético |
| HYNIC | Ácido 6-hidracinonicotínico |
| ACN | Acetonitrilo |
| DOTA | Ácido 1,4,7,10-tetraaza-ciclododecano- tetraacético |
| DTPA | Ácido dietilen triamino pentaacético |
| AC | Aberraciones cromosómicas |
| mAb | Anticuerpos monoclonales |
| EPR | Aumento de la permeabilidad y retención |
| HPLC | Cromatografía Líquida de Alta Performance |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DLS | Dispersión de luz dinámica |
| FDA | Food and Drug Administration |
| G0, G1.. | Generación 0, 1.. |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| AFM | Microscopía de fuerza atómica |
| PAMAM | Poliamidoamina |
| PPI | Polipropilenimina |
| PEG | Polietilenglicol |
| PEI | Polietilenimina |
| %DI | Porcentaje de la dosis inyectada |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| MRI | Resonancia magnética |
| RBE | Relación de eficacia biológica |
| DSB | Roturas doble cadena del ADN |

| | |
|-----------|--|
| Suc-HYNIC | succinimidil-hidrazino nicotinamida |
| BOC | tert-butiloxicarbonilo |
| TC | Tomografía computarizada |
| TCNB | Terapia por captura de neutrones de boro |
| SPECT/CT | Tomografía Computarizada por Emisión de Fotones Individuales |
| LET | Transferencia lineal de energía |
| TMS | Tetrametilsilano |
| UV | Ultravioleta |

3. Introducción

3.1 Nanotecnología y aplicaciones biomédicas

La nanomedicina es el uso de los materiales nanoestructurados en medicina para obtener efectos médicos únicos, incluyendo estructuras con dimensiones características de hasta 300 nanómetros (nm).

Por lo general la nanomedicina toma ventaja de dos fenómenos generales que ocurren a escala nano: transiciones en las propiedades físico-químicas y transiciones en las interacciones fisiológicas. Muchas de las primeras definiciones de nanotecnología empleaban un límite de hasta 100 nm, donde los efectos cuánticos están restringidos para las estructuras en el orden de las decenas de nanómetros [1, 2]. Sin embargo el comportamiento físico-químico único de estas estructuras también acontece en nanomateriales con escalas por encima de los 100 nm (ej. actualmente se investiga clínicamente el plasmón de resonancia en nanocápsulas de oro de 150 nm para terapia del cáncer [3]).

Muchos de los beneficios (y riesgos) de la nanomedicina están relacionados con las interacciones fisiológicas de estos nanomateriales. A nivel sistémico la biodisponibilidad de los fármacos se incrementa debido a una extensa área superficial relativa de las nanopartículas [4]. Por ejemplo la generación 4 de los dendrímeros PAMAM (poliamidoamina) posee 64 grupos superficiales los cuales pueden ser aprovechados para la unión de fármacos o radionucleidos aumentando significativamente la biodisponibilidad del fármaco, o la actividad específica del radionucleido. A nivel tisular, muchos productos nanomédicos utilizan el direccionamiento pasivo a los tumores a través de un efecto de permeabilidad y retención de las nanopartículas que extravasan los vasos anormales de los tumores [5]. A nivel celular, las nanopartículas pueden acumularse en el interior celular a través de diferentes vías dependiendo de las propiedades, y del tamaño de la nanopartícula [6]. Aunque el tamaño óptimo de internalización celular de los coloides de oro es 50 nm [7], los macrófagos pueden fagocitar nanopartículas de hasta 200 nm lo que conlleva a la retención de las mismas dificultando su biodisponibilidad [8].

3.1.1 Diagnóstico

Se han desarrollado nanopartículas con la intención de detectar etapas muy tempranas del crecimiento tumoral. Cuando las nanopartículas se unen a los tumores se liberan “biomarcadores”, por ejemplo péptidos. La idea general es que cada nanopartícula transporte un gran número de péptidos, por lo tanto aunque la etapa de crecimiento tumoral sea muy temprana se depositará una alta concentración de estos biomarcadores permitiendo la detección temprana [9].

Existe un método aún en desarrollo para la detección temprana de cáncer cerebral el cual utiliza nanopartículas magnéticas y la resonancia magnética nuclear (RMN). La nanopartícula magnética se une a las partículas en el sistema circulatorio llamadas microvesículas las cuales se originan en las células del cáncer de cerebro. Luego se utiliza RMN para detectar estas aglomeraciones de microvesículas-nanopartículas magnéticas, pudiendo generarse imágenes por RMN [10].

Los nanotubos de carbono y las nanopartículas de oro son usados como sensores para detectar proteínas que son indicativas del cáncer oral. Los ensayos han demostrado ser precisos en este tipo de cáncer incluso luego de 1 hora de administrados [11].

3.1.2 Terapia

Se han utilizado nanopartículas de bismuto con el objetivo de concentrar radiación en el tratamiento del cáncer. Los resultados iniciales indican que las nanopartículas de bismuto incrementarían las dosis radioactivas en el tumor en un 90% [12].

Nanopartículas compuestas de polietilenglicol combinadas con cadenas de carbono hidrófilos (PEG-HCC) mostraron ser absorbentes de radicales libres a una tasa mucho mayor que la realizada por las proteínas dedicadas a esta función. Estas nanopartículas pueden ser utilizadas para reducir el daño generado por la liberación de radicales libres luego de un tratamiento radioactivo al cerebro [13].

Por otro lado, se está desarrollando la terapia con calor dirigido, de manera de destruir los tumores de cáncer de mama. En este método, ciertos anticuerpos unidos a nanotubos son atraídos fuertemente a las proteínas producidas en un tipo de célula de cáncer de mama, causando que los nanotubos se acumulen en el tumor. La luz

infrarroja de un láser es absorbida por los nanotubos y produce calor que incinera el tumor.

3.2 Cáncer, nanotecnología y radiofármacos

En el mundo se reportan más de 12 millones de casos de cáncer y 7.6 millones de muertes por cáncer cada año. Para el 2050, la incidencia de cáncer esperada será de 27 millones, y la mortalidad por cáncer será 17.5 millones [14]. El cáncer exhibe un crecimiento celular incrementado con la habilidad de las células de transportarse e invadir otras regiones del cuerpo.

En las últimas décadas el progreso tanto en biología molecular y en el entendimiento de la transformación maligna y la tumorigénesis ha llevado al planteamiento de 2 tipos de terapias principales: 1) La aplicación de terapias molecularmente dirigidas para bloquear características propias del cáncer, y 2) El empleo de sistemas de entrega de drogas a través de nanocompuestos dirigidos al tumor que incrementan la farmacocinética y biodisponibilidad. Desde 1980 al 2005, un total de 205 anticuerpos monoclonales (mAb) fueron ensayados clínicamente [15-17]. La FDA (Food and Drug Administration) aprobó el primer mAb anti-CD20 (Rituximab) para el tratamiento del linfoma no-Hodkin en 1997. Hasta el 2010, 12 de este tipo de moléculas dirigidas han sido aprobadas en el mundo [16-17].

Los fármacos convencionales para combatir el cáncer presentan falta de especificidad, pobre solubilidad y distribución, farmacocinética desfavorable y una alta tasa de daño en tejidos normales. Se han desarrollado sistemas de suministro de fármacos como el direccionamiento activo y pasivo de nanocompuestos con diámetros entre 10 y 100 nm, lo cual ha contribuido a mejorar las características farmacológicas, la biodistribución y la toxicidad de agentes usados tanto en diagnóstico como en terapia del cáncer [18-21]. La nanotecnología en el cáncer se espera que transforme los actuales sistemas de tratamiento ofreciendo una mayor eficiencia tanto a nivel diagnóstico como terapéutico. Hoy en día los nanocompuestos son utilizados en detectar el cáncer en etapas tempranas, llevando drogas específicamente a los tumores [20-21]. Fueron aprobados por la FDA dos sistemas terapéuticos; liposomas y un tipo

de nanopartícula de albúmina [19, 22]. Como los nanocarriers son evaluados en términos de eficiencia y seguridad, la nanotecnología brindará avances significativos en imagenología molecular y terapéutica específica de tumores, elevando la eficiencia y finalmente llegando al objetivo de la detección temprana y control del cáncer.

Las construcciones a nanoescala pueden funcionar como vehículos de liberación de grandes dosis de radiación o como agentes quimioterapéuticos para las células malignas, disminuyendo la liberación en tejidos normales, lo cual reduce los efectos secundarios que usualmente son muy notorios en las terapéuticas utilizadas en la actualidad.

3.3 Dendrímeros

Los dendrímeros son moléculas poliméricas, versátiles, tridimensionales y con forma bien definida, tamaño nanoscópico y con propiedades físico-químicas similares a las de las biomoléculas. Los dendrímeros han recibido una gran atención en los últimos años debido a su posible utilización en aplicaciones tan variadas como catálisis a nanoescala, encapsulación de moléculas, agentes de diagnóstico y también como vehículos para el transporte de fármacos.

Las estructuras dendríticas, caracterizadas por poseer subunidades hiper-ramificadas, poseen una amplia distribución en la naturaleza. De hecho, el término dendrímero proviene de las palabras griegas “dendron” que significa árbol, y el sufijo “meros” que significa “segmento” [23]. A modo de comparación, las similitudes con macromoléculas dendriméricas se ilustran con un árbol, donde las hojas se encuentran en un andamio altamente ramificado para maximizar su accesibilidad al mundo exterior optimizando funciones tales como la recolección de la luz. De manera similar, el núcleo interior encapsulado dentro de un dendrímero puede proporcionar un microambiente protegido con propiedades químicas y reactividades diferentes a su región externa [24].

Los dendrímeros (PAMAM) están constituidos de unidades sintéticas de poliamidoamina. Una característica básica de estas moléculas es su composición en capas (conocidas como generaciones) [Figura 1].

La morfología exacta de los dendrímeros depende tanto de su composición química como del número de generación, como por ejemplo los PAMAM de baja generación (G0, G1) que tienen formas muy asimétricas y poseen estructuras abiertas en comparación con los PAMAM de mayor generación con estructuras de formas globulares. Estas estructuras pueden progresar a geometrías esféricas, asumiendo estructuras globulares con una reducción significativa en el volumen hidrodinámico [25].

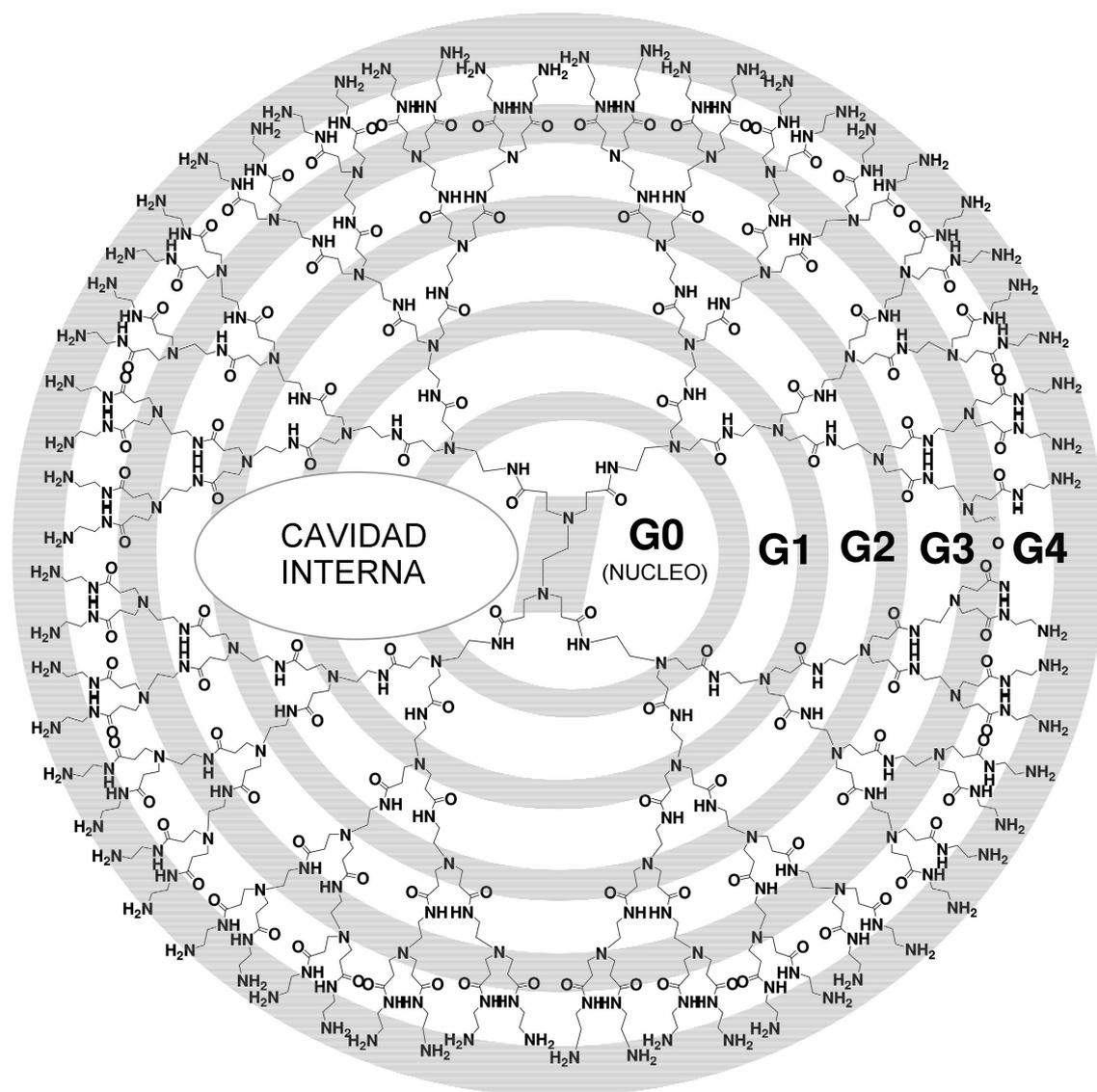


Figura 1. Representación esquemática de un dendrímero generación 4 con 64 grupos amino en su periferia. La periferia de las sucesivas generaciones se marca con círculos grises. Se muestra también la formación de las cavidades internas (tomado y modificado del libro: Dendrimers in Cancer Treatment and Diagnosis Srinivasa-Gopalan Sampathkumar, and Kevin J. Yarema, 2007).

3.3.1 Arquitectura y composición

Los dendrímeros se sintetizan con un alto grado de control, que por lo general no se observa en la mayoría de los polímeros lineales, lo cual conlleva a la monodispersidad de tamaño. Los dendrímeros se sintetizan habitualmente por una de dos estrategias: a) a partir de un núcleo central hacia el exterior, en un proceso conocido como el método divergente, descrito por Tomalia y Newkome [26-27] o, b) preparados por el método convergente de Fréchet por el cual el dendrímero se sintetiza a partir de la periferia hacia el interior terminando en el núcleo. Las unidades de ramificación se describen como generación, a partir del núcleo central ramificado, generación 0 (G0), y aumenta con cada adición sucesiva de puntos (es decir, G1, G2, etc) que se ramifican. Los dendrímeros son caracterizados por su generación terminal, de tal manera que un G5 se refiere a un polímero con cuatro generaciones de puntos ramificados que emana de un núcleo central. Con cada generación sucesiva, el número de grupos terminales aumenta exponencialmente [Tabla 1].

| Generación | Peso molecular (Dalton) | Diámetro (Angstrom) | Grupos de superficie (-NH ₂) |
|------------|----------------------------|------------------------|---|
| 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 |
| G11 | 1869780 | 167 | 8192 |

Tabla. 1. Características de dendrímeros PAMAM, generación por generación.

Las macromoléculas dendríticas tienden a aumentar de diámetro linealmente y adoptar una forma cada vez más globular al aumentar la generación del dendrímero. Como consecuencia de ello, los dendrímeros se han convertido en un candidato ideal para el estudio explícito de los efectos del tamaño del polímero, la carga, y composición de las propiedades biológicamente relevantes como la interacción con la bicapa lipídica, citotoxicidad, internalización, tiempo de retención en plasma sanguíneo, biodistribución y filtración. La mayoría de los estudios se han realizado sobre la modificación de dendrímeros poliamidoamina (PAMAM), en parte porque las generaciones PAMAM 0 hasta 10 (G0-G10) están disponibles comercialmente con un gran número de grupos periféricos (4 a 4096), diferentes tipos de grupos funcionales terminales (por ejemplo, amina, ácido carboxílico, hidroxilo) y pesos moleculares (de 657 a 935.000 g/mol). Los grupos superficiales de aminas (catiónicas) poseen ventajas para su unión a otras moléculas ya que las aminas son muy reactivas y forman fácilmente enlaces covalentes. Otras moléculas dendríticas en investigación activa incluyen polipropilenoimina, poliglicerol-coácidosuccínico, poli-L-lisina, poliglicerol, poli2,2-bis(hidroximetil)propiónico y dendrímeros de melamina [Figura 2]. Todos estos dendrímeros representan una colección de macromoléculas que poseen estructuras químicas y propiedades variadas (por ejemplo, basicidad, capacidad de unión, carga, etc.) las cuales pueden ser manipuladas aumentando la generación o modificando los grupos de superficie.

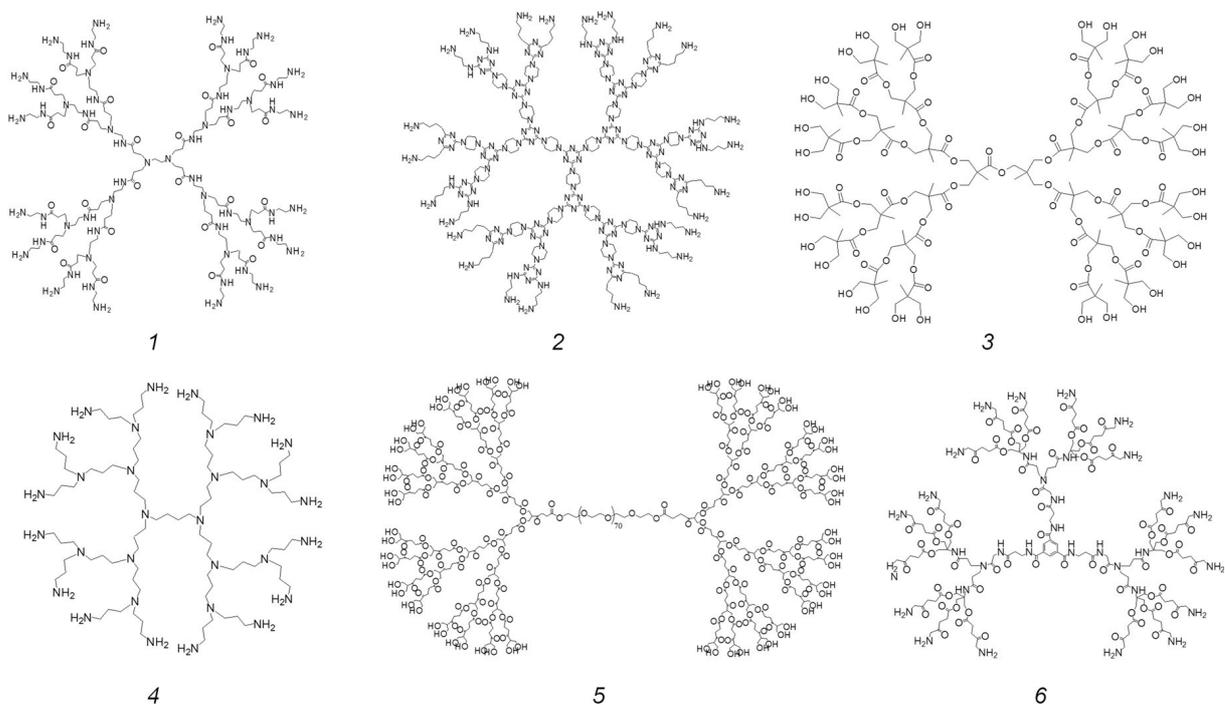


Figura 2. Estructuras dendríticas utilizadas en terapias de cáncer. (1) PAMAM, (2) basados en melamina, (3) ácido-2,2-bis(hidroximetil)propiónico, (4) PPI, (5) dendrímtero basado en glicerol y ácido succínico con un núcleo de PEG, y (6) ácido-5-aminolevulínico.

3.3.2 Interacciones dendrímtero-membrana

Estudios previos han demostrado que las grandes macromoléculas catiónicas pueden desestabilizar las membranas celulares para facilitar el transporte de biomoléculas al interior celular [28, 29]. Estos estudios examinaron las interacciones entre los polímeros cargados positivamente con lípidos vesiculares y células cultivadas. Los grupos de Banaszak y Baker realizaron un estudio mecanicista sobre los efectos de tamaño, carga y funcionalidad. Por primera vez, las interacciones dendrímtero-bicapa lipídica se observaron directamente con técnicas que incluyen la microscopía de fuerza atómica (AFM), dispersión de luz dinámica (DLS) y RMN ^{31}P . Los dendrímteros PAMAM G7 (~ 8 nm de diámetro) con amina o carboxilato como grupos periféricos, forman agujeros de 15-40 nm en modelos de fosfolípidos de membrana (bicapas de 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina) [30]. Existe una construcción de dendrímteros llamada tectodendrímteros, que consiste en macromoléculas construidas de forma tal que de 10 a 12 dendrímteros G5 con carboxilato como grupo terminal se unen

covalentemente a un dendrímero G7 con terminal amina que sirve de núcleo o punto de unión (~ 28 nm de diámetro según lo informado por el grupo de Tomalia [31]). Lo sorprendente es que no produjo como resultado la formación de huecos, lo que indica que la carga no es el único factor resultante en la disrupción de la membrana.

El papel del tamaño y la carga en la disrupción de la bicapa lipídica fue analizado utilizando dendrímeros PAMAM G3, G5 y G7 con terminales aminas cargados positivamente, o terminales acetamida con carga neutra. Tanto el dendrímero G7 cargado positivamente como los dendrímeros acetamida G7 formaron agujeros en la membrana. Los dendrímeros de amina G5 mostraron una disminución significativa de la capacidad para eliminar las moléculas de lípidos de la bicapa, participando predominantemente en el aumento de las deformidades ya existentes, mientras que los G3 aminas, G3 acetamida y G5 acetamida no mostraron propensión a participar en la formación de huecos.

Aunque la permeabilidad de la membrana puede desempeñar un papel importante en la captación celular de ciertos dendrímeros, los modos convencionales de internalización endocítica se atribuyen a la absorción de muchos dendrímeros. El grupo de Duncan [32] examinó el efecto de la estructura en la tasa y mecanismo de captación celular de PEI (polietilenimina) lineales y ramificados, y dendrímeros PAMAM (G2, G3, y G4). Se evaluaron la unión, captura endocítica y tráfico intracelular mediante la conjugación de Oregon green a los polímeros. Los tres polímeros se internalizan a través de una absorción vía endocitosis por células de melanoma B16F10. El dendrímero PAMAM G4 mostró la mayor tasa de absorción, siendo bastante menores las correspondientes a PEI ramificados, PEI lineales y PAMAM G3. Recientemente en 2 trabajos en los cuales colaboré se demostró la internalización de los dendrímeros PAMAM G4 [trabajos adjuntos en material suplementario]. En el primero de ellos los dendrímeros PAMAM G4 fueron unidos covalentemente a FITC como fluoróforo, y se demostró la internalización en las células de un tumor murino inducido con la línea celular B16F1 (melanoma murino) [33, ver apéndice]. Cabe destacar que el trabajo se realizó *in vivo* demostrándose el potencial de los dendrímeros como transporte de fármacos o radionucleidos. En el segundo trabajo, se demostró la internalización y localización celular de los dendrímeros G4-FITC en células miometriales humanas, llegando incluso por medio de electroporación al núcleo celular [34, ver apéndice].

3.3.3 Grupos terminales y toxicidad

Varios grupos han demostrado que la toxicidad celular se correlaciona con la funcionalidad del grupo superficial del dendrímero. Los grupos positivamente cargados tales como las aminas generalmente demuestran (dependiendo de la dosis) toxicidad; por esta razón, los grupos cargados positivamente por lo general se enmascaran con moléculas neutras tales como acetilo y grupos glicerilo [35, 36]. Recientes estudios han ampliado la investigación de los grupos terminales. Fuchs et. al. [37] examinó el impacto de la funcionalidad periférica sobre la citotoxicidad de las células MCF-7 (células cancerosas de mama) *in vitro* utilizando bajas generaciones de polímeros de poliamidoamina (G0, G1 y G2). En general, la mayor parte de los materiales cargados positivamente fueron en alguna medida citotóxicos dependiendo de la dosis, pero no todos, incluidos los dendrímeros diaminopropiónicos. La estructura de la base del dendrímero no parece tener una influencia sobre la toxicidad de estas macromoléculas de baja generación.

En otro estudio realizado por el laboratorio de Simanek [38] sobre el efecto de los grupos de superficie de dendrímeros de melamina no modificados sobre la citotoxicidad, la hemólisis y toxicidad aguda *in vivo* demostraron una tendencia hemolítica. Para mejorar la biocompatibilidad de estos polímeros, se protegieron las aminas superficiales con Boc, carboxilato, sulfonato, fosfonato y polietilenglicol. Se añaden por separado a los glóbulos rojos de la sangre y se supervisa la toxicidad aguda y la hemólisis. Los grupos aminas con carga positiva demostraron actividad hemolítica dependiente de dosis y tiempo. Los sulfonatos cargados negativamente, fosfonatos y carboxilatos condujeron a la hemólisis sólo a concentraciones altas (~1 mg/ml) en tanto la melamina PEGilada mostró una actividad hemolítica mínima. Los dendrímeros de melamina PEGilados fueron elegidos como candidatos a vehículos de entrega de drogas. Se inyectan en ratones C3H machos para evaluar la toxicidad *in vivo*, comparándolos con dendrímeros G3 de melamina no modificados. Los dendrímeros PEGilados no fueron citotóxicos, como se evidencia en los aumentos insignificantes en los niveles de enzimas en el hígado. Los niveles de nitrógeno ureico en sangre permanecieron normales para todas las concentraciones de dendrímero, mientras que los niveles de alanina transaminasa indican normalidad en la función del

hígado tanto a 10 mg/kg para dosis agudas y 2,5 mg/kg para esquemas de dosificación subcrónica. Estos resultados son consistentes con investigaciones anteriores de toxicidad para dendrímeros PAMAM donde se demostró que G3-PAMAM se tolera bien *in vivo* a 2,6 mg/kg durante 7 días, 30 días y 6 meses después de la exposición [39]. Los dendrímeros PAMAM G4 demostraron no ser tóxicos en las dosis utilizadas para los estudios de biodistribución y/o internalización celular [33, 34, ver apéndice].

3.3.4 Farmacocinética

El tiempo de circulación, la captación en los órganos, y la acumulación en el tumor son todos factores críticos para la eficacia *in vivo* de un sistema de entrega polimérico. Como tal, la farmacocinética debe ser entendida como una función de la composición del dendrímero, la generación y la arquitectura. Los grupos de Fréchet y Szoka investigaron la farmacocinética de los dendrímeros basados en polietilenglicol y ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico con diferentes pesos moleculares y números de cadena, para determinar el efecto del peso molecular y la arquitectura [40]. Los polímeros se componen por un lado de G3 con terminaciones hidroxilo, y G1, G2 o G3 con cadenas PEG de pesos moleculares: 5000, 10.000 y 20.000 Da. Todas las estructuras, independientemente de su peso molecular, demostraron un mínimo de citotoxicidad en células de cáncer de mama MDA-MB231. Los estudios de biodistribución con dendrímeros PEGilados marcados con ¹²⁵I mostraron varias tendencias cuando fueron inyectados en ratones CD-1. Los dendrímeros G3 con pesos moleculares de aproximadamente 45.000, 85.000 y 165.000 Da (PEGilados con 8 cadenas por molécula; PEG5000, PEG10000 y PEG20000) obtuvieron tiempos de circulación largos, con una semivida de eliminación de 31, 40 y 50 h, respectivamente. Menos de 4% de estos polímeros fueron excretados por la orina durante 48 h, con 7 a 16% excretado por las heces durante el mismo lapso. La circulación del dendrímero [G2]-(PEG)4-[G3]-(OH)8 fue significativamente más rápida, con pesos moleculares \approx 45.000 y 85.000 (PEG10000 y PEG20000, respectivamente) mostraron vidas medias de 26 y 25 h, mientras que el peso molecular de 23000 tuvo una vida media menor de 11 h. Este resultado era de esperar ya que el tamaño máximo de filtración renal para PEG lineales es entre 30000 a 40000 Da [41]. Se observó un comportamiento

dependiente de la arquitectura, donde el número de macromoléculas PEG unidas influye dramáticamente en el tiempo de circulación. El polímero [G1]-(PEG20k)₂-[G3]-(OH)₈ de 44.000 Da tiene una vida media de 1.5 h, mientras que un polímero [G3]-(PEG5K)₈-[G3]-(OH)₈ de similar peso molecular tiene una vida media de 31 h. Las dos macromoléculas más grandes [G3]-(PEG10k)₈-[G3]-(OH)₈ y [G3]-(PEG20k)₈-[G3]-(OH)₈ se inyectaron por vía intravenosa a ratones C57BL6 portadores de tumores (previamente inoculados por vía subcutánea con células de melanoma B16F10). Ambos polímeros mostraron características de biodistribución similares, con niveles altos en los tumores (10% a 15%) y la sangre (18% al 20%) a las 48 h. Las características de biodistribución de dendrímeros de aminoácidos G₄, G₅, G₆ en base a polilisina o poliornitina, y sus derivados PEGilados, fueron reportados por Okuda et al. [42]. La PEGilación de los dendrímeros tiene notables características diferentes de biodistribución que su equivalente no modificado. Los dendrímeros no pegilados G₄, G₅, G₆ fueron eliminados de la circulación en minutos después de la inyección, con acumulación principalmente en el hígado y los riñones en ratones normales. La acumulación hepática aumentó en correlación con polímeros de altas generaciones. Incrementos similares se observaron en dendrímeros con carga positiva, mientras que la acumulación renal disminuye. Se evaluó la biodistribución de los dendrímeros G₅ PAMAM no modificados (cargados positivamente) y acetilados, ambos marcados radiactivamente con ³H en modelos de tumor de próstata y melanoma (DU145, B16). Los dos dendrímeros mostraron distribuciones no específicas con rápida eliminación de la sangre dentro de las 24 h después de la inyección [43]. Biodistribuciones realizadas en tiempos largos (12 semanas) en ratones no portadores de tumor, no mostraron efectos nocivos. La rápida eliminación es particularmente importante cuando se utilizan los dendrímeros como transportadores de drogas o radionucleidos para el tratamiento de procesos tumorales ya que el daño colateral disminuye.

3.3.5 Los dendrímeros se acumulan pasivamente en los tumores

El “efecto EPR” (aumento de la permeabilidad y retención) se basa en las características fisiopatológicas únicas de los tumores sólidos. Cuando la masa tumoral

alcanza un tamaño de 2-3 mm, comienza la inducción del proceso de angiogénesis para satisfacer la mayor demanda de oxígeno y nutrientes. Todo esto resulta en la hiper-vascularización, drenaje linfático limitado y aumento de la permeabilidad a los lípidos y macromoléculas. Estas características que ayudan a asegurar el suministro adecuado de nutrientes para satisfacer las necesidades metabólicas de los tumores de crecimiento rápido, pueden convertirse en una ventaja en el uso de agentes terapéuticos a escala nano ya que difunden pasivamente a través de los capilares tumorales fenestrados y llegan hasta el espacio intersticial de las células malignas [Figura 3] [44, 45].

La porosidad de la vasculatura de los tumores puede ser muy variable, incluso un único vaso puede ser permeable a un tamaño de partícula en una región única del tumor [46].

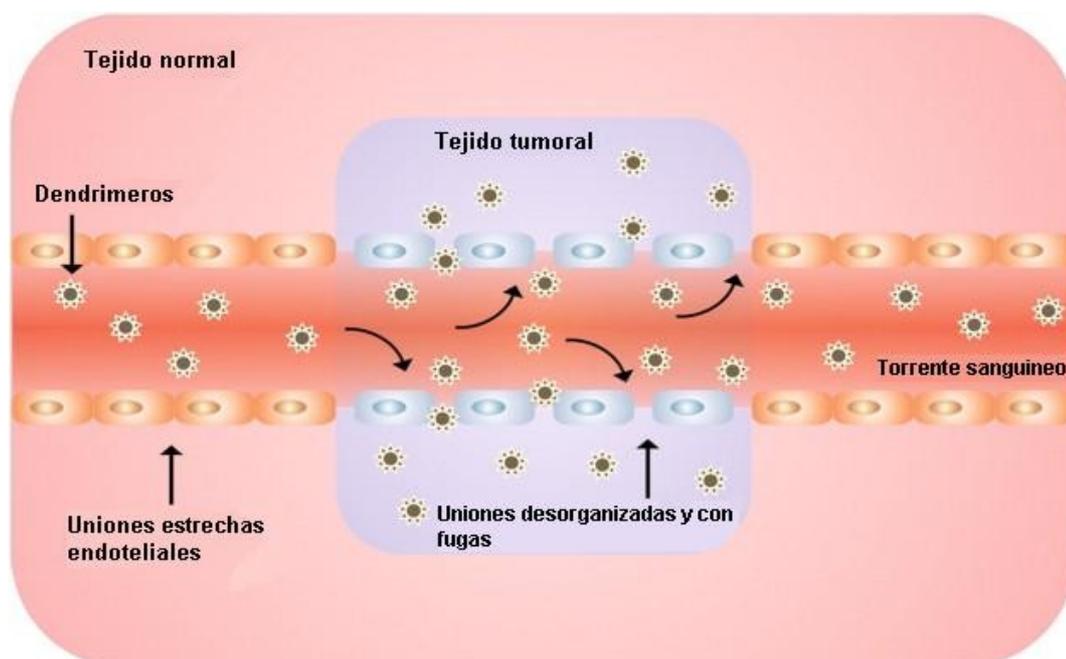


Figura 3. Representación esquemática de dendrímeros acumulándose en un tumor a través del aumento de la permeabilidad y retención, efecto EPR (modificado a partir de Polymeric nanohybrids and functionalized carbon nanotubes as drug delivery carriers for cancer therapy, [Advanced Drug Delivery Reviews](#) [47]).

La utilización de nanopartículas tradicionales con poli-dispersidad en sus tamaños, como por ejemplo los liposomas y polímeros convencionales, demostró serias complicaciones. La capacidad de construir poblaciones monodispersas de dendrímeros

en el rango de tamaño necesario para aprovechar el efecto EPR posibilita la explotación pasiva de estas propiedades tumorales [48]. En un trabajo reciente (Tassano et al. 2011), logramos marcar radioactivamente los dendrímeros PAMAM G4-FITC con el intermediario $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ con una pureza $\sim 90\%$. Desarrollamos un método de análisis por HPLC utilizando columna C18 y encontramos que el compuesto fue estable por 24 horas. En ratones con melanoma inducido, observamos que el patrón de distribución del conjugado fue similar que en ratones normales. Sin embargo, observamos alta captación del conjugado por el tumor 1 hora post-inyección. La captación por el tumor, fue 4-10 veces mayor que la captación observada en la musculatura circundante, lo que permitió un buen contraste para la obtención de imágenes centellográficas [Figura 4]. La elevada captación por parte del tumor puede ser explicada por el efecto EPR descrito anteriormente. El análisis de las imágenes de microscopía confocal mostraron que el $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -dendrímero-FITC fue internalizado por las células del hígado y del tumor, con señal fluorescente detectada a nivel del citoplasma celular. Los estudios biológicos mostraron el potencial del compuesto desarrollado en la obtención de imágenes moleculares oncológicas [33, ver apéndice].

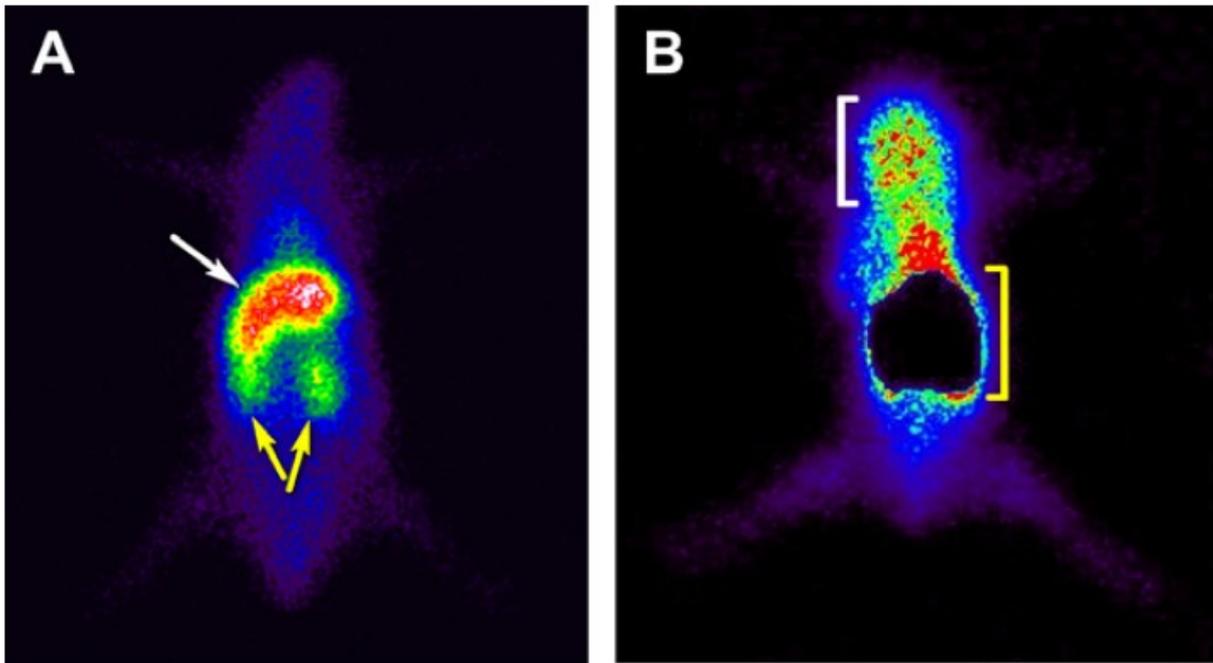


Figura 4. Imagen centellográfica tanto de ratón normal (A) como de ratón con melanoma inducido (B). Ambas imágenes se tomaron 1 hora post inyección con $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -dendrímico-FITC. Las flechas muestran el hígado (flecha blanca) y los riñones (flechas amarillas). El paréntesis recto blanco muestra la región donde se encuentra localizado el tumor. El paréntesis amarillo muestra la región abdominal donde se generó una máscara para abolir la interferencia de esa región con la zona del tumor. (Tassano et. al. 2011).

3.3.6 Imagenología utilizando dendrímeros

La imagenología puede ser utilizada en oncología para diagnosticar, localizar y posteriormente generar un plan de tratamiento acorde al tipo de tumor diagnosticado. La tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (MRI) son dos métodos estándar de formación de imágenes asociadas con diagnósticos de cáncer. El gadolinio (Gd) es un agente de contraste paramagnético para MRI, el cual puede ser acoplado a moléculas de dendrímico para mejorar tanto el contraste como la eliminación y el potencial direccionamiento del mismo [49-52]. Sistemas Gd-PAMAM se han utilizado para visualizar tanto la vasculatura como la afectación linfática del tumor. Los cambios en la permeabilidad del tumor se visualizaron por resonancia magnética utilizando G8-Gd-PAMAM como agente de contraste después de un tratamiento por radioterapia [53]. Se observó que la permeabilidad de los vasos mejoró temporalmente en tumores SCCVII (murino espontáneo SCC (SCC VII) después de la radiación,

posiblemente atribuido a la permeabilidad resultante de la disminución de la presión intersticial del tumor, el aumento de factor de permeabilidad vascular o el factor de crecimiento endotelial vascular [54, 55]. Estos resultados sugieren un nuevo método de optimización del uso de terapias concurrentes basado en el aumento de la permeabilidad de la vasculatura del tumor. Se evaluó también el conjugado G6-Gd-PAMAM a través de resonancia micromagnética linfo-angiográfica en ratones con hematomas, el cual aumenta el contraste entre imágenes intra y extralinfáticas [56]. La caracterización más precisa del linfoma podría llevar a cambiar el curso del régimen de la quimioterapia. El G6-Gd-PAMAM también puede acumularse en los ganglios linfáticos centinela, que son rutinariamente visualizados antes de la cirugía de cáncer de mama y melanoma [57].

El agente de contraste gadolinio se conjugó a dendrímeros PPI y se evaluaron para su uso como agentes de contraste para MRI [58]. Las generaciones mayores de Gd-PPI (G3 y G5) tuvieron límites inferiores de detección en comparación con G0 y G1, pero mostraron mayor difusión gradual en el tumor. Al igual que los Gd-dendrímeros para RM, los agentes de contraste yodados para tomografía computarizada (TC) podrían beneficiarse de la conjugación al dendrímero con mayores tiempos de retención. Se desarrolló la síntesis de un conjunto de agentes de contraste yodados en base a dendrímeros de poli(lisina) G3-G5 conjugados con iobitridol y núcleos de PEG de diferentes longitudes para una posible TC de la microvasculatura tumoral [59]. El uso de sondas fluorescentes para la detección de tumores ofrece la ventaja de una mejor biocompatibilidad en comparación con otros tipos de agentes de contraste, pero adolece de la escasa penetración de la luz a través del tejido. Para proporcionar una solución mínimamente invasiva, se prepararon dendrímeros PAMAM G5 conjugados con ácido fólico y una sonda fluorescente (6-TAMRA, 6T) que fueron posteriormente dirigidos a los tumores *in vivo* y detectados por una sonda óptica de dos fotones [60]. En nuestro trabajo publicado en el 2011 demostramos una captación de 4-10 veces mayor de dendrímeros unidos a ^{99m}Tc en el tumor (melanoma) que en el músculo circundante lo cual genera un buen contraste para generar imágenes centellográficas [33, ver apéndice].

3.3.7 Incremento del área superficial relativa en dendrímeros

Actualmente existen limitaciones de la terapia dirigida con radiofármacos debido a la insuficiente cantidad de radionucleidos transportados a los sitios tumorales utilizando anticuerpos monoclonales o péptidos, ya que no siempre se sobreexpresan los receptores en las células tumorales o la expresión es heterogénea. Las limitaciones parten de la base de la insuficiente cantidad de receptores pero también existe una insuficiente cantidad de radionucleidos por unidad molar de péptidos o anticuerpos. Un péptido por lo general es una molécula pequeña de pocos aminoácidos. Si a esta molécula peptídica se le suma una unión química que incluya un único radionucleido, tiene cierta probabilidad de afectar la estructura del péptido y por lo tanto el reconocimiento por parte del receptor tumoral. Por lo tanto, generalmente se dispone un radionucleido por unidad de péptido. En el caso de los anticuerpos monoclonales (moléculas mucho más grandes) los sitios de unión disponibles que son químicamente reactivos (aminas) son básicamente los residuos de lisina que se disponen a lo largo de la molécula. En muchos casos las lisinas se disponen en la región del anticuerpo de unión al antígeno, por lo tanto una modificación en estos anticuerpos ocasionalmente causa una significativa disminución en la unión antígeno-anticuerpo. Para maximizar el índice terapéutico y minimizar la toxicidad, es importante transportar los radionucleidos a los sitios correctos, pero también es sustancial que lleguen en concentraciones correctas.

Los nanopartículas como los dendrímeros poseen un área superficial relativa alta en comparación con el mismo volumen o masa de materiales de escala mayor [Figura 5].

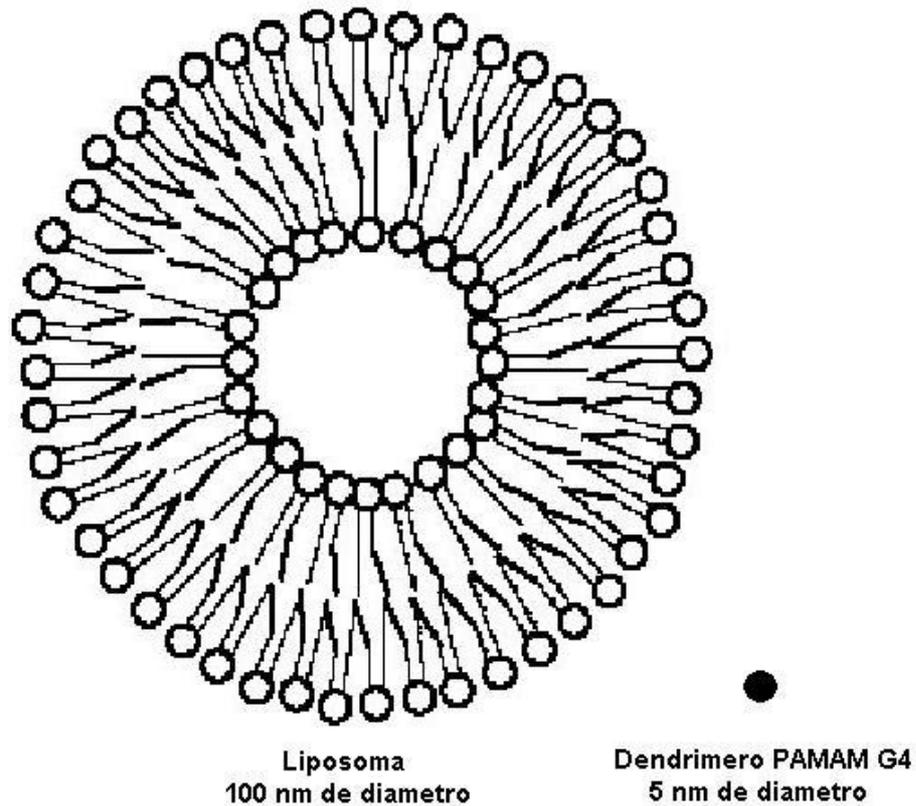


Figura 5. Representación a escala de un liposoma típico de 100 nm de diámetro, y un dendrímoro PAMAM generación 4 de 5 nm de diámetro.

Área superficial y volumen de liposomas (100 nm) y dendrímeros (5 nm).

Cuando se considera una esfera de radio “r”:

$$\text{Volumen} = \frac{4}{3}\pi r^3$$

$$\text{Área superficial} = 4\pi r^2$$

Dendrímoro

Volumen: 65 nm^3

Área superficial: 78 nm^2

Liposoma

Volumen: 523580 nm^3

Área superficial: 31415 nm^2

Relación área superficial / volumen = $3/r$

Por lo tanto cuando el radio de la esfera decrece, la relación área superficial / volumen se incrementa. Como el tamaño de la partícula disminuye existe una mayor proporción de átomos que se encuentran en la superficie en comparación con el interior, lo que permite una alta reactividad química en su superficie, ya que puede interactuar espacialmente con una mayor cantidad de moléculas o radionucleidos por unidad de dendrímero. El dendrímero PAMAM G4 de 5 nm de diámetro posee un total de 64 grupos aminos reactivos en su superficie (Figura 1) por lo cual podría teóricamente albergar 64 radionucleidos por unidad de dendrímero.

3.3.8 Nanosistemas como radiofármacos para la terapia de tumores

Mientras que los radiotrazadores de diagnóstico se basan en una relación alta de tumor/fondo en cortos períodos, el suceso de la radioterapia de tumores depende de la alta concentración del radionucleido en el tumor por períodos más largos. Por esto, un radiofármaco de terapia debe tener las siguientes características: alta captación por parte del tumor, alta relación de captación tumor/fondo, tiempo alto de residencia en el tumor y una rápida eliminación del organismo.

La alta captación en el tumor y la rápida eliminación renal es importante para mejorar la relación tumor/fondo y reducir el daño colateral, como en los riñones y la médula ósea.

Si bien existen estudios recientes utilizando dendrímeros como vehículo de radionucleidos beta [61] mostrando el potencial como posible uso terapéutico, solamente con liposomas se han realizado ensayos en pacientes oncológicos. Los liposomas son nanopartículas de un origen totalmente distinto a los dendrímeros, pero al igual que los dendrímeros se pueden utilizar como vehículos de radionucleidos y a su vez aprovechar el tamaño nanométrico como forma de acumulación en las zonas tumorales a través del efecto EPR.

Se han realizado estudios analíticos de dosimetría utilizando liposomas marcados con emisores beta ^{131}I , ^{90}Y , ^{188}Re y ^{67}Cu en radioterapia interna [62]. Los resultados de los liposomas PEGylados marcados radiactivamente dirigidos a tumores sólidos en pacientes con cáncer local avanzado, apoyan la posibilidad del tratamiento con

emisores beta a través de nanosistemas. Esto se ha visto particularmente en pacientes con cáncer de cuello y cabeza con altos niveles de captación en el tumor: 33.0 ± 15.8 % ID/kg (porcentaje de dosis inyectada/kg) para un tumor de un volumen de 36.2 ± 18.0 cm³ [63]. Además de la administración por vía intravenosa, se ha investigado la administración intratumoral e intraperitoneal en el potencial uso de ¹⁸⁶Re-liposomas [64-66]. Las imágenes de alta resolución utilizando SPECT/CT (Tomografía Computarizada por Emisión de Fotones Individuales) revelan la distribución intratumoral de los liposomas [67, 68]. La quimioterapia y radioterapia concomitante han mejorado los tratamientos en un amplio rango de tumores sólidos. Los liposomas PEGylados a los cuales se les encapsularon doxorubicina y cisplatino fueron dirigidos pasivamente en una proporción efectiva a los tumores sólidos, incrementando la eficacia terapéutica y disminuyendo la toxicidad [69]. La biodistribución, farmacocinética e imagen nuclear de nanosistemas radioterapéuticos dirigidos pasivamente utilizando ¹¹¹In/¹⁸⁸Re-liposomas en modelos animales de carcinoma C26 y HT-29 (colon), dio como resultado relaciones 7 veces mayores en el tumor que en músculo comparado con la administración intravenosa de ¹⁸⁸Re-BMEDA no encapsulado [70].

El ¹¹¹In posee rayos γ con 171 keV de energía el cual se utiliza en imagenología y electrones Auger de 0.42 MeV los cuales penetran en el orden de nm en el tejido, permitiendo la destrucción de células tumorales individuales. El ¹⁸⁸Re posee rayos γ con 155 keV de energía para imagen nuclear, y a su vez es un emisor beta de alta energía con 2.12 MeV, el cual genera un efecto dañino no específico en grandes clusters de células malignas [Tabla 2]. Ambos radionucleidos pueden ser utilizados tanto en imagenología como en aplicaciones radioterapéuticas.

Los nanosistemas basados en polímeros como los dendrímeros poseen un gran potencial en mejorar a los nanosistemas liposomales en el tratamiento de tumores sólidos avanzados en base a una distribución pasiva más eficaz [71].

| Radionucleido | Tipo de emisión | Vida media | E _{max} (MeV) | R _{max} (media) | Tamaño celular del tumor |
|---------------|-----------------|------------|------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| 186-Re | β, γ (9,4%) | 89,2 h | 1,07 | 5 mm (0,9 mm) | clusters intermedios |
| 188-Re | β, γ (15,1%) | 17 h | 2,12 | 11 mm (2,4 mm) | clusters grandes |
| 177-Lu | β | 6,6 d | 0,49 | 1,6 mm (0,67 mm) | clusters pequeños |
| 131-I | β, γ (81,2%) | 8 d | 0,28 0,36 0,64 | 2 mm | clusters pequeños |
| 90-Y | β | 64,1 h | 2,28 | 12 mm (2,8 mm) | clusters grandes |
| 67-Cu | β | 2,6 d | 0,19 | 0,7 mm | clusters pequeños |
| 225-Ac | α | 10 d | 5,83 5,79 5,73 | 40-80 μm | clusters pequeños – células únicas |
| 211-At | α | 7,2 h | 5,87 | 60-80 μm | clusters pequeños – células únicas |
| 111-In | Auger, γ | 67 h | 0,42 | 2-500 nm | células únicas |

Tabla 2. Características de los potenciales radionucleidos para tratamiento de tumores. *R_{max}* penetración en tejido tumoral, rango máximo y la media. Clusters (grupos) pequeños, intermedios y grandes de células corresponde aproximadamente a intervalos de $10^4 - 10^6$, $10^6 - 10^8$, y $10^8 - 10^{10}$ células tumorales por cluster, respectivamente.

Estudios teóricos de dosimetría han demostrado el potencial uso de los liposomas radioterapéuticos para el tratamiento de tumores vía inyección intravenosa [72]. La evaluación dosimétrica comparativa del ^{188}Re -(DXR)-liposoma derivado de la biodistribución, indicaron que las dosis de radiación son seguras y viables para proseguir en la investigación clínica [73]. Los resultados de dosis para los órganos principales revelaron que tanto el hígado como el bazo recibieron dosis similares. Los riñones recibieron dosis menores al compararse con la terapia a través de ^{111}In -DTPA-octreotide. También fueron bajas las dosis recibidas en cuerpo entero e hígado comparado con ^{111}In -DTPA-hEGF (0.19 y 0.76 mGy/MBq, respectivamente). Las dosis absorbidas por el bazo, hígado, riñones y medula ósea roja son menores que para la terapia con ^{90}Y -DOTATOC el cual es de uso en clínica [74].

Las partículas α son prometedoras para la terapia de micrometástasis tumorales. Se estableció la marcación con ^{225}Ac (actinio, emisor alfa) cargándolos en liposomas y dirigiéndolos a tumores por medio del direccionamiento pasivo [75].

La terapia por captura de neutrones de boro (TCNB) es un acercamiento binario para la terapia del cáncer basado en la reacción nuclear que ocurre cuando el ^{10}B es irradiado con neutrones produciendo partículas α de un alto LET (transferencia lineal de energía) y núcleos de litio. Estas partículas poseen un pequeño rango de penetración (<10 μm) y depositan toda su energía en el espacio de una sola célula. La eficacia del tratamiento de tumores con TCNB depende de lo selectivo y la cantidad de ^{10}B

depositada en los tumores. También se han estudiado liposomas y dendrímeros PAMAM (con receptores de folato asociados a su superficie) los cuales llevaban incorporado ^{10}B (boro) para el tratamiento a través de TCNB en modelos animales [76, 77]. Los resultados demuestran una acumulación pasiva de ^{10}B en el tumor, causando la supresión del crecimiento tumoral *in vivo* por TCNB [78].

3.4 Radiometales para terapia

Existen varios factores a tomar en cuenta para la elección del radionucleido apropiado en radioterapia [79-83] incluyendo: retención por parte del tumor, depuración sanguínea, tasa de administración de la radiación, vida media y actividad específica del radionucleido y también la disponibilidad de producción y entrega del radionucleido así como también el costo económico.

El principal objetivo de la radioterapia dirigida es el de administrar dosis tumorocidas de radiación a las células tumorales sin causar efectos colaterales inmanejables. La pureza radioquímica debe ser suficiente y reproducible, con una cantidad traza de impurezas (particularmente impurezas radionucleídicas) que pueden afectar el radiomarcado y la pureza.

Se requiere que el radionucleido elegido tenga una alta actividad específica. Los metales traza contaminantes tienen que ser minimizados ya que compiten con el radionucleido por la conjugación del agente quelante bifuncional y la molécula.

Más allá de que existan varios radionucleidos, el ^{90}Y y los lantánidos son particularmente interesantes. Existen varios isótopos lantánidos para escoger: emisores β de baja energía, ej. ^{177}Lu , emisores β - de media energía, ej. ^{153}Sm , y emisores de alta energía como ^{188}Re y ^{90}Y . Dependiendo de la localización y el tamaño tumoral, la elección del emisor beta será diferente. Por ejemplo, los emisores de baja y media energía como el ^{177}Lu son mejores para metástasis pequeñas, mientras que los emisores de energías altas como el ^{90}Y son usados para tumores mayores.

Los emisores beta tienen una penetración en tejido relativamente larga, de unos 2-12 mm, lo cual es particularmente importante para tumores sólidos. Producen una distribución de dosis homogénea debido al efecto de “fuego cruzado” aun cuando se distribuyen heterogéneamente en el tumor [Figura 6].

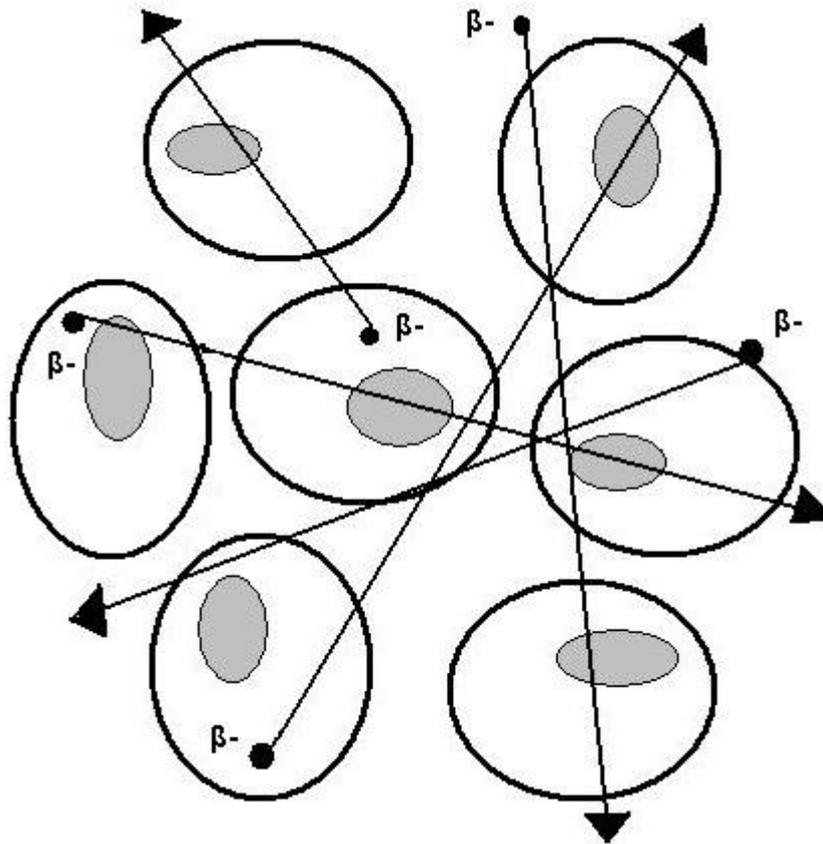


Figura 6. Representación esquemática del efecto de “fuego cruzado” por parte de emisores beta en células de un tejido tumoral.

3.4.1 Diferentes tipos de emisores beta

Ytrio-90

El ^{90}Y es un radionucleido producido a través de generadores, como resultado del decaimiento del ^{90}Sr . Decae por emisión de partículas beta de alta energía ($E_{\text{max}}=2.28$ MeV, 100% abundancia) formando ^{90}Zr . Tiene una vida media de 2.7 días, lo cual es lo suficiente para alcanzar una dosis crítica y a la vez permite que el radiofármaco sea manufacturado y transportado para el uso clínico. La actividad específica del ^{90}Y es muy alta, por lo tanto es adecuado en el desarrollo de radiofármacos de terapia que utilizan la unión específica a receptores.

Ya que no emite radiación gamma que permita la imagenología, se utiliza como sustituto el ^{111}In (gammas de 171 y 245 KeV, vida media de 2.8 días) en la marcación de la misma biomolécula, con el objetivo de determinar características de biodistribución y dosimetría.

Samarium-153

El ^{153}Sm tiene 3 emisiones beta (30% 0.64 MeV, 50% 0.71 MeV, y 20% 0.81 MeV) y una emisión gamma (28% 103 keV), con una vida media de 1.95 días. Se puede producir en grandes cantidades y con una alta actividad específica a través del enriquecimiento del ^{152}Sm por activación neutrónica [84]. La vida media relativamente corta posibilita la entrega fraccionada de dosis mientras que los rayos gamma de 103 keV se utilizan para la determinación de la biodistribución a través de imagenología gamma.

Holmio-166

El ^{166}Ho emite partículas beta con una energía máxima de 1.85 MeV (penetración máxima en tejido de aprox. 9 mm) y una pequeña porción de rayos gamma (6.6% 80.6 keV, y 0.9% 1.38 MeV), el cual se utiliza para determinar biodistribución. Tiene una vida media de 26.78 horas [84].

Lutecio-177

El ^{177}Lu es un radionucleido generado en reactores nucleares. Tiene 3 emisiones beta (12% 0.176 MeV, 9% 0.384 MeV, y 79% 0.497 MeV) y dos emisiones gamma (6.4% 113 keV y 11% 208 keV) con una vida media de 6.75 días. Un método utilizado para la producción de ^{177}Lu , es a través de la irradiación de ^{176}Lu enriquecido en un reactor. Por este método, el ^{177}Lu se puede obtener con un rendimiento elevado y con una actividad específica relativamente alta a un bajo costo. La actividad específica de ^{177}Lu del reactor de la Universidad de Missouri es rutinariamente producida en cantidades mayores a 20 Ci/mg [84].

Renio-186

El ^{186}Re tiene una vida media de 3.68 días con emisión beta ($E_{\text{max}}=1.07$ MeV, 91% de abundancia) y gamma ($E=137$ keV, 9% de abundancia) lo que permite imagenología durante la terapia. Se produce solamente en reactores nucleares por irradiación de ^{185}Re con neutrones ($^{185}\text{Re}(n, \gamma)^{186}\text{Re}$). El rendimiento de producción depende de la cantidad de Re, la energía de los neutrones y el reflujó neutrónico. La actividad específica varía de baja a media, obteniéndose un producto no totalmente puro.

Renio-188

El ^{188}Re tiene una vida media de 16.98 horas con emisión beta de alta energía ($E_{\text{max}}=2.12$ MeV, 85% de abundancia) y fotones gamma de 155 keV (15% de abundancia). El ^{188}Re puede ser preparado tanto por reacción nuclear ($^{187}\text{Re}(n, \gamma)^{188}\text{Re}$) como a través de generador $^{188}\text{W}-^{188}\text{Re}$. El producto de generador es puro y con una alta actividad específica. La mayor ventaja de usar un generador es la disponibilidad constante de ^{188}Re así como también su bajo costo económico comparado con los productos de reacción nuclear. Los fotones gamma se utilizan para el cálculo de dosimetría y biodistribución.

Cobre-67

El ^{67}Cu tiene una vida media larga ($t_{1/2}=62$ h), decae por emisión de 3 emisiones beta (45% 0.40 MeV, 3% 0.48 MeV, y 20% 0.58 MeV) y 2 emisiones gamma (93 keV 17%, and 185 keV 48%). La emisión gamma permite la toma de imágenes de la distribución del radiofármaco durante el tratamiento. El ^{67}Cu se produce por bombardeo de Zn natural con protones con 200 MeV ($^{68}\text{Zn}(p, 2p)$). Es dificultoso obtener una gran actividad específica utilizando este método de producción. Se pueden producir hasta 400 mCi de ^{67}Cu en ciclotrones pequeños ($E_p=17-18$ MeV; 80 μA) [85].

3.4.2 Agentes bifuncionales para el marcado de moléculas con 186/188Re

El primer trabajo en la utilización de ácido 6-hidracinonicotínico (HYNIC) estuvo a cargo de Abrams et al. [86, 87]. Desde entonces el HYNIC ha sido utilizado en la marcación con ^{99m}Tc de una amplia gama de moléculas que van desde fragmentos de anticuerpo [88], péptidos [89-92], análogos de somatostatina [93-98], liposomas [99] y oligonucleótidos [100, 101], demostrando ser una marcación eficiente y muy estable. El HYNIC sólo ocupa uno de dos sitios de coordinación, por lo tanto es necesario un coligando como la tricina para completar la esfera de coordinación del tecnecio [Figura 7]. La ventaja de usar HYNIC como agente bifuncional es la alta eficiencia de marcado con ^{99m}Tc y la capacidad de elección del coligando como la tricina o glucoheptonato, que permite la modificación de la hidrofobicidad y la farmacocinética de la molécula marcada.

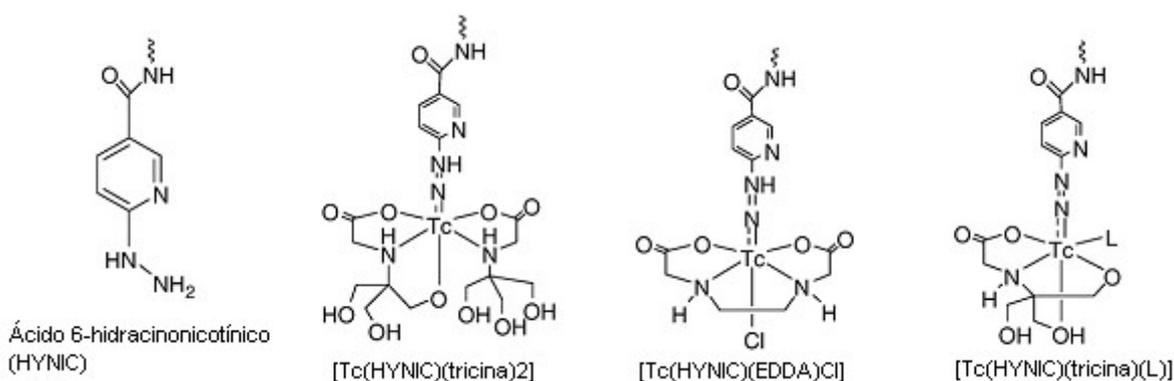


Figura 7. Derivados del HYNIC, coligandos y sus complejos binarios y terciarios con ^{99m}Tc .

El renio es del grupo II por lo tanto congénere del tecnecio. La química de coordinación del renio es bastante similar (no idéntica) al tecnecio debido a las relaciones de la tabla periódica. Como consecuencia, el desarrollo del agente acoplante para el marcado con ^{99m}Tc puede ser usado para el radiomarcado con $^{186/188}\text{Re}$ [102-104]. Muchos radiofármacos fueron desarrollados como agentes de imagen con ^{99m}Tc . A pesar de sus similitudes, también poseen muchas diferencias. Por ejemplo, se necesita un reductor más fuerte para reducir el Re(VII) del $^{186/187}\text{ReO}_4^-$ para un estado de oxidación menor, debido a un tasa de reducción menor del renio. El sistema de ligando ternario (HYNIC-BM, tricina y TPPTS) funciona bien para la marcación de

pequeñas moléculas con ^{99m}Tc [105-109] pero se obtiene un rendimiento de marcado menor con $^{186/188}\text{Re}$ de las mismas moléculas debido a la lenta química redox del renio.

3.4.3 Agentes quelantes bifuncionales para el radiomarcado de moléculas con lantánidos

Existen varios requerimientos de un agente bifuncional en la quelación de lantánidos como el ^{177}Lu [110, 111]. Se debe formar un metal quelato con una alta estabilidad termodinámica y una cinética inerte, con el objetivo de mantener el quelato intacto bajo condiciones fisiológicas. La descomposición del metal quelato produce iones libres, que se pueden depositar en los huesos produciendo toxicidad en la médula ósea. El agente quelante bifuncional debe formar un metal quelato con un mínimo de isomerismo, ya que la captación por parte del tumor del radiofármaco no sólo depende de la afinidad de unión de la biomolécula, sino también de las propiedades físicas y químicas tanto de la molécula como del metal quelato. El agente bifuncional quelante debe poseer una alta hidrofiliidad, de manera de incrementar la depuración sanguínea y la excreción renal tanto del conjugado radiomarcado como del no-marcado. La rápida excreción renal del conjugado no-marcado, minimiza la competición por los receptores con el conjugado radiomarcado. El agente bifuncional quelante debe además ser resistente a la radiólisis debido a la gran dosis recibida por la radiación beta, y a los radicales libres producidos.

DOTA

La ventaja de utilizar DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraaza-ciclododecano- tetraacético) radica en la cinética inerte del radiometal quelado. Sin embargo, la cinética de radiomarcación de las moléculas conjugadas a DOTA es bastante lenta, y dependiente de las condiciones de marcado [112-119], incluyendo concentración, pH, temperatura, tiempo de reacción, tipo de buffer y concentración del mismo, presencia de otros iones metales como Zn(II) y Fe(III) [Figura 8]. Para que el rendimiento sea apropiado se necesita el calentamiento del medio de radiomarcado al menos hasta unos 50 °C.

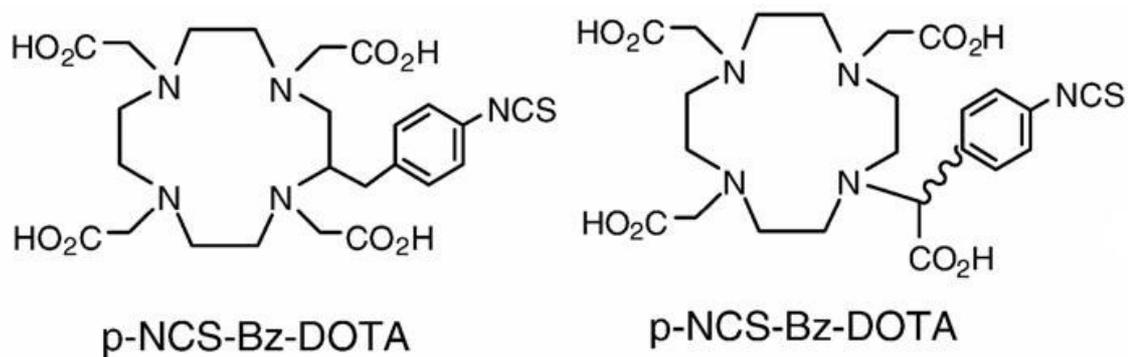


Figura 8. Distintos quelantes DOTA, con sus respectivos grupos reactivos de unión a la molécula.

3.5 ¿Cómo las radiaciones ionizantes afectan a las células?

La radiación ionizante es energía transmitida a través de los rayos X, rayos gamma, partículas beta (electrones de alta velocidad), partículas alfa (núcleo del átomo de helio), neutrones, protones y otros iones pesados, tales como los núcleos de argón, nitrógeno, carbono y otros elementos. Los rayos X y los rayos gamma son ondas electromagnéticas como la luz, pero su energía es mucho mayor que la de la luz (sus longitudes de onda son más cortas). La luz ultravioleta (UV) es una radiación de energía intermedia que puede dañar las células, pero la luz UV se diferencia de las formas de radiación electromagnética en que no causa ionización (pérdida de un electrón) en átomos o moléculas, pero sí excitación (cambio en el nivel de energía de un electrón). Las otras formas de radiación en base a partículas tienen ya sea carga negativa (electrones), carga positiva (protones, partículas alfa, y otros iones pesados) o son eléctricamente neutras (neutrones).

Las radiaciones beta son electrones de alta velocidad que pierden energía a medida que pasan a través de las células e interactúan con las moléculas. La energía transferida es suficientemente alta como para romper los enlaces químicos, lo que resulta en la formación de radicales o ionización. La ionización difiere de la formación de iones que se produce en las reacciones químicas ordinarias. El proceso que tiene lugar cuando se disuelve la sal (cloruro de sodio, NaCl) en agua es un buen ejemplo de una reacción ordinaria. En este tipo de reacciones químicas, tales como la unión de Na a Cl, los

electrones que se han perdido o ganado son siempre los de la órbita más externa. Cuando se disuelve NaCl en agua, los dos átomos se separan, el cloruro mantiene el electrón exterior, por lo tanto, el sodio tiene una carga neta positiva (Na^+) y el cloruro tiene una carga neta negativa (Cl^-), pero la carga (equilibrio entre positivo y negativo) se mantiene neutral. Estos átomos cargados se llaman iones, y son estables en agua a pesar de sus cargas eléctricas.

En contraste, cuando un electrón pasa a través de una célula, libera su energía a lo largo de su trayectoria mediante la interacción con los electrones de las moléculas cercanas. La energía liberada es absorbida por átomos cerca de la trayectoria, resultando tanto en excitación (un cambio en la órbita de un electrón a un nivel de energía más alto) o ionización (liberación de un electrón del átomo). Lo que difiere de una reacción química normal es que cuando la radiación dona energía a los átomos o moléculas, los electrones de las órbitas internas pueden ser liberados produciendo inestabilidad en los átomos. Tales átomos inestables se denominan radicales y son químicamente muy reactivos. Algunos radicales son tan reactivos que existen sólo durante microsegundos.

Las partículas cargadas positivamente transfieren su energía a las moléculas en las células esencialmente por los mismos mecanismos. Los neutrones son algo diferentes, ya que no están cargados eléctricamente, y su efecto principal es el impacto de los núcleos de los átomos de hidrógeno, es decir, protones. Dado que la masa de un neutrón y un protón son similares, el impacto resulta en un proceso de dispersión elástica. Los protones expulsados se comportan como partículas cargadas.

Las ionizaciones inducidas por la radiación pueden actuar directamente sobre las moléculas de los componentes celulares o indirectamente sobre las moléculas de agua, que causan los radicales derivados del agua. Los radicales reaccionan con moléculas cercanas en un tiempo muy corto, lo que resulta en la rotura de los enlaces químicos u oxidación (adición de átomos de oxígeno) de las moléculas afectadas. El efecto más importante en las células es la rotura de la molécula de ADN. Dado que el ADN consta de dos cadenas complementarias, se pueden producir roturas tanto de una sola hebra o de ambas. Sin embargo, la rotura de ambas hebras es mucho más importante biológicamente. La mayoría de los fragmentos de hebras simples pueden ser reparados normalmente gracias a la naturaleza de doble hebra de la molécula de ADN (las dos

hebras se complementan entre sí, de modo que una hebra intacta puede servir como molde para la reparación). En el caso de la rotura de doble hebra, la reparación es más compleja y puede ocurrir la reasociación errónea de los extremos. Por lo tanto la rotura de la doble hebra resulta en la inducción de mutaciones, aberraciones cromosómicas (AC) o muerte celular. [120-125]

3.5.1 Los efectos biológicos difieren según el tipo de radiación

Las radiaciones no sólo se diferencian por sus diferentes constituyentes (electrones, protones, neutrones, etc), sino también por su energía. Las radiaciones que causan una ionización densa a lo largo de su trayectoria (tales como neutrones, partículas alfa, radiación beta) se denominan de alta transferencia lineal de energía (alto LET), es un parámetro físico para describir la energía media liberada por unidad de longitud de la trayectoria. Las radiaciones de bajo LET (rayos X y rayos gamma) producen ionizaciones escasas a lo largo de su trayectoria y, por lo tanto se distribuyen homogéneamente dentro de una célula. La dosis de radiación es la cantidad de energía por unidad de material biológico (por ejemplo, número de ionizaciones por célula). Por consiguiente, las radiaciones de alto LET son más destructivas para el material biológico que las radiaciones de baja LET. Esto se debe a que en la misma dosis, las radiaciones de bajo LET inducen el mismo número de radicales pero mucho más disperso dentro de una célula, mientras que las radiaciones de alto LET transfieren la mayor parte de su energía en una pequeña región de la célula [Figura 9]. El daño local al ADN causado por ionizaciones densas de radiaciones de alto LET es más complejo de reparar que el daño difuso en el ADN causado por las ionizaciones dispersas de radiaciones de bajo LET.

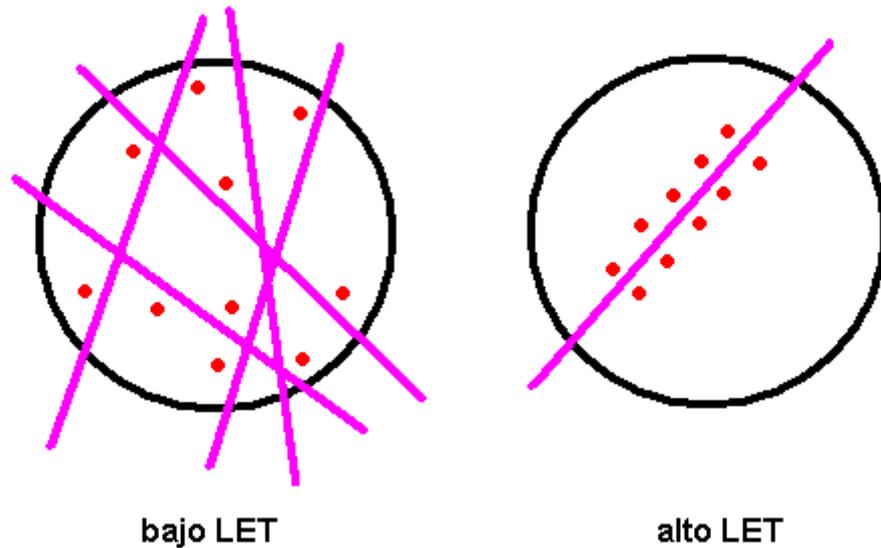


Figura 9. Ambos ejemplos producen el mismo número de ionizaciones (puntos rojos), representando la misma dosis. El daño focalizado de las radiaciones de alto LET es mucho más importante para el material biológico (ej. ADN).

3.6 Las radiaciones producen aberraciones cromosómicas

Las radiaciones ionizantes producen reordenamientos del genoma. Cuando la irradiación se produce durante la fase G₀/G₁ del ciclo celular, se producen reordenamientos a gran escala, y aparecen cambios de cromosomas en la siguiente mitosis. Tales aberraciones pueden alterar los fenotipos celulares, y son importantes en diversas áreas de la biología:

1. Aplicaciones médicas y de salud pública que incluyen diagnóstico prenatal, la caracterización de tipos específicos de cáncer, estimación del riesgo de carcinogénesis, biodosimetría radiactiva, y la planificación del tratamiento radioterapéutico.
2. El análisis de las AC ayuda a caracterizar las vías de reparación/no-reparación implicadas en el procesamiento de daño en el ADN. En comparación con otros agentes genotóxicos, produce grandes cantidades de roturas de doble cadena del ADN (DSB). Por otra parte, el daño por radiación inicial tiene un carácter

estocástico discreto que puede ser modulado mediante el uso de diferentes tipos de radiación (por ejemplo, partículas frente a rayos X) las cuales poseen diferentes densidades de ionización [126, 127].

3. El espectro de las diferentes AC inducidas por la radiación es informativo acerca de la arquitectura de los cromosomas durante la interfase, y viceversa [128, 129].
4. La inestabilidad cromosómica, en la que las nuevas aberraciones (aunque a menudo no del tipo característico de G₀/G₁) seguirán surgiendo muchas generaciones posteriores a la irradiación, [130-131] representando una forma de inestabilidad genómica.

Las simulaciones por sistemas informáticos y los estudios de laboratorio han demostrado que el patrón ionizante de las células que fueron atravesadas por las partículas cargadas de alto LET es claramente diferente de las células expuestas a los rayos X y gama de baja radiación LET [132, 133]. Los iones pesados energéticos de alto LET producen una gran cantidad de roturas de doble cadena del ADN por unidad de dosis [134] y produce daños complejos e irreparables en el ADN [135]. Aunque se han estudiado en profundidad los mecanismos de inducción de lesiones en el ADN debido a las radiaciones, no se conocen cabalmente las vías de conversión de DSB y otras lesiones del ADN en AC [136]. Las DSB son las principales lesiones que participan en la formación de AC. Los intercambios cromosómicos son el resultado del sellado erróneo de roturas principalmente por recombinación no homóloga en G₁ y S, o por recombinación homóloga en las etapas S y G₂ del ciclo celular [137-142]. Las lesiones DSB se inducen directa, o indirectamente por procesos enzimáticos de reparación que pueden convertir las lesiones de una sola hebra en DSB [143, 144]. Varios estudios sugieren que las lesiones no DSB agrupadas juegan un papel importante en la inestabilidad cromosómica a través de su resistencia a la reparación [145-147]. Las lesiones del ADN inducen diferentes tipos de aberraciones dependiendo del ciclo celular. Las aberraciones tipo cromosoma ocurren predominantemente cuando las células se irradian en las fases G₀/G₁, que precede a la

fase S, y las aberraciones de tipo cromátida cuando se irradian las células en S/G2, que preceden a la fase M. Un reciente estudio de la cromatina en interfase, mostró que el proceso de condensación-decondensación de la cromatina afecta el tipo y el nivel de producción de las AC inducidas por radiación [148]. Las radiaciones de alto LET mostraron un mayor rendimiento en relación a valores de eficacia biológica (RBE) para la inducción de AC [149], y se ha sugerido que las radiaciones de alto LET producen huellas únicas en los cromosomas [150]. Los iones pesados de alta energía depositan su energía heterogéneamente en la célula con una región de alta densidad de depósito cerca de la trayectoria del ión, y una región de bajo LET debido a los rayos delta individuales (electrones secundarios producto de la radiación primaria) a distancias mayores de la trayectoria de los iones. Por el contrario, las radiaciones de bajo LET depositan la dosis de radiación uniformemente por toda la célula. Se ha propuesto que las radiaciones de alto LET son capaces de producir múltiples roturas en un único cromosoma, dando lugar a una disminución de la relación entre inter- e intracambios cromosómicos en comparación con radiaciones de bajo LET. En contraste, las radiaciones de bajo LET producen daños al azar en muchos cromosomas lo que probablemente resultará en intercambios simples entre los cromosomas.

3.6.1 Evaluación del daño cromosómico inducido por radiaciones ionizantes

Las aberraciones estructurales de los cromosomas pueden ser inducidas a través de roturas en el ADN por varios tipos de mutágenos. Las roturas en el ADN pueden ser reparadas totalmente restaurándose la estructura original del cromosoma, o bien la reparación puede ser incorrecta o no ocurrir en absoluto. Estas dos últimas eventualidades pueden ser observadas en las preparaciones microscópicas de células en metafase como AC. Sin embargo, muchos de estos cambios bruscos probablemente no permitirán la supervivencia celular después de la división.

El ensayo de AC se realiza con mayor frecuencia en los linfocitos de sangre periférica. Como los linfocitos periféricos están en la fase G0 del ciclo celular, tienen que ser estimuladas para dividirse por un antígeno no específico, como la fitohemaglutinina. Previo a la recolección de las células luego de 46 horas de cultivo, se adiciona un

inhibidor del huso celular como el Colcemid (Ciba) a fin de bloquear las células en la metafase de la primera mitosis.

Las AC pueden dividirse en dos grupos principales: 1) las aberraciones tipo cromosoma, que afectan ambas cromátidas de un cromosoma y, 2) las aberraciones tipo cromátida que involucran sólo una de las dos cromátidas. La radiación ionizante induce AC tales como dicéntricos, translocaciones, inversiones o cromosomas en anillo en la etapa G0 o G1 del ciclo celular (o sea antes de la replicación del ADN). En cambio, las aberraciones de cromátida se producen durante la fase S o G2 (durante o después de la síntesis del ADN). La mayoría de los mutágenos químicos requieren de la replicación del ADN para inducir AC de tipo cromátida (clastógenos S-dependientes).

4. Hipótesis y objetivos

4.1 Hipótesis

Es posible desarrollar nanosistemas dendriméricos unidos covalentemente a diferentes radionucleidos emisores beta los cuales podrían ser utilizados como radiofármacos para el tratamiento del cáncer, especialmente de tumores sólidos. Los nanosistemas dendriméricos conteniendo radionucleidos que emiten radiación beta, generan daño en el ADN de las células.

La mayor acumulación y permanencia del nanosistema dendrimérico en el tumor sólido por el efecto EPR, generaría un daño mayor en el ADN de las células malignas, promoviendo eventualmente mayor muerte de estas células en el tiempo.

4.2 Objetivo

El propósito de este trabajo es desarrollar, caracterizar y estudiar nanosistemas resultantes de la conjugación entre la nanotecnología y la radiofarmacia para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. Por lo tanto, el objetivo general del presente trabajo es el desarrollo, caracterización y estudio de nanosistemas dendriméricos como posibles radiofármacos para el tratamiento del cáncer.

Objetivos Específicos

- 1) Obtención de un dendrímero PAMAM G4 (DOTA) marcado con ^{177}Lu , estable y caracterizado química y físicamente.
- 2) Obtención de un dendrímero PAMAM G4 (HYNIC) marcado con ^{188}Re estable y caracterizado química y físicamente.
- 3) Estudios de distribución biológica del complejo ^{177}Lu -PAMAM G4.
- 4) Estudios de distribución biológica del complejo ^{188}Re -PAMAM G4.
- 5) Evaluación del daño del complejo ^{188}Re -PAMAM G4 sobre el ADN de la línea tumoral B16F1 por el test de aberraciones cromosómicas.

5. Materiales y Métodos

5.1 Conjugado y marcación del dendrímero con ¹⁷⁷Lu

El ligando DOTA-NHS (Macrocyclics, USA) se utilizó en una proporción 15:1 respecto al dendrímero PAMAM G4. Se pesó 4 mg de DOTA-NHS y se le agregó 400 µL de buffer fosfato 0.1 M pH 8.5 (el buffer fue preparado con agua miliQ para evitar contaminación de metales). Posteriormente, se adicionó la solución de DOTA-NHS a 10 mg de dendrímero al cual se le extrajo previamente el metanol con N₂ gas. Se dejó reaccionar por 1 h a temperatura ambiente.

El conjugado fue purificado del DOTA libre por cromatografía de exclusión molecular en una columna Sephadex G-25 (PD-10, Amersham Biosciences) con buffer acetato de sodio, 0.15 M, pH 6.4.

La marcación de este conjugado se llevó a cabo mediante la adición de 7.4-37 MBq (0.2-1 mCi) de ¹⁷⁷LuCl₃ (MURR, Missouri) a 1 mg de dendrímero-DOTA con ácido genticónico (10 mg/mL). Posteriormente, se incubó por 30 min a 50°C y se purificó por columna PD- 10.

Los controles de rendimiento, pureza y estabilidad se realizaron por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Performance) con detector gamma y UV (Agilent Technologies Inc. Serie Infinity 1200 equipado con detector GABI Star). Se utilizó una columna C18 (MCH-10, 150 x 4.6 mm). La fase móvil fue agua ultrapura con TFA (2,2,2-ácido trifluoroacético) 0.14% (solvente A) y ACN (Acetonitrilo) con TFA 0.14% (solvente B), con un flujo de 1 mL/min con un gradiente 0 a 30 min 100% solvente B.

5.2 Conjugado y marcación del dendrímero con ^{188}Re

La conjugación de Suc-HYNIC-dendrímero fue iniciada por adición de 33 μL de 1M NaHCO_3 a 10 mg de dendrímero PAMAM G4. Luego se le adicionaron 4 mg de Suc-HYNIC (exceso molar 20:1) en 10 μL de DMSO (J. T. Baker). La mezcla fue incubada a 18-25 $^\circ\text{C}$ durante 30 min en oscuridad, pH 8. El conjugado fue purificado del HYNIC libre por cromatografía de exclusión molecular en una columna Sephadex G-25 (PD-10, Amersham Biosciences) con buffer acetato de sodio, 0.15 M, pH 6.4.

Se estudió la unión del Suc-HYNIC-dendrímero mediante resonancia magnética nuclear. Los espectros se registraron en un espectrómetro Bruker DPX-400, y se utilizó disolvente deuterado disponible comercialmente (CD_3OD). Los desplazamientos químicos de protones se informaron en ppm (δ) y fue utilizado tetrametilsilano (TMS) como estándar interno.

El número de moléculas de HYNIC combinadas al polímero se estudió por medio de espectroscopía de ^1H -RMN. Inicialmente, los grupos de protones fueron asignados a los picos particulares dentro del espectro analizado para el PAMAM G4-NH₂ (Figura 1). Ha (2.75 ppm) corresponde a los protones de los grupos metileno de los grupos amino terminales del dendrímero. Los protones Hd (2.81 ppm) y He (2.60 ppm) corresponden a los protones de los grupos metileno de los grupos amino terciarios internos. Mientras que los protones Hb y Hf (3.29 ppm) y Hc (2.39 ppm) se asignaron a los protones de los grupos metileno de los grupos amida internos y el grupo alfa-carbonilo interno, respectivamente.

La marcación radioactiva del conjugado se realizó mediante dos etapas:

Se disolvieron 10 mg de Tricina (N-[Tris(hidroximetil)-metil]glicina, Sigma) en 0.8 mL de agua y se ajustó el pH a 4.5-5 con HCl 2.0 M. En un segundo vial, se disolvieron 15 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (J. T. Baker) en 0.5 mL de HCl 2.0 M y se tomaron 0.05 mL de esta solución para adicionarla al vial que contiene la tricina disuelta. En una segunda etapa, para llevar a cabo la marcación con ^{188}Re se ajustó el volumen del vial que contiene la mezcla Tricina/ SnCl_2 , hasta un volumen de 5 mL con NaCl 0.9 %

(solución B). Posteriormente, se adicionaron 25 μL de la solución B a 10 mg del dendrímero-HYNIC purificado (solución A).

Una vez eluído con NaCl 0.9 % el generador $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ (POLATOM, Polonia) se obtiene el eluato de ^{188}Re en forma de $^{188}\text{ReO}_4^-$. Se adicionó a la mezcla una actividad entre 7.4 MBq (0.2 mCi) a 37 MBq (1 mCi) en un volumen no mayor a 1 mL. La mezcla se incubó a 50 °C durante 60 min y se purificó por filtración en gel con una columna de Sephadex G-25 (PD-10 Sephadex G-25, Pharmacia).

Todos los solventes empleados fueron previamente purgados con N_2 gas.

A todas las muestras se les controló sus respectivas actividades utilizando un Calibrador de Dosis Capintec CRC7, contador de centelleo sólido con un cristal 3"x 3" de NaI(Tl) asociado a un analizador multicanal ORTEC.

La pureza radioquímica del conjugado marcado fue cuantificada mediante la técnica de HPLC descrita para la marcación con ^{177}Lu .

5.3 Modelo Animal

La línea celular de melanoma murino B16-F1 se obtuvo del repositorio American Type Culture Collection. Se cultivó en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (PAA) y glutamina 2 mM (AppliChem GmbH, Darmstadt, Alemania). Se utilizaron ratones C57 black (URBE, Uruguay) de seis semanas de edad. Todos los protocolos experimentales que involucran animales se realizaron siguiendo las directivas aprobadas por el Comité Nacional de Experimentación Animal (CHEA, Uruguay). Los melanomas fueron inducidos en los ratones por administración subcutánea de 2.5×10^5 células de melanoma B16F1 en 0.1 mL de buffer fosfato salino (PBS). Luego de dos semanas de la inoculación, los tumores eran palpables (16 mm de diámetro por calibre) y los ratones se encontraban listos para comenzar los estudios.

5.4 Estudios de Biodistribución

Los estudios de biodistribución se realizaron en ratones C57 black normales (n=3 por tiempo), y portadores de melanoma (n=3 por tiempo), pesando en ambas condiciones 25±3 gramos. Se inyectaron tanto con ¹⁸⁸Re-dendrímico como ¹⁷⁷Lu-dendrímico en actividades entre 3.7-11.1 MBq (100-300 µCi) por ratón en vía intravenosa a través de la vena de la cola.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical a las 1 h, 4 h y 24 h post inyección. Tanto el tumor como los tejidos y órganos de interés fueron extirpados, pesados y su actividad medida en un contador de centelleo sólido (ORTEC). La actividad captada en los tejidos normales y tumor fue expresada como porcentaje de actividad inyectada (% DI).

5.5 Ensayo de aberraciones cromosómicas

El primer día se procedió a la siembra de 500.000 células de la línea celular B16F1 contenidas en 5 mL en cajas de Petri de 100 × 20 mm.

El día 2 consistió en el tratamiento de las células mediante adición de ¹⁸⁸Re-dendrímico en una actividad de 15 µCi (0.555 MBq) (7 cajas). A su vez se dejaron cultivos sin tratar como control del experimento (7 cajas).

Ambos tipos de cultivos se incubaron por 24 horas.

El día 3 se procedió a la recolección de los cultivos. La técnica empleada se detalla a continuación:

- Se trataron los cultivos con 120 µL de Colcemid (stock: 2 µg/mL) por cada 3 mL de medio total (concentración final 0.08 µg/mL) durante 4 horas.
- Se recolectaron las células mitóticas (en suspensión) transfiriendo el medio de cultivo a un tubo de centrifuga. Se despegó con tripsina las células que quedaron adheridas. Se agregó 1 mL de PBS 1X a las placas, y se colocó en

tubos de centrifuga. Se incubaron las placas con 1 mL de tripsina a 37°C por 2-3 minutos, se resuspendieron, retiraron y fueron transferidas a tubos de centrifuga.

- Se centrifugó a 1500 g durante 10 min y se aspiró el sobrenadante.
- Se resuspendió el pellet celular y se realizó un tratamiento hipotónico con 5 mL de KCl (0.075 M) a 37°C durante 4 min. Se agregó el KCl por la pared del tubo.
- Se prefijó incorporando con una pipeta Pasteur un volumen (pipeta llena) de fijador 3:1 (metanol: ácido acético).
- Se centrifugó a 1500 g durante 10 min y se aspiró el sobrenadante.
- Se resuspendió el pellet celular y se implementó dos fijaciones sucesivas con fijador 3:1 como se describe a continuación:
 - a) se agregó 5 mL de fijador colocando el tubo de centrifuga sobre el vórtex.
 - b) se centrifugó a 1500 g durante 10 min y se aspiró el sobrenadante.
 - c) se resuspendió el pellet celular repitiéndose la fijación. Se centrifugó a 1500 g durante 10 min y se aspiró el sobrenadante dejando un volumen suficiente para realizar los extendidos celulares.
- Se dejó gotear la suspensión celular sobre portaobjetos previamente sumergidos en agua destilada fría y luego se aproximó a la llama de un mechero.

El día 4 se tiñeron las preparaciones con Giemsa al 3 % (1.5 mL de metanol, 2 mL de Giemsa y 46.5 mL de agua destilada, 10 min), se enjuagó con agua y se secó en estufa a 37°C.

5.6 Análisis cuantitativo de las aberraciones cromosómicas (AC)

La acción clastogénica de la radiación de los nanosistemas se evaluó analizando la frecuencia de AC en 500 metafases de los cultivos control y 400 obtenidas de células tratadas, seleccionadas al azar, que presentaron más de 50 centrómeros y que fueron teñidas con el colorante de Giemsa. El análisis se realizó utilizando el programa METAFER de MetaSystems GmbH (Alemania). Esta plataforma de análisis automatizado de metafases funciona en un microscopio AXIOPLAN Mot II (Zeiss, Alemania). Se analizó la frecuencia de todas las AC, con excepción de las lesiones acromáticas. Se consideraron las siguientes AC para el presente estudio: discontinuidades (fractura de cromátida); intercambios (intercambio de cromátida, intercambio de cromátida-isocromátida, dicéntrico, translocación); intracambios interbraquial (anillos de cromátida); intracambios intra-braquial (fractura de isocromátida, delección intersticial, duplicación-delección).

6. Resultados

6.1 Marcación del dendrímero con ^{177}Lu

La marcación del dendrímero conjugado a DOTA con ^{177}Lu se obtuvo con un rendimiento de marcado mayor al 98% y mostró ser estable al menos por 24 horas con rendimientos superiores al 95% (el marcado fue incubado en la solución de marcación por 24 horas a temperatura ambiente). Todos los controles se realizaron por HPLC con detectores gamma y UV (se utilizaron dos longitudes de onda UV-A y UV-B de 260 y 214 nm respectivamente que cubren un alto rango de absorciones), descrito en Materiales y Métodos. En el resultado de HPLC de la Figura 10 se muestran en la parte superior la detección de absorción ultravioleta (UV) en dos longitudes de onda (UV_A, UV_B), los cuales coinciden con la detección gamma de la parte inferior. En rojo se muestra el área bajo de la curva del ^{177}Lu -dendrímero que corresponde al 98%, y en verde se muestra ^{177}Lu libre el cual no fue conjugado al dendrímero, que corresponde al 2 % restante.

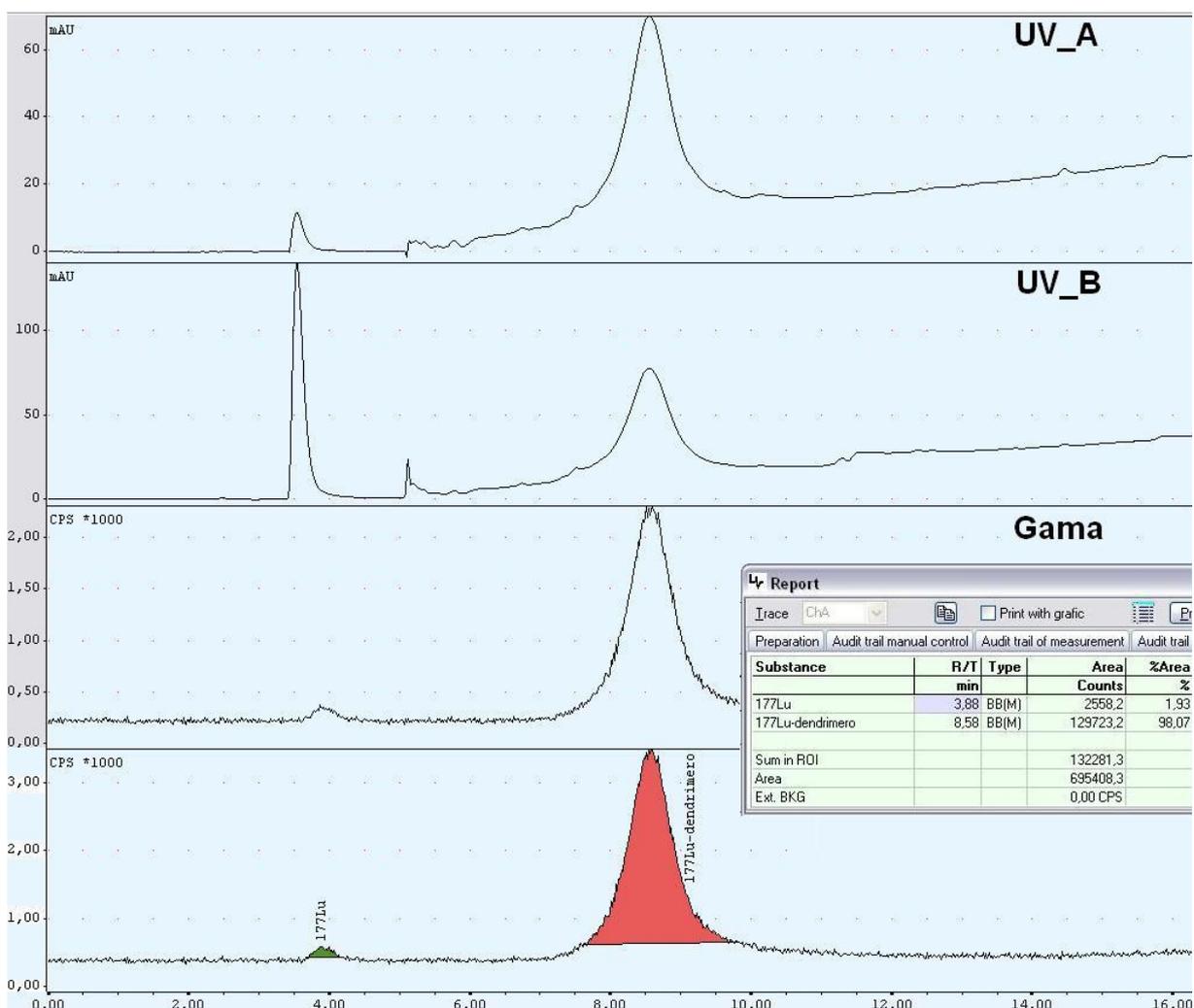


Figura 10. HPLC del marcado ^{177}Lu -dendrímtero mostrando en la parte inferior los picos gamma de ^{177}Lu -dendrímtero (tiempo de retención 8.58 min) y ^{177}Lu libre (tiempo de retención 3.88 min.). En la parte superior se muestran los UV correspondientes.

6.2 Marcación con ^{188}Re

La marcación del dendrímtero conjugado a HYNIC con ^{188}Re se obtuvo con un rendimiento de marcado cercano al 70%, y mostró ser estable al menos por 24 horas con rendimientos superiores al 60% (el marcado fue incubado en la solución de marcación por 24 horas a temperatura ambiente). Todos los controles se realizaron por HPLC con detectores gamma y UV (descrito en Materiales y Métodos). En el resultado del HPLC de la Figura 11 se muestran en la parte superior los dos UV (con diferentes longitudes de onda) que coinciden con los gamma de la parte inferior. En

rojo se muestra el área bajo de la curva del ^{177}Lu -dendrímtero que corresponde al 70%, y en verde se muestra el ^{188}Re que no fue unido al dendrímtero, correspondiendo al 30% restante. Una vez obtenida dicha marcación del 70% se purifica mediante columna de exclusión molecular PD10 para obtener una pureza adecuada.

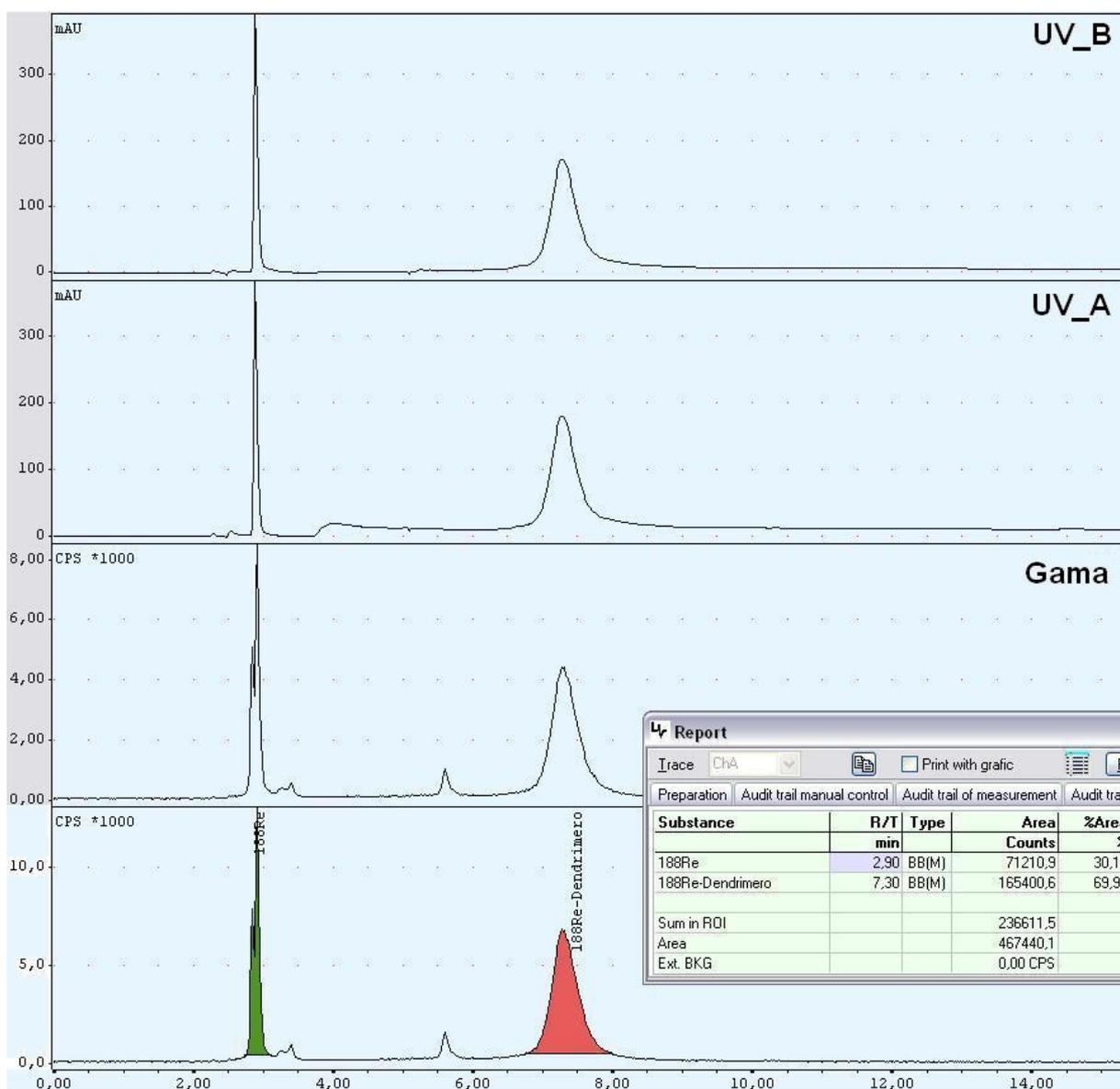


Figura 11. HPLC del marcado ^{188}Re -dendrímtero mostrando en la parte inferior los picos gama de ^{188}Re -dendrímtero (tiempo de retención 7.30 min) y ^{188}Re libre (tiempo de retención 2.90 min.). En la parte superior se muestran los UV correspondientes.

Si bien los rendimientos de marcación con ^{188}Re no fueron tan promisorios como para el ^{177}Lu , se debe realizar un paso previo de purificación por PD10 para proseguir con los estudios de evaluación biológica, obteniéndose una actividad específica baja con respecto al ^{177}Lu -dendrúmero.

6.3 Conjugación del dendrúmero a HYNIC

El Suc-HYNIC (ligando bifuncional activado para la reacción de acoplamiento) se conjugó al dendrúmero PAMAM G4, el cual presenta en la superficie 64 grupos amino primarios, a través de enlace amida [Figura 12]. La reacción del dendrúmero G4 PAMAM-NH₂ con Suc-HYNIC dio lugar a la formación de un grupo amida, G4-HYNIC [Figura 13]. El enlace amida resultó estable entre el dendrúmero y HYNIC. El pico característico en 3.2 ppm (Ha') en el espectro de ¹H-RMN, que corresponde a los protones alifáticos de CH₂NHC=O, confirmó la formación de un grupo amida entre PAMAM G4-NH₂ y HYNIC [Figura 13]. El número de moléculas de HYNIC a la superficie dendrúmero se estimó mediante RMN de protón, mediante la comparación de los protones de los grupos metileno del dendrúmero, con los protones Ha' de grupos metileno en el grupo amida terminal y protones aromáticos de HYNIC, los que sugirieron que 16 moléculas de HYNIC se unieron al dendrúmero. Además, la presencia de protones aromáticos en el ¹H-RMN con desplazamientos químicos de 8.5 (Hi), 8.0 (Hii) y 6.8 ppm (Hiii) de HYNIC confirma la formación de G4-HYNIC [Figura 13].

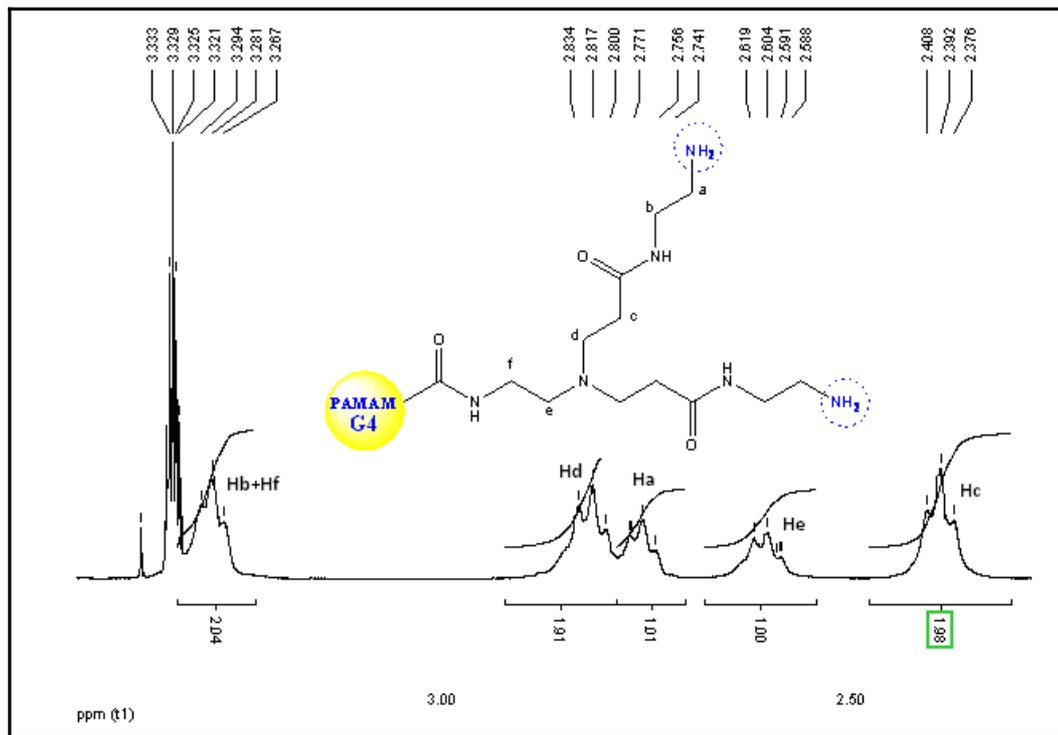


Figura 12. ^1H -RMN (MeOD) del dendrímtero PAMAM 4.

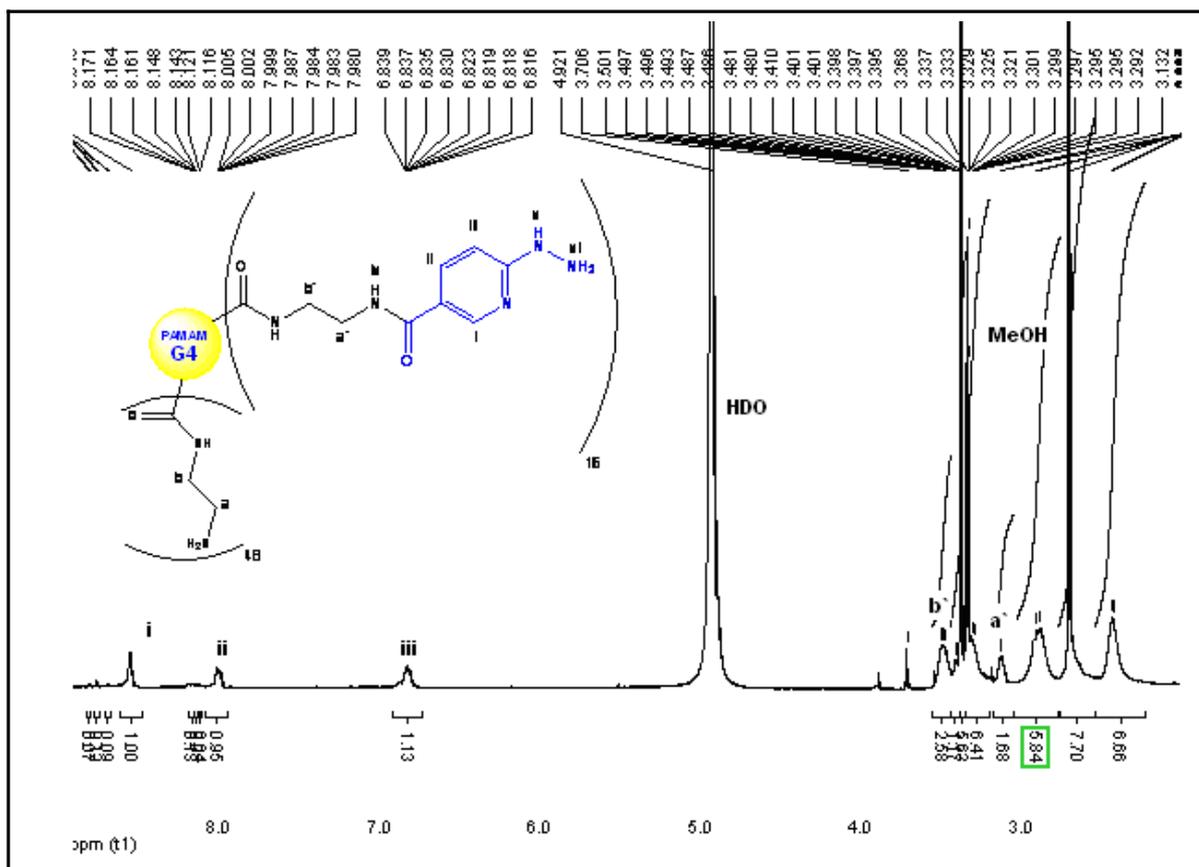


Figura 13. ^1H -RMN (MeOD) del dendrímtero PAMAM-4-HYNIC.

6.4 Evaluación biológica

Se realizaron estudios de biodistribución tanto de ^{177}Lu -dendrímico como de ^{188}Re -dendrímico en ratones C57 normales y con melanoma inducido (línea celular B16-F1), de 2 meses de edad con un peso aproximado de 30 g a distintos tiempos (1, 4 y 24 h). Todas las inyecciones se realizaron a través de la vena de la cola.

Los resultados para el ^{177}Lu -dendrímico en ratones normales se muestran en la figura 14 donde se observa una alta captación hepática ($35\% \pm 3\%$, $34\% \pm 5\%$ y $25\% \pm 8\%$ para 1, 4 y 24 h) y eliminación renal ($5\% \pm 3\%$, $10\% \pm 4\%$, $11\% \pm 5\%$ para 1, 4 y 24 h, respectivamente).

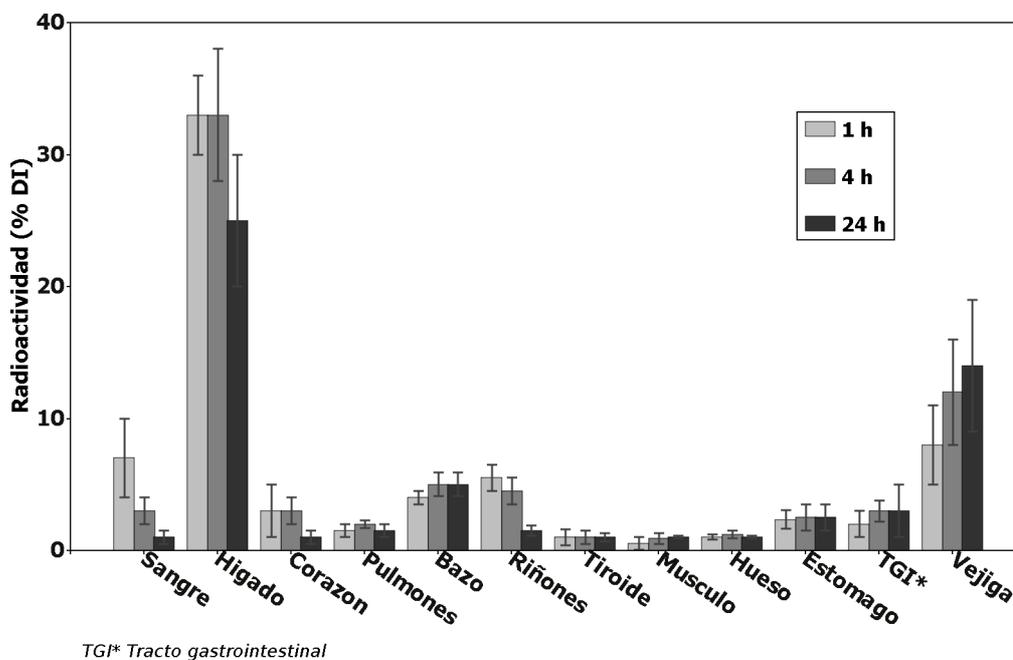


Figura 14. Se observa la biodistribución de ^{177}Lu -dendrímico en ratones C57 normales (3 por punto), donde se grafica el porcentaje de la dosis inyectada (%DI) por órgano en diferentes tiempos (1, 4 y 24 h).

En los ratones con melanoma [Figura 15] se observa el mismo patrón de biodistribución que para los ratones normales. Fue interesante observar que la

captación tumoral para ^{177}Lu -dendrímtero fue significativa a partir de 1 h post inyección ($5.2\% \pm 2\%$) manteniéndose a lo largo de las 24 horas.

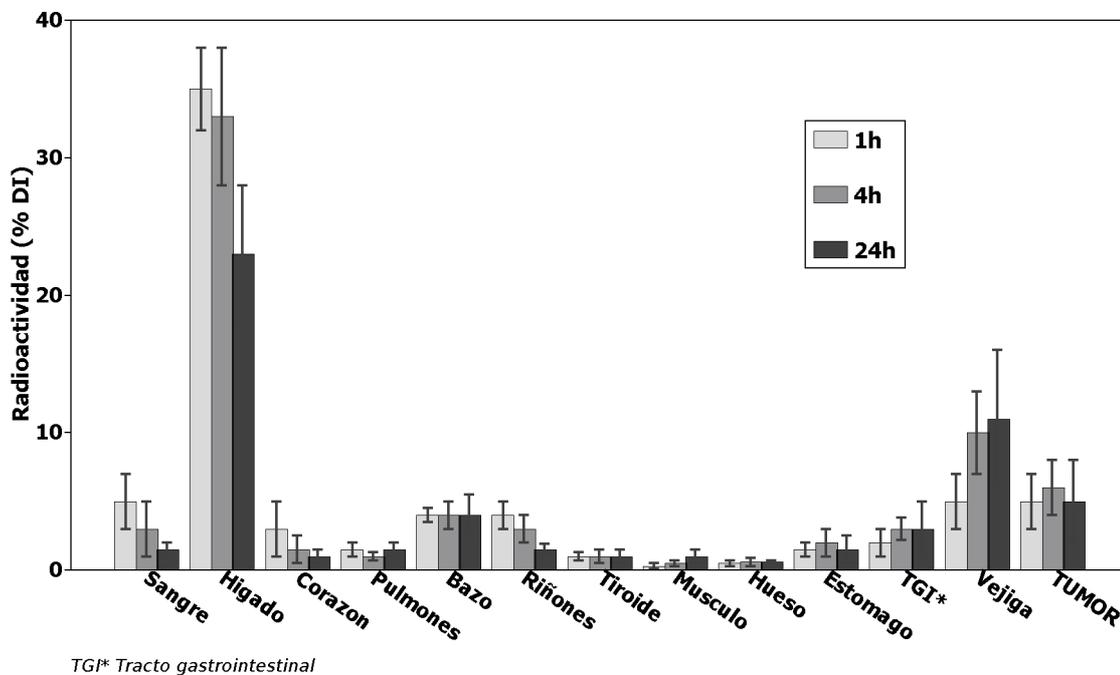


Figura 15. Se observa la biodistribución de ^{177}Lu -dendrímtero en ratones C57 con tumor inducido (3 por punto), donde se grafica el porcentaje de la dosis inyectada (%DI) por órgano en diferentes tiempos (1, 4 y 24 h).

Los resultados para el ^{188}Re -dendrímtero en ratones normales se muestran en la figura 16 donde se observa al igual que para ^{177}Lu -dendrímtero, una alta captación hepática ($30\% \pm 2\%$, $35\% \pm 5\%$ y $21\% \pm 5\%$ para 1, 4 y 24 h) y eliminación renal ($10\% \pm 1\%$, $12\% \pm 3\%$, $16\% \pm 5\%$ para 1, 4 y 24 h, respectivamente).

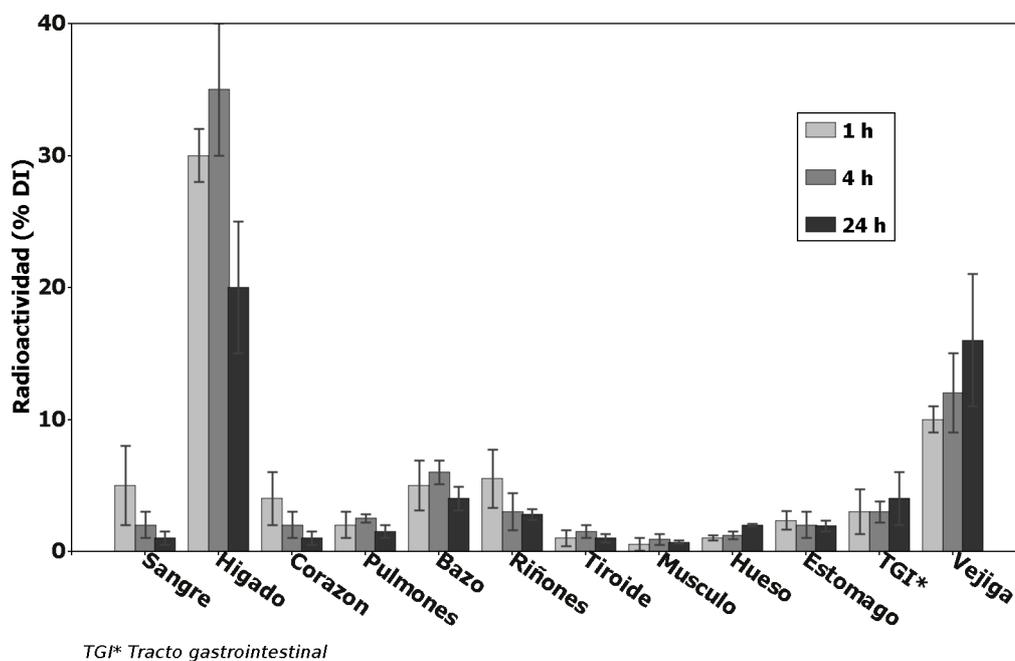


Figura 16. Se observa la biodistribución de ^{188}Re -dendrímtero en ratones C57 normales (3 por punto), donde se grafica el porcentaje de la dosis inyectada (%DI) por órgano en diferentes tiempos (1, 4 y 24 h).

Al igual que para los ratones inyectados con ^{177}Lu -dendrímtero, los ratones con melanoma inyectados con ^{188}Re -dendrímtero [Figura 17] se obtienen similares patrones de acumulación en los órganos y el tumor. Aunque en éste último los porcentajes de acumulación son algo menores (entre 4 y 5%) que para los inyectados con ^{177}Lu -dendrímtero (entre 5 y 6%).

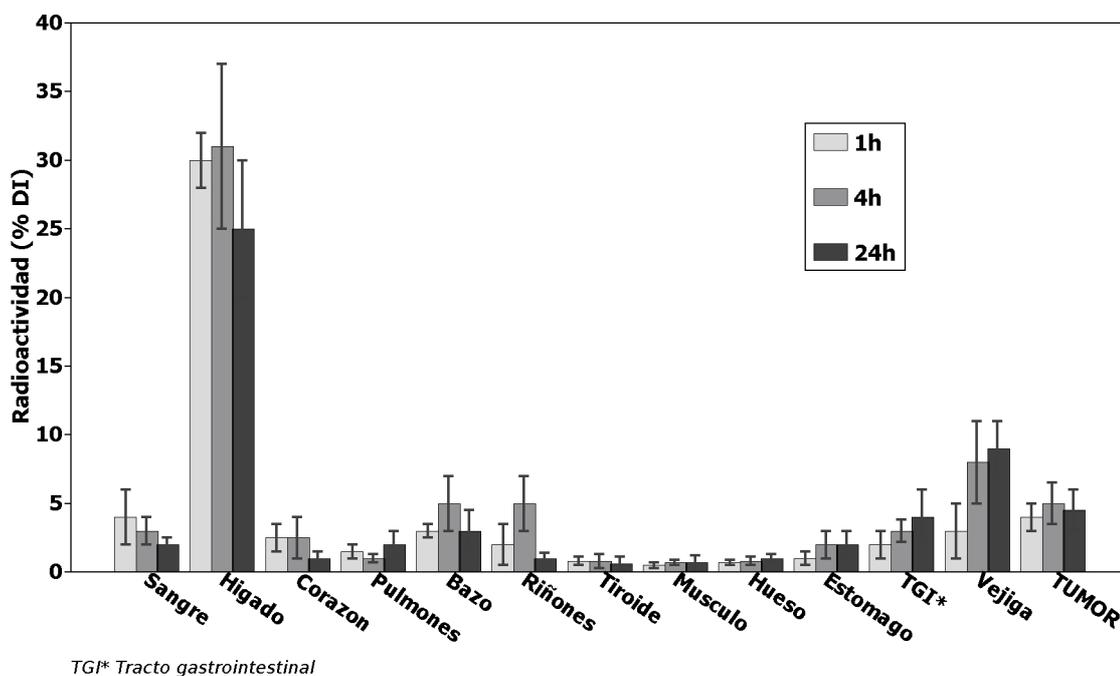


Figura 17. Se observa la biodistribución de ^{188}Re -dendrímtero en ratones C57 con tumor inducido (3 por punto) graficándose el porcentaje de la dosis inyectada (%DI) por órgano en diferentes tiempos (1, 4 y 24 h).

6.5 Ensayo de aberraciones cromosómicas

La acción clastogénica de la radiación de los nanosistemas fue evaluada analizando la frecuencia de AC en 500 metafases de los cultivos control y 400 metafases obtenidas de células tratadas, seleccionadas al azar, que presentaran 50 o mas centrómeros y que fueron teñidas con el colorante de Giemsa. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. En las células control se cuantificó un 7 % de metafases anormales que corresponden únicamente a fragmentos. En el caso de las células tratadas con 15 μCi (0.555 MBq) por 24 horas de ^{188}Re -dendrímtero el porcentaje de metafases anormales se elevó a 29.5%, correspondiendo tanto a fragmentos (29.25 %) como a intercambios (0.25%).

| Línea celular B16-F1 | Actividad μCi (MBq) | Metafasas normales (%) | Metafasas anormales (%) | Aberraciones / 100 células | |
|----------------------|------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------|
| | | | | fragmentos | intercambios |
| Control | 0 | 93 | 7 | 7 | 0 |
| Tratadas | 15 (0.555) | 70,5 | 29,5 | 29,25 | 0,25 |

Tabla 3. Diferentes aberraciones contadas a partir de 500 metafases de los cultivos control y 400 metafases obtenidas de células tratadas. El control corresponde a células sin tratamiento (se recolectan en 24 h) mientras que las células tratadas, corresponde a células que fueron incubadas 24 h con 15 μCi (0.555 MBq) de ¹⁸⁸Re-dendrímico.

6.6 Imágenes microscópicas de las aberraciones cromosómicas

Diferentes imágenes fueron obtenidas del microscopio descrito en Materiales y Métodos, mientras se realizaban las tareas de conteo y análisis. En la Figura 18 se muestra la imagen de un cariotipo de B16F1 sin tratamiento y que no posee AC. En la Figura 19 se muestran diferentes AC obtenidas luego del tratamiento.

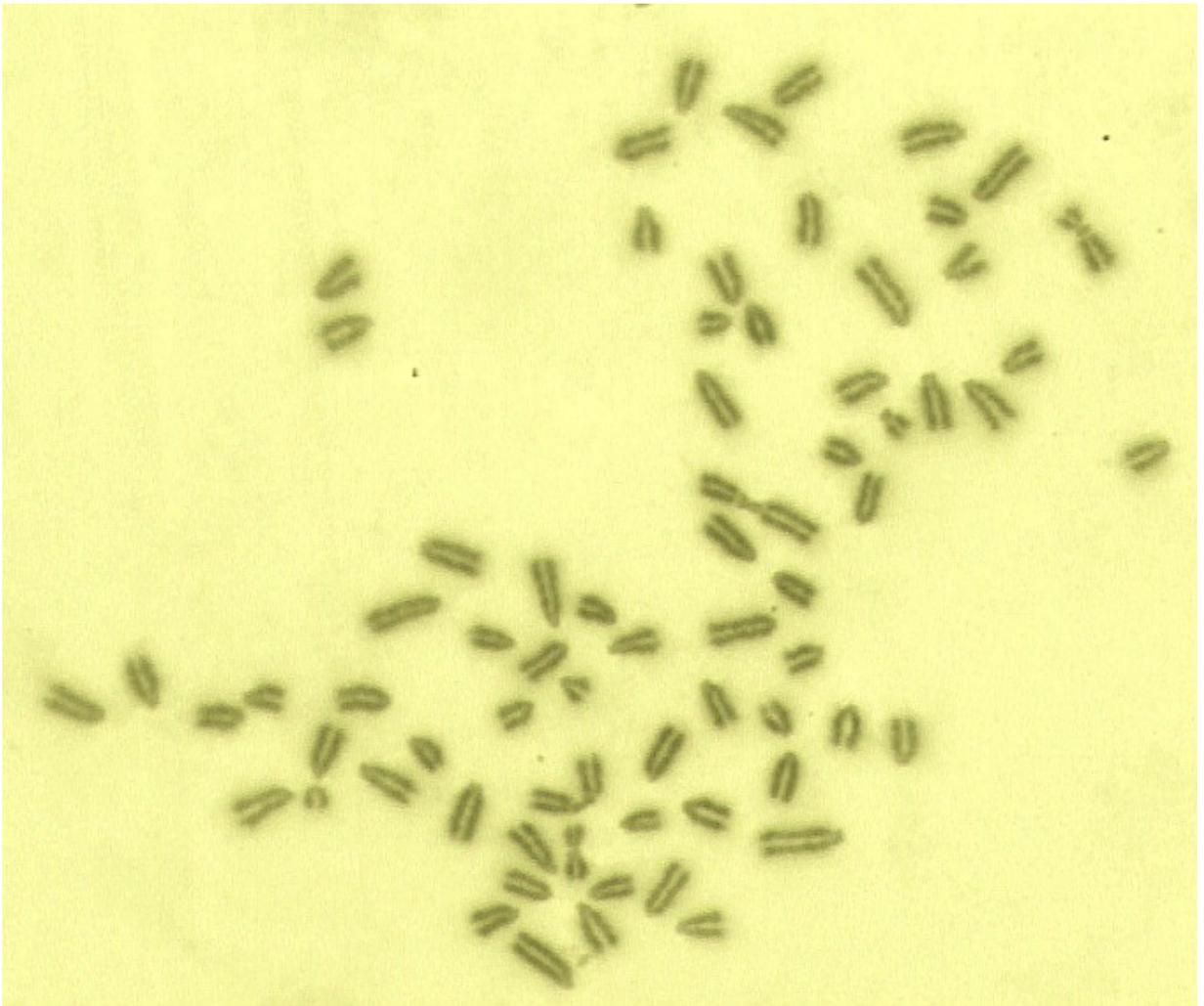


Figura 18. Imagen microscópica de una metafase sin tratamiento (normal) con 67 cromosomas de las células B16F1.

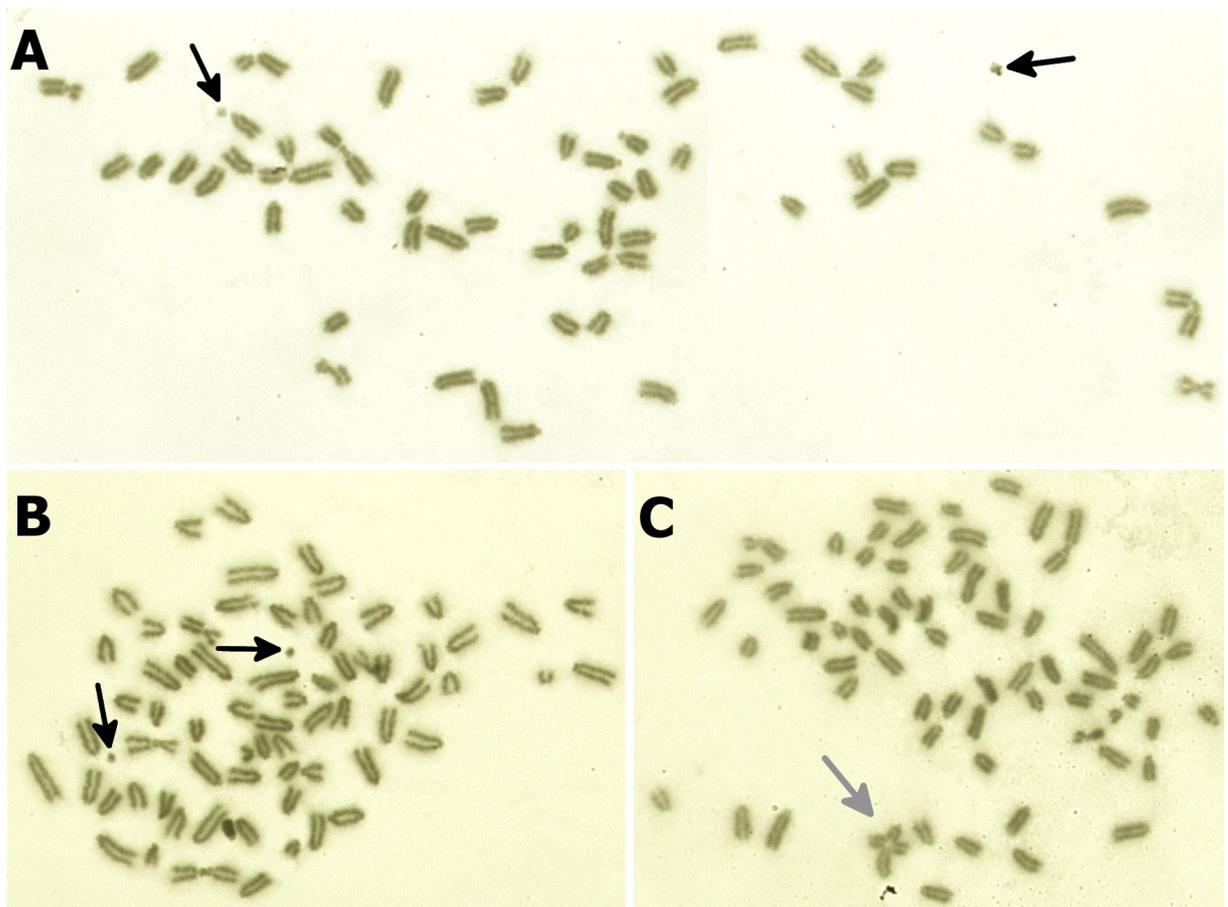


Figura 19. Imágenes microscópicas de metafases correspondientes a cultivos de células B16F1 incubados con 15 μCi (0.555 MBq) de ^{188}Re -dendrímtero por 24 h. En las metafases A) y B) se señala con flechas negras diferentes fragmentos de cromosoma. En la imagen C) se muestra con una flecha gris un intercambio cromosómico.

7. Discusión

En este trabajo de Tesis de Maestría se demostró que la marcación radioactiva de los dendrímeros PAMAM generación 4 con radionucleidos emisores beta es posible. La conjugación al agente quelante bifuncional DOTA y la marcación con ^{177}Lu fue realizado en forma sencilla y con un rendimiento de marcado del 98% [Figura 10] manteniéndose alrededor del 95% 24 h post-marcación. Este hecho sugiere una excelente resistencia del conjugado a la radiólisis por parte del ^{177}Lu y una muy buena estabilidad química del mismo.

La conjugación con el ligando HYNIC resultó eficiente ya que el dendrímero PAMAM-NH₂ G4 posee sitios de unión que incluyen 64 grupos superficiales de amina primaria, 62 grupos de amina terciaria internos y 124 grupos amida. Debido a esta complejidad es difícil hablar de una estequiometría definida con referencia a los procesos de unión de un ligando con la macromolécula de dendrímero. Mediciones ^1H -RMN indicarían que el dendrímero se une a las moléculas de HYNIC vía los grupos aminas superficiales. Los grupos superficiales de amina de un dendrímero G4 PAMAM-NH₂ se transformaron en derivados de amida por medio de reacción con HYNIC. El análisis de los datos de RMN mostró una proporción de aproximadamente 16 moléculas de HYNIC por molécula del dendrímero PAMAM G4 [Figuras 12 y 13]. Si bien se logró la marcación con ^{188}Re , la misma no resultó sencilla y presentó menores rendimientos en comparación con la correspondiente a ^{177}Lu [Figura 11]. Las condiciones para la marcación con ^{188}Re fueron de una concentración de reductor muy alta ya que se necesita reducir el Re(VII) del $^{188}\text{ReO}_4^-$ hacia un estado de oxidación menor, todo esto debido a un tasa de reducción pobre y una lenta química redox del renio. Aún así, se obtuvo un 70% de rendimiento de marcado. Se debe incluir un paso de purificación antes de utilizarlo en los ensayos biológicos.

En cuanto a la estabilidad y distribución *in vivo* demostraron poseer una alta depuración sanguínea y alta captación hepática que se corresponde con los resultados obtenidos para aquellos marcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ del trabajo publicado en 2011 [34, ver apéndice]. La alta depuración sanguínea se debe a una captura de los ^{177}Lu -dendrímero por parte del sistema hepático [Figuras 14-17], el cual se encarga de la eliminación de sustancias y partículas extrañas a través de la fagocitosis. La carga catiónica de los dendrímeros PAMAM contribuye a una interacción inespecífica con el tejido hepático aumentando aún más la retención. Si se pretende una mayor circulación sanguínea se

debería buscar una estrategia de modificación de la superficie del dendrímero para disimular su carga y así modificar su biodistribución [36, 37].

Por otro lado, se observa depuración por parte del sistema renal ya que el umbral de filtración glomerular tolera bien moléculas de 14 KDa como los dendrímeros [42]. La captación por parte del tumor correspondió al 6% del total de la dosis inyectada manteniéndose a lo largo del tiempo. Esta captación es debida al aumento en la permeabilidad y retención de macromoléculas en los tumores sólidos, como es el caso de los dendrímeros y el modelo de melanoma utilizado. Existe un mecanismo adicional de retención de los dendrímeros por parte de los tumores que resulta de la endocitosis por las células del melanoma [34, 35, ver apéndice]. Una de las vías de endocitosis es debida a la formación de huecos transitorios en la membrana celular por dendrímeros catiónicos como es el caso del PAMAM G4. Una vez en el interior celular, se disponen de manera perinuclear sin ingresar al núcleo [34, ver apéndice]. Si bien la cercanía al núcleo no es una condición limitante para la radiación beta utilizada (rango medio de penetración en tejido tumoral: ^{188}Re , 2.4 mm. ^{177}Lu , 0.67 mm), sí es importante para una dosis focalizada y homogénea del ADN nuclear. También es importante en la marcación para terapia con emisores beta menos energéticos, o para emisores alfa o electrones Auger que poseen rangos de micrómetros y nanómetros respectivamente de penetración en tejidos. Se debe considerar también que el ensayo AC fue realizado en un modelo *in vitro* utilizando cajas de Petri, en el cual las células B16F1 estaban en suspensión en un volumen de 5 mL. En el modelo *in vivo* el volumen tumoral es alrededor de 2.2 cm³ o sea la mitad del volumen *in vitro*. El volumen *in vivo* se distribuye en una forma más o menos esférica (tumor sólido), mientras que el volumen *in vitro* se dispone en forma cilíndrica (forma de la placa de Petri). Esto es importante ya que la distribución de dosis radioactiva es mas eficiente en esferas por el efecto de fuego cruzado [Figura 9], donde una trayectoria beta alcanza mas células (núcleos) que en formas cilíndricas planas como es el caso del ensayo *in vitro*. Por lo tanto, sería de esperar un mayor efecto de las radiaciones en el modelo tumoral *in vivo* (volumen menor y forma esférica) comparado con las condiciones *in vitro* (volumen mayor y forma cilíndrica). Se dispuso la incubación de las células para el ensayo de AC con 15 μCi (0.555 MBq) de ^{188}Re -dendrímero por 24

h, lo cual corresponde al 6% de la dosis inyectada a un ratón (alrededor de 250 μCi , 9.25 MBq) simulando el total captado por el tumor en el ensayo *in vivo*.

En el ensayo de AC se cuantificó en las células control un 7% de metafases anormales que corresponden únicamente a fragmentos. En el caso de las células tratadas con 15 μCi (0.555 MBq) por 24 horas con ^{188}Re -dendrímico el porcentaje de metafases anormales fue de 29,5%, correspondiendo tanto a fragmentos (29.25%) como a intercambios (0.25%) [Tabla 3]. Por lo tanto, existe un aumento significativo en los niveles de metafases anormales y a su vez una diversificación del daño al constatarse un 0.25% de intercambios. Tanto los fragmentos como los intercambios son productos de roturas de doble hebra del ADN inducida únicamente por los efectos de las radiaciones ionizantes, descartándose el posible daño producto de otra fuente no radioactiva. Si las lesiones de doble hebra no son reparadas o son mal reparadas debido a una alta tasa de daño genético puede dar lugar a la detención del ciclo celular, y por lo tanto a la inducción de la apoptosis, o muerte celular causada por la pérdida de material genómico. La apoptosis y la muerte celular es un efecto deseado en el tratamiento de las células malignas con agentes radioactivos. Si bien en el presente trabajo, la muerte celular no fue evaluada directamente, la alta tasa de daño cromosómico determinada *in vitro* por el ensayo de AC de las células incubadas con ^{188}Re -dendrímico por 24 h, promovería eventualmente mayor muerte de estas células. Existen un reducido número de trabajos en la literatura que abordan las AC debido a radiaciones beta [150, 151]. Por lo general estos trabajos están enfocados al daño a células periféricas normales (células de la sangre) debido al daño colateral generado por tratamientos con agentes beta en pacientes.

El aporte del presente trabajo, fue mostrar que es posible desarrollar nanosistemas dendriméricos estables conjugados covalentemente con radioisótopos emisores beta. Estos nanoconjugados fueron captados por el tumor (melanoma) *in vivo*, inducidos en los ratones por administración subcutánea de células de melanoma B16F1. Los dos tipos de nanosistemas marcados radioactivamente (con emisores beta), mostraron buena captación por el tumor. Se logró un ensayo *in vitro* eficiente para medir de forma cuali- y cuantitativa el daño molecular de un cultivo de células tumorales resultante del tratamiento con un agente radiactivo beta (^{188}Re -dendrímico).

Como trabajo para un futuro inmediato, se podría plantear la perspectiva de evaluar daño por AC en tejidos tumorales de animales vivos que fueran expuestos a agentes terapéuticos radioactivos. Esto permitiría una aproximación realista de la dosis radiactiva que llega y permanece en el tumor así como también el daño efectivo del ADN. Sería interesante, complementar las medidas de daño del ADN *in vivo* con medidas de reducción del tamaño tumoral. También sería muy interesante, realizar biopsias del tumor tratado para determinar muerte celular utilizando marcadores específicos. Otra posibilidad interesante, radica en la unión de otros isótopos beta de diferentes energías o también isótopos alfa de menor alcance (teniendo en cuenta la distribución celular del dendrímero), generando un radiofármaco de terapia con los mayores índices posibles de daño al ADN en tejidos tumorales.

8. Bibliografía

1. Smith AM, Nie S: Semiconductor nanocrystals: structure, properties, and band gap engineering. *Acc Chem Res* 43 (2): 190-200, 2010.
2. Daniel M-C, Astruc D: Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev* 104 (1): 293-346, 2004.
3. NCT00848042: Pilot study of Aurolaser™therapy in refractory and/or recurrent tumors of the head and neck. Full text view. Available from: ClinicalTrials.gov.
4. Van Eerdenbrugh B, Van den Mooter G, Augustijns P: Top-down production of drug nanocrystals: nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. *Int J Pharma* 364 (1): 64-75, 2008.
5. O'Neal DP, Hirsch LR, Halas NJ, Payne JD, West JL: Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer Lett* 209 (2): 171-176, 2004.
6. Chou LY, Ming K, Chan WC: Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem Soc Rev* 40: 233-245, 2010.
7. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW: Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett* 6 (4): 662-668, 2006.
8. Clift MJD, Rothen-Rutishauser B, Brown DM, Duffin R, Donaldson K, Proudfoot L, et al.: The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 232 (3): 418-427, 2008.
9. [Kwong GA](#), [von Maltzahn G](#), [Murugappan G](#), [Abudayyeh O](#), [Mo S](#), [Papayannopoulos IA](#), [Sverdlov DY](#), [Liu SB](#), [Warren AD](#), [Popov Y](#), [Schuppan D](#), [Bhatia SN](#): Mass-encoded synthetic biomarkers for multiplexed urinary monitoring of disease. *Nat Biotechnol* 31: 63-70, 2013.
10. Shao H, Chung J, Balaj L, Charest A, Bigner DD, Carter BS, Hochberg FH, Xandra, Breakefield O, Weissleder R, Lee H: Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nat Med* 18 (12):1835-1840, 2012.
11. [Malhotra R](#), [Patel V](#), [Chikkaveeraiah BV](#), [Munge BS](#), [Cheong Sch](#), [Zain RB](#), [Abraham MT](#), [Dey DK](#), [Gutkind JS](#), [Rusling JF](#): Ultrasensitive Detection of Cancer Biomarkers in the Clinic by Use of a Nanostructured Microfluidic Array. *Anal Chem* 84 (14): 6249-6255, 2012.
12. [Bitner BR](#), [Marcano DC](#), [Berlin JM](#), [Fabian RH](#), [Cherian L](#), [Culver JC](#), [Dickinson ME](#), Robertson CS, [Pautler RG](#), [Kent TA](#), [Tour JM](#). Sydney, Australia 4 - 8 November 2012. 26. Antioxidant Carbon Particles Improve Cerebrovascular Dysfunction Following Traumatic Brain Injury. International Conference on 3D Radiation Dosimetry. *ACS Nano* 6 (9): 8007-8014, 2012.
13. [Xiao Y](#), [Gao X](#), [Taratula O](#), [Treado S](#), [Urbas A](#), [Holbrook RD](#), [Cavicchi RE](#), [Avedisian CT](#), [Mitra S](#), [Savla R](#), [Wagner PD](#), [Srivastava S](#), [He H](#): Anti-HER2 IgY antibody-functionalized single-walled carbon nanotubes for detection and selective destruction of breast cancer cells. *BMC Cancer* 9: 351, 2009.
14. Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, Thun MJ: Global Cancer Facts and Figures. American Cancer Society 2008.
15. Adams GP, Weiner LM: Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 23:1147-1157, 2005.

16. Reichert JM, Valge-Archer VE: Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6: 349-356, 2007.
17. Carter PJ: Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 6: 343-357, 2006.
18. Allen TM, Cullis PR: Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* 303: 1818-1822, 2004.
19. Davis ME, Chen ZG and Shin DM: Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov* 7: 771-782, 2008.
20. Ferrari M: Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* 5: 161-171, 2005.
21. Lammers T, Hennink WE and Storm G: Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice. *Br J Cancer* 99: 392-397, 2008.
22. Sanhai WR, Sakamoto JH, Canady R and Ferrari M: Seven challenges for nanomedicine. *Nat Nanotechnol* 3: 242-244, 2008.
23. Tomalia DA, Baker H, Dewald JR, Hall M, Kallos G, Martin S, Roeck J, Ryder J, Smith P: A new class of polymers: Starburst- dendritic macromolecules. *Polym J* 17, 117-132, 1985.
24. Svenson S, Tomalia DA: Dendrimers in biomedical applications reflections on the field. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 2106-2129, 2005.
25. Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, Roeck J, Ryder J, Smith P: Dendritic macromolecules: synthesis of starburst dendrimers. *Macromolecules* 19, 2466-2468, 1986.
26. Newkome GR, Yao Z, Baker GR, Gupta VK: Cascade molecules: a new approach to micelles. *J Org Chem* 50 (11): 2003-2004, 1985.
27. Hawker CJ, Fréchet JM: Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *J Am Chem Soc* 112: 7638-7647, 1990.
28. Zhang ZY, Smith BD: High-generation polycationic dendrimers are unusually effective at disrupting anionic vesicles: membrane bending model. *Bioconj Chem* 11: 805-814, 2000.
29. Karoonuthasiri N, Titiyevskiy K, Thomas JL: Destabilization of fatty acid-containing liposomes by polyamidoamine dendrimers. *Colloid Surf B* 27: 356-375, 2003.
30. Mecke A, Uppuluri S, Sassanella TM, Lee DK, Ramamoorthy A, Baker JR, Orr BG, Banaszak Holl MM: Direct observation of lipid bilayer disruption by poly(amidoamine) dendrimers. *Chem Phys Lipids* 132 (1): 3-14, 2004.
31. Uppuluri S, Piehler L, Li J, Hagnauer GL, Tomalia DA: Core-shell tecto(dendrimers): 1. Synthesis and characterization of saturated shell models. *Adv Mater* 12: 796-800, 2000.
32. Seib FP, Jones AT, 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.
33. Tassano MR, Audicio PF, Gambini JP, Fernandez M, Damian JP, Moreno M, Chabalgoity JA, Alonso O, Benech JC, Cabral P: [Development of ^{99m}Tc\(CO\)₃-dendrimer-FITC for cancer imaging](#). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21: 5598-5601, 2011.

34. [Oddone N](#), [Zambrana AI](#), [Tassano M](#), [Porcal W](#), [Cabral P](#), [Benech JC](#): Cell uptake mechanisms of PAMAM G4-FITC dendrimer in human myometrial cells. *J Nanopart Res* **15**: 1776, 2013.
35. Hong S, Bielinska AU, Mecke A, Keszler B, Beals JL, Shi X, Balogh L, Orr BG, Baker JR, Banaszak Holl MM: Interaction of poly (amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayers and cells: hole formation and the relation to transport, *Bioconj Chem* **15**: 774–782, 2004.
36. Diallo MS, Christie S, Swaminathan P, Balogh L, Shi X, Um W, Papelis C, Goddard WA, Johnson JH Jr: Dendritic chelating agents. 1. Cu(II) binding to ethylene diamine core poly(amidoamine) dendrimers in aqueous solutions. *Langmuir* **20**: 2640–2651, 2004.
37. Fuchs S, Kapp T, Otto H, Schoneberg T, Franke P, Gust R, Schluter AD: A surface-modified dendrimer set for potential application as drug delivery vehicles: synthesis, in vitro toxicity, and intracellular localization. *Chemistry* **10**: 1167-1192, 2004.
38. Chen HT, Neerman MF, Parrish AR, Simanek EE: Cytotoxicity, hemolysis, and acute in vivo toxicity of dendrimers based on melamine, candidate vehicles for drug delivery. *J Am Chem Soc* **126**: 10044-10048, 2004.
39. Roberts JC, Bhalgat MK, Zera RT: Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst dendrimers. *J Biomed Mater Res* **30**: 53-65, 1996.
40. Gillies ER, Dy E, Fréchet JM, Szoka FC: Biological evaluation of polyester dendrimer: poly(ethylene oxide) “bow-tie” hybrids with tunable molecular weight and architecture. *Mol Pharm* **2**: 129-138, 2005.
41. Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y: Distribution and tissue uptake of poly (ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. *J Pharm Sci* **83**: 601-606, 1994.
42. Okuda T, Kawakami S, Maeie T, Niidome T, Yamashita F, Hashida M: Biodistribution characteristics of amino acid dendrimers and their PEGylated derivatives after intravenous administration. *J Control Release* **114**: 69-77, 2006.
43. Nigavekar SS, Sung LY, Llanes M, El-Jawahri A, Lawrence TS, Becker CW, Balogh L, Khan MK: 3H dendrimer nanoparticle organ/ tumor distribution. *Pharm Res* **21**: 476-483, 2004.
44. Heuser LS, Miller FN: Differential macromolecular leakage from the vasculature of tumors. *Cancer* **57**: 461-464, 1986.
45. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K: Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *J Controlled Release* **65**: 271-284, 2000.
46. Jain RK: Barriers to drug-delivery in solid tumors. *Sci Am* **271**: 58-65, 1994.
47. Prakash S, Malhotra M, Shao W, Tomaro-Duchesneau C, Abbasi S: Polymeric nanohybrids and functionalized carbon nanotubes as drug delivery carriers for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* **63**: 1340-1351, 2011.
48. Choi Y, Baker JR Jr: Targeting cancer cells with DNA-assembled dendrimers: A mix-and-match strategy for cancer. *Cell Cycle* **4**: 669-671, 2005.
49. Wiener EC, Konda S, Shadron A, Brechbiel M, Gansow O: Targeting dendrimer-chelates to tumors and tumor cells expressing the high-affinity folate receptor. *Invest Radiol* **32**: 748-754, 1997.

50. Wiener EC, Brechbiel MW, Brothers H, Magin RL, Gansow OA, Tomalia DA, Lauterbur PC: Dendrimer-based metal chelates: a new class of magnetic resonance imaging contrast agents. *Magn Reson Med* 31: 1-8, 1994.
51. Bourne MW, Margerun L, Hylton N, Champion B, Lai JJ, Derugin N, Higgins CB: Evaluation of the effects of intravascular MR contrast media (gadolinium dendrimer) on 3D time of flight magnetic resonance angiography of the body. *J Magn Reson Imaging* 6: 305-310, 1996.
52. Kobayashi H, Sato N, Kawamoto S, Saga T, Hiraga A, Haque TL, Ishimori T, Konishi J, Togashi K, Brechbiel MW: Comparison of the macromolecular MR contrast agents with ethylenediamine-core versus ammonia-core generation-6 polyamidoamine dendrimer. *Bioconjug Chem* 12: 100-107, 2001.
53. Kobayashi H, Reijnders K, English S, Yordanov AT, Milenic DE, Sowers AL, Citrin D, Krishna MC, Waldmann TA, Mitchell JB, Brechbiel MW: Application of a macromolecular contrast agent for detection of alterations of tumor vessel permeability induced by radiation. *Clin Cancer Res* 10: 7712-7720, 2004.
54. Dvorak HF: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 20: 4368-4380, 2002.
55. Znati CA, Rosenstein M, Boucher Y, Epperly MW, Bloomer WD, Jain RK: Effect of radiation on interstitial fluid pressure and oxygenation in a human tumor xenograft. *Cancer Res* 56: 964-968, 1996.
56. Kobayashi H, Kawamoto S, Brechbiel MW, Bernardo M, Sato N, Waldmann TA, Tagaya Y, Choyke PL: Detection of lymph node involvement in hematologic malignancies using micromagnetic resonance lymphangiography with a gadolinium-labeled dendrimer nanoparticle. *Neoplasia* 7: 984-991, 2005.
57. Kobayashi H, Kawamoto S, Bernardo M, Brechbiel MW, Knopp MV, Choyke PL: Delivery of gadolinium-labeled nanoparticles to the sentinel lymph node: comparison of the sentinel node visualization and estimations of intra-nodal gadolinium concentration by the magnetic resonance imaging. *J Control Release* 111: 343-351, 2006.
58. Langereis S, de Lussanet QG, van Genderen MH, Meijer EW, Beets-Tan RG, Griffioen AW, van Engelshoven JM, Backes WH: Evaluation of Gd(III)DTPA-terminated poly(propylene imine) dendrimers as contrast agents for MR imaging. *NMR Biomed* 19: 133-141, 2006.
59. Fu Y, Nitecki DE, Maltby D, Simon GH, Berejnoi K, Raatschen HJ, Yeh BM, Shames DM, Brasch RC: Dendritic iodinated contrast agents with PEG-cores for CT imaging: synthesis and preliminary characterization. *Bioconjug Chem* 17: 1043-1056, 2006.
60. Thomas TP, Myaing MT, Ye JY, Candido K, Kotlyar A, Beals J, Cao P, Keszler B, Patri AK, Norris TB, Baker JR Jr: Detection and analysis of tumor fluorescence using a two-photon optical fiber probe. *Biophys J* 86: 3959-3965, 2004.
61. [Laznickovaa A](#), [Biricovaa V](#), [Laznickeb M](#), [Hermannc P](#): Mono(pyridine-N-oxide) DOTA analog and its G1/G4-PAMAM dendrimer conjugates labeled with ¹⁷⁷Lu: Radiolabeling and biodistribution studies. *Appl Radiat Isot* 84: 70-7, 2014.
62. Emfietzoglou D, Kostarelos K, Sgouros G: An analytic dosimetry study for the use of radionuclide-liposome conjugates in internal radiotherapy. *J Nucl Med* 42: 499-504, 2001.

63. Harrington KJ, Mohammadtaghi S, Uster PS, Glass D, Peters AM, Vile RG, Stewart JS: Effective targeting of solid tumors in patients with locally advanced cancers by radiolabeled pegylated liposomes. *Clin Cancer Res* 7: 243-254, 2001.
64. Phillips WT, Goins B, Bao A: Radioactive liposomes. *Interdiscipl Rev Nanomed Nanobiotechnol* 1: 69-83, 2009.
65. Wang SX, Bao A, Herrera SJ, Phillips WT, Goins B, Santoyo C, Miller FR, Otto RA: Intraoperative. ¹⁸⁶Re-liposome radionuclide therapy in a head and neck squamous cell carcinoma xenograft positive surgical margin model. *Clin Cancer Res* 14: 3975-3983, 2008.
66. Phillips WT, Klipper R and Goins B: Novel method of greatly enhanced delivery of liposomes to lymph nodes. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 309-313, 2000.
67. Harrington KJ, Rowlinson-Busza G, Syrigos KN, Vile RG, Uster PS, Peters AM, Stewart JS: Pegylated liposome-encapsulated doxorubicin and cisplatin enhance the effect of radiotherapy in a tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 6: 4939-4949, 2000.
68. Huber PE, Bischof M, Jenne J, Heiland S, Peschke P, Saffrich R, Grone HJ, Debus J, Lipson KE, Abdollahi A: Trimodal cancer treatment: beneficial effects of combined antiangiogenesis, radiation, and chemotherapy. *Cancer Res* 65: 3643-3655, 2005.
69. Lammers T, Subr V, Peschke P, Kuhnlein R, Hennink WE, Ulbrich K, Kiessling F, Heilmann M, Debus J, Huber PE, Storm G: Image-guided and passively tumour-targeted polymeric nanomedicines for radiochemotherapy. *Br J Cancer* 99: 900-910, 2008.
70. Chen LC, Chang CH, Yu CY, Chang YJ, Wu YH, Lee WC, Yeh CH, Lee TW, Ting G: Pharmacokinetics, micro-SPECT/CT imaging and therapeutic efficacy of ¹⁸⁸Re-DXR-liposome in C26 colon carcinoma ascites mice model. *Nucl Med Biol.* 35: 883- 893, 2008.
71. Lee WC, Hwang JJ, Tseng YL, Wang HE, Chang YF, Lu YC, Ting G, Whang-Peng J and Wang SJ. Therapeutic efficacy evaluation of ¹¹¹In-VNB-liposome on human colorectal adenocarcinoma HT-29/luc mouse xenografts. *Nucl Instrum Meth A* 569: 497-504, 2006.
72. Chang CH, Stabin MG, Chang YJ, Chen LC, Chen MH, Chang TJ, Lee TW, Ting G: Comparative dosimetric evaluation of nanotargeted ¹⁸⁸Re-(DXR)-liposome for internal radiotherapy. *Cancer Biother Radiopharm* 23: 749-758, 2008.
73. Chang CH, Stabin MG, Chang YJ, Chen LC, Chen MH, Chang TJ, Lee TW, Ting G: Comparative dosimetric evaluation of nanotargeted ¹⁸⁸Re-(DXR)-liposome for internal radiotherapy. *Cancer Biother Radiopharm* 23: 749-758, 2008.
74. Sofou S, Thomas JL, Lin HY, McDevitt MR, Scheinberg DA, Sgouros G: Engineered liposomes for potential alpha-particle therapy of metastatic cancer. *J Nucl Med.* 45, 253-260, 2004.
75. Chang MY, Seideman J, Sofou S: Enhanced loading efficiency and retention of ²²⁵Ac in rigid liposomes for potential targeted therapy of micrometastases. *Bioconjug Chem* 19: 1274- 1282, 2008.
76. Sofou S, Kappel BJ, Jaggi JS, McDevitt MR, Scheinberg DA, Sgouros G: Enhanced retention of the alpha-particleemitting daughters of actinium-225 by liposome carriers. *Bioconjug Chem* 18: 2061-2067, 2007.
77. Shukla S, Wu G, Chatterjee M, Yang W, Sekido M, Diop LA, Muller R, Sudimack JJ, Lee RJ, Barth RF, Tjarks W: Synthesis and biological evaluation of folate receptor-targeted boronated PAMAM dendrimers as potential agents for neutron capture therapy. *Bioconjug Chem* 14: 158-167, 2003.

78. Liu S, Edwards DS: Fundamentals of receptor-based diagnostic metalloradiopharmaceuticals. *Top Curr Chem* 222: 259-278, 2002.
79. Liu S: The role of coordination chemistry in development of target-specific radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev* 33: 1-18, 2004.
80. Volkert WA, Hoffman TJ: Therapeutic radiopharmaceuticals. *Chem. Rev* 99: 2269-2292, 1999.
81. Liu S, Edwards DS: Bifunctional chelators for target specific therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. *Bioconjugate Chem* 12 (1): 7-34, 2001
82. Schubiger PA, Alberto R, Smith A: Vehicles, chelators, and radionuclides: choosing the "building blocks" of an effective therapeutic radioimmunoconjugate. *Bioconjug Chem* 7: 165-179, 1996.
83. Ehrhardt GJ, Ketring AR, Ayers LM: Reactor-produced radionuclides at the University of Missouri Research Reactor. *Appl Radiat Isotopes* 49: 295-297, 1998.
84. Anderson CJ, Green MA, Yashi YF: Chemistry of copper radionuclides and radiopharmaceutical products. En: *Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications*, pp 402-422, 2003.
85. Abrams MJ, Juweid M, Tenkate CI, Schwartz DA, Hauser MM, Gaul FE, Fucello AJ, Rubin RH, Strauss HW, Fischman AJ: Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. *J Nucl Med* 31: 2022-2028, 1990.
86. Schwartz DA, Abrams MJ, Hauser MM, Gaul FE, Larsen SK, Rauh D, Zubieta J: Preparation of hydrazino-modified proteins and their use for the synthesis of 99mTc-protein conjugates. *Bioconjug Chem* 2: 333-336, 1991.
87. Ultee ME, Bridger GJ, Abrams MJ, Longley CB, Burton CA, Larsen S, Henson GW, Padmanabhan S, Gaul FE, Schwartz DA: Tumor imaging with technetium-99m-labeled hydrazinonicotinamide-Fab' conjugates. *J Nucl Med* 38: 133-138, 1997.
88. Babich JW, Solomon H, Pike MC, Kroon D, Graham W, Abrams MJ, Tompkins RG, Rubin RH, Fischman AJ: Technetium-99m labeled hydrazine nicotinamide derivatized chemotactic peptide analogs for imaging focal sites of bacterial infection. *J Nucl Med* 34: 1967-1974, 1993.
89. Babich JW, Fischman AJ: Effect of "co-ligand" on the biodistribution of 99mTc labeled hydrazino nicotinic acid derivatized chemotactic peptides. *Nucl Med Biol* 22: 25-30, 1995.
90. Babich JW, Graham W, Barrow SA, Fischman AJ: Comparison of the infection imaging properties of a 99mTc labeled chemotactic peptide with 111In IgG. *Nucl Med Biol* 22: 643-648, 1995.
91. Babich JW, Coco WG, Barrow SA, Fischman AJ, Femia FJ, Zubieta J: 99mTc labeled chemotactic peptides: influence of coligands on distribution of molecular species and infection imaging properties. Synthesis and structural characterization of model complexes with the {Re(η^2 -NNC5H4N)(η^1 -HNNC5H4N)} core. *Inorg Chim Acta* 309: 123-136, 2000.
92. Decristoforo C, Mather SJ: Preparation, 99mTc-labeling, and in vitro characterization of HYNIC and N3S modified RC-160 and [Tyr3]Octreotide. *Bioconjug Chem* 10: 431-438, 1999.
93. Decristoforo C, Melendez L, Sosabowski JK, Mather SJ: 99mTc-HYNIC-[Tyr3]- octreotide for imaging somatostatin-receptor-positive tumors: preclinical evaluation and comparison with 111In-Octreotide. *J Nucl Med* 41: 1114-1119, 2000.

94. Decristoforo C, Mather SJ: ^{99m}Tc-labeled peptide-HYNIC conjugates: effect of lipophilicity and stability on biodistribution. *Nucl Med Biol* 26: 389-396, 1999.
95. Decristoforo C, Mather SJ: Technetium-99m somatostatin analogues: effect of labeling methods and peptide sequence. *Eur J Nucl Med* 26: 869-876, 1999.
96. Bangard M, Béhé M, Guhlke S, Otte R, Bender H, Maecke HR, Birsack HJ: Detection of somatostatin receptor-positive tumours using the new ^{99m}Tc-tricine- HYNIC-D-Phe1-Tyr3-octreotide: first results in patients and comparison with ¹¹¹In-DTPA-D-Phe1- Tyr3-octreotide. *Eu J Nucl Med* 27: 628-637, 2000.
97. Decristoforo C, Mather SJ, Cholewinski W, Donnemiller E, Riccabona G, Moncayo R: ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-TOC: a new ^{99m}Tc-labeled radiopharmaceutical for imaging somatostatin receptor-positive tumors: first clinical results and intrapatient comparison with ¹¹¹In-labeled octreotide derivatives. *Eur J Nucl Med* 27: 1318-1325, 2000.
98. Laverman P, Dams ETM, Oyen WJG, Storm G, Koenders EB, Prevost R, van der Meer JWM, Corstens FHM, Boerman OC: A novel method to label liposomes with ^{99m}Tc by the hydrazinonicotinyl derivative. *J Nucl Med* 40: 192-197, 1999.
99. Zhang Y, Liu N, Zhu ZH, Rusckowski M, Hnatowich DJ: Influence of different chelators (HYNIC, MAG3 and DTPA) on tumor cell accumulation and mouse biodistribution of technetium-99m labeled antisense DNA. *Eur J Nucl Med* 27: 1700-1707, 2000.
100. Hnatowich DJ, Winnard P Jr, Virzi F, Fogarasi M, Santo T, Smith C., Cantor CR, Rusckowski M: Technetium-99m labeling of DNA oligonucleotides. *J Nucl Med* 36: 2306-2314, 1995.
101. Najafi A, Alauddin MM, Sosa A, Ma GQ, Chen DCP, Epstein AL, Siegel ME: The evaluation of ¹⁸⁶Re-labeled antibodies using N2S4 chelate in vitro and in vivo using tumor-bearing nude mice. *Nucl Me Biol* 19: 205-212, 1992.
102. Blower PJ, Prakash S: The chemistry of rhenium in nuclear medicine. *Perspect Bioinorg Chem* 4: 91-143, 1999.
103. Visser GWM, Gerretsen M, Herscheid JDM, Snow GB, vanDongen G: Labeling of monoclonal antibodies with rhenium-186 using the MAG3 chelate for radioimmunotherapy of cancer: a technical protocol. *J Nucl Med* 34: 1953-1963, 1993.
104. Liu S, Edwards DS, Looby RJ, Harris AR, Poirier MJ, Barrett JA, Heminway SJ, Carroll TR: Labeling a hydrazinonicotinamide-modified cyclic IIB/IIIA receptor antagonist with ^{99m}Tc using aminocarboxylates as co-ligands. *Bioconjug Chem* 7: 63-71, 1996.
105. Edwards DS, Liu S, Ziegler MC, Harris AR, Crocker AC, Heminway SJ, Barrett JA, Bridger GJ, Abrams MJ, Higgins JD: RP463: a stabilized technetium- ^{99m} complex of a hydrazino nicotinamide conjugated chemotactic peptide for infection imaging. *Bioconjug Chem* 10: 884-891, 1999.
106. Edwards DS, Liu S, Barrett JA, Harris AR, Looby RJ, Ziegler MC, Heminway SJ, Carroll TR: A new and versatile ternary ligand system for technetium radiopharmaceuticals: water soluble phosphines and tricine as coligands in labeling a hydrazino nicotinamide-modified cyclic glycoprotein IIB/IIIA receptor antagonist with ^{99m}Tc. *Bioconjug Chem* 8: 146-154, 1997.
107. Liu S, Edwards DS, Harris AR: A novel ternary ligand system for technetium radiopharmaceuticals: imine-N containing heterocycles as coligands in labeling a hydrazinonicotinamide-modified cyclic platelet glycoprotein IIB/IIIA receptor antagonist with ^{99m}Tc, *Bioconjug Chem* 9: 583-595, 1998.

108. Liu S, Edwards DS, Harris AR, Heminway SJ, Barrett JA: Technetium complexes of a hydrazinonicotinamide-conjugated cyclic peptide and 2-hydrazinopyridine: synthesis and characterization. *Inorg Chem* 38: 1326-1335, 1999.
109. Liu S, Edwards DS: Fundamentals of receptor-based diagnostic metalloradiopharmaceuticals. *Top Curr Chem* 222: 259-278, 2002.
110. Liu S, Edwards DS: Bifunctional chelators for target specific therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. *Bioconjug Chem* 12 (1):7-34, 2001.
111. Liu S, Pietryka J, Ellars CE, Edwards DS: Comparison of yttrium and indium complexes of DOTA-BA and DOTA-MBA: models for ⁹⁰Y- and ¹¹¹In-labeled DOTAbiomolecule conjugates. *Bioconjug Chem* 13: 902-913, 2002.
112. Stimmel JB, Stockstill ME, Kull FC Jr: Yttrium-90 chelation properties of tetraazatetraacetic acid macrocycles, diethylenetriaminepentaacetic acid analogues, and a novel terpyridine acyclic chelator. *Bioconjug Chem* 6: 219-225, 1995.
113. Stimmel JB, Kull FC Jr: Samarium-153 and lutetium-177 chelation properties of selected macrocyclic and acyclic ligands. *Nucl. Med. Biol.* 25: 117-125, 1998.
114. Liu S, Ellars CE, Edwards DS: Ascorbic acid: useful as a buffer agent and radiolytic stabilizer for metalloradiopharmaceuticals. *Bioconjug Chem* 14: 1052-1056, 2003.
115. Liu S, Edwards DS: Stabilization of ⁹⁰Y-labeled DOTA-biomolecule conjugates using gentisic and ascorbic acid. *Bioconjug Chem* 12: 554-558, 2001.
116. Liu S, Cheung E, Rajopadyhe M, Ziegler MC, Edwards DS: ⁹⁰Y- and ¹⁷⁷Lu-labeling of a DOTA-conjugated vitronectin receptor antagonist for therapy. *Bioconjug Chem* 12: 559-568, 2001.
117. Kukis DL, DeNardo SJ, DeNardo GL, Donnell RT, Meares CF: Optimized conditions for chelation of yttrium-90-DOTA immunoconjugates. *J Nucl Med* 39: 2105-2110, 1998.
118. Jang H, Blanco M, Dasgupta S, Keire DA, Shively JE, Goddard WA: Mechanism and energetics for complexation of ⁹⁰Y with 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA), a model for cancer radioimmunotherapy. *J Am Chem Soc* 121: 6142-6151, 1999.
119. Cornforth MN: Radiation-induced damage and the formation of chromosomal aberrations. En: Nickoloff JA, Hoekstra MF (Eds.) *DNA damage and repair*. Humana Press, Totowa (New Jersey) pp 559-585, 1998.
120. Ottolenghi A, Ballarini F, Biaggi M: Modelling chromosomal aberration induction by ionising radiation: the influence of interphase chromosome architecture. *Adv Space Res* 27: 369-382, 2001.
121. Sachs RK, Levy D, Chen AM, Simpson PJ, Cornforth MN, Ingerman EA, Hahnfeldt P, Hlatky LR: Random breakage and reunion chromosome aberration formation model; an interaction-distance version based on chromatin geometry. *Int J Radiat Biol* 76: 1579-1588, 2000.
122. Savage JRK: A brief survey of aberration origin theories. *Mutat Res* 404: 139-147, 1998.
123. Edwards AA: Modeling radiation-induced chromosome aberrations. *Int J Radiat Biol* 78, in press. 2002. *Int J Radiat Biol* 78 (7): 551-558, 2002.
124. Brenner D: Track structure, lesion development, and cell survival. *Radiat Res* 124: S29-S37, 1990.

125. Rossi H, Zaider M: *Microdosimetry and its applications*. New York, Springer, 1996.
126. Day JP, Limoli CL, Morgan WF: Recombination involving interstitial telomere repeat-like sequences promotes chromosomal instability in Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* 19: 259-266, 1998.
127. Grosovsky AJ, Parks KK, Giver CR, Nelson SL: Clonal analysis of delayed karyotypic abnormalities and gene mutations in radiation-induced genetic instability. *Mol Cell Biol* 16: 6252-6262, 1996.
128. Watson GE, Lorimore SA, Macdonald DA, Wright EG: Chromosomal instability in unirradiated cells induced in vivo by a bystander effect of ionizing radiation. *Cancer Res* 60: 5608-5611, 2000.
129. Anderson G, Stoler D, Brenner B: *Cancer: the evolved consequence of a destabilized genome*. *Bioessays* 23: 1037-1046, 2001.
130. Padilla-Nash HM, Heselmeyer-Haddad K, Wangsa D, Zhang H, Ghadimi BM, Macville M, Augustus M, Schrock E, Hilgenfeld E, Ried T: Jumping translocations are common in solid tumor cell lines and result in recurrent fusions of whole chromosome arms. *Genes Chrom Cancer* 30: 349-363, 2001.
131. Nikjoo H, Uehara S, Wilson WE, Hoshi M, Goodhead DT: Track structure in radiation biology: theory and applications. *Int J Radiat Biol* 73: 355-364, 1998.
132. Cucinotta FA, Nikjoo H, Goodhead DT: Model for radial dependence of frequency distributions for energy imparted in nanometer volumes from HZE particles. *Radiat Res* 153: 459-468, 2000.
133. Lobrich M, Cooper PK, Rydberg B: Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation. *Int J Radiat Biol* 70: 493-503, 1996.
134. Hada M, Georgakilas AG: Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiations: a review. *Radiat Res* 49: 203-210, 2008.
135. Obe G, Durante M: DNA double strand breaks and chromosomal aberrations. *Cytogenet Genome Res* 128: 8-16, 2010.
136. Natarajan AT, Obe G: Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. I. Utilization of neurospora endonuclease for the study of aberration production in G2 stage of the cell cycle. *Mutat Res* 52: 137-149, 1978.
137. Natarajan AT, Obe G: Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. III. Restriction endonucleases. *Chromosoma* 90: 120-127, 1984.
138. Bryant PE: Enzymatic restriction of mammalian cell DNA using PvuII and BamHI: evidence for the double-strand origin of chromosomal aberrations. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 46: 57-65, 1984.
139. Iliakis G, Wang H, Perrault AR, Boecker W, Rosidi B, Windhofer F, Wu W, Guan J, Terzoudi G, Pantelias G: Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res* 104: 14-20, 2004.
140. Sachs RK, Levy D, Hahnfeldt P, Hlatky L: Quantitative analysis of radiation-induced chromosome aberrations. *Cytogenet Genome Res* 104: 142-148, 2004.
141. Bailey SM, Bedford JS: *Studies on chromosome aberration induction: what can they tell us about DNA repair?* *DNA Repair* 5: 1171-1181, 2006.

142. Obe G, Johannes C, Schulte-Frohlinde D: DNA double-strand break induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis* 7: 3-12, 1992.
143. Pfeiffer P, Goedecke W, Obe G: Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberration. *Mutagenesis* 15: 289-302, 2000.
144. Singleton BK, Griffin CS, Thacker J: Clustered DNA damage leads to complex genetic changes in irradiated human cells. *Cancer Res* 62: 6263-6269, 2002.
145. Tsao D, Kalogerinis P, Tabrizi I, Dingfelder M, Stewart RD, Georgakilas AG: Induction and processing of oxidative clustered DNA lesions in ⁵⁶Fe-ionirradiated human monocytes. *Radiat Res* 168: 87-97, 2007.
146. Hair JM, Terzoudi GI, Hatzi VI, Lehockey KA, Srivastava D, Wang W, Pantelias GE, Georgakilas AG: BRCA1 role in the mitigation of radiotoxicity and chromosomal instability through repair of clustered DNA lesions. *Chem Biol Interact* 188: 350-358, 2010.
147. Wu H, Durante M, George K, Yang TC: Induction of chromosome aberrations in human cells by charged particles. *Radiat Res* 148: 102-107, 1997.
148. Sachs RK, Brenner DJ, Chen AM, Hahnfeldt P, Hlatky L: Intra-arm and interarm chromosome intrachanges: tools for probing the geometry and dynamics of chromatin. *Radiat Res* 148: 330-340, 1997.
149. Wu H: Probabilities of radiation-induced inter- and intrachromosomal exchanges and their dependence on the DNA content of the chromosome. *Radiat Res* 156: 603-606, 2001.
150. Shanmuga Sundaram P, Padma S, Sudha S, Sasikala K: Transient cytotoxicity of ¹³¹I beta radiation in hyperthyroid patients treated with radioactive iodine. *Indian J Med Res* 133: 401-406, 2011.
151. [de Oliveira EM](#), [Suzuki MF](#), [do Nascimento PA](#), [da Silva MA](#), [Okazaki K](#): Evaluation of the effect of ⁹⁰Sr beta-radiation on human blood cells by chromosome aberration and single cell gel electrophoresis (comet assay) analysis. *Mutat Res* 476 (1-2): 109-210, 2001.

9. Agradecimientos

Para la realización del trabajo debo agradecer en primer lugar por los consejos y apoyo a mi tutor de maestría Dr. Juan C. Benech del Centro de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. En dicho centro conte con el apoyo también de la Lic. Natalia Oddone para el cultivo de las células y el ensayo de aberraciones cromosómicas. Al Dr. Wilner López por su experiencia en las imágenes microscópicas. Y al Dr. Gustavo Folle y Dr. Jose Sotelo por los consejos en la tesis.

Por el Centro de Investigaciones Nucleares (Facultad de Ciencias) agradezco al Dr. Pablo Cabral quien fue pionero en introducir los nanosistemas para marcación radioactiva en Uruguay, los cuáles utilicé para formarme primero como licenciado y luego utilizados para éste trabajo. Al Dr. Hugo Cerecetto por los consejos en la tesis. A la MSc. Mirel Cabrera por el apoyo en laboratorio. A la MSc. Fernanda García por la síntesis del HYNIC. Al Dr. Williams Porcal por la interpretación de los ensayos de RMN. A Marcelo Fernández por los ensayos de biodistribución, y a todos los compañeros y amigos del CIN.

Al Centro de Medicina Nuclear del Hospital de Clínicas en especial al Dr. Juan pablo Gambini por las tomas de imágenes.

Gracias a Maria Moreno y Alejandro Chabalgoity por brindarnos las células.

Finalmente agradezco a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación y a PEDECIBA biología por el apoyo financiero.

10. Apéndice

Se agregan trabajos publicados en revistas arbitradas internacionales en los cuáles fui participe en forma directa tanto de la idea y escritura, como también de todos los pasos en laboratorio como: conjugaciones, marcaciones, ensayos fisicoquímicos y biológicos, toma de imágenes, microscopías etc. Dichos trabajos fueron base y se relacionan estrechamente con el actual trabajo de maestría. Se mencionan en varias oportunidades a lo largo de la tesis.