



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN DE LIPOPROTEINAS
DE ALTA DENSIDAD RADIOMARCADAS CON ^{177}Lu ,
CON FINES RADIOTERAPÉUTICOS”**

TESIS

**PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO**

Presenta

Rodrigo García Marín

Director: Dr. Enrique Morales Ávila

Asesora Externa: Dra. Keila Isaac Olivé

Toluca de Lerdo, Estado de México, 2021



El presente trabajo de tesis de licenciatura, se realizó en la Facultad de Química, con financiamiento de la Universidad Autónoma del Estado de México bajo el marco de la convocatoria de Investigación Científica para la Consolidación de los Grupos de Investigación y los Estudios Avanzados UAEM 2019, bajo el proyecto con clave de registro 4745/2019CIB

Responsable técnico: Dr. Enrique Morales Avila

| | |
|--|----|
| I. Contenido | |
| 2. Resumen | 8 |
| 3. Antecedentes..... | 9 |
| 3.1. Radiofarmacia y radiofármacos..... | 9 |
| 3.2. Aplicaciones del Lutecio ⁻¹⁷⁷ en medicina nuclear..... | 10 |
| 3.3. Sistemas nanoparticulados radiomarcados como estrategias terapéuticas. | 10 |
| a. Nanotecnología | 10 |
| b. Nanopartículas radiomarcadas | 12 |
| c. Nanopartículas lipídicas y su radiomarcado | 16 |
| d. Nanopartículas (SLN) | 17 |
| e. Liposomas radiomarcados | 18 |
| 3.1 Lipoproteínas radiomarcadas | 19 |
| 3.2 Lipoproteínas de Alta Densidad reconstituidas (rHDL) como sistemas de entrega de fármacos..... | 21 |
| a. Lipoproteínas de alta densidad: estructura y función. | 21 |
| b. rHDL: Alternativas terapéuticas..... | 23 |
| c. Estrategias de radiomarcado de rHDL..... | 25 |
| d. rHDL dirigido al receptor SR-B1..... | 26 |
| 4. Justificación | 27 |
| 5. Hipótesis | 29 |
| 6. Objetivos..... | 30 |
| 6.1 Objetivo general..... | 30 |
| 6.2 Objetivos específicos | 30 |
| 7. Materiales y métodos..... | 31 |
| 7.1 Diseño metodológico..... | 31 |
| 7.2 Materiales y reactivos..... | 31 |
| 7.3. Instrumentación | 32 |
| 7.4 Métodos experimentales..... | 33 |
| a. Diagrama general..... | 33 |

| | | |
|--------|--|--------------------------------------|
| b. | Secuencia metodológica..... | 34 |
| 8. | Resultados y discusiones | 41 |
| 8.1 | Modificación del colesterol | 41 |
| 8.2. | Caracterización por espectroscopia IR y espectrofotometría UV-Vis..... | 42 |
| 8.2.1. | Colesterol | 42 |
| 8.3. | Espectrometría IR-FT..... | 42 |
| 8.2.2 | Espectroscopia UV-Vis | 43 |
| 8.3 | Colesterol-Cloro..... | 43 |
| 8.3.1 | Mecanismo de reacción | 43 |
| 8.3.2 | Espectroscopia IR-FT | 45 |
| 8.3.3 | Espectroscopia UV-Vis | 46 |
| 8.4 | Colesterol-NH ₂ | 46 |
| 8.4.1 | Mecanismo de reacción | 46 |
| 8.4.2 | Espectroscopia IR-FT | 48 |
| 8.4.3 | Espectroscopia UV-Vis | 49 |
| 8.5 | DOTA-SCN | 50 |
| 8.5.1 | Espectroscopia IR-FT | 50 |
| 8.5.2 | Espectroscopia UV-Vis | 51 |
| 8.6 | Colesterol-DOTA..... | 51 |
| 8.6.1 | Mecanismo de reacción | 51 |
| 8.6.2 | Espectroscopia IR-FT | 53 |
| 8.6.3 | Espectroscopia UV-Vis | ¡Error! Marcador no definido. |
| 8.7 | rHDL cargadas con colesterol-DOTA | 54 |
| 8.8 | DLS..... | 54 |
| 9 | Conclusiones..... | 59 |
| | Referencias | 60 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estructura molecular de los agentes quelantes DOTA y sus derivados..... | 15 |
| Figura 2. Comparación de la estructura de las lipoproteínas..... | 20 |
| Figura 3. Estructura y composición de las lipoproteínas de alta densidad HDL..... | 22 |
| Figura 4. Conformación de ApoA-I en partículas HDL esféricas y discoidales. Las moléculas de apoA-I están organizadas como un doble cinturón en partículas discoidales (A) y como un trébol en partículas esféricas (B)..... | 22 |
| Figura 5. Esquema general | 33 |
| Figura 6. Diagrama general de la reacción. | 34 |
| Figura 7. Arreglo experimental de la reacción de halogenación | 35 |
| Figura 8. Arreglo experimental de la reacción de aminación..... | 36 |
| Figura 9. Espectro de IR de colesterol..... | 42 |
| Figura 10. Espectro UV-Vis de colesterol..... | 43 |
| Figura 11. Mecanismo de reacción de la reacción de halogenación. | 44 |
| Figura 12. Espectro de IR de colesterol-cloro. | 45 |
| Figura 13. Espectro UV-Vis de colesterol-cloro. | 46 |
| Figura 14. Mecanismo de la reacción de aminación. | 47 |
| Figura 15. Espectro de IR de colesterol-NH ₂ | 48 |
| Figura 16. Espectro UV-Vis de colesterol-NH ₂ | 49 |
| Figura 17. Espectro de IR de DOTA-isotiocianato. | 50 |
| Figura 18. Mecanismo de la conjugación colesterol-DOTA..... | 52 |
| Figura 19. Espectro de IR de colesterol-DOTA. | 53 |
| Figura 20. Distribución de tamaño de partículas DOTA rHDL. | 54 |
| Figura 21. Distribución de tamaño de las partículas rHDL filtradas..... | 55 |
| Figura 22. A) Captación y B) Especificidad del sistema DOTA-rHDL..... | 56 |
| Figura 23 Biodistribución en tejidos y sangre de ¹⁷⁷ Lu-DOTA-HDL..... | 57 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Constantes de estabilidad de algunos complejos con DOTA..... | 14 |
| Tabla 2. Principales sistemas de nanoparticulas lipídicas. | 17 |
| Tabla 3. Cuanti y cualificación de los productos de reacción | 41 |
| Tabla 4. Porcentaje de actividad administrada por g tejido en los órganos disectados..... | 57 |

Abreviaturas

Abs: Absorbancia

Df: Desferrioxamina

DOTA: Ácido tetracarboxílico, 1,4,17,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético

DTPA: Ácido dietilenaminopentaacético

FDA: (*ing*) Food and Drug Administration

HDL: (*ing*) High density lipoprotein

IR-FT: Infrarrojo con transformada de Fourier

LDL: (*ing*) Low Density Lipoprotein

NOTA: 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético

PM: Peso Molecular

rHDL: Lipoproteínas de Alta Densidad reconstituidas

rHDL: (*ing*) Reconstituted High Density Lipoprotein

SEC: (*ing*) Size Exclusion Chromatography

SLN: Nanopartículas lipídicas sólidas

SRB-1: (*ing*) Scavenger receptor class B type 1

SRE: Sistema Retículo-Endotelial

st: vibración de tensión

sy: simetría

TRC: Transporte Reverso de Colesterol

UV-Vis: Ultravioleta-visible

δ : vibración de deformación

2. Resumen

En los últimos años, las combinaciones de tecnología nuclear y nanomedicina han revolucionado la atención médica convencional y tecnología médica. Y en las últimas décadas se ha incrementado la búsqueda de moléculas endógenas que puedan sintetizarse y ayuden a mejorar la entrega y dirección de fármacos y radiofármacos. Tal es el caso de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), cuya función es el transporte inverso del colesterol desde los tejidos hasta el hígado principalmente. Su importancia radica en la alta afinidad del receptor endógeno SR-B1 y la apoproteína A1, contenidos en las HDL. Adicionalmente, se ha demostrado que los receptores SR-B1 se sobreexpresan en células tumorales, lo cual lo hace un blanco idóneo para el transporte y liberación de fármacos.

En este trabajo se reporta la preparación de un sistema nanolipídico como posible transportador de fármacos mediante la elaboración de lipoproteínas de alta densidad reconstituidas (rHDL) cargadas con colesterol previamente modificado con la conjugación de un agente quelante (DOTA-isotiocianato), el cual tendrá capacidad para el quelado de radioisótopos, como Lutecio 177, capaz de producir muerte celular en tumores sólidos, como una alternativa de medicina nuclear. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue sintetizar el sistema de transporte de fármacos dirigido al receptor SR-B1 a partir de lipoproteínas de alta densidad reconstituidas, radiomarcadas con ¹⁷⁷Lutecio y evaluar su actividad biológica mediante estudios biocinéticos y de captación celular.

Se realizó una amplia caracterización del sistema y los subproductos obtenidos utilizando técnicas fisicoquímicas (punto de fusión, CCF, propiedades fisicoquímicas) y técnicas analíticas (UV-Vis, IR-FT, DLS), además de estudios biológicos, que incluyen la biodistribución y captación celular.

Los resultados demostraron que fue posible sintetizar el compuesto Colesterol-DOTA, con características ideales para incluirlo en la preparación de las rHDL. Se logró preparar rHDL, modificadas con Col-DOTA, además el radiomarcado de éstas mostró una pureza radioquímica superior al 90 % y eficiencia de marcado superior al 90%. Las pruebas de biodistribución en ratones demostraron que el sistema tiene interacción en gran medida con el hígado, riñón y hueso; además de una adecuada eliminación del complejo para ser excretado en mayor proporción por los riñones sin acumulación significativa en tejidos sanos. Las pruebas de captación celular demostraron especificidad de las rHDL preparadas por receptores celulares SR-B1. Se concluye, que las ¹⁷⁷Lu-DOTA-rHDL, son un sistema con capacidad de ser aplicado en sistemas de diagnóstico y terapia, además de poder ser un sistema liberador de fármacos para explorar alternativas de quimio-radioterapia.

3. Antecedentes

3.1. Radiofarmacia y radiofármacos

La radiofarmacia es una especialidad sanitaria multidisciplinar que estudia los aspectos farmacéuticos, químicos, bioquímicos, biológicos y físicos de los radiofármacos, aplicando dichos conocimientos en los procesos de diseño, producción, preparación, control de calidad y dispensación de radiofármacos, tanto en su vertiente asistencial (diagnóstica y terapéutica) como en investigación (Perales, 2016).

Un radiofármaco es un compuesto que por su cantidad y calidad de radiación, puede ser utilizado para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades (FEUM, 2017).

Generalmente, el 95 % de los radiofármacos utilizados en medicina nuclear son de diagnóstico mientras que aproximadamente un 5 % de usan para terapia (Chain & Illanes, 2015). Cuando son utilizados con un propósito diagnóstico, se aprovecha la propiedad emisora de los radioisótopos para detectarlos a distancia; cuando la intención es terapéutica, se aprovecha el efecto deletéreo que la radiación puede tener sobre un tejido.

Si bien, la sustancia que se administra como radiofármaco no tiene un efecto farmacológico mensurable, es posible que presente interacción farmacológica con medicamentos que esté recibiendo el paciente. Muchas veces las medicaciones pueden modificar significativamente el resultado de una práctica de medicina nuclear por interacción con el radiofármaco administrado. Los radiofármacos deben ser sometidos a los controles de calidad de las sustancias radiactivas y, dado que son administrados a seres humanos, es necesario que sean estériles y apirógenos y que cumplan los controles de una droga convencional.

Los radiofármacos pueden clasificarse, según su estructura química, en radionucleídos primarios y compuestos marcados (Chain & Illanes, 2015). Los radionucleídos primarios son soluciones de compuestos inorgánicos del radioisótopo. Los compuestos marcados son esencialmente una asociación entre dos componentes: un radionucleído y una molécula que funciona como “vehículo”. Esta última dirige al radiofármaco selectivamente a un tejido específico en respuesta a condiciones fisiológicas o patrones de expresión genética específicos.

3.2. Aplicaciones del Lutecio 177 en medicina nuclear

El Lutecio es un metal pesado, blanco plateado, duro y denso; relativamente estable al aire. Constituye el 8×10^{-5} % en peso de la corteza. Se encuentra en muy pequeñas cantidades en los minerales de cerita, gadolinita, samarquesita y xenotima.

Presenta varios isotopos, los nucleídos estables (^{175}Lu y ^{176}Lu) que emiten radiación beta después de su activación con neutrones térmicos y pueden usarse como catalizadores en alquilación, hidrogenación y polimerización. Pero el más utilizado en medicina nuclear es el Lutecio-177, el cual se obtiene en reactor nuclear por activación neutrónica de $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$ enriquecido al 64.3 % (Herrera et al., n.d.).

El ^{177}Lu decae emitiendo partículas beta con una energía máxima de 0.498 MeV (90 %), y rayos gamma con una energía máxima de 0.208 MeV. Al proceso de decaimiento del ^{177}Lu se le conoce como decaimiento beta negativo, el cual se produce cuando en el núcleo, un neutrón se convierte en un protón y un electrón emitido fuera del núcleo (Yepes, 2015).

El tiempo de vida media para el Lutecio-177 es de 6.71 días, el cual es el tiempo necesario para que la actividad del Lutecio se reduzca a la mitad.

El ^{177}Lu es utilizado en radioinmunoterapia cuando es quelado a un anticuerpo asociado a tumores y también ha sido propuesto como una fuente de radisótopos en la braquiterapia.

La vida media del ^{177}Lu es el tiempo suficiente para poder marcar a los péptidos. Además ^{177}Lu tiene las características químicas apropiadas para el marcado de proteínas con agentes quelantes bifuncionales como el DTPA, y sus derivados, o el DOTA (Terap et al., 2019).

3.3. Sistemas nanoparticulados radiomarcados como estrategias terapéuticas.

a. Nanotecnología

La nanotecnología comprende la creación, manipulación y utilización de materiales en el orden nanométrico (10^{-9} m) y su aplicación en los campos de la química, la biología, la física, la ingeniería y en especial la medicina, se ha traducido en trascendentales avances en la ciencia. Su campo de estudio está centrado en el diseño, creación, síntesis y aplicación de

materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nanoescala y la explotación de fenómenos y propiedades de la materia (Thaxton et al., 2016)

La nanotecnología abarca cinco áreas fundamentalmente: minerales y agroindustria, dispositivos médicos y salud, energía y medioambiente, materiales y fabricación, y electrónica, información y comunicaciones. Entre las principales ciencias de aplicación destacan la informática, la medicina, la biología y la construcción. La Nanotecnología en Medicina molecular ya tiene y tendrá múltiples impactos sobre el sector de la Medicina en general. Este vínculo hará que los medios de la investigación y la práctica de la Medicina sean menos costosos y más potentes, ayudará a desarrollar una investigación y diagnóstico más eficaz, lo que permitirá una capacidad de respuesta más rápida para tratar nuevas enfermedades (Guerrero Arellano et al., 2017).

Dentro de un contexto multidisciplinario, su fin primordial es mejorar la calidad de vida y promover el desarrollo humano. Esta nueva ciencia ofrece soluciones en el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades, reduce el consumo de materias primas, organiza y desarrolla procesos productivos, y diseña y crea nuevos productos con características novedosas, entre muchos otros usos, mediante procedimientos sostenibles para el ambiente (Roco, 2003).

La nanotecnología se encuentra en una fase de crecimiento y ha capturado el interés de empresas, gobiernos e inversionistas que buscan desarrollar productos útiles para aplicarlos en diferentes esferas, especialmente en medicina. La nanomedicina es una rama de la nanotecnología con aplicaciones directas en medicina, que está permitiendo el abordaje de enfermedades (tales como el cáncer, la diabetes, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, inmunitarias, o infectocontagiosas, entre otras), a un nivel celular o molecular (Morales, 2017; Pájaro Castro et al., 2013).

Los dispositivos con un tamaño menor de 20 nm pueden transitar por el torrente circulatorio y entrar fácilmente en la mayoría de las células. La nanomedicina es ya una realidad que está produciendo avances en el diagnóstico, prevención y tratamiento de las enfermedades porque permite interactuar con las biomoléculas (proteínas y ácidos nucleicos). Además, esta capacidad posibilitará un conocimiento de las complejas vías de

regulación y señalización que dirigen el comportamiento de las células normales y transformadas (Morales, 2017).

Entre las áreas de aplicación están:

- **Prevención:** dispositivos que pueden identificar marcadores relacionados con la enfermedad y liberar en ese momento agentes capaces de revertir los cambios premalignos producidos en las células o eliminar las células con potencial maligno.
- **Diagnóstico:** Se usan como sensores capaces de reconocer firmas genéticas de diferentes partículas y transmitir la información.
- **Terapia:** sistemas liberadores de fármacos que permitan mejorar la formulación de principios activos con problemas para acceder al lugar de acción, nanopartículas como principios activos, implantes activos, pasivos e ingeniería tisular.

El uso de nanopartículas podría ser la solución a problemas de solubilidad, biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y citotoxicidad de los medicamentos puesto que pueden imitar o alterar procesos biológicos (Jaramillo, 2013).

b. Nanopartículas radiomarcadas

En los últimos años, las combinaciones de tecnología nuclear y nanomedicina han revolucionado la atención médica convencional y tecnología médica. Aunque la aplicación de la tecnología nuclear en nanomedicina se encuentra actualmente en una etapa temprana, se espera que tenga un impacto significativo en el diagnóstico y el tratamiento.

El número de nanoproductos radiactivos que se envían a la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para la aprobación está creciendo rápidamente y las nuevas aplicaciones están continuamente siendo desarrolladas.

Las primeras nanopartículas marcadas con radionúclidos se usaron para el diagnóstico por imagen y fueron los nano-coloides (coloide $^{99m}\text{Tc-S}$, óxido férrico ^{68}Ga , hidróxido férrico ^{113m}In), cuyo uso comenzó en la década de 1950. El descubrimiento de liposomas en 1965

por Bangham y Watkins y el desarrollo de métodos de etiquetado de proteínas han permitido el desarrollo de nanopartículas lipídicas radiomarcadas para uso clínico (Torres & Seijo, 2009).

Un desafío importante en este esfuerzo es desarrollar nanopartículas específicas de la enfermedad con estrategias de radiomarcado fáciles y robustas. Además, las nanopartículas radiomarcadas deben demostrar una adecuada estabilidad *in vitro* e *in vivo*, una mayor sensibilidad para la detección de la enfermedad en una etapa temprana, una farmacocinética optimizada *in vivo* para una absorción reducida de órganos no específicos y una mejor orientación para lograr una alta eficacia (Chakravarty et al., 2017).

Las nanopartículas exhiben propiedades físicas y químicas únicas que dependen del tamaño, que si se aprovechan adecuadamente pueden abordar desafíos no resueltos en la medicina clínica. Una gran ventaja de las partículas radiactivas nanométricas es su potencial para contener numerosos átomos radiactivos dentro de una sola nanopartícula (Farzin et al., 2019).

Actualmente, el enfoque más prudente que proporciona información cuantitativa sobre la biodistribución de todo el cuerpo es mediante la incorporación de radioisótopos adecuados en las nanopartículas, un proceso conocido como radiomarcado. El radiomarcado puede definirse como la incorporación de un radionucleído a una molécula, bien sea mediante síntesis química o mediante la formación de complejos. Un método de radiomarcado debe ser robusto, rápido, seguro, debe introducir cambios mínimos en las características originales de las nanopartículas y ser razonablemente eficiente. Se debe evitar la alta temperatura de reacción, el tiempo de reacción prolongado y las estrategias de purificación de múltiples pasos, que representan una amenaza tanto para las propiedades de las nanopartículas como para la salud de los operadores.

Existen cuatro estrategias principales de radiomarcado: 1) reacción de complejación de iones radiometales con quelantes mediante química de coordinación; 2) bombardeo directo de nanopartículas a través de proyectiles hadrónicos; 3) síntesis de nanopartículas intrínsecamente radiomarcadas utilizando una mezcla de precursores radiactivos y no radiactivos; 4) radiomarcado post-sintético libre de quelantes (Chakravarty et al., 2017).

Cada uno de estos métodos de radiomarcado tiene sus propias ventajas y limitaciones, y la elección de un método de radiomarcado particular debe basarse en el radioisótopo específico, el propósito de la investigación y la viabilidad.

El método de radiomarcado más utilizado hasta hoy es mediante la coordinación del radiometal a la nanopartícula a través de una molécula quelante. En esta perspectiva, se encuentra disponible una amplia variedad de agentes quelantes y diversos radiometales con diferentes características físicas de desintegración, que pueden usarse según el tipo de aplicaciones.

Una amplia variedad de quelantes como el 1,4,7-triazaciclononano. Ácido 1,4,7-triacético (NOTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-ácido 1,4,7,10-tetraacético (DOTA), desferrioxamina (Df), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), etc. están disponibles para este propósito y la elección de un quelante particular se basa en la química de coordinación del ion radiometal utilizado para el radiomarcado (Pérez-Medina et al., 2016).

El agente quelante DOTA junto con sus derivados (Figura 1) son una buena alternativa para ser utilizados como agentes quelantes, ya que forma complejos muy estables con una variedad de radionúclidos trivalentes, tales como ^{68}Ga , ^{90}Y , ^{111}In , ^{149}Pm , ^{177}Lu , y radionúclidos divalentes como ^{27}Mg , ^{47}Ca , ^{64}Cu (Ramos et al., 2012).

Tabla 1. Constantes de estabilidad de algunos complejos con DOTA

| Ion | DOTA (Log K) |
|------------------|---------------------|
| In^{3+} | 23.90 |
| Ga^{3+} | 21.33 |
| Mg^{2+} | 11.15 |
| Ca^{2+} | 16.37 |
| Sr^{2+} | 14.39 |
| Ba^{2+} | 11.75 |
| Lu^{2+} | 10.38 |

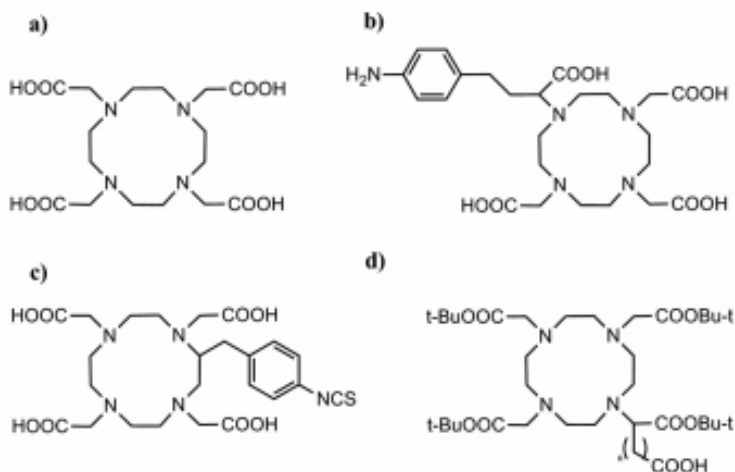


Figura 1. Estructura molecular de los agentes quelante DOTA(a) y sus derivados (b, c y d).

Las ventajas de usar nanopartículas radiomarcadas para aplicaciones terapéuticas son múltiples ya que pueden actuar como amplificadores de señal, lo que conduce a índices de contraste mejorados y una mayor sensibilidad en comparación con los radiotrazadores convencionales. Debido a la gran área de superficie de las nanopartículas, se pueden conjugar con diferentes ligandos dirigidos para la detección dirigida de varios tipos de cánceres. Además, las nanopartículas ofrecen el alcance de la imagenología multimodal que proporciona ventajas sinérgicas sobre cualquier modalidad de imagen molecular única sola. Otra ventaja radica en la capacidad de las nanopartículas para combinar capacidades de diagnóstico y terapéuticas (Chakravarty et al., 2017).

Además, diferentes agentes terapéuticos (fármacos quimioterapéuticos y se pueden incorporar radioisótopos terapéuticos adecuados) en la misma nano-plataforma que podría ser una opción viable hacia la terapia dirigida multimodal para mejorar el manejo del cáncer.

En general, las nanopartículas utilizadas para este tipo de técnicas se pueden clasificar en cuatro grupos: 1) nanopartículas inorgánicas tales como puntos cuánticos, nanopartículas metálicas, nanopartículas de óxido de hierro, nanopartículas de sílice, nanopartículas de sulfuro metálico y nanofosforos de conversión ascendente; 2) nanopartículas de polímero tales como dendrímeros núcleo-cubierta y nanopartículas anfífilas; 3) nanopartículas lipídicas tales como liposomas y nanopartículas lipídicas sólidas; y 4) nanoestructuras a

base de carbono, tales como nanotubos de carbono, óxido de grafeno y nanodiamantes (Heath et al., 2009).

c. Nanopartículas lipídicas y su radiomarcado

Las nanopartículas se consideran unos sistemas muy prometedores para la administración de fármacos en terapia génica. Hasta ahora, los sistemas virales de administración han resultado ser más eficaces, pero presentan importantes problemas de seguridad. Los vectores no virales, entre los que se encuentran las nanopartículas radiomarcadas, son menos eficaces pero mucho más seguros, aunque su eficacia ha aumentado significativamente en los últimos años (del Pozo-Rodríguez et al., 2016).

Las nanopartículas lipídicas (LN) son capaces de superar las principales barreras biológicas para la transfección de células, incluida la degradación por nucleasas, la internalización celular del tráfico intracelular y la selección selectiva de un tipo de célula específica. Además, presentan ventajas importantes: desde un punto de vista de seguridad, las LN se preparan con componentes bien tolerados y, desde un punto de vista tecnológico, pueden producirse fácilmente a gran escala, pueden someterse a esterilización y liofilización, y han demostrado buena estabilidad de almacenamiento (Torres & Seijo, 2009).

Hay muchas clases diferentes de nanopartículas bajo desarrollo como agentes de diagnóstico y terapia. Dentro de las nanopartículas elaboradas a base de lípidos, hay varias categorías incluyendo micelas, microemulsiones y liposomas. Esta clase también puede incluir nanopartículas compuestas de sílice, mica, vidrio u óxido de hierro con una bicapa lipídica externa.

A continuación, en la tabla 2, se mencionan los principales sistemas de nanopartículas lipídicas y un ejemplo de su utilización como transportadores de fármacos o radioisótopos destinados para distintos sitios de acuerdo con su función.

Tabla 2. Principales sistemas de nanopartículas lipídicas.

| Tipo de partícula | Radioisótopo/fármaco | Aplicación | Referencia |
|---|--|---|---------------------------------------|
| Liposomas | ^{99m} Tc, ¹¹¹ In, ⁶⁷ Ga | Diagnostico mediante imagen | (Goins, 2008), (Boerman et al., 2000) |
| Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) | Curcumina | Cáncer de pulmón en células no pequeñas | (Lamas,2015) |
| Vehículo lipídico nanoestructurado recubiertos de ácido hialurónico | Paclitaxel | Antitumoral | (Lamas,2015) |
| Micelas | (^{99m} Tc) | Antitumoral | (Boerman et al., 2000) |
| Micro y nanoemulsiones | Insulina | Tratamiento contra la diabetes | (Pérez-Medina et al., 2016) |

d. Nanopartículas (SLN)

Las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) son elaboradas mediante diferentes métodos que incluyen la dispersión de una fase oleosa conteniendo diferentes tipos de lípidos sólidos y/o líquidos, en una fase acuosa conteniendo una alta proporción de tensoactivos y cotensoactivos. Para llegar a obtener dispersiones de partículas nanométricas estables, se requieren métodos de homogenización de alta energía y la formación de un recubrimiento protector de emulsificantes alrededor de las partículas lipídicas (Garzón S. et al., 2008). Los SLN deben tener un diámetro inferior a 500 nm, y el tamaño ideal para el uso in vivo se considera de 120 nm o menos (del Pozo-Rodríguez et al., 2016).

El interés creciente que suscita este tipo de sistemas radica especialmente en algunas propiedades que los caracteriza, como son la inocuidad de sus componentes y métodos, especialmente los que evitan disolventes, y en su biocompatibilidad y facilidad de escalado

industrial. Son partículas que comparten similitudes con otros nanosistemas como los liposomas, en cuanto a su naturaleza lipídica, y las nanopartículas poliméricas, en este caso, en cuanto a su estructura matricial sólida (Torres & Seijo, 2009). Sin embargo, nacen con la finalidad de superar algunos de los inconvenientes asociados a ambos sistemas, como son los problemas de estabilidad de los liposomas, o bien la potencial toxicidad asociada a algunos polímeros y disolventes utilizados en la preparación de las nanopartículas poliméricas.

e. Liposomas radiomarcados

Un liposoma es una vesícula esférica artificial con una o más bicapas lipídicas concéntricas que encierran un volumen acuoso interno. Las bicapas lipídicas se forman espontáneamente al dispersar los fosfolípidos, que son neutros o cargados en agua y se estabilizan por las interacciones hidrofóbicas y las fuerzas de Van de Waals. Los métodos de preparación son diversos, lo que permite obtenerlos de diferentes composiciones y tamaños que varían de 50 a 1000 nm, aunque los más estables son aquellos con un tamaño de 90 a 250 nm (Phillips et al., 2009).

Los primeros liposomas marcados con radionúclidos (^{131}I) fueron obtenidos en 1971 por Gregoriadis y Ryman (Gregoriadis and Brenda, 2003; Torres and Seijo, 2009) y se usaron por primera vez en humanos en 1974.

Las características fisicoquímicas de los liposomas (tamaño, composición lipídica, carga superficial y fluidez de la bicapa, entre otros) son responsables de su versatilidad, que ha permitido el desarrollo de diferentes métodos de etiquetado de radionúclidos para su uso como radiofármacos para diagnóstico, terapia y diagnóstico (Richardson et al., 1977).

Los liposomas radiomarcados se han utilizado como radiofármacos de diagnóstico, en estudios preclínicos para evaluar el comportamiento in vivo de los fármacos de carga útil, en la monitorización de la terapia y en la imagen terapéutica (Andreopoulos & Kasi, 1997).

3.1 Lipoproteínas radiomarcadas

Las lipoproteínas son complejos supramoleculares de proteínas y lípidos que se sintetizan en el hígado y los intestinos, son esenciales en el control del metabolismo de los lípidos, ya que transportan el colesterol y los triglicéridos a las células a través de los sistemas circulatorio linfático y sanguíneo. Debido a su alta compatibilidad, estabilidad y seguridad, se han convertido en transportadores biónicos que se utilizan para el diagnóstico y la terapia. A diferencia de los liposomas, pueden circular durante mucho tiempo en el torrente sanguíneo sin ser capturados por el SRE o reconocidos por el sistema inmunitario. Su pequeño tamaño les permite penetrar profundamente en los tumores y unirse a los receptores tumorales (Zheng et al., 2005).

Las lipoproteínas están formadas por dos compartimentos grandes: un núcleo apolar hidrófobo compuesto principalmente por triglicéridos y colesterol esterificado, que está recubierto con una membrana externa anfifílica formada por una monocapa de fosfolípidos (polar y no polar), colesterol libre y proteínas específicas llamadas apolipoproteínas. Por lo tanto, los fármacos lipofílicos se pueden insertar en el núcleo, mientras que los compuestos lipofílicos e hidrofílicos se pueden unir a la membrana (Shaish et al., 2001).

Según su tamaño, composición y densidad, las lipoproteínas se dividen en cuatro tipos principales: quilomicrones; lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL); lipoproteínas de baja densidad (LDL); y lipoproteínas de alta densidad (HDL). La composición y la función varían de un tipo a otro (Zheng et al., 2005). Hay un quinto tipo de lipoproteína de densidad intermedia (IDL), que es un producto del metabolismo de VLDL y tiene una vida útil muy corta porque se transforma rápidamente en LDL (Bricarelo *et al.*, 2011).

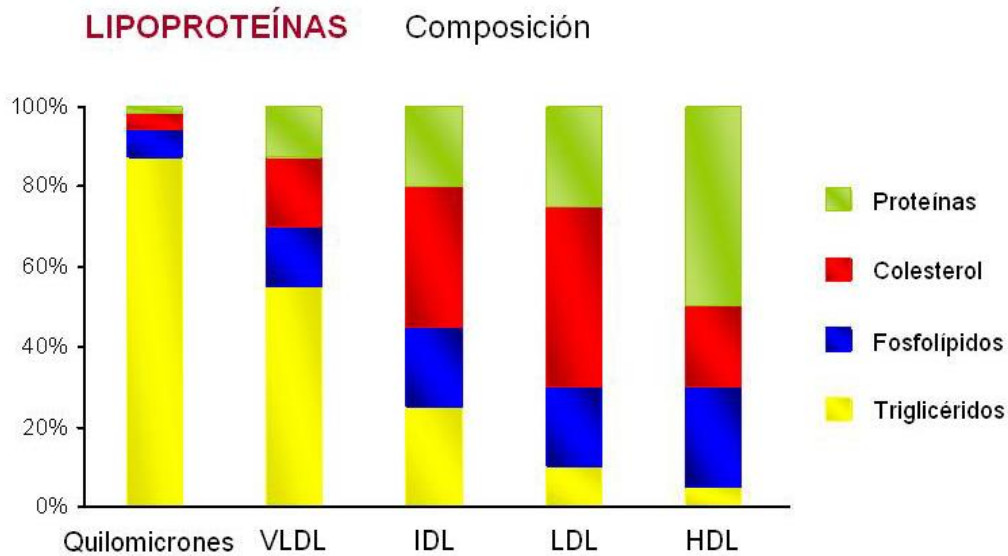


Figura 2. Comparación de la estructura de las lipoproteínas.

La figura 2. Representa una forma gráfica útil para comparar la composición de cada una de las distintas lipoproteínas, de manera general se puede destacar que a menor tamaño la cantidad de proteínas que las conforman es mayor, siendo la HDL la lipoproteína de menor tamaño.

Las lipoproteínas naturales se pueden modificar, reconstituir o recombinar para obtener partículas con las propiedades deseadas con el fin de insertar agentes de diversa naturaleza, incluidos los radionucleidos, para la detección, visualización y diagnóstico de diversas patologías en particular cáncer, aterosclerosis, (Isaac-Olivé et al., 2019; Shaish et al., 2001; Zheng et al., 2005). También se pueden sintetizar a partir de sus componentes principales. Estos procesos se realizan por diferentes métodos según el componente que se modifica y la molécula que se va a insertar.

3.2 Lipoproteínas de Alta Densidad reconstituidas (rHDL) como sistemas de entrega de fármacos.

a. Lipoproteínas de alta densidad: estructura y función.

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés High Density Lipoprotein) son una familia de partículas con una densidad entre 1.063 - 1.21 g/mL y un diámetro entre 7 y 600 NM (Aguilar-salinas & Melgarejo-hernández, 2011). Mas del 50% de su masa está constituido por proteínas; su contenido de fosfolípidos es mayor al del resto de las lipoproteínas. Su síntesis inicia con el transporte del colesterol de la membrana celular al espacio extracelular donde se une a la apolipoproteína A-I (apoA-I).

Las HDL son complejos macromoleculares, pseudomicelares, constituidos por lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol libre), lípidos no polares (triglicéridos y ésteres de colesterol) y por proteínas llamadas apolipoproteínas (Apo) (Siebenmann, 2014). Los lípidos anfipáticos se organizan en una monocapa al interior de la superficie del complejo, presentando sus grupos polares hacia el medio acuoso (ver figura 3).

La estabilidad de esta monocapa está garantizada por las apolipoproteínas. Los lípidos no polares son insolubles en un medio acuoso como el plasma y en consecuencia se sitúan en el interior de las lipoproteínas, evitando así las interacciones con grupos polares que serían fisicoquímicamente desfavorables. De esta manera el transporte de los lípidos en plasma está garantizado (Contreras-Duarte et al., 2014).

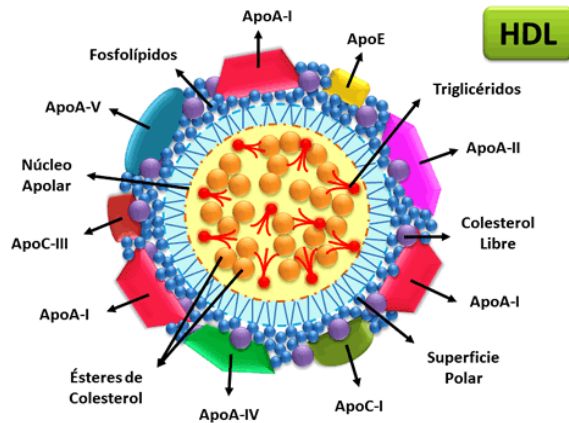


Figura 3. Estructura y composición de las lipoproteínas de alta densidad HDL.

Las HDL son las lipoproteínas con mayor proporción proteica (55-60% de su masa seca), siendo la Apo A-I su apolipoproteína más abundante (ver figura 4). La apoA-I es el principal componente proteico de las partículas HDL esféricas circulantes, se ha identificado además que las partículas lipídicas nacientes, presentan formas discoidales. La Apo A-I, aparte de su función estructural, es indispensable para el flujo de colesterol de las células periféricas. La Apo A-I desempeña también la función de coenzima de la lecitina: colesterol acil-transferasa (LCAT), enzima clave en el TRC.

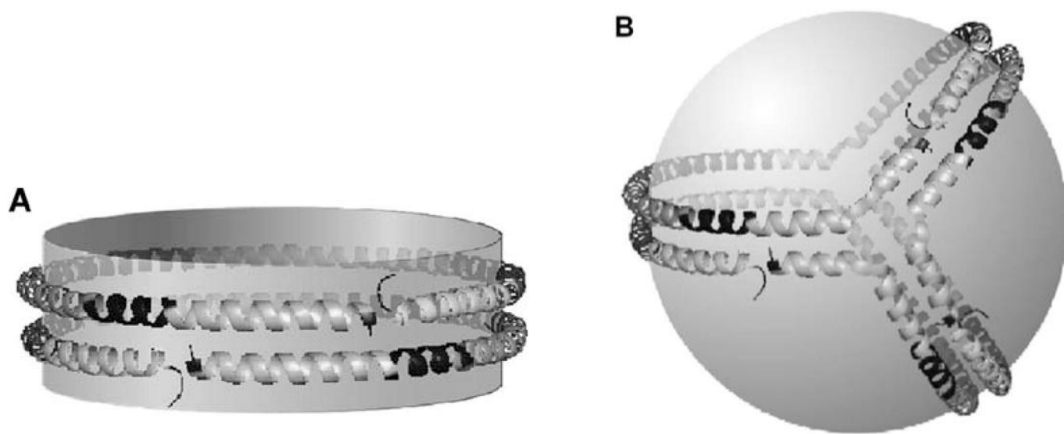


Figura 4. Conformación de ApoA-I en partículas HDL esféricas y discoidales. Las moléculas de apoA-I están organizadas como un doble cinturón en partículas discoidales (A) y como un trébol en partículas esféricas (B).

Las HDL son responsables del transporte inverso del colesterol desde los tejidos al hígado, donde se incorpora a través de receptores específicos de Apo-A1 llamados SR-B1. (Isaac-Olivé et al., 2019). Debido a esta función, las HDL tienen propiedades de protección ateroide ya que promueve el flujo de colesterol de los macrófagos de las placas ateroscleróticas al hígado para su excreción. Se ha informado que, además del colesterol, transporta otras sustancias; Por lo tanto, tiene un papel multifacético en la comunicación. Tiene propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Dependiendo de su composición y la vía de administración, se acumula en los riñones, hígado, bazo, corazón, aorta, pulmones y placas ateroscleróticas con un comportamiento farmacocinético superior al LDL (Rodríguez Esparragón et al., 2006).

El receptor específico de HDL (SR-B1) está presente en la membrana plasmática del hepatocito. Sin embargo, a diferencia del LDL, cuando el HDL interactúa con su receptor, no se internaliza ni se descompone en la célula, sino que regresa al torrente sanguíneo para adquirir más colesterol (Isaac-Olivé et al., 2019). Al igual que el LDL, el contenido de HDL es más bajo en pacientes con ciertos tipos de cáncer, aparentemente debido a un aumento en la expresión de los receptores SR-B1 en algunos tipos de células cancerosas, como el útero, el cáncer de mama y algunas líneas de cáncer de pulmón que producen una disminución en los niveles de HDL en sangre, de forma que la sobreexpresión de receptores SR-B1 puede emplearse como un bioindicador útil en el diagnóstico de proliferación de células cancerosas, empleando adecuadas sondas para la obtención de imágenes (Pérez-Martínez et al., 2003).

b. rHDL: Alternativas terapéuticas

A finales de los años sesenta, Scanu (Scanu, 1967) aisló la apolipoproteína humana y fosfolípidos usando una secuencia de dos pasos de separación y extracción por densidad y ultracentrifugación con solventes orgánicos. Después de la extracción, los lípidos se secaron y posteriormente se rehidrataron con una solución salina acuosa, tras una

incubación de lípidos con el aislado de proteína, a temperatura fisiológica, se formaron conjuntos de proteínas lipídicas, se utilizó cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para separar las diversas especies, absorbancia óptica a 280 nm para cuantificar el contenido de proteínas y la ultracentrifugación para medir la densidad de partículas; Scanu señaló que los productos de la incubación de la proteína lipídica dio como resultado partículas que exhibían un conjunto discreto de proporciones estequiométricas.

Esta serie de observaciones condujo a la noción de que las lipoproteínas nativas podrían reconstituirse mediante autoensamblaje simplemente incubando los constituyentes bajo condiciones apropiadas (Bricarello et al., 2011). A partir de ese hallazgo surge el término de lipoproteínas de alta densidad reconstituidas (rHDL).

La entrega y focalización terapéutica de fármacos para tejidos o células específicos es importante maximizar la eficacia y limitar las reacciones adversas. La toxicidad intrínseca de muchos fármacos puede conducir a efectos secundarios cuando se administran en dosis altas o cuando actúan en tejidos sanos. Para satisfacer estas condiciones, los sistemas de rHDL han sido probados, por su eficacia y especificidad en la administración dirigida de fármacos contra enfermedades crónico degenerativas e infectocontagiosas, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, hepatitis B, entre otros. En el futuro inmediato, es probable que las investigaciones se centren en ampliar el catálogo de componentes de membrana compatibles con las lipoproteínas sintéticas, lo que aumentaría significativamente sus aplicaciones terapéuticas. La utilización de rHDL para la terapéutica anticancerígena y la formación de imágenes tumorales revolucionaran la estrategia futura para el manejo de una amplia gama de cánceres y otras enfermedades (Raut et al., 2018).

Existen diversos estudios aplicados mediante este sistema en los cuales los resultados obtenidos son prometedores, tal es el caso de la HDL marcada con ^{99m}Tc , la cual se ha utilizado para visualizar sitios que sobreexpresan el receptor SR-B1, como el hígado y los tumores malignos (Isaac-Olivé et al., 2019). Se ha marcado con ^{59}Fe para estudios preclínicos de farmacocinética y biodistribución de hidróxido de hierro superparamagnético para IRM. El radiomarcado con ^{89}Zr y ^{125}I se ha utilizado para visualizar lesiones arterioscleróticas. Sintéticas o recombinadas, las HDL son muy atractivas como portadoras

de fármacos para aplicaciones teranósticas ya que su tamaño más pequeño le permite alcance a más profundidad en los tumores que las LDL (Murphy et al., 2009).

En resumen, las rHDL son inherentemente capaces de superar varias barreras biológicas. Su tamaño, capacidad de orientación intrínseca, el escape del endosoma, la seguridad demostrada en estudios en animales y humanos hace que esta idea sea muy atractiva para el diseño de los nuevos medicamentos de quimioterapia (Raut et al., 2018).

La toxicidad hepática podría ser una preocupación potencial, sin embargo, no se han encontrado informes que muestren daño en modelos murinos.

c. Estrategias de radiomarcado de rHDL

Los enfoques de radiomarcado para nanopartículas y polímeros son herramientas esenciales en el desarrollo de posibles sistemas de administración de fármacos. Se han desarrollado varias estrategias de radiomarcado con una gran variedad de diferentes isótopos para la obtención de imágenes PET y radioterapia, las cuales, muestran resultados muy prometedores.

Existen numerosas posibilidades de cómo se puede unir un radionúclido a sistemas poliméricos o nanopartículas ya sea directamente o mediante el radiomarcado a un grupo prostético (componente no aminoacídico). Para ello se deben tomar en cuenta varios aspectos tanto del radioisótopo, el sistema a emplear y el uso que se le dará al sistema.

En principio, el rango muy amplio de vidas medias del radioisótopo ya que permite el seguimiento y la detección de este en el organismo desde el punto de tiempo de administración hasta varios días e incluso semanas.

El sistema rHDL, permite el radiomarcado mediante un enlace covalente o mediante un quelante bifuncional. Por lo tanto, el marcado con un radiometal requiere un quelante, que forma complejos estables con él (Contreras-Duarte et al., 2014).

d. rHDL dirigido al receptor SR-B1

En el metabolismo de las partículas HDL se produce un proceso de captación celular selectiva de sus componentes, de forma que penetran los esteres de colesterol, pero no el componente proteínico. Este proceso de entrada selectiva está mediado, por un receptor scavenger de clase B y tipo 1, o SR-B1 (Rodríguez Esparragón et al., 2006) Siendo éste el primer receptor de las HDL caracterizado molecularmente.

El receptor SR-B1, es una proteína receptora de membrana multiligando que funciona como un receptor de HDL, fisiológicamente relevante cuya función principal es mediar la absorción o afluencia selectiva de ésteres de colesterol derivados de HDL en células y tejidos. Los receptores SR-B1 también facilitan la salida de colesterol de los tejidos periféricos, incluidos los macrófagos, y su retorno al hígado. Como regulador del contenido de colesterol en la membrana plasmática, SR-B1 promueve la absorción de vitaminas solubles en lípidos, así como la entrada de ciertas partículas virales en las células huésped. Estas funciones colectivas de SR-B1 afectan en última instancia la muerte celular programada, la fertilidad femenina, la función plaquetaria, la inflamación de la vasculatura, la aterosclerosis y el infarto al miocardio inducidos por la dieta (Rodríguez Esparragón et al., 2006).

Los receptores SR-B1, también han sido identificados como adecuados bioindicadores, debido a su asociación en el desarrollo y proliferación de neoplasias, empleándose para el diagnóstico y pronóstico del cáncer. Por lo que ahora se está evaluando como una puerta de entrada para el suministro de agentes terapéuticos y de diagnóstico.

4. Justificación

Las aplicaciones de la medicina nuclear en la atención médica se han consolidado, con el tiempo, como técnicas altamente rentables para encarar importantes problemas de salud como la malnutrición, el cáncer, enfermedades infecciosas y circulatorias. Hoy en día, reportan beneficios perdurables a pacientes, médicos, investigadores médicos y profesionales de la salud en todo el mundo. Muchas aplicaciones nucleares ya están tan bien establecidas y documentadas, que se prefieren a otros métodos, por esta razón son un indicio prometedor para continuar con la investigación de nuevas plataformas, combinaciones de vectorización dirigidas a receptores o biomarcadores específicos, nuevas modalidades de tratamiento, así como la evaluación de la eficacia del tratamiento.

Una de las principales ocupaciones de estas aplicaciones es la radioterapia para eliminar o disminuir tumores malignos, sin embargo, como limitante, estos muestran una notable heterogeneidad, incluso en el mismo sitio de tejido se pueden encontrar diferentes tipos de células con antecedentes genéticos variables. Por el contrario, se ha encontrado que un marcador relativamente consistente, el receptor del captador tipo B1 (SR-B1), se sobreexpresa de manera consistente por la mayoría de las células tumorales (Mooberry et al., 2016). El receptor SR-B1, es una proteína receptora de membrana multiligando que funciona como un receptor de lipoproteína de alta densidad (HDL), lo que la convierte en una molécula de interés para su posible uso como transportador de fármacos o agentes que sean dirigidos hacia el receptor SR-B1. Se busca que sean un sistema seguro, eficaz y de calidad, por ello las investigaciones conducen a la reconstitución de esta molécula mediante técnicas químicas (rHDL).

En el presente estudio se propone la elaboración de un sistema nanolipídico como posible transportador de fármacos mediante la elaboración de rHDL cargadas con colesterol previamente modificado con la unión de un agente quelante (DOTA-isotiocianato), el cual servirá para la incorporación de un radioisótopo de Lutecio 177 mediante técnicas radioanalíticas. Con base en lo anterior, se pretende formular dicho sistema para que en investigaciones próximas se estudie el dirigirlo hacia células y tumores malignos que

sobreexpresen el receptor SR-B1, y pueda producir muerte celular en tumores sólidos mediante medicina nuclear.

Recientemente, los radiofármacos de ^{177}Lu con reconocimiento molecular específico, se han propuesto como una nueva clase de radiofármacos teragnósticos debido a las propiedades terapéuticas (emisión β - máxima de 497 keV) y diagnósticas (emisión γ para imagen nuclear de 113 y 208 keV) del radionúclido. No hay hasta el momento artículos donde las HDL hayan sido radiomarcadas con ^{177}Lu . Razón que justifica el objetivo de este proyecto.

Para que un radiofármaco sea empleado como agente terapéutico tiene que cumplir ciertos requisitos por lo que el producto final de esta investigación será evaluado para verificar su cumplimiento en cuanto a las características fisicoquímicas del radionúclido y de la molécula vector, así como una evaluación biológica de los parámetros de captación celular y estudios biocinéticos.

5. Hipótesis

La incorporación del conjugado Colesterol-DOTA a lipoproteínas de alta densidad reconstituidas y su radiomarcado con ¹⁷⁷Lutecio brindaran una molécula que funcione como transportadora de fármacos, teniendo una eficiencia en la captación celular superior al 50%.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Preparar y caracterizar un sistema de transporte de fármacos a partir de lipoproteínas de alta densidad reconstituidas, radiomarcadas con ^{177}Lu -Lutecio, para evaluar su capacidad radioterapéutica.

6.2 Objetivos específicos

6.2.1. Modificar mediante una reacción de halogenación con SOCl_2 y una posterior reacción tipo SN_2 para aminorar la molécula de colesterol, y así conjugarla con el quelante DOTA-isotiocianato.

6.2.2. Sintetizar y caracterizar el complejo colesterol-DOTA.

6.2.3. Preparar y caracterizar rHDL que incluyan el complejo colesterol-DOTA en su composición.

6.2.4. Radiomarcas las rHDL-DOTA con Lutecio-177.

6.2.5. Evaluar la actividad biológica del sistema mediante estudios biocinéticos y de captación celular.

7. Materiales y métodos

7.1 Diseño metodológico

7.1.1. Tipo de estudio: experimental, observacional y descriptivo.

7.1.2. Variables dependientes: concentración del radioisótopo, temperaturas de reacciones químicas, técnicas analíticas.

7.1.3. Variables independientes: Eficiencias de reacción. Radiomarcado, pureza radioquímica.

7.2 Materiales y reactivos

Los reactivos: Cloruro de tionilo (SOCl_2), 118.97 g/mol; Etilendiamina ($\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2$), 60.1 g/mol; Oleato de colesterol ($\text{C}_{45}\text{H}_{78}\text{O}_2$) 651.10 g/mol; Ácido etilendiaminotetraacético, EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$), 292.94 g/mol, Proteína Apo- A1 de plasma humano, se adquirieron de Sigma-Aldrich.

El diclorometano (CH_2Cl_2), 84.933 g/mol y la Dimetilformamida ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$), 73.09 g/mol; fueron adquiridos de la Marca Fermont.

El Hidruro de sodio (NaH), 23.99 g/mol; Cloruro de potasio (KCl), 74.55 g/mol, se adquirieron de botica la moderna.

Los lípidos: Fosfatidilcolina de yema de huevo (EYPC), Colesterol ($\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$), 386.65 g/mol se adquirieron de Pioner Biotech.

DOTA-isotiocianato ($\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$), 668 g/mol. Obtenido de la marca Macrocyclics.

$^{177}\text{LuCl}_3$, marca ITG, Alemania.

7.3. Instrumentación

7.3.1. Espectroscopía UV-Vis:

Los espectros de absorción se obtuvieron con un espectrofotómetro Thermo Genesys 10S en el rango de 200-800 nm, utilizando una celda de cuarzo de 1 cm. Las suspensiones de nanopartículas se midieron mediante espectroscopía UV-Vis para controlar las reacciones de conjugación.

7.3.2. Espectroscopía IR-FT.

Los espectros IR de materias primas y muestras deshidratadas se obtuvieron en un espectrómetro Perkin Elmer System 2000 con plataforma ATR (Pike Technologies), aplicando espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier de reflexión total atenuada (ATR-FT-IR). Los espectros se adquirieron con 50 barridos, en un rango operativo de 4000 - 400 cm^{-1} y una resolución de 0,4 cm^{-1} .

7.3.3. Dynamic Light Scattering (DLS) and Zeta Potential (ζ):

La distribución del tamaño de partícula y el potencial Z de las partículas de rHDL se llevaron a cabo mediante análisis de dispersión dinámica de luz (DLS), utilizando un analizador Nanotracs (Microtract; FL, EE. UU.). Los análisis se realizaron con una longitud de onda de 657 nm (20 ° C, corriente de 15,79 mA, campo eléctrico de 14,35 V / cm y un tiempo de muestreo de 128 μs), en solución acuosa. Para cada muestra, se informó el diámetro medio y la desviación estándar ($n = 3$). El potencial zeta se midió en muestras diluidas para asegurar una fuerza iónica constante y adecuada.

7.4 Métodos experimentales

a. Diagrama general

A continuación se esquematiza la secuencia general desarrollada en la parte experimental de la presente investigación, desde la formulación del complejo colesterol-DOTA, la preparación de las rHDL, el radiomarcado de las mismas; así como la caracterización fisicoquímica de los productos intermedios obtenidos y por último la evaluación biológica del producto final.

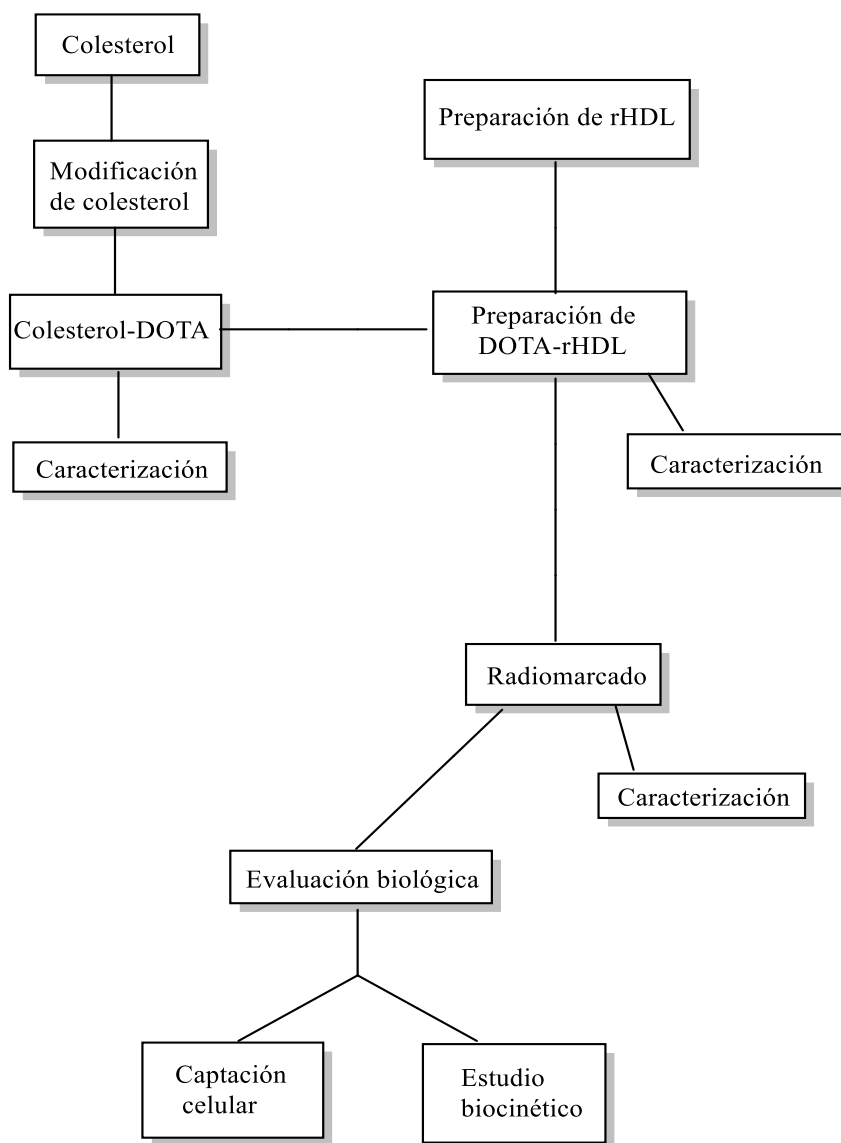


Figura 5. Esquema general

b. Secuencia metodológica

I. Síntesis de derivado: Col-DOTA

El objetivo de la primera fase del experimento es la conjugación de una molécula de colesterol con una molécula del quelante DOTA, al no ser una reacción que se lleve a cabo de manera directa, se optó por llevar a cabo una modificación al colesterol realizando una halogenación sustituyendo su grupo -OH por un grupo cloro, para posteriormente hacer una nueva sustitución de ese grupo por una molécula de etilendiamina. Esto permitió la adición de la molécula DOTA mediante una reacción de conjugación entre la etilendiamina y el grupo isotiocianato del compuesto mencionado.

El procedimiento descrito en la figura 5, refiere la serie de reacciones en el procedimiento:

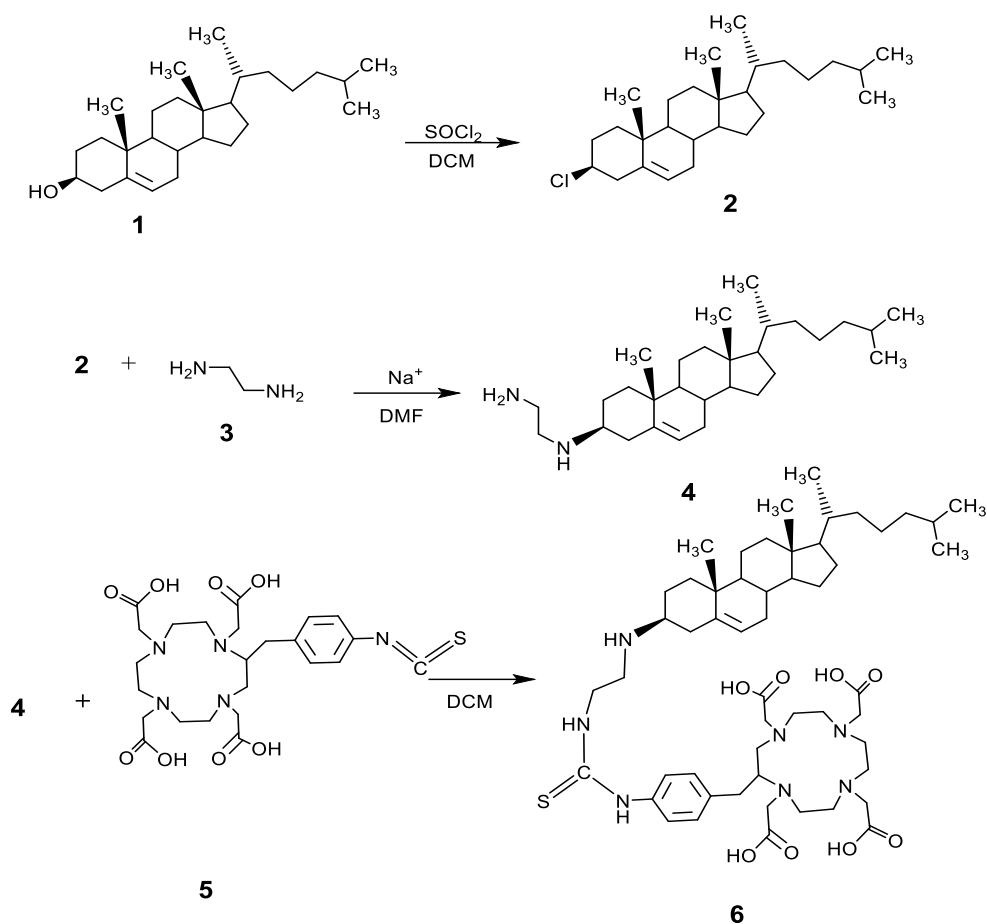


Figura 6. Diagrama general de la reacción.

II. Modificación de colesterol

Para la obtención del compuesto Col-Cl [2], se realizó una cloración partiendo de 0.730 g de colesterol [1] que se disolvieron en 5 mL de diclorometano (DCM) se colocaron en un matraz con agitación y temperatura ambiente, posteriormente se añadieron 41 microlitros (reacción 3:1) de cloruro de tionilo (SOCl_2) y se mantuvo en agitación durante 3 horas, al finalizar el tiempo se llevó a cabo un lavado del producto y posteriormente la cristalización y purificación del colesterol modificado, Col-Cl [2], para su posterior caracterización. La reacción fue llevada a cabo en un sistema como el que se muestra en la figura 6 a continuación, la trampa con cloruro de calcio fue utilizada debido a que la reacción desprende vapores.

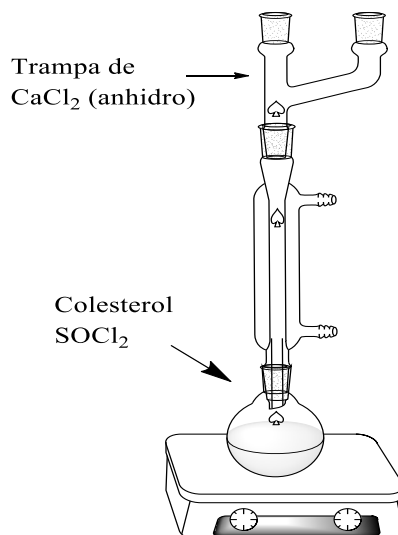


Figura 7. Arreglo experimental de la reacción de halogenación

III. Aminación del colesterol clorado

Partiendo de 0.0101 g de la molécula 2, se colocaron en un matraz de bola junto a 0.450 mL de Etilendiamina y 1 mL de Dimetilformamida, se agito la reacción y posteriormente se colocaron 2 equivalentes de hidruro de sodio. La reacción fue llevada a cabo en una atmosfera de nitrógeno y se mantuvo en agitación durante 3 horas.

La reacción se llevó a cabo en un sistema como el que se muestra en la figura 7 en atmósfera de nitrógeno.

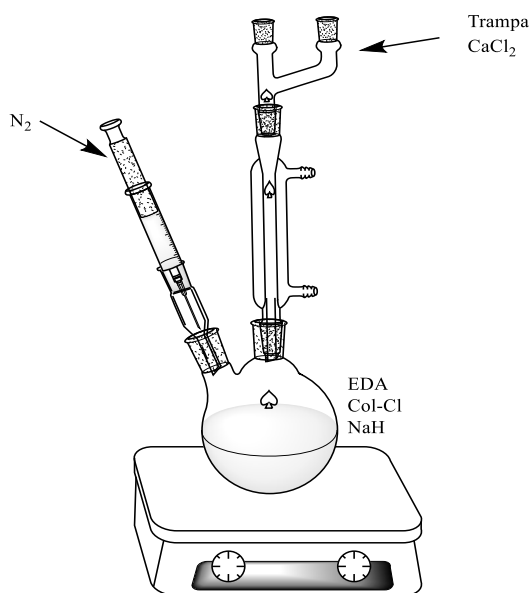


Figura 8. Arreglo experimental de la reacción de aminación.

IV. Conjugación de DOTA

Se colocaron en un matraz de bola 0.015 g del compuesto DOTA-isotiocianato junto a 0.0093 g del compuesto colesterol-NH₂, la reacción se mantuvo en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente, se utilizó como disolvente 5 mL de diclorometano, el cual fue evaporado al término de la reacción. Posteriormente se realizó la purificación del producto mediante la técnica de par de disolventes.

V. Preparación de rHDL

Preparación de soluciones

- Fosfatidilcolina de yema de huevo (EYPC): 50 mg/ml. Se prepara en cloroformo. Y se almacena a -20°C.
- Colesterol libre: 50 mg/ml. Se prepara en cloroformo. y se almacena a -20° C.
- Ester de colesterol: 20 mg/ml. Se prepara en cloroformo. Y se almacena a -20° C.

- Buffer pH = 8.0: 10 mM tris, 0.1 M KCl, 1 mM EDTA pH 8.0. Almacenar a -4° C.
- Proteína Apo- A1: 9.24 mg/ml. Se prepara en Tris buffer y se almacena a -20° C.
- Colato de sodio: 100 mg/ml. Se prepara en Tris buffer y se almacena a -4° C.

Nota: Se esteriliza el buffer. Se preparan las soluciones de proteína y colato de sodio y se filtran con miliporos de 22 micrómetros.

Procedimiento

Colocar en un vial de cristal 300 μL de EYPC, 10 μL s de colesterol y 7.5 μL de éster de colesterol. Mezclar todo, y colocar el vial horizontalmente para pasarle un flujo de aire comprimido (nitrógeno) para evaporar el cloroformo. Posteriormente, se añaden 500 μL de proteína Apo-A1, 140 μL de colato de sodio y 1.322 μL de buffer. La mezcla se coloca en agitación en un vortex, el vial se cierra y se sella con parafilm se coloca en incubación y agitación a 4°C durante 24 horas. Por último, el producto se dializa para eliminar el exceso de colato y demás reactivos durante 24 horas con 4 cambios de solución dializadora.

VI. Preparación de DOTA-rHDL

La preparación de las rHDL con el compuesto colesterol-DOTA se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en la sección V. con la única diferencia que un tercio del colesterol libre se sustituye por el compuesto modificado.

VII. Radiomarcado de ^{177}Lu -DOTA-rHDL

7.1. Radiomarcado

Para realizar el radiomarcado de las partículas DOTA-rHDL se tomó una alícuota de 100 μL de DOTA-rHDL (1mg/250 μL H₂O) se diluyó con 100 μL de una solución amortiguadora de acetato 1 M a pH 7.0, seguido por la adición de 10 μL (3 MBq) de una solución de $^{177}\text{LuCl}_3$ (ITG, Alemania). La mezcla se incubó a 37 °C en un termoblock seco por 3 horas., posteriormente se realizó la determinación de la eficiencia de marcado y la pureza radioquímica.

7.2. Caracterización radioquímica

- a. La eficiencia de marcado se determinó mediante cromatografía en capa fina (ITLC), empleando solución salina (NaCl) como fase móvil. Los iones de Lu^{+3} libre se desplazan con el frente del solvente, mientras que las rHDL marcadas, permanecen en el origen. Posteriormente se cuantifica la actividad del frente y del origen de la fase estacionaria.
- b. La pureza radioquímica se determinaron empleando un método de centrifugación, con filtros para centrifuga Amicon®-15 10K (10,000 MWCO), para ello una muestra de 1 ml se centrifugó a 3500 rpm, separando el sobrenadante del contenido particulado, que por su peso molecular queda en la membrana de filtración. Se determinó la actividad en el filtrado y sobrenadante, para obtener la fracción de radiactividad no asociada a las rHDL.

VIII. Caracterización biológica

a. Captación de rHDL

La captación de rHDL-DOTA-Lu se evaluó por microscopía de fluorescencia. Se sembraron 2.5×10^5 células T47D, se incubaron por 24 h a 37 °C y 5 % de CO_2 . Posteriormente, se agregaron 200 μL de lipoproteínas de alta densidad modificadas con DOTA y radiomarcadas con Lu^{-177} (DOTA-rHDL-Lu) e incubó a 37 °C durante una hora. Se retiró el medio y se lavó con PBS 1x. Las células se fijaron con paraformaldehído al 2 % durante 15 min a temperatura ambiente y posteriormente, se enjuagaron con PBS 1x. Se agregó el marcador fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e incubó 37°C por 5 min. Para la adquisición de imágenes se utilizó el microscopio de fluorescencia Nikon eclipse, empleando un objetivo de 60X.

La especificidad del sistema DOTA-rHDL-Lu se evaluó a través del bloqueo de los receptores SR-B1 utilizando microscopia de fluorescencia. 2.5×10^5 células de T47D, se incubaron con 200 μL Apo-A1 (1 mg/ml) por 30 min. Posteriormente, las células se incubaron con 200 μL de DOTA-rHDL-Lu a 37°C durante una hora. Se retiró el medio y se lavó con PBS 1x. Las células se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 15 min a temperatura ambiente y posteriormente, se enjuagaron con PBS 1x. Se agregó el marcador

DAPI e incubó 37°C por 5 min. La adquisición de imágenes se hizo con el microscopio de fluorescencia Nikon eclipse.

b. Modelo biocinético

El estudio de biodistribución se realizó en ratones sanos de la cepa Balb-c. Se utilizaron ratones isogénicos de tres semanas de edad (20 –25 g), se seleccionó como vía de administración la vía intraperitoneal, teniendo 4 grupos con n = 3, cada uno.

A cada animal se le administró una actividad de 285 µCi (10.54 x 10⁶ Bq) por ratón (n = 3), la disección se realizó por grupo a las 2 h, 24 h, 48 h y 120 h, post administración. Los órganos se pesaron y se determinaron las actividades presentes en los órganos.

De forma experimental en el estudio biocinético, se obtiene el valor de la actividad en función del tiempo de los distintos órganos del ratón, la medida se corrige experimentalmente por medio de la normalización contra un estándar radiactivo ($e^{-\lambda_{rad}t}$), que a todos los tiempos representará un valor de 100 %, de esa forma obtenemos únicamente el valor de la componente debida a la interacción biológica del radiofármaco ($q_h(t)$), de forma algebraica tenemos que:

$$q_h(t) = A_0 e^{-\lambda_{biol} t}$$

Para un modelo cinético exponencial donde la concentración del radiofármaco al tiempo (t) sigue una cinética de primer orden, puede ser representada de acuerdo con:

$$q_h(t) = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t} + C e^{-\gamma t} + n e^{-nt}$$

Para conocer la farmacocinética de las rHDL marcadas, tomando en cuenta la componente de eliminación biológica y radiactiva, es necesario multiplicar los datos experimentales por el factor de decaimiento ($e^{-\lambda_{rad}t}$) y de donde obtendremos el porcentaje de la actividad inyectada $A_h(t)$ algebraicamente se tiene que:

$$A_h(t) = q_h(t) e^{-\lambda_{rad}t} = A_0 (e^{-\lambda_{biol} t} e^{-\lambda_{rad}t}) = A_0 e^{-\lambda_{eff} t}$$

De acuerdo al formalismo anterior, la actividad acumulada en los órganos de interés se determinó numéricamente con los valores obtenidos para construir los modelos cinéticos y las funciones de los modelos compartimentales usando el software OLINDA/ORIGIN.

6.3.5.2 Normatividad de uso de modelos in vivo

Los estudios de biodistribución del sistema ^{177}Lu -DOTA-rHDL en un modelo murino se realizaron de acuerdo con las normas internacionales y nacionales y las normas éticas para el manejo de animales de laboratorio (Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999).

Los ratones se mantuvieron en contenedores plásticos, con cama de virutas de madera, períodos de luz de 12:12 h, temperatura y humedad constante, y. El agua y la alimentación (alimentación estándar PMI 5001) se administraron ad libitum.

8. Resultados y discusiones

8.1 Modificación del colesterol

La tabla 2 muestra los resultados de la caracterización de los productos obtenidos a través de la modificación del colesterol mediante tres reacciones. El paso inicial fue partir de colesterol libre para sustituir el grupo OH por un cloro, el rendimiento de esta reacción fue del 27.87%, el producto fue purificado mediante la técnica de par de disolventes, se hizo la medición del punto de fusión el cual fue de 95 °C, siendo acorde a lo esperado tras la incorporación de la molécula de cloro reduciendo así el punto de fusión del colesterol puro el cual es de 148 °C, el producto final fue un polvo color amarillo opaco que posteriormente fue llevado a una reacción de aminación para sustituir el grupo cloro por una amina, en la figura 13, se presenta el mecanismo de reacción. Esta reacción tuvo un rendimiento del 64.35%, y el producto se purificó mediante la técnica de par de disolventes, su punto de fusión fue de 121 °C; el aumento en el punto de fusión nos indica que la sustitución de la molécula de cloro fue realizada de manera adecuada, como producto final de esta reacción se obtuvo un polvo color amarillo fuerte, higroscópico. Como último paso el producto se colocó en una reacción con la molécula DOTA isotiocianato para obtener el producto final, el cual mostró un punto de fusión superior al subproducto anterior lo cual sugiere la correcta adición del quelante a la molécula de colesterol.

| Tabla 3. Cuanti y cualificación de los productos de reacción | | | | | |
|--|--------------------|-----------------------|--|-----------------|------|
| Producto | Rendimiento %, (g) | | Características | Punto de fusión | Rf |
| | Teórico | Práctico | | | |
| Colesterol | --- | --- | Polvo fino blanco, textura oleosa. | 148 °C | 0.26 |
| Col-Cl | 100%, (0.0764g) | 27.87%, (0.0213 g) | Polvo amarillento, textura oleosa. | 95 °C | 0.40 |
| Col-NH ₂ | 100%, (0.0202g) | 64.35%, (0.0130g) | Conglomerado color amarillo fuerte, higroscópico | 121 °C | 0.83 |
| Col-DOTA | 100%, (0.0243g) | 92%, (0.0224g) | Polvo fino color crema, de textura oleosa | 133 °C | 0.60 |

8.2. Caracterización por espectroscopia IR y espectrofotometría UV-Vis.

8.2.1. Colesterol

8.3. Espectrometría IR-FT

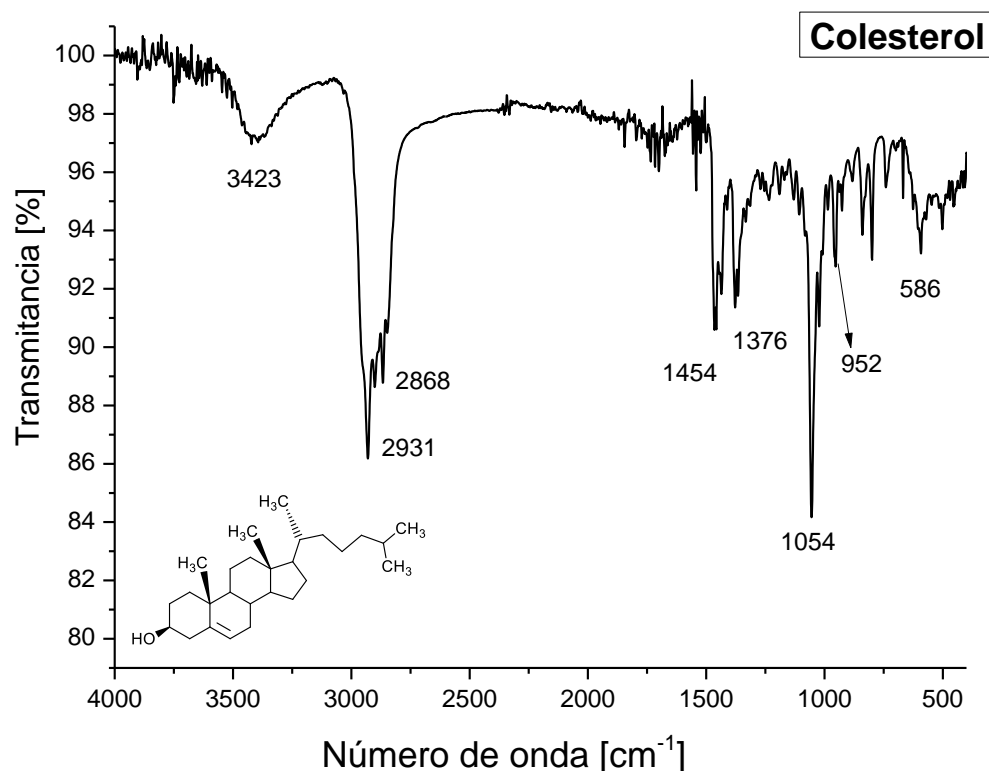


Figura 9. Espectro de IR de colesterol.

El espectro IR del colesterol, mostró dos bandas intensas entre 2850-2950 cm^{-1} atribuibles a la presencia de enlaces $(-\text{CH}_2-)_{\text{st}}$ de cicloalcanos y la cadena alifática lateral $-(\text{CH}_2)_3-$ presentes en la molécula de colesterol, también se observa los modos vibracionales $(-\text{CH}_2-)_{\text{das}}$ en 1454 cm^{-1} . Se presentan bandas para los enlaces $(-\text{CH}_3)_{\text{dsy}}$ entre 1000-1400 cm^{-1} ya que la molécula presenta cinco metilos terminales. En la región de 3423 cm^{-1} se puede observar una banda de baja intensidad pero ancha la cual indica la presencia del grupo $(\text{OH})_{\text{st}}$ al igual que la banda débil que se observa en 586 cm^{-1} , atribuible al mismo grupo funcional.

8.2.2 Espectroscopia UV-Vis

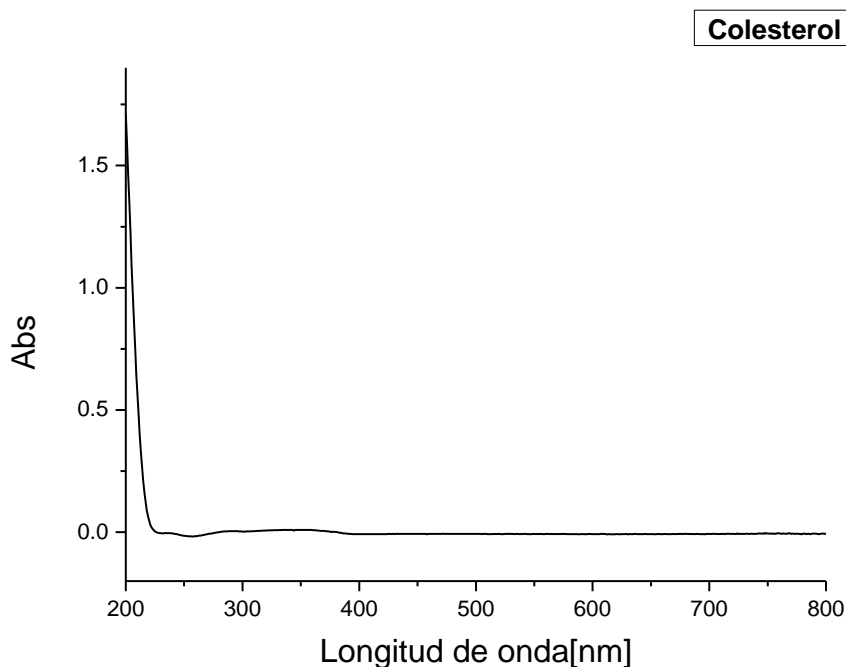


Figura 10. Espectro UV-Vis de colesterol.

En los hidrocarburos saturados, en los que solamente hay enlaces sencillos (C–H) se producen transiciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$, estas transiciones entre orbitales moleculares sigma enlazantes y antienlazantes implican energías relativamente altas, de forma que las bandas de absorción se observan en el ultravioleta lejano, a longitudes de onda inferiores a 200 nm. Para el caso del enlace (C=C), la transición es de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ la cual forma bandas en la región de los 163 nm, lo cual es difícil apreciar por la sensibilidad del instrumento de medición, pero el espectro obtenido es similar al reportado en bases de datos (Medrano & Del Castillo, 2012).

8.3 Colesterol-Cloro

8.3.1 Mecanismo de reacción

Esta parte de la síntesis consiste en la formación de un cloruro de alquilo a partir de un alcohol secundario (colesterol) mediante el tratamiento con cloruro de tionilo. La reacción es una sustitución nucleofílica tipo 2 (S_N2), la figura 10 representa el mecanismo de

reacción, el cual se lleva a cabo en 7 pasos iniciando por la formación del clorosulfito a partir del ataque del alcohol y su adición al centro deficiente de electrones, en este caso el azufre. Posteriormente se lleva a cabo la sustitución nucleofílica biomolecular, donde el cloro actúa como nucleófilo e intercambia la posición con el grupo $-OH$ del colesterol.

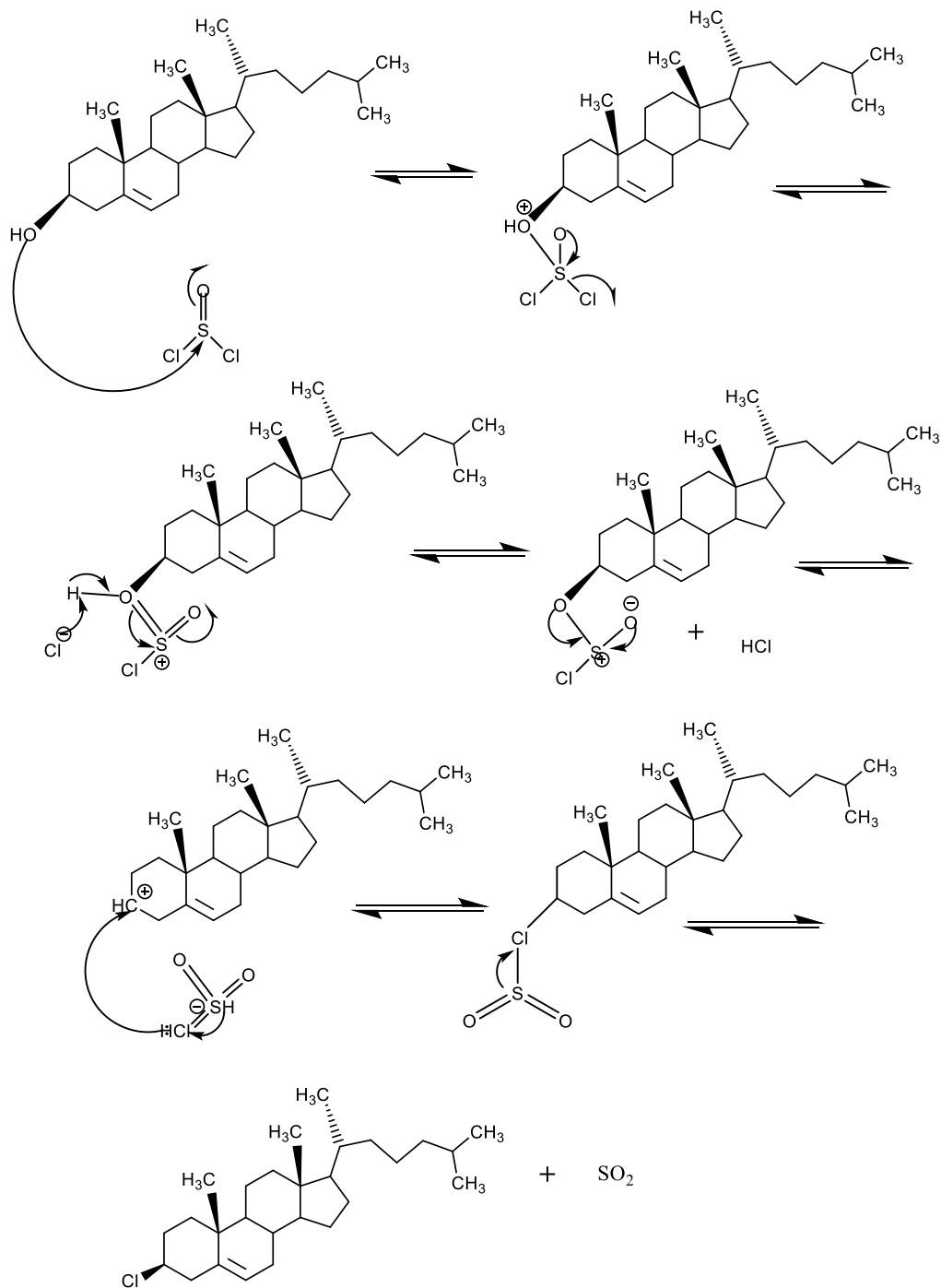


Figura 11. Mecanismo de reacción de la reacción de halogenación.

8.3.2 Espectroscopia IR-FT

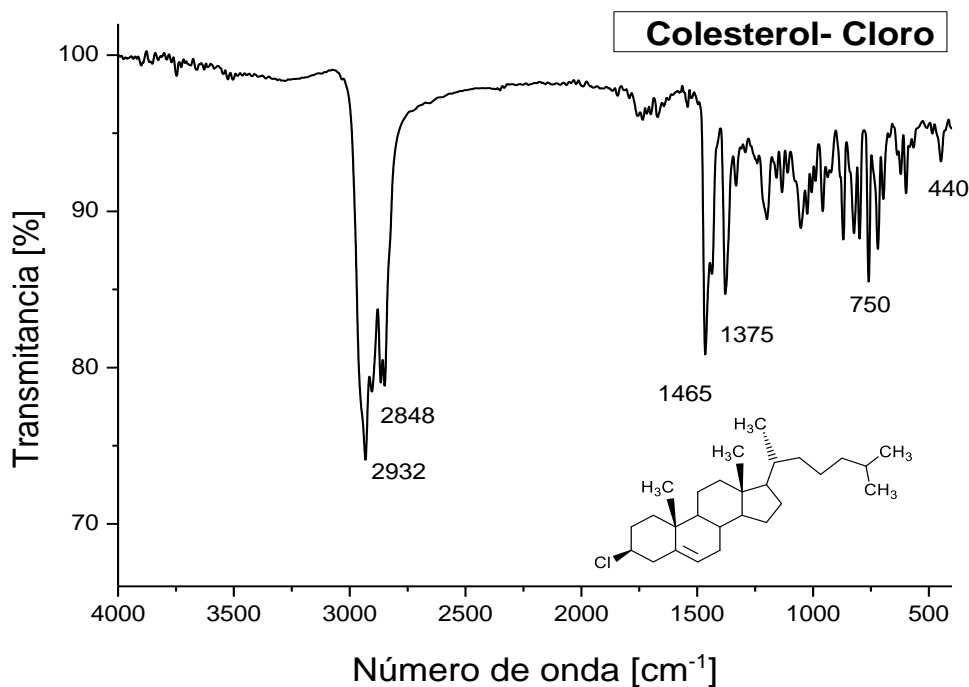


Figura 12. Espectro de IR de colesterol-cloro.

El espectro del colesterol halogenado (Col-Cl) mostró las bandas en la región entre 2850-2950 cm⁻¹ atribuible a la presencia de enlaces (-CH₂-)_{vs} en la molécula de colesterol, y además con una intensidad similar, también se vuelven a presentar las bandas para esos enlaces en 1000-1400 cm⁻¹, se observa un pico referente al grupo (CH₃)_{δsy}; la banda que se encuentra en los 440 nm se muestra como una banda débil que es característica de los cloroalcanos (CCl)_δ. Por otra parte, al realizar la comparación con el espectro de colesterol libre se puede notar que ya no se encuentra la banda característica del grupo (OH), lo que sugiere que el cloro si fue adicionado a la molécula de colesterol sustituyendo al OH.

En su artículo llamado “Halogen bonds in biological molecules”, Pascal Auffinger realiza un análisis sobre las propiedades de los enlaces de halógeno biomoleculares, particularmente en su relación geométrica y energética con los enlaces de hidrógeno clásicos y menciona que los convierten en herramientas potencialmente poderosas para el diseño de inhibidores, nanomedicina y la ingeniería molecular (Auffinger, 2011).

8.3.3 Espectroscopia UV-Vis

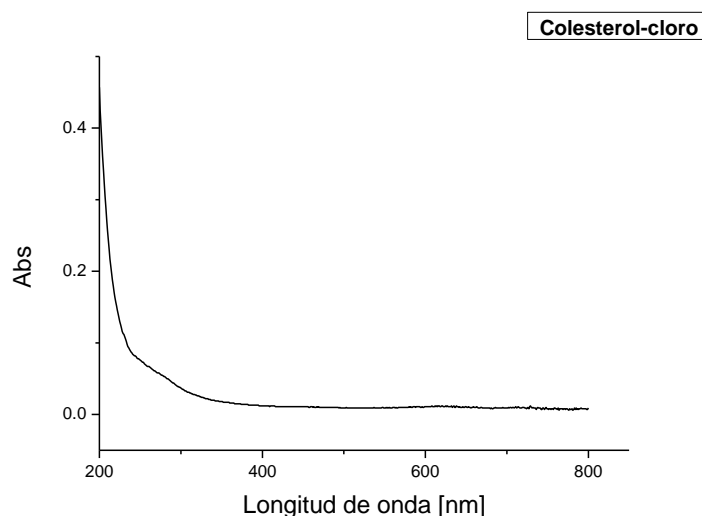


Figura 13. Espectro UV-Vis de colesterol-cloro.

El espectro UV-Vis de la molécula de colesterol-cloro muestra una banda cercana a los 200 nm, esta puede ser debido al enlace (C–Cl) el cual presenta una transición $n \rightarrow \sigma^*$ y de acuerdo a la literatura (Ríos, 2011) presenta una absorbancia máxima en 173 nm. El resto de la molécula es concordante con el espectro de colesterol.

8.4 Colesterol-NH₂

8.4.1 Mecanismo de reacción

Uno de los métodos más utilizados para obtener aminas consiste en la reacción de aminas más simples con diversos agentes alquilantes como los haluros o sulfonatos de alquilo (Mirón, n.d.).

En la figura 13. se muestra el mecanismo de reacción para la aminación del colesterol, se trata de una reacción de tipo S_N2 , en la cual se realiza la sustitución del grupo –Cl por una etilendiamina, para que la reacción funcione de manera adecuada es necesaria la incorporación de una base fuerte, en este caso el NaH cuya función es la protonación del Na^+ para facilitar la incorporación de la amina a la molécula de colesterol.

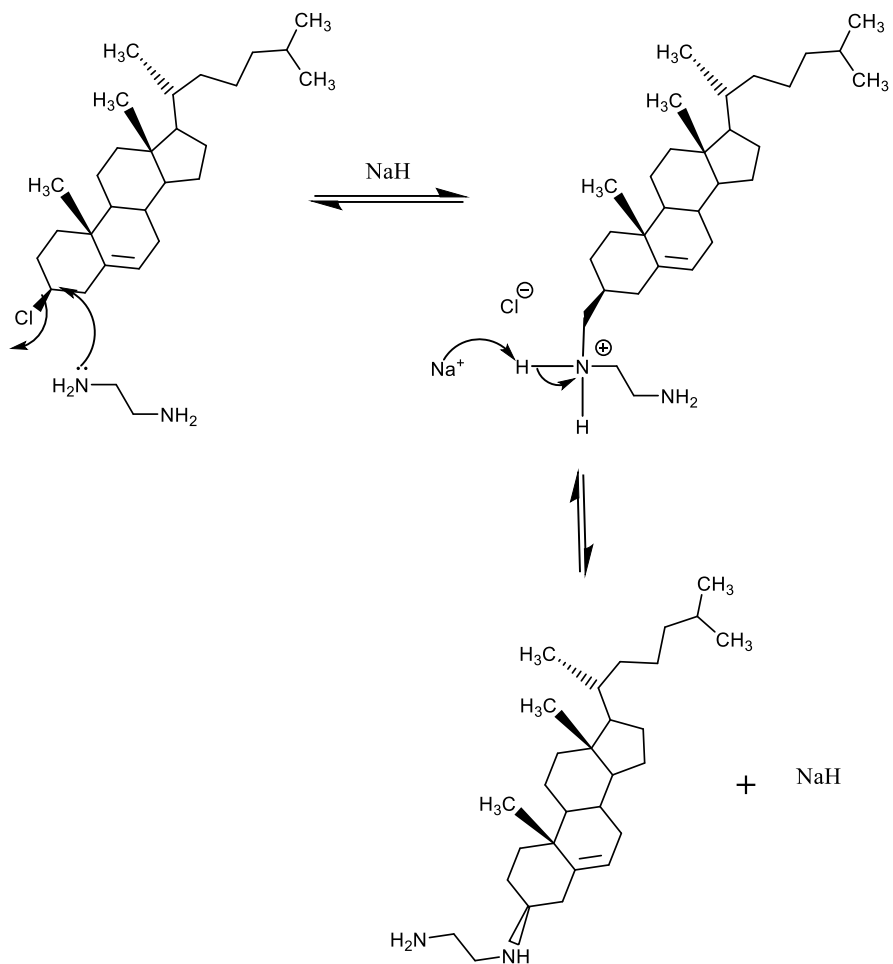


Figura 14. Mecanismo de la reacción de aminación.

8.4.2 Espectroscopia IR-FT

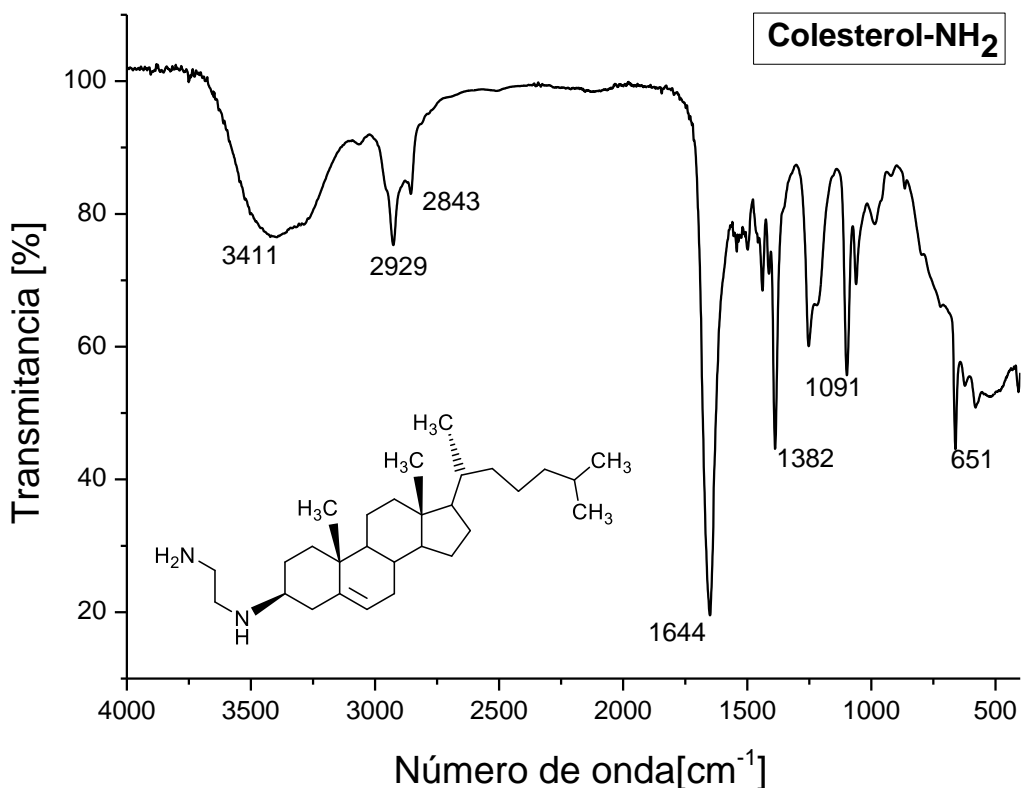


Figura 15. Espectro de IR de colesterol-NH₂.

El espectro IR del colesterol aminado (Col-NH₂) mostró una banda ancha en 3400-3500 cm⁻¹ que caracteriza la presencia de una amina primaria (NH₂)_{st} lo cual indica la sustitución nucleofílica tipo 2 de la etilendiamina, ya que las aminas exhiben una zona de absorción muy característica, debido a la vibración de alargamiento -NH₂, en forma libre o con la formación de enlaces de hidrógeno, observables en el rango de 3000-3700cm⁻¹. Si es una amina primaria, la absorción aparece como un pico doble o una banda muy ancha, como se aprecia en el espectro.

También se observa la desaparición de la vibración en los 440 nm asociada al cloroalcano (CCl)_δ, de lo cual se infiere la sustitución del cloro. Además se mantienen los modos vibracionales en las regiones 2800-2950 y 1000-1400 cm⁻¹ atribuibles a la presencia de enlaces (CH₂)_{bs} en la molécula de colesterol.

8.4.3 Espectroscopia UV-Vis

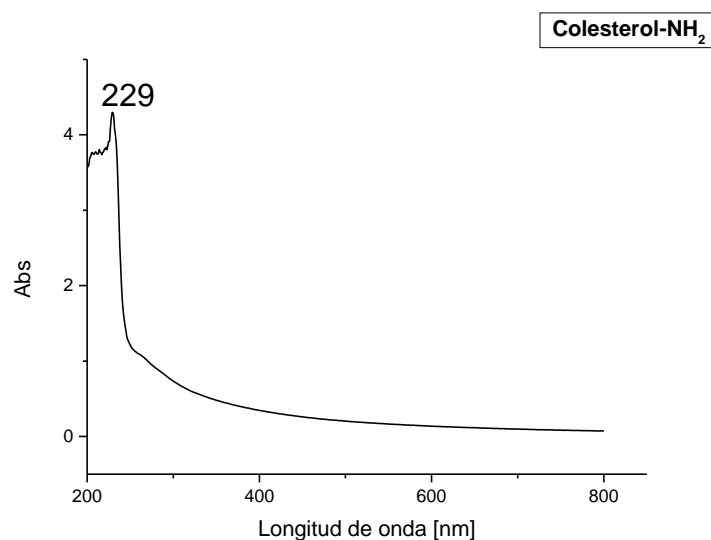


Figura 16. Espectro UV-Vis de colesterol-NH₂.

El espectro UV-Vis de la molécula de colesterol-NH₂ muestra una banda a los 229 nm la teoría indica que el grupo (-NH₂) el cual presenta una transición $n \rightarrow \sigma^*$ actúa como un compuestoauxocromo y presenta bandas cercanas a los 220 nm. El resto de la molécula es concordante con el espectro de colesterol.

8.5 DOTA-SCN

8.5.1 Espectroscopia IR-FT

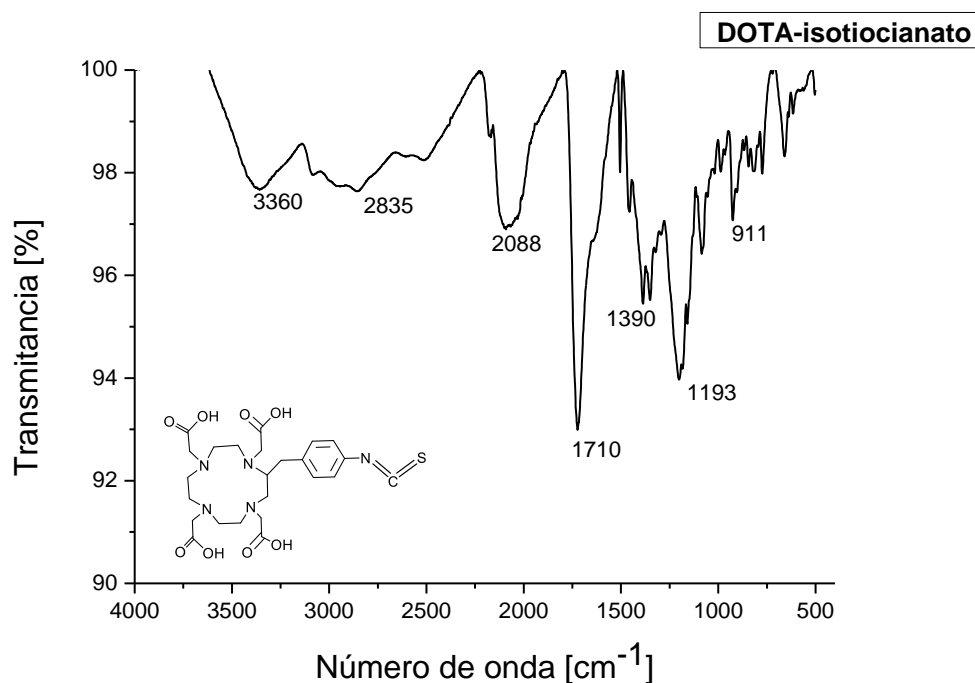


Figura 17. Espectro de IR de DOTA-isotiocianato.

El espectro de la molécula DOTA-isotiocianato, mostró bandas anchas de baja intensidad entre 2800-2950 cm⁻¹ atribuibles a la presencia de enlaces (-CH₂-)_{st} presentes en las cadenas de los grupos carboxilo, mismos que también se observan en la región de 1390 cm⁻¹ (-CH₂-)_{δas}.

El grupo isotiocianato presente en la molécula se puede distinguir en el número de onda 2088 cm⁻¹ ya que la literatura (Rojo, 2000) indica que este grupo cuando está unido a un anillo aromático (Ar-N=C=S)_{st,as} presenta una banda ancha de intensidad media aproximadamente en 2090 cm⁻¹.

Respecto a los grupos carboxilo (COO-H)_{st}, se observa su modo vibracional en la región entre 2500 y 3500 cm⁻¹ con bandas de intensidad variable. Para el enlace (C=O)_{st} las bandas

se muestran en la región entre 1700 y 1750 cm^{-1} con una intensidad alta como se observa en la figura.

8.5.2 Espectroscopia UV-Vis

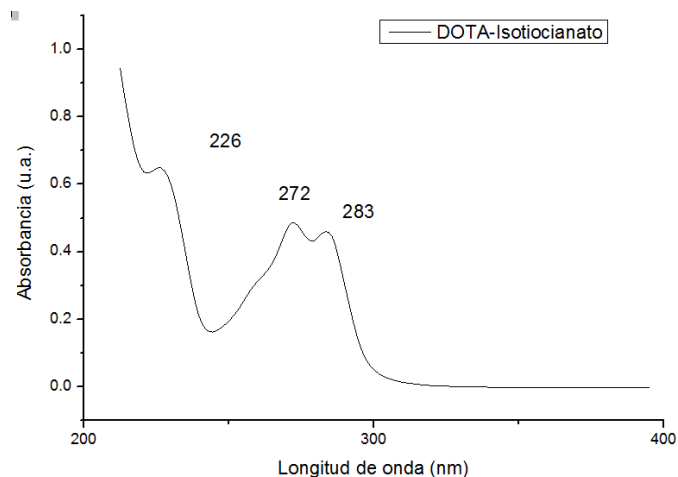


Figura 18 Espectro UV-Vis de DOTA-Isotiocianato

El espectro UV-Vis de la molécula de DOTA-Isotiocianato muestra una banda a los 226 nm que indica la presencia del grupo (-C=N-) el cual presenta una transición $n \rightarrow \sigma^*$ y presenta bandas cercanas a los 220 nm. Las bandas cercanas a los 270 nm se deben a la presencia del grupo benceno en la molécula.

8.6 Colesterol-DOTA

8.6.1 Mecanismo de reacción

Los isotiocianatos presentan una reactividad intermedia y forman enlaces tiourea con aminas primarias (Ramos et al., 2012). La figura 17 representa el mecanismo de la reacción de conjugación del complejo quelante DOTA-Isotiocianato y la molécula colesterol- NH_2 . La reacción se lleva a cabo con la protonación de la amina y el posterior ataque al carbono del grupo isotiocianato, lo que da lugar a la formación del enlace NH-C-NH y la posterior formación del enlace tiourea.

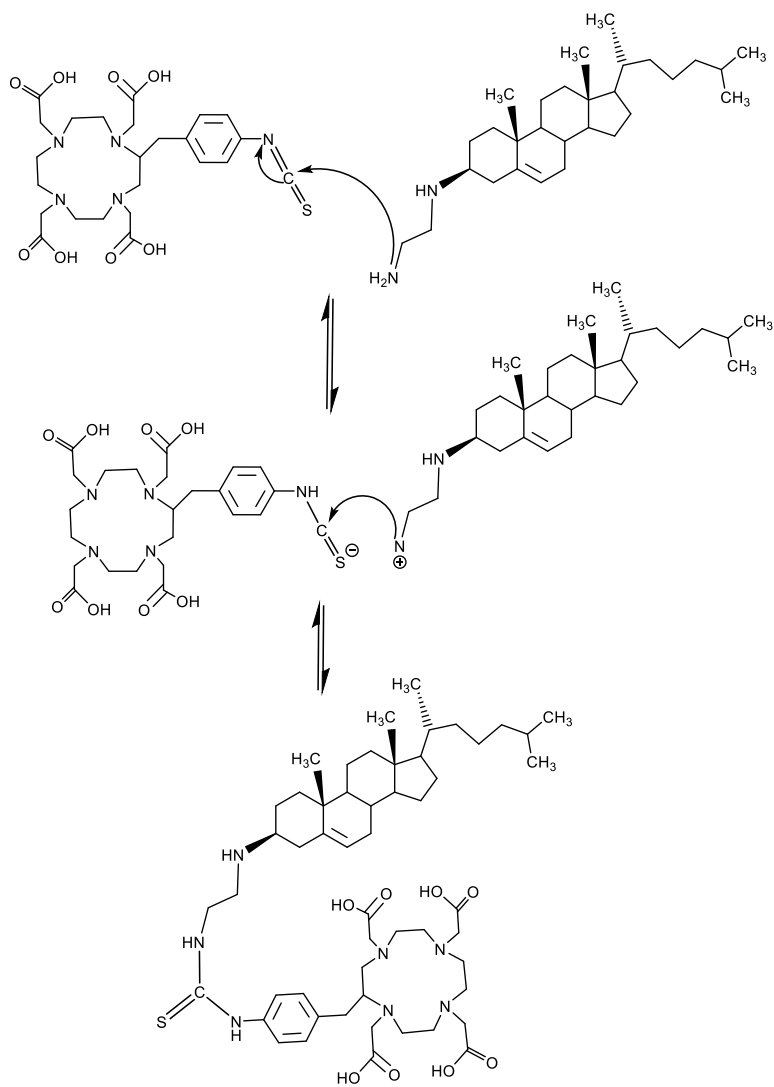


Figura 19. Mecanismo de la conjugación colesterol-DOTA.

8.6.2 Espectroscopia IR-FT

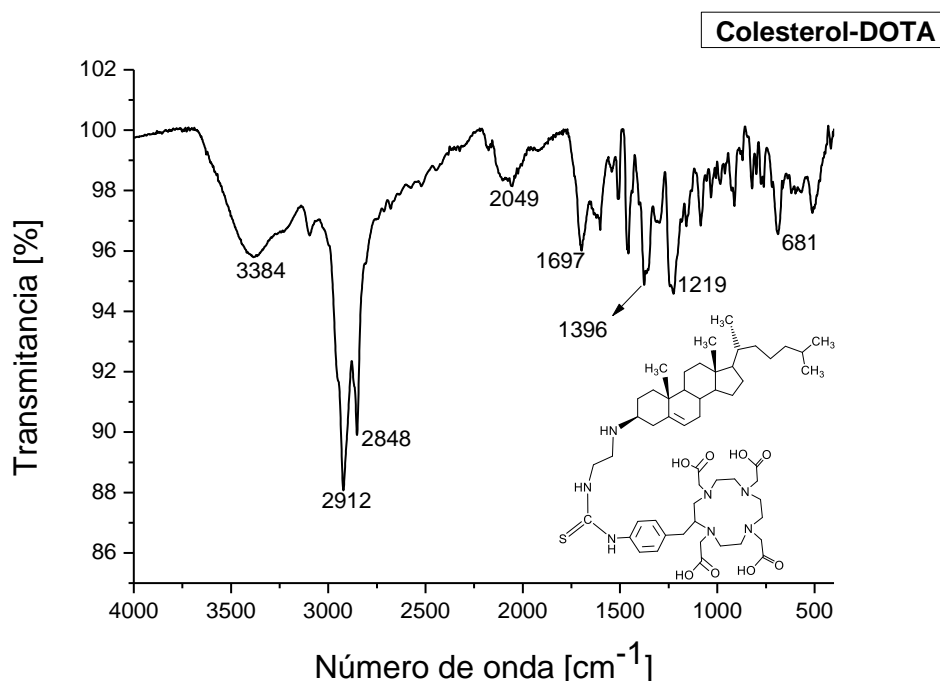


Figura 20. Espectro de IR de colesterol-DOTA.

La molécula colesterol-DOTA (figura 19) presenta las bandas características de los enlaces $(-\text{CH}_2-)_{\text{st}}$ de cicloalcanos y la cadena alifática lateral $-(\text{CH}_2)_3-$ presentes en la molécula de colesterol entre $2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$ y para los grupos carboxilo $(\text{COO}-\text{H})_{\text{st}}$, de la molécula DOTA los cuales se observan entre 2500 y 3500 cm^{-1} . También se observan las bandas para los enlaces $(-\text{CH}_3)_{\delta_{\text{sy}}}$ entre $1000\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ de los metilos provenientes del colesterol.

Se puede apreciar una banda ancha en $3400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ que caracteriza la presencia de una amina secundaria $(\text{NH})_{\text{st}}$ ya que la molécula cuenta con dos grupos de este tipo, este modo vibracional también es aplicable para los grupos carboxilo $(\text{COO}-\text{H})_{\text{st}}$ de la molécula.

La banda de intensidad media observable en 1219 cm^{-1} se puede atribuir a la presencia del enlace $(\text{C}=\text{S})_{\text{st}}$ que forma parte del grupo tiocarbonil que une ambas moléculas. Esta banda no se presenta en el espectro IR de la molécula de DOTA-isotiocianato, lo cual sugiere la correcta conjugación de ambas moléculas como se esperaba.

Además, la banda en 2049 cm^{-1} indica que el grupo aromático sigue presente en la molécula y que no sufrió la adición de algún grupo funcional.

8.7 rHDL cargadas con colesterol-DOTA

8.7.1 DLS

La dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés de "Dynamic light Scattering, es una técnica físico-química empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión (Cuadros-Moreno et al., 2014).

En la figura 21, se presentan las determinaciones de tamaño promedio de las partículas DOTA rHDL, sin realizar alguna modificación posterior al término de su reconstitución, el tamaño se grupa en un rango entre los 1000 y 6800 nanómetros, siendo en mayor volumen de un tamaño entre 2500 y 3500 nanómetros. Posteriormente se llevó a cabo un proceso de separación con un sistema ultrafiltración por centrifugación para un peso molecular de 10,000 MWL, los resultados se muestran en la figura 21, y como se puede observar el tamaño de las partículas disminuyó hasta un rango entre 50 y 600 nanómetros, después del proceso de separación; teniendo en mayor volumen tamaños alrededor de 100 nanómetros.

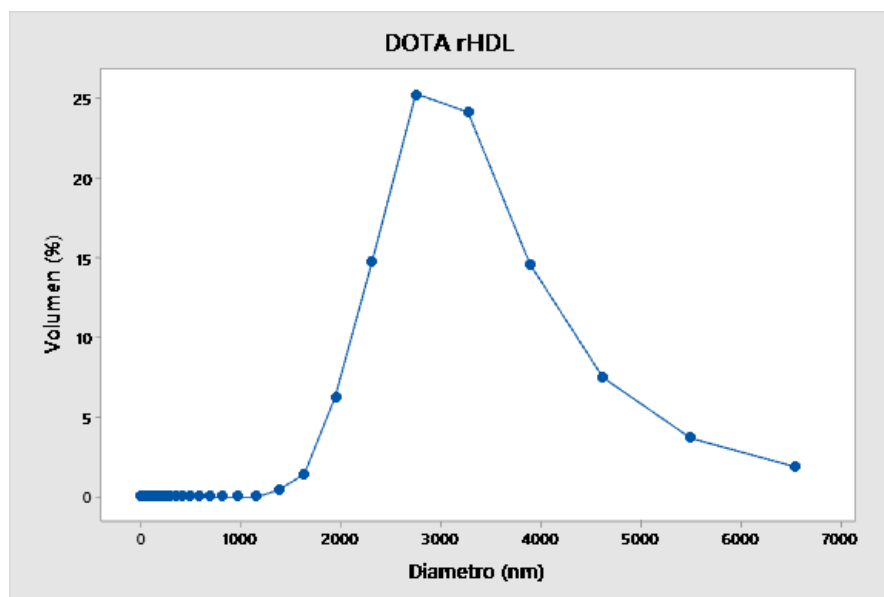


Figura 21. Distribución de tamaño de partículas DOTA rHDL.

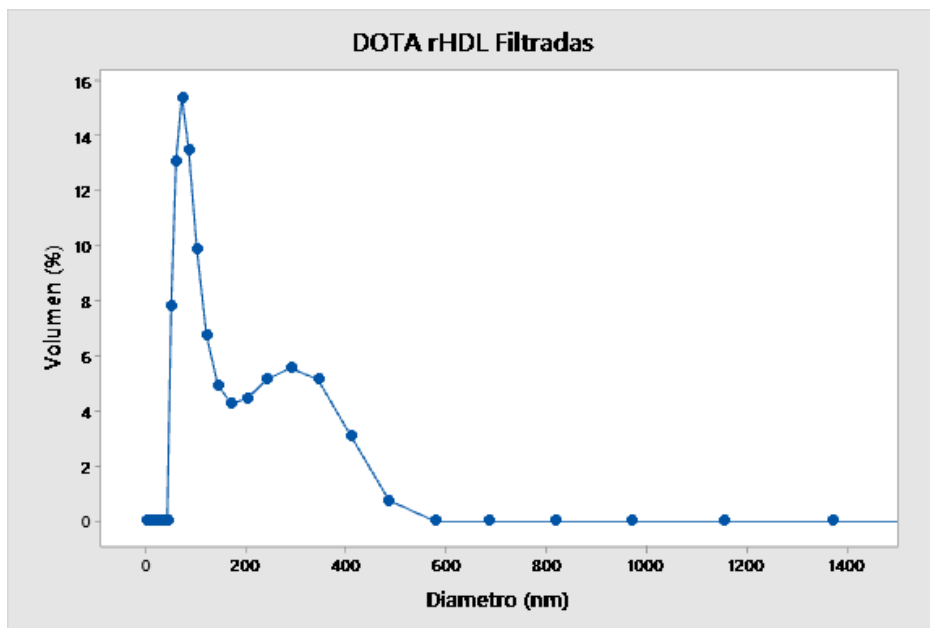


Figura 22. Distribución de tamaño de las partículas rHDL filtradas.

La caracterización de las rHDL y los subproductos obtenidos en el proceso se realizó mediante técnicas fisicoquímicas y analíticas, mostrando los resultados presentados anteriormente y con la evidencia para concluir que se obtuvieron partículas rHDL, las cuales contienen colesterol-Dota en su estructura, además de que están radiomarcadas con ^{177}Lu a partir de la determinación de la eficiencia de radiomarcado como se menciona en el apartado 7.2.

8.7.2 Caracterización biológica

8.7.2.1 Captación e internalización de rHDL

Para realizar comprobar la especificidad del sistema, se realizó un cultivo de celular T47D, las cuales han demostrado una expresión relativamente alta de receptores SR-B1, las células mostraron adecuada captación del sistema, reflejado en un incremento en la fluorescencia celular, indicativo de la captación de las Rhdl transportadas en el sistema lipídico. Esto demuestra que las rHDL, preparadas con la metodología descrita, puede ser empleado con un sistema de transporte y liberación de compuestos lipofílicos (figura 23 A)). Se demostró que el compuesto transportado se entrega en el citoplasma celular, no se observó liberación o incremento de la concentración de lutecio en los núcleos celulares. Adicionalmente se demostró una captación específica del sistema, ya que cuando los receptores celulares se bloquearon con un exceso de apoproteína A1, éstas impidieron la incorporación de la RB transportada (figura 23 B)).

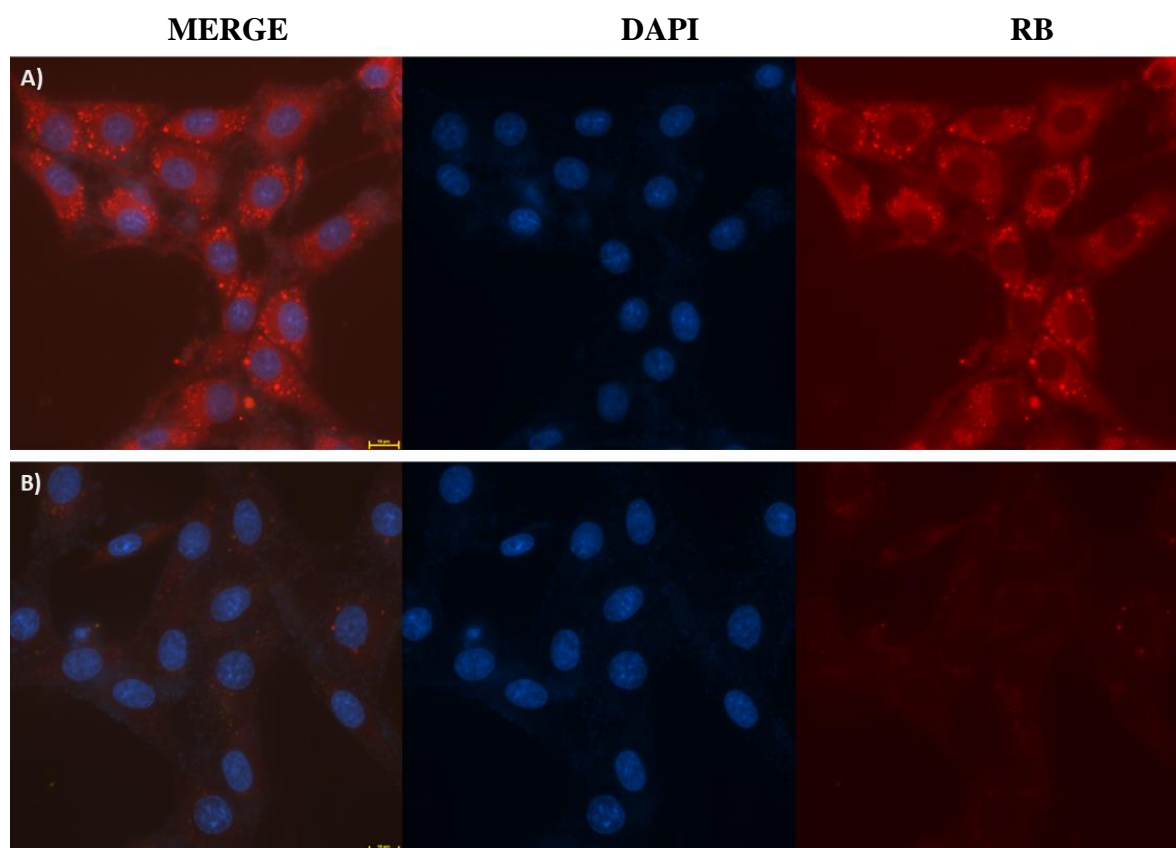


Figura 23. A) Captación y B) Especificidad del sistema DOTA-rHDL

8.7.3 Modelo biocinético

| Tabla 4. Porcentaje de actividad administrada por g tejido en los órganos disectados. | | | | | | | | |
|---|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|
| ¹⁷⁷ Lu-DOTA-HDL | | | | | | | | |
| | 2 h | | 24 h | | 48 h | | 120 h | |
| Órgano | \bar{X} | DE | \bar{X} | DE | \bar{X} | DE | \bar{X} | DE |
| Sangre | 4.61 | 1.49 | 0.54 | 0.06 | 0.45 | 0.14 | 0.08 | 0.01 |
| Corazón | 4.55 | 2.88 | 1.06 | 0.15 | 1.22 | 0.23 | 1.29 | 0.07 |
| Pulmones | 6.35 | 2.03 | 2.49 | 0.26 | 2.57 | 0.59 | 2.20 | 0.38 |
| Hígado | 20.02 | 7.49 | 7.38 | 1.27 | 7.10 | 1.92 | 5.38 | 0.94 |
| Páncreas | 9.48 | 7.40 | 1.40 | 1.04 | 1.66 | 0.73 | 0.79 | 0.27 |
| Bazo | 18.80 | 4.85 | 2.31 | 0.10 | 2.88 | 1.16 | 1.51 | 0.45 |
| Riñones | 91.78 | 7.31 | 47.85 | 2.59 | 35.54 | 5.92 | 16.94 | 1.02 |
| Intestino | 10.24 | 7.76 | 2.47 | 0.47 | 2.88 | 0.87 | 0.61 | 0.11 |
| Músculo | 3.07 | 0.76 | 0.71 | 0.14 | 1.75 | 1.68 | 0.45 | 0.09 |
| Hueso | 17.23 | 3.45 | 10.79 | 1.11 | 20.22 | 1.41 | 11.96 | 0.25 |

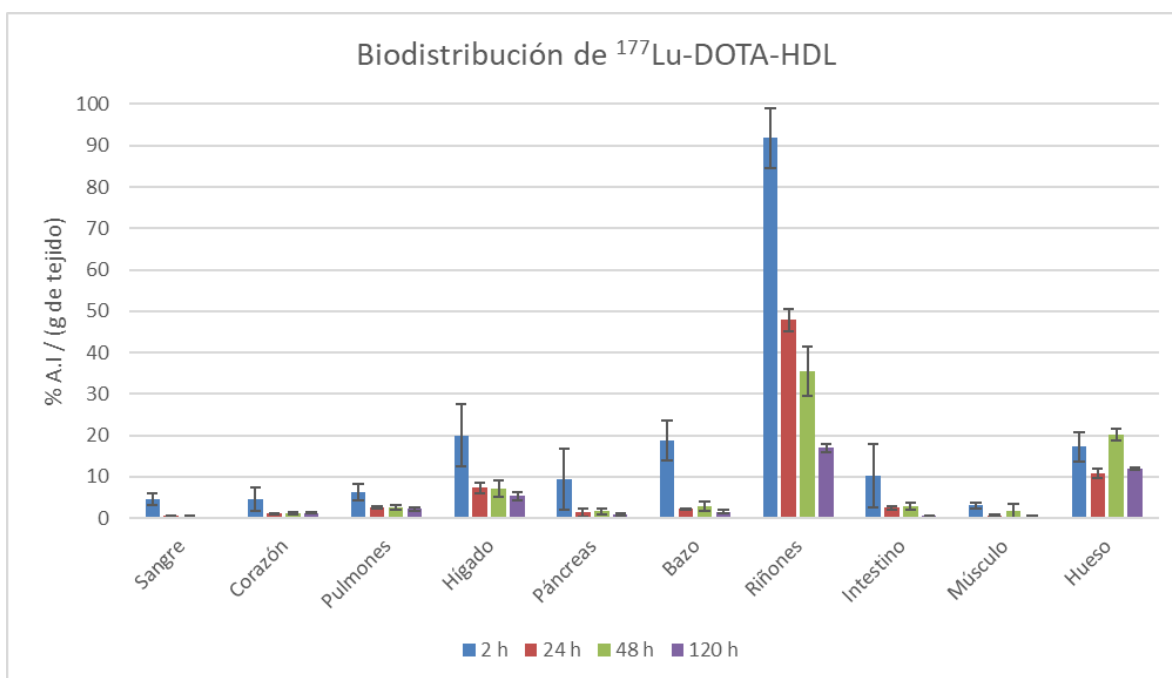


Figura 24 Biodistribución en tejidos y sangre de ¹⁷⁷Lu-DOTA-HDL

Cómo se observa en los resultados anteriores, la radioactividad procedente del ¹⁷⁷Lu-DOTA-HDL, se distribuye rápidamente y de forma heterogénea por los órganos y tejidos,

con excepción de los riñones en los cuales se observó una actividad mucho mayor, Con casi el 90% de la actividad administrada en comparación con los demás órganos evaluados.

La distribución inicial (2 horas post-administración) puede atribuirse a una rápida eliminación del complejo ya que se concentra mayormente en riñones e hígado. En general las concentraciones mayores se observan en hígado, riñones, bazo, intestino y hueso; las concentraciones más pequeñas se determinaron en corazón, musculo y pulmones.

La concentración de radioactividad en la mayor parte de los órganos y tejidos decrece a partir de las 2 horas hasta las 48 horas. Sólo en hígado y hueso se observa un incremento de la actividad posterior a las 48 horas respecto a la medición anterior (24 horas). A las 120 horas post-administración sólo se detecta radioactividad considerable en el riñón, hígado y hueso.

Como se observa en los datos de distribución obtenidos, la mayor radioactividad se alcanza en los órganos y tejidos asociados con la excreción y/o la biotransformación. Esto es importante dado que en un tratamiento terapéutico el complejo radiomarcado producirá bajas dosis de radiación a los tejidos sanos.

9 Conclusiones

Derivado del presente trabajo se concluye que el radiocomplejo Colesterol-DOTA se adhiere adecuadamente a la formulación y estructura de las lipoproteínas de alta densidad reconstituidas; el radioisótopo ^{177}Lu es incorporado adecuadamente a las rHDL preparadas, lo que brinda una molécula capaz de interactuar con tumores malignos y producir radioterapia.

Se logró establecer las condiciones adecuadas de síntesis para la preparación del complejo Colesterol-DOTA a partir de la molécula de colesterol en tres reacciones orgánicas.

Se demostró la obtención del sistema mediante la caracterización a través de espectroscopía infrarroja y espectroscopía de luz ultravioleta.

Se logró modificar la molécula de colesterol para conjugarla con el quelante DOTA-Isotiocianato.

Se reconstituyeron lipoproteínas de alta densidad que incluyeron en su estructura la molécula sintetizada Colesterol-DOTA, las cuales fueron radiomarcadas con ^{177}Lu .

Los estudios de biodistribución indican que el sistema se distribuye y elimina de manera eficiente, lo cual indica la viabilidad del tratamiento sin afectar tejidos sanos.

Referencias

- Aguilar-salinas, C., & Melgarejo-hernández, M. A. (2011). Análisis de la composición y de la función de las HDL. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, *19*(3), 113–122.
- Andreopoulos, D., & Kasi, L. P. (1997). 99mTc-labelled diphytanoylphosphatidylcholine liposomes: In vitro and in vivo studies. *Journal of Microencapsulation*, *14*(4), 427–436. <https://doi.org/10.3109/02652049709033827>
- Biologically-inspired, C., Bricarello, D. A., Smilowitz, J. T., Zivkovic, A. M., German, J. B., & Parikh, A. N. (n.d.). *Reconstituted Lipoprotein : A Versatile Nanostructures*. *5*(1).
- Boerman, O. C., Laverman, P., Oyen, W. J. G., Corstens, F. H. M., & Storm, G. (2000). Radiolabeled liposomes for scintigraphic imaging. *Progress in Lipid Research*, *39*(5), 461–475. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(00\)00013-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(00)00013-8)
- Chain, Y., & Illanes, L. (2015). *Radiofármacos en medicina nuclear Fundamentos y aplicación clínica Yamil Chain Luis Illanes Libros de Cátedra*. 189. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46740/Documento_completo.pdf?sequence=1
- Chakravarty, R., Goel, S., Dash, A., & Cai, W. (2017). Radiolabeled inorganic nanoparticles for positron emission tomography imaging of cancer: An overview. *Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, *61*(2), 181–204. <https://doi.org/10.23736/S1824-4785.17.02969-7>
- Cheng, J., & Deming, T. J. (2011). synthesis of polypeptides by ROP of NCAs. *Peptide-Based Materials*, *310*(October 2014), 1–26. <https://doi.org/10.1007/128>
- Contreras-Duarte, S., Varas, P., Awad, F., Busso, D., & Rigotti, A. (2014). Papel protector de las lipoproteínas de alta densidad en sepsis: aspectos básicos e implicancias clínicas. *Revista Chilena de Infectología*, *31*(1), 34–43. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000100005>
- Cuadros-Moreno, A., Casañas Pimentel, R., San Martín Martínez, E., & Yañes Fernandez,

- J. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Latin-American Journal of Physics Education*, 8(4), 14.
- del Pozo-Rodríguez, A., Solinís, M. Á., & Rodríguez-Gascón, A. (2016). Applications of lipid nanoparticles in gene therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 109, 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.10.016>
- Farzin, L., Sheibani, S., Moassesi, M. E., & Shamsipur, M. (2019). An overview of nanoscale radionuclides and radiolabeled nanomaterials commonly used for nuclear molecular imaging and therapeutic functions. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 107(1), 251–285. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36550>
- Garzón S., M. D. L., Hernández L., A., Vázquez, M. L., Villafuerte R., L., & García F., B. (2008). Preparación de nanopartículas sólidas lipídicas (SLN), y de acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC). *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 39(4), 50–66.
- Goins, B. A. (2008). Radiolabeled lipid nanoparticles for diagnostic imaging. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*, 2(7), 853–873. <https://doi.org/10.1517/17530059.2.7.853>
- GREGORIADIS, G., & BRENDA, R. E. (2003). Liposomes as Carriers of Enzymes or Drugs: a New Approach to the Treatment of Storage Diseases. *Biochemical Society*, 238(6173), 761–762. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)72269-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)72269-0)
- Guerrero Arellano, H., Caicedo Salazar, J., & Guerrero Zambrano, E. (2017). La Nanotecnología farmacéutica es una realidad. *Dominio de Las Ciencias*, 3(2), 526–538.
- Heath, J., Davis, M., & Hood, L. (2009). Nanomedicina contra el cáncer. *Investigación y Ciencia*, 391, 24–31.
- Herrera, J., Miranda, J., Portilla, A., & Benites, M. (n.d.). Obtención de Lutecio 177 mediante la irradiación de Lutecio enriquecido y Lutecio natural Resultados y Discusiones. 211–213.

- Isaac-Olivé, K., Ocampo-García, B. E., Aranda-Lara, L., Santos-Cuevas, C. L., Jiménez-Mancilla, N. P., Luna-Gutiérrez, M. A., Medina, L. A., Nagarajan, B., Sabnis, N., Raut, S., Prokai, L., & Lacko, A. G. (2019). [99 mTc-HYNIC-N-dodecylamide]: a new hydrophobic tracer for labelling reconstituted high-density lipoproteins (rHDL) for radioimaging. *Nanoscale*, 11(2), 541–551. <https://doi.org/10.1039/c8nr07484d>
- Jaramillo, N. I. (2013). *Encapsulación De Un Fármaco En Nanopartículas De Sílice Sintetizadas Vía Sol – Gel Asistido Por Microemulsión De Micelas Inversas*. 108. <http://www.bdigital.unal.edu.co/40923/1/43987191.2014.pdf>
- Medrano, C. L., & Del Castillo, T. (2012). *Obtención de películas delgadas de polianilina con aplicación potencial en la detección de colesterol*.
- Mirón, C. E. (n.d.). *Química farmacéutica i*.
- Morales, C. (2017). Nanotecnología en Medicina. In *UBO Healt Journal* (Vol. 4). <https://doi.org/10.23854/07198698.20174morales44>
- Murphy, A. J., Chin-Dusting, J., & Sviridov, D. (2009). Reconstituted HDL: A therapy for atherosclerosis and beyond. *Clinical Lipidology*, 4(6), 731–739. <https://doi.org/10.2217/clp.09.68>
- Nano, M. Y., & De, P. (n.d.). *Desarrollo de sistemas nanoparticulares de liberación sostenida para la administración parenteral*.
- Pájaro Castro, N., Olivero Verbel, J., & Redondo Padilla, J. (2013). Nanotecnología aplicada a la medicina. *Revista Guillermo de Ockham*, 11(1), 125. <https://doi.org/10.21500/22563202.606>
- Perales, J. L. G. (2016). *Radiofarmacia en pdf* (Issue March).
- Pérez-Martínez, P., Bellido, C., Moreno, J. ., Gómez, P., Moreno, R., Marín, C., López-Miranda, J., Pérez-Jiménez, F., & Ordovás, J. M. (2003). El metabolismo posprandial de los triglicéridos se modifica por el polimorfismo presente en el exón 1 del gen del receptor scavenger clase B tipo I. *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis*, 15(4), 147–152. [https://doi.org/10.1016/s0214-9168\(03\)78922-0](https://doi.org/10.1016/s0214-9168(03)78922-0)

- Pérez-Medina, C., Binderup, T., Lobatto, M. E., Tang, J., Calcagno, C., Giesen, L., Wessel, C. H., Witjes, J., Ishino, S., Baxter, S., Zhao, Y., Ramachandran, S., Eldib, M., Sánchez-Gaytán, B. L., Robson, P. M., Bini, J., Granada, J. F., Fish, K. M., Stroes, E. S. G., ... Mulder, W. J. M. (2016). In Vivo PET Imaging of HDL in Multiple Atherosclerosis Models. *JACC: Cardiovascular Imaging*, 9(8), 950–961. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2016.01.020>
- Phillips, W. T., Goins, B. A., & Bao, A. (2009). Radioactive liposomes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1(1), 69–83. <https://doi.org/10.1002/wnan.3>
- Ramos, E. L., Ramos, S. L., Jesús, C., & García, C. (2012). *síntesis de radiofármacos Bifunctional chelating agents used in the synthesis of radiopharmaceuticals*. 7–23.
- Raut, S., Mooberry, L., Sabnis, N., Garud, A., Dossou, A. S., & Lacko, A. (2018). *Reconstituted HDL : Drug Delivery Platform for Overcoming Biological Barriers to Cancer Therapy*. 9(October), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01154>
- Richardson, V. J., Jeyasingh, K., & Jewkes, R. F. (1977). Properties of [99 mTc] technetium labelled liposomes in normal and tumour bearing rats. *Biochemical Society Transactions*, 5(1), 290–291. <https://doi.org/10.1042/bst0050290>
- Ríos, Y. (2011). Espectroscopia UV-Visible. *Compuestos Orgánicos Por Espectroscopia UV-VIS*, 31–65. <http://www.yolanda-rios.net/materiales/UVTeoria.pdf>
- Roco, M. C. (2003). Nanotechnology: Convergence with modern biology and medicine. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 337–346. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00068-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00068-5)
- Rodríguez Esparragón, F., Hernández Trujillo, Y., Macías Reyes, A., Hernández Ortega, E., Medina, A., & Rodríguez Pérez, J. C. (2006). Sobre los genes paraoxonasa-1 y SR-B1, y su importancia en la aterosclerosis. *Revista Espanola de Cardiologia*, 59(2), 154–164. <https://doi.org/10.1157/13084643>
- Rojo, F. (2000). Tablas de Espectroscopía Infrarroja. *Facultad de Química - Departamento de Programas Audiovisuales*, 11.

http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TablasIR_15437.pdf
http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/IRTablas_33080.pdf

- Shaish, A., Keren, G., Chouraqui, P., Levkovitz, H., & Harats, D. (2001). Imaging of Aortic Atherosclerotic Lesions by 125 I-LDL , 125 I-Oxidized-LDL ., *Pathobiology*, 69, 225–229.
- Siebenmann, G. (2014). *Espagnol*. 74, 60. <https://doi.org/10.1075/chlel.iv.09sie>
- Terap, I. D. E. P., Gep, T.-, & Tambi, V. (2019). *Informe de Posicionamiento Terapéutico de lutecio (177 Lu) oxodotreotida (Lutathera ®) en el tratamiento de tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos bien diferenciados*. 1–7.
- Thaxton, C. S., Rink, J. S., Naha, P. C., & Cormode, D. P. (2016). Lipoproteins and lipoprotein mimetics for imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 106, 116–131. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.020>
- Torres, D., & Seijo, B. (2009). Nanosistemas Lipídicos. *Nanotecnología Farmacéutica, Realidades y Posibilidades Farmacoterapéuticas*, 133–167.
- Yepes, P. N. (2015). *Avances En La Dosimetría Interna De Nuevos Radiofármacos Marcados Con Lu De Producción Local Para La Protección Radiológica De Los Pacientes En Medicina Nuclear*.
- Zheng, G., Chen, J., Li, H., & Glickson, J. D. (2005). Rerouting lipoprotein nanoparticles to selected alternate receptors for the targeted delivery of cancer diagnostic and therapeutic agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(49), 17757–17762. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508677102>