

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica I



TESIS DOCTORAL

**Nano-radiotrazadores y nanopartículas
superparamagnéticas: síntesis, propiedades y aplicaciones en
imagen molecular**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Juan Pellico Sáez

Directores

Jesús María Ruiz-Cabello Osuna

Fernando Herranz Rabanal

Madrid, 2017

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Orgánica I



Nano-radiotrazadores y Nanopartículas superparamagnéticas: Síntesis, propiedades y aplicaciones en imagen molecular

Memoria para optar al grado de Doctor realizada por:

D. Juan Pellico Sáez

Directores:

Dr. Jesús M^a Ruiz-Cabello Osuna

Dr. Fernando Herranz Rabanal

Madrid, Febrero de 2016.

cnic

ciberes

Agradecimientos

Tanto a nivel profesional como personal, la realización de este trabajo de tesis ha sido posible gracias a la ayuda y apoyo de muchas personas.

A nivel profesional quiero dar mi más sincero agradecimiento a:

El Dr. Jesús Ruiz-Cabello Osuna por darme la posibilidad de trabajar en su equipo de investigación, por sus consejos, atención y especialmente por confiar en mí.

El Dr. Fernando Herranz Rabanal por ayudarme y guiarme durante el desarrollo de este trabajo. Por enseñarme con infinita paciencia todos los entresijos de la nanotecnología y la radioquímica.

Los investigadores del Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid, especialmente a los doctores M^a del Puerto Morales, Sabino Veintemillas-Verdaguer y Lucía Gutiérrez por toda la ayuda prestada de forma incondicional y desinteresada.

Al personal del Centro Nacional de Microscopía Electrónica (CNME) por su ayuda en la obtención de las imágenes de TEM.

A la Unidad de Celómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) por la ayuda recibida en los estudios de citotoxicidad.

A los doctores José Antonio Enriquez y Sergio Caja por proporcionarme los modelos animales de tumor.

Al personal técnico de la Unidad de Imagen Avanzada del CNIC por su ayuda en la adquisición de las imágenes de PET y MRI.

A nivel personal les estaré eternamente agradecido a muchas personas, entre ellas:

Me gustaría agradecerle a Fer su paciencia, su compañerismo y su amistad. Con personas así es muy fácil trabajar.

A toda la gente con la que tuve la suerte de trabajar en el laboratorio de Química Orgánica de la Universidad de Salamanca. Con ellos, Aitor, Isa, Cheli, Carlos, Mateo, Javi, Magda, Ana B, pasé grandes momentos. Quiero agradecer especialmente a Ana Gil todo el esfuerzo que puso para enseñarme a trabajar dentro de un laboratorio, por hacerlo de una forma tan divertida y por ser una persona extraordinaria.

A todos mis compañeros de la Unidad de Imagen Avanzada del CNIC, especialmente a Ana V, Marina, Carlos e Irene por los grandes ratos que hemos pasado, por los cafés entre risas y por aguantar mis chiste malos...

A la gran Bea chinchilla por tus sabios consejos, hacer del trabajo algo muy divertido y ser tan buena amiga.

A Carlos Pérez, "The Teacher", por los grandes momentos que pasamos poniendo reacciones, escuchando una y otra vez las mismas canciones y disfrutando tanto de este mundillo.

A los Pililos, Javi, Pedro, Miguel y Frej por ser la banda sonora de esta tesis. A todos los vecinos de Valdesangil por haber sido los Pililos más incondicionales, abrir sus puertas y ofrecerme su amistad.

A mis compañeros y amigos de A20, Andresillo, Garrote, Raulje, Japo, Fanego, Agus, Ainhoa, César, Raquel y Ture porque siempre habéis estado conmigo aunque no os haya podido dedicar todo el tiempo que merecéis.

A mis hermanos Gallego y Jesús por saber escucharme y aguantarme. Por todos los grandes ratos de risas, por creer siempre en mí y por haberme hecho pasar unos de los mejores años de mi vida.

A toda la reciente familia andaluza que he adquirido. A Jose, Ana y Virginia por abrirme las puertas de su casa con tanto cariño. A los Viecos nerviosos y a los Lechuga por hacerme sentir uno más desde el primer momento.

A mi gran compañera de viaje, Ana Victoria, por todo lo que me has enseñado tanto a nivel profesional como a nivel personal. Por ayudarme y animarme en los peores momentos y por hacer mucho más felices los buenos. Sin duda el mejor resultado que he obtenido nunca es compartir mi vida contigo (y con Pipo).

Y por supuesto a mi familia:

A mis hermanos, María, Paloma, Belén y Carlos. No hay nada mejor que un hermano, tengo la gran suerte de tener cuatro y tener los mejores. No hay palabras que puedan agradeceros todo lo que hacéis por mí día a día. A mis cuñados, Nacho, Chus y Alex, aunque os bebáis mi gin tonic también os quiero. A mi hermano adicional Jaime y cuñada Laura por todo el cariño que me dáis. Y a los peques de la familia, Javier, Paloma, Marcos, Elena, Cristina, Daniel, Carlos y Lucía por todo lo que me hacéis reír.

A Nano, por ser un compañero inseparable, por todos los buenos consejos y los grandes momentos que me has hecho pasar junto a ti. Gran parte de lo que soy te lo debo a ti. A mí gran madrina, Paloma, por tratarme como a un hijo más, por todo lo haces por mí y por supuesto por alimentarme de forma extraordinaria jueves tras jueves.

A mi madre, la gran Chelo, por ser, junto con mi padre, lo más importante de mi vida. Siempre has sido mi modelo a seguir. La bondad, el trabajo duro, la constancia, el amor a la familia y una inquebrantable fuerza de voluntad te caracterizan. Todo el mundo cree que su madre es la mejor, sin duda, no te conocen.

Este trabajo de tesis está especialmente dedicado a la memoria de mi Padre, José Javier Pellico. Gracias a ti hoy puedo ser quien quiero ser.

Te echamos mucho de menos.

Resumen

Summary

Lista de abreviaturas

	Página
Capítulo 1.- Introducción	1
1.- Nanotecnología y Nanomedicina	3
1.1.- Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro	5
1.1.2. Nanopartículas de óxido de hierro como agentes de contraste en MRI	10
1.1.3. Métodos de síntesis de nanopartículas de óxido de hierro	14
i) Descomposición Térmica	14
ii) Coprecipitación	15
iii) Síntesis Hidrotermal	17
iv) Pirolisis láser	17
v) Síntesis de nanopartículas a través de microondas	17
1.2.- Radioquímica	22
1.2.1. Tomografía por Emisión de Positrones (PET)	22
1.2.2. Síntesis de radio-trazadores para PET	23
1.3.- Nano-radioquímica	34
1.3.1. Síntesis de Nano-radiotrazadores	39
i) Formación de complejos entre el nanomaterial y el radioisótopo	40
ii) Bombardeo de hadrones en la nanopartícula	40
iii) Síntesis del nano-radiotrazador a través de una mezcla de precursores radiactivos y no radiactivos	41

	Página
iv) Síntesis del nanomaterial con incorporación posterior del radioisótopo	41
1.3.2. Síntesis de nano-radiotrazadores PET/MRI	42
1.3.3. Nanopartículas duales de óxido de hierro y ⁶⁸ Ga	43
1.4.- Bibliografía	45
Capítulo 2.- Objetivos	57
<u>Sección 1: Síntesis de Nanosistemas</u>	61
Capítulo 3.- Síntesis de nanopartículas MW-IONP-OA & IONP-OA	63
3.1.- Introducción	65
3.2.- Resultados y discusión	67
3.3.- Conclusiones	74
3.4.- Bibliografía	75
Capítulo 4.- Síntesis de nanopartículas MW-IONP-AA & IONP-AA	79
4.1.- Introducción	81
4.2.- Resultados y discusión	86
4.3.- Conclusiones	92
4.4.- Bibliografía	93
Capítulo 5.- Síntesis de nanopartículas PET/MRI recubiertas de dextrano	97
5.1.- Introducción	99
5.2.- Resultados y discusión	102
5.2.1.- Síntesis de nanopartículas IONP-DEXT	102
5.2.2.- Síntesis de nanopartículas ⁶⁸ Ga-IONP-DEXT	109

	Página
5.3.- Aspectos clave	125
5.4.- Conclusiones	126
5.5.- Bibliografía	128
Capítulo 6.- Síntesis de nanopartículas PET/MRI recubiertas de ácido cítrico	131
6.1.- Introducción	133
6.2.- Resultados y discusión	135
6.2.1.- Síntesis de nanopartículas ⁶⁸ Ga-IONP-CIT	135
6.2.2.- Síntesis de nanopartículas IONP-CIT100, 150, 165 y 180.	144
6.3.- Conclusiones	160
6.4.- Bibliografía	162
<u>Sección 2: Aplicaciones</u>	165
Capítulo 7.- Caracterización <i>in vivo</i> de placa de aterosclerosis	167
7.1.- Introducción	169
7.2.- Resultados y discusión	174
7.3.- Conclusiones	190
7.4.- Bibliografía	192
Capítulo 8.- Detección de fenómenos de angiogénesis	197
8.1.- Introducción	199
8.2.- Resultados y discusión	207
8.2.1.- Síntesis de nanopartículas ⁶⁸ Ga-IONP-EPOX	208
8.2.2.- Síntesis de nanopartículas ⁶⁸ Ga-IONP-RGD	211

	Página
8.3.- Aspectos clave	221
8.4.- Conclusiones	222
8.5.- Bibliografía	224
Capítulo 9.- Imagen selectiva de neutrófilos en modelos inflamatorios	229
9.1.- Introducción	231
9.2.- Resultados y discusión	234
9.3.- Conclusiones	245
9.4.- Bibliografía	247
Capítulo 10.- Conclusiones	251
Anexos	257
Anexo I.- Técnicas instrumentales	259
Anexo II.- Procedimientos experimentales	277

Resumen

Las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro son unos de los materiales más utilizados actualmente en biomedicina. Debido a su extendido uso, la búsqueda de nuevos procedimientos de síntesis que sean rápidos y reproducibles es un campo de investigación todavía en crecimiento. En este trabajo de investigación se han desarrollado nuevos métodos de síntesis dirigidas por microondas para obtener este tipo de nanomateriales de forma rápida y reproducible produciendo nanopartículas con una alta estabilidad coloidal y excelentes características fisicoquímicas.

Además, se ha utilizado esta aproximación para generar una nueva familia de nanopartículas con un radioisótopo incorporado en el núcleo, formando sondas para imagen bimodal PET/MRI. Este tipo de compuestos, conocidos como nano-radiotrazadores, combinan las mejores cualidades de la nanotecnología con lo mejor de la radioquímica lo que ha llevado, a lo largo de este trabajo, a la obtención de imágenes de alta calidad tanto por PET como por MRI.

Por último, la elevada superficie específica de todos los nanosistemas obtenidos junto con las herramientas apropiadas que aporta la química orgánica, ha permitido su funcionalización con diferentes biomoléculas produciendo una amplia variedad de nuevas sondas para su aplicación en imagen molecular. Estas nuevas sondas han posibilitado la detección de factores de riesgo asociados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como son la formación de placa de aterosclerosis vulnerable, la producción de fenómenos de angiogénesis y la sobreexpresión de neutrófilos en inflamación.

Summary

Nowadays superparamagnetic iron oxide nanoparticles are one of the most important nanomaterial in biomedicine. The search of fast and reproducible methods is a growing research field due to the extended use of iron oxide nanoparticles. In the present work, a new method, based on microwave-driven synthesis, has been developed obtaining iron oxide nanoparticles in a fast and reproducible method. Samples showed high colloidal stability and excellent physicochemical properties.

In addition, this approach has been used to generate a new family of nanoparticles with a radioisotope incorporated in the core, producing bimodal PET/MRI probes. These kinds of compounds, known as nano-radiotracers, combine the best of nanotechnology with the best of radiochemistry. This fact has allowed, throughout this work, to obtain high quality images in both PET and MRI.

Finally, organic chemistry protocols were used to functionalize the surface of the nanoparticles with different biomolecules producing a wide variety of new probes for its use in molecular imaging. These new probes have enabled the detection of risk factors associated with the development of cardiovascular diseases such as vulnerable plaque in atherosclerosis, integrin overexpression in angiogenesis phenomena and overexpression of neutrophils in inflammation.

Lista de abreviaturas

AC: Corriente alterna

ALARA: Tan bajo como sea razonablemente posible (As Low As Reasonably Achievable)

C: Constante de Curie

CIT: Citrato

CT: Tomografía computerizada (Computed Tomography)

DEXT: Dextrano

DLS: Dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering)

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

Dp: Profundidad de penetración

DRX: Difracción de rayos X

Ea: Energía de activación

EC: Captura electrónica (Electronic Capture)

ECM: Matriz extracelular (ExtraCellular Matrix)

ECV: Enfermedades cardiovasculares

EDC: Hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

EDS: Energía dispersiva de rayos X (Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy)

EPOX: diglicidil éter del 1,4-Butanodiol

FCC: Estructura cúbica centrada en las caras

FDA: Agencia de administración de alimentos y medicamentos (Food and Drug Administration)

FDG: Fluorodesoxiglucosa

FTIR: Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier

HCS: Análisis celular multiparamétrico de alto barrido

HDL: Lipoproteína de alta densidad (High Density Lipoprotein)

HEPES: Ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperacini]-etanosulfónico

ID/ g: Dosis inyectada por gramo (Injected Dose per gram)

IONP: nanopartículas de óxido de hierro (Iron Oxide NanoParticles)

i.v.: Intravenoso

K_B : Constante de Boltzmann

LDL: Lipoproteína de baja densidad (Low Density Lipoprotein)

MAFs: Fibroblastos de ratón adulto (Mouse Adult Fibroblast)

m_{eff} : Momento magnético efectivo

MMPs: Metaloproteasas de Matriz

MRA: Angiografía por Resonancia Magnética (Magnetic Resonance Angiography)

MRI: Resonancia Magnética de imagen (Magnetic Resonance Imaging)

M_s : Saturación de magnetización

N : Número de núcleos radiactivos a tiempo t

N_0 : Número inicial de núcleos radiactivos

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

NP: Nanopartícula

Oe: Oersted

OMS: Organización mundial de la salud

PET: Tomografía por emisión de positrones (Positron Emission Tomography)

SPECT: Tomografía computerizada por emisión de un solo fotón (Single Photon Emission Computed Tomography)

SQUID: Dispositivo superconductor de interferencia cuántica (Superconducting Quantum Interference Device)

Sulfo-NHS: sal sódica de N-Hidroxisulfosuccinimida

SUV: Valor de captación estandarizado (Standardized Uptake Value)

T: Tesla

$t_{1/2}$: Tiempo de vida media

T_1 : Tiempo de relajación longitudinal

T_2 : Tiempo de relajación transversal

TE: Tiempo de eco

TEM: Microscopía de transmisión electrónica (Transmission Electron Microscopy)

TGA: Análisis termogravimétrico (ThermoGravimetric Analysis)

TMBACl: Cloruro de trimetilbencilamonio

TR: Tiempo de repetición

VSM: Espectrómetro de muestra vibrante (Vibrating Sample Magnetometer)

XRF: Fluorescencia de rayos X (X-Ray Fluorescence)

β^+ : Positrón

χ : Susceptibilidad magnética

ϵ : Permitividad

ϵ' : Constante dieléctrica

ϵ_0 : Permitividad en el vacío

ϵ'' : Factor de pérdida dieléctrica

λ : Constante de desintegración

CAPÍTULO

1

Introducción

Año 1959, el Dr. Richard Feynman se presenta ante los asistentes del congreso anual de la sociedad americana de física con su exposición titulada “There’s plenty of room at the bottom”. Los asistentes incrédulos ante la disertación del Dr. Feynman, que está desarrollando la visión sobre qué pasaría si se pudiera manipular y controlar las cosas a pequeña escala (escala atómica), no saben que están asistiendo al principio de lo que hoy conocemos como nanotecnología.¹

1.- Nanotecnología y Nanomedicina

La nanotecnología ha sido definida de múltiples formas. Atendiendo al prefijo “nano”, se concreta al estudio de materiales cuyo tamaño se encuentra entre 0.1 y 100 nanómetros ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). Sin embargo, esta definición es poco específica, debido a ello la US National Nanotechnology Initiative, en el año 2000, concretó la nanotecnología como “el estudio de materiales y sistemas cuyas estructuras y componentes exhiben de forma significativa nuevas y mejoradas propiedades físicas, químicas y biológicas debido a su tamaño nanométrico”.²

La nanomedicina sería por tanto la aplicación de dicha nanotecnología para la mejora de tratamientos médicos y pruebas diagnósticas. Por ejemplo, mientras procedimientos convencionales como la cirugía, la radiación o la quimioterapia tratan de eliminar las células dañadas más rápido que las sanas, la nanomedicina trata de eliminar sólo las células dañadas o repararlas de forma específica utilizando biosensores que reconozcan únicamente estas células dañadas, liberando fármacos específicamente en estas y preservando las células sanas intactas.³⁻⁵ Por tanto, la nanomedicina y la nanotecnología van de la mano. La nanomedicina necesita la nanotecnología para poder avanzar y a su vez le exige nueva

herramientas continuamente, lo que hace que la nanotecnología avance. Esta retroalimentación hace que el número de trabajos publicados bajo estos dos términos haya ido en aumento desde el año 2000 hasta consolidarse como campos de investigación de gran relevancia (figura 1.1).⁶

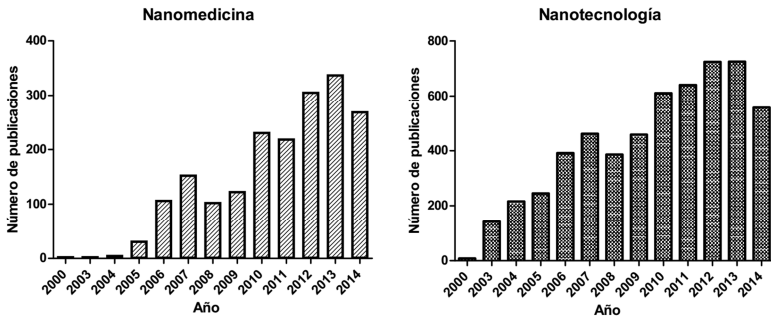


Figura 1.1. Trabajos publicados con los términos nanomedicina y nanotecnología desde el año 2000 (fuente PubMed).

Dentro de la nanotecnología los esfuerzos se centran en el diseño, síntesis y desarrollo de diferentes materiales como nanopartículas, nanotubos, nanovarillas, clusters, nanocables, películas delgadas y nanochips.⁷ Todos ellos se han desarrollado para su uso dentro de algún campo de la nanomedicina. Entre todas estas categorías, la que mayores aplicaciones ha desarrollado para su uso en la clínica ha sido el campo de las nanopartículas. Dentro de este, nos encontramos con diferentes sistemas como liposomas, partículas magnéticas, partículas poliméricas, *up-converting nanophosphors*, partículas de oro y quantum dots principalmente. Cada sistema nanoparticulado se puede utilizar con diferentes fines. Sin embargo, todos comparten una finalidad común, su uso como sondas para diferentes técnicas de imagen.⁸⁻¹³

El uso de nanopartículas en nanomedicina es un campo muy variado donde se pueden elegir diferentes tipos de nanopartículas para tratar de resolver un mismo problema. Dentro de las diferentes posibilidades, las nanopartículas magnéticas, en concreto nanopartículas de óxido de hierro, son las más estudiadas de los últimos años. Este tipo de nanopartículas presentan unas propiedades fisicoquímicas especiales que hacen que sean un sistema muy atractivo para su estudio y que han hecho que las nanopartículas de óxido de hierro sean uno de los focos de atención dentro del desarrollo de esta Tesis.

Por tanto, a continuación se revisa en más profundidad las nanopartículas de óxido de hierro.

1.1.- Nanopartículas superparamagnéticas de Óxido de hierro

Las partículas magnéticas han sido utilizadas para diversas aplicaciones desde principios del siglo XX. Así pues, su uso comenzó como material para grabaciones magnéticas y altavoces.¹⁴ En la década de los 90 su uso se popularizó dentro de la nanotecnología debido a sus propiedades superparamagnéticas.

Las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (IONP) son óxidos mixtos no estequiométricos que presentan estructuras cristalinas de magnetita ($(\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}_2^{\text{III}})\text{O}_4$) y/o maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Estas estructuras cristalinas son del tipo espinela inversa, en la cual los oxígenos forman una estructura cúbica centrada en las caras (FCC) en la que se encuentran cationes Fe^{2+} en huecos octaédricos y cationes Fe^{3+} en huecos octaédricos y tetraédricos (figura 1.2).¹⁵⁻¹⁷

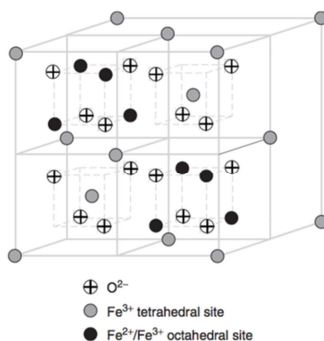


Figura 1.2. Estructura nanopartícula de óxido de hierro tipo espinela inversa.

Al tratarse de nanopartículas su comportamiento viene definido por la presencia de propiedades dependientes del tamaño; la elevada relación superficie-volumen y su carácter superparamagnético. En el caso de la superficie, imaginemos que tenemos un cubo de 1 cm de lado, como este tiene 6 caras, la superficie del cubo es de 6 cm^2 . Si ahora se divide este cubo hasta obtener cubos de 1 nm de lado, se obtienen 10^{21} cubos, cada uno con una superficie de 6 nm^2 sumando entre todos una superficie total de 6000 m^2 .¹⁸ Es fácil entender esta propiedad que hace de las nanopartículas un sistema excelente para procesos de catálisis o consigue que, gracias a su alta reactividad, las nanopartículas sean una plataforma perfecta para crear sistemas multifuncionales.^{19,20} Sin embargo, esta elevada relación superficie-volumen también hace que las nanopartículas presenten una gran energía superficial y como consecuencia tiendan a agregarse para disminuirla. Para evitar que estos procesos de agregación ocurran, se recubren las nanopartículas de óxido de hierro con un determinado surfactante que hace que la energía superficial disminuya estabilizando así las nanopartículas. Por tanto, se puede decir que una nanopartícula de óxido de hierro presenta dos partes diferentes. La primera, un núcleo formado por un óxido mixto no

estequiométrico. La segunda, un recubrimiento o surfactante que proporciona estabilidad coloidal (figura 1.3).

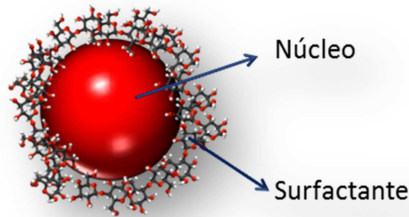


Figura 1.3. Representación de una nanopartícula de óxido de hierro.

Aparte de proporcionar estabilidad coloidal, el surfactante juega un papel importante en las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, determinando factores tan importantes como el tamaño hidrodinámico y el tiempo de vida en sangre de las nanopartículas. En este último caso la elección del surfactante es clave. Al entrar las nanopartículas en el torrente sanguíneo, el cuerpo las reconoce como si fueran un patógeno, formándose una corona de proteínas alrededor de estas en un proceso conocido como opsonización. Dependiendo del surfactante el tipo de proteínas que se unen es diferente, produciendo que las nanopartículas sean fagocitadas de forma más o menos rápida por los macrófagos del hígado (células Kupffer) y del bazo y por tanto, aumentando o disminuyendo su tiempo de vida en sangre.²¹⁻²³

En consecuencia la elección del surfactante es un punto fundamental a la hora de sintetizar nanopartículas de óxido de hierro. Se deben elegir moléculas que presenten gran afinidad hacia la superficie del núcleo de las nanopartículas de forma que se forme un enlace fuerte que proporcione

estabilidad. Además, el surfactante sirve de plataforma para posteriores funcionalizaciones ya sea con péptidos, anticuerpos o trazadores para diferentes técnicas de imagen.

Respecto al núcleo, el hecho de obtener partículas de tamaño nanométrico puede implicar un cambio en alguna de sus propiedades. En el caso de las partículas de óxido de hierro, las propiedades magnéticas se ven alteradas de forma que a escala nanométrica, estas partículas presentan el fenómeno de superparamagnetismo.

Un material ferromagnético presenta múltiples dominios magnéticos que pueden ser alineados en presencia de un campo externo dando grandes valores de magnetización. Sin embargo, cuando se retira el campo magnético externo, el material sigue presentando magnetización mostrando un ciclo de histéresis magnética (figura 1.4).²⁴

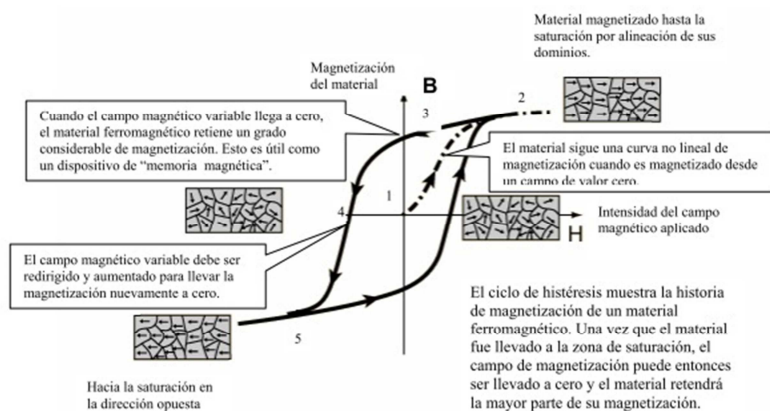


Figura 1.4. Ciclo de histéresis magnética de un material ferromagnético.²⁵

En cambio en las nanopartículas de óxido de hierro, el tamaño nanométrico de las partículas hace que estos dominios se comporten como

un único dominio (mono-dominio) haciendo que los momentos magnéticos dentro del mono-dominio puedan estar perfectamente alineados cuando se somete la muestra a un campo magnético externo. Además, sin presencia de campo magnético externo, los momentos magnéticos se encuentran aleatoriamente situados haciendo que las nanopartículas de óxido de hierro se comporten como materiales no magnéticos y por tanto, no presenten histéresis magnética. En definitiva, se comportan como materiales paramagnéticos pero llegan a valores de magnetización tan altos como los materiales ferromagnéticos a temperatura ambiente (figura 1.5).^{26,27}

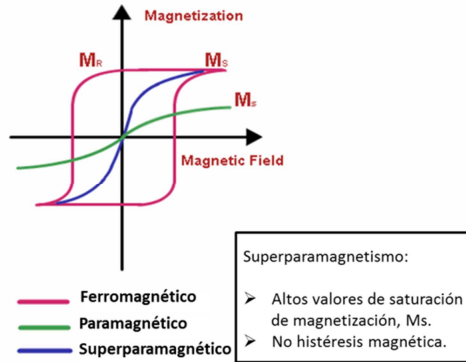


Figura 1.5. Curvas de magnetismo para un material ferromagnético (rosa), paramagnético (verde) y superparamagnético (azul).

Esta propiedad presente en las partículas de óxido de hierro de tamaño nanométrico ha permitido que este tipo de materiales tengan diferentes aplicaciones dentro de la nanomedicina, entre ellas, su uso como agentes de contraste para Imagen por Resonancia Magnética (MRI de sus siglas en inglés) es sin duda una de la aplicaciones más relevantes.²⁸⁻³²

1.1.2.- Nanopartículas de óxido de hierro como agentes de contraste en MRI

La MRI es una técnica de imagen no invasiva muy utilizada hoy en día para el diagnóstico de diferentes enfermedades y lesiones.

El funcionamiento de los equipos MRI se basa en los momentos magnéticos que presentan los elementos de número atómico impar, ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F y particularmente los protones del agua presente en los tejidos. Estos se alinean con el campo magnético externo de forma paralela o anti-paralela a la dirección del campo, lo que genera un vector magnetización en la dirección del campo magnético externo. Una vez alineados se aplica un pulso de radiofrecuencia a una determinada frecuencia de resonancia que altera la dirección de dicho vector de magnetización (figura 1.6). A continuación se deja evolucionar el sistema para que vuelva a la situación de equilibrio. Dicha evolución se caracteriza, principalmente, por los fenómenos de relajación longitudinal (T_1 , tiempo de relajación longitudinal) y transversal (T_2 , tiempo de relajación transversal). El T_1 determina a qué velocidad se recupera la magnetización longitudinal mientras que el T_2 determina a qué velocidad se pierde la magnetización transversal, originada por el pulso de radiofrecuencia (figura 1.6). Los datos recogidos tras codificación espacial adecuada con ayuda de gradientes de campo magnético son después transformados en imagen empleando una transformada de Fourier discreta.³³

Cuando la diferencia de señal entre tejidos próximos es muy baja o para experimentos de imagen molecular, es necesario el uso de agentes de contraste. Estas sustancias provocan una alteración del campo magnético

local de los protones que se encuentran a su alrededor reduciendo los tiempos de relajación.^{34,35} Aquéllos compuestos que reducen principalmente el T_1 producen una imagen hiperintensa de los protones de agua cercanos (el ejemplo típico son los complejos de Gd) mientras que los que reducen mayoritariamente el T_2 producen zonas hipointensas en la imagen, siendo las nanopartículas de óxido de hierro el ejemplo más conocido.³⁶

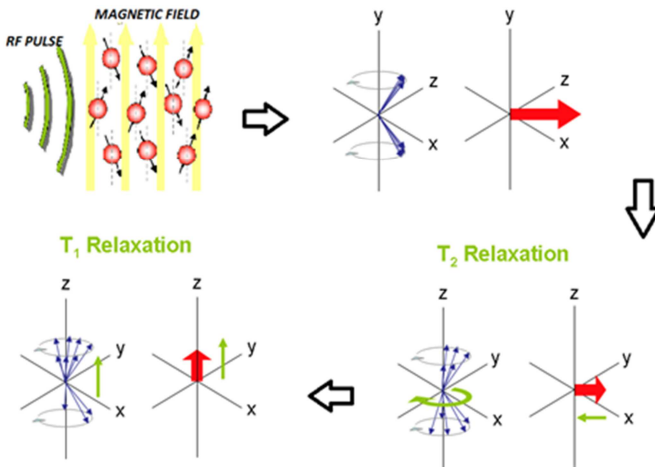


Figura 1.6. Ilustración principios básicos de la Resonancia Magnética nuclear.

Las nanopartículas de óxido de hierro se utilizan en la práctica clínica como agente de contraste T_2 , también conocido como agente de contraste negativo. Existen diferentes formulaciones de este tipo de partículas que se comercializan para el diagnóstico de diferentes enfermedades. Debido a su eliminación a través de hígado y bazo, este tipo de contrastes se utilizan para el diagnóstico de patologías localizadas en estos órganos. Hasta hace poco existían varios productos comerciales basados en nanopartículas de óxido de hierro, ferumoxitoles (Feraheme®), ferumóxidos (Endorem® o Feridex®), ferucarbotranos (Resovist®), ferumoxtrano-10 (Combidx® y Sinerem®), feruglosa (Clariscan®), ferumoxsilo (Lumirem®) y algunas moléculas sin

estructura todavía conocida como Supravist® (de Bayer) y VSOP-C184 (de Ferropham), aunque la producción de muchas de ellas se ha discontinuado por razones varias.³⁷⁻⁴⁰ El Lumiren, Feraheme, Clariscan, VSOP y Supravist presentan un tamaño hidrodinámico mucho menor que el resto y por ello tienen un tiempo de circulación en sangre mayor por lo que puede ser utilizado para aplicaciones diagnósticas que requieran un tiempo en sangre de las nanopartículas elevado.

El diagnóstico de muchas patologías puede ser no obstante complicado con el uso de contraste negativo debido, por ejemplo, a la aparición de señales hipointensas endógenas (por sangrado, calcificaciones, presencia de otros metales) que pueden dificultar la distinción de un contraste. Además, hay órganos que de forma natural presentan poca densidad de protones al tener poco contenido de agua, lo que produce que se vean completamente negros. Este es el caso de los pulmones, que están formados principalmente por aire. Estas razones han motivado que en los últimos años se haya investigado mucho en la obtención de nanopartículas de óxido de hierro para su uso como agente de contraste T_1 .^{41,42}

Hay varias opciones para conseguir este tipo de contraste con nanopartículas de óxido de hierro. Atendiendo a la relaxividad, las nanopartículas producirán contraste positivo con determinadas secuencias que así lo permitan, si están en suficiente concentración y a determinados (bajos) campos magnéticos, si estas partículas presentan valores bajos en la relación r_2/r_1 . Para ello se pueden dar alguna de estas tres condiciones; que tengan valores altos de r_1 , que tengan valores bajos de r_2 y/o que presenten valores altos de r_1 y valores modestos de r_2 . Esta última opción es por regla

general la que produce resultados óptimos para obtener un buen contraste positivo. Para conseguir que se den este tipo de valores de relaxividad se han sintetizado nanopartículas con un tamaño de núcleo pequeño (2-3 nm). Esto produce que haya muchos cationes Fe^{3+} en la superficie del núcleo de la nanopartícula, cada uno de ellos con 5 electrones desapareados, haciendo que la nanopartícula tenga un comportamiento más paramagnético y obteniéndose valores de r_1 comparables o incluso mejores que los que presentan los clásicos agentes de contraste T_1 basados en complejos de Gd (figura 1.7).⁴²

En conclusión, para conseguir nanopartículas de óxido de hierro con buenas características para su uso como agente de contraste positivo, los núcleos deben presentar un tamaño pequeño y por tanto el método de síntesis es un elemento clave.

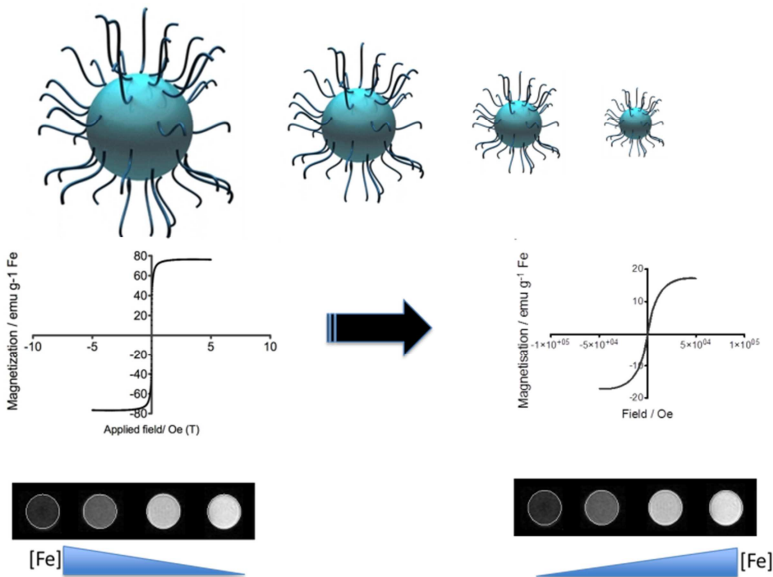


Figura 1.7. Ilustración del cambio de las propiedades magnéticas de las nanopartículas de óxido de hierro con el cambio de tamaño.

Dada la importancia del método de síntesis, a continuación se resumen los métodos de síntesis comúnmente utilizados en la producción de nanopartículas de óxido de hierro.

1.1.3.- Métodos de síntesis de nanopartículas de óxido de hierro.

Existen diferentes métodos para obtener nanopartículas de óxido de hierro. Entre ellos los más importantes son:

i) Descomposición Térmica.

Este método está basado en la descomposición a alta temperatura de precursores organometálicos en presencia de surfactantes y disolventes orgánicos. Es uno de los procedimientos más utilizados debido a que genera nanopartículas de alta cristalinidad y muy uniformes (figura 1.8). Esto hace que los valores de magnetización de saturación sean muy altos haciendo que las nanopartículas obtenidas a través de este método sean buenos agentes de contraste negativo.⁴³

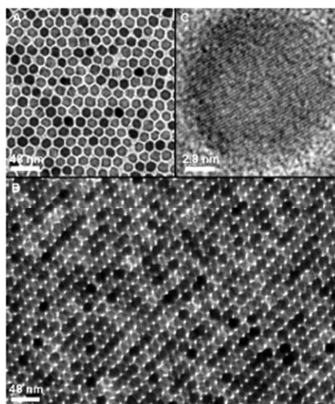


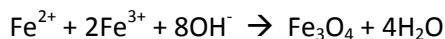
Figura 1.8. Imágenes TEM, a 3 magnitudes diferentes, de nanopartículas Fe_3O_4 obtenidas por descomposición térmica de precursores orgánicos. Copyright 2002, American Chemical Society.⁴⁴

Se han empleado diferentes tipos de precursores orgánicos, cada uno en presencia de determinados surfactantes y disolventes orgánicos. Por ejemplo, la primera síntesis descrita por este método fue llevada a cabo por Alivisatos *et al.* en 1999 donde se utilizaba FeCup_3 (Cup: *N*-nitrosufenilhidroxilamina) como precursor, octilamina como surfactante y trioctilamina como disolvente. Otros precursores orgánicos utilizados son; $\text{Fe}(\text{CO})_5$,⁴⁵ $\text{Fe}(\text{oleato})_3$,⁴⁶ $\text{FeO}(\text{OH})$ ⁴⁷ y $\text{Fe}(\text{acac})_3$.⁴⁸⁻⁵⁰ Una de las variantes más utilizada es la descrita por Sun *et al.* basada en la descomposición del acetilacetato de hierro ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) en presencia de 1,2-hexadecanodiol, oleilamina y ácido oleico como surfactantes y difénil éter como disolvente. Esta reacción permite controlar el tamaño de las nanopartículas obtenidas, desde 3 a 20 nm, dependiendo del tiempo de reacción y de la cantidad de surfactante.⁴⁴

Un inconveniente de la descomposición térmica es que debida a la naturaleza hidrofóbica de los surfactantes utilizados, las nanopartículas obtenidas solo forman suspensiones estables en medios orgánicos, por lo que necesitan de un paso posterior de funcionalización para hacerlas estables en medios fisiológicos.

ii) Coprecipitación

Este método se basa en hacer reaccionar disoluciones de Fe^{2+} y Fe^{3+} en medio básico. Bajo estas condiciones se forman nanopartículas de magnetita que precipitan en forma de sólido negro. Este procedimiento desarrollado por Massart *et al.* en 1981 se representa de forma general en la siguiente reacción:



Como se muestra, la relación molar entre el $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$ debe ser 2:1. Además la reacción se tiene que llevar a cabo en atmósfera inerte y a pH 9.⁵¹

Dentro de la síntesis por coprecipitación hay una gran variedad de parámetros que pueden producir cambios en el tamaño, las propiedades magnéticas y la estabilidad coloidal de las nanopartículas. Por ejemplo, nanopartículas del mismo tamaño pueden tener valores muy diferentes de magnetización debido a la incorporación de impurezas en el núcleo y/o efectos de superficie.^{52,53} El tamaño final de las nanopartículas varía dependiendo del pH de reacción y purificación, sin embargo, el control de dicho tamaño es muy limitado.⁵⁴

Se han utilizado diferentes surfactantes para estabilizar las nanopartículas sintetizadas por el método de coprecipitación, desde polímeros⁵⁵⁻⁵⁸ hasta dendrímeros⁵⁹ y ácidos orgánicos.^{60,61}

El método de coprecipitación permite obtener nanopartículas estables en medios fisiológicos en un solo paso, lo que representa la mayor ventaja de este método. No obstante, presenta dos inconvenientes a tener en cuenta. El primero de ellos es el control de tamaños y su homogeneidad, muy limitado debido a que el crecimiento del cristal solo puede ser regulado por factores cinéticos lo que produce muestras heterogéneas en términos de tamaño y forma de la nanopartícula. El segundo inconveniente se presenta en la superficie de la nanopartícula donde se producen interacciones débiles entre el surfactante y el núcleo. Además el número de grupos funcionales

expuestos en la superficie de la nanopartícula es bajo, complicando la posibilidad de funcionalizar las nanopartículas para cualquier fin biomédico.

iii) Síntesis Hidrotermal

La síntesis hidrotermal se basa en la cristalización de muestras a partir de disoluciones acuosas. Para ello se puede utilizar un aumento de temperatura, habitualmente entre 130 °C – 250 °C, o un aumento de presión (0.3 MPa - 0.4 MPa). Este método permite obtener nanopartículas de óxido de hierro con una distribución de tamaño homogénea.⁶²

Como curiosidad, la síntesis hidrotermal se ha utilizado para sintetizar nanopartículas con geometrías poco comunes como partículas de forma elíptica o cúbica.^{63,64}

iv) Pirólisis láser

Este método se basa en la descomposición de los precursores a través de mezclas vaporizadas previamente por un láser. La formación de los núcleos de las nanopartículas se produce de manera muy rápida lo que provoca que las nanopartículas sintetizadas por este método sean poco cristalinas. Una ventaja de la pirolisis láser es que se obtienen nanopartículas con una distribución de tamaño extraordinariamente homogénea.⁶⁵

v) Síntesis de nanopartículas a través de microondas

La síntesis de nanopartículas de óxido de hierro utilizando la tecnología microondas es un método relativamente nuevo. Dado que este método ha sido elegido para la síntesis de todas las muestras obtenidas

durante el desarrollo de esta Tesis, a continuación se explica de forma más detallada.

La tecnología de microondas se ha utilizado durante muchos años en química inorgánica y química orgánica. Sin embargo, el uso de esta metodología para la síntesis de nanopartículas es algo novedoso que está adquiriendo cada vez más relevancia dentro de la nanotecnología. La ventaja que ofrece el microondas frente a métodos tradicionales se basa en el calentamiento dieléctrico.

Los métodos térmicos tradicionales emplean sistemas de calentamiento como baños de aceite, de arena o mantas calefactoras. Estas técnicas de calentamiento son lentas dado que primero se tiene que producir una transferencia de calor desde el sistema de calentamiento al recipiente de reacción y de este a la muestra. Además el calentamiento no es homogéneo en toda la muestra, produciéndose gradientes térmicos que generan sobrecalentamiento en zonas puntuales dentro de la muestra. Estos efectos del calentamiento convencional pueden producir variaciones significativas en los procesos de nucleación y crecimiento dentro de la síntesis de las nanopartículas aumentando la heterogeneidad de la muestra.

La síntesis por microondas es capaz de resolver las limitaciones de los métodos convencionales de calentamiento. El aspecto clave de esta técnica es el calentamiento dieléctrico. La radiación de microondas está comprendida en el rango de frecuencias 30 GHz-300 MHz del espectro electromagnético. Cuando interactúan con moléculas polares se produce una desviación eléctrica (dipolo eléctrico) para alinear los dipolos de la molécula con el campo eléctrico alterno generado por el microondas. Sin

embargo, no todos los átomos son capaces de moverse debido a interacciones intramoleculares, lo que produce choques y movimientos rotacionales, y por tanto, un calentamiento debido al movimiento de los dipolos eléctricos.⁶⁶ La eficacia del calentamiento depende de varios factores, como el estado de agregación, la densidad y la polaridad. Una de las propiedades más importantes a tener en cuenta es la permitividad (ϵ), que define la capacidad que presenta un material para ser polarizado en presencia de un campo eléctrico. Este parámetro está relacionado con la constante dieléctrica (ϵ') a través de la permitividad en el vacío (ϵ_0) de forma que $\epsilon' = \epsilon / \epsilon_0$. Otro factor importante de los materiales dieléctricos es el factor de pérdida dieléctrica (ϵ'') que representa la pérdida de energía de un material dieléctrico por conducción o disipación. El factor de pérdida indica la parte de energía que va a perder el material al entrar en contacto con el campo eléctrico alterno y que será la que se convierta en calor. Por tanto, el factor de pérdida proporciona, en gran medida, la eficiencia de calentamiento de un material por microondas. Todos estos factores se relacionan a su vez con otra propiedad muy importante de las microondas, la profundidad con que las ondas penetran en el material. Esta profundidad es relevante para obtener un calentamiento eficaz y homogéneo de la muestra. Si un material presenta una profundidad baja, la eficacia de calentamiento puede ser baja aunque el factor de pérdida dieléctrica sea alto. La profundidad de penetración de las microondas en un determinado material se puede calcular a través de la siguiente ecuación:

$$Dp = \frac{\lambda}{4\pi} \left[\frac{2}{\epsilon'(\sqrt{1 + (\epsilon''/\epsilon')^2} - 1)} \right]^{1/2}$$

donde D_p es la profundidad de penetración de la radiación en el material, λ es la longitud de onda de la radiación ($\lambda_{(2.45\text{ GHz})} = 12.24\text{ cm}$), ϵ' la constante dieléctrica y ϵ'' el factor de pérdida dieléctrica.⁶⁷

Queda claro que el calentamiento dieléctrico por microondas depende de varios factores a tener en cuenta a la hora de realizar una síntesis por este sistema. Respecto a la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro, el uso de las microondas presenta la ventaja de la reproducibilidad y homogeneidad del calentamiento respecto a los métodos convencionales. En el caso del calentamiento por microondas, la radiación es capaz de atravesar las paredes del recipiente de reacción y calentar solo reactivos y disolvente de forma directa y uniforme, como decíamos anteriormente. Esto produce que una muestra pueda llegar a una determinada temperatura de forma mucho más rápida que por métodos tradicionales (figura 1.9).

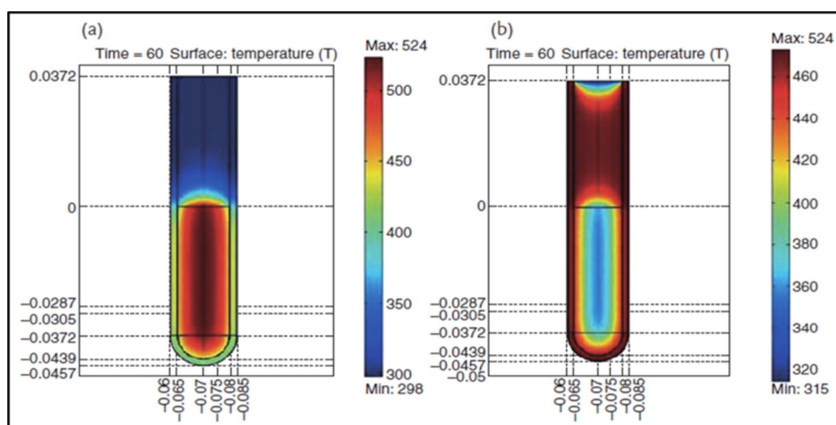


Figura 1.9. Perfil de temperatura para una muestra sometida a calentamiento durante 60 segundos en microondas a) y en un baño de aceite b).⁶⁸

Las características del microondas hacen que se pueda tener un mejor control sobre los parámetros que afectan a la síntesis de las

nanopartículas de óxido de hierro. Además, permite una gran reproducibilidad entre distintas síntesis. Debido a las ventajas que las microondas ofrecen sobre métodos convencionales de calentamiento, ya se han desarrollado varios procedimientos de síntesis de nanopartículas de óxido de hierro dirigidas por microondas. Existen en la literatura algunos ejemplos de síntesis de nanopartículas de maghemita,⁶⁹⁻⁷¹ de maghemita-magnetita⁷² y de magnetita solamente.⁷³ Estos trabajos se centran en la síntesis del núcleo magnético a través de microondas y su caracterización. Sin embargo, las muestras presentaban poca estabilidad coloidal en medios acuosos. Estudios más recientes han tratado de resolver este problema utilizando surfactantes como el dextrano que mejoran la estabilidad coloidal de las nanopartículas sintetizadas por microondas.⁷⁴

Una de las aplicaciones más importantes y novedosa dentro de la síntesis por microondas de nanopartículas de óxido de hierro es la producción de nanopartículas duales PET/MRI que incorporan un radioisótopo emisor de positrones (PET: Tomografía por Emisión de Positrones, de sus siglas en inglés). Teniendo en cuenta que el uso de microondas reduce de forma significativa los tiempos de reacción, esta técnica puede ser muy apropiada para la síntesis de nanopartículas PET/MRI que incorporen radioisótopos de vida media corta como el ⁶⁸Ga. Hasta el momento solo existe un trabajo en el cual se incorpora ⁶⁴Cu en el núcleo de las nanopartículas.⁷⁵ El uso de microondas para la incorporación de isótopos de vida media corta dentro de los núcleos de las nanopartículas es hoy en día un reto y uno de los objetivos más importantes de este trabajo de Tesis. Dado el carácter radiactivo de las nanopartículas que se quieren obtener, a continuación se introduce de forma detallada el concepto de radioquímica.

1.2.- Radioquímica

La radioquímica es la rama de la química que estudia las propiedades y el comportamiento de los materiales radiactivos y la utilización de radioisótopos en el estudio de problemas químicos y biológicos.. Se puede dividir en diferentes ramas, entre ellas, se encuentra la síntesis de trazadores destinados a su uso para diferentes técnicas de imagen de medicina nuclear. Existen multitud de aproximaciones y procedimientos para la síntesis de radio-trazadores dependiendo de la técnica, el radioisótopo utilizado y la aplicación biomédica.^{76,77} Dentro de las técnicas de imagen nuclear se incluyen la gammagrafía, la SPECT y la PET (SPECT: Tomografía Computerizada por Emisión de un Fotón único, de sus siglas en inglés). Todas han sido empleadas en la práctica clínica, sin embargo, la PET es la técnica de imagen nuclear más utilizada debido a la alta sensibilidad que ofrece.

1.2.1.- Tomografía por Emisión de Positrones (PET)

La técnica de imagen PET se basa en la detección de radioisótopos emisores de positrones. Un positrón (β^+) es una partícula de carga positiva que posee la misma masa que el electrón. También llamado antielectrón, el positrón fue descubierto por el físico Carl David Anderson en 1932 aunque Paul Dirac ya había predicho su existencia en 1928.⁷⁸ Un emisor de positrones decae de forma natural a un isótopo estable emitiendo un positrón, un neutrón y un neutrino. El positrón, en contacto con un electrón, genera dos fotones gamma de 511 KeV que viajan en direcciones opuestas en un proceso conocido como aniquilación de positrones. Son este tipo de fotones los que son recogidos por la PET dando una señal que es después transformada en la imagen final (figura 1.10).⁷⁹ La ventaja que ofrece la

técnica PET respecto a otras técnicas de imagen es su alta sensibilidad, estando en un rango de nanomoles e incluso picomoles.⁸⁰ Esta sensibilidad permite obtener información molecular, funcional y metabólica de forma muy precisa por lo que su uso se ha extendido enormemente en los últimos años para el diagnóstico de diferentes enfermedades como el cáncer, el Alzheimer y las enfermedades cardiovasculares entre otras muchas.⁸¹⁻⁸³

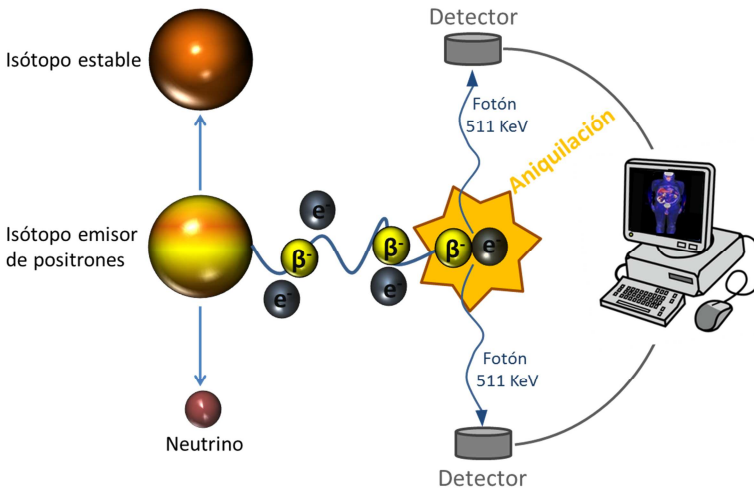


Figura 1.10. Ilustración del proceso de aniquilación de positrones y detección en la tecnología basada en PET.

1.2.2.- Síntesis de radio-trazadores para PET

El progreso de la técnica PET va muy ligado al diseño y síntesis de nuevos radio-trazadores para la detección de diferentes patologías. La síntesis de radio-trazadores depende del emisor de positrones seleccionado. Existe una amplia gama de emisores β^+ que se pueden emplear para el desarrollo de trazadores PET. Hay dos aspectos importantes a la hora de elegir uno de ellos. En primer lugar el isótopo radiactivo debe tener un tiempo de vida media adecuado al tiempo que tarda el radiotrazador en

unirse a la diana específica o en causar un determinado efecto metabólico. El segundo aspecto se refiere al tipo de química que necesita el emisor para ser unido a una determinada biomolécula que causará el efecto deseado.

El tiempo de vida media o período de semidesintegración de un radioisótopo indica el tiempo que tarda el emisor en desintegrar sus núcleos a la mitad decayendo a un isótopo más estable. Es decir, mide el tiempo que tarda un isótopo radiactivo en reducir una determinada actividad inicial a la mitad. Hay que tener en cuenta que el decaimiento de un núcleo se produce al azar y no de forma ordenada por lo que no se puede calcular que núcleo decaerá de forma puntual. Lo que sí se puede calcular es la probabilidad de que un núcleo decaiga en determinado tiempo. Esta expresión viene dada por la constante de desintegración, λ , que indica la probabilidad por unidad de tiempo de que un núcleo dado decaiga. Por tanto, si en una determinada muestra hay N núcleos radiactivos, la probabilidad de desintegración en un determinado tiempo, dT , vienen dada por la expresión:

$$\frac{dN}{dT} = -\lambda N$$

donde el signo menos representa la pérdida de núcleos radiactivos debido al decaimiento. Si se integra esta ecuación de la siguiente forma:

$$\int_{N_0}^N \frac{dN}{N} = \int_0^t -\lambda dT$$

se obtiene la fórmula general del decaimiento radiactivo:

$$N = N_0 e^{-\lambda t}$$

donde N es el número de núcleos radiactivos a un tiempo t , N_0 el número de núcleos radiactivos inicial, $t = 0$, λ es la constante de desintegración y t es el tiempo de vida media.⁸⁴

La fórmula general de decaimiento ha sido utilizada durante este trabajo de Tesis para realizar todas las correcciones de decaimiento en las síntesis realizadas.

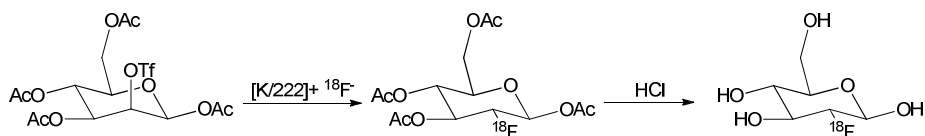
Para cada ventana temporal de la aplicación funcional o molecular que se trate existen diversas opciones de radioisótopos utilizados en la síntesis de radio-trazadores biocompatibles. Entre ellos, los más empleados son el ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{68}Ga , ^{64}Cu y ^{89}Zr (tabla 1.1). La mayoría de ellos se producen en un ciclotrón (acelerador de partículas), lo que requiere grandes instalaciones. Sin embargo, existen otros radioisótopos como el ^{68}Ga que puede producirse de forma muy sencilla a través de un generador.

El ^{18}F es, sin lugar a dudas, el radioisótopo más utilizado dentro del campo de la imagen nuclear. Este ha sido utilizado bajo diferentes formulaciones aunque en su uso más popular el ^{18}F se encuentra formando parte de la 2-desoxi-D-glucosa en el conocido ^{18}FDG ($^{18}\text{Flúor-desoxiglucosa}$). Este radio-trazador es sintetizado de forma muy rápida a través de un precursor que contiene un triflato, buen grupo saliente, produciéndose una reacción de sustitución entre el anión $^{18}\text{F}^-$ y el triflato. El resto de alcoholes contenidos en la glucosa se encuentran protegidos en forma de acetatos por lo que es necesario un segundo paso de reacción en medio ácido para desproteger los alcoholes (esquema 1.1).

Tabla 1.1. Radioisótopos más comunes en PET.

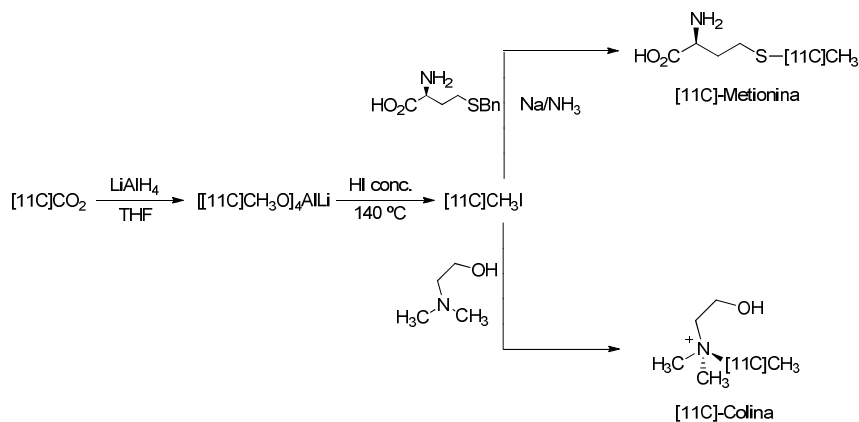
Radioisótopo	Tiempo de vida media	Modo de producción
Carbono-11	20.4 min	$^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ (ciclotrón)
Nitrógeno-13	9.9 min	$^{16}\text{O}(p,\alpha)^{13}\text{N}$ (ciclotrón)
Oxígeno-15	122 seg	$^{14}\text{N}(d,n)^{15}\text{O}$ (ciclotrón)
Flúor-18	110 min	$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ (ciclotrón)
Cobre-62	9.74 min	$^{63}\text{Cu}(p,2n)^{62}\text{Zn}$ (ciclotrón) $^{62}\text{Zn} \rightarrow ^{62}\text{Cu}$ (generador)
Cobre-64	12.7 h	$^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ (ciclotrón) $\text{Zn}(\text{varios})^{64}\text{Cu}$ (ciclotrón)
Galio-68	68.3 min	$^{69}\text{Ga}(p,2n)^{68}\text{Ge}$ (ciclotrón) $^{68}\text{Ge} \rightarrow ^{68}\text{Ga}$ (generador)
Bromo-76	16.2 h	$^{76}\text{Se}(p,n)^{76}\text{Br}$ (ciclotrón)
Iodo-124	4.15 d	$^{124}\text{Te}(p,n)^{124}\text{I}$ (ciclotrón)
Zirconio-89	78.4 h	$^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ (ciclotrón)

Todo el proceso de síntesis de la ^{18}F FDG se realiza de forma automatizada y muy rápida, obteniéndose rendimientos de marcaje altos y permitiendo su uso en la práctica clínica.⁸⁵ Al estar basado en la glucosa, este radio-trazador permite obtener una gran cantidad de información metabólica y por ello es utilizado para el diagnóstico de diferentes enfermedades. Entre todas, cabe destacar el uso de la ^{18}F FDG en el campo de la oncología donde este radio-trazador se emplea de forma rutinaria para la detección de diferentes tipos de cáncer.^{86,87}



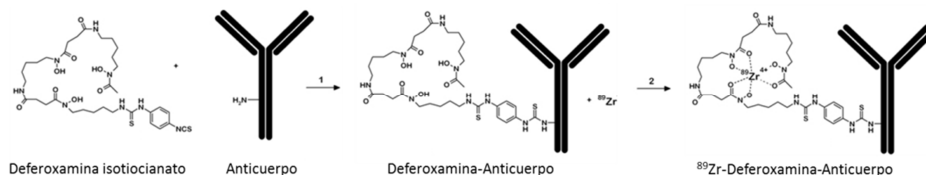
Esquema 1.1. Síntesis de ^{18}F FDG por sustitución nucleofílica.

Otro radioisótopo utilizado de forma común es el ^{11}C . Se han sintetizado varios trazadores con este radioisótopo todos ellos basados en la unión covalente del ^{11}C a biomoléculas como acetato sódico, metionina y colina. Estas síntesis se producen normalmente a través de reacciones de metilación con $^{11}\text{CH}_3\text{I}$. Este reactivo se prepara a partir del $^{11}\text{CO}_2$, que es el producto de síntesis que llega del ciclotrón. El $^{11}\text{CO}_2$ se transforma en $^{11}\text{CH}_3\text{OH}$ por reducción con LiAlH_4 , después, se convierte en $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ haciendo reaccionar el $^{11}\text{CH}_3\text{OH}$ con HI . El $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ es empleado para la síntesis de ^{11}C -metionina y ^{11}C -colina en reacciones muy rápidas con altos rendimientos (esquema 1.2). Estos trazadores se utilizan para diversas aplicaciones. Por ejemplo, la ^{11}C -colina se ha utilizado, dando grandes resultados, en la detección de tumores en el cerebro y cáncer de próstata.^{88,89} La ^{11}C -Metionina se emplea para el diagnóstico de diferentes desórdenes neurológicos y el ^{11}C -Acetato proporciona información metabólica siendo un sustrato esencial en la ruta del ácido tricarboxílico y utilizándose en la detección de cáncer de próstata.⁹⁰⁻⁹²



Esquema 1.2. Síntesis de ^{11}C -Metionina y ^{11}C -Colina a partir de ^{11}C -CO₂.

Un radioisótopo que está ganando relevancia en los últimos años es el ^{89}Zr . Aunque todavía no se utiliza de forma habitual en la clínica debido a que presenta un tiempo de semidesintegración relativamente largo ($t_{1/2} = 78.4 \text{ h}$), su uso está cada vez más extendido en la investigación básica y preclínica. Debido al tiempo de desintegración que presenta el ^{89}Zr , se está utilizando para seguir la biodistribución de diferentes anticuerpos. Normalmente los anticuerpos monoclonales presentan un tiempo de circulación en sangre bastante largo que puede variar desde algunas horas hasta varios días. Por tanto, si se quiere seguir la actividad del anticuerpo dentro del organismo se necesitan radioisótopos de vida larga como es el caso del ^{89}Zr . Las síntesis de radio-trazadores de ^{89}Zr se basan en reacciones de formación de complejos. El quelato utilizado para formar estos complejos es la deferoxamina, que es capaz de formar complejos de coordinación con el ^{89}Zr . Para funcionalizar el radio-trazador con el anticuerpo, primero se hace reaccionar el isotiocianato de deferoxamina con el propio anticuerpo. Esto permite conjugar las aminas primarias que contienen los anticuerpos, mayoritariamente en su región constante, con el isotiocianato presente en la deferoxamina dando el conjugado anticuerpo-deferoxamina. Como último paso de reacción se forma el complejo entre el conjugado anticuerpo-deferoxamina y el ^{89}Zr (esquema 1.3).⁹³



Esquema 1.3. Protocolo de síntesis para radiomarcaje de un anticuerpo con ^{89}Zr .

Este tipo de aproximación se ha utilizado para marcar anticuerpos como el Bevacizumab y el Trastuzumab capaces de unirse a marcadores de angiogénesis en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.⁹⁴

Por último, el ^{68}Ga es un radioisótopo que presenta una ventaja importante frente al resto de emisores β^+ descritos hasta ahora, su producción se puede llevar a cabo desde un generador de síntesis. Como se ha mencionado anteriormente, para obtener los radioisótopos PET se necesita un acelerador de partículas también conocido como ciclotrón. Esto es una gran desventaja debido a las grandes instalaciones que se necesitan y al precio de los equipos que encarecen el coste de la síntesis. Sin embargo, hay algunos radioisótopos, como el ^{68}Ga , que pueden producirse desde pequeños módulos llamados generadores que no requieren ningún tipo de infraestructura especial (figura 1.11).⁹⁵ Esto hace que el uso del ^{68}Ga vaya en aumento y el número de aplicaciones de este radioisótopo crezca de forma significativa año tras año.⁹⁶



Figura 1.11 Generadores comerciales de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$

Este tipo de generadores están formados por una determinada matriz, que varía en función de la casa comercial, que tiene retenido ^{68}Ge , el isótopo padre del ^{68}Ga . El ^{68}Ge presenta un tiempo de semidesintegración de

270 días y decae por un proceso de captura electrónica a ^{68}Ga (figura 1.12). El tiempo de vida media del ^{68}Ge permite producir ^{68}Ga durante muchos meses sin necesidad de cambiar de generador.

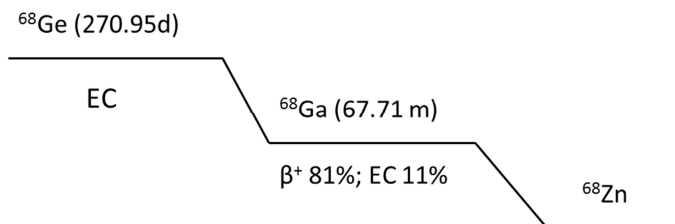


Figura 1.12. Esquema de decaimiento del ^{68}Ge .

Además, el tiempo de vida media del ^{68}Ga es muy apropiado para visualizar péptidos, siendo generalmente muy aproximado al tiempo de circulación en sangre de dichos péptidos.

La síntesis de radio-trazadores con ^{68}Ga se basa en la formación de complejos de coordinación, como con todos los radiosiótopos metálicos. Para ello, se utilizan agentes quelantes que presenten más de un átomo donador para coordinarse con el ion metálico, en este caso el ^{68}Ga . Los más utilizados para formar quelatos con el ^{68}Ga son los agentes quelantes cíclicos que pueden formar complejos [3+3] o [3+4]. Uno de los quelantes más empleados para la síntesis de radio-trazadores con ^{68}Ga es el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético, comúnmente conocido como DOTA. Este tipo de compuestos macrocíclicos producen complejos de coordinación estables. La velocidad de disociación de estos complejos es del orden de 10^5 - 10^7 más lenta que la disociación de los complejos formados por compuestos análogos abiertos. Además, hay que tener en cuenta que el ion metálico queda atrapado en el interior del espacio que deja el compuesto cíclico dándole una mayor estabilidad.⁹⁷ En el caso del DOTA, hay

4 sustituyentes que contienen grupos carboxílicos. Tres de ellos son los que forman el complejo de coordinación con el ^{68}Ga quedando un “brazo” libre para poder funcionalizar el compuesto con una biomolécula. Existe una librería muy amplia de compuestos derivados de DOTA que presentan diferentes grupos funcionales para posteriores modificaciones (figura 1.13). Se han realizado muchos trabajos de investigación utilizando este tipo de radio-trazadores con diferentes fines. Entre ellos se encuentra la síntesis del radio-trazador ^{68}Ga -DOTATATE. Este péptido es un receptor de la somatostatina que ha mostrado tener una gran eficacia para el diagnóstico de diferentes tipos de tumor.⁹⁸ Otro de los radio-trazadores más empleados, también receptor de somatostatina, es el DOTATOC. Este ha resultado ser muy efectivo en el diagnóstico y tratamiento de tumores neuroendocrinos.⁹⁹

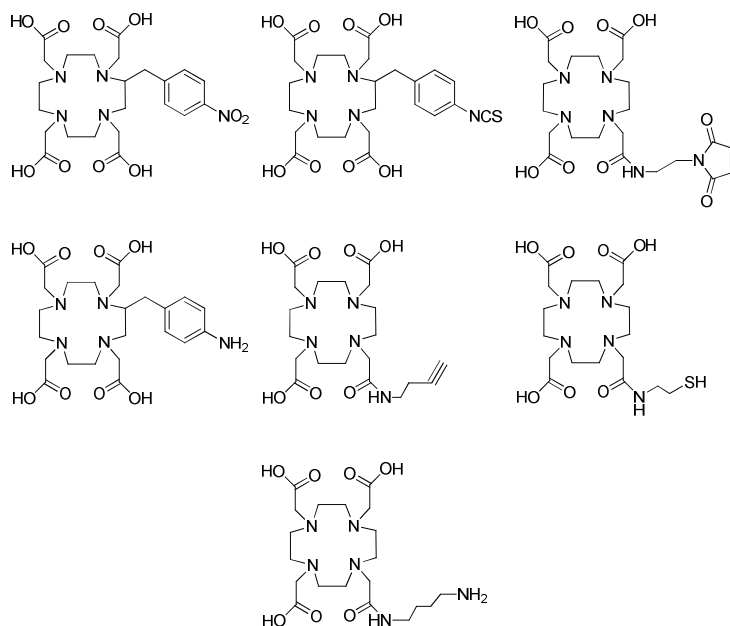


Figura 1.13. Estructuras de DOTA derivados comerciales.

También se han diseñados varios radio-trazadores orientados a la detección de angiogénesis utilizando péptidos basados en la secuencia RGD. Para este propósito se han sintetizado DOTAs conjugados con péptidos monoméricos, diméricos e incluso poliméricos.¹⁰⁰

En muchas de estas aproximaciones, antes de unir el péptido al quelante, se realiza una conjugación del quelato con algún compuesto que aumente el tiempo de vida en sangre del radio-trazador. Esto se debe a que muchos de los radiofármacos DOTA-péptido se eliminan muy rápido por vía renal, evitando la acumulación de la sonda en la región de interés. El sistema más utilizado para aumentar el tiempo de vida en sangre de estos radio-trazadores es la inserción de un compuesto pegilado en el quelante para posteriormente conjugar el quelante pegilado con el péptido de interés.¹⁰¹

Aunque el DOTA es el agente quelante más utilizado dentro de la síntesis de trazadores con ^{68}Ga , presenta algunas desventajas. La reacción de complejación entre el DOTA y el ^{68}Ga necesita de altas temperaturas (70 °C - 95 °C) para que se alcancen altos rendimientos de marcaje. Esto supone un problema teniendo en cuenta que algunos péptidos no soportan estas temperaturas. Además, se necesita un pH ácido (~4.5) para formar el complejo ya que el ^{68}Ga forma hidróxidos estables a pH más alto.¹⁰²

Para evitar el uso de temperaturas altas en el proceso de radiomarcaje, se ha empleado otro quelante denominado NOTA (ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético). Este compuesto presenta una estructura similar al DOTA pero contiene un grupo carboxilo menos (figura 1.14). Esto hace que el espacio que deja el ciclononano se ajuste más al tamaño del

cación $^{68}\text{Ga}^{3+}$. El NOTA forma complejos más estables a temperaturas más bajas que en el caso del DOTA.

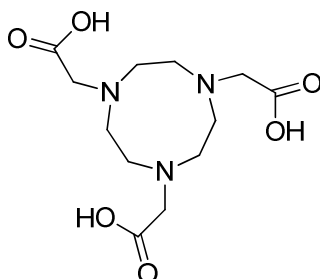


Figura 1.14. Estructura del ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético

La síntesis de radio-trazadores ^{68}Ga -NOTA-péptido también ha sido utilizada para el diagnóstico de diferentes enfermedades como el cáncer.^{103,104}

Como conclusión, se puede decir que el ^{68}Ga presenta unas características muy atractivas para su uso como radioisótopo PET. Su producción a través de un generador y su tiempo de vida media, hacen que este radioisótopo haya sido elegido como fuente de positrones para el desarrollo de los sistemas nanoparticulados sintetizados en este trabajo de Tesis.

Hasta aquí se ha mostrado, brevemente, lo que la nanotecnología y la radioquímica pueden aportar a la medicina y en concreto a las técnicas de imagen avanzada. En los últimos años, está apareciendo un nuevo concepto que une estas dos disciplinas en una sola. Conocida como nanoradioquímica, esta nueva definición trata de combinar lo mejor que puede aportar la nanotecnología a la radioquímica y viceversa. Este nuevo concepto ha sido explotado durante este trabajo de investigación revelando resultados muy prometedores.

1.3.- Nano-radioquímica

La nano-radioquímica es un término relativamente nuevo que hace referencia a la conjunción entre nanotecnología y radioquímica. Esta relación intenta aunar las dos grandes ventajas de cada campo; las propiedades dependientes del tamaño de la nanotecnología y la extraordinaria sensibilidad de las técnicas de imagen nuclear. La unión de estas disciplinas proporciona sondas con mejores características. Algunas de las ventajas que presenta la nano-radioquímica frente a las disciplinas que la componen son:

i) Estudios de biodistribución

Debido a la naturaleza de los materiales nanoparticulados de núcleo inorgánico resulta muy complicado, en la mayoría de los casos, seguir su biodistribución *in vivo*, y más de forma cuantitativa. Para ello hay que recurrir a complejas técnicas que solo son capaces de discernir si el material se encuentra en un determinado órgano u en otro, pero resulta imposible obtener un estudio de biodistribución de cuerpo completo. Además, la cuantificación de la cantidad de sonda presente en cada órgano es muy compleja y en la mayoría de los casos las técnicas no presentan sensibilidad suficiente. Si pensamos en una determinada nanopartícula de óxido de hierro, resulta imposible estudiar su biodistribución *in vivo*, se necesitan técnicas *ex vivo* histológicas o complejas técnicas de magnetización, todas ellas con baja sensibilidad.¹⁰⁵ Por el contrario, si esta misma nanopartícula se conjuga con un radioisótopo, resulta muy fácil estudiar su biodistribución a través de una técnica de imagen nuclear, ya sea PET o SPECT, obteniéndose una imagen de cuerpo entero que permite elucidar a simple vista el comportamiento *in vivo* de la nanopartícula. Además, al ser técnicas muy

sensibles, permiten cuantificar de forma precisa la cantidad de sonda que hay en cada órgano.¹⁰⁶ Esta estrategia se ha utilizado en numerosas ocasiones para conocer la biodistribución de algunas nanopartículas. Se han utilizado radioisótopos como ^{59}Fe , ^{64}Cu , ^{89}Zr , ^{68}Ga y ^{18}F para estudiar la biodistribución de nanopartículas poliméricas, de óxido de hierro, de óxido de silicio y de oro.^{107–110}

Si pensamos en los radiotrazadores, estos presentan, en muchas ocasiones, un tiempo de circulación en sangre muy bajo. Para resolver este problema se necesitan pasos previos de funcionalización con algún compuesto que pueda aumentar este tiempo de vida en sangre, lo que aumenta el tiempo y el coste de la síntesis. Por ejemplo, un compuesto muy empleado dentro de la radioquímica es el ^{68}Ga -DOTA. Este radio-trazador presenta, en modelos de animal pequeño, un tiempo de vida en sangre inferior a 10 minutos. Cuando se funcionaliza con un péptido para conferir una determinada actividad biológica a la sonda, este tiempo de circulación no aumenta, provocando un rápida eliminación del torrente sanguíneo que produce que el radiotrazador no tenga suficiente tiempo para unirse a un sitio específico. Normalmente se conjuga previamente con sustratos basados en el polímero polietilén-glicol o simplemente pegilados o también conjugaciones con proteínas como la albúmina que incrementen el tiempo de vida en sangre.^{111,112} Sin embargo, esto requiere de múltiples pasos de síntesis que encarecen el procedimiento, como se ha comentado con anterioridad. Una forma rápida de resolver este problema es conjugar el radiotrazador con una nanopartícula que presente en sí misma un tiempo de vida en sangre largo. Al formar este conjugado el radiotrazador pasará de tener un tiempo de vida en sangre bajo a tener el tiempo de vida en sangre

que le proporcione la nanopartícula. Como se observa en la figura 1.15, el hecho de tener una nanopartícula de tiempo de vida en sangre largo, hace que el compuesto radiotrazador-nanopartícula presente circulación en sangre 30 minutos tras la inyección, no ocurriendo así en el caso del ^{68}Ga -DOTA donde 10 minutos tras la inyección, solo se observa señal en la vejiga debida a su eliminación.

En conclusión, en términos de biodistribución la nano-radioquímica permite obtener resultados que no son fácilmente obtenibles por las disciplinas que la componen de forma individual.

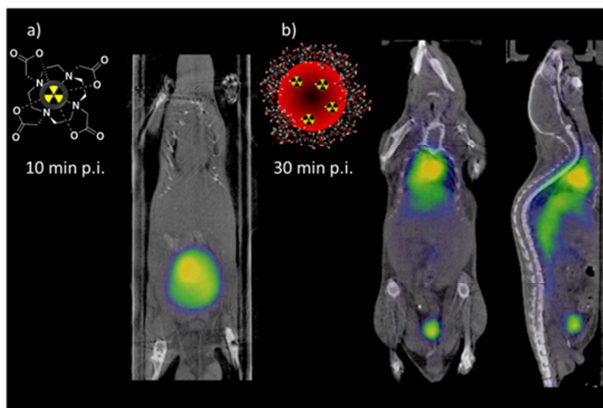


Figura 1.15. a) Biodistribución de ^{68}Ga -DOTA 10 minutos post-inyección mostrando eliminación de la sonda por la vejiga, b) Biodistribución de una nanopartícula con ^{68}Ga 30 minutos post-inyección mostrando circulación en sangre de la sonda.

ii) Multifuncionalización

Como se comentaba en secciones anteriores, una de las ventajas que presentan los materiales nanométricos es su elevada relación superficie/volumen. Esto hace que presenten una alta reactividad y por tanto puedan ser combinados con diferentes grupos específicos dando sondas multifuncionales. Esta estrategia ha sido utilizada con diferentes finalidades.

Una de las más empleadas es la incorporación en una nanopartícula de un agente terapéutico que proporciona al nanomaterial dos funciones al mismo tiempo, por un lado, la capacidad diagnóstica proveniente de la nanopartícula y por otro, las propiedades terapéuticas que añade el agente. Esta combinación se conoce como teranósticas (combinación de terapia + diagnóstico) y ha sido empleada para el diagnóstico y liberación de fármacos en enfermedades cardiovasculares y cáncer.^{113,114}

La nano-radioquímica puede mejorar las propiedades de las nanopartículas multifuncionales. Si el sistema poli-conjugado se encuentra formado por la unión nanopartícula-radioisótopo, la sonda aumenta su capacidad diagnóstica enormemente pudiendo ser detectada por dos o más técnicas de imagen avanzadas de forma individual o combinada, incrementando la sensibilidad y la resolución. Además, la nano-radioquímica ayuda a realizar un seguimiento de la liberación controlada de fármacos de los agentes teranósticos, pudiendo cuantificar de forma efectiva la cantidad de sonda multifuncional que se encuentra liberando el fármaco e incluso calcular la cantidad de fármaco que se libera.^{115,116} Por último la inclusión de radioisótopos para tratamiento como el ¹³¹I o el ¹⁹²Ir ofrece nuevas posibilidades, particularmente en tratamientos anticancerígenos.

iii) Técnicas de imagen híbridas

Se pueden utilizar una gran cantidad de combinaciones entre diferentes nanosistemas y diferentes isótopos radiactivos. A través de ellas se pueden diseñar sondas multimodales válidas para diferentes técnicas de imagen o para equipos que combinan dobles o triples tecnologías PET/CT, SPECT/PET/CT, SPECT/MRI, PET/MRI, MRI-fluorescencia, etc.^{106,117-119} Estas

técnicas híbridas permiten obtener información anatómica y funcional de forma secuencial o simultánea complementando y enriqueciendo las características de las técnicas de imagen individuales. Por ejemplo, la MRI presenta una gran resolución espacial sin embargo la sensibilidad hacia las sondas moleculares es baja. Por el contrario, la técnica PET presenta una alta sensibilidad pero una resolución espacial muy baja. Las técnicas ópticas son muy sensibles pero debido a la dispersión de la luz, no tienen capacidad de penetración por lo que la resolución es muy baja. La unión de dos técnicas en una solución híbrida pueda mejorar los defectos que presentan cada una de forma individual. Dentro de todas las combinaciones que el desarrollo tecnológico puede ofrecer, una de las más interesantes es la combinación PET/MRI. Teniendo en cuenta que la imagen de PET puede proporcionar información funcional/molecular llegando a una sensibilidad de picomoles (pmoles) y que la resolución espacial proporcionada por la MRI alcanza el orden de micras (μm), la combinación de ambas técnicas de imagen en un solo equipo abre un prometedor abanico de posibilidades dentro del diagnóstico preciso y precoz de diferentes enfermedades.¹²⁰⁻¹²² Dado que los equipos combinados PET/MRI ya existen comercialmente (figura 1.16), la búsqueda de nuevos trazadores duales PET/MRI es un campo de investigación abierto donde la nano-radioquímica tiene mucho que aportar.



Philips TF PET/MRI Combo

Figura 1.16. Escáneres comerciales PET/MRI.

1.3.1.- Síntesis de Nano-radiotrazadores.

De la mano del desarrollo de nuevos equipos de imagen avanzada va la investigación sobre el diseño y síntesis de nuevos agentes de contraste.

Existen en la actualidad 4 métodos diferentes para sintetizar nano-radiotrazadores, a saber (figura 1.17); i) formación de complejos entre el nanomaterial y el radioisótopo a través de un agente quelante, ii) bombardeo de hadrones en la nanopartícula, iii) Síntesis del nano-radiotrazador a través de una mezcla de precursores radiactivos y no radiactivos, iv) Síntesis del nanomaterial con incorporación posterior del radioisótopo.

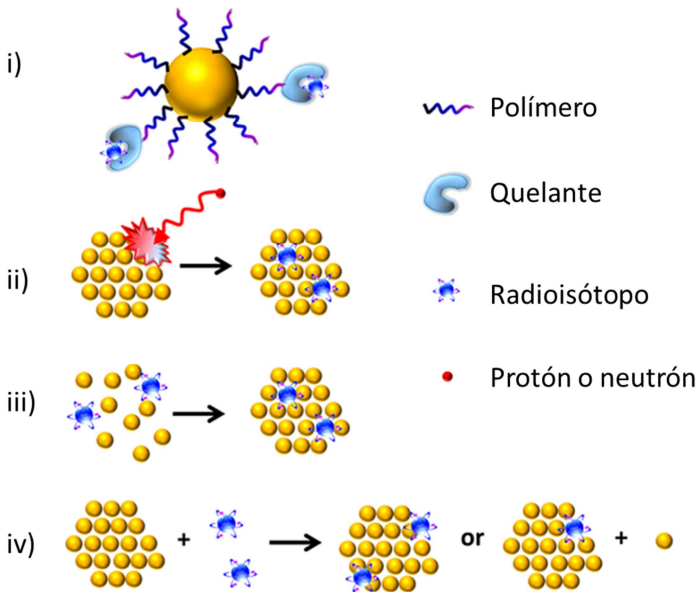


Figura 1.17. Tipos de síntesis de un nano-radiotrazador. i) Formación de complejos entre el nanomaterial y el radioisótopo a través de un agente quelante, ii) Bombardeo de hadrones en la nanopartícula, iii) Síntesis del nano-radiotrazador a través de una mezcla de precursores radiactivos y no radiactivos, iv) Síntesis del nanomaterial con incorporación posterior del radioisótopo.¹²³

i) Formación de complejos entre el nanomaterial y el radioisótopo

Esta es sin duda la técnica más empleada para sintetizar nanoradiotrazadores. Básicamente consiste en funcionalizar la superficie del nanomaterial con un quelante que sea capaz de coordinarse posteriormente con el radioisótopo. Por tanto, hay dos aspectos importantes a tomar en consideración, el tipo de funcionalización de la superficie de la nanopartícula y la formación del quelato entre el agente quelante y el radioisótopo. La funcionalización con el agente quelante debe producir un enlace fuerte entre este y la superficie para evitar posibles desorciones. A su vez, el agente quelante tiene que generar complejos de coordinación muy estables con el radioisótopo para que no se produzcan reacciones *in vivo* de transmetalación en presencia de los cationes metálicos que hay en el torrente sanguíneo de los organismos vivos.^{124,125}

ii) Bombardeo de hadrones en la nanopartícula

Este procedimiento de síntesis consiste en un bombardeo con protones o neutrones directamente sobre la nanopartícula de forma que uno de los elementos contenidos en esta cambie su estado hacia un isótopo radiactivo. Aunque en este tipo de síntesis no se necesitan agentes quelantes que pueden producir transmetalación, es un procedimiento poco utilizado debido a que el bombardeo sobre la nanopartícula puede causar cambios en sus propiedades fisicoquímicas y afectar a las biomoléculas que contengan. Un ejemplo de este tipo de síntesis es el bombardeo de protones sobre una nanopartícula de Al_2O_3 enriquecida de ^{16}O que genera átomos de ^{13}N a través de la reacción $^{16}\text{O}(p,\alpha)^{13}\text{N}$.¹²⁶

iii) Síntesis del nano-radiotrazador a través de una mezcla de precursores radiactivos y no radiactivos

Este tipo de síntesis se basa en la adición de un precursor radiactivo a la mezcla de reacción convencional en la síntesis de las nanopartículas. La idea de esta metodología es dopar el núcleo de las nanopartículas con el radioisótopo. Para ello, el precursor radiactivo se añade en cantidades muy pequeñas, del orden de nanomoles, produciéndose el dopaje en la estructura cristalina de las nanopartículas, lo que confiere una alta estabilidad radioquímica al nano-radiotrazador. El radioisótopo más utilizado en este tipo de síntesis es el ^{64}Cu . Este ha sido utilizado para la formación de quantum dots de CuS a través de una reacción de metátesis con Na_2S , $^{64}\text{CuCl}_2$ y CuCl_2 produciendo $[^{64}\text{Cu}]\text{CuS}$, también para la síntesis de nanopartículas de oro a través de descomposición térmica dando nanopartículas $[^{64}\text{Cu}]\text{Au}$ de 10 nm. También se han sintetizado nanopartículas de óxido de hierro dopadas con ^{64}Cu utilizando una reacción de hidrólisis de FeCl_3 , FeCl_2 y $^{64}\text{CuCl}_2$ dirigida por microondas.^{75,127,128} Como alternativa al uso del ^{64}Cu , el ^{198}Au , radioisótopo utilizado en SPECT, ha sido utilizado para dopar diferentes nanoestructuras de oro.¹²⁹

iv) Síntesis del nanomaterial con incorporación posterior del radioisótopo.

Este método consiste en la adsorción del radioisótopo en la superficie de la nanopartícula. Primero se realiza la síntesis de la nanopartícula tras lo cual se incorpora el radioisótopo en la superficie de la nanopartícula basándose en la afinidad que presentan algunos radioisótopos hacia la superficie de determinadas nanopartículas. Este método presenta la

ventaja de conservar la estructura de la nanopartícula de forma íntegra, sin embargo, con este método sólo se ha conseguido obtener nano-radiotrazadores con radioisótopos poco traslacionales a la clínica como el ^{72}As y el ^{69}Ge . Estos radioisótopos se han incorporado a nanopartículas de óxido de hierro debido a la capacidad de formación de complejos entre el la superficie de la magnetita y estos radioisótopos.^{130,131}

Como se ha comentado, existe una amplia de gama de posibilidades a la hora de elegir un nano-radiotrazador. Entre todas ellas, la síntesis de sondas PET/MRI presenta un gran atractivo debido a las características de esta técnica de imagen híbrida, anteriormente descritas.

1.3.2.- Síntesis de nano-radiotrazadores PET/MRI

La investigación dentro de este campo se ha centrado en la síntesis de nuevas nanopartículas que produzcan contraste en MRI con radioisótopos incorporados que sean detectados en la PET. Este tipo de trazadores son a menudo difíciles de obtener y necesitan un número elevado de pasos de síntesis lo que incrementa los costes y puede provocar cambios perjudiciales en las propiedades fisicoquímicas del trazador en detrimento de su uso para la práctica clínica.¹³² Debido a ello, encontrar un método de síntesis rápido, eficaz, robusto y barato, ha sido uno de los objetivos principales de este trabajo de Tesis.

Lo primero que se debe hacer en este sentido, es la elección del tipo de sistema nanométrico de base que produzca contraste en MRI y del radioisótopo que proporcione señal en PET. Como se ha comentado en puntos anteriores dentro de esta Introducción, una combinación que puede

generar buenos resultados es aquella compuesta por nanopartículas de óxido de hierro y ^{68}Ga .

1.3.3.- Nanopartículas duales de óxido de hierro y ^{68}Ga .

Existen dos tipos de aproximaciones a la hora de desarrollar nanopartículas duales de óxido de hierro y ^{68}Ga . En la primera, se funcionaliza el surfactante de la nanopartículas con un agente quelante para ^{68}Ga , generalmente algún derivado de DOTA, y se realiza el radiomarcaje en último lugar (figura 1.18). Este procedimiento necesita de un gran número de pasos de reacción para obtener la nanopartícula dual. Hay que tener en cuenta que primero hay que sintetizar las nanopartículas, después se suele realizar un segundo paso de funcionalización para incrementar el tiempo de vida en sangre tras lo cual se conjuga la nanopartícula con el quelante y si se quiere que la nanopartícula presente algún tipo de actividad biológica, habrá que hacer otro paso de síntesis para añadir una biomolécula. Una vez acabado todo el protocolo y habiendo caracterizado cada paso intermedio, se realiza la reacción final de radiomarcaje.^{133,134}

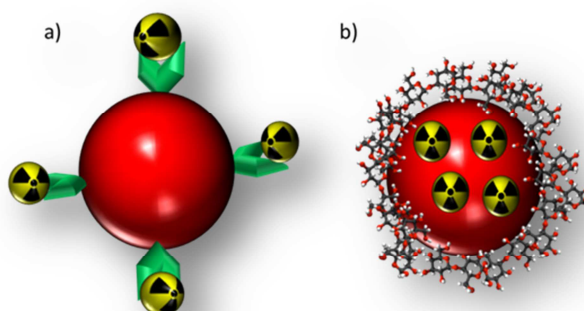


Figura 1.18. a) Esquema de nanopartícula dual con el radioisótopo en la superficie, b) Esquema de nanopartícula dual con el radioisótopo dopando el núcleo.

En una segunda aproximación, la cual no se había conseguido realizar con ^{68}Ga hasta ahora, se dopa el núcleo de la nanopartícula a la vez que se realiza la síntesis de esta (figura 1.18). Esta forma de proceder presenta ciertas ventajas. Hay que realizar menos pasos de síntesis, además, se evitan posibles reacciones de transmetalación que pueden darse cuando se inyectan radio-trazadores basados en quelantes como el DOTA. Para conseguir este tipo de nanopartículas con ^{68}Ga dopado en el núcleo, se debe emplear un método que proporcione una velocidad alta de reacción dado que se tienen que formar la nanopartículas en un tiempo muy corto teniendo cuenta el tiempo de vida media del ^{68}Ga . Para ello, se puede utilizar la síntesis dirigida por microondas, que como se ha visto anteriormente, permite reducir en gran medida los tiempos de reacción.

4.- Bibliografía

1. Feynman, R. There's plenty room at the bottom. *Eng. Sci.* **23**, 22 (1960).
2. National nanotechnology initiative – Leading to the next industrial revolution. 15 (2000). at <[https://www.whitehouse.gov/files/documents/ostp/NSTC Reports/NNI2000.pdf](https://www.whitehouse.gov/files/documents/ostp/NSTCReports/NNI2000.pdf)>
3. Freitas, R. A. What is nanomedicine? *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **1**, 2–9 (2005).
4. Kawasaki, E. S. & Player, A. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **1**, 101–109 (2005).
5. Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A.-K. & Zweck, A. The emerging nanomedicine landscape. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1211–1217 (2006).
6. Pubmed. Results by year Nanotechnology and Nanomedicine. at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=nanotechnology>>
7. Gómez Roca, A. Preparación de nanopartículas magnéticas uniformes y de alta cristalinidad para biomedicina. (CSIC, 2009).
8. Langereis, S., Geelen, T., Grüll, H., Strijkers, G. J. & Nicolay, K. Paramagnetic liposomes for molecular MRI and MRI-guided drug delivery. *NMR Biomed.* **26**, 728–744 (2013).
9. Iv, M. *et al.* Clinical applications of iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging of brain tumors. *Nanomedicine (Lond)*. **10**, 993–1018 (2015).
10. He, C. & Lin, W. Hybrid nanoparticles for cancer imaging and therapy. *Cancer Treat. Res.* **166**, 173–92 (2015).
11. Hu, H. *et al.* Multimodal-luminescence core-shell nanocomposites for targeted imaging of tumor cells. *Chem. - A Eur. J.* **15**, 3577–3584 (2009).
12. Meir, R., Motiei, M. & Popovtzer, R. Gold nanoparticles for in vivo cell tracking. *Nanomedicine (Lond)*. **9**, 2059–69 (2014).
13. Pekkanen, A. M., DeWitt, M. R. & Rylander, M. N. Nanoparticle enhanced optical imaging and phototherapy of cancer. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **10**, 1677–1712 (2014).
14. Tartaj, P. Nanomagnets-From Fundamental Physics to biomedicine. *Current.Nanoscience* **2**, 43–53 (2006).
15. Fleet, M. E. The structure of magnetite. *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry* **37**, 917–920 (1981).

16. O'Neill, H. S. C. & Dollase, W. A. Crystal structures and cation distributions in simple spinels from powder XRD structural refinements: MgCr₂O₄, ZnCr₂O₄, Fe₃O₄ and the temperature dependence of the cation distribution in ZnAl₂O₄. *Phys. Chem. Miner.* **20**, 541–555 (1994).
17. Kovalenko, M. V. *et al.* Fatty acid salts as stabilizers in size- and shape-controlled nanocrystal synthesis: The case of inverse spinel iron oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 6352–6353 (2007).
18. Ngô, C. & Van de Voorde, M. H. in *Nanotechnology in a Nutshell* 3–22 (2014). doi:10.2991/978-94-6239-012-6_1
19. *Nanoparticles*. (2004). doi:10.1007/978-1-4419-9042-6
20. Biener, J. *et al.* Surface chemistry in nanoscale materials. *Materials* **2**, 2404–2428 (2009).
21. Gao, H. & He, Q. The interaction of nanoparticles with plasma proteins and the consequent influence on nanoparticles behavior. *Expert Opin. Drug Deliv.* **11**, 409–20 (2014).
22. Groult, H. *et al.* Phosphatidylcholine-coated iron oxide nanomicelles for in vivo prolonged circulation time with an antibiofouling protein corona. *Chemistry* **20**, 16662–71 (2014).
23. Aggarwal, P., Hall, J. B., McLeland, C. B., Dobrovolskaia, M. A. & McNeil, S. E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**, 428–437 (2009).
24. Pauling, L. A Theory of Ferromagnetism. *Proc Natl Acad Sci USA* **39**, 551–560 (1953).
25. Hyperphysics. at
<<http://hyperphysics.phyastr.gsu.edu/hbasees/solids/hyst.html>>
26. Mikhaylova, M. *et al.* Superparamagnetism of Magnetite Nanoparticles: Dependence on Surface Modification. *Langmuir* **20**, 2472–2477 (2004).
27. Bean, C. P. & Livingston, J. D. Superparamagnetism. *J. Appl. Phys.* **30**, S120 (1959).
28. Zhao, X., Zhao, H., Chen, Z. & Lan, M. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging contrast agent. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **14**, 210–220 (2014).
29. Li, L. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as MRI contrast agents for non-invasive stem cell labeling and tracking. *Theranostics* **3**, 595–615 (2013).

30. Yoffe, S., Leshuk, T., Everett, P. & Gu, F. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs): Synthesis and Surface Modification Techniques for use with MRI and Other Biomedical Applications. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 493–509 (2013).
31. Sosnovik, D. E., Nahrendorf, M. & Weissleder, R. Magnetic nanoparticles for MR imaging: Agents, techniques and cardiovascular applications. *Basic Research in Cardiology* **103**, 122–130 (2008).
32. Laurent, S., Boutry, S., Mahieu, I., Vander Elst, L. & Muller, R. N. Iron oxide based MR contrast agents: from chemistry to cell labeling. *Curr. Med. Chem.* **16**, 4712–4727 (2009).
33. Henderson, R. G. Nuclear magnetic resonance imaging: a review. *J. R. Soc. Med.* **76**, 206–212 (1983).
34. Wood, M. L. & Hardy, P. A. Proton relaxation enhancement. *J. Magn. Reson. Imaging* **3**, 149–156
35. Hendrick, R. E. & Haacke, E. M. Basic physics of MR contrast agents and maximization of image contrast. *J. Magn. Reson. Imaging* **3**, 137–148
36. Tanimoto, A., Pouliquen, D., Kreft, B. P. & Stark, D. D. Effects of spatial distribution on proton relaxation enhancement by particulate iron oxide. *J. Magn. Reson. Imaging* **4**, 653–657
37. Corot, C., Robert, P., Idée, J. M. & Port, M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 1471–1504 (2006).
38. Wang, Y.-X. J. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. *Quant. Imaging Med. Surg.* **1**, 35–40 (2011).
39. Reimer, P. & Balzer, T. Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications. *Eur. Radiol.* **13**, 1266–1276 (2003).
40. Leung, K. *Ferumoxsil. Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* (2004). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20641202>>
41. Hu, F., Jia, Q., Li, Y. & Gao, M. Facile synthesis of ultrasmall PEGylated iron oxide nanoparticles for dual-contrast T1- and T2-weighted magnetic resonance imaging. *Nanotechnology* **22**, 245604 (2011).
42. Kim, B. H. *et al.* Large-scale synthesis of uniform and extremely small-sized iron oxide nanoparticles for high-resolution T1 magnetic resonance imaging contrast agents. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 12624–12631 (2011).
43. Laurent, S. *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. *Chem. Rev.* **108**, 2064–2110 (2008).

44. Sun, S. & Zeng, H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8204–8205 (2002).
45. Hyeon, T., Su Seong Lee, Park, J., Chung, Y. & Hyon Bin Na. Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 12798–12801 (2001).
46. Park, J. *et al.* Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nat. Mater.* **3**, 891–895 (2004).
47. Yu, W. W., Falkner, J. C., Yavuz, C. T. & Colvin, V. L. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. *Chem. Commun. (Camb)*. 2306–2307 (2004). doi:10.1039/b409601k
48. Sun, S. *et al.* Monodisperse MFe₂O₄ (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 273–279 (2004).
49. Hu, F. *et al.* Preparation of biocompatible magnetite nanocrystals for in vivo magnetic resonance detection of cancer. *Adv. Mater.* **18**, 2553–2556 (2006).
50. Hu, F., Li, Z., Tu, C. & Gao, M. Y. Preparation of magnetite nanocrystals with surface reactive moieties by one-pot reaction. *J. Colloid Interface Sci.* **311**, 469–474 (2007).
51. Kim, D. K., Zhang, Y., Voit, W., Rao, K. V. & Muhammed, M. Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **225**, 30–36 (2001).
52. Gazeau, F. *et al.* Magnetic resonance of ferrite nanoparticles: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **186**, 175–187 (1998).
53. Gazeau, F. *et al.* Magnetic resonance of nanoparticles in a ferrofluid: evidence of thermofluctuational effects. *J. Magn. Magn. Mater.* **202**, 535–546 (1999).
54. Jolivet, J.-P. *Metal Oxide Chemistry and Synthesis: From Solution To Solid State*. (John Wiley, Chichester; New York, 2000).
55. Molday, R. S. & MacKenzie, D. Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells. *J. Immunol. Methods* **52**, 353–367 (1982).
56. Berret, J.-F. *et al.* Controlled clustering of superparamagnetic nanoparticles using block copolymers: design of new contrast agents for magnetic resonance imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 1755–1761 (2006).
57. Thünemann, A. F., Schütt, D., Kaufner, L., Pison, U. & Möhwald, H. Maghemite nanoparticles protectively coated with poly(ethylene imine) and poly(ethylene oxide)-block-poly(glutamic acid). *Langmuir* **22**, 2351–2357 (2006).

58. Yoo, M. K. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with galactose-carrying polymer for hepatocyte targeting. *J. Biomed. Biotechnol.* **2007**, (2007).
59. Shi, X., Thomas, T. P., Myc, L. A., Kotlyar, A. & Baker, J. R. Synthesis, characterization, and intracellular uptake of carboxyl-terminated poly(amidoamine) dendrimer-stabilized iron oxide nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9**, 5712–5720 (2007).
60. Shieh, D. Bin *et al.* Aqueous dispersions of magnetite nanoparticles with NH₃ + surfaces for magnetic manipulations of biomolecules and MRI contrast agents. *Biomaterials* **26**, 7183–7191 (2005).
61. Bee, A., Massart, R. & Neveu, S. Synthesis of very fine maghemite particles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **149**, 6–9 (1995).
62. Giri, S., Samanta, S., Maji, S., Ganguli, S. & Bhaumik, A. Magnetic properties of α -Fe₂O₃ nanoparticle synthesized by a new hydrothermal method. *J. Magn. Magn. Mater.* **285**, 296–302 (2005).
63. Wang, S. B., Min, Y. L. & Yu, S. H. Synthesis and magnetic properties of uniform hematite nanocubes. *J. Phys. Chem. C* **111**, 3551–3554 (2007).
64. Titirici, M. M., Antonietti, M. & Thomas, A. A generalized synthesis of metal oxide hollow spheres using a hydrothermal approach. *Chem. Mater.* **18**, 3808–3812 (2006).
65. Costo, R. *et al.* Ultrasmall iron oxide nanoparticles for biomedical applications: Improving the colloidal and magnetic properties. *Langmuir* **28**, 178–185 (2012).
66. Loupy, A. de la Hoz, A. *Microwaves in Organic Synthesis.* (Wiley-VCH, 2013).
67. Peregrinus, P. *Industrial Microwave Heating.* (IEE, 1983).
68. Horikoshi, S. & Serpone, N. *Microwaves in Nanoparticles synthesis.* (Wiley-VCH, 2013).
69. J.G. Parsons, C. Luna, C.E. Botez, J. Elizalde, and J. L. G.-T. Microwave Assisted Synthesis of Iron(III) Oxyhydroxides/Oxides Characterized Using Transmission Electron Microscopy, X-ray Diffraction, and X-ray Absorption Spectroscopy. *J Phys Chem Solids* **70**, 555–560 (2010).
70. Liao, X., Zhu, J., Zhong, W. & Chen, H.-Y. Synthesis of amorphous Fe₂O₃ nanoparticles by microwave irradiation. *Materials Letters* **50**, 341–346 (2001).
71. Wang, W. W., Zhu, Y. J. & Ruan, M. L. Microwave-assisted synthesis and magnetic property of magnetite and hematite nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **9**, 419–426 (2007).

72. Jiang, F. Y., Wang, C. M., Fu, Y. & Liu, R. C. Synthesis of iron oxide nanocubes via microwave-assisted solvothermal method. *J. Alloys Compd.* **503**, (2010).
73. Kholam, Y. B. *et al.* Microwave hydrothermal preparation of submicron-sized spherical magnetite (Fe₃O₄) powders. *Mater. Lett.* **56**, 571–577 (2002).
74. Osborne, E. A. *et al.* Rapid microwave-assisted synthesis of dextran-coated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Nanotechnology* **23**, 215602 (2012).
75. Wong, R. M., Gilbert, D. A., Liu, K. & Louie, A. Y. Rapid size-controlled synthesis of dextran-coated, 64Cu-doped iron oxide nanoparticles. *ACS Nano* **6**, 3461–3467 (2012).
76. Price, E. W. & Orvig, C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 260–90 (2014).
77. Medicine., N. R. C. (US) and I. of M. (US) C. on S. of the S. of N. *Advancing Nuclear Medicine Through Innovation*. (National Academies Press (US);, 2007).
78. Anderson, C. D. The positive electron. *Phys. Rev.* **43**, 491–494 (1933).
79. Piepmeyer, J. M. Positron Emission Tomography. *Yale J. Biol. Med.* **59**, 377 (1986).
80. Garcia, E. V. Physical attributes, limitations, and future potential for PET and SPECT. *Journal of Nuclear Cardiology* **19**, (2012).
81. Schöder, H. & Larson, S. M. Positron emission tomography for prostate, bladder, and renal cancer. *Seminars in Nuclear Medicine* **34**, 274–292 (2004).
82. Någren, K., Halldin, C. & Rinne, J. O. Radiopharmaceuticals for positron emission tomography investigations of Alzheimer’s disease. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **37**, 1575–1593 (2010).
83. Blomberg, B. A. & Høilund-Carlsen, P. F. [¹⁸F]-fluorodeoxyglucose PET imaging of atherosclerosis. *PET Clin.* **10**, 1–7 (2015).
84. Groch, M. W. Radioactive decay. *Radiographics* **18**, 1247–1256; quiz 1245–1246
85. Yu, S. Review of 18F-FDG synthesis and quality control. *Biomedical Imaging and Intervention Journal* **2**, (2006).
86. Belhocine, T. *et al.* 18FDG PET in oncology: The best and the worst (review). *International Journal of Oncology* **28**, 1249–1261 (2006).
87. Hildebrandt, M. G., Kodahl, A. R., Teilmann-Jørgensen, D., Mogensen, O. & Jensen, P. T. [¹⁸F]fluorodeoxyglucose PET/computed tomography in breast cancer and gynecologic cancers: a literature review. *PET Clin.* **10**, 89–104 (2015).

88. Giovannini, E., Lazzeri, P., Milano, A., Gaeta, M. C. & Ciarmiello, A. Clinical applications of choline PET/CT in brain tumors. *Curr. Pharm. Des.* **21**, 121–7 (2015).
89. Brogsitter, C., Zöphel, K. & Kotzerke, J. 18F-Choline, 11C-choline and 11C-acetate PET/CT: Comparative analysis for imaging prostate cancer patients. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **40**, (2013).
90. Shirai, S. *et al.* Usefulness of 11C-methionine-positron emission tomography for the diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Neurol.* **261**, 2314–8 (2014).
91. Kume, K. *et al.* Advantage of 11C-methionine positron emission tomography for assessing IgG4-related central nervous system lesions. *Journal of Neurology* **261**, 625–627 (2014).
92. Mohsen, B. *et al.* Application of C-11-acetate positron-emission tomography (PET) imaging in prostate cancer: systematic review and meta-analysis of the literature. *BJU Int.* **112**, 1062–72 (2013).
93. Vosjan, M. J. W. D. *et al.* Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine. *Nat. Protoc.* **5**, 739–743 (2010).
94. Gaykema, S. B. M. *et al.* 89Zr-trastuzumab and 89Zr-bevacizumab PET to evaluate the effect of the HSP90 inhibitor NVP-AUY922 in metastatic breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **20**, 3945–3954 (2014).
95. Rösch, F. (68)Ge/ (68)Ga generators: past, present, and future. *Recent results cancer Res. Fortschritte der Krebsforsch. Progrès dans les Rech. sur le cancer* **194**, 3–16 (2013).
96. Velikyan, I. 68Ga-Based Radiopharmaceuticals: Production and Application Relationship. *Molecules* **20**, 12913–43 (2015).
97. Alexander, V. Design and Synthesis of Macrocyclic Ligands and Their Complexes of Lanthanides and Actinides. *Chem. Rev.* **95**, 273–342 (1995).
98. Hofman, M. S., Lau, W. F. E. & Hicks, R. J. Somatostatin receptor imaging with 68Ga DOTATATE PET/CT: clinical utility, normal patterns, pearls, and pitfalls in interpretation. *Radiographics* **35**, 500–16
99. Kratochwil, C. *et al.* SUV of [68Ga]DOTATOC-PET/CT Predicts Response Probability of PRRT in Neuroendocrine Tumors. *Mol. Imaging Biol.* **17**, 313–8 (2015).
100. Knetsch, P. A. *et al.* [(68)Ga]FSC-(RGD)₃ a trimeric RGD peptide for imaging $\alpha v \beta 3$ integrin expression based on a novel siderophore derived chelating scaffold-synthesis and evaluation. *Nucl. Med. Biol.* **42**, 115–22 (2015).
101. Blom, E. *et al.* Ga-labeling of RGD peptides and biodistribution. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **5**, 165–172 (2012).

102. Decristoforo, C. *et al.* A fully automated synthesis for the preparation of 68Ga-labelled peptides. *Nucl. Med. Commun.* **28**, 870–875 (2007).
103. Zhang, J. *et al.* Clinical Translation of a Novel Albumin-Binding PET Radiotracer 68Ga-NEB. *J. Nucl. Med.* (2015). doi:10.2967/jnumed.115.159640
104. Kang, C. M. *et al.* In vivo characterization of 68Ga-NOTA-VEGF121 for the imaging of VEGF receptor expression in U87MG tumor xenograft models. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **40**, 198–206 (2013).
105. Schlachter, E. K. *et al.* Metabolic pathway and distribution of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: in vivo study. *Int. J. Nanomedicine* **6**, 1793–1800 (2011).
106. Glaus, C., Rossin, R., Welch, M. J. & Bao, G. In vivo evaluation of 64Cu-labeled magnetic nanoparticles as a dual-modality PET/MR imaging agent. *Bioconjug. Chem.* **21**, 715–722 (2010).
107. Miller, L., Winter, G., Baur, B. & Witulla, B. Synthesis, characterization, and biodistribution of multiple 89 Zr-labeled pore-expanded mesoporous silica nanoparticles for PET. *Nanoscale* **6**, 4928–35 (2014).
108. Pressly, E. D. *et al.* Structural effects on the biodistribution and positron emission tomography (PET) imaging of well-defined 64Cu-labeled nanoparticles comprised of amphiphilic block graft copolymers. *Biomacromolecules* **8**, 3126–3134 (2007).
109. Groult, H. *et al.* Parallel multifunctionalization of nanoparticles: a one-step modular approach for in vivo imaging. *Bioconjug. Chem.* **26**, 153–60 (2015).
110. Zhu, J. *et al.* Rapid 18F-labeling and loading of PEGylated gold nanoparticles for in vivo applications. *Bioconjug. Chem.* **25**, 1143–1150 (2014).
111. Leung, K. *Gly-Ala-Cys-Leu-Arg-Ser-Gly-Arg-Gly-Cys-Gly-(PEG)3-DOTA-(68)Ga. Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* (2004). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21491704>>
112. Hoffend, J. *et al.* Gallium-68-DOTA-albumin as a PET blood-pool marker: Experimental evaluation in vivo. *Nucl. Med. Biol.* **32**, 287–292 (2005).
113. Cabral, R. M. & Baptista, P. V. Anti-cancer precision theranostics: a focus on multifunctional gold nanoparticles. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **14**, 1041–52 (2014).
114. Wang, D., Lin, B. & Ai, H. Theranostic nanoparticles for cancer and cardiovascular applications. *Pharmaceutical Research* **31**, 1390–1406 (2014).
115. Lee, D.-E. *et al.* Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chemical Society Reviews* **41**, 2656 (2012).

116. Kim, J., Piao, Y. & Hyeon, T. Multifunctional nanostructured materials for multimodal imaging, and simultaneous imaging and therapy. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 372–390 (2009).
117. Bouziotis, P., Psimadas, D., Tsoதாக, T., Stamopoulos, D. & Tsoukalas, C. Radiolabeled iron oxide nanoparticles as dual-modality SPECT/MRI and PET/MRI agents. *Curr. Top. Med. Chem.* **12**, 2694–702 (2012).
118. Lütje, S. *et al.* Pretargeted dual-modality immuno-SPECT and near-infrared fluorescence imaging for image-guided surgery of prostate cancer. *Cancer Res.* **74**, 6216–23 (2014).
119. Hu, K. *et al.* In Vivo Cancer Dual-Targeting and Dual-Modality Imaging with Functionalized Quantum Dots. *J. Nucl. Med.* **56**, 1278–84 (2015).
120. Eiber, M. *et al.* Performance of Whole-Body Integrated 18F-FDG PET/MR in Comparison to PET/CT for Evaluation of Malignant Bone Lesions. *J. Nucl. Med.* **55**, 191–7 (2014).
121. Quick, H. H. Integrated PET/MR. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **39**, 243–258 (2014).
122. Quick, H. H. *et al.* Integrated whole-body PET/MR hybrid imaging: clinical experience. *Invest. Radiol.* **48**, 280–9 (2013).
123. Sun, X., Cai, W. & Chen, X. Positron Emission Tomography Imaging Using Radiolabeled Inorganic Nanomaterials. *Acc. Chem. Res.* (2015). doi:10.1021/ar500362y
124. Xie, J., Liu, G., Eden, H. S., Ai, H. & Chen, X. Surface-engineered magnetic nanoparticle platforms for cancer imaging and therapy. *Acc. Chem. Res.* **44**, 883–892 (2011).
125. Wadas, T. J., Wong, E. H., Weisman, G. R. & Anderson, C. J. Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease. *Chem. Rev.* **110**, 2858–2902 (2010).
126. Pérez-Campaña, C. *et al.* Biodistribution of different sized nanoparticles assessed by positron emission tomography: A general strategy for direct activation of metal oxide particles. *ACS Nano* **7**, 3498–3505 (2013).
127. Zhou, M. *et al.* A chelator-free multifunctional [64Cu]CuS nanoparticle platform for simultaneous micro-PET/CT imaging and photothermal ablation therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 15351–15358 (2010).
128. Zhao, Y. *et al.* Copper-64-alloyed gold nanoparticles for cancer imaging: Improved radiolabel stability and diagnostic accuracy. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **53**, 156–159 (2014).

129. Black, K. C. L. *et al.* Radioactive ^{198}Au -doped nanostructures with different shapes for in vivo analyses of their biodistribution, tumor uptake, and intratumoral distribution. *ACS Nano* **8**, 4385–4394 (2014).
130. Chen, F. *et al.* Chelator-free synthesis of a dual-modality PET/MRI agent. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 13319–13323 (2013).
131. Chakravarty, R. *et al.* Intrinsically germanium-69-labeled iron oxide nanoparticles: synthesis and in-vivo dual-modality PET/MR imaging. *Adv. Mater.* **26**, 5119–23 (2014).
132. Cheng, Z., Al Zaki, A., Hui, J. Z., Muzykantov, V. R. & Tsourkas, A. Multifunctional nanoparticles: cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities. *Science* **338**, 903–10 (2012).
133. Lee, H.-Y. *et al.* PET/MRI dual-modality tumor imaging using arginine-glycine-aspartic (RGD)-conjugated radiolabeled iron oxide nanoparticles. *J. Nucl. Med.* **49**, 1371–1379 (2008).
134. Madru, R. *et al.* (^{68}Ga) -labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for multi-modality PET/MR/Cherenkov luminescence imaging of sentinel lymph nodes. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **4**, 60–9 (2013).

Capítulo

2

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo de Tesis son:

- i. Desarrollar nuevas metodologías para la síntesis rápida y reproducible de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro.
- ii. Estudiar comparativamente las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de óxido de hierro obtenidas mediante síntesis termal y por microondas.
- iii. Sintetizar nano-radiotrazadores basados en nanopartículas de óxido de hierro y ^{68}Ga .
- iv. Estudiar el comportamiento *in vivo* y las aplicaciones para imagen molecular cardiovascular de los sistemas nanoparticulados de partida y de los productos derivados de las mismas.

Sección 1: Síntesis de Nanosistemas

Capítulo 3.- Síntesis de nanopartículas de Fe_3O_4 recubiertas de ácido oleico mediante descomposición térmica de precursores orgánicos y microondas.

Capítulo 4.- Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de ácido azelaico. Síntesis convencional frente a síntesis dirigida por microondas.

Capítulo 5.- Síntesis por microondas de nanopartículas PET/MRI de óxido de hierro recubiertas de dextrano dopadas con ^{68}Ga .

Capítulo 6.- Síntesis por microondas de nanopartículas PET/MRI de óxido de hierro recubiertas de ácido cítrico dopadas con ^{68}Ga .

CAPÍTULO

3

Síntesis de nanopartículas de Fe_3O_4 recubiertas de ácido oleico mediante descomposición térmica de precursores orgánicos y microondas.

3.1.- Introducción

Las nanopartículas de Fe_3O_4 recubiertas de ácido oleico (IONP-AO) son una de las soluciones más utilizadas para la producción de sondas para imagen médica. Existen multitud de ejemplos que utilizan este tipo de nanopartículas para obtener, tras una funcionalización posterior, sistemas nanoparticulados de elevada cristalinidad y momento magnético.¹⁻⁴

La razón por la cual este tipo de nanopartículas se utilizan de forma tan común en investigación, radica en la naturaleza de su síntesis. Como se resumía anteriormente, la descomposición térmica de precursores orgánicos es el método empleado para su obtención. Este método permite obtener nanopartículas que presentan una alta cristalinidad con una distribución de tamaños estrecha y uniforme. En el caso de las nanopartículas recubiertas de ácido oleico se puede controlar el tamaño variando la temperatura y la cantidad de surfactantes en la reacción.⁵ Además, el uso del ácido oleico como surfactante hace que las nanopartículas presenten una alta estabilidad coloidal.⁶ En definitiva, tanto el gran control de las propiedades de las nanopartículas obtenidas por esta síntesis así como las ventajas que ofrece el uso del ácido oleico como surfactante, hacen que sean una excelente solución muy empleada en nanotecnología.

El objetivo de este capítulo es comparar el método de descomposición térmica de precursores orgánicos con la síntesis dirigida por microondas para la obtención de las nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de ácido oleico. La motivación que llevó a realizar la síntesis de estas partículas a través del microondas fue la de reducir el tiempo de reacción empleando además un método más reproducible (figura 3.1).

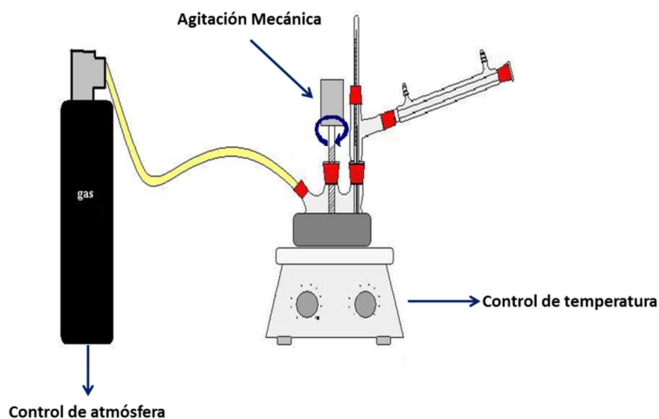


Figura 3.1. Ilustración de un montaje para la síntesis de IONP-AO por descomposición térmica.

Lo primero que se hizo, fue elegir el tipo de síntesis. Como se vio en la Introducción de esta Tesis, existen diferentes combinaciones de compuestos orgánicos y surfactantes para producir las nanopartículas. En este caso, la elección del método se basó en nuestra experiencia en la síntesis de IONP-AO a través de descomposición térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ en presencia de ácido oleico, oleilamina y 1,2- hexadecanodiol. El mecanismo por el cual se forman las nanopartículas a través de esta síntesis comienza con la reducción parcial de cationes Fe^{3+} a Fe^{2+} . Después se produce la formación del complejo $\text{Fe}(\text{oleico})_x$ entre el hierro y el ácido oleico que se descompone a temperaturas elevadas dando lugar a un proceso de nucleación donde se producen núcleos de óxido de hierro. A continuación se produce una etapa de crecimiento en la cual se forma una capa de surfactantes que actúan como capa dinámica superficial en la que se adsorben y disuelven los iones de Fe de forma continua. La elección de estos surfactantes así como la velocidad de crecimiento determinará el tamaño y la forma final de las nanopartículas (figura 3.2).^{7,8} La oleilamina estabiliza el

ácido oleico y hace que este se enlace mejor a la estructura cristalina del óxido de hierro. Esta presenta un afinidad mucho menor que el ácido oleico hacia los núcleos de óxido de hierro por lo que ayuda a la estabilidad pero no interfiere en la unión entre el ácido oleico y dichos núcleos. El uso de la oleilamina implica cambios en el tamaño y forma final de las nanopartículas.^{9,10} Este surfactante se acompaña del 1,2- hexadecanodiol que provoca una disminución en los tamaños finales de la nanopartícula (4-10 nm).⁵

El tiempo de las etapas de nucleación y crecimiento afecta a las características fisicoquímicas de la muestra final. En nuestro caso, al utilizar una síntesis dirigida por microondas se pretendía reducir los tiempos de reacción sin afectar las propiedades de las nanopartículas. Se debe tener en cuenta que en el microondas, el tiempo que la muestra tarda en alcanzar una determinada temperatura es mucho menor que lo que emplearía a través de calentamientos convencionales. Esto implica un aumento significativo en la velocidad de reacción que hace que las etapas dentro de la formación de la nanopartícula puedan completarse de forma más rápida.

Por tanto, nuestra hipótesis inicial de trabajo fue que *“el uso de las microondas nos permitirá obtener nanopartículas IONP-OA en un tiempo de síntesis menor sin que esto afecte a sus propiedades fisicoquímicas.”*

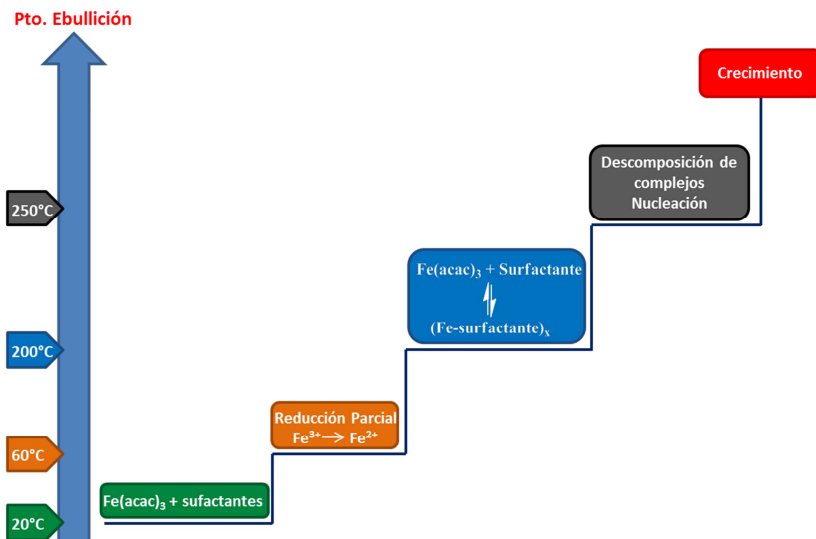


Figura 3.2. Pasos para la formación de nanopartículas IONP-AO.

3.2.- Resultados y discusión

Para conocer cómo afecta la síntesis dirigida por microondas a la formación de las IONP-AO, en este apartado se muestran los resultados concernientes a la caracterización de estas partículas obtenidas tanto por el método de descomposición de precursores orgánicos (IONP-AO) como por la síntesis por microondas (MW-IONP-OA).

En ambos métodos se utilizaron las mismas cantidades de precursores e idénticas temperaturas. Respecto a los tiempos de reacción, en la síntesis por descomposición de precursores orgánicos, se dejó la muestra 30 minutos a 60 °C subiendo la temperatura a 200 °C durante 2 horas para terminar el proceso con una temperatura de 250 °C durante 30 minutos más. En la síntesis dirigida por microondas, los tiempos de reacción se redujeron a 2 minutos en el paso de reducción, 20 minutos para la

formación del complejo y 10 minutos para las etapas de nucleación y crecimiento (figura 3.3).

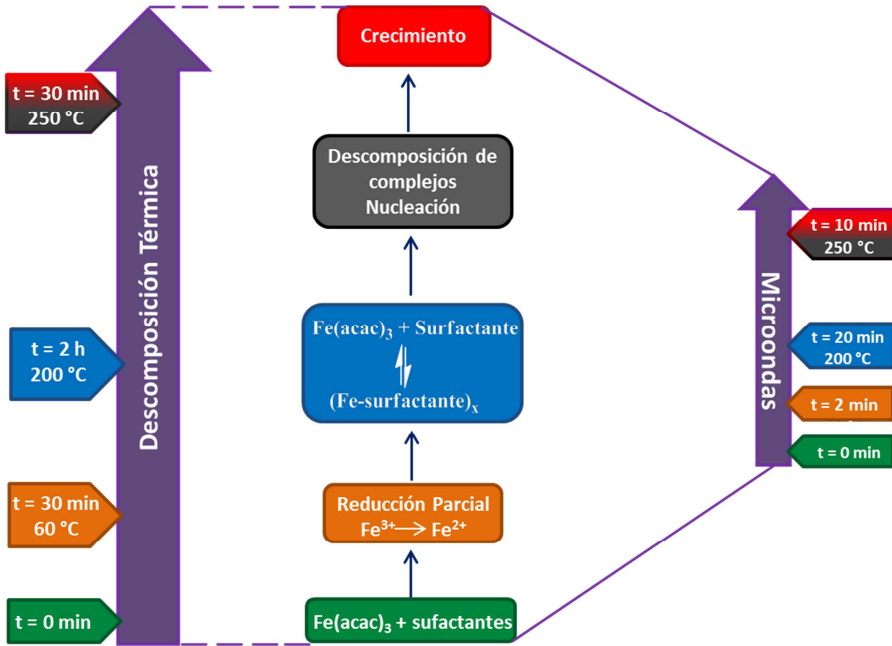


Figura 3.3. Esquema de síntesis de nanopartículas IONP-AO por descomposición térmica y por microondas.

Una vez hecha la síntesis, se caracterizaron las muestras obtenidas tanto por descomposición térmica como por microondas.

Lo primero que se comprobó fue el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas medido por DLS (Dynamic Light Scattering), véase Anexo I para más detalles. Mientras que las nanopartículas obtenidas por descomposición térmica presentaron un tamaño hidrodinámico medio de $8.1 \pm 1.8 \text{ nm}$ las nanopartículas obtenidas a través de microondas mostraron un tamaño medio de $7.5 \pm 1.2 \text{ nm}$ (figura 3.4). Estos resultados revelan pocos cambios significativos en el tamaño hidrodinámico al emplear la síntesis

dirigida por microondas. Además, también se observa una distribución de tamaños más estrecha en el caso de la síntesis por microondas, por lo que se puede deducir que este método produce unas partículas de tamaño más uniforme (figura 3.4).

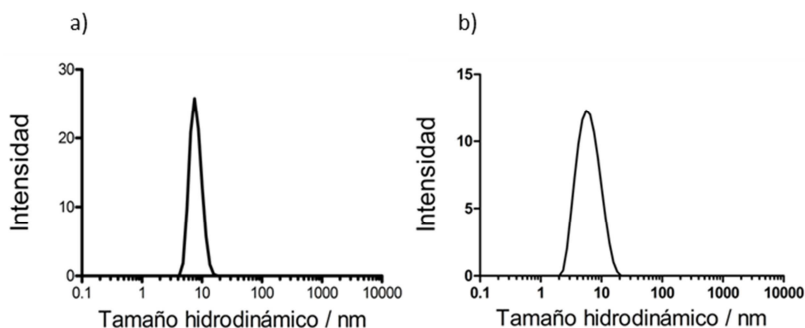


Figura 3.4. a) Tamaño hidrodinámico de las nanopartículas MW-IONP-AO y b) IONP-AO.

A continuación se realizó un estudio del tamaño del núcleo para lo cual realizamos imágenes por TEM (Transmission Electron Microscopy), véase Anexo I para más detalles. En el caso de las nanopartículas MW-IONP-AO el tamaño de núcleo, calculado como tamaño medio entre 50 partículas fue de 3.7 ± 0.8 nm mientras que en el caso de las nanopartículas IONP-AO, medidas de la misma manera, fue de 5.1 ± 0.9 nm. Al igual que en el caso del tamaño hidrodinámico, se observa un ligero descenso en el tamaño de núcleo de las nanopartículas sintetizadas con microondas sin que este sea estadísticamente significativo (figura 3.5). En ambos casos se obtuvieron núcleos bien dispersos sin signos de agregación.

Para caracterizar la composición superficial de las nanopartículas se realizaron espectros Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR), véase Anexo I para mayor detalle de la técnica.

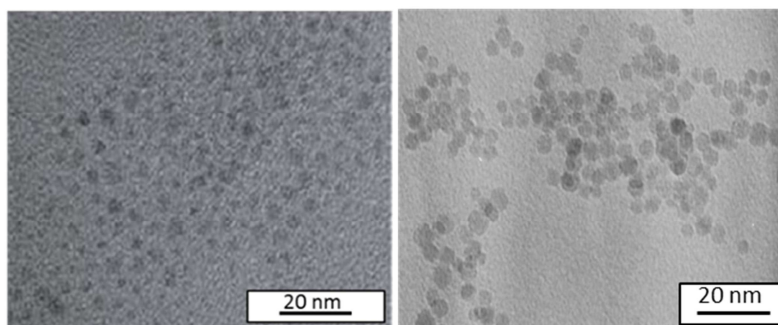


Figura 3.5. Imágenes TEM de las nanopartículas a) MW-IONP-AO y b) IONP-AO.

En ambos espectros FTIR se pueden observar las siguientes bandas características del ácido oleico (figura 3.6): las bandas correspondientes a la vibración del enlace C-H del doble enlace del ácido oleico que aparecen a 2920 cm^{-1} y 2850 cm^{-1} . Las bandas del grupo carboxilo del ácido terminal debida al movimiento de tensión $\nu(\text{C-O})$ que aparecen a 1625 cm^{-1} y 1530 cm^{-1} también están presentes en los espectros obtenidos tanto para las MW-IONP-AO como para IONP-AO. Estas bandas nos indican que el ácido carboxílico presente en el ácido oleico se encuentra coordinado con el hierro de la nanopartícula ya que si se encontrara de forma libre, aparecería la banda C=O a 1710 cm^{-1} muy característica en moléculas que contienen algún tipo de derivado carbonílico. En lugar de esta, aparecen las dos bandas anteriormente descritas que se encuentran en un rango de mayor energía que la correspondiente a un enlace sencillo C-O, indicando que el enlace que forman está entre el doble y el sencillo.¹¹ Por último, este hecho se puede corroborar a través de la banda típica de la magnetita debida al enlace Fe-O que aparece a 590 cm^{-1} y que está presente en las nanopartículas obtenidas por ambos métodos.

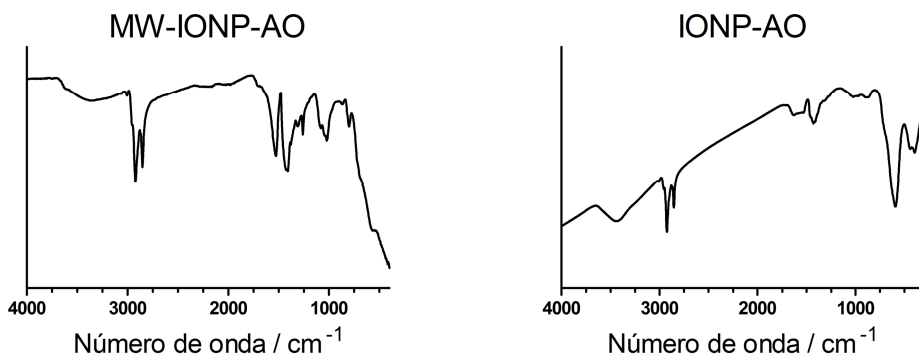


Figura 3.6. Espectros FTIR de las nanopartículas MW-IONP-AO (izq) y IONP-AO (dcha).

Comparando ambos espectros FTIR, se ve claramente cómo en el caso de la síntesis por microondas, las bandas de absorción espectrales son más intensas indicando un mayor movimiento dipolar y por tanto una mayor presencia de ácido oleico en la superficie.

Para continuar con la caracterización de la superficie de las nanopartículas se realizaron sendos TGAs (Análisis Termogravimétricos), véase anexo I para más detalle. El análisis muestra que las nanopartículas sintetizadas a través de microondas perdieron un 35 % de masa debido a la pérdida del ácido oleico frente a un 16 % para el caso de la síntesis convencional (figura 3.7). Esto indica que la cantidad de ácido oleico presente en la superficie de las nanopartículas es mayor, más del doble, en el caso de la síntesis por microondas obteniendo un mejor recubrimiento de la nanopartícula.

A continuación se evaluaron las propiedades magnéticas de ambas nanopartículas. Para ello, se realizaron medidas de magnetización en un espectrómetro de muestra vibrante (VSM), véase Anexo I para conocer más detalles de esta técnica.

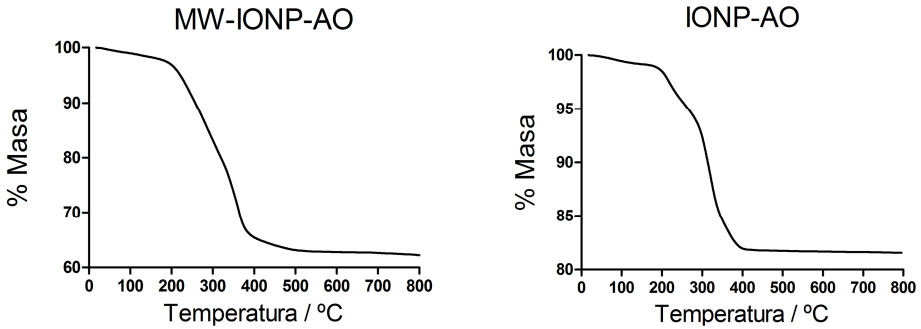


Figura 3.7. Análisis termogravimétrico de las nanopartículas MW-IONP-AO y nanopartículas IONP-AO.

Una de las características más importantes de las nanopartículas de magnetita del tamaño de nuestros sistemas es que presentan un comportamiento superparamagnético. Como se observa en la figura 3.8, ambos tipos de nanopartículas tienen un buen comportamiento superparamagnético obteniendo valores de magnetización de saturación de 79 emu/gFe en ambos casos. Sin embargo, en el caso de las nanopartículas sintetizadas por microondas se observa un comportamiento mejor, con una pendiente mayor en la curva de magnetización. La mayor pendiente en la curva de magnetización se debe a una distribución de barreras de energía muy estrecha que provoca que todas las partículas se inviertan a la vez en presencia de un campo magnético. Esta característica depende del tamaño de las partículas, de la distribución de tamaños y del orden de cristalinidad. Por tanto, el comportamiento magnético de las nanopartículas MW-IONP-AO confirma los resultados obtenidos durante los pasos previos de caracterización en los cuales se mostraba una mayor homogeneidad en el tamaño de partícula. Además, permite concluir que estas nanopartículas presentan una mejor cristalinidad que las nanopartículas obtenidas por el método de descomposición térmica.

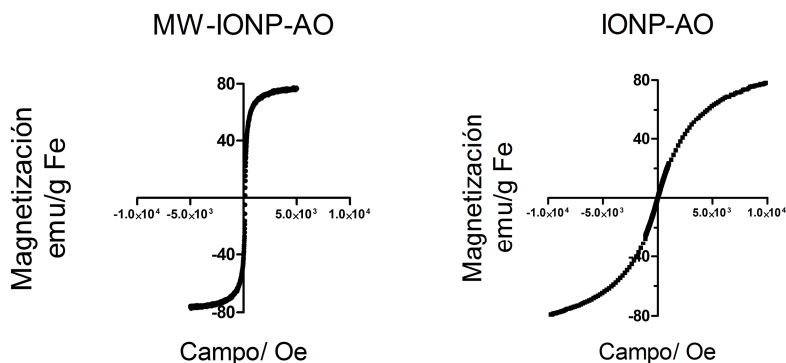


Figura 3.8. Curvas de magnetización a 280 K para a) MW-IONP-AO y b) IONP-AO.

3.3.- Conclusiones

Se ha creado un método de síntesis dirigido por microondas para la obtención de nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de ácido oleico.

Con este método se reducen considerablemente los tiempos de reacción pasando de 3 horas para el método tradicional de descomposición térmica a media hora con la nueva síntesis.

Las partículas obtenidas por esta nueva técnica han mostrado mayor homogeneidad en términos de tamaño hidrodinámico. Además, los espectros de FTIR mostraron bandas más intensas que en el caso de la descomposición térmica habitual revelando una gran presencia de ácido oleico en la superficie de la nanopartícula.

El análisis termogravimétrico confirmó una mayor presencia de ácido oleico en la superficie de las nanopartículas sintetizadas a través de microondas.

La síntesis por microondas produce nanopartículas que presentan los mismos valores de saturación de magnetización que los obtenidos a través de descomposición térmica. Además las nanopartículas sintetizadas por microondas presentaron un mejor comportamiento superparamagnético.

Aunque la hipótesis inicial de trabajo era utilizar la síntesis por microondas para obtener nanopartículas recubiertas de ácido oleico sin que se produjeran cambios en las propiedades fisicoquímicas, los resultados han revelado que esta nueva síntesis produce por regla general nanopartículas con algunas propiedades mucho mejores para las aplicaciones que se le van a dar que las obtenidas por descomposición térmica tradicional.

3.4.- Bibliografía

1. La Porta, A. *et al.* Multifunctional self-assembled composite colloids and their application to SERS detection. *Nanoscale* **7**, 10377–81 (2015).
2. Salinas, B., Ruiz-Cabello, J., Lechuga-Vieco, A. V, Benito, M. & Herranz, F. Surface-Functionalized Nanoparticles by Olefin Metathesis: A Chemoselective Approach for In Vivo Characterization of Atherosclerosis Plaque. *Chemistry* **21**, 10450–6 (2015).
3. Groult, H. *et al.* Parallel Multifunctionalization of Nanoparticles: A One-Step Modular Approach for in Vivo Imaging. *Bioconjug. Chem.* **26**, 153–160 (2015).
4. Nordmeyer, D. *et al.* Iron oxide nanoparticles stabilized with dendritic polyglycerols as selective MRI contrast agents. *Nanoscale* **6**, 9646–54 (2014).
5. Sun, S. & Zeng, H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8204–5 (2002).
6. Soares, P. I. P. *et al.* Effects of surfactants on the magnetic properties of iron oxide colloids. *J. Colloid Interface Sci.* **419**, 46–51 (2014).
7. Morales, M. P., Roca, a. G. & Serna, C. J. Synthesis of Monodispersed Magnetite Particles from Different Organometallic Precursors. in *INTERMAG 2006 - IEEE International Magnetism Conference* **42**, 555–555 (2006).
8. Roca, A. G., Morales, M. del P., O’Grady, K. & Serna, C. J. Structural and magnetic properties of uniform magnetite nanoparticles prepared by high temperature decomposition of organic precursors. *Nanotechnology* **17**, 2783–2788 (2006).
9. Kang, E. *et al.* Direct Synthesis of Highly Crystalline and Monodisperse Manganese Ferrite Nanocrystals. *J. Phys. Chem. B* **108**, 13932–13935 (2004).
10. Rao, C. N. R., Ramakrishna Matte, H. S. S., Voggu, R. & Govindaraj, A. Recent progress in the synthesis of inorganic nanoparticles. *Dalton Trans.* **41**, 5089–120 (2012).
11. Bronstein, L. M. *et al.* Influence of Iron Oleate Complex Structure on Iron Oxide Nanoparticle Formation. *Chem. Mater.* **19**, 3624–3632 (2007).

CAPÍTULO

4

Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de ácido azelaico. Síntesis convencional frente a síntesis dirigida por microondas

4.1.- Introducción

La síntesis de nanopartículas por descomposición térmica tiene muchas ventajas frente a otros métodos. Sin embargo, presenta la desventaja de que las nanopartículas obtenidas por este método solo son estables en medios hidrofóbicos. Las nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de ácido oleico, descritas en el capítulo anterior, no son una excepción y por tanto son muy estables en medios orgánicos como el CHCl_3 y el hexano. Lógicamente es necesario que este tipo de nanopartículas sean estables en medios fisiológicos para poder utilizarlas con algún fin biomédico. Existen tres métodos diferentes para conseguir nanopartículas estables en medios fisiológicos a partir de nanopartículas recubiertas de ácido oleico: formación de micelas, intercambio de ligando y funcionalización covalente.

i) Formación de micelas

Este método se basa en el uso de compuestos anfifílicos para estabilizar las nanopartículas en medios acuosos generando una micela. La parte apolar, del compuesto anfifílico, normalmente cadenas hidrocarbonadas de distinta longitud, interaccionan con las cadenas de ácido oleico por fuerzas de van der Waals quedando la parte polar expuesta al medio de dispersión acuoso estabilizando las nanopartículas en dicho medio (figura 4.1).^{1,2} Este método es rápido y además versátil ya que existen una gran cantidad de compuestos anfifílicos que pueden utilizarse para este propósito. Sin embargo, el éxito de la formación depende de muchos parámetros como son el tipo de compuesto anfifílico, su peso molecular, la longitud de la cadena hidrocarbonada o su conformación.³

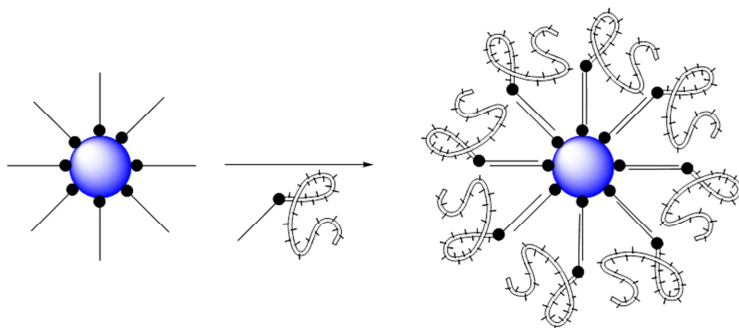


Figura 4.1. Ilustración de la formación de una micela entre una nanopartícula hidrofóbica y un compuesto anfifílico.

ii) Intercambio de ligando

Debido a su simplicidad, este ha sido uno de los métodos más empleados para transferir las nanopartículas IONP-AO a medios acuosos. El método consiste en hacer reaccionar las nanopartículas con un compuesto hidrofílico que presente una mayor afinidad hacia el núcleo de las nanopartículas y por tanto pueda sustituir al ácido oleico produciendo la estabilización en medios acuosos (figura 4.2).^{4,5} Se pueden emplear compuestos que presenten diferentes tipos de grupos funcionales para realizar el intercambio de ligando, entre ellos, los más empleados son los ácidos carboxílicos, los grupos fosfatos y los silánicos.⁶⁻⁸ Este método es muy sencillo ya que solo es necesario hacer reaccionar el ligando con las nanopartículas. Sin embargo presenta algunos inconvenientes. El más significativo es la falta de control en la unión del ligando con la superficie de manera que puede aparecer de muy distinta forma lo que se traduce en una composición superficial con alta variabilidad y, normalmente, pocos grupos funcionales accesibles para la posterior biofuncionalización.

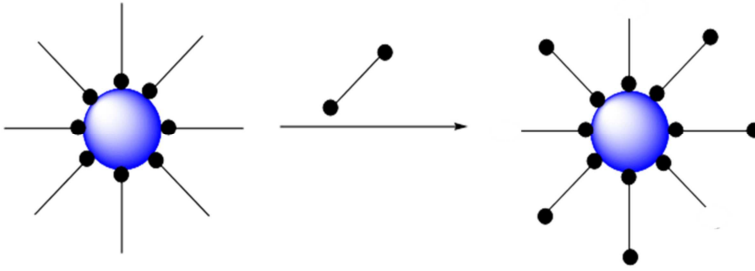


Figura 4.2. Ilustración del método de intercambio de ligando.

iii) Funcionalización covalente.

Este método es el más reciente de los tres y consiste en aprovechar la reactividad química del surfactante de la nanopartícula, en este caso, el ácido oleico (figura 4.3).^{9,10} Contrariamente al intercambio de ligando, donde se realiza una sustitución parcial del ácido oleico, o a la formación de micelas donde el surfactante es enmascarado por la micela, la funcionalización covalente permite cambiar completamente la composición de la superficie de la nanopartícula de forma selectiva y sin que en ningún momento la superficie quede “desprotegida” de la presencia de un surfactante.

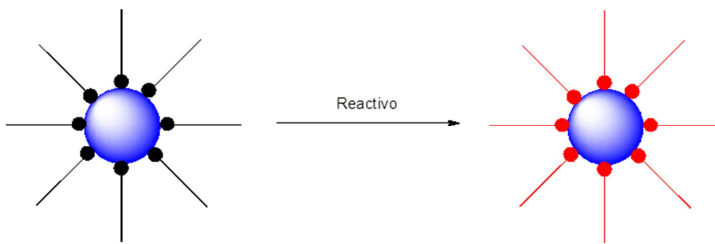
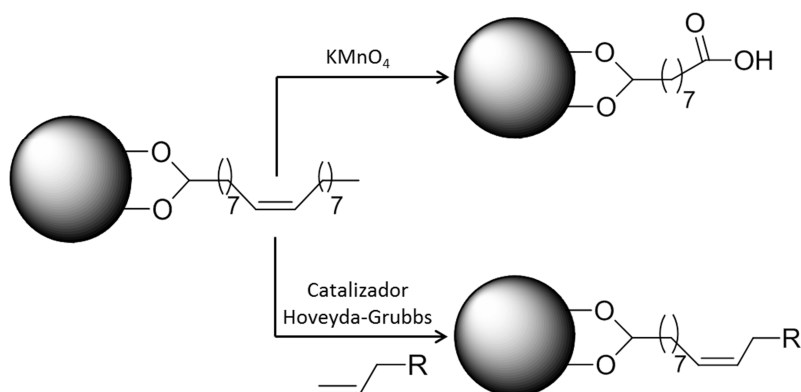


Figura 4.3. Ilustración del método de funcionalización covalente.

Por tanto, la funcionalización covalente es la aplicación de la química orgánica a la nanotecnología, en este caso concretamente, a las nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de ácido oleico. Es evidente

que previamente a la funcionalización se debe realizar un estudio de las posibilidades que ofrece la química orgánica para modificar el ácido oleico. Atendiendo a su estructura dentro de la nanopartícula parece claro que la manera más fácil de modificar la superficie de la nanopartícula es utilizando el doble enlace interno como diana de la funcionalización. Dentro de esta estrategia, nuestro grupo de investigación desarrolló dos vías diferentes para la estabilización en medio acuoso de las nanopartículas IONP-AO. La primera de ellas consistió en la oxidación del doble enlace con KMnO_4 generando ácido azelaico en la superficie de la nanopartícula. En la segunda, se utilizó una reacción de metátesis con catalizador Hoveyda-Grubbs para introducir nuevos grupos funcionales que consiguieron estabilizar las nanopartículas en medios fisiológicos (esquema 4.1).^{11,12}

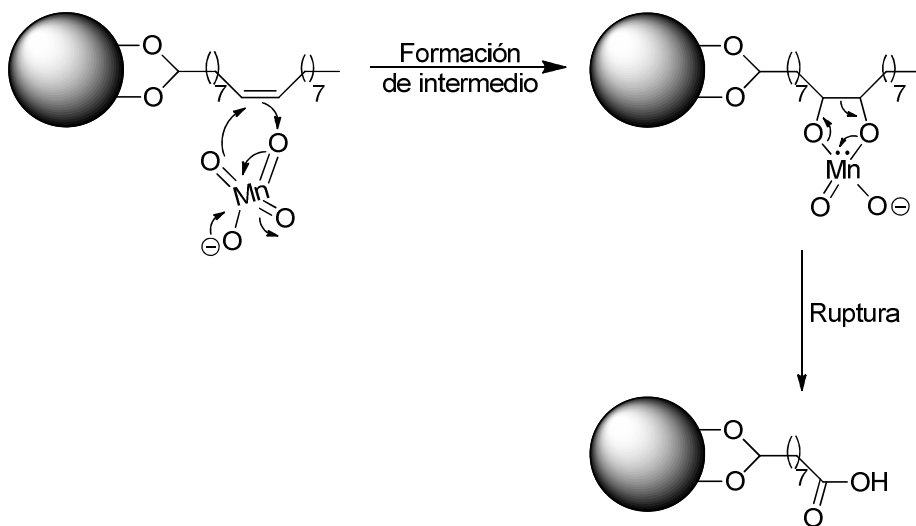


Esquema 4.1. Estrategias de funcionalización covalente de las nanopartículas IONP-AO para su estabilización en medio fisiológico.

Ambas estrategias mostraron una gran eficacia para la modificación del ácido oleico produciendo nanopartículas hidrofílicas muy estables. Sin embargo, el método de metátesis está restringido a sustratos con olefinas terminales que contengan grupos hidrófilos por lo que en muchos casos,

estos sustratos se deben sintetizar previamente aumentando el número de pasos y el tiempo global de síntesis.

El método de oxidación es un método directo que requiere de un esfuerzo sintético menor. El protocolo descrito por nuestro grupo consistía en el uso de KMnO_4 como agente oxidante produciéndose la reacción en dos pasos. En el primero el KMnO_4 produce un intermedio cíclico entre el ion permanganato y el doble enlace. Al tratarse de una reacción que transcurre en dos fases ($\text{CHCl}_3:\text{H}_2\text{O}$) se utilizó un catalizador de transferencia de fase (cloruro de trimetilbencilamonio, TMBACl) para aumentar la solubilidad del permanganato en la fase orgánica. Transcurrida la formación del intermedio de reacción se producía su ruptura en medio ácido generando el ácido carboxílico correspondiente, en este caso, el ácido azelaico (esquema 4.2).



Esquema 4.2. Mecanismo de oxidación de la olefina presente en el ácido oleico para dar ácido azelaico.

Los dos pasos dentro de la reacción necesitan unas 24 h, cuatro horas para la formación del intermedio tras lo cual se añadía tampón a pH = 2.9 y veinte horas más a 70 °C para su ruptura.¹³

Este tipo de síntesis produjo nanopartículas con buenas características fisicoquímicas y por ello se ha querido reproducir el método en este trabajo de Tesis. Además, teniendo en cuenta las características de esta síntesis, se pensó en la posibilidad de utilizar la síntesis por microondas para reducir el tiempo de reacción. Con la síntesis “convencional” el tiempo de reacción es de 24 h; como se ha mostrado en el capítulo anterior, la síntesis por microondas puede reducir estos tiempos de forma considerable haciendo que la estabilización en agua de las nanopartículas IONP-AO se produzca en un tiempo mucho menor.¹⁴

Con todo lo mencionado hasta este punto, la hipótesis de trabajo es consecuente con el trabajo novedoso propuesto en esta tesis. *“La síntesis por microondas permitirá realizar la oxidación del doble enlace del ácido oleico para transferir las nanopartículas a medio acuoso en un tiempo más corto que la síntesis convencional sin que las características de las nanopartículas se vean significativamente afectadas.”*

4.2.- Resultados y discusión

Para realizar la síntesis de las nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de ácido azelaico a través de microondas (MW-IONP-AA) se dividió el proceso de síntesis en dos etapas. La primera, para formar el intermedio de reacción con el KMnO_4 , se realizó en un tiempo de nueve minutos a 105 °C. Transcurrido este tiempo se añadió una disolución tampón

a pH = 2.9 para producir la ruptura del intermedio, tras lo cual se produjo una segunda etapa de reacción en las mismas condiciones que la primera. Finalizada esta segunda etapa de síntesis, se pudo observar cómo las nanopartículas eran ahora estables en fase acuosa lo que permite tener una idea preliminar y cualitativa de que la reacción se está produciendo en tan solo 20 minutos.

Una vez purificada la muestra, empleando el mismo protocolo descrito en la síntesis clásica, se procedió con la caracterización de las propiedades fisicoquímicas. Las nanopartículas MW-IONP-AA tenían un tamaño hidrodinámico de 30 ± 5 nm, presentando por tanto una distribución estrecha de tamaños. Las nanopartículas obtenidas por el método anterior presentaron un tamaño hidrodinámico similar de 37 ± 4 nm (figura 4.4).

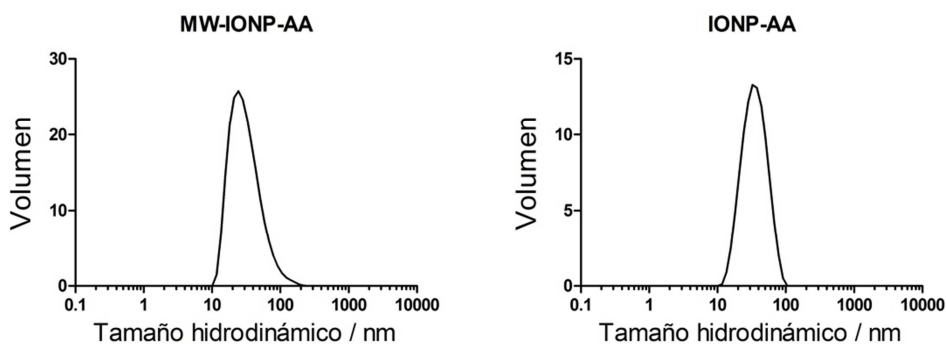


Figura 4.4. Curvas de tamaño hidrodinámico de las nanopartículas MW-IONP-AA (izqda.) y IONP-AA (dcha.).

El uso de las microondas trajo además una nueva propiedad esencial, la alta reproducibilidad de la síntesis. En un ensayo para comprobarla, las muestras resultantes de cuatro repeticiones de síntesis presentaron prácticamente el mismo tamaño hidrodinámico (media y SD) (figura 4.5).

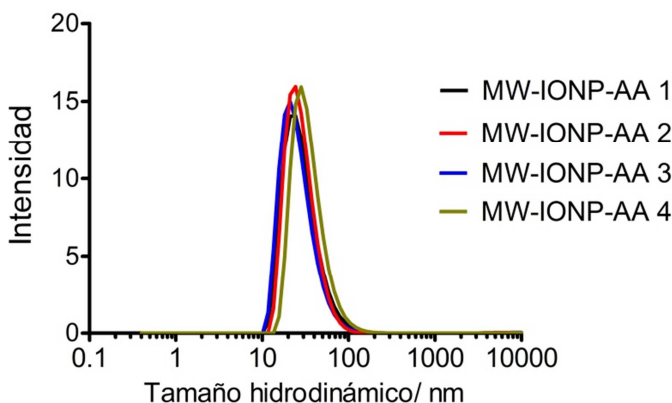


Figura 4.5 Curvas de tamaño hidrodinámico de cuatro síntesis diferentes de nanopartículas MW-IONP-AA.

A continuación, se realizó la evaluación del tamaño del núcleo de ambas nanopartículas a partir de las imágenes adquiridas por el TEM (figura 4.6). Las nanopartículas MW-IONP-AA presentaron un tamaño de núcleo de 4.9 ± 0.9 nm, calculado como la media entre los valores obtenidos para el tamaño de cincuenta partículas, mientras que en el caso de las nanopartículas IONP-AA el valor fue de 5.9 ± 0.7 nm. Es decir, un tamaño de núcleo ligeramente mayor en el caso de las nanopartículas obtenidas por el método térmico. Estos tamaños de núcleo tienen sentido ya que son muy similares a los resultados obtenidos para las nanopartículas precursoras, MW-IONP-AO y IONP-AO. Además, la estabilidad coloidal de ambas muestras era buena, presentando el mismo tamaño hidrodinámico días después de su síntesis.

Para evaluar la composición superficial de las nanopartículas, se realizaron sendos espectros FTIR. En ambos casos el resultado fue el mismo (figura 4.7).

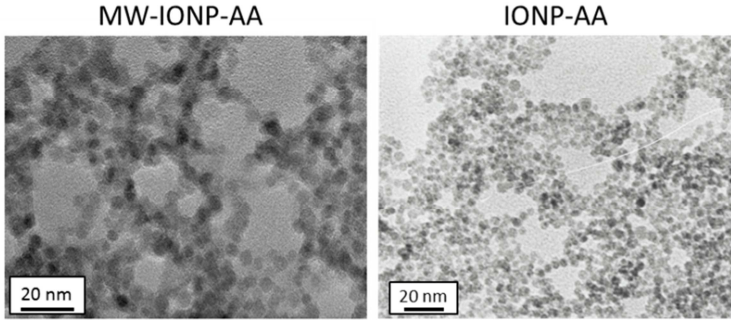


Figura 4.6 Imágenes TEM de las nanopartículas MW-IONP-AA y IONP-AA.

El mayor cambio en los espectros FTIR de las nanopartículas precursoras recubiertas de ácido oleico y las nanopartículas modificadas corresponde a la desaparición de las bandas a 2920 cm^{-1} y 2850 cm^{-1} asociadas a la vibración C-H del doble enlace características en el ácido oleico. Además, aparecen otras bandas a 984 cm^{-1} , 1036 cm^{-1} , 1126 cm^{-1} y 1192 cm^{-1} , las cuales, corresponden a la presencia de ácido azelaico en la superficie de las nuevas nanopartículas.¹⁵ Por último, la presencia de las bandas a 560 cm^{-1} y 640 cm^{-1} debidas al enlace Fe-O son seguramente consecuencia de una ligera transformación de magnetita a maghemita debido a la fuerte oxidación de la reacción.

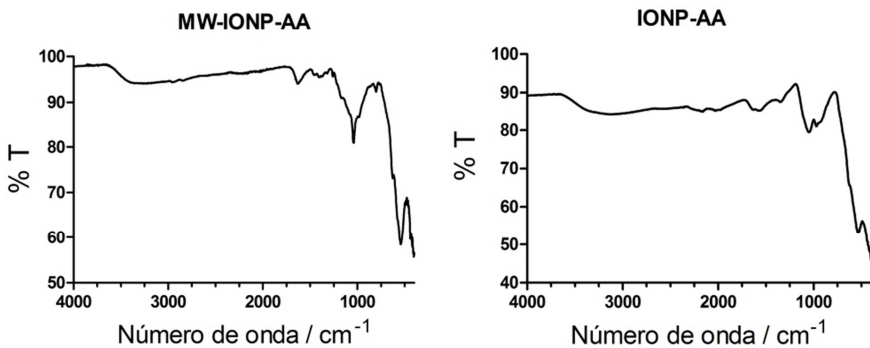


Figura 4.7 Espectros FTIR de las nanopartículas MW-IONP-AA y IONP-AA.

La pérdida de masa debida a la capa superficial fue del 13 % aproximadamente en las partículas sintetizadas por microondas, mientras que en la síntesis convencional se perdió entorno a un 7 %, resultando en un mayor contenido de H₂O (figura 4.8). Estos prácticamente idénticos resultados son los esperados por la similitud de tamaño de núcleo y radio hidrodinámico de ambas muestras.

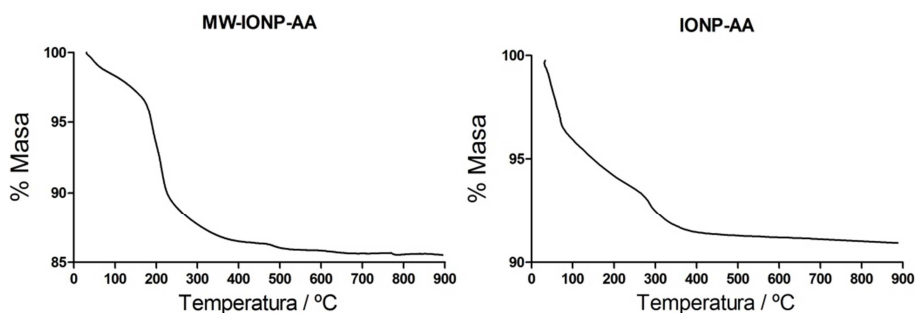


Figura 4.8 Análisis termogravimétrico de las nanopartículas MW-IONP-AA y nanopartículas IONP-AA.

Respecto a las propiedades magnéticas, la muestra sintetizada a través de microondas presentó una saturación de magnetización de 63 emu/gFe mientras que la síntesis clásica produjo nanopartículas con un valor de saturación de 74 emu/gFe (figura 4.9). En ambos casos, el valor es más bajo que el que presentaban las nanopartículas precursoras recubiertas de ácido oleico (79 emu/gFe). Este descenso se debe a la oxidación parcial que se produce en el núcleo de la nanopartícula y que provoca que una fracción de magnetita se oxide a maghemita. Al igual de lo que se vio en el capítulo anterior, la susceptibilidad magnética de las nanopartículas sintetizadas por microondas es mayor que en la síntesis normal aunque en este caso, las nanopartículas sintetizadas por el método convencional presentan un valor de saturación de magnetización mayor.

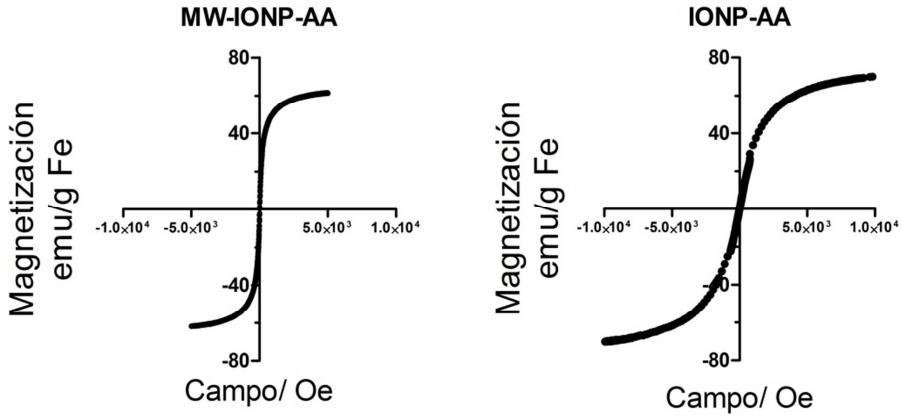


Figura 4.9 Curvas de magnetización a 280 K para las nanopartículas MW-IONP-AO y IONP-AO.

En cuanto a las propiedades relaxométricas, las nanopartículas obtenidas por microondas poseían una relaxividad longitudinal (r_1) de $15.2 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ y una relaxividad transversal (r_2) de $90.7 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ (figura 4.10). A su vez, las nanopartículas IONP-AA presentaron un valor de r_1 de $3.9 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ y un r_2 de $105.2 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Estos altos valores de r_2 obtenidos permitieron concluir que ambos tipos de nanopartículas pueden ser utilizadas como agentes de contraste T_2 , o contraste de realce negativo.¹⁶

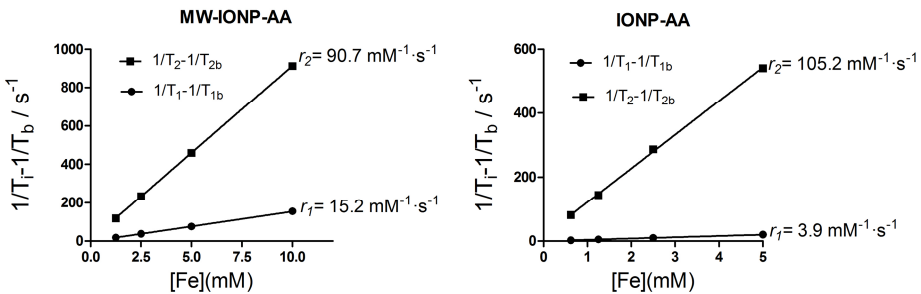


Figura 4.10 Representación de los tiempos de relajación T_1 y T_2 (s^{-1}) frente a concentración de Fe (mM) para MW-IONP-AA y IONP-AA.

4.3.- Conclusiones

La síntesis por microondas ha permitido la estabilización en medios acuosos de las nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de ácido oleico.

A través del uso del microondas se ha conseguido disminuir el tiempo de reacción desde 24 horas hasta 20 minutos.

El método es muy reproducible como muestran los tamaños hidrodinámicos obtenidos tras varias repeticiones de la síntesis.

Las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas obtenidas por microondas son muy similares a las obtenidas por vía tradicional. Tanto los tamaños hidrodinámicos como los tamaños del núcleo de ambos tipos de nanopartículas eran los que se esperaban.

El proceso de oxidación con KMnO_4 provoca que el núcleo de las nanopartículas se oxide, de forma parcial, de magnetita a maghemita, siendo esta oxidación más acusada en las nanopartículas obtenidas por microondas.

Las medidas de magnetización revelaron un buen comportamiento superparamagnético en ambos casos. Además, la evaluación de las propiedades relaxométricas de las muestras reveló que se podrán usar como agentes de contraste negativo.

4.4.- Bibliografía

1. Jain, T. K., Morales, M. a., Sahoo, S. K., Leslie-Pelecky, D. L. & Labhassetwar, V. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. *Mol. Pharm.* **2**, 194–205 (2005).
2. Yu, W. W., Chang, E., Sayes, C. M., Drezek, R. & Colvin, V. L. Aqueous dispersion of monodisperse magnetic iron oxide nanocrystals through phase transfer. *Nanotechnology* **17**, 4483–4487 (2006).
3. Kim, B.-S., Qiu, J.-M., Wang, J.-P. & Taton, T. A. Magnetomicelles: composite nanostructures from magnetic nanoparticles and cross-linked amphiphilic block copolymers. *Nano Lett.* **5**, 1987–91 (2005).
4. Bloemen, M. *et al.* Improved functionalization of oleic acid-coated iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *J. Nanopart. Res.* **14**, 1100 (2012).
5. Amstad, E., Textor, M. & Reimhult, E. Stabilization and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Nanoscale* **3**, 2819–2843 (2011).
6. Mejías, R. *et al.* Liver and brain imaging through dimercaptosuccinic acid-coated iron oxide nanoparticles. *Nanomedicine* **5**, 397–408 (2010).
7. Karimi, A. *et al.* In vitro and in vivo evaluation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated by bisphosphonates: The effects of electrical charge and molecule length. *Eur. J. Pharm. Sci.* **49**, 101–108 (2013).
8. De Palma, R. *et al.* Silane ligand exchange to make hydrophobic superparamagnetic nanoparticles water-dispersible. *Chem. Mater.* **19**, 1821–1831 (2007).
9. Herranz, F. *et al.* Superparamagnetic Nanoparticles for Atherosclerosis Imaging. *Nanomaterials* **4**, 408–438 (2014).
10. Wang, M., Peng, M.-L., Cheng, W., Cui, Y.-L. & Chen, C. A novel approach for transferring oleic acid capped Iron Oxide Nanoparticles to water phase. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **11**, 3688–3691 (2011).
11. Salinas, B., Ruiz-cabello, J., Lechuga-vieco, A. V, Benito, M. & Herranz, F. Surface-Functionalized Nanoparticles by Olefin Metathesis: A Chemoselective Approach for In Vivo Characterization of Atherosclerosis Plaque. *Chem. - A Eur. J.* **21**, 10450–10456 (2015).
12. Herranz, F., Morales, M. P., Roca, A. G., Vilar, R. & Ruiz-Cabello, J. A new method for the aqueous functionalization of superparamagnetic Fe₂O₃ nanoparticles. *Contrast Media Mol. Imaging* **3**, 215–22

13. Herranz, F., Morales, M. P., Roca, A. G., Desco, M. & Ruiz-Cabello, J. A New Method for the Rapid Synthesis of Water Stable Superparamagnetic Nanoparticles. *Chem. - A Eur. J.* **14**, 9126–9130 (2008).
14. Pellico, J. *et al.* Microwave-driven synthesis of bisphosphonate nanoparticles allows in vivo visualisation of atherosclerotic plaque. *RSC Adv.* **5**, 1661–1665 (2015).
15. Hung, H. M. & Ariya, P. Oxidation of oleic acid and oleic acid/sodium chloride(aq) mixture droplets with ozone: Changes of hygroscopicity and role of secondary reactions. *J. Phys. Chem. A* **111**, 620–632 (2007).
16. Vuong, Q. L., Berret, J. F., Fresnais, J., Gossuin, Y. & Sandre, O. A universal scaling law to predict the efficiency of magnetic nanoparticles as MRI T2-contrast agents. *Adv. Healthc. Mater.* **1**, 502–512 (2012).

CAPÍTULO

5

Síntesis por microondas de nanopartículas PET/MRI de óxido de hierro recubiertas de dextrano dopadas con ^{68}Ga .

5.1.- Introducción

Dentro de la nanotecnología, uno de los aspectos más interesantes es la posibilidad de emplear sondas multimodales, es decir, que proporcionen señal en más de una técnica de imagen.^{1,2} Teniendo en cuenta las distintas posibilidades, como se comentaba en la Introducción, la combinación PET/MRI es una de las que ofrece mayores ventajas.

Hay dos aspectos clave a la hora de diseñar sondas duales PET/MRI nanoparticuladas. El primero es el tipo de nanomaterial a utilizar junto a la elección del radioisótopo que pueda ser detectado en la PET. El segundo es la forma en la cual el radioisótopo se une a la nanopartícula. En este trabajo se ha utilizado como material de partida nanopartículas de óxido de hierro junto con ^{68}Ga como radioisótopo PET.

El ^{68}Ga presenta un tiempo de vida media relativamente corto como se mencionaba en la Introducción ($t_{1/2} = 67.8$ min). Esto hace que la tasa de radiactividad que recibe el paciente sea baja, algo esencial en todas las aplicaciones diagnósticas de la medicina nuclear. Además, este tiempo se ajusta muy bien al tiempo de biodistribución de muchos péptidos lo cual lo hace atractivo para su conjugación.^{3,4} Otra característica importante y positiva del ^{68}Ga es su producción a través de un generador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ de forma muy sencilla, evitando así la necesidad de un ciclotrón, que requiere grandes instalaciones, para la obtención del radioisótopo.

Respecto al tipo de nanomaterial usado, se han elegido las nanopartículas de óxido de hierro, cómo se ha descrito con anterioridad, este tipo de nanopartículas son comúnmente utilizadas como agente de contraste para MRI con realce T_2 produciendo un oscurecimiento de las zonas donde se acumulan. Este tipo de contraste negativo, es en muchos

casos difícil de detectar principalmente por la presencia en muchas ocasiones de señales de similares características y artefactos. También es prácticamente imposible visualizar por MRI convencional (basada en la cantidad de agua del tejido) órganos como los pulmones, que presentan una intensidad de señal baja de forma natural debido a que su contenido es mayoritariamente aire. Estos problemas, siempre a tener en cuenta en la aplicación de los agentes de contraste negativos, pueden ser solventados haciendo en lo posible que alternativamente produzcan contraste de realce T_1 , denominado contraste positivo, resultando en una señal brillante allí donde se acumulan las nanopartículas.^{5,6} El tipo de contraste que producen las sondas para MRI viene determinado por los valores de relaxividad que presenten. Para obtener un contraste positivo la relación r_2/r_1 debe ser lo más pequeña posible (ver la Introducción de esta Tesis). Es obvio que esto se puede lograr a través de dos estrategias diferentes: la primera preparar nanopartículas con un valor pequeño de r_2 y, la segunda, obtener nanopartículas con valores grandes de r_1 . En este escenario, los valores de este cociente son parecidos o incluso superiores a los del Gd que son los comúnmente usados para contraste positivo en MRI.^{7,8}

Aunque existen ejemplos de síntesis de nanopartículas de óxido de hierro con núcleo de tamaño muy pequeño que dan contraste positivo, todos se basan en síntesis hidrotermales. Los tiempos de reacción descritos en la síntesis de estas nanopartículas oscilan entre tres y veinticuatro horas, haciendo que este tipo de aproximación sea inviable si se quiere añadir un radioisótopo de vida media corto como es el ^{68}Ga . Una alternativa (*vide supra*) para reducir los tiempos de reacción es la síntesis a través de microondas.^{9,10} El calentamiento por microondas reduce considerablemente

los tiempos de reacción a la vez que aumenta la reproducibilidad de la síntesis por lo que ha sido el método elegido para la obtención de nanopartículas de óxido de hierro con contraste positivo.

Llegados a este punto y una vez seleccionados el tipo de agente de contraste para MRI y el tipo de radioisótopo PET, todavía queda el segundo aspecto clave a resolver; la unión del agente de contraste al radioisótopo. Existen dos posibilidades a la hora de introducir ^{68}Ga en una nanopartícula de óxido de hierro. La primera consiste en unir un agente quelante a la superficie de la nanopartícula para que forme posteriormente un complejo con el radioisótopo. La segunda posibilidad se basa en el dopaje del núcleo de la nanopartícula con el isótopo radiactivo.

Como se ha descrito en la Introducción, la unión de agentes quelantes tipo DOTA o NOTA, en la superficie de la nanopartícula es a fecha de hoy la aproximación más empleada.¹¹⁻¹³ Una variante de esta, es la adsorción pasiva del radioisótopo en la nanopartícula.¹⁴⁻¹⁶ Aunque este tipo de aproximaciones son relativamente sencillas, dado que tanto la química de los óxidos de hierro como la de los complejos metálicos está bien asentada, presentan algunos inconvenientes; existe siempre el riesgo de transmetalación entre el radioisótopo quelado y algunos de los cationes metálicos presentes en el organismo. Además, este tipo de protocolos requieren muchos pasos, habitualmente lentos y con rendimientos de marcaje bajos.

Dopar el núcleo con el radioisótopo a la vez que se forma la partícula, es una ruta alternativa que soluciona todos los inconvenientes anteriormente mencionados. Solo existe un ejemplo en la literatura de nanopartículas de Fe_3O_4 dopadas con un radioisótopo PET en el núcleo.¹⁷ En

este trabajo se usó un radioisótopo de vida media relativamente larga como es el ^{64}Cu ($t_{1/2} = 12.7$ h) para dopar nanopartículas de magnetita recubiertas con dextrano. A pesar de todo, los rendimientos de marcaje descritos en este trabajo eran bajos ($\sim 30\%$) y no se mostró ningún experimento de imagen. No nos consta ningún ejemplo en el cual se utilice un isótopo de vida corta como el ^{68}Ga para dopar el núcleo de nanopartículas de óxido de hierro debido, entre otras cosas, a la necesidad de nuevos protocolos que puedan introducir de forma reproducible y rápida el radiotrazador en las nanopartículas. Esto ha llevado a la motivación principal del desarrollo de este trabajo. Teniendo en cuenta la carencia de procedimientos suficientemente rápidos y todo lo que conlleva, hacemos la siguiente hipótesis de trabajo inicial, la cual se tratará de demostrar a lo largo de este capítulo:

“La síntesis por microondas de nanopartículas de óxido de hierro, conteniendo como surfactante dextrano de bajo peso molecular, será capaz de proporcionar nanopartículas de pequeño tamaño que produzcan contraste positivo en MRI. Además, la adición de una disolución de $^{68}\text{GaCl}_3$ en los materiales de partida, facilitará la inserción de átomos de ^{68}Ga en la estructura cristalina del núcleo de la nanopartícula en un tiempo reducido consiguiéndose nanopartículas duales PET/MRI(T_1).”

5.2.- Resultados y discusión

5.2.1.- Síntesis de nanopartículas Fe_3O_4 - Dextrano (IONP-DEXT)

El primer paso que se dio para tratar de comprobar la hipótesis planteada fue la síntesis fría de la nanopartículas de óxido de hierro con dextrano utilizando radiación de microondas. Para ello, se empleó una mezcla de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, dextrano (6KDa) e hidracina monohidrato en agua. La mezcla se

calentó en 54 segundos de microondas hasta alcanzar 100 °C y se mantuvo a esa temperatura durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo la mezcla se sometió a dos pasos de purificación, el primero, a través de una columna de exclusión de tamaños. Este tipo de columnas de exclusión de tamaños (PD-10 desalting column) están empaquetadas con una matriz polimérica que provoca que los compuestos más grandes pasen más rápido a través de ella que los de menor tamaño, debido a que estos tienen que recorrer un camino más largo (figura 5.1a). Por lo tanto, con este proceso conseguimos separar las nanopartículas del material de partida que no reaccionó: FeCl_3 e hidracina. Sin embargo, dado que el tamaño medio del dextrano usado es 6KDa, puede coeluir con las nanopartículas, quedando polímero presente en la suspensión resultante. Para eliminar este exceso de dextrano, la muestra fue sometida a un segundo paso de purificación basado en la ultrafiltración. Este proceso consiste en pasar la muestra por un filtro que presenta una membrana con un tamaño de poro determinado, la cual, una vez sometida la muestra a centrifugación, permite tamizar los compuestos que presenten un tamaño molecular menor al del poro (figura 5.1b). Así pues, en nuestro caso añadimos la muestra a un filtro 30K permitiendo el paso del dextrano 6KDa y reteniendo las nanopartículas completamente purificadas. Este procedimiento también puede ser utilizado con el objetivo de concentrar las muestras.

Una vez obtenidas las nanopartículas, procedimos a la completa caracterización fisicoquímica de las mismas. Lo primero que se hizo, fue medir el tamaño hidrodinámico mediante DLS. Para conseguir nanopartículas de buena calidad, se requiere una distribución de tamaños estrecha, es decir, que el tamaño hidrodinámico medio de la muestra sea homogéneo. Si esto

no ocurre, habrá distintas poblaciones de nanopartículas con diferentes tamaños dentro de una misma muestra, desencadenando diferentes comportamientos farmacocinéticos y fisicoquímicos en estudios de imagen *in vivo*, que es en sí mismo, la aplicación última de su síntesis.

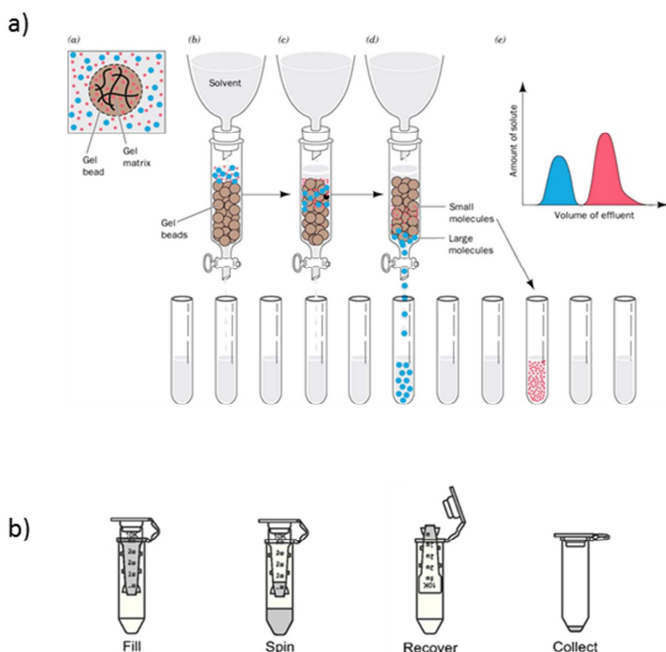


Figura 5.1. a) Purificación por exclusión de tamaños, b) Ultrafiltración.

Estas nanopartículas, que llamamos IONP-DEXT, presentan un tamaño hidrodinámico de 18.2 ± 1.5 nm, por lo que se encuentran en el rango de USPIO ($R_H < 50$ nm, figura 5.2a). Para evaluar la reproducibilidad del método, se realizó la síntesis y medida de cuatro muestras de manera secuencial. Como se muestra en la figura 5.2b, no se observan variaciones significativas en las curvas, obteniéndose en todas las muestras casi idéntico tamaño revelando una excelente reproducibilidad del método.

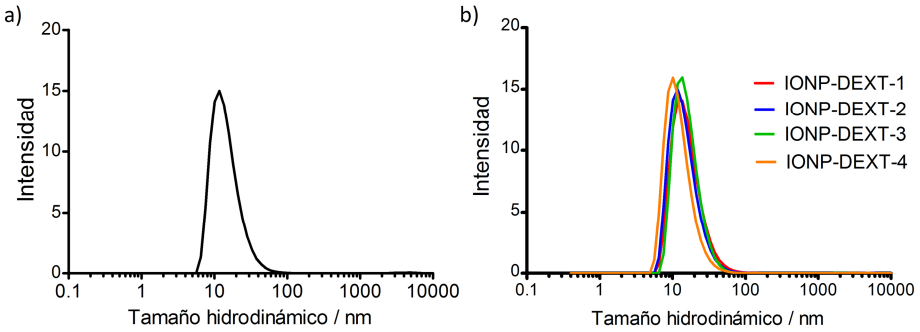


Figura 5.2. Tamaño hidrodinámico (DLS) de a) IONP-DEXT b) 4 repeticiones de IONP-DEXT.

Otra característica importante es el tamaño de núcleo de la nanopartícula. Para conseguir que las nanopartículas IONP-DEXT produzcan contraste positivo, la síntesis debe permitir obtener tamaños de núcleo pequeños que oscilen entre los 2 nm y 3 nm. De acuerdo con las imágenes obtenidas por TEM, las nanopartículas IONP-DEXT presentan un tamaño de núcleo de 2.1 ± 0.2 nm (figura 5.3), calculado como valor medio entre 50 nanopartículas.

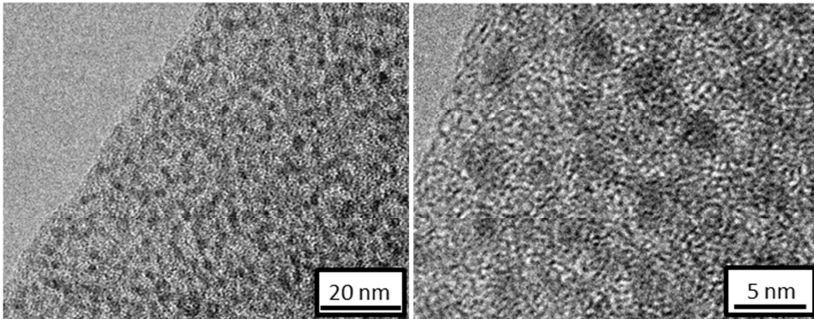


Figura 5.3. Imágenes TEM de las nanopartículas IONP-DEXT a dos magnitudes diferentes.

Aunque el espectro de Difracción de Rayos X (DRX), véase Anexo I para más detalles, no se define bien, debido al tamaño tan pequeño de núcleo, se obtuvo un tamaño de núcleo promedio de 2.6 nm (figura 5.4). Por

lo tanto, respecto al núcleo, estamos alcanzando las expectativas presentadas en nuestra hipótesis inicial de trabajo.

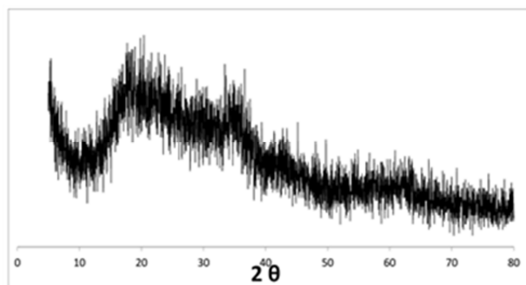


Figura 5.4. Espectro DRX de las nanopartículas IONP-DEXT

Las bandas típicas del espectro FTIR son características de la presencia del dextrano en la superficie, $\nu(\text{OH})$ 3400 cm^{-1} , $\nu(\text{C-H})$ 2930 cm^{-1} , $\delta(\text{H-O-H})$ 1640 cm^{-1} , $\delta(\text{C-H})$ 1450 y $13:5\text{ cm}^{-1}$, $\delta(\text{O-H})$ 1420 cm^{-1} y la banda más característica $\nu(\text{C-O})$ y $\nu(\text{C-C})$ a 1000 cm^{-1} (Figura 5.5a). Además, la presencia de una banda a 590 cm^{-1} confirma la presencia de óxido de hierro, siendo esta la banda más característica de estos materiales. El análisis termogravimétrico permitió elucidar el contenido de dextrano que recubre la partícula. Teniendo en cuenta que la primera pérdida de masa a 100 °C es debida al agua y que a 300 °C hubo una pérdida de masa de casi el 80%, correspondiente con la pérdida de dextrano, se puede asegurar que la nanopartícula presenta un alto contenido del mismo en la superficie (figura 5.5b). Este hecho corrobora la excelente estabilidad coloidal de estas nanopartículas además de explicar el mayor tamaño hidrodinámico (18.2 nm) comparado con el tamaño de núcleo (2.1 nm).

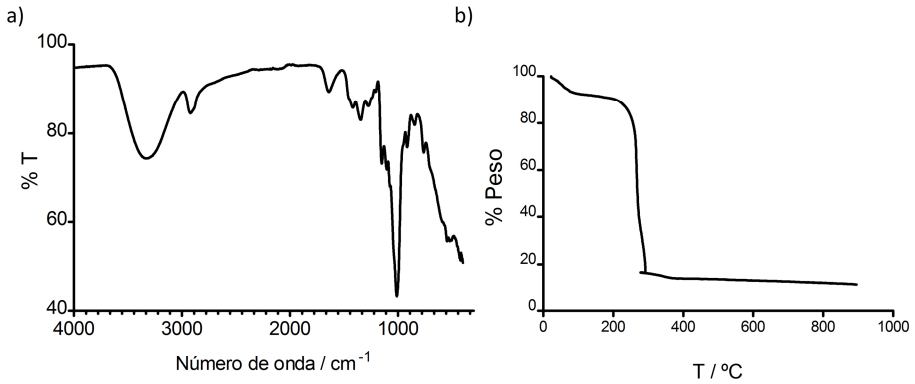


Figura 5.5. a) Espectro FTIR de IONP-DEXT, b) Curva análisis termogravimétrico de IONP-DEXT.

Debido a que las propiedades magnéticas de las nanopartículas IONP-DEXT son dependientes del tamaño del núcleo cristalino de la nanopartícula, se puede predecir un valor bajo de saturación de magnetización para nanopartículas con un núcleo tan pequeño. El comportamiento superparamagnético de la muestra, analizado en un dispositivo superconductor de interferencia cuántica (SQUID) descrito en el Anexo I, reveló un momento magnético de 17.2 emu/g Fe (figura 5.6).

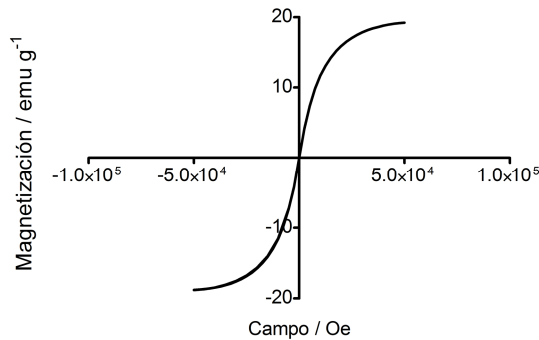


Figura 5.6. Curva de magnetización de las nanopartículas IONP-DEXT a 298 K.

Este valor es bajo si lo comparamos con aquellos obtenidos para nanopartículas de óxido de hierro comúnmente usadas como agentes de contraste negativo, T_2 , característica que se requiere para poder obtener

contraste positivo, T_1 .¹⁸ Los valores de r_1 y r_2 , medidos en un relaxómetro de 1.5 T a 37 °C, fueron $25.7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para r_2 y $6.5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para r_1 (figura 5.7). Estos resultados dan un valor de cociente r_2/r_1 de 3.9, suficiente para que las partículas IONP-DEXT produzcan contraste positivo.

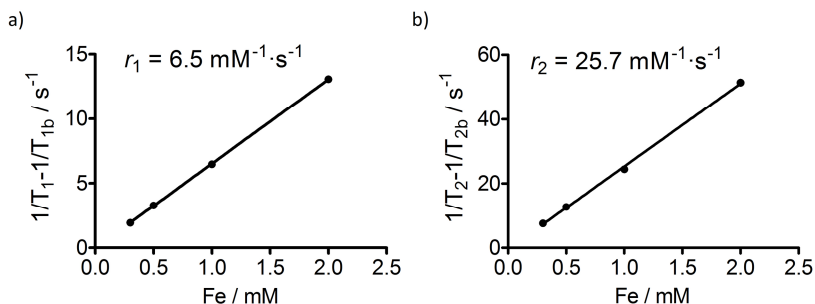


Figura 5.7. a) Curva velocidad de relajación longitudinal, T_1 , frente a concentración de hierro, b) Curva velocidad de relajación transversal, T_2 , frente a concentración de hierro.

El valor elevado de r_1 de las nanopartículas IONP-DEXT es atribuible al tamaño tan pequeño de núcleo magnético que deja un gran número de iones Fe^{3+} , cada uno con 5 electrones desapareados, en la superficie de la nanopartícula.

Por último, se comprobó la capacidad de estas nanopartículas como agente de contraste positivo para MRI. Para ello, se adquirieron imágenes de referencia con nanopartículas IONP-DEXT a diferentes concentraciones de hierro.

Después de realizar una secuencia potenciada en T_1 , se obtuvo un gran contraste positivo que incrementaba con la concentración de hierro (figura 5.8).

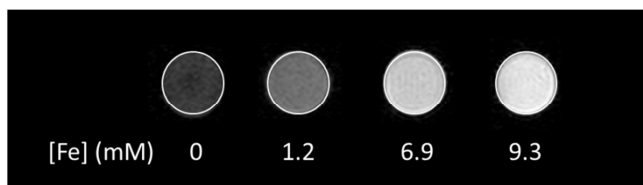


Figura 5.8. Imágenes de MRI potenciadas en T_1 con diferentes muestras de IONP-DEXT a diferentes concentraciones.

5.2.2.- Síntesis de nanopartículas duales ^{68}Ga - IONP-DEXT

En este caso, se repitió el procedimiento de síntesis pero añadiendo 74 MBq de ^{68}Ga provenientes del eluido de un generador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. El eluido se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante en HCl 0.05M. Esta muestra fue mezclada directamente con los materiales de partida llevándose a cabo la reacción en el microondas con las mismas condiciones que en el caso anterior. Una vez transcurrida la reacción, se realizaron los dos procesos de purificación anteriormente descritos. En este caso, la purificación por exclusión de tamaños además de eliminar el FeCl_3 y la hidracina en exceso, también elimina el ^{68}Ga libre que no se haya incorporado en las partículas. De hecho, ahora puede realizarse un perfil de elución fácilmente midiendo la actividad presente en cada una de las fracciones recogidas. En este caso se pudo observar un pico principal de radiactividad correspondiente a las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-DEXT, seguido inmediatamente de un pequeño pico correspondiente al ^{68}Ga libre (figura 5.9a). Una vez purificada la muestra, se realizó un control de calidad por HPLC, el cual, lleva acoplado un detector de radiactividad. La columna utilizada para el control de calidad está basada también en la exclusión de tamaños. Observando el cromatograma (figura 5.9b), se puede concluir que la muestra no contiene ^{68}Ga libre tras su purificación, ya que este (línea verde), no se

eluye durante el tiempo de barrido. Además, toda la señal de radiactividad es atribuible a las nanopartículas porque existe el mismo perfil cromatográfico tanto en el canal UV/Vis (absorción de Fe) como en el canal de radiactividad (señal del ^{68}Ga).

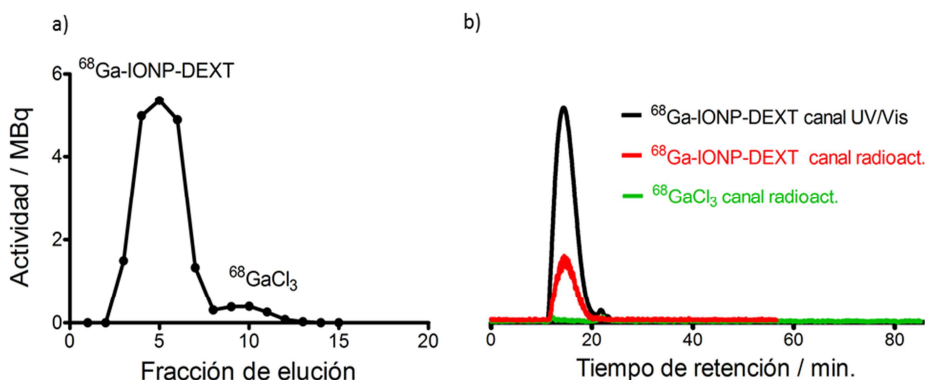


Figura 5.9. a) Perfil de elución de la cromatografía por exclusión de tamaños, b) Cromatograma HPLC para ^{68}Ga -IONP-DEXT en el canal UV/Vis a 380 nm (línea negra) y canal de radiactividad (línea roja) comparado con ^{68}Ga libre (línea verde).

Hay que tener en cuenta que el tiempo para realizar el protocolo completo de purificación es de 10 minutos por lo que se facilita, 1) que no se pierda actividad, 2) se consiga la completa eliminación de productos sin reaccionar, como por ejemplo ^{68}Ga libre, asegurandonos que no haya toxicidad en las nanopartículas y 3) dado que se recupera casi toda la radiactividad podemos garantizar que se pueda alcanzar toda la sensibilidad de las técnicas de imagen posteriormente.

Una vez que la muestra pasa el control de calidad, se calcula el rendimiento de marcaje de la reacción, obteniéndose una media del 93.5% (decaimiento corregido) para cinco experimentos diferentes realizados con idéntico protocolo. Este valor excepcional de rendimiento de marcaje es muy

superior a los que se habían conseguido hasta ahora utilizando aproximaciones similares e isótopos de mayor tiempo de desintegración.¹⁷

El protocolo descrito, proporciona unos 9 mL de nanopartículas con altos rendimientos de marcaje obteniéndose una actividad específica de 7.8 GBq/mmol de Fe. La alta reproducibilidad en términos de rendimiento de marcaje se obtuvo similarmente para diferentes actividades de partida. Así pues, tras realizar la síntesis con actividades bajas y moderadas de ^{68}Ga (37 MBq, 62.9 MBq, 111 MBq y 133.2 MBq) se alcanzaron resultados parecidos para las síntesis con una alta actividad inicial de ^{68}Ga de 1280 MBq (tabla 5.1). Esta gran reproducibilidad y eficiencia de marcaje hace que el campo de aplicación de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-DEXT pueda extenderse con toda facilidad a modelos de animal grande e incluso humanos.

Una decaída la radiactividad de las muestras, se caracterizaron sus propiedades fisicoquímicas mostrando que la inserción de átomos de ^{68}Ga no afecta significativamente dichas propiedades (tabla 5.2).

Tabla 5.1. Rendimientos de marcaje de ^{68}Ga -IONP-DEXT con diferentes actividades iniciales.

Muestra (actividad a t=0)	Rendimiento de marcaje (%)
^{68}Ga -IONP-DEXT (37 MBq)	85.7
^{68}Ga -IONP-DEXT (62.9 MBq)	82.8
^{68}Ga -IONP-DEXT (111 MBq)	93.5
^{68}Ga -IONP-DEXT (133.2 MBq)	90.4
^{68}Ga -IONP-DEXT (1280 MBq)	92.0

Debe tenerse en cuenta, que el ^{68}Ga decae de forma natural a ^{68}Zn , por lo que finalmente la muestra se encontrará dopada con dicho elemento pudiendo cambiar algunas de sus propiedades, especialmente las referentes al magnetismo.

Tabla 5.2. Propiedades fisicoquímicas principales de IONP-DEXT and ^{68}Ga -IONP-DEXT (valores medios \pm ds). HD size, tamaño hidrodinámico; TEM, tamaño por microscopía de transmisión electrónica; XRD, x-ray size; Ms, magnetización de saturación; r_2 ; r_1 ; r_2/r_1 ; % radiomarcaje

Muestra (N= 7)	HD (nm)	TEM (nm)	DRX (nm)	Ms $\text{emu}^{-1}\text{g}^{-1}$	r_2 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	r_1 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	r_2/r_1	% radiomarcaje
IONP-DEXT	18.2 ± 2.5	2.1 ± 0.2	2.6	17.2 ± 1.8	25.7 ± 3.1	6.5 ± 0.2	3.9	n.a.
^{68}Ga -IONP-DEXT	20.6 ± 2.4	2.2 ± 0.2	1.9	19.2 ± 2.1	22.2 ± 2.6	5.7 ± 0.1	3.9	93.4

Respecto al núcleo de las nanopartículas, las imágenes TEM mostraron tamaños muy pequeños de 2.2 nm además de exhibir la presencia de partículas dispersas sin agregar (figura 5.10).

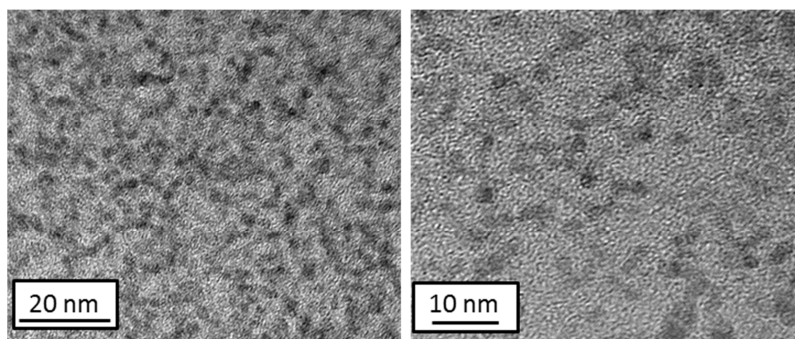


Figura 5.10. a) Imágenes TEM de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-DEXT a dos magnitudes diferentes

La difracción de rayos X no reveló, como cabría esperar dada la pequeña cantidad de radioisótopo introducida, cambios estructurales apreciables respecto a las nanopartículas frías (figura 5.11).

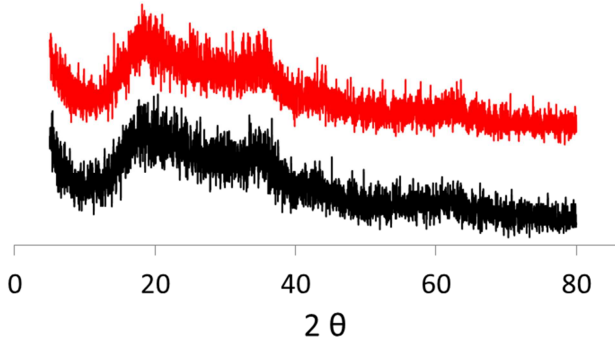


Figura 5.11. Espectros de DRX de las nanopartículas IONP-DEXT (negro) y ^{68}Ga -IONP-DEXT (rojo).

En lo concerniente a la composición superficial de la nanopartícula, ni el espectro de FTIR ni el análisis termogravimétrico mostraron diferencias entre las partículas frías y las partículas sintetizadas con ^{68}Ga (figura 5.12).

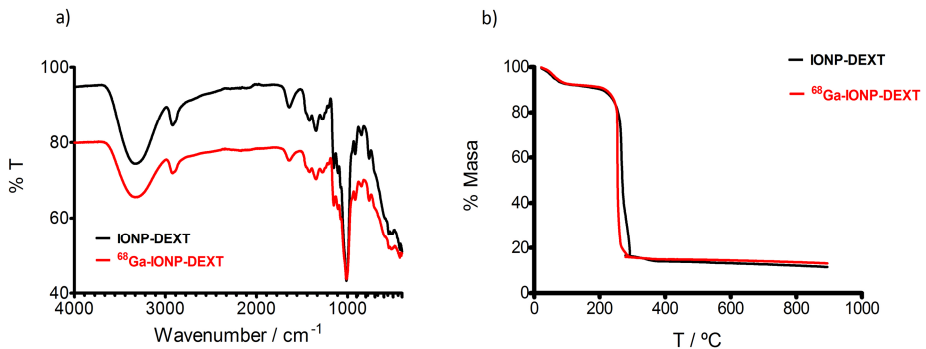


Figura 5.12. a) Espectro FTIR de IONP-DEXT (negro) y ^{68}Ga -IONP-DEXT (rojo); b) Análisis termogravimétrico (TGA) de IONP-DEXT (negro) y ^{68}Ga -IONP-DEXT (rojo).

La muestra dopada con ^{68}Ga muestra un comportamiento superparamagnético casi idéntico con un valor de magnetización de saturación de 19.2 emu/gFe (figura 5.13).

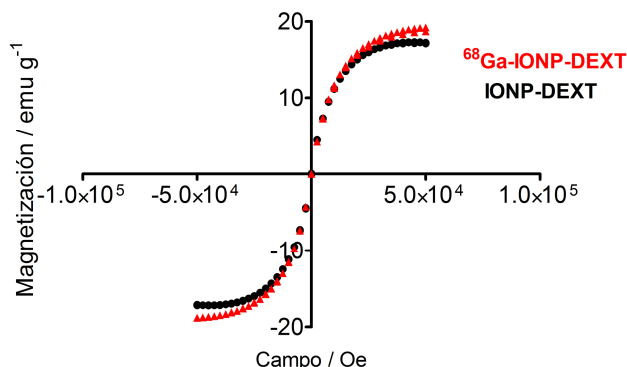


Figura 5.13. Curva de magnetización de IONP-DEXT (negro) y ^{68}Ga -IONP-DEXT (rojo).

Además los valores de r_1 y r_2 obtenidos para ^{68}Ga -IONP-DEXT también fueron consonantes con aquellos obtenidos para la muestra sin dopar (figura 5.14).

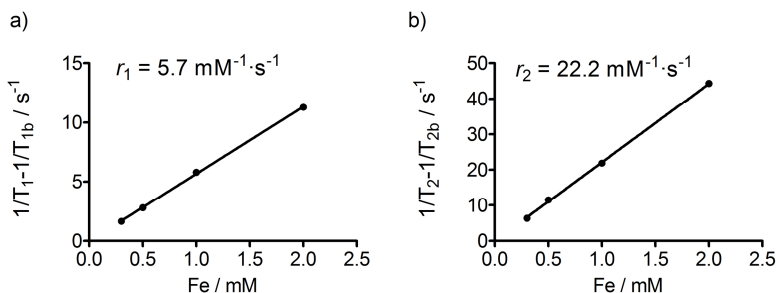


Figura 5.14. a) Curva velocidad de relajación longitudinal, T_1 , frente a concentración de hierro, b) Curva velocidad de relajación transversal, T_2 , frente a concentración de hierro.

Como se ha mencionado anteriormente, una de las hipótesis de trabajo dentro de este estudio es la inserción de átomos de ^{68}Ga en la estructura cristalina del óxido de hierro. Hasta ahora, lo que se puede afirmar a través de los diferentes procesos de purificación, control de calidad

y caracterización es que el ^{68}Ga se encuentra en la nanopartícula sin que haya presencia de ^{68}Ga libre. Sin embargo, todavía no se ha demostrado que el ^{68}Ga presente en la nanopartícula se encuentre localizado en la estructura cristalina de la misma y no adsorbido en la capa polimérica del dextrano utilizado como recubrimiento. Es de vital importancia comprobar que realmente se ha producido el dopaje en el núcleo sobre todo porque se ha utilizado un isótopo de vida corta. Una adsorción del isótopo en la capa polimérica superficial podría desencadenar problemas de estabilidad del radiotrazador, encontrándonos con una desorción del radioisótopo en su comportamiento *in vivo*. Una integración en el núcleo de la nanopartícula probablemente evitará todos los problemas de transmetalación o liberación del isótopo que pudieran darse en algún modo. Para comprobar la incorporación en la estructura cristalina del núcleo, se realizaron medidas tanto indirectas como directas. Las medidas indirectas se realizaron mediante una síntesis “control” de las nanopartículas utilizando un radioisótopo aniónico de ^{18}F . Para ello, al protocolo descrito anteriormente se le añadió una disolución de Na^{18}F en lugar de la disolución de $^{68}\text{GaCl}_3$. Después de realizar los procesos de purificación se obtuvieron nanopartículas de óxido de hierro con el mismo tamaño y propiedades químicas pero con un 0.5 % de eficacia en el marcaje radiactivo. Al tratarse el $^{18}\text{F}^-$ de un radioisótopo aniónico, su incorporación dentro de la estructura cristalina es mucho más compleja ya que debe sustituir a los iones óxido (O^{2-}) en la formación del núcleo. Sin embargo, el $^{68}\text{Ga}^{3+}$ puede sustituir de forma sencilla al Fe^{3+} porque ambos tienen unas propiedades químicas muy similares. Por tanto, debido a que no se encuentra ^{18}F tras la reacción, se puede afirmar que el marcaje de las nanopartículas con ^{68}Ga no se produce

en principio a través de una simple adsorción del radioisótopo en la superficie de las mismas. Adicionalmente, se caracterizó la estabilidad del marcaje incubando las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-DEXT en suero sanguíneo de ratón a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo se purificaron por duplicado por ultrafiltración y se midió la radiactividad tanto del filtrado –es decir, de la cantidad que haya podido desprenderse de la nanopartícula– y de las nanopartículas. Como era de esperar, toda la radiactividad se encontraba en las partículas y no en el filtrado (figura 5.15).

En cuanto a las medidas directas de la presencia de ^{68}Ga se realizaron diferentes muestras dopando para esta medida las partículas con cantidades variables de GaCl_3 con el isotopo normal del ^{69}Ga “frío”. Se estudiaron las muestras a través de técnicas de difracción policristalina como son el análisis por energía dispersiva de rayos X (EDS) y el análisis por fluorescencia de rayos X (XRF). Los anillos continuos de difracción sugirieron un tamaño de grano pequeño.

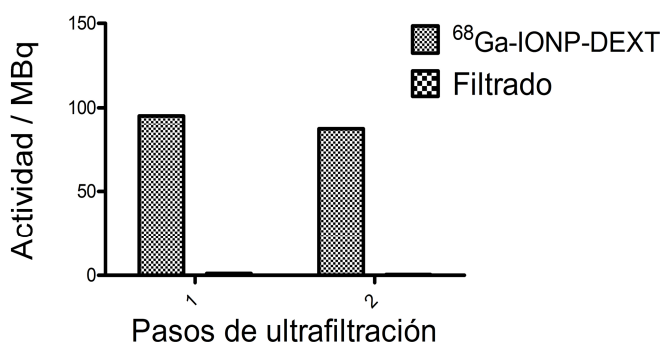


Figura 5.15. Actividad medida en las nanopartículas y el filtrado, después de incubarse ^{68}Ga -IONP-DEXT con suero de ratón a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 45 min, tras dos procesos de ultrafiltración.

Además los patrones de los anillos fueron identificados con los patrones de difracción de rayos X tabulados: PDF 01-074-2229 (nombre ICSD:

óxido de hierro galio, FeGa_2O_4) y PDF 00-019-0629 (nombre de mineral: magnetita, Fe_3O_4). La longitud de la cámara era de 730 mm. El análisis de la composición local sobre la partícula fue realizado por EDS (Figura 5.16). Los valores de composición se calcularon a partir del espectro individual en cada punto; el Ga se midió en el núcleo obteniéndose un porcentaje del 0.22 % en la composición atómica. También se realizó un estudio de fluorescencia de rayos X para obtener información global sobre la presencia de Ga. El porcentaje de Ga en relación con Fe en este caso es 0.294 ± 0.008 %, concordando con el valor obtenido por EDS (figura 5.16).

Todos estos datos indican claramente que el Ga se incorpora en el núcleo de la nanopartícula y no está adsorbido en el polímero, como la reacción de control con ^{18}F también indicaba.

Una vez realizada la caracterización completa de las muestras, se acometió el estudio de citotoxicidad mediante ensayos *in vitro*. Aunque hayamos partido de materiales ya conocidos y aprobados por la FDA para su uso en clínica, resulta lógico, realizar un estudio riguroso de la viabilidad de la muestra antes de ser utilizada en modelos animales de cualquier tipo.

Para realizar este ensayo, se utilizaron tres líneas celulares humanas, dos hepáticas (Huh7 y HepG2), por su normal acumulación en el hígado, y una endotelial (EA.hy926), por su administración intravenosa. Se incubaron dichas células con las nanopartículas a tres concentraciones diferentes de hierro 20, 50 y 100 $\mu\text{g Fe/mL}$. Además de un control negativo (células sin nanopartículas), se realizó un control positivo utilizando taxol como agente tóxico.

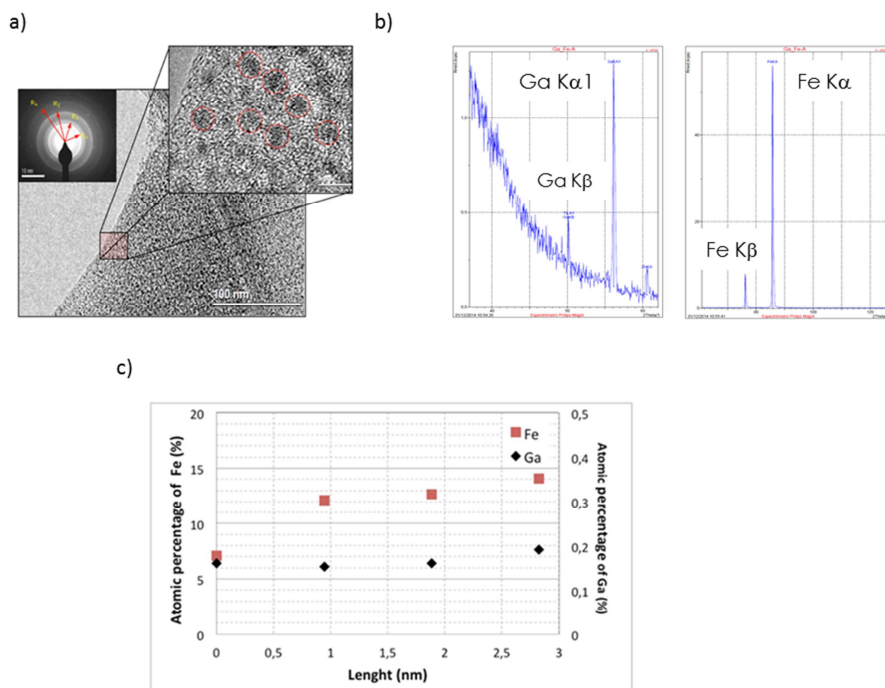


Figura 5.16. a) Imágenes TEM de Ga-IONP-DEXT. La imagen derecha muestra las partículas rodeadas por un círculo rojo. La zona superior izquierda muestra los patrones de difracción de las partículas, b) Espectros de fluorescencia por rayos X (XRF) de Ga-IONP-DEXT mostrando Ga y Fe. c) Análisis elemental por EDS mostrando los porcentajes de Fe y Ga.

Las muestras fueron evaluadas por análisis celular multiparamétrico o de alto barrido (HCS). Al contar el número de células se vio que contrariamente con lo que pasaba en las células tratadas con taxol, las células tratadas con nanopartículas presentaban una viabilidad similar a las células sin tratamiento (figura 5.17a). A continuación se utilizó un sustrato fluorescente para caspasas activadas 3/7. Estas caspasas están implicadas en procesos de apoptosis, pudiéndose seguir a través de la relación de la señal fluorescente producida por el sustrato entre el núcleo y el citoplasma de la célula. Al medir esta relación, se pudo concluir que las nanopartículas no

producían una respuesta apoptótica en las células tratadas. Por el contrario, las células tratadas con taxol presentaban una relación en la señal fluorescente núcleo/citoplasma claramente incrementada respecto al control en las líneas celulares Huh7 y HepG2 (figura 5.17b). Para la comparación se realizó la prueba U de Mann-Whitney concluyéndose que las diferencias en dicha relación entre el control y las células Huh7 para 50 y 20 $\mu\text{g Fe/mL}$ no eran estadísticamente significativas así como tampoco lo era la diferencia entre el control y la línea HepG2 para 50 $\mu\text{g Fe/mL}$. También se incubaron las muestras con Mitotracker, sonda que permite evaluar el daño mitocondrial o la respiración celular. Las células incubadas con nanopartículas presentaron niveles similares de respiración que las células sin tratamiento. Sin embargo las células tratadas con taxol presentaron una disminución en su respiración (figura 5.17c). Además, para el resto de medidas en diferentes condiciones, sólo se observó un efecto entre pequeño y mediano para las células tratadas con nanopartículas si se comparan con el control, obteniéndose un coeficiente d de Cohen menor a 0.5 ($d < 0.5$), mientras que las diferencias entre el taxol y el control sí que condujeron a gran efecto cuantificado por un coeficiente de 0.8 (Figura 5.17d).

Estos datos de toxicidad confirman entonces lo esperado, la ausencia total de efectos dada la composición de las nanopartículas, de forma similar a lo que ocurre con compuestos comerciales como el ferumoxtran-10 y el ferumoxytol. Estas nanopartículas de composición y tamaño similares ya han sido utilizadas con ausencia de efectos nocivos en modelos animales para aplicaciones vasculares y han sido aprobadas para su uso en humanos.¹⁹

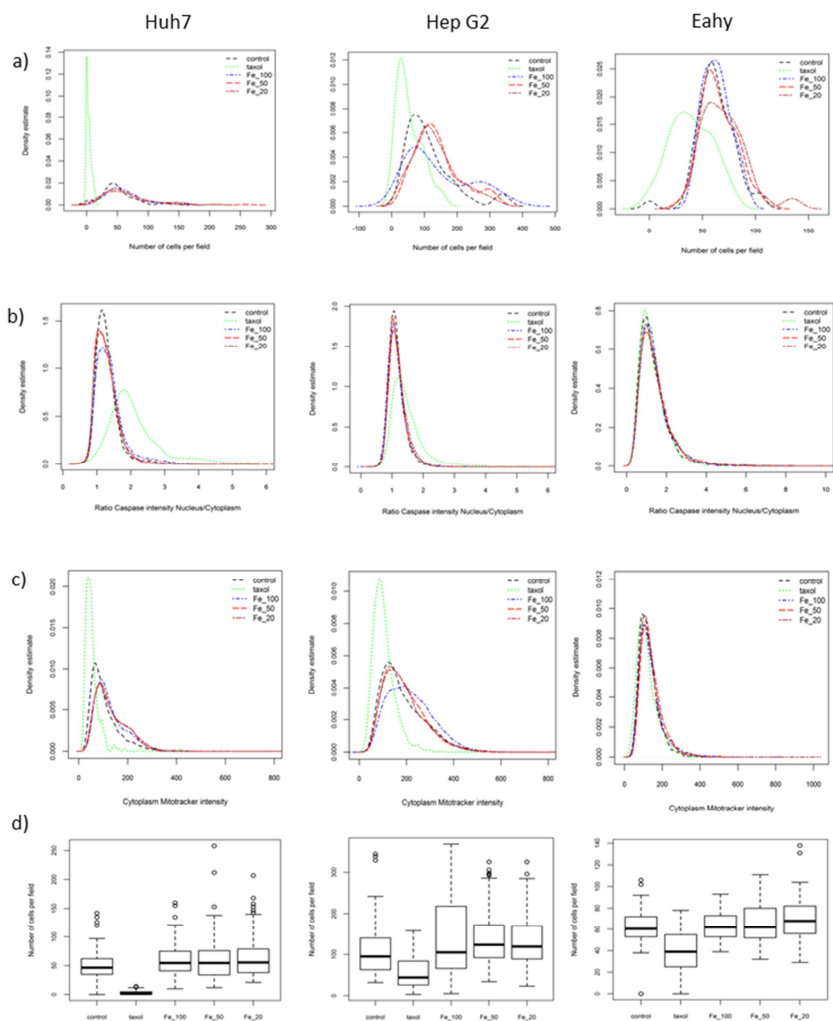


Figura 17. Ensayos in vitro de toxicidad con 3 líneas celulares Huh7, HepG2 y EA.hy926 tratadas con ^{68}Ga -IONP-DEXT a tres concentraciones 20, 50 y 100 μg Fe/mL, sin tratar y tratadas con Taxol 0.5 μM ; a) Número de células por campo representado en histogramas, b) Estimaciones de distribución de densidad de la relación de intensidad citoplasma-núcleo Caspasa obtenidos por análisis de imagen de 35 pocillos en duplicado, c) Estimaciones de distribución de densidad de la intensidad media del Mitotracker obtenidos por análisis de imagen de 35 pocillos en duplicado, d) Representación Box-plot de células por campo obtenidas de núcleos contados de 35 pocillos en duplicado.

Llegados a este punto, se procedió como fin último de este y gran parte del trabajo de esta Tesis, a la caracterización de la imagen *in vivo* de las nanopartículas mediante técnicas de imagen, en modelos animales tanto por PET como por MRI. Lo primero que se hizo fue comprobar la capacidad de la sonda dual ^{68}Ga -IONP-DEXT para producir señal en PET y contraste positivo en MRI. Para ello se realizó un ensayo con tubos a diferentes concentraciones de hierro. Como muestra la imagen (figura 5.18), a medida que aumenta la concentración de hierro se obtiene un mayor contraste positivo. Obviamente al aumentar la concentración de hierro estamos aumentando también la cantidad de ^{68}Ga por lo que la señal cuantitativa de la PET también es más intensa.

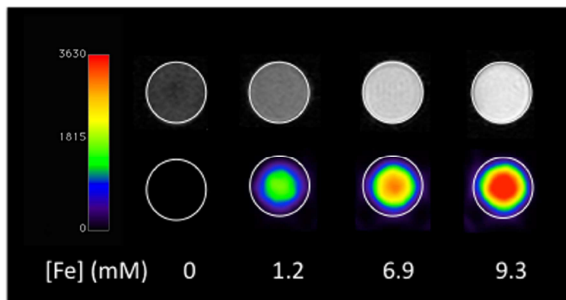


Figura 5.18. Imágenes de MRI (arriba) y PET (abajo) para diferentes concentraciones de ^{68}Ga -IONP-DEXT.

A continuación se llevaron a cabo los experimentos *in vivo*. Una de los objetivos de estos experimentos era caracterizar el comportamiento de las nanopartículas en cuanto a tiempo de circulación y vías de eliminación, parámetros importantes a la hora de diseñar trazadores para imagen y para un posible uso terapéutico. Se realizó un experimento de imagen en el PET a un ratón de la cepa C57BL/6 al cual se le inyectó, de forma intravenosa por cola, 150 μl de nanopartículas ^{68}Ga -IONP-DEXT con una concentración de Fe

de $1.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y una actividad de 12 MBq . La imagen fue tomada una hora tras la inyección del trazador y fue adquirida durante 30 minutos. Como se puede observar en la imagen (figura 5.19a), las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-DEXT presentan un largo tiempo de circulación en sangre ya que tras una hora de captación casi toda la señal proviene de dicha circulación (corazón, carótidas y aorta) habiendo un poco de captación en vejiga debida a las partículas más pequeñas y en el hígado siendo este el órgano de eliminación principal. A continuación se realizó una Angiografía por Resonancia Magnética (MRA) para evaluar la capacidad de contraste T_1 de las nanopartículas (Figura 5.19b). Las imágenes mostraron un fuerte contraste positivo llegándose a detectar incluso los vasos sanguíneos más pequeños hasta 90 minutos después de su inyección. Por lo tanto se demuestra que estas nanopartículas generan un gran contraste T_1 , a concentraciones bajas de Fe *in vivo* además de volver a comprobar un tiempo de vida en sangre prolongado.

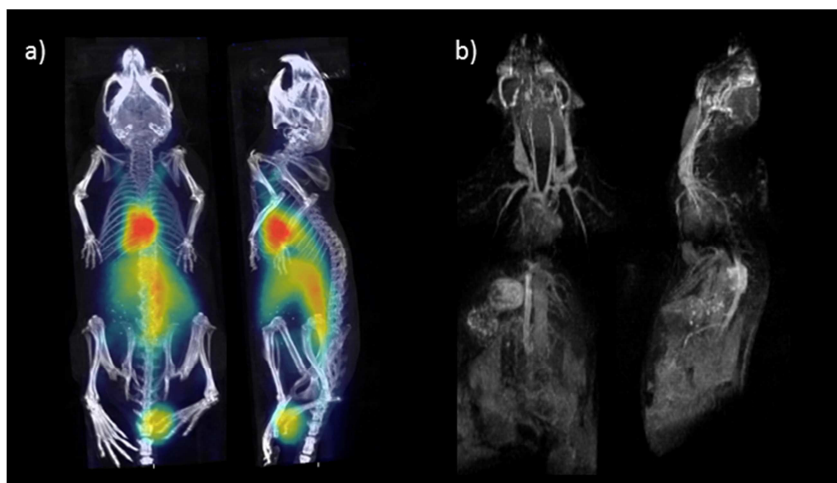


Figura 5.19. a) Imagen PET una hora post-inyección de ^{68}Ga -IONP-DEXT (12 MBq), b) Imagen angiográfica de MR 90 min post-inyección de IONP-DEXT.

El estudio se repitió con otra especie de mayor tamaño como es el conejo utilizando un equipo traslacional clínico. Para ello se inyectó una dosis de 2.2 mg Fe/kg de IONP-DEXT a un conejo sano al que se le realizó una MRA. El tiempo tan corto de relajación T_1 de estas nanopartículas produjo una gran intensidad de señal obteniéndose unas imágenes de alta calidad. Las imágenes, generadas tras realizar la supresión de grasa con una proyección de máxima intensidad, permitieron distinguir claramente toda la estructura vascular del conejo, diferenciándose hasta los vasos más pequeños (figura 5.20). Dado que esta intensidad de señal se mantenía incluso una hora tras la inyección, se vuelve a corroborar el largo tiempo de circulación en sangre presente en las nanopartículas IONP-DEXT en otra especie. Por tanto, estas nanopartículas presentan una gran eficacia de contraste y pueden ser un buen sistema para realizar estudios angiográficos cuando el uso de los contrastes positivos basados en agentes quelantes de Gadolinio sean un problema, como en los pacientes con afectaciones renales.

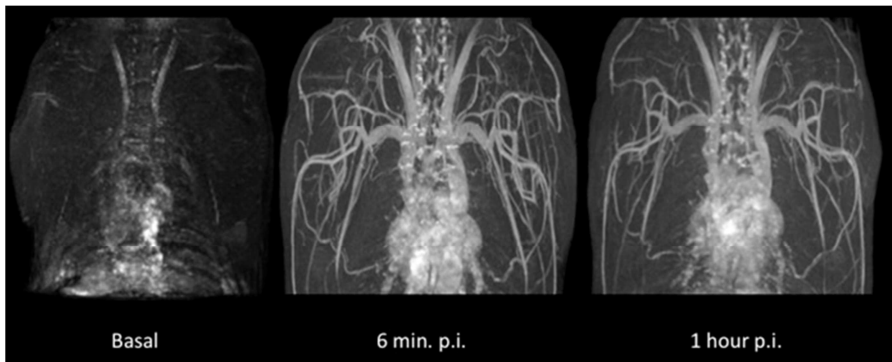


Figura 5.20. MRA de conejo antes de inyectar IONP-DEXT (basal), 6 minutos y 1 hora post inyección intravenosa de IONP-DEXT. La imagen se adquirió en un equipo Philips MRI Achieva 3T.

Para continuar con el estudio, 45 MBq de nanopartículas ^{68}Ga -IONP-DEXT fueron inyectadas de forma intravenosa al conejo. Las imágenes PET volvieron a confirmar el gran tiempo de circulación en sangre de las nanopartículas (figura 5.21a). Se realizó una cuantificación de la actividad en diferentes órganos y en sangre, lo que permitió ver de forma cuantitativa la biodistribución de la sonda a 30 minutos post inyección (figura 5.21b). Como muestra la figura, el valor más alto de captación estandarizado (SUV, de su acrónimo en inglés Standardized Uptake Value) corresponde con la actividad en sangre seguido de los órganos clásicos de eliminación, hígado y riñón.

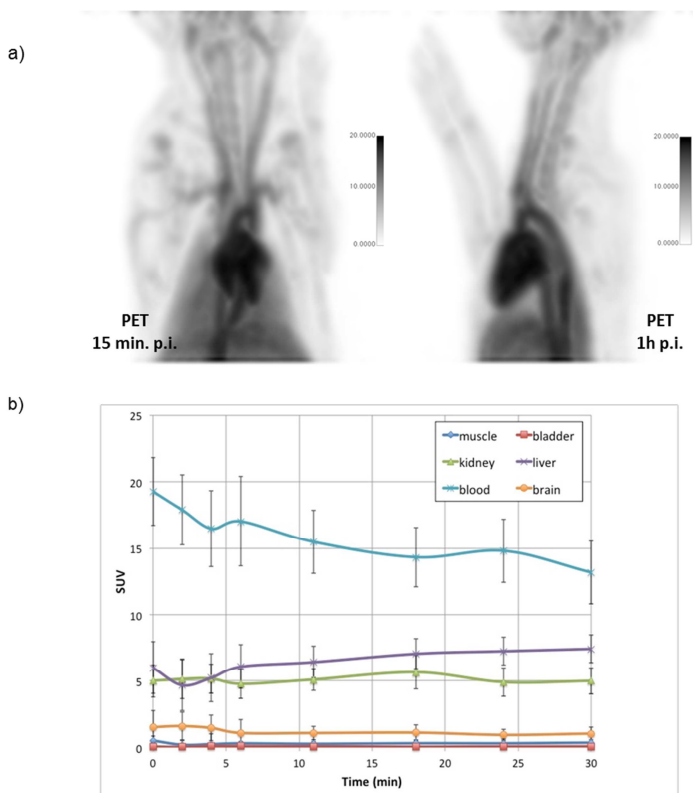


Figura 5.21. a) Imágenes PET de conejo 15 min y 1 hora post inyección intravenosa de ^{68}Ga -IONP-DEXT, b) Valores de captación estandarizados (SUV) en conejo 30 min post inyección intravenosa de ^{68}Ga -IONP-DEXT.

5.3.- Aspectos clave

Antes de cerrar el capítulo, puede resultar de gran utilidad mencionar o discutir brevemente algunos puntos interesantes que puedan resolver dudas, ayudar al lector o servir de apoyo en la reproducción experimental del desarrollo descrito.

En primer lugar, en lo que respecta a los espectros de difracción de rayos X (figuras 5.4 y 5.9), es fácilmente observable que los espectros no se definen correctamente y por lo tanto es complicado asignar los planos a una estructura cristalina concreta. Esto es debido al tamaño tan pequeño de los núcleos generados en ambas formulaciones (IONP-DEXT y ^{68}Ga -IONP-DEXT). Aun así, en las imágenes TEM de mayor resolución es posible ver los planos cristalinos de los núcleos reflejando magnetita con una buena cristalinidad.

En segundo lugar y concerniente a la evaluación del dopaje se debe tener en cuenta de nuevo el tamaño de núcleo. Aunque se consiguió de forma satisfactoria, la individualización de núcleos para su estudio de evaluación de la composición puede resultar una tarea ardua debido a su tamaño tan pequeño. Además es necesario tener en mente que la cantidad de átomos de Ga que estamos utilizando como material de partida es muy pequeña lo que hace que su detección por EDS pueda ser complicada. Por ello el espectro mostrado necesita de más aumentos que en el caso del Fe, presente en una abundancia mucho mayor.

Como se ha mencionado durante el desarrollo de este capítulo, la síntesis completa de ^{68}Ga -IONP-DEXT genera unos nueve mL de nanopartículas con una concentración de 1.2 mg Fe/mL y un rendimiento de

marcaje de entre el 90 % - 95 %. Siempre que se realiza este tipo de síntesis se debe tener en cuenta que se está manipulando radiactividad y por lo tanto se debe seguir el criterio internacional conocido como ALARA (As Low As Reasonably Achievable) que indica que siempre se debe de trabajar de forma que se reciba la menor cantidad de tasa de dosis radiactiva que sea razonablemente posible. Esto significa que para un estudio en modelo de animal grande debe realizarse el procedimiento completo pero si se quiere realizar un estudio en animal pequeño, será suficiente con purificar y utilizar una cuarta parte del volumen inicial puesto en la reacción (ver sección Procedimiento Experimental). Además, debido al gran rendimiento de marcaje de la reacción para todo rango de actividad inicial de ^{68}Ga , se puede jugar con la cantidad de radiactividad que se añade en función del uso para el que destinen las nanopartículas, recibiendo sólo la tasa de dosis justa para el fin que se busca.

5.4.- Conclusiones

A lo largo de este trabajo se ha conseguido responder a todas las partes recogidas en la hipótesis inicial.

El uso del microondas como medio de síntesis produjo nanopartículas altamente estables en medios fisiológicos en tiempos de reacción muy cortos con una excelente reproducibilidad. La metodología empleada ha permitido la obtención de nanopartículas de núcleo muy pequeño capaces de generar contraste positivo en MRI.

Además, con este procedimiento se ha conseguido, por primera vez, insertar un isótopo radiactivo de vida media corta como el ^{68}Ga en el núcleo de la nanopartícula. Se ha demostrado que este isótopo se encontraba dopando el núcleo de la partícula y no está adsorbido sobre la superficie de esta. Se consiguieron rendimientos de marcaje sin precedentes para un gran rango de actividades.

Las muestras obtenidas eran completamente biocompatibles como mostraron todos los ensayos *in vitro* de citotoxicidad en tres líneas celulares diferentes.

Por último, los estudios *in vivo* en los modelos animales empleados (ratón y conejo) revelaron imágenes de excelente calidad tanto por MRA como en PET, obteniéndose en ambos casos contrastes positivos con largos tiempos de circulación en sangre.

La formulación de las partículas empleadas abre un gran abanico de posibilidades dentro de las aplicaciones de la imagen dual PET/MRI así como al futuro de la síntesis y aplicaciones de las nanopartículas multifuncionales.

5.5.- Bibliografía

1. Louie, A. Multimodality imaging probes: Design and challenges. *Chem. Rev.* **110**, 3146–3195 (2010).
2. Pysz, M. A., Gambhir, S. S. & Willmann, J. K. Molecular imaging: current status and emerging strategies. *Clinical Radiology* **65**, 500–516 (2010).
3. Morgat, C., Hindié, E., Mishra, A. K., Allard, M. & Fernandez, P. Gallium-68: chemistry and radiolabeled peptides exploring different oncogenic pathways. *Cancer Biother. Radiopharm.* **28**, 85–97 (2013).
4. Vorster, M., Maes, A., Van deWiele, C. & Sathekege, M. Gallium-68: a systematic review of its nononcological applications. *Nucl. Med. Commun.* **34**, 834–54 (2013).
5. Hu, F., Jia, Q., Li, Y. & Gao, M. Facile synthesis of ultrasmall PEGylated iron oxide nanoparticles for dual-contrast T1- and T2-weighted magnetic resonance imaging. *Nanotechnology* **22**, 245604 (2011).
6. Kim, B. H. *et al.* Large-scale synthesis of uniform and extremely small-sized iron oxide nanoparticles for high-resolution T1 magnetic resonance imaging contrast agents. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 12624–12631 (2011).
7. Caravan, P. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 512–523 (2006).
8. Caravan, P., Ellison, J. J., McMurry, T. J. & Lauffer, R. B. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: Structure, dynamics, and applications. *Chem. Rev.* **99**, 2293–2352 (1999).
9. Hayes, B. L. *Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light*. (CEM Pub., 2002). at <<http://bks0.books.google.com/jm/books?id=8xEpAQAAMAAJ>>
10. Lidström, P., Tierney, J., Wathey, B. & Westman, J. Microwave assisted organic synthesis—a review. *Tetrahedron* **57**, 9225–9283 (2001).
11. Choi, J. *et al.* A hybrid nanoparticle probe for dual-modality positron emission tomography and magnetic resonance imaging. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **47**, 6259–6262 (2008).
12. Stelter, L. *et al.* Modification of aminosilanized superparamagnetic nanoparticles: Feasibility of multimodal detection using 3T MRI, small animal PET, and fluorescence imaging. *Mol. Imaging Biol.* **12**, 25–34 (2010).
13. Glaus, C., Rossin, R., Welch, M. J. & Bao, G. In vivo evaluation of ⁶⁴Cu-labeled magnetic nanoparticles as a dual-modality PET/MR imaging agent. *Bioconjug. Chem.* **21**, 715–722 (2010).

14. Chakravarty, R. *et al.* Intrinsically germanium-69-labeled iron oxide nanoparticles: Synthesis and in-vivo dual-modality PET/MR zimaging. *Adv. Mater.* **26**, 5119–5123 (2014).
15. Chen, F. *et al.* Chelator-free synthesis of a dual-modality PET/MRI agent. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 13319–13323 (2013).
16. Zhao, Y. *et al.* Copper-64-alloyed gold nanoparticles for cancer imaging: Improved radiolabel stability and diagnostic accuracy. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **53**, 156–159 (2014).
17. Wong, R. M., Gilbert, D. A., Liu, K. & Louie, A. Y. Rapid size-controlled synthesis of dextran-coated, ⁶⁴Cu-doped iron oxide nanoparticles. *ACS Nano* **6**, 3461–3467 (2012).
18. Yang, H., Hasegawa, D., Takahashi, M. & Ogawa, T. Facile synthesis, phase transfer, and magnetic properties of monodisperse magnetite nanocubes. in *IEEE Transactions on Magnetics* **44**, 3895–3898 (2008).
19. Balakrishnan, V. S. *et al.* Physicochemical properties of ferumoxytol, a new intravenous iron preparation. *Eur. J. Clin. Invest.* **39**, 489–496 (2009).

CAPÍTULO

6

Síntesis por microondas de nanopartículas PET/MRI de óxido de hierro recubiertas de ácido cítrico dopadas con ^{68}Ga .

6.1.- Introducción

Como se ha demostrado en el capítulo anterior, la síntesis por microondas permite producir nanopartículas duales PET/MRI de alta calidad en un período muy breve de tiempo. Teniendo en cuenta el impacto que este tipo de nano-radiotrazadores pueden generar dentro del campo de la imagen molecular, consideramos de gran importancia profundizar más en el estudio de este tipo de sondas moleculares. Para ello, hay que considerar la composición del nano-radiotrazador descrito en la sección anterior, a saber; un núcleo de cristal pequeño que proporciona un contraste con realce positivo o T_1 en MRI, dopaje con ^{68}Ga que permite la detección por técnicas de imagen nuclear PET y dextrano como surfactante biocompatible que produce una alta estabilidad coloidal y largos tiempos de circulación en sangre. Dentro de esta combinación, parece lógico mantener el sistema que conforma el núcleo de la nanopartícula y permite obtener buenos resultados tanto en MRI como en PET. Por tanto, quedan las distintas opciones de surfactante como tercer aspecto que puede modificarse para producir un nuevo nano-radiotrazador. Para una primera aproximación se empleó dextrano, como vimos en el capítulo anterior ya que es un surfactante ampliamente utilizado en la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro que proporciona una buena estabilidad coloidal.¹⁻³ Además, una modificación de este polímero ha sido utilizado recurrentemente en la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro aprobadas por los organismos regulatorios y que se están utilizando actualmente en la práctica clínica, aunque se haya interrumpido su producción.⁴ Estas razones prácticas motivaron su uso en una primera aproximación a la síntesis de nano-radiotrazadores dopados con ^{68}Ga . Después quisimos investigar otras

alternativas en el proceso de generación de nuevas sondas duales usando la tecnología de microondas.

Una molécula biocompatible empleada también en el campo es el ácido cítrico. Este ácido también ha sido utilizado para recubrir nanopartículas de óxido de hierro desde hace varios años debido principalmente a que proporciona una alta estabilidad coloidal a las nanopartículas que recubre. La variedad de nanopartículas recubiertas de citrato es elevada, con diferentes tamaños y propiedades fisicoquímicas.⁵⁻⁷ De entre dicha variedad destacan las conocidas como VSOP (very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles), las cuales son capaces de circular durante mucho tiempo en sangre dado su tamaño tan pequeño. Dentro de las VSOP se encuentran las VSOP-C184 que han sido evaluadas como agente de contraste para MRA en humanos.⁸ Estas nanopartículas presentan un tamaño de entre 4 y 8 nm y unos valores de relaxividad longitudinal (r_1) de $20.1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ y relaxividad transversal (r_2) de $37.1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ medidos a 0.94 T, valores que explican la utilización de este tipo de nanopartículas como agente de contraste de MRI con realce positivo.⁹

Las nanopartículas recubiertas de ácido cítrico también han sido evaluadas como posible agente de contraste en la detección de placa de aterosclerosis. En este trabajo, realizado en conejos, se mostró cómo este tipo de nanopartículas (VSOP), son capaces de resaltar eficientemente las lesiones ateroscleróticas gracias a la acumulación de estas nanopartículas en macrófagos y micro-vesículas calcificadas.¹⁰

Con estos precedentes parece muy interesante reproducir la síntesis con el método descrito en el capítulo anterior, incorporando como novedad

el ^{68}Ga en el núcleo de las nanopartículas recubiertas de ácido cítrico generando de esta forma unos nuevos sistemas duales PET/MRI.

Además, conseguir sintetizar este tipo de nano-radiotrazadores no sólo con un polímero sino también con una molécula de peso molecular bajo como es el ácido cítrico es un reto, que si finalmente tenemos éxito, puede abrir un gran abanico de posibilidades para la síntesis de nano-radiotrazadores con diferentes moléculas que confieran diferentes características fisicoquímicas y con seguridad distintas propiedades farmacocinéticas que puedan generar un amplio elenco de efectos y aplicaciones biológicas.

Tras exponer las razones que motivaron este trabajo, la hipótesis inicial que en este estudio fue: *“La síntesis dirigida por microondas permitirá la obtención de nanopartículas de óxido de hierro dopadas con ^{68}Ga y recubiertas de ácido cítrico para su uso como nano-radiotrazador PET/MRI”.*

6.2.- Resultados y discusión

6.2.1.- Síntesis de nanopartículas ^{68}Ga -IONP-CIT

La síntesis fue llevada a cabo de la misma forma que se describió en el capítulo anterior. En este caso se sustituyó el Dextrano 6 KDa por citrato sódico trihidrato, añadiendo en este caso 0.31 mmol. La reacción se realizó de igual manera a 100 °C durante 10 minutos siendo posteriormente purificada por exclusión de tamaños. En este caso, al utilizar una molécula de peso molecular pequeño, no hizo falta un segundo paso de purificación por ultrafiltración.

Tras la reacción por microondas no se observaron agregados, lo que dio una primera idea, *de visu*, de que la reacción había transcurrido de manera satisfactoria. Una vez purificada la muestra, se pasó a la caracterización completa de la muestra, a la que llamaremos ^{68}Ga -IONP-CIT.

El tamaño hidrodinámico, medido por DLS, fue de 7.5 ± 1 nm, estando en el rango de las nanopartículas VSOP tal como se esperaba (figura 6.1a). Además, de nuevo, se obtuvo una gran reproducibilidad de tamaños para tres repeticiones de síntesis así como una distribución estrecha y homogénea, características ya conocidas de la síntesis por microondas (figura 6.1b).

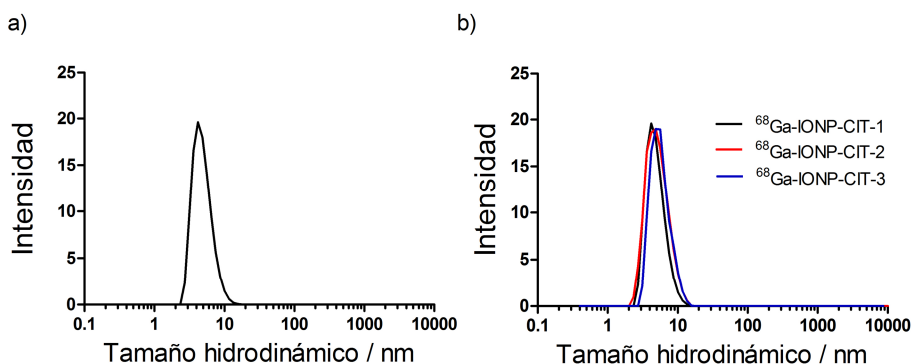


Figura 6.1. Tamaño hidrodinámico, medido por DLS, de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-CIT a) y tras tres repeticiones de síntesis de ^{68}Ga -IONP-CIT b).

Las imágenes realizadas por TEM revelaron un tamaño de núcleo de 1.5 ± 0.9 nm (figura 6.2). Un análisis detallado de las imágenes TEM permitió observar una baja cristalinidad en los núcleos de las nanopartículas. Debido a esto, nos pareció importante seguir analizando en más profundidad las características de estas muestras, centrándonos sobre todo en sus propiedades magnéticas y la cristalinidad. Debido al tamaño extremadamente pequeño de las partículas por el calentamiento rápido de la

muestra realizada con el microondas y a la utilización de una molécula biocompatible de tamaño pequeño puede provocar, *a priori*, que el comportamiento magnético de las nanopartículas no sea el más adecuado para su uso como contraste de hierro.

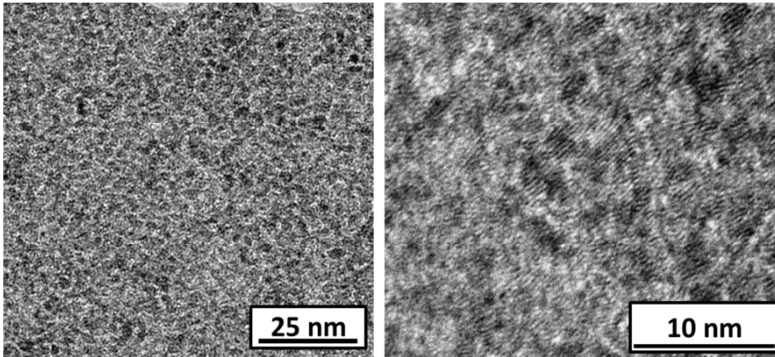


Figura 6.2. Imágenes de TEM de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-CIT.

Para estudiar la cristalinidad se realizó un experimento de difracción de rayos X. El difractograma no mostró los picos correspondientes a la magnetita y/o maghemita, lo que permitió concluir que la cristalinidad es muy baja o prácticamente nula debido al tamaño tan pequeño de núcleo (figura 6.3).

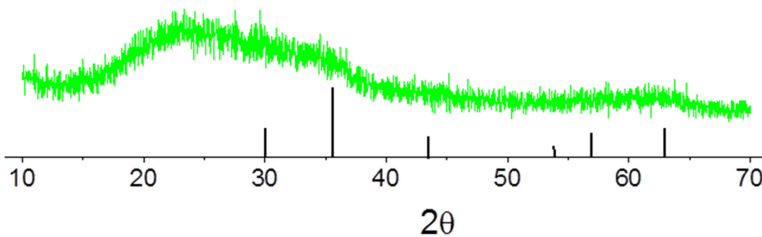


Figura 6.3. Espectro DRX de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-CIT.

Este comportamiento también se observó en el espectro de FTIR (figura 6.4), donde se distinguen perfectamente las bandas a 1534 cm^{-1} , 1339

cm^{-1} y 1064 cm^{-1} correspondientes a la presencia de ácido cítrico y sin embargo, la banda a 590 cm^{-1} , característica del enlace Fe-O, no está bien definida, sugiriendo formación de clústeres de hierro pero no una estructura cristalina tipo magnetita/maghemita.

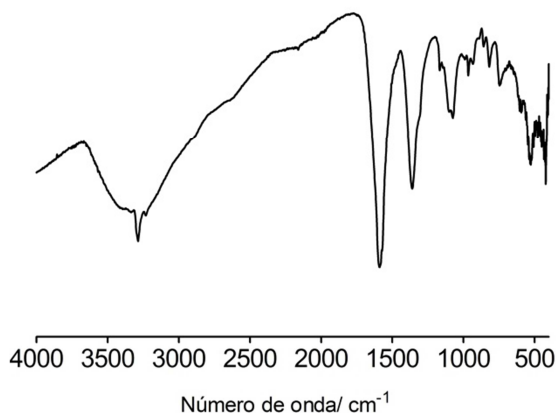


Figura 6.4. Espectro FTIR de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-CIT.

Una vez estudiada la cristalinidad de las nanopartículas se procedió a realizar el estudio de las propiedades magnéticas. Como se ha comentado con anterioridad, la baja cristalinidad afecta a las propiedades magnéticas, provocando que las nanopartículas tengan una magnetización de saturación baja, y su uso como agentes de contraste en MRI se encuentre muy comprometido o directamente no generarán ningún tipo de realce.

Para calcular el valor de saturación de magnetización (Ms) se realizó un experimento por VSM. La curva de magnetización muestra un comportamiento superparamagnético con ausencia de histéresis, aunque como se esperaba, el valor de saturación de magnetización era muy bajo, de tan solo 9 emu/gFe , lo que revela un comportamiento magnético muy pobre (figura 6.5a). Para evaluar la capacidad de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-CIT

como agente de contraste en MRI se midió la relajividad longitudinal (r_1) así como la transversal (r_2) a 37 °C y 1.5 T. Los valores obtenidos fueron de 0.3 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ para r_1 y 1.9 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ para r_2 (figura 6.5b y 6.5c). Estos valores tan bajos se deben de nuevo a tener núcleos amorfos y no cristalinos y por tanto, hacen que las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-CIT no puedan utilizarse como agentes de contraste en MRI.

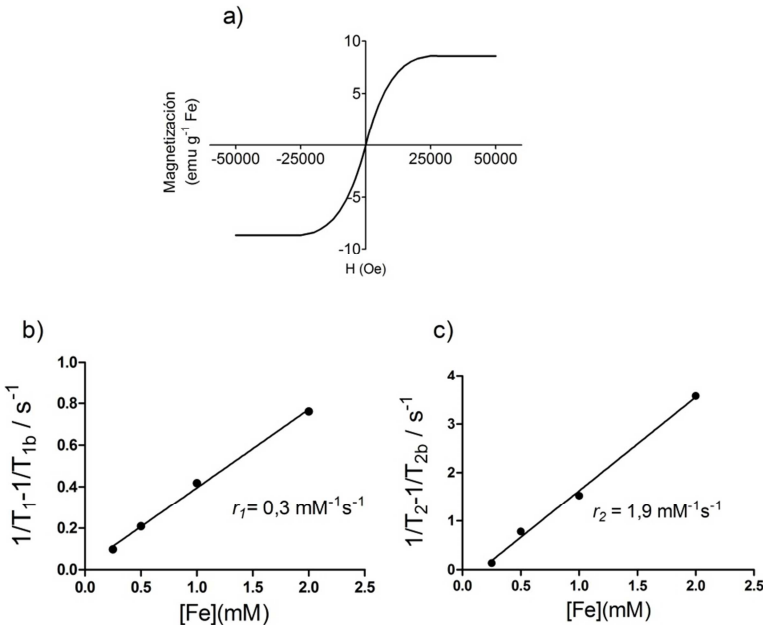


Figura 6.5. a) Curva de magnetización a 280 K de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-CIT, b) Representación del recíproco del tiempo de relajación T_1 (s^{-1}) frente a concentración de Fe (mM), c) Representación de la inversa del tiempo de relajación T_2 (s^{-1}) frente a concentración de Fe (mM).

Sin embargo, aunque respecto a las propiedades magnéticas estas nanopartículas no cumplen con los requisitos indispensables para su utilización por MRI, no se debe olvidar que tienen un carácter dual ya que han sido dopadas con el isótopo radiactivo ^{68}Ga , por lo que se deben evaluar también sus características como radiotrazador para PET.

Transcurrida la síntesis y purificación, se calculó el rendimiento de marcaje radiactivo siendo este del 88.8 %. Este valor, aunque no es tan alto como en el caso de las nanopartículas recubiertas con dextrano, sigue siendo un rendimiento excelente comparado con la síntesis general de nanoradiotrazadores. Este alto rendimiento permitió obtener una actividad específica relativa a la cantidad de Fe de 7.2 GBq/mmol de Fe lo que facilita que pueda emplearse en experimentos *in vivo* inoculando cantidades de hierro muy pequeñas, lo que puede ser altamente beneficioso en ciertas aplicaciones donde la acumulación hepática y lenta eliminación por las rutas habituales del hierro sean un problema. Las características fisicoquímicas de las nanopartículas ⁶⁸Ga-IONP-CIT se recogen en la tabla 6.1.

Tabla 6.1. Resumen de algunas propiedades fisicoquímicas y de eficiencia del marcaje de las nanopartículas ⁶⁸Ga-IONP-CIT.

Propiedad	⁶⁸ Ga-IONP-CIT
Tamaño hidrodinámico/ nm	7.5 ± 1.5
Tamaño de núcleo (TEM)/ nm	1.5 ± 0.9
Ms (emu/gFe)	9
r_1 (mM ⁻¹ ·s ⁻¹)	0.3 ± 0.05
r_2 (mM ⁻¹ ·s ⁻¹)	1.9 ± 0.4
r_2/r_1	6.3
Rendimiento de marcaje (%)	88.8
Actividad específica (GBq/ mmol Fe)	7.2

Para el estudio de la farmacocinética tras su administración intravenosa se realizaron dos experimentos con imagen y contador gamma. En el primero de ellos, se inyectó por cola, una dosis de 10 MBq a un ratón C57BL/6 de 10 semanas de edad. Una hora tras la inyección se realizó una adquisición estática de 30 minutos en un equipo nanoPET/CT. Las imágenes obtenidas muestran como tras ese periodo desde la inyección, las nanopartículas se encuentran principalmente en los órganos de eliminación convencionales de las nanopartícula de este tamaño, hígado, bazo y vejiga, sin que se observe presencia de nanopartículas en circulación (figura 6.6).

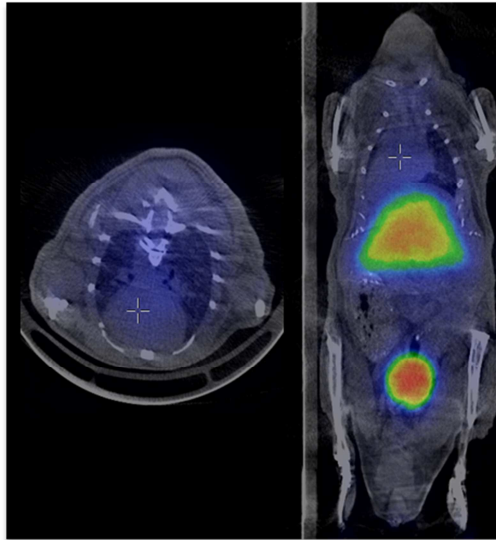


Figura 6.6. Imagen PET/CT 1 h tras inyectar de forma intravenosa 10 MBq de nanopartículas ^{68}Ga -IONP-CIT a un ratón C57BL/6.

Este comportamiento se comprobó adicionalmente en un segundo experimento en el cual se realizó el estudio de biodistribución de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-CIT a través de un contador gamma (véase anexo I). Para llevar a cabo este proceso se inyectó la misma dosis que para el

experimento de imagen (10 MBq) en este caso a 5 ratones de la misma cepa y de la misma edad. Transcurrida la hora de biodistribución, se extrajo sangre para su cuantificación y tras el sacrificio del animal se realizó una perfusión de los tejidos con PBS para eliminar los restos de sangre de los órganos, los cuales, fueron extraídos para su cuantificación individual en el contador gamma. Los resultados cuantitativos, representados como % de dosis inyectada por gramo de tejido (%ID/g) mostraron el mismo resultado que en el experimento de imagen *in vivo*. Como resumen de estos experimentos, transcurrida una hora desde su administración endovenosa, prácticamente la totalidad de las nanopartículas se encuentran en los órganos convencionales de eliminación de las nanopartículas, hígado y bazo (figura 6.7), tal y como vimos en el experimento de imagen.

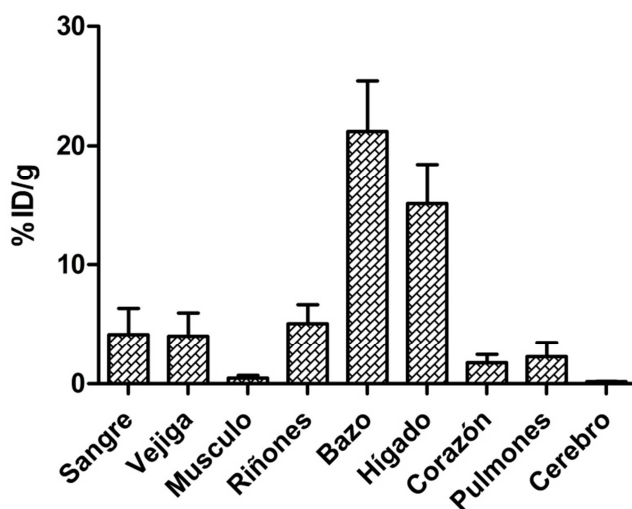


Figura 6.7. Biodistribución por contador gamma 1 hora tras inyectar de forma intravenosa 10 MBq de nanopartículas ^{68}Ga -IONP-CIT a 5 ratones C57BL/6.

Con estos resultados se puede concluir que las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-CIT obtenidas se pueden utilizar como nano-radiotrazador para

experimentos unimodales por PET teniendo en cuenta que el tiempo de circulación en sangre que presentan es inferior a una hora. Desgraciadamente, debido a las propiedades magnéticas de estas nanopartículas, no pueden utilizarse como agente de contraste en MRI.

Aunque las nanopartículas de óxido de hierro están demostrando ser un buen punto de partida para la síntesis de radiotrazadores PET de forma sencilla y eficiente, si no presentan buenas propiedades magnéticas, estamos limitando el uso del nano-radiotrazador al PET y por tanto excluiríamos las ventajas de la utilización dual por técnicas de imagen. Uno de los principales objetivos de este trabajo es obtener nano-radiotrazadores que puedan utilizarse en aplicaciones duales PET/MRI. Por tanto, para mejorar las propiedades magnéticas de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-CIT, se ha incluido un segundo estudio dentro de este capítulo, en el cual se modificaron algunos parámetros dentro de la síntesis dirigida por microondas.

Dentro de la síntesis por esta tecnología de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-CIT hay dos parámetros que pueden modificarse de forma muy sencilla que podrían incrementar la cristalinidad de los núcleos de las nanopartículas, el tiempo y la temperatura de reacción. Teniendo en cuenta que uno de los objetivos, ya cumplido, era incorporar un isótopo de vida media relativamente corto como es el ^{68}Ga , decidimos probar diferentes temperaturas de reacción realizando la síntesis en diez minutos como habíamos realizado anteriormente. Para llevar a cabo este estudio se hizo la síntesis de las nanopartículas, en ausencia de ^{68}Ga , a cuatro temperaturas diferentes, la original a 100 °C más otras tres a 150 °C, 165 °C y 180 °C. Las nanopartículas que se obtengan en estas condiciones se llamarán IONP-

CIT100, IONP-CIT150, IONP-CIT165 y IONP-CIT180, respectivamente. A continuación se evaluaron y compararon entre sí las principales propiedades de los productos resultantes.

6.2.2.- Síntesis de nanopartículas IONP-CIT100, 150, 165 y 180

Para comenzar se comprobó el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas observándose cómo a medida que aumenta la temperatura aumenta este tamaño siendo el incremento más sutil en el caso de IONP-CIT150 y IONP-CIT165 y más pronunciado en IONP-CIT180 (figura 6.8). Las nanopartículas IONP-CIT100 tenían un tamaño de 7.5 ± 1 nm mientras que las nuevas síntesis produjeron nanopartículas con tamaños de 10.1 ± 1.3 nm para IONP-CIT150, 15.7 ± 1.9 para IONP-CIT165 y, sorprendentemente, 80 ± 3 nm para IONP-CIT180.

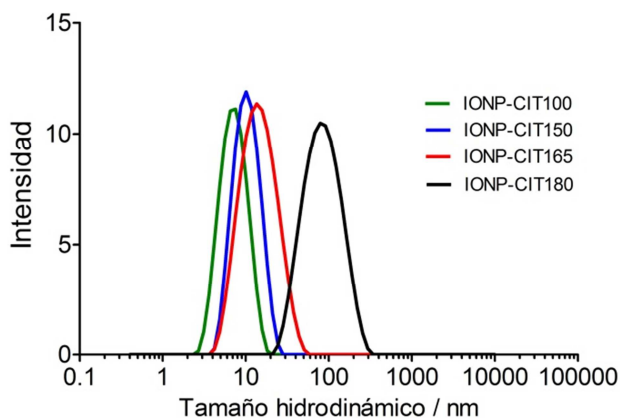


Figura 6.8. Tamaño hidrodinámico, medido por DLS, de las nanopartículas IONP-CIT100 (verde), IONP-CIT150 (azul), IONP-CIT165 (rojo) e IONP-CIT180 (negro).

Después de tres repeticiones de la síntesis en cada una de las condiciones de temperatura, los valores de tamaño hidrodinámico obtenidos fueron prácticamente los mismos (figura 6.9).

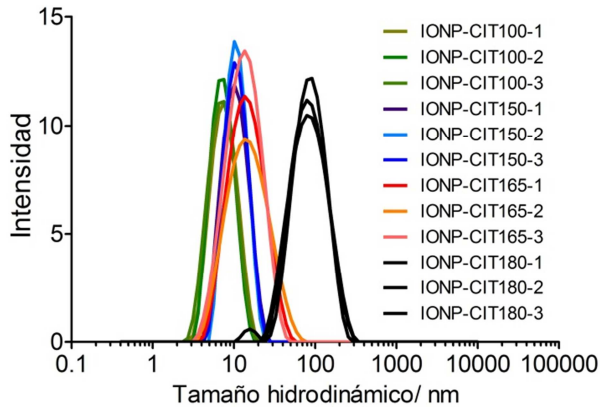


Figura 6.9. Tamaño hidrodinámico, medido por DLS, para tres repeticiones de síntesis de las nanopartículas IONP-CIT100 (verde), IONP-CIT150 (azul), IONP-CIT165 (rojo) y IONP-CIT180 (negro).

El aumento del tamaño hidrodinámico puede deberse a que al incrementar la temperatura de la reacción mejore el rendimiento de la etapa de nucleación y que, por tanto, los núcleos crezcan de tamaño. Para comprobar esta hipótesis, se realizó la medida del tamaño de núcleo a través de TEM. Los tamaños de núcleo obtenidos para las nanopartículas también crecieron desde 1.5 ± 0.9 nm para IOPN-CIT100 hasta 3.4 ± 1.3 nm para IONP-CIT180. Tanto las nanopartículas IONP-CIT150 como las IONP-CIT165 presentaron un tamaño de núcleo de 2.5 ± 1.0 nm (figura 6.10). Aunque este aumento del tamaño de núcleo pueda explicar el ligero incremento de tamaño hidrodinámico que se produce en las síntesis a 150 °C y 165 °C, no explica la diferencia de tamaño que se produce en las nanopartículas obtenidas a 180 °C. Una explicación de este comportamiento anómalo podría deberse a la formación de una capa de surfactante que contenga un mayor número de moléculas de ácido cítrico que el obtenido en el resto de casos.

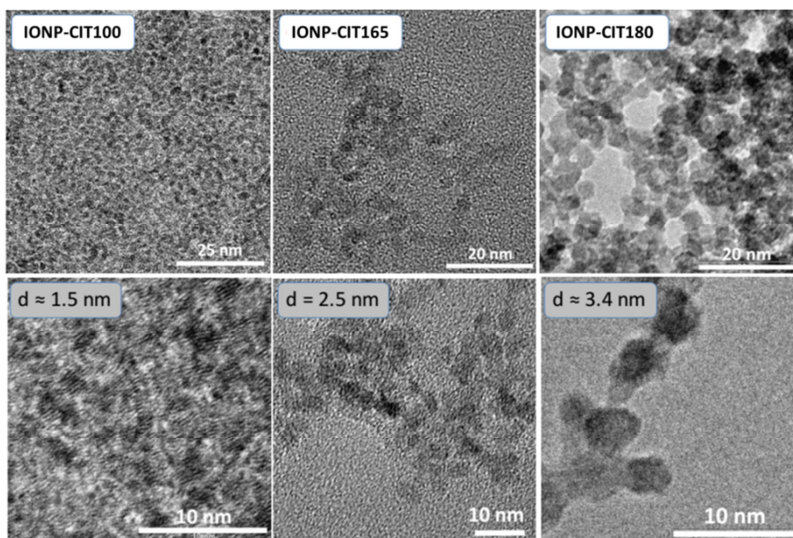


Figura 6.10. Imágenes de TEM de las nanopartículas IONP-CIT100, IONP-CIT165 y IONP-CIT180 respectivamente.

Sin embargo, del análisis termogravimétrico de estas nanopartículas tampoco se pudo explicar el incremento del tamaño porque todas las curvas mostraban un comportamiento muy similar con una pérdida de masa de entre el 40 % y el 50 % hasta 600 °C con un perfil de pérdida gradual, típico en las nanopartículas recubiertas con ácido cítrico (figura 6.11).¹¹

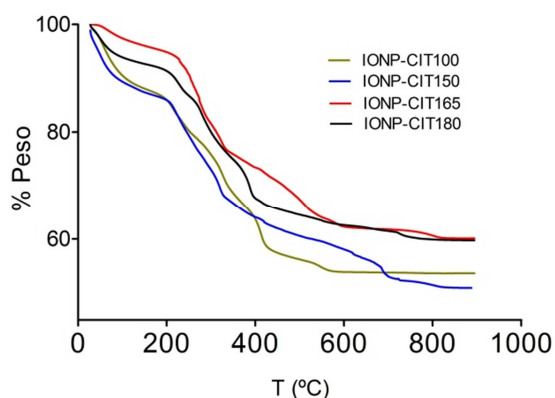


Figura 6.11. Curvas TGA de las nanopartículas IONP-CIT100 (verde), IONP-CIT150 (azul), IONP-CIT165 (rojo) y IONP-CIT180 (negro).

No obstante, con estos datos, y calculando el número de nanopartículas que había en cada muestra, se pudo estimar el número de moléculas de citrato contenidas en las nanopartículas para cada temperatura. Como muestra la figura 6.12, las nanopartículas IONP-CIT180 presentan una cantidad de moléculas de citrato del orden de tres órdenes de magnitud mayor que en el resto de casos, lo que podría explicar la gran diferencia existente entre el tamaño del núcleo y el tamaño hidrodinámico.

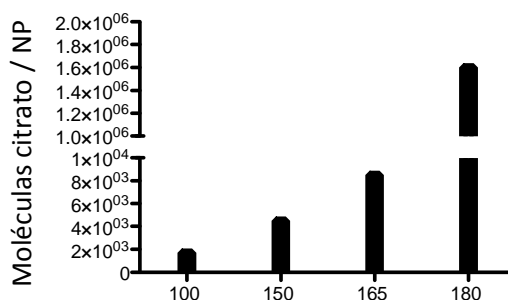


Figura 6.12. Número de moléculas de citrato por nanopartícula para IONP-CIT100, IONP-CIT150, IONP-CIT165 y IONP-CIT180.

A continuación nos dispusimos a estudiar la cristalinidad del núcleo de las nanopartículas. Es importante recordar en este punto que el estudio de síntesis a diferentes temperaturas tenía como finalidad, como hemos dicho en párrafos anteriores, mejorar las propiedades magnéticas de la muestra IONP-CIT100, por tanto, un aumento en la cristalinidad de las muestras iría a favor de dicho fin. Para ello, se realizó un experimento de DRX a todas las muestras. Los patrones de rayos X obtenidos mostraban picos muy anchos debidos al realmente pequeño núcleo que presentan, aun así, se pudo observar una evolución clara desde la muestra de la síntesis original IONP-CIT100, donde prácticamente no se ve nada, hasta la muestra IONP-CIT180, donde se diferencian notoriamente los picos correspondientes

a un estructura tipo maghemita (figura 6.13). Con este experimento se pudo concluir que en la síntesis por microondas de las nanopartículas IONP-CIT aumenta la cristalinidad de las muestras a medida que aumenta la temperatura de reacción.

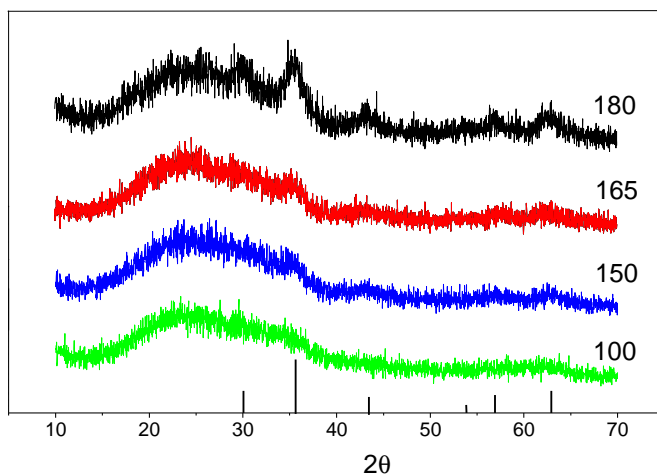


Figura 6.13. Espectros DRX para las muestras IONP-CIT100 (verde), IONP-CIT150 (azul), IONP-CIT165 (rojo) y IONP-CIT180 (negro).

La composición superficial de las nanopartículas fue de nuevo evaluada a través de los correspondientes espectros FTIR. En todos los casos los espectros eran similares siendo principales las bandas a 1534 cm^{-1} , 1339 cm^{-1} y 1064 cm^{-1} que se corresponden con la presencia de ácido cítrico (figura 6.14). Sin embargo, mirando en la región correspondiente a las bandas del óxido de hierro podían verse algunas diferencias notables. En el caso de la muestra IONP-CIT100 las bandas correspondientes al enlace Fe-O, como dijimos anteriormente, no están bien definidas además de presentar una intensidad menor que las bandas que corresponden al ácido cítrico. Por el contrario, en la muestra IONP-CIT180 la banda más intensa es la debida al enlace Fe-O a 552 cm^{-1} . Este comportamiento puede explicarse por una

mayor cristalinidad de la muestra IONP-CIT180, como ya se mostró en los espectros de DRX y a un mayor tamaño hidrodinámico.

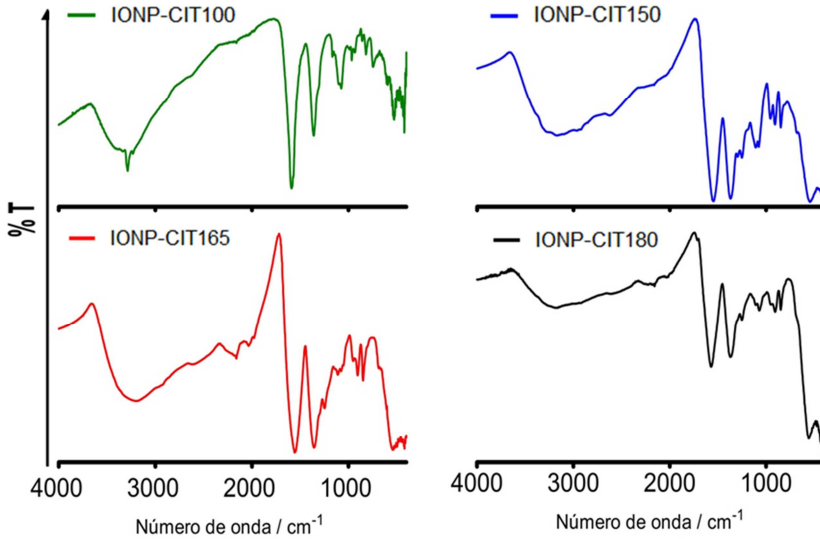


Figura 6.14. Espectros FTIR para las muestras IONP-CIT100 (verde), IONP-CIT150 (azul), IONP-CIT165 (rojo) y IONP-CIT180 (negro).

Además, si se analiza la región comprendida entre 800 y 400 cm⁻¹ en mayor profundidad, se deduce que la fase cristalina de las nanopartículas es maghemita en lugar de magnetita ya que todas presentan un comportamiento típico de esa fase con una banda por encima de 600 cm⁻¹ (figura 6.15).¹²

Una vez caracterizado tanto el núcleo como la composición superficial de las nanopartículas se procedió a la evaluación de sus propiedades magnéticas para poder comprobar si han mejorado, tal y como se pretendía.

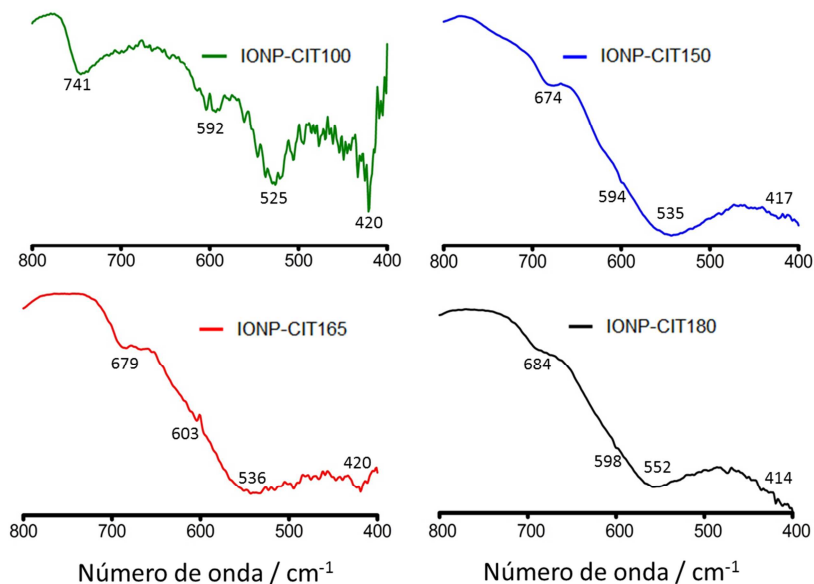


Figura 6.15. Espectros FTIR de la región entre 800 - 400 cm^{-1} para IONP-CIT100 (verde), IONP-CIT150 (azul), IONP-CIT165 (rojo) y IONP-CIT180 (negro).

Las curvas de magnetización obtenidas con dispositivos SQUID revelaron un comportamiento superparamagnético en todos los casos sin presencia de histéresis (figura 6.16). Sin embargo, los valores de saturación de magnetización aumentaron respecto a la muestra IONP-CIT100, pasando de un valor de 9 emu/gFe a valores cercanos a 60 emu/gFe para las muestras IONP-CIT150, IONP-CIT165 y IONP-CIT180. Estos valores concuerdan con los perfiles de rayos X donde se observaba una estructura amorfa en IONP-CIT100 y estructuras más cristalinas a menudo que aumentaba la temperatura de reacción.

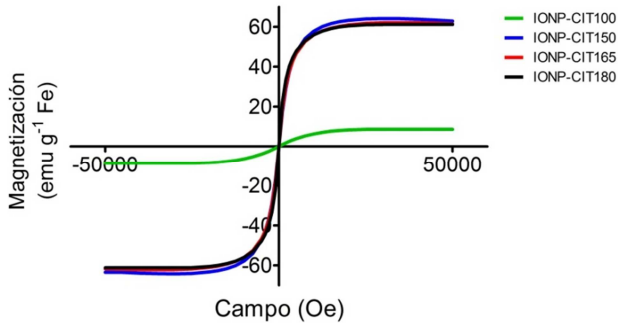


Figura 6.16. Curvas de magnetización, realizadas por SQUID de las muestras IONP-CIT100 (verde), IONP-CIT150 (azul), IONP-CIT165 (rojo) y IONP-CIT180 (negro).

El mismo comportamiento magnético se observó a campo bajo, con un valor pequeño de susceptibilidad para la muestra IONP-CIT100 y valores mucho más altos para las otras tres muestras, siendo las nanopartículas IONP-CIT180 las que presentaron un mayor valor de susceptibilidad magnética (figura 6.17).

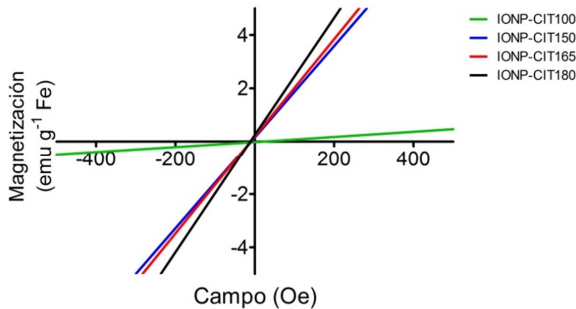


Figura 6.17. Curvas de magnetización a campo bajo (-500 – 500 Oe) para las muestras IONP-CIT100 (verde), IONP-CIT150 (azul), IONP-CIT165 (rojo) y IONP-CIT180 (negro).

La magnetización de saturación es una propiedad intrínseca de cada nanopartícula y refleja el orden del cristal del núcleo de la nanopartícula. Que las muestras IONP-CIT150, IONP-CIT165 y IONP-CIT180 presenten valores similares de saturación de magnetización indica que el orden de cristalinidad de los núcleos es muy similar. Teniendo en cuenta estos

resultados de cristalinidad diferente de las diferentes nanopartículas, resultó muy interesante realizar un estudio más exhaustivo de las propiedades magnéticas de las nanopartículas. Para ello, en primer lugar, se estudió la dependencia de la temperatura con la susceptibilidad magnética AC (en corriente alterna, susceptibilidad fuera de fase). Esta medida permite obtener una idea clara de la distribución de tamaños de las partículas en el caso de que la muestra se presente como conjuntos de partículas que no interactúan dentro del mismo material.¹³ La susceptibilidad llega a cero sobre 20 K, 45 K, 55 K y 70 K para IONP-CIT100, IONP-CIT150, IONP-CIT165 y IONP-CIT180 respectivamente (figura 6.18).

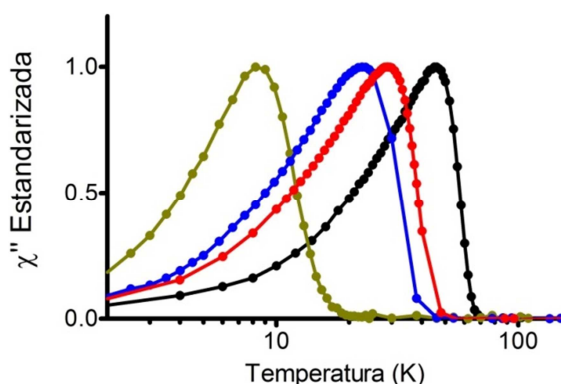


Figura 6.18. Dependencia de la temperatura con la susceptibilidad magnética AC para las muestras IONP-CIT100 (verde), IONP-CIT150 (azul), IONP-CIT165 (rojo) y IONP-CIT180 (negro).

Estos valores de susceptibilidad indican que todas las muestras son superparamagnéticas y que, por tanto, seguirán la ley de Curie por encima de estas temperaturas. Para calcular las interacciones inter-partícula, se calculó, utilizando la ecuación de Arrhenius, el factor pre-exponencial τ_0 :

$$\tau = \tau_0 \exp(E_a/k_B T)$$

donde K_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura y E_a la barrera de energía de anisotropía de una sola partícula (uniaxial). Este factor indica la frecuencia de las colisiones entre partículas que pueden ser debidas, entre otros fenómenos, a interacciones dipolares.¹⁴ En este caso, no solo el núcleo es importante, sino que el surfactante juega un papel importante ya que las interacciones magnéticas dependen de la distancia entre las partículas y entre núcleos, siendo estas dependientes del tipo y cantidad de surfactante. Los valores obtenidos para los respectivos factores pre-exponenciales de las cuatro muestras se encontraban por debajo de los valores que consideran que las interacciones inter-partículas (figura 6.19) dentro de las muestras son insignificantes ($10^{-9} - 10^{-12}$ s).

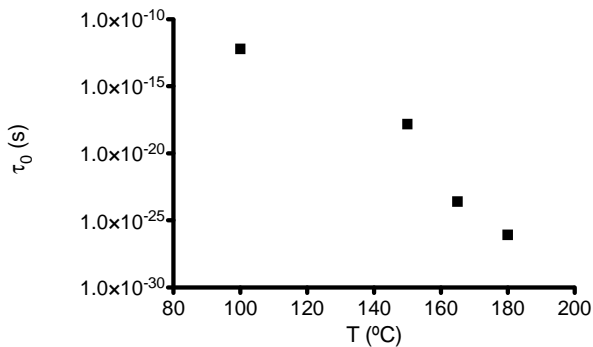


Figura 6.19. Factor pre-exponencial de la ecuación de Arrhenius, τ_0 , calculado para IONP-CIT100, IONP-CIT150, IONP-CIT165 y IONP-CIT180 respectivamente.

Además se observa que los valores de τ_0 disminuían a medida que aumentaba la temperatura de reacción lo que quiere decir que a medida que aumenta la temperatura de reacción, el número de interacciones y la agregación son mayores, acorde con un tamaño hidrodinámico mucho mayor de la muestra a 180 °C.¹⁵

Por último, se calculó el momento magnético efectivo por átomo de hierro (m_{eff}) para estas muestras. Para ello, primero se calculó la constante de Curie, C. En sistemas superparamagnéticos, como en este caso, la constante de Curie se relaciona con la susceptibilidad magnética (χ) a través de la siguiente ecuación:

$$\chi = C/T$$

donde χ es la susceptibilidad magnética, C la constante de Curie y T la temperatura. Una vez obtenido el valor de la constante de Curie se pudo calcular el momento magnético efectivo a través de la expresión:

$$C = \mu_0 N m_{\text{eff}} / (3k)$$

donde C es la constante de Curie, N el número de iones magnéticos por unidad de volumen y K la constante de Boltzmann. Como era de esperar, la muestra IONP-CIT100 presentó el momento efectivo más bajo ($13,4 \mu_B$), produciéndose un incremento de este valor a medida que se aumentaba la temperatura de reacción llegando a un momento de $74 \mu_B$ para IONP-CIT180 (figura 6.20).

Estos resultados sí concuerdan con los difractogramas de rayos X, donde la muestra IONP-CIT100 presentaba una fase amorfa y la muestra IONP-CIT180 fases más cristalinas. También explica el desplazamiento de las curvas de susceptibilidad magnética AC a medida que aumenta la temperatura de reacción, encontrando tamaños de partícula mayores y una progresión en la cristalinidad de las nanopartículas hacia fases más cristalinas a medida que aumenta la temperatura de reacción, así como un incremento

en las interacciones inter-partículas aunque la cantidad de surfactante también aumente.

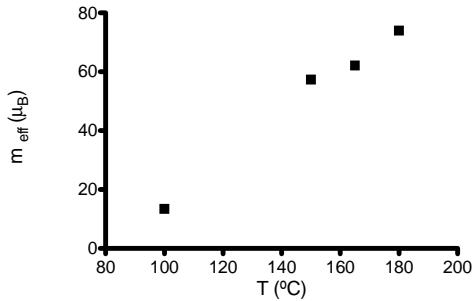


Figura 6.20. Momento magnético efectivo m_{eff} calculado para IONP-CIT100, IONP-CIT150, IONP-CIT165 y IONP-CIT180 respectivamente.

El aumento de la cristalinidad descrito anteriormente sugiere una mejoría de las propiedades como contraste respecto a IONP-CIT100, por lo que se midieron los tiempos de relajación transversal y longitudinal a 1.5 T y 37 °C. Los datos obtenidos fueron no obstante sorprendentes. Los valores altos de r_1 para IONP-CIT150 y IONP-CIT165 reflejaban el potencial para el uso de estas nanopartículas como agente de contraste con realce T_1 , llegando a $11.3 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ para IONP-CIT165 acompañados de valores modestos de r_2 . Sin embargo, en el caso de las nanopartículas IONP-CIT180, el valor de r_1 baja a 8.1 mientras que el r_2 sube hasta $71.5 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Estos valores apuntan a un posible uso de las nanopartículas IONP-CIT180 como agente de contraste con realce T_2 (figura 6.21a y 6.21b). Los valores de la relación r_2/r_1 obtenidos de son bajos en el caso de las nanopartículas sintetizadas a 150 °C y 165 °C mientras que en las nanopartículas IONP-CIT180 la relación aumentaba (figura 6.21c). Como se explicaba en la Introducción, este valor refleja enseguida la capacidad de contraste en MRI,

con contraste positivo las nanopartículas que presentan valores bajos en la relación y contraste negativo aquellas que tienen valores altos.¹⁶

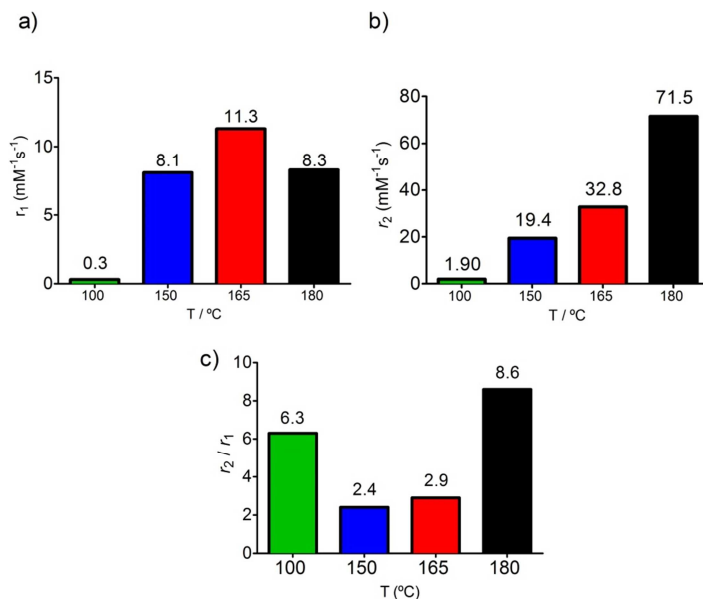


Figura 6.21. a) Representación de los valores de relajación longitudinal, r_1 , para las muestras IONP-CIT100 (verde), IONP-CIT150 (azul), IONP-CIT165 (rojo) y IONP-CIT180 (negro), b) Representación de los valores de relajación transversal, r_2 , para las muestras IONP-CIT100 (verde), IONP-CIT150 (azul), IONP-CIT165 (rojo) y IONP-CIT180 (negro), c) Representación de los valores de la relación r_2/r_1 para las muestras IONP-CIT100 (verde), IONP-CIT150 (azul), IONP-CIT165 (rojo) y IONP-CIT180 (negro).

En el caso de las nanopartículas IONP-CIT150 y IONP-CIT165, los tamaños de núcleo eran ligeramente superiores a los de la muestra IONP-CIT100 y la cristalinidad era mayor como mostraba el espectro de DRX. Esto produjo un aumento en los valores de saturación de magnetización y un aumento en los valores de relajación respecto a IONP-CIT100. El hecho de que presenten valores correspondientes a agentes de contraste con realce T_1 se debe a la combinación de varios factores; un tamaño pequeño de núcleo junto con una mayor cristalinidad además de una capa orgánica superficial

mayor, sin presencia de aglomerados. Todas estas características hacen que estas nanopartículas sean ideales para su uso como agentes de contraste positivo. La muestra IONP-CIT180 cambia hacia una conducta parecida a la de los agentes de contraste convencionales basados en nanopartículas de óxido de hierro. Este cambio se produce por el aumento de tamaño y del momento magnético efectivo. También se debe tener en cuenta que la presencia o ausencia de aglomerados influye en los tiempos de relajación.¹⁷ En el caso de la muestra IONP-CIT180 se producían aglomerados como se observaba tanto en las imágenes obtenidas por TEM como en los valores obtenidos para la interacción inter-partículas provocando cambios en los tiempos de relajación.

Finalmente se realizaron experimentos de imagen *in vivo* por Resonancia Magnética para corroborar el comportamiento como agentes de contraste de estas nanopartículas. Las muestras elegidas, por su diferente comportamiento, fueron IONP-CIT165 y IONP-CIT180. La elección se basó en los valores de relaxividad obtenidos en ambos casos. Teniendo en cuenta estos datos, las nanopartículas IONP-CIT165 deberían generar un contraste de realce T_1 mientras que en la muestra IONP-CIT180 tendría que aparecer un contraste de realce T_2 . De hecho, esto fue lo que se observó tras su administración endovenosa. En el caso de la muestra IONP-CIT165, se administró, por la vena de la cola, 100 μl de la muestra a concentración de 1 $\text{mg Fe}\cdot\text{mL}^{-1}$ a un ratón sano C57BL/6 de 8 semanas de edad. Noventa minutos tras la inyección se realizó una angiografía por Resonancia Magnética. Las imágenes obtenidas mostraron como las nanopartículas IONP-CIT165 generaban un contraste de realce T_1 de gran intensidad pudiendo diferenciar de forma clara toda la vasculatura del ratón, aorta, vena cava, carótida,

incluso vasos mucho más pequeños y las diferentes cámaras del corazón (figura 6.23).

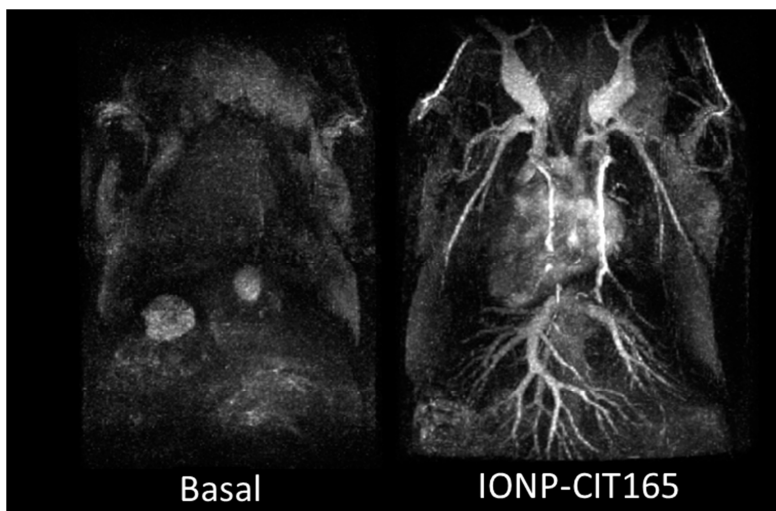


Figura 6.23. Angiografía por Resonancia Magnética de un ratón C57BL/6 sin inyectar nanopartículas (basal) y 90 minutos tras inyectar, de forma intravenosa, 100 µl de nanopartículas IONP-CIT165 a 1 mg Fe·mL⁻¹.

Este resultado, por un lado lo que cabría esperar, es sorprendente si se tiene en cuenta que las imágenes fueron adquiridas en un equipo de MRI con un campo magnético de 7 T donde la capacidad de generar contraste T₁, debido a la dependencia de los tiempos de relajación con el campo magnético, es mucho menor que en otros equipos.¹⁸ También se debe destacar que la angiografía fue realizada noventa minutos tras la inyección de las nanopartículas por lo que las nanopartículas IONP-CIT165 presentan un tiempo de circulación en sangre largo y mayor que el tiempo de circulación de las nanopartículas IONP-CIT100.

Para evaluar el comportamiento *in vivo* de las nanopartículas IONP-CIT180 se realizó una monitorización en el hígado de un ratón sano C57BL/6

dado que pensábamos que estas nanopartículas producirían contraste negativo, y este órgano es diana de casi todas las aplicaciones con nanopartículas de óxido de hierro porque es donde se acumulan mayoritariamente. Como se puede observar de forma clara en la figura 6.24, el contraste del hígado cambia 30 minutos tras inyectar, de forma intravenosa, 100 μ l de las nanopartículas IONP-CIT180 ($1 \text{ mg Fe}\cdot\text{mL}^{-1}$). En la imagen basal este órgano aparece brillante, sin embargo, 30 minutos tras inyectar las nanopartículas el tejido hepático presenta el típico oscurecimiento debido a la presencia de nanopartículas de óxido de hierro.

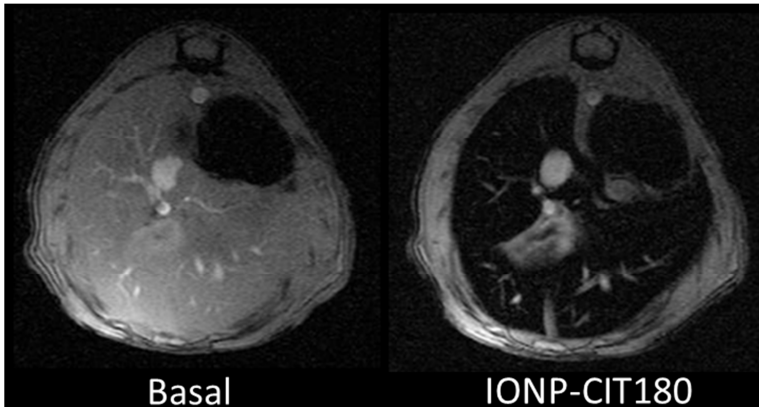


Figura 6.24. Imagen axial de MRI del hígado de ratón C57Bl/6 sin nanopartículas (basal) y 30 minutos tras inyectar las nanopartículas IONP-CIT180 de forma intravenosa.

Además las nanopartículas se encuentran ya en el hígado a los 30 minutos de la inyección por lo que presentan un tiempo de circulación en sangre corto, comportamiento muy frecuente en nanopartículas de óxido de hierro de mayor tamaño hidrodinámico que se eliminan mayoritariamente por el sistema retículoendotelial.

6.3.- Conclusiones

Se ha conseguido producir nanopartículas duales PET/MRI utilizando como surfactante ácido cítrico en lugar de dextrano.

El método, de nuevo, ha mostrado ser muy reproducible con rendimientos de marcado altos.

El nano-radiotrazador obtenido presentó un tiempo de circulación en sangre inferior a una hora y unas propiedades magnéticas poco útiles para aplicaciones de MRI.

Se ha realizado un estudio en función de la temperatura de reacción obteniéndose nanopartículas recubiertas con ácido cítrico a 150, 165 y 180 °C.

Un estudio en profundidad de las características fisicoquímicas de las muestras reveló un aumento en el tamaño hidrodinámico, tamaño de núcleo y cristalinidad a medida que aumentaba la temperatura de reacción.

Las nuevas muestras producidas a mayor temperatura presentaban un comportamiento magnético con valores de saturación de magnetización muy superiores. En todos los casos las nanopartículas mostraron un comportamiento superparamagnético.

La evaluación de las muestras como agentes de contraste por técnicas relaxométricas mostró la capacidad de producir contraste positivo en el caso de las muestras IONP-CIT150 y IONP-CIT165. A su vez los valores de relaxividad obtenidos para IONP-CIT180 indicaron la posibilidad de utilizar estas nanopartículas como agente de contraste negativo.

Los estudios *in vivo* de ratón muestran un ejemplo de la aplicación de las nanopartícula con realce positivo mediante técnicas de angiografía por Resonancia Magnética durante al menos 90 minutos tras la inyección de las IONP-CIT165.

Las nanopartículas IONP-CIT180 produjeron un fuerte contraste negativo en el hígado del ratón 30 minutos tras la inyección, corroborando así la capacidad de estas nanopartículas de producir también contraste con realce T_2 *in vivo*.

Por tanto, además de permitir la producción de nanoradiotrazadores de forma sencilla y muy reproducible, la síntesis por microondas hace posible modular las capacidades como agentes de contraste de estas nanopartículas, gracias a lo cual se puede obtener un espectro de nanopartículas que produzcan un fuerte realce en T_1 o en T_2 según se requiera tan solo cambiando la temperatura de reacción y en solo diez minutos de síntesis.

6.4.- Bibliografía

1. Peng, M. *et al.* Dextran-coated superparamagnetic nanoparticles as potential cancer drug carriers in vivo. *Nanoscale* **7**, 11155–11162 (2015).
2. Borny, R. *et al.* Nucleophilic cross-linked , dextran coated iron oxide nanoparticles as basis for molecular imaging: synthesis , characterization , visualization and comparison with previous product. *Contrast Media Mol. Imaging* **10**, 18–27 (2014).
3. Tassa, C., Shaw, S. Y. & Weissleder, R. Dextran-coated iron oxide nanoparticles: A versatile platform for targeted molecular imaging, molecular diagnostics, and therapy. *Acc. Chem. Res.* **44**, 842–852 (2011).
4. Reimer, P. & Balzer, T. Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications. *Eur. Radiol.* **13**, 1266–1276 (2003).
5. Blanco-Andujar C, Ortega D, Southern P, Pankhurst QA, T. N. High performance multi-core iron oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia: microwave synthesis, and the role of core-to-core interactions. *Nanoscale* **7**, 1768–75 (2015).
6. Saraswathy A, Nazeer SS, Jeevan M, Nimi N, Arumugam S, Harikrishnan VS, Varma PR, J. R. Citrate coated iron oxide nanoparticles with enhanced relaxivity for in vivo magnetic resonance imaging of liver fibrosis. *Colloids Surf B Biointerfaces* **1**, 216–24 (2014).
7. Taboada E, Rodríguez E, Roig A, Oró J, Roch A, M. R. Relaxometric and magnetic characterization of ultrasmall iron oxide nanoparticles with high magnetization. Evaluation as potential T1 magnetic resonance imaging contrast agents for molecular imaging. *Langmuir* **23**, 4583–8 (2007).
8. Schnorr, J. *et al.* Comparison of the iron oxide-based blood-pool contrast medium VSOP-C184 with gadopentetate dimeglumine for first-pass magnetic resonance angiography of the aorta and renal arteries in pigs. *Invest Radiol* **39**, 546–553 (2004).
9. Magnetic Resonance - Technology Information Portal. at <<http://www.mr-tip.com/serv1.php?type=db1&db=VSOP-C184>>
10. Wagner, S. *et al.* Contrast-enhanced MR imaging of atherosclerosis using citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Calcifying microvesicles as imaging target for plaque characterization. *Int. J. Nanomedicine* **8**, 767–779 (2013).

11. Saraswathy, A. *et al.* Citrate coated iron oxide nanoparticles with enhanced relaxivity for in vivo magnetic resonance imaging of liver fibrosis. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **117**, 216–224 (2014).
12. Hu, L., Percheron, A., Chaumont, D. & Brachais, C.-H. Microwave-assisted one-step hydrothermal synthesis of pure iron oxide nanoparticles: magnetite, maghemite and hematite. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **60**, 198–205 (2011).
13. Gutiérrez, L. *et al.* Ac magnetic susceptibility study of in vivo nanoparticle biodistribution. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **44**, 255002 (2011).
14. Laha, S. S., Regmi, R. & Lawes, G. Structural origin for low-temperature relaxation features in magnetic nanoparticles. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **46**, 325004 (2013).
15. Mørup, S., Hansen, M. F. & Frandsen, C. Magnetic interactions between nanoparticles. *Beilstein J. Nanotechnol.* **1**, 182–190 (2010).
16. Kim, B. H. *et al.* Large-scale synthesis of uniform and extremely small-sized iron oxide nanoparticles for high-resolution T1 magnetic resonance imaging contrast agents. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 12624–12631 (2011).
17. Carroll, M. R. J. *et al.* The effect of polymer coatings on proton transverse relaxivities of aqueous suspensions of magnetic nanoparticles. *Nanotechnology* **22**, 325702 (2011).
18. Rohrer M, Bauer H, Mintorovitch J, Requardt M, W. H. Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Invest Radiol.* **40**, 715–24 (2005).

Sección 2: Aplicaciones

Capítulo 7.- Nanopartículas para la caracterización *in vivo* de la placa de aterosclerosis en modelos murinos.

Capítulo 8.- Detección de fenómenos de angiogénesis mediante nanopartículas duales para PET/MR.

Capítulo 9.- Imagen selectiva de neutrófilos en modelos inflamatorios empleando nanopartículas duales.

CAPÍTULO

7

Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro para la caracterización *in vivo* de la placa de aterosclerosis en modelos murinos.

7.1.- Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) las enfermedades cardiovasculares (ECV) son, hoy en día, la principal causa de muerte en todo el mundo. Alrededor de 17.3 millones de personas murieron debido a enfermedades cardiovasculares en 2008, lo que representa el 30 % de todas las muertes a nivel mundial. De estas, se estima que 7.3 millones se debieron a una cardiopatía coronaria y 6.2 millones se debieron a un accidente cerebrovascular. Los países subdesarrollados y en vías de desarrollo se ven desproporcionadamente afectados: más del 80 % de las muertes por ECV se producen en estos países y se producen casi por igual en hombres y mujeres. Teniendo en cuenta los datos estimados por la OMS, más de 23 millones de personas morirán en 2030 a causa de estas enfermedades.¹

Un proceso subyacente dentro de las ECV es la formación de la placa de aterosclerosis. La aterosclerosis es un término referido al engrosamiento y endurecimiento de las arterias de mediano y gran calibre. Es un proceso inflamatorio crónico que afecta a las arterias de diferentes lechos vasculares que se caracteriza por el engrosamiento de la capa media e íntima con una consecuente pérdida de elasticidad (figura 7.1).²⁻⁵

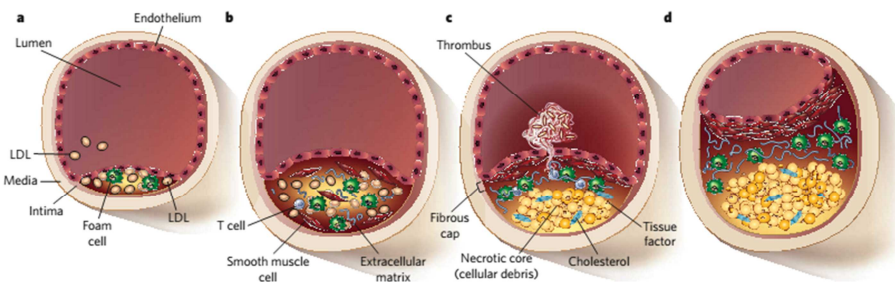


Figura 7.1. Representación de la formación de placa de aterosclerosis a 4 estadios diferentes. Fuente: *Nature* **451**, 904–913 (2008).

La placa está compuesta por una mezcla compleja de lípidos, colesterol, calcio, macrófagos y otros muchos componentes celulares y moleculares presentes en la sangre. Como hemos dicho clínicamente se manifiesta en forma de cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular o enfermedad arterial periférica (EAP), siendo en nuestro país la causa de 124000 muertes anuales.^{6,7}

Existen diferentes campos dentro de la investigación de la placa de aterosclerosis. Desde el estudio de la formación y los procesos que tienen lugar en las diferentes etapas de su desarrollo hasta el posible tratamiento de la misma que evite un desenlace de graves repercusiones para el individuo. Dentro de todas las posibilidades que se consideran para el estudio de la placa de aterosclerosis la imagen molecular es una elección prometedora para el diagnóstico precoz y evolución de un posible tratamiento mediante la caracterización e identificación de procesos moleculares tempranos de esta enfermedad.

El mayor riesgo que se encuentra dentro del desarrollo de la placa de aterosclerosis es la ruptura y/o desprendimiento de la misma causando infarto de miocardio o accidente cerebrovascular.⁸ Las placas capaces de desprenderse son denominadas placas vulnerables y presentan una serie de características comunes desde el punto de vista histopatológico. Dichas placas presentan un gran núcleo necrótico, remodelado de vasos, una capa fibrosa fina (<65 μm), infiltración de macrófagos que causan inflamación, hipoxia que desencadena neo-vascularización y finalmente una etapa temprana de microcalcificación.⁹⁻¹¹

Estos mismos elementos comunes presentes en las placas vulnerables pueden ser utilizados convenientemente como diana para su identificación a través de técnicas no invasivas de imagen avanzada.^{12,13}

Estas características presentes en placas vulnerables pueden estar relacionadas entre sí, de hecho, la formación de calcificaciones está directamente relacionada con la infiltración de macrófagos, y por tanto, con el proceso inflamatorio. En el proceso de generación de la placa de aterosclerosis los macrófagos producen un ciclo inflamatorio en respuesta a la acumulación de lípidos en la capa íntima de las arterias. Contrariamente a su propósito, la infiltración de macrófagos acelera la acumulación de lípidos aumentando el núcleo necrótico, una excesiva inflamación y los niveles de hipoxia.^{14,15} Además, durante el proceso, las células segregan citoquinas pro-inflamatorias y metaloproteinasas de matriz que debilitan activamente la capa fibrosa (única barrera entre el núcleo trombogénico y el lumen, ver figura 7.1).¹⁶⁻¹⁸ Como réplica a esta segregación, se produce en el vaso un proceso de calcificación que intenta poner un muro entre el lumen y el núcleo necrótico precisamente para evitar el riesgo de ruptura de la placa.¹⁹ Mucho antes de este estadio final de estabilización o calcificación de la placa, es posible detectar micro-calcificaciones gérmenes de lo que llegará a ser macro-calcificaciones en las últimas fases del desarrollo de la placa.

Las macro-calcificaciones están formadas principalmente por cristales de hidroxiapatita que dan estabilidad a la placa y reducen el riesgo de ruptura. Pueden ser detectadas por técnicas de imagen poco o nada invasivas como la Tomografía Computerizada (CT) o la angiografía por rayos X. Las micro-calcificaciones, sin embargo, parecen ser un indicador precoz

asociado seguramente a la presencia de placas vulnerables o inestables donde existe un alto riesgo de ruptura. Este tipo de calcificaciones, normalmente, no son visibles utilizando técnicas de imagen no invasivas.²⁰ Recientemente se ha mostrado que estas micro-calcificaciones pueden ser detectadas y visualizadas a través de la PET utilizando Na^{18}F como radiotrazador.²¹ Este trazador, debido a su afinidad hacia el calcio de los huesos, se emplea como herramienta de diagnóstico de enfermedades relacionadas con ciertas patologías óseas. El mecanismo por el cual el ^{18}F se acumula en los huesos es de sobra conocido. En primer lugar el ^{18}F se difunde a través de la red capilar dentro del fluido extracelular del hueso. Después, el ^{18}F produce una reacción de sustitución con los grupos hidroxilo presentes en la hidroxiapatita formando fluorapatita.²²⁻²⁴ Al igual que el hueso, el calcio presente en la placa de aterosclerosis se encuentra principalmente en forma de hidroxiapatita y es por ello que el ^{18}F puede ser utilizado para la detección de calcificaciones en la placa. Debido a la reducción de la relación superficie/volumen en las macro-calcificaciones la cantidad de grupos hidroxilos accesibles es mucho menor por lo que la acumulación de ^{18}F es mucho menor o nula, pudiendo visualizarse solo las micro-calcificaciones. Sin embargo, en modelos animales, debido a la afinidad del ^{18}F por el calcio, principalmente acumulado en los huesos, a veces resulta complicado distinguir entre la señal procedente de la micro-calcificación de las placas situadas sobre la zona descendente de la aorta y la señal intensa situada sobre la columna vertebral que transcurren paralelas y cercanas justo en esa zona. Esto unido a la baja resolución del PET ($\sim 1\text{mm}$) hace que sea muy difícil la detección de micro-calcificaciones de pequeño tamaño, especialmente en ratón.

Es por tanto muy relevante el papel del calcio en la formación y caracterización de la placa de aterosclerosis y su detección, especialmente de las micro-calcificaciones, es un campo de enorme interés dentro de la imagen molecular por dos motivos; por un lado su detección temprana es una opción muy interesante para detectar fenómenos moleculares iniciales de la formación de la placa y aparentemente una forma única de caracterizar su estabilidad. En este capítulo se ha investigado la posible detección de la placa de aterosclerosis por MRI utilizando el calcio como diana. Para conseguir dirigir hacia esos acúmulos de calcio un sistema basado en nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (IONPs), se funcionalizó el material de partida con ácido neridrónico (figura 7.2).

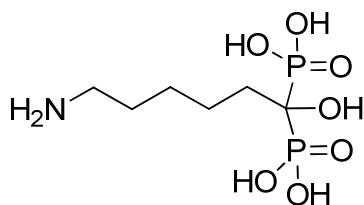


Figura 7.2. Estructura química del ácido Neridrónico.

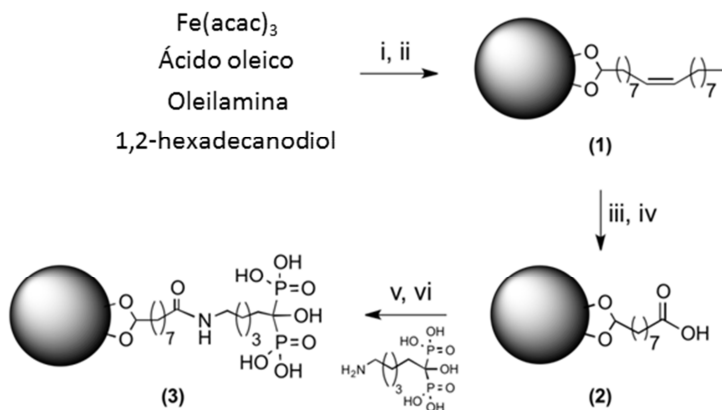
El ácido neridrónico es una molécula de la familia de los bifosfonatos. Los bifosfonatos son derivados químicamente estables de pirofosfato inorgánico y su uso en la clínica se remonta a más de 30 años.²⁵ La elección de este tipo de moléculas para dirigir las nanopartículas hacia la placa de aterosclerosis se basó en la conocida capacidad de los bifosfonatos para formar complejos con el calcio presente en la hidroxiapatita.²⁶ Este tipo de moléculas ya han sido descritas para la estabilización en agua de las IONPs debido a la afinidad que presentan los grupos fosfato por la superficie del núcleo de la nanopartícula, quedando estos bifosfonatos en la cara interna de la misma.²⁷⁻²⁹ En este trabajo se realizó una estrategia diferente, a saber,

el uso de este grupo funcional para decorar superficialmente la nanopartícula quedando los grupos fosfato expuestos en la cara externa de la misma, buscando la posible actividad biológica de estos compuestos y no sus propiedades como surfactantes.

Una aproximación similar ya ha sido descrita para el diseño de un agente de contraste para la detección de osteoporosis por MRI.³⁰ En nuestro caso, la conjugación de la nanopartícula con un bifosfonato tenía la finalidad de dirigir la sonda hacia la placa de aterosclerosis. Como punto de partida previo se eligieron las nanopartículas recubiertas de ácido azelaico descritas en el Capítulo 4. La síntesis rápida y reproducible que se consigue de estas nanopartículas hace que sean interesantes para su posterior funcionalización con el bifosfonato, permitiendo la obtención de un agente de contraste potencialmente útil para detectar y caracterizar el estado de la placa de aterosclerosis en tiempos mucho más cortos de los convencionales. La hipótesis inicial de trabajo fue, por tanto, considerar que la presencia de grupos bifosfonato en la superficie de la nanopartícula permitiría dirigirla hacia las micro-calcificaciones, generadas por la sobreexpresión de macrófagos, características de la placa de aterosclerosis incipiente o vulnerable.

7.2.- Resultados y discusión

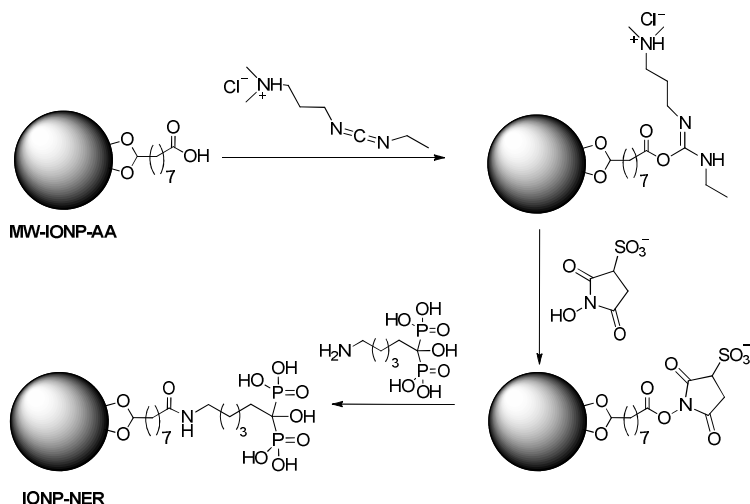
Para la obtención de las nanopartículas de óxido de hierro funcionalizadas con ácido neridróico (IONP-NER) se partió de las nanopartículas MW-IONP-AO producidas por síntesis por microondas (Capítulo 3). Desde estas se obtuvieron MW-IONP-AA (Capítulo 4) que fueron conjugadas posteriormente con el ácido neridróico (esquema 7.1).



Esquema 7.1. Síntesis de IONP-NER (3). Reactivos y condiciones: (i) 60 °C, 2 min.; (ii) 180 °C, 20 min.; (iii) KMnO_4 , BTACL, 105 °C, 300 W, 9 min.; (iv) pH 2.9, 105 °C, 300 W, 9 min.; (v) EDC, sulfo-NHS, pH 7.0, 30 min.; (vi) HEPES pH 7.7, 2 h.

Para realizar la conjugación entre las nanopartículas MW-IONP-AA y el ácido neridrónico se utilizó una síntesis tradicional en química orgánica vía EDC/sulfo-NHS para la formación de un enlace amida. Esta aproximación es la más lógica dados los grupos funcionales presentes en ambos compuestos. Las nanopartículas MW-IONP-AA presentan grupos carboxilo en su cara externa mientras que el ácido neridrónico tiene una amina primaria, lo que hace que la formación de un enlace amida entre los dos sea, en principio, sencillo. Existen diferentes formas de realizar esta conjugación. En este caso se eligió una síntesis clásica a través de EDC/Sulfo-NHS. El mecanismo pasa por la formación de un éster no estable y muy reactivo derivado de la urea que reacciona con la N-hidroxisulfosuccinimida formando un intermedio más estable que incrementa la eficiencia de la reacción de sustitución final con la amina primaria (esquema 7.2). Al tratarse de nanopartículas es clave la utilización de la sulfo-NHS en lugar de la más habitual NHS ya que de esta

forma se garantiza que el éster intermedio tenga la suficiente estabilidad coloidal.



Esquema 7.2. Formación del enlace amida vía EDC/Sulfo-NHS entre MW-IONP-AA y el ácido neridrónico.

Una vez realizada la conjugación con el ácido neridrónico se procedió a realizar la caracterización fisicoquímica de la muestra. En los capítulos 3 y 4 se han mostrado las propiedades de las nanopartículas precursoras MW-IONP-AO y MW-IONP-AA, por tanto, este capítulo nos centraremos en el estudio de las nanopartículas IONP-NER.

Comenzando por el núcleo de la nanopartícula, las imágenes de TEM revelaron un tamaño de 5.5 ± 0.7 nm (calculado como tamaño medio entre 50 partículas, figura 7.3). Además, estas imágenes muestran una distribución homogénea de tamaños de núcleo así como la ausencia de agregación entre partículas.

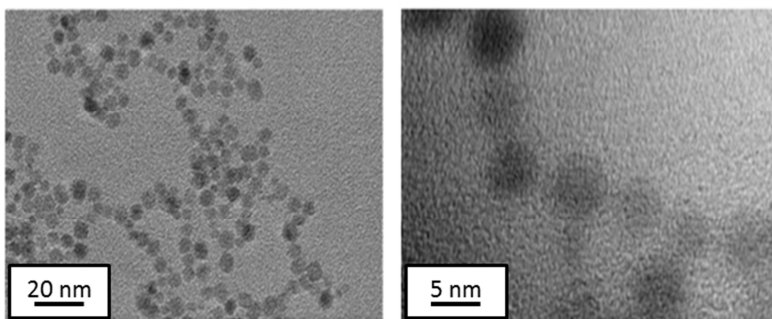


Figura 7.3. Imágenes TEM de IONP-NER.

A continuación se midió el tamaño hidrodinámico de las partículas. La curva DLS reveló un tamaño hidrodinámico medio de 40 ± 4 nm obteniéndose una distribución estrecha de tamaños (figura 7.4). Este valor supone un aumento pequeño si se compara con el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas precursoras MW-IONP-AA que presentaban un valor medio de 30 ± 5 nm, algo esperable debido a la conjugación del ácido azelaico con el ácido neridróico.

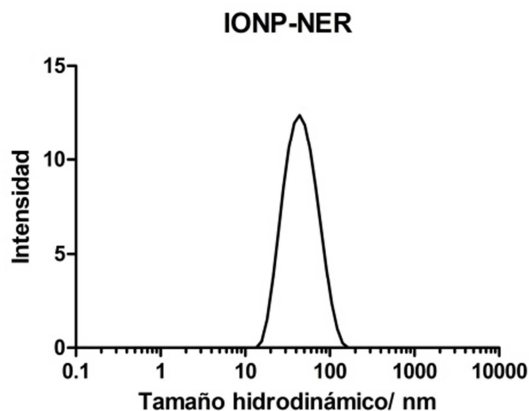


Figura 7.4. Curva tamaño hidrodinámico de IONP-NER.

Para caracterizar la superficie de las nanopartículas se realizó un espectro de FTIR. Si se compara este espectro con el de la nanopartículas

MW-IONP-AA, se puede observar cómo la banda de estiramiento correspondiente al grupo carbonilo del ácido azelaico presente a 1660 cm^{-1} ahora se encuentra a 1636 cm^{-1} debido a la formación del enlace amida entre dicho ácido y el neridrónico. Además aparecen nuevas bandas a 1179 y 1043 cm^{-1} presentes en el espectro FTIR del ácido neridrónico (figura 7.5).

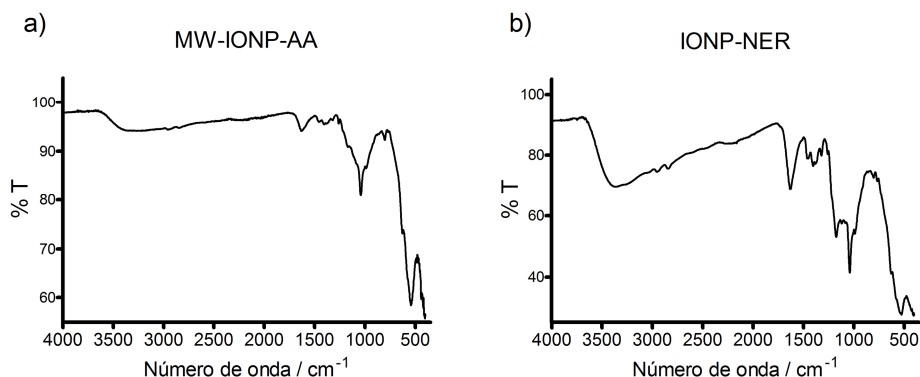


Figura 7.5. a) Espectro FTIR de las nanopartículas MW-IONP-AA, b) Espectro FTIR de las nanopartículas IONP-NER.

Con el objetivo de corroborar la presencia del ácido neridrónico, aparte del espectro de FTIR, se realizó un análisis por EDX. Dicho experimento reveló la presencia de fósforo en las nanopartículas con una abundancia del 10.5 % en relación con el Fe presente en las mismas (figura 7.6).

De estos experimentos se puede concluir que la conjugación entre las nanopartículas IONP-AA y el ácido neridrónico a través de la reacción con EDC/sulfo-NHS se realizó de forma satisfactoria.

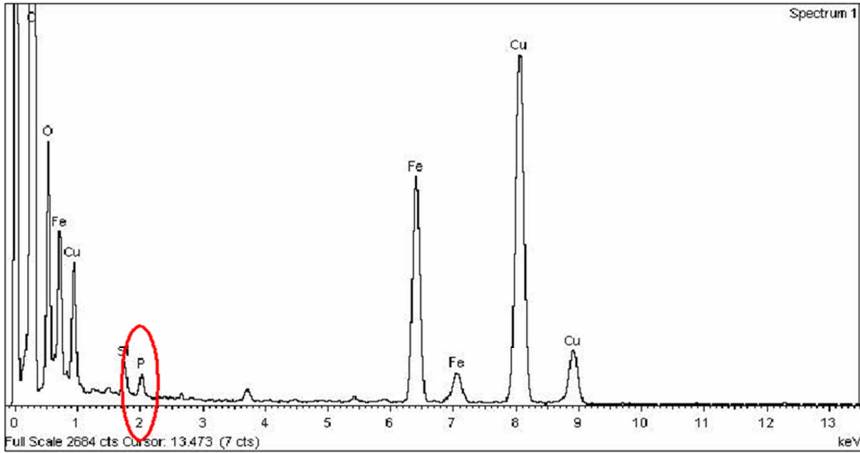


Figura 7.6. Espectro EDX de las nanopartículas IONP-NER.

Prosiguiendo con la caracterización, se evaluaron las propiedades magnéticas de la muestra IONP-NER. Para ello se midieron los valores de relaxividad longitudinal y transversal a 37 °C y 1.5 T. Las nanopartículas IONP-NER presentaron un valor de r_1 de $11.2 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ y de r_2 de $93.3 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Estos valores son muy parecidos a los obtenidos para las nanopartículas MW-IONP-AA y confirman la posibilidad de utilizar las nanopartículas IONP-NER como contraste negativo en MRI (figura 7.7). Estos valores son ligeramente menores en el caso de r_2 y mayores en el caso de r_1 que aquellos obtenidos por síntesis tradicionales. Este comportamiento, como se ha explicado en secciones anteriores, se debe al calentamiento tan rápido empleado en la síntesis por microondas. No obstante, los valores todavía se encuentran en un rango óptimo para poder utilizar las nanopartículas como agente de contraste negativo.³¹

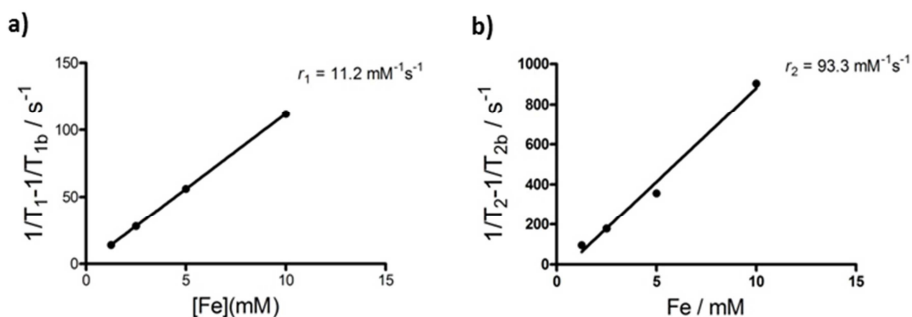


Figura 7.7. a) Medidas de relajación longitudinal, T_1 , y b) de la relajación transversal, T_2 , frente a concentración de hierro para la obtención de la relaxividad longitudinal y transversal de las IONP-NER, respectivamente.

Llegados a este punto se continuó evaluando la afinidad de las nanopartículas hacia el Ca^{2+} . La hipótesis inicial de trabajo era conseguir dirigir las nanopartículas de óxido de hierro hacia la placa de aterosclerosis aprovechando la gran afinidad que presentan los bifosfonatos hacia el calcio mayoritariamente en forma de hidroxapatita. Por tanto, se realizó una primera prueba sencilla para elucidar si las nanopartículas IONP-NER presentaban afinidad hacia este catión. Es conocido que los tiempos de relajación de las nanopartículas cambian cuando se forman agregados en la suspensión debido, entre otros factores, a la anisotropía inducida por los acoplamiento dipolares entre los nanocristales vecinos, siendo mayor cuanto menor es esta distancia.³² Aprovechando esta característica, se incubaron durante un periodo hasta de dos horas a temperatura fisiológica de 37 °C las nanopartículas con disoluciones de distintas concentraciones de CaCl_2 . Después de este periodo se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se midió el tiempo de relajación transversal en cada una de ellas. Si las nanopartículas presentasen afinidad hacia el Ca^{2+} , el tiempo de relajación debería aumentar a medida que las nanopartículas se fueran agregando. De

hecho, este fue el resultado obtenido. Como se observa en la figura 7.8, el tiempo de relajación T_2 aumenta a medida que crece la concentración del Ca^{2+} añadido así como el tiempo de incubación. Incluso a una concentración tan baja de Ca^{2+} como $12 \mu\text{M}$, las partículas presentaron un incremento en el tiempo de relajación transversal, mientras que con $0 \mu\text{M}$ no se producía ninguna variación. Con este experimento se puede observar la alta afinidad de las IONP-NER hacia el Ca^{2+} .

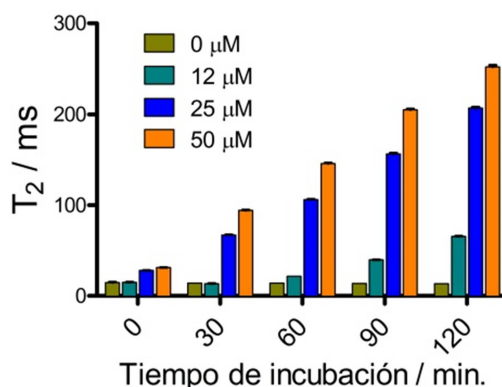


Figura 7.8. Evolución del tiempo de relajación T_2 de IONP-NER con el tiempo y diferentes concentraciones de Ca^{2+} .

Una vez caracterizada la muestra y habiendo comprobado la capacidad de las nanopartículas para unirse al calcio, se procedió a realizar los estudios *in vitro* para evaluar su citotoxicidad. Para estos ensayos se utilizaron células procedentes de fibroblastos de ratón adulto (MAFs, Mouse Adult Fibroblast) de la especie C57BL/6. Las nanopartículas se incubaron a tres concentraciones diferentes $10 \mu\text{g}/\text{mL}$, $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ y $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ y se analizó tanto la viabilidad como la proliferación celular. En ninguno de los dos casos se observó un cambio significativo en comparación con el control

(células sin nanopartículas) por lo que se puede concluir que las nanopartículas IONP-NER no presentan aparentemente ningún efecto citotóxico (figura 7.9).

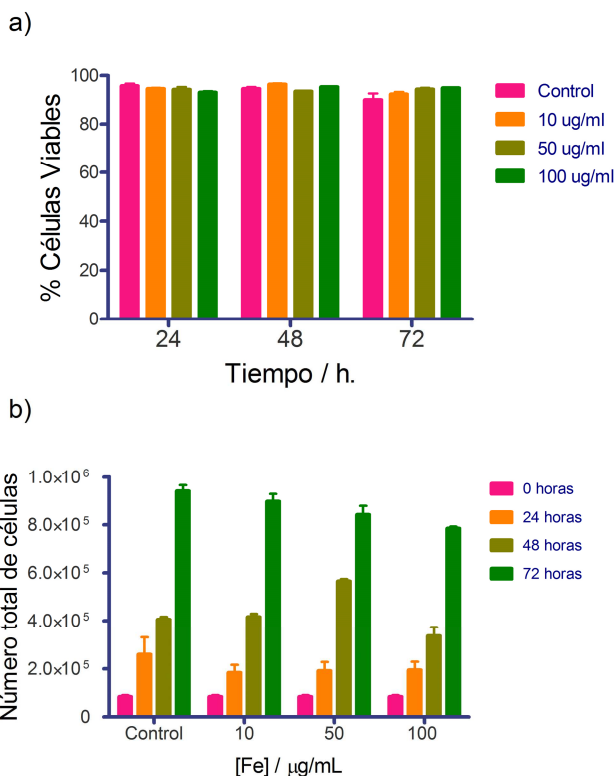


Figura 7.9. a) Viabilidad celular después de incubar MAFs con IONP-NER a tres concentraciones y tiempos diferentes, b) Proliferación celular después de incubar MAFs con IONP-NER a tres concentraciones y tiempos diferentes.

Continuando con los ensayos *in vitro*, se realizaron dos experimentos más para estudiar la interacción de las nanopartículas con la células. Con estos experimentos queríamos comprobar si las nanopartículas eran capaces de atravesar la membrana citoplasmática de la célula o simplemente se quedaban unidas a dicha membrana por su cara externa. En primer lugar llevamos a cabo una incubación con las nanopartículas IONP-NER utilizando

las mismas concentraciones que en los ensayos de citotoxicidad. Después se recogió el cultivo celular que fue fijado y teñido con azul de Prusia, también conocido como tinción Perls. En dicha tinción se generan cristales insolubles de $\text{Fe}_7(\text{CN})_{18}(\text{H}_2\text{O})_x$ por la presencia del hierro-III de las partículas. Además, empleamos una contra-tinción con rojo rápido nuclear (nuclear fast red) para teñir el núcleo de la célula de rojo. Las imágenes tomadas por microscopio óptico mostraron grandes diferencias entre el control y las células incubadas con las nanopartículas. También revelaron que además de una acumulación de nanopartículas en la cara externa de la membrana celular, había una gran entrada de las nanopartículas dentro de las células (figura 7.10a). Esto fue corroborado a través de un segundo experimento empleando la técnica de citometría de flujo. Esta técnica permite distinguir entre poblaciones de células en función de algún parámetro o propiedad en concreto. En este caso lo que se observa fue un aumento de la rugosidad y por tanto complejidad de la célula debida seguramente a la presencia de las nanopartículas en el interior de la misma. Los cambios fueron significativos con respecto al control para las concentraciones utilizadas 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (figura 7.10b).

Finalmente, se realizaron los experimentos *in vivo* en modelo murino. En este caso utilizamos ratones *ApoE* knockout (*ApoE*^{-/-}) al ser el modelo murino clásico de placa de aterosclerosis. Estos son ratones procedentes de la base C57BL/6 en los que se ha delecionado el gen que codifica la apolipoproteína E. La apolipoproteína E es una proteína formada por 299 aminoácidos constituyente principal de diversos tipos de lipoproteínas. Los ratones *ApoE*, deficientes en el gen productor de esta proteína, desarrollan hiperlipidemia que desencadena valores altos de

colesterol en sangre.³³ Esta particularidad hace que este tipo de ratones frente a los ratones de los que proceden desarrollen placa de aterosclerosis con el transcurso del tiempo. El proceso de formación de placa puede ser acelerado haciendo que los ratones consuman una dieta rica en colesterol, en cuyo caso, nos encontramos con que las primeras fases de la formación de la placa se dan a partir de la 8 semanas de consumo de esta dieta.³⁴

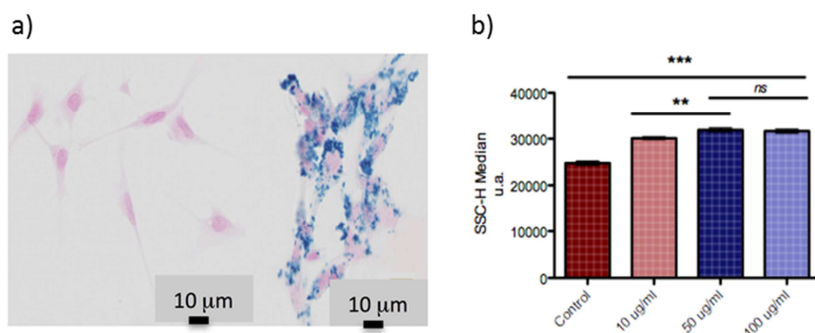


Figura 7.10. a) Tinción de Perl's en células control (izquierda) e incubadas con IONP-NER (derecha) durante 24 horas (C=50 µg/mL). Barra= 10 µm; b) Resultados para dispersión lateral (SSC-H) a tres concentraciones diferentes de IONP-NER (10, 50 and 100 µg/mL) tras 24 horas de incubación.

Para este estudio se emplearon ratones *ApoE*^{-/-} de 48 semanas de edad que habían consumido una dieta normal. En este caso, el proceso de formación de la placa es más lento, apareciendo signos de lesión aterosclerótica a partir de las 20-25 semanas.³⁵ Aunque el tiempo de espera es mayor utilizando una dieta normal, el desarrollo de la placa se produce de una forma más natural. Para comprobar que los ratones utilizados eran realmente ratones *ApoE*^{-/-} se realizó un análisis de sangre a 3 de ellos para medir los valores de colesterol, LDL, HDL y triglicéridos. Como indican los valores presentados en la tabla 7.1, los tres ratones presentaban valores más altos que aquellos obtenidos para un ratón C57BL/6 normal.³⁶

Tabla 7.1. Bioquímica para triglicéridos, LDL, HDL y colesterol total de 1 ratón C57BL/6 y 3 ratones *ApoE*^{-/-} de 48 semanas de edad.

Prueba	C57BL/6	ApoE-1	ApoE-2	ApoE-3
Triglicéridos (mg/dL)	84	51	68	105
LDL (mg/dL)	20.34	81.76	83.48	120.86
HDL (mg/dL)	70.12	255.46	293.28	288.43
Colesterol total (mg/dL)	93.37	360.1	415.4	460.7

Para los experimentos por MRI lo primero que se hizo fue tomar una imagen basal, es decir, sin nanopartículas inyectadas. La imagen fue tomada en la aorta abdominal cerca de la bifurcación renal. La elección de esta zona trata de minimizar la presencia de artefactos de flujo que puedan dar lugar a equívoco a la hora de ver el contraste, siendo además una zona típica de formación de placa. Aunque el arco aórtico es en la mayoría de los casos la zona con mayor lesión aterosclerótica, con frecuencia se pueden encontrar problemas de artefactos debido al alto flujo sanguíneo de esta zona. Una vez localizada la zona aterosclerótica, se inyectaron, 100 μ l de nanopartículas IONP-NER a una concentración de 1 mg Fe/mL de forma intravenosa por la cola del ratón. La imagen fue tomada 1 hora tras la inyección en la misma zona que en la imagen basal. Como muestra la figura 7.11, tras ese periodo las nanopartículas se encontraban en la zona de la placa resaltando un mayor contraste negativo, es decir, oscureciendo la zona donde se habían acumulado.

Estos resultados permiten destacar las ventajas e inconvenientes de los agentes de contraste con realce en T_2 para MRI; por un lado se pueden

emplear concentraciones muy pequeñas de agente de contraste dada la sensibilidad de las partículas superparamagnéticas pero, por otro lado, las imágenes con realce en T₂ o contraste negativo presentan serios problemas de confusión con zonas necróticas o artefactos de flujo que, ya pudieran aparecer en la imagen basal, lo que hace muy complicado la identificación y caracterización del área afectada.

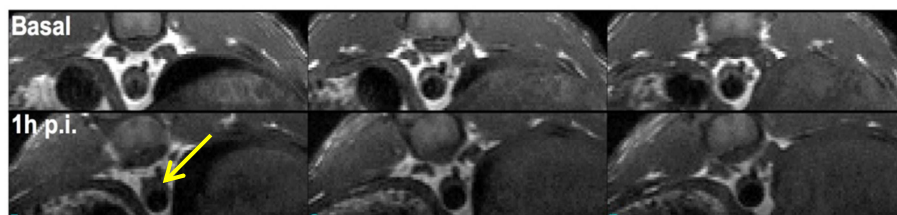


Figura 7.11. Imagen por Resonancia Magnética *in vivo* de un ratón ApoE^{-/-} antes (arriba) y 1 hora después (abajo) de la inyección intravenosa de IONP-NER.

Para corroborar la acumulación de IONP-NER en la placa de aterosclerosis se cuantificó el cambio de intensidad observado. Para ello seleccionamos dos regiones de interés (en inglés, ROIs) de la placa y dos ROIs del músculo, donde al no esperarse captación de las nanopartículas, se emplea como referencia. Al representar la intensidad relativa entre estas dos zonas se observó una disminución significativa en la relación placa/músculo para la imagen tomada 1 hora tras la inyección de las nanopartículas comparada con la relación placa/músculo para la imagen basal (figura 7.12).

Para descartar que el cambio de intensidad fuera debido a la circulación en sangre de las partículas y no a la acumulación en placa proporcionada por el neridronato, se realizó un experimento en el cual monitorizamos la presencia de estas nanopartículas en el hígado.

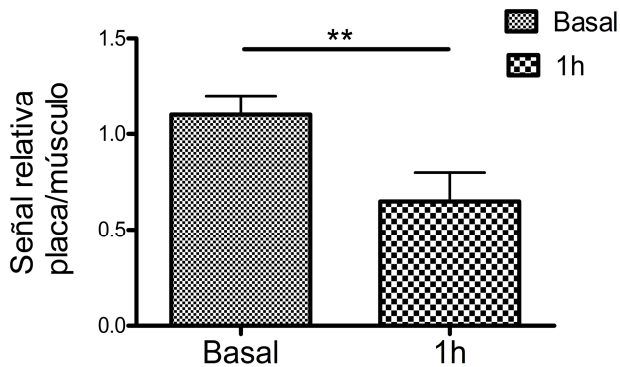


Figura 7.12. Relación de intensidad Placa/Músculo sin nanopartículas (basal) y 1 hora tras inyectar IONP-NER.

Como se ha descrito en capítulos anteriores, uno de los órganos principales de eliminación de las nanopartículas de un tamaño como las empleadas en este estudio es el hígado. Por tanto, si se evalúa la intensidad relativa entre el hígado y el músculo se puede estimar cuándo las nanopartículas se han eliminado completamente. A medida que las nanopartículas se van acumulando en el hígado la intensidad irá disminuyendo dando un valor en la relación hígado/músculo menor. Una vez que las nanopartículas hayan sido eliminadas del torrente sanguíneo este cociente de intensidades será constante al no producirse cambios de concentración. Como se muestra en la figura 7.13, las nanopartículas IONP-NER son eliminadas en un tiempo próximo a 20 minutos por lo que nos aseguramos que no quedaban partículas en circulación a la hora post-inyección.

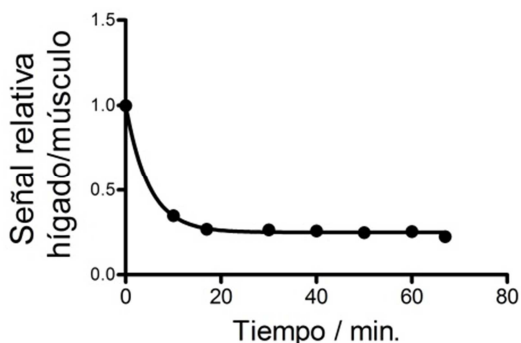


Figura 7.13. Señal relativa hígado/músculo a diferentes tiempos tras inyectar IONP-NER.

Además de la cuantificación, también realizamos dos experimentos *ex vivo*. En el primero de ellos, se extrajeron las aortas de los ratones con y sin nanopartículas a las que se les realizó otro experimento de MRI. Las aortas fueron sumergidas en Fomblin. El Fomblin es un lubricante inerte perfluorado que en este caso permite adquirir imágenes de MRI sin fondo ya que esta sustancia no tiene ningún protón en su molécula. La imagen *ex vivo* permitió comprobar el resultado obtenido *in vivo* con una señal hipo-intensa que indica con mayor claridad la acumulación de las nanopartículas en la aorta (figura 7.14).

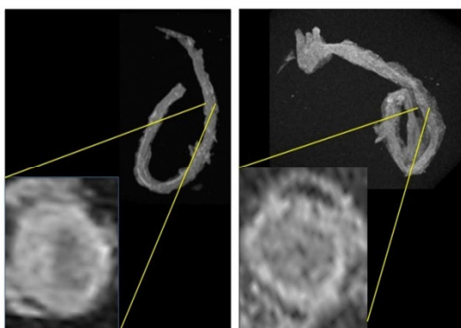


Figura 7.14. Imágenes *ex vivo* de aorta basal (izquierda) y aorta 24 horas tras inyectar IONP-NER (derecha).

Para concluir realizamos un estudio histológico de las aortas extraídas. Para ello, se realizaron diferentes tinciones con el objetivo de ver coincidencias entre diferentes elementos. Las tinciones elegidas fueron: Tricrómica para visualizar la fibrosis de la placa, Perls para detectar el hierro-III de las partículas, F480 para diferenciar macrófagos y Von Kossa para teñir el calcio presente. La tinción Tricrómica permite ver la fibrosis de la placa, que aparece en un periodo de desarrollo tardío de la misma. Allí donde se presente esta fibrosis aparecen zonas de coloración más azuladas. En el caso de la tinción con F480 se consiguen teñir los macrófagos que aparecerán de un color marrón y nos permitirá asociar la presencia de las nanopartículas a la actividad fagocítica de estas células. Esta coloración es la que aparece también para los depósitos de calcio utilizando la tinción Von Kossa. Teniendo en cuenta todas estas tinciones se pudo apreciar en la imagen (figura 7.15), una clara correlación entre los pequeños depósitos de calcio y las nanopartículas (azul). Además este tipo de acumulación coincide también con zonas de mayor actividad o presencia de macrófagos. Por tanto, queda demostrada la afinidad de las nanopartículas IONP-NER hacia las calcificaciones presentes en la placa. Estas calcificaciones no corresponden con las calcificaciones que se detectan por tomografía computarizada, que se asocia a estadios ya más tardíos en los que la placa se estabiliza para evitar su desprendimiento.

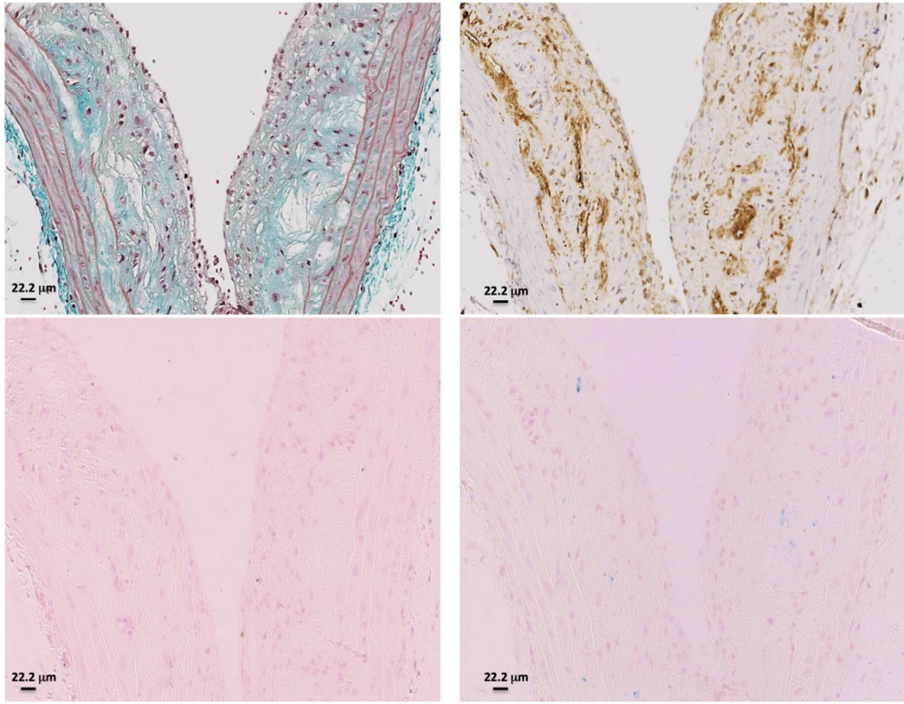


Figura 7.15. Cortes histológicos de aorta con tinción (de izquierda a derecha) tricrómica, F480, Von Kossa y Perls; barra de escala = 22.2 μm.

7.3.- Conclusiones

Se ha conseguido conjugar las nanopartículas MW-IONP-AA con el ácido neridróico de forma satisfactoria a través de la formación de enlaces amida con el surfactante.

Estas nanopartículas, denominadas IONP-NER, fueron caracterizadas mostrando buenos valores de relaxividad para su uso como agentes de contraste en MRI.

Las nanopartículas IONP-NER tienen una alta afinidad hacia Ca^{2+} incluso en presencia de pequeñas concentraciones de este catión.

Estudios de citotoxicidad confirman los nulos efectos tras su incubación a concentraciones mayores de las usadas *in vivo*. Además estas nanopartículas son capaces de internalizarse en las células sin producir aparentemente ningún efecto adverso.

Tanto los experimentos *in vivo* como los *ex vivo* demuestran la capacidad de unión de las nanopartículas IONP-NER a componentes celulares de la placa de aterosclerosis produciendo un cambio de contraste en la zona de acumulación y por tanto su posible utilización para caracterización molecular de la misma.

Los cortes histológicos corroboraron la presencia de nanopartículas en la aorta, correlacionándose con la presencia de macrófagos y con las zonas de mayor acumulación de calcio mostrando así la capacidad de IONP-NER de dirigirse a estas zonas donde coincide una mayor presencia de macrófagos, presentes en la placa de aterosclerosis inflamada.

7.4.- Bibliografía

1. World Health Organization. at http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/
2. Stary, H. C. *et al.* A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 1512–1531 (1995).
3. Viles-Gonzalez, J. F., Fuster, V. & Badimon, J. J. Atherothrombosis: A widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *European Heart Journal* **25**, 1197–1207 (2004).
4. Rauch, U. *et al.* Thrombus formation on atherosclerotic plaques: Pathogenesis and clinical consequences. *Annals of Internal Medicine* **134**, 224–238 (2001).
5. Leys, D. Atherothrombosis: a major health burden. *Cerebrovasc. Dis.* 11 Suppl 2, 1–4 (2001).
6. Rader, D. J. & Daugherty, A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* **451**, 904–913 (2008).
7. Lahoz, Carlos y Mostaza, J. M. La aterosclerosis como enfermedad sistémica. *Rev Esp Cardiol.* **60**, 184–95 (2007).
8. Naghavi, M. *et al.* Review : Current Perspective From Vulnerable Plaque to Vulnerable Patient A Call for New Definitions and Risk Assessment Strategies : Part I Vulnerable Patient : Part I. *Circulation* **108**, 1664–72 (2003).
9. Finn, A. V., Nakano, M., Narula, J., Kolodgie, F. D. & Virmani, R. Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **30**, 1282–1292 (2010).
10. Virmani, R. *et al.* in *The Vulnerable Atherosclerotic Plaque: Strategies for Diagnosis and Management* 19–36 (2007). doi:10.1002/9780470987575.ch2
11. Virmani, R., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Farb, A. & Schwartz, S. M. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1262–1275 (2000).
12. Calvert, P. A. *et al.* Association between IVUS findings and adverse outcomes in patients with coronary artery disease: The VIVA (VH-IVUS in vulnerable atherosclerosis) study. *JACC Cardiovasc. Imaging* **4**, 894–901 (2011).
13. Rogers, I. S. *et al.* Feasibility of fdg imaging of the coronary arteries: Comparison between acute coronary syndrome and stable angina. *JACC Cardiovasc. Imaging* **3**, 388–397 (2010).

14. Moore, K. J., Sheedy, F. J. & Fisher, E. a. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 709–21 (2013).
15. Leitinger, N. & Schulman, I. G. Phenotypic polarization of macrophages in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 1120–1126 (2013).
16. Hansson, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1685–1695 (2005).
17. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **420**, 868–874
18. Van der Wal, A. C., Becker, A. E., van der Loos, C. M. & Das, P. K. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* **89**, 36–44 (1994).
19. Abedin, M., Tintut, Y. & Demer, L. L. Vascular calcification: Mechanisms and clinical ramifications. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **24**, 1161–1170 (2004).
20. Otsuka, F., Finn, A. V. & Virmani, R. Do vulnerable and ruptured plaques hide in heavily calcified arteries? *Atherosclerosis* **229**, 34–37 (2013).
21. Joshi, N. V. *et al.* 18F-fluoride positron emission tomography for identification of ruptured and high-risk coronary atherosclerotic plaques: A prospective clinical trial. *Lancet* **383**, 705–713 (2014).
22. BLAU, M., NAGLER, W. & BENDER, M. A. Fluorine-18: a new isotope for bone scanning. *J. Nucl. Med.* **3**, 332–334 (1962).
23. Blau, M., Ganatra, R. & Bender, M. A. 18 F-fluoride for bone imaging. *Semin. Nucl. Med.* **2**, 31–37 (1972).
24. Hawkins, R. A. *et al.* Evaluation of the skeletal kinetics of fluorine-18-fluoride ion with PET. *J. Nucl. Med.* **33**, 633–642 (1992).
25. Drake, M. T., Clarke, B. L. & Khosla, S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin. Proc.* **83**, 1032–1045 (2008).
26. Nancollas, G. H. *et al.* Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: Differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone* **38**, 617–627 (2006).
27. Robinson, D. B. *et al.* DNA-functionalized MFe₂O₄ (M = Fe, Co, or Mn) nanoparticles and their hybridization to DNA-functionalized surfaces. *Langmuir* **21**, 3096–3103 (2005).
28. Lalatonne, Y. *et al.* Bis-phosphonates-ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a platform towards diagnosis and therapy. *Chem. Commun. (Camb)*. 2553–2555 (2008). doi:10.1039/b801911h

29. Karimi, A. *et al.* In vitro and in vivo evaluation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated by bisphosphonates: The effects of electrical charge and molecule length. *Eur. J. Pharm. Sci.* **49**, 101–108 (2013).
30. Lalatonne, Y. *et al.* Superparamagnetic bifunctional bisphosphonates nanoparticles: a potential MRI contrast agent for osteoporosis therapy and diagnostic. *J. Osteoporos.* **2010**, 747852 (2010).
31. Rohrer, Martin; Bauer, Hans; Mintorovitch, Jan; Requardt, Martin; Weinmann, H.-J. Comparison of Magnetic Properties of MRI Contrast Media Solutions at Different Magnetic Field Strengths. *Invest. Radiol.* **40**, 715–724 (2005).
32. Smolensky, E. D. *et al.* Scaling Laws at the Nano Size: The Effect of Particle Size and Shape on the Magnetism and Relaxivity of Iron Oxide Nanoparticle Contrast Agents. *J. Mater. Chem. B. Mater. Biol. Med.* **1**, 2818–2828 (2013).
33. Meir, K. S. & Leitersdorf, E. Atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse: A decade of progress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **24**, 1006–1014 (2004).
34. Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L. & Ross, R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler. Thromb.* **14**, 133–140 (1994).
35. Jawień, J., Nastałek, P. & Korbut, R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J. Physiol. Pharmacol.* **55**, 503–517 (2004).
36. Praticò, D., Tangirala, R. K., Rader, D. J., Rokach, J. & FitzGerald, G. A. Vitamin E suppresses isoprostane generation in vivo and reduces atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Nat. Med.* **4**, 1189–1192 (1998).

CAPÍTULO

8

Detección de fenómenos de angiogénesis
mediante nanopartículas duales para PET/MR

8.1.- Introducción

El fenómeno de la angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes.¹ Se trata de un proceso natural que se produce en individuos sanos, formándose nuevos vasos sanguíneos de tamaño capilar que desempeñan una función importante en una gran cantidad de procesos fisiológicos, asociados o no a una patología. El cuerpo controla la angiogénesis mediante un equilibrio preciso de producción de factores de crecimiento y factores inhibidores en los tejidos sanos (tabla 8.1). Los factores proangiogénicos (de crecimiento) comienzan la generación de nuevos vasos sanguíneos induciendo la proliferación de células endoteliales vasculares mientras que las moléculas antiangiogénicas (factores angiostáticos) antagonizan el efecto de los factores angiogénicos.²⁻⁴

El proceso de angiogénesis comienza como respuesta a los factores que activan las células endoteliales que recubren los capilares preexistentes (figura 8.1). Los pericitos, células que envuelven las células endoteliales inhibiendo su proliferación, se separan de la pared de los vasos y se liberan de la membrana basal por degradación proteolítica, la cual es mediada por proteínas denominadas metaloproteinasas. Las células endoteliales pierden sus uniones y los vasos nacientes se dilatan. Factores angiogénicos como el VEGF incrementan la permeabilidad vascular de las células endoteliales, lo que causa una extravasación de proteínas del plasma y establecen una matriz extracelular (ECM) provisional.

Tabla 8.1. Algunos factores implicados en el proceso de angiogénesis⁵

Factores angiogénicos	Factores angiostáticos
Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)	Trombospondina-1 (TSP-1)
Angiopoietina-1 (ANG-1)	Interferón- α (INF- α)
Factores de crecimiento fibroblástico (FGFs)	Factor plaquetario 4 (PF-4)
Factor de Necrosis Tumoral (TNF)	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs)
Triptasa	Interleuquina 12 (IL-12)
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	Angiostatina
Factor de crecimiento transformante β (TGF- β)	Endostatina
Proteínas NOTCH	Retinoides
Citoquina IL-6	Tumstatina
Quimiocina IL-8	Vasculostatina
Metaloproteinasas (MMP-9)	Interferón α

En respuesta a la señalización por integrinas, las células migran dentro de esa ECM. Existen factores angiogénicos que se encuentran en la matriz extracelular que son liberadas por unas enzimas llamadas proteasas. El movimiento de las células endoteliales hacia la señal angiogénica es ordenado, esto se debe a la selección de una célula conocida como célula punta que guía dicho movimiento. Las células adyacentes a la célula punta o célula guía asumen posiciones subsidiarias como células tallo, las cuales se dividen para alargar el tallo y establecer el lumen (figura 8.1). Finalmente, las

células endoteliales reanudan su estado quiescente y señales inducidas por moléculas como el PDGF-B, ANG-1, TGF- β , efrina B-2 y NOTCH causan que las células endoteliales sean nuevamente cubiertas por los pericitos. En esta etapa final, inhibidores de proteasas producen el depósito de una membrana basal y las uniones celulares son restablecidas para asegurar una distribución de flujo.⁶⁻⁹

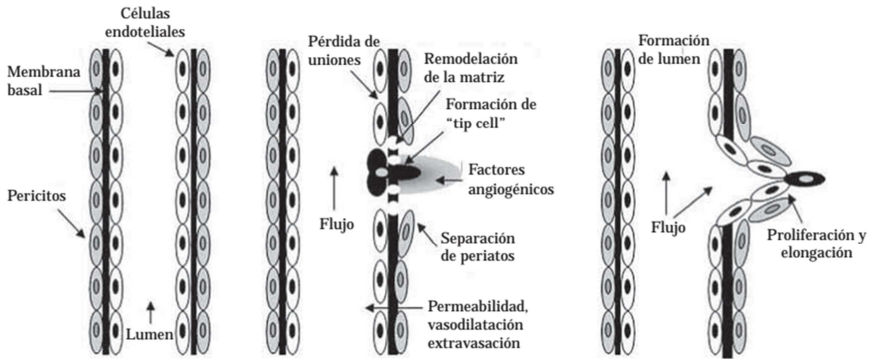


Figura 8.1. Proceso de formación de un nuevo vaso sanguíneo. Fuente: El Residente, Revista-Opinión, Vol. VI Número 2-2011: 111-119

Como se ha comentado, el cuerpo controla la angiogénesis a través del equilibrio entre los factores pro y anti- angiogénicos. Cuando este equilibrio se ve alterado se produce un déficit o un superávit de angiogénesis provocando un crecimiento insuficiente o excesivo de vasos sanguíneos. Esta anomalía, es ahora reconocida como un denominador común subyacente en el desarrollo de diferentes enfermedades. Entre estas enfermedades se incluyen todos los tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, ceguera, artritis, complicaciones del SIDA, la diabetes y la enfermedad de Alzheimer.^{5,10,11}

Debido a su presencia en todas estas patologías, el estudio de la angiogénesis es el foco de atención de muchas investigaciones. Algunos autores ya consideran que los tratamientos basados en la regulación angiogénica tendrán en este siglo el mismo impacto que tuvieron los antibióticos en el siglo XX.¹²

En lo que concierne al campo de investigación de esta Tesis, la angiogénesis puede resultar un proceso de gran utilidad a la hora de realizar una sonda para el diagnóstico de enfermedades en las que dicho fenómeno está involucrado. Han sido muchas las aproximaciones que se han realizado hasta este momento para la síntesis de sondas dirigidas a angiogénesis.¹³⁻¹⁶ Dado el gran número de biomoléculas que intervienen en el proceso de formación de los nuevos vasos sanguíneos, existen diferentes posibilidades a la hora de seleccionar una estrategia para dirigir la sonda hacia la zona donde la angiogénesis se está produciendo. Atendiendo a los factores más importantes, se pueden seleccionar las siguientes dianas angiogénicas:

1.- Receptores de VEGF

Los factores de crecimiento endoteliales vasculares (VEGF) son los mediadores angiogénicos que más se sobreexpresan en el desarrollo de la angiogénesis.¹⁷ Existen 6 isoformas diferentes de VEGF atendiendo al número de aminoácidos que presentan, 121, 145, 165, 183, 189 y 206 respectivamente, siendo VEGF₁₆₅ la más común. Aunque esta proteína es secretada, una parte importante se queda ligada en la superficie celular y en la matriz extracelular dejando fracciones de VEGF libres para ser conjugadas con receptores de VEGF-2.^{18,19} Este fenómeno se ha aprovechado para la

síntesis de sondas dirigidas a estos factores de crecimiento, utilizando anticuerpos monoclonales receptores de VEGF-2. Uno de los anticuerpos más utilizados es el Bevacizumab, aprobado por la FDA y comercializado con el nombre de Avastin® (Genentech, USA), se ha utilizado tanto para estudios de imagen como para realizar tratamientos antiangiogénicos.^{20,21} Respecto a los estudios de imagen, el Bevacizumab se ha marcado con radioisótopos de vida media larga como el ⁸⁹Zr ($t_{1/2}$ = 78,4 h) y el ¹¹¹In ($t_{1/2}$ = 67,2 h). Estos estudios confirmaron la unión específica de este anticuerpo hacia receptores de VEGF en modelos de xenograft humanos de ovario y colon de ratón.^{22,23}

2.- Extra-dominio B de la Fibronectina

La fibronectina es una gran glicoproteína presente en la matriz extracelular. El extra-dominio B es una secuencia de 91 aminoácidos presente tanto en ratones como en ratas y humanos que se expresa alrededor de estructuras neo-vascularizadas en procesos de angiogénesis.²⁸ Algunas aproximaciones, basadas en el marcaje de anticuerpos de cadena sencilla con ¹²³I y ^{99m}Tc, se han realizado para visualizar angiogénesis en este tipo de estructuras.^{29,30}

3.- Metaloproteinasas de la matriz extracelular

Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), son un conjunto de enzimas formado por más de 20 proteínas capaces de degradar diferentes compuestos de la matriz extracelular. Estas enzimas se encuentran sobreexpresadas en procesos de angiogénesis y crecimiento de tumores. Las más importantes en procesos de angiogénesis son las MMPs 1, 2, 3, 9 y 14.³¹

Sondas dirigidas hacia MMPs se han sintetizado con ^{18}F como radioisótopo, usando inhibidores de MMP-2.³²

4.- Integrinas $\alpha_v\beta_3$

Las integrinas son una familia de glicoproteínas encargadas de la adhesión, migración y transducción celular. El término integrina deriva de la capacidad de estas proteínas para unir las proteínas presentes en la matriz extracelular con el citoesqueleto intracelular.³³ Las integrinas $\alpha_v\beta_3$ se unen a las proteínas de la matriz extracelular a través de la secuencia de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD).³⁴ Este tipo de integrinas se encuentran mínimamente expresadas en células endoteliales quiescentes, sin embargo, en procesos de proliferación del endotelio se produce una sobreexpresión.³⁵ Diferentes estudios han demostrado que este tipo de integrinas juegan un papel fundamental en la supervivencia de las células endoteliales durante los procesos de angiogénesis.³⁶ Estas características se han aprovechado para dirigir diferentes sondas de imagen hacia estas proteínas. Diferentes péptidos, basados en la secuencia RGD, han sido utilizados para la detección de las integrinas $\alpha_v\beta_3$ (y otras integrinas relacionadas), desde péptidos lineales hasta péptidos cíclicos han sido marcados con diferentes radioisótopos para la detección de angiogénesis. Entre los péptidos que han resultado tener mayor afinidad por este tipo de integrinas se encuentran los péptidos cíclicos c(RGDfV) y c(RGDfK).^{37,38} Con el objetivo de aumentar la cantidad de sonda acumulada en la zona de angiogénesis se han desarrollado péptidos cíclicos “multivalentes” (dímeros, trímeros y tetrámeros) presentando una mayor afinidad hacia las integrinas

que los monoméricos, como cabía esperar.³⁹ Todos ellos han sido utilizados de múltiples formas para la detección de angiogénesis por diferentes técnicas de imagen. Conjugados con nanopartículas para imagen por MR⁴⁰, con sondas para técnicas ópticas⁴¹ y con radioisótopos para SPECT⁴² y PET⁴³, los péptidos basados en la secuencia RGD han demostrado tener una alta afinidad hacia las integrinas $\alpha_v\beta_3$.

Queda claro de esta breve descripción, que hay múltiples posibilidades a la hora de diseñar una sonda para la detección de angiogénesis. No obstante, no se debe perder de vista la línea de investigación que se ha seguido en el desarrollo de esta Tesis. Teniendo en cuenta las nanopartículas que se han desarrollado y mostrado hasta llegar aquí, nos parecía lógico utilizar las integrinas $\alpha_v\beta_3$ como diana de la sonda a sintetizar. La mayoría de los receptores que se han mostrado requieren del uso de anticuerpos para su conjugación, sin embargo, las integrinas $\alpha_v\beta_3$ ofrecen una gran versatilidad si se basa su conjugación en péptidos con la secuencia RGD. Además existe una amplia librería comercial de estos péptidos, lo que permite obtener con un coste bajo, casi cualquier estructura molecular basada en la secuencia RGD.

Este tipo de péptidos pueden ser conjugados fácilmente con algunas de las nanopartículas que han sido mostradas en capítulos anteriores, dividiéndolo en dos grandes grupos; nanopartículas de óxido de hierro para su uso como agente de contraste negativo en MRI o nanopartículas duales de óxido de hierro dopadas con ⁶⁸Ga para PET/(T₁)MRI. Ambas podían ser utilizadas para el propósito de este capítulo, sin embargo, teniendo en cuenta que lo que se intenta es visualizar las integrinas a través del péptido y

lo que se quiere es obtener información funcional, las nanopartículas duales pueden dar mejores resultados porque abre la opción de contraste brillante positivo y sobre todo la comparación del resultado por dos técnicas de imagen distintas. La ventana temporal ^{68}Ga es muy apropiado para la detección de péptidos, al presentar tiempos de vida media y de biodistribución apropiados para la biodistribucion de estas biomoléculas. Además, el uso de la plataforma dual nos daba la posibilidad de visualizar los fenómenos de angiogénesis empleando una técnica anatómica de alta resolución espacial y otra funcional de alta sensibilidad molecular. Por tanto, para este trabajo se eligieron las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-DEXT.

Para la detección de la angiogénesis se utilizó el péptido c(RGDfK), que como se ha descrito, presenta una gran afinidad hacia las integrinas $\alpha_v\beta_3$ sobreexpresadas en fenómenos de angiogénesis. La elección de este péptido se basó en el hecho de que contiene una lisina que proporciona una amina terminal muy adecuada para su conjugación con las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-DEXT (figura 8.2).

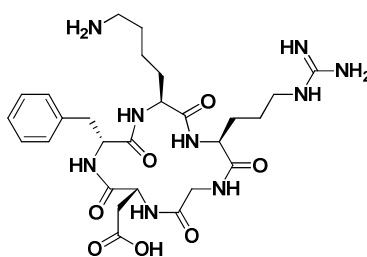


Figura 8.2. Estructura química del c(RGDfK)

Para conjugar la nanopartícula con el péptido, se utilizó el diglicidil éter del 1,4-butanodiol. Esta es una molécula homobifuncional que presenta dos grupos epóxido terminales (figura 8.3). Por tanto, primero podrá

conjugarse la nanopartícula con esta molécula a través de los grupos OH que contiene el dextrano para después ser la amina terminal del péptido la que ataque al epóxido restante. Estas reacciones de sustitución con OH y NH₂ como nucleófilos se pueden dar tanto en medio ácido como en medio básico.

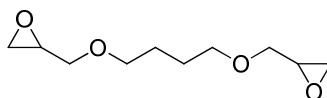


Figura 8.3. Estructura química del diglicidil éter del 1,4-butanodiol

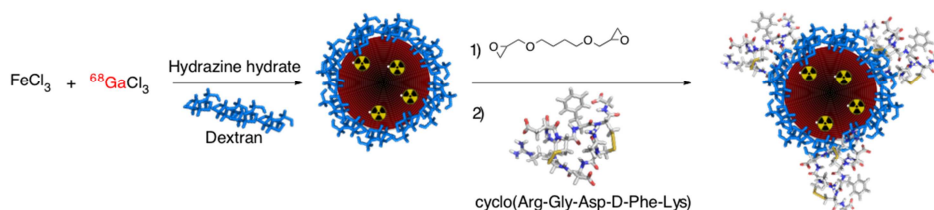
En este caso se requería la utilización del microondas para realizar las síntesis con el objetivo de reducir los tiempos de reacción, algo que hasta ahora no ha sido probado.

Concluyendo, la hipótesis para la realización de este estudio fue que el uso de la molécula bifuncional diglicidil éter del 1,4-butanodiol permitiría la funcionalización, empleando microondas, de las nanopartículas ⁶⁸Ga-IONP-DEXT con el péptido c(RGDfK) para la detección de angiogénesis *in vivo* por PET/MR.

8.2.- Resultados y discusión

Para la funcionalización de las nanopartículas ⁶⁸Ga-IONP-DEXT con el péptido c(RGDfK) se realizó un paso intermedio de reacción en el cual se hizo reaccionar las nanopartículas con el diglicidil éter 1,4-Butanodiol. El esquema general de síntesis consta por tanto de tres reacciones; en primer lugar la formación de las nanopartículas recubiertas con dextrano y dopadas con ⁶⁸Ga, a continuación la funcionalización con la molécula que servirá de unión

para, finalmente, conjugar el péptido con las nanopartículas (esquema 8.1). Las tres reacciones se llevaron a cabo en el microondas para reducir en gran medida los tiempos de reacción. El empleo del microondas para realizar los tres pasos de síntesis es un aspecto esencial por los tiempos de decaimiento del radioisótopo utilizado.



Esquema 8.1. Funcionalización de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-DEXT con el péptido c(RGDfK) a través del diglicidil éter del 1,4-butanodiol.

La síntesis y caracterización de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-DEXT ya ha sido descrita en el Capítulo 5, por tanto, este capítulo se centra en la síntesis del intermedio de reacción con el 1,4-Butanodiol diglicidil éter al que llamaremos ^{68}Ga -IONP-EPOX y de las nanopartículas conjugadas con el péptido c(RGDfK) a las que llamaremos ^{68}Ga -IONP-RGD.

8.2.1.- Síntesis de nanopartículas ^{68}Ga -IONP-EPOX

La síntesis del intermedio de reacción con el epóxido, nanopartículas ^{68}Ga -IONP-EPOX, se realizó modificando un protocolo ya descrito en la bibliografía.^{44,45} En este protocolo se modificaba dextrano de 70 KDa con la misma molécula homobifuncional. La reacción transcurría en medio básico a 25 °C durante 12 h. Del mismo modo se funcionalizaron las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-DEXT pero en este caso utilizando el microondas para incrementar

la velocidad de reacción. La reacción se realizó con resultados satisfactorios a 55 °C en tan solo 20 minutos de reacción.

Después de purificar la muestra a través de cromatografía por exclusión de tamaño y ultrafiltración, se analizaron algunas de las características fisicoquímicas más importantes de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-EPOX.

En primer lugar, se midió el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas. Al introducir una molécula de tamaño tan pequeño respecto al dextrano (6 KDa), no se esperaba observar cambios significativos en el tamaño de partícula. Se obtuvo un tamaño medio de 21.8 ± 1.4 nm. Este valor es lógico si tenemos en cuenta que la síntesis de las nanopartículas iniciales, ^{68}Ga -IONP-DEXT, produjo nanopartículas con un tamaño hidrodinámico medio de 20.6 ± 2.4 nm (figura 8.4).

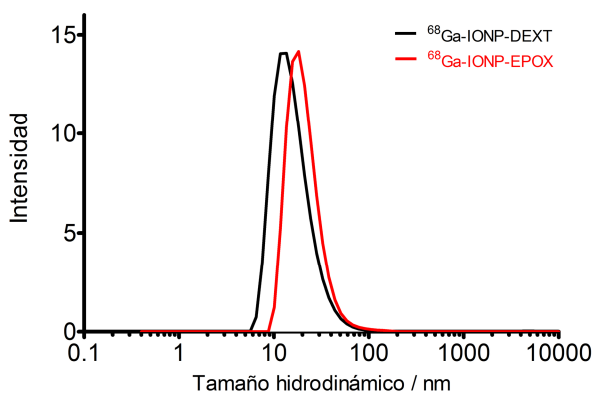


Figura 8.4. Tamaño hidrodinámico de ^{68}Ga -IONP-DEXT (negro) y de ^{68}Ga -IONP-EPOX (rojo).

Donde sí cabía esperar un cambio significativo, era en los valores de potencial ξ . Al modificar la superficie de las nanopartículas estamos

cambiando los grupos funcionales expuestos al medio y por tanto la carga neta superficial debe ser diferente. En este caso los resultados para el potencial ξ mostraban una disminución desde -4.04 ± 0.40 para ^{68}Ga -IONP-DEXT hasta -14.8 ± 0.90 para ^{68}Ga -IONP-EPOX, señal de que se había producido un cambio en la presencia de los grupos funcionales contenidos en la superficie de las nanopartículas.

Respecto al tamaño de núcleo, las imágenes realizadas por TEM no mostraron ningún cambio significativo entre ambos tipos nanopartículas. El valor medio, realizado sobre 50 partículas, reveló un tamaño de núcleo medio de 2.35 ± 0.30 nm para las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-EPOX mientras que las nanopartículas precursoras presentaban un valor promedio, también calculado sobre 50 partículas, de 2.20 ± 0.20 nm (figura 8.5). Teniendo en cuenta que lo que se está modificando es la superficie de la nanopartícula, en condiciones de reacción muy suaves, no cabía esperar ningún cambio en las propiedades del núcleo de las nanopartículas como se ha observado en este caso por su similar tamaño.

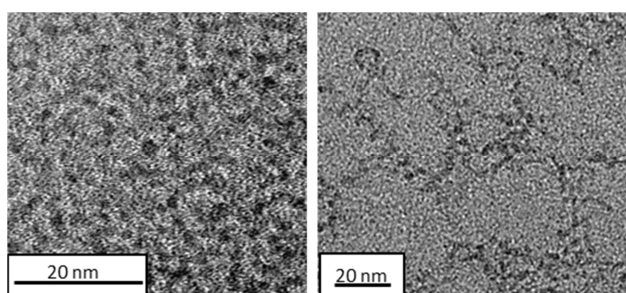


Figura 8.5. Imágenes TEM de nanopartículas ^{68}Ga -IONP-DEXT (izquierda) y ^{68}Ga -IONP-EPOX (derecha).

Como ocurría en el caso de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-DEXT, el tamaño de núcleo tan pequeño y la naturaleza del surfactante superficial

dificultan su caracterización microscópica. Aunque sea complicado observarlo, las imágenes TEM a mayor magnitud permiten todavía distinguir planos cristalinos.

Como se mostró, en el Capítulo 5, con este tamaño de núcleo tan pequeño, cabe esperar que las nanopartículas generen un contraste positivo intenso. Aun así, se realizó una imagen por MRI para asegurar que las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-EPOX seguían mostrando las mismas propiedades que aquellas de las que proceden. Para ello se prepararon 4 muestras, una con agua y las otras tres a concentraciones decrecientes de hierro de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-EPOX. La imagen obtenida mostró como las nanopartículas funcionalizadas con el diglicidil éter del 1,4-butanodiol seguían produciendo un contraste positivo, algo ya esperable dada la naturaleza suave del esquema de síntesis (figura 8.6).

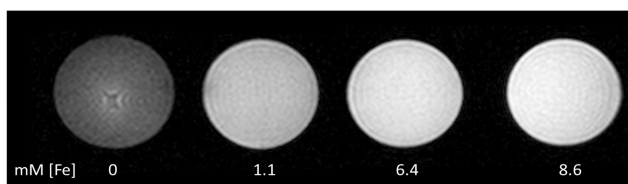


Figura 8.6. Imagen MRI axial de eco de gradiente potenciada en T_1 para el agua y 3 muestras a diferentes concentraciones de Fe de ^{68}Ga -IONP-EPOX.

8.2.2.- Síntesis de nanopartículas ^{68}Ga -IONP-RGD

A continuación se realizó la conjugación del péptido c(RGDfK) con las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-EPOX para obtener las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-RGD. Para ello, se hizo reaccionar 1 mg del péptido con las nanopartículas en medio básico a $\text{pH} = 8$. La reacción se realizó en el microondas a $55\text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.

El uso del microondas permite la conjugación en condiciones relativamente suaves y en un periodo de tiempo muy corto. En consecuencia, aparte de poder trabajar con radioisótopos de vida corta como el ^{68}Ga , asegura que el péptido conserve su integridad sin que pueda sufrir procesos de desnaturalización como consecuencia de las altas temperaturas o los tiempos largos de reacción en medios básicos. Las nanopartículas obtenidas presentaban un tamaño hidrodinámico de 22.09 ± 1.1 nm así como una distribución estrecha y homogénea de tamaños. Este valor es ligeramente superior al obtenido para las nanopartículas de partida ^{68}Ga -IONP-DEXT y para las nanopartículas precursoras ^{68}Ga -IONP-EPOX aunque sin ser significativamente diferente (figura 8.7). Al igual que en el caso anterior, tampoco se observó ningún cambio significativo en cuanto al tamaño del núcleo. Los cálculos realizados a partir de las imágenes obtenidas en el TEM mostraron un tamaño de núcleo de 2.37 ± 0.26 nm.

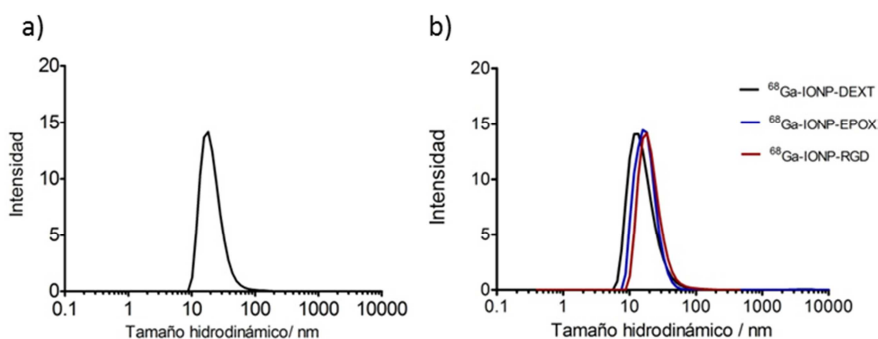


Figura 8.7. a) Curva de tamaño hidrodinámico expresada en intensidad para ^{68}Ga -IONP-RGD, b) Curvas de tamaño hidrodinámico expresadas en intensidad para ^{68}Ga -IONP-DEXT, ^{68}Ga -IONP-EPOX y ^{68}Ga -IONP-RGD.

Como ocurre siempre con este tipo de nanopartículas de núcleo pequeño, resulta difícil observar su cristalinidad. No obstante, se puede ver

claramente como los núcleos se encuentran bien dispersos sin que haya presencia de agregados (figura 8.8).

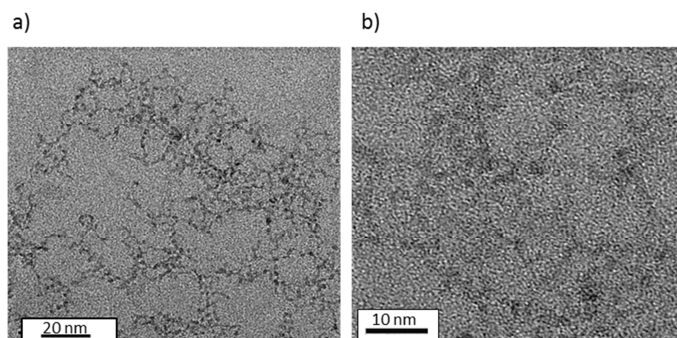


Figura 8.8. Imágenes TEM de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-RGD a dos escalas diferentes a) 20 nm y b) 10 nm.

A continuación, se evaluó la composición superficial de las nanopartículas a través de su espectro de FTIR (figura 8.9). El espectro presentó una banda ancha a 1693 cm^{-1} correspondiente al enlace peptídico y a la cadena lateral de la arginina. Además apareció una banda a 1444 cm^{-1} atribuible a la cadena de Lisina y dos bandas a 1700 cm^{-1} y 1202 cm^{-1} que aparecen debido al ácido aspártico.⁴⁶

Para comprobar que efectivamente el péptido se había unido a las partículas y, además, cuantificarlo se realizó un ensayo de cuantificación de proteínas. Existen diferentes métodos para calcular la cantidad de proteína contenida en una disolución. Estos se dividen en métodos colorimétricos y métodos fluorimétricos. Los más utilizados son los métodos colorimétricos debido a que se basan en procedimientos rápidos, sencillos y de gran sensibilidad.⁴⁷ Dentro de los métodos colorimétricos se encuentran el método Lowry, el Biuret, el Bradford y el método por BCA. Entre todos ellos,

el Biuret es el menos sensible y en el Lowry pueden darse algunas interferencias debidas a detergentes no iónicos.⁴⁸

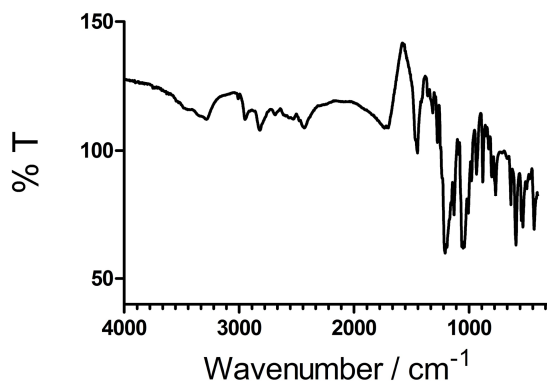


Figura 8.9. Espectro FTIR de las nanopartículas ⁶⁸Ga-IONP-RGD.

En el caso de las nanopartículas ⁶⁸Ga-IONP-RGD se llevó a cabo un ensayo Bradford debido a su alta sensibilidad y sencillez. Para ello se realizó una curva patrón según indica el protocolo estandarizado.⁴⁹ A continuación se hicieron las correspondientes medidas a las nanopartículas ⁶⁸Ga-IONP-RGD y a los controles. Para descartar cualquier tipo de interferencia en la medida se utilizaron 3 controles diferentes, a saber; las nanopartículas precursoras ⁶⁸Ga-IONP-EPOX, el péptido íntegro c(RGDfK) y los lavados correspondientes tras la purificación de las nanopartículas ⁶⁸Ga-IONP-RGD. Los valores obtenidos tanto de las nanopartículas funcionalizadas con el péptido como de los controles condujeron a un mismo resultado final. Asumiendo una geometría esférica y una densidad para la magnetita de 5.18 g·cm⁻³, se obtuvieron 18.1 moléculas de RGD por nanopartícula. Estos valores indicaron que el rendimiento de la reacción de conjugación entre ⁶⁸Ga-IONP-EPOX y el péptido c(RGDfK) fue del 79 %.

Además del ensayo por Bradford, también se realizó un análisis termogravimétrico de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-RGD. Como se observa en el gráfico, hay dos fuertes caídas de masa (figura 8.10). La primera, del 36 % a 260 °C corresponde con la pérdida del dextrano unido en la superficie de la nanopartícula. La segunda pérdida de masa, del 30 % a 550 °C, debe corresponder a la pérdida del epóxido-RGD ya que al ser una unión covalente se necesitan mayor temperatura para que se produzca la desorción.

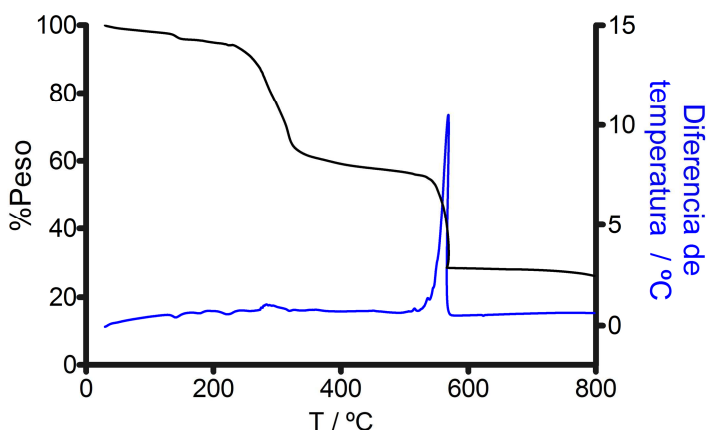


Figura 8.10. Análisis termogravimétrico de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-RGD.

Por tanto, se puede concluir que el nuevo método diseñado para unir las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-DEXT, de forma rápida a través del uso de microondas, con péptidos que contengan aminas terminales, es un método efectivo con altos rendimientos de reacción. Este resultado deja claro una de las ventajas de emplear nanopartículas frente al uso de sondas “tradicionales”; como se comentaba al principio con el objetivo de conseguir un efecto de multivalencia se han probado muchas sondas diferentes de RGD, en el mejor de los casos se conseguía una “carga de ligando” de 6 péptidos por sonda, a costa de un gran y largo esfuerzo sintético. Se puede

ver que en este caso, en tres pasos de reacción se ha conseguido una carga de 18 moléculas por sonda.

Además de obtener un rendimiento alto en la conjugación, hay que tener en cuenta que el rendimiento de radiomarcaje con el ^{68}Ga es muy alto, como se mostraba en el Capítulo 5. En este caso, después de la síntesis de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-DEXT se obtuvo un rendimiento de marcaje del 92 %. Tras la síntesis de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-EPOX la radiactividad presente en la muestra resultó en un rendimiento del 97 %. A su vez el rendimiento radiactivo tras la conjugación con el péptido fue del 96 %. Estos valores son lógicos si se tiene en cuenta que el ^{68}Ga se encuentra dopando el núcleo de la nanopartícula. Como se ha demostrado, al realizar procesos de funcionalización en la superficie de la nanopartícula en condiciones suaves y de forma rápida el núcleo no se ve afectado. Por tanto el ^{68}Ga contenido en el núcleo de la nanopartícula no se ve afectado en los pasos posteriores de funcionalización, dando rendimientos cercanos al 100 % y una actividad específica de 7.60 GBq/ mmol de Fe.

Por último, se realizaron los correspondientes experimentos *in vivo* para comprobar la capacidad de la sonda para detectar angiogénesis. Para ello, se utilizó un modelo murino de cáncer. Aunque la sonda está diseñada con el fin último de detectar angiogénesis en diferentes enfermedades cardiovasculares, se eligió un modelo de cáncer. Esta decisión se basó en el hecho de que la angiogénesis que desarrollan los tumores de este tipo de modelo animal está muy bien descrita y por tanto, nos servirá como modelo de referencia en el que podemos estar seguros de que los animales van a desarrollar procesos de angiogénesis con total seguridad.

El cáncer elegido, por su rapidez y reproducibilidad, para este experimento fue un melanoma subcutáneo, generado al inyectar 500.000 melanocitos tumorales (B16-F10) en ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad.

Dado el carácter dual de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-RGD, los experimentos de imagen se realizaron tanto por PET como por MRI. Para ello se inyectaron, de forma intravenosa por la cola del ratón, 100 μL de nanopartículas con una actividad de 15 MBq, y una concentración de 1.1 mg Fe/mL. Las imágenes PET fueron adquiridas de forma estática durante 30 minutos y transcurrida una hora tras la inyección de las nanopartículas para permitir que abandonen mayoritariamente el lecho vascular. Las imágenes obtenidas fueron especialmente de buena calidad si se tiene en cuenta que prácticamente toda la señal procedente de las nanopartículas se encontraba en la zona tumoral (indicada en el CT con una flecha blanca). Naturalmente también se aprecia señal en el hígado, órgano principal de eliminación de las nanopartículas de óxido de hierro (figura 7.11).

Para confirmar que las nanopartículas se dirigían al tumor debido a la funcionalización con el péptido, se realizaron varios experimentos control. En primer lugar, se inyectaron las nanopartículas precursoras sin el péptido, ^{68}Ga -IONP-EPOX, a dos ratones que tenían el mismo tipo de tumor. La dosis inyectada fue la misma en términos de actividad y concentración que la administrada en el caso anterior. Las imágenes fueron adquiridas bajo las mismas condiciones de tiempo de espera y acumulación de datos. Como se muestra en la figura 7.12a, no se observó presencia de las nanopartículas en el tumor (indicado con flecha blanca en el CT), solo la señal correspondiente al hígado.

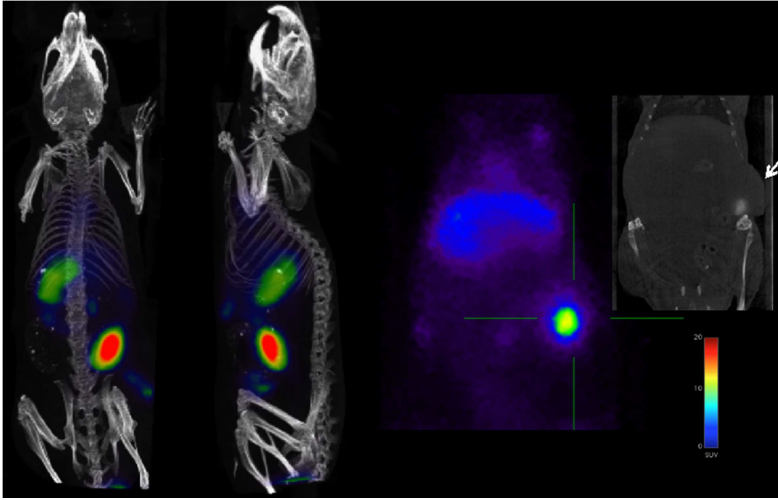


Figura 7.11. Imagen PET/CT de un ratón con tumor adquirida 1 h después de la inyección de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-RGD.

En segundo lugar, se realizó otro experimento produciendo un bloqueo previo de las integrinas antes de inyectar las nanopartículas. La necesidad de este control era confirmar que el motivo de la acumulación de las nanopartículas era la presencia del péptido RGD y no algún efecto de acumulación pasiva, como el efecto EPR (enhanced permeability and retention effect) típico de tumores. Para ello se inyectó 1 mg del péptido c(RGDfK) íntegro, 5 minutos antes de inyectar las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-RGD. La idea de este experimento se basaba en que al inyectar el péptido con anterioridad al uso de las nanopartículas, este saturara los sitios de unión del péptido sobre las integrinas sobreexpresadas en el tumor y bloqueara la posterior unión de las nanopartículas produciendo una disminución en gran medida de dicha acumulación. Como se muestra en la figura 7.12b, la captación en el tumor es casi nula en comparación con la señal obtenida en el primer experimento, por lo que se puede concluir que la acumulación de

las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-RGD en el tumor se debe principalmente a la presencia del péptido en la nanopartícula.

Para terminar con los experimentos correspondientes a las nanopartículas radiactivas, se realizó un estudio de biodistribución de los ratones con tumor a los que se les inyectó las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-RGD y de los que se les inyectó ^{68}Ga -IONP-EPOX. Los cinco animales de cada grupo fueron sacrificados y los órganos perfundidos (para quitar los restos de sangre) y extraídos. Los órganos se llevaron a un contador gamma donde se midió la actividad presente en cada órgano.

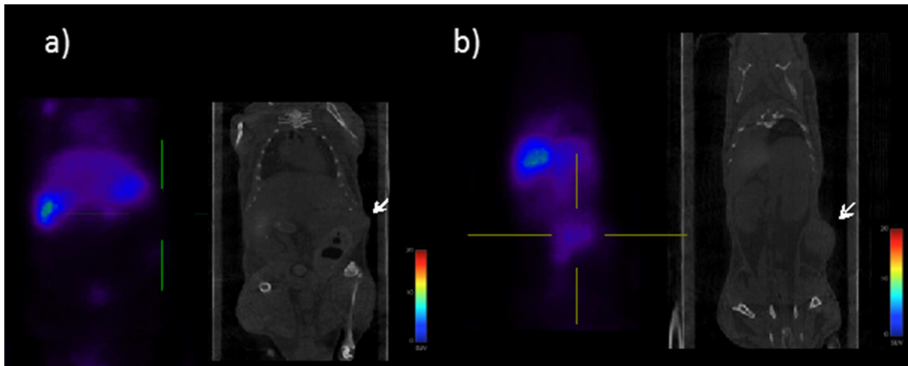


Figura 7.12. a) Imágenes PET/CT de un ratón con tumor adquiridas 1 h después de la inyección de ^{68}Ga -IONP-EPOX, b) Imágenes PET/CT de un ratón con tumor al que se inyectó 1 mg de c(RGDfK) 5 min antes de la inyección de ^{68}Ga -IONP-RGD y adquiridas 1 h después de la inyección de las nanopartículas.

Los datos, representados en forma de % de dosis inyectada por gramo de tejido (%ID/g), confirmaron la acumulación vista en las imágenes in vivo. Además de la acumulación en los órganos de eliminación, había una diferencia significativa en la captación del tumor por parte de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-RGD frente al control donde había una captación prácticamente nula (figura 7.13).

Por último, se realizó el experimento de MRI. Como se ha mostrado anteriormente, debido al tamaño tan pequeño del núcleo de las nanopartículas, estas tienen la capacidad de producir contraste de realce T_1 . Es decir, allí donde se acumulen las nanopartículas debería verse una zona más brillante que en la imagen homóloga sin nanopartículas. Debido a esta característica y una vez que se ha demostrado que las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-RGD se acumulan en el tumor, la imagen por Resonancia Magnética tendría que mostrar asimismo un cambio de intensidad en la señal procedente del tumor.

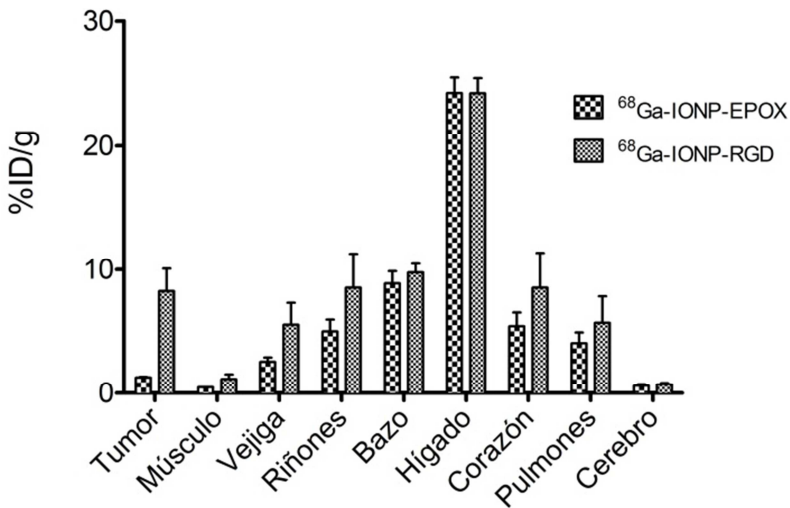


Figura 7.13. Biodistribución medida en contador gamma 4 h después de la inyección de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-EPOX y ^{68}Ga -IONP-RGD en ratón con tumor (N=5, por cada nanopartícula).

La imagen de Resonancia Magnética se realizó en uno de los ratones procedentes del experimento PET 24 h después de haber inyectado las nanopartículas, al que previamente se le había tomado una imagen basal. La diferencia de contraste entre la imagen basal y la imagen tras la inyección de nanopartículas es evidente. En un corte axial del tumor con las

nanopartículas se pueden observar zonas de mayor intensidad que se deben seguramente a la acumulación de las nanopartículas (figura 7.14).

Por partida doble se observa la acumulación de las nanopartículas en el tumor demostrándose así, que las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-RGD se pueden acumular en las zonas donde hay una mayor expresión de integrinas $\alpha_v\beta_3$ asociadas en este caso a fenómenos de angiogénesis tumorales.

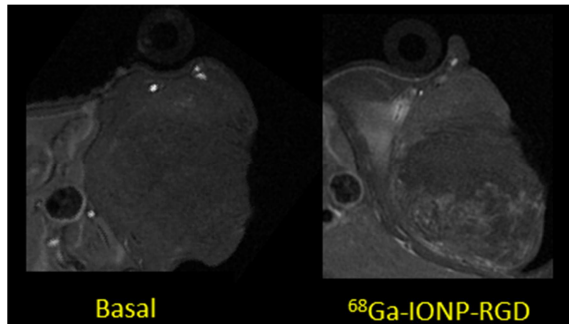


Figura 7.14. Imagen MRI axial de eco de gradiente potenciada en T_1 de tumor basal (izquierda) y 24 h tras inyectar ^{68}Ga -IONP-RGD (derecha).

8.3.- Aspectos clave

En el proceso de síntesis de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-RGD hay algunos puntos clave que deben ser aclarados:

Para la síntesis de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-EPOX es necesario realizar una purificación exhaustiva por ultrafiltración. Hay que tener en cuenta que si no se purifica bien la muestra, el exceso de dextrano utilizado en la síntesis de las partículas ^{68}Ga -IONP-DEXT reaccionará con el diglicidil éter del 1,4-Butanodiol de la misma forma que lo hace el dextrano contenido en la superficie de las nanopartículas, obteniéndose de esta forma agregados entrecruzados de dextrano-epóxido. Para evitar que esto ocurra,

se debe realizar un paso extra de ultrafiltración eliminándose de esta forma el exceso de dextrano. Nótese que este paso sólo conlleva 2 minutos más en el proceso rutinario de purificación.

Debe mencionarse que el tiempo total de síntesis y purificación para realizar las tres nanopartículas de forma secuencial es de aproximadamente 100 minutos. Este tiempo es mínimo si se tiene en cuenta que se están sintetizando y purificando exhaustivamente tres nanopartículas duales. En este caso se partió de una actividad inicial de 1280 MBq llegando al final del esquema de síntesis con 390 MBq. Estos datos resultan en un rendimiento radiactivo global del 85 % (decaimiento corregido), lo cual permite utilizar la sonda no solo en modelos de animal pequeño sino que podría usarse en modelos de animal grande e incluso en humanos.

8.4.- Conclusiones

Se ha realizado de forma satisfactoria y por primera vez en la bibliografía un esquema de funcionalización para nanopartículas duales de núcleo dopado con un isótopo radiactivo.

El uso del microondas en los tres pasos de síntesis ha permitido reducir enormemente los tiempos de reacción, pudiendo usar isótopos radiactivos de vida relativamente corta como es el ^{68}Ga .

La molécula diglicidil éter del 1,4-Butanodiol ha demostrado ser un buen nexo de unión para conjugar péptidos con las nanopartículas de partida ^{68}Ga -IONP-DEXT. La conjugación entre el intermedio ^{68}Ga -IONP-EPOX y el péptido c(RGDfK) dio rendimientos próximos al 80 %.

Las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-RGD demostraron tener una gran afinidad hacia fenómenos de angiogénesis producidos en un tumor. Además, se demostró que esta afinidad era debida al péptido contenido en las nanopartículas.

El carácter dual de las nanopartículas permitió detectar la angiogénesis del tumor tanto por PET como por por contraste de realce T_1 en MRI.

La biodistribución a través del contador gamma confirmó los resultados obtenidos en los experimentos de imagen dando diferencias significativas entre las nanopartículas control y las conjugadas con el péptido para su acumulación en la zona tumoral.

8.5.- Bibliografía

1. Folkman, J. & Shing, Y. Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **267**, 10931–10934 (1992).
2. Adams, R. H. & Alitalo, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 464–478 (2007).
3. Ribatti, D. Transgenic Mouse Models of Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *International Review of Cell and Molecular Biology* **266**, 1–35 (2008).
4. Cantelmo, A. R., Brajic, A. & Carmeliet, P. Endothelial Metabolism Driving Angiogenesis: Emerging Concepts and Principles. *Cancer J.* **21**, 244–249
5. The Angiogenesis foundation. at <https://www.angio.org/learn/angiogenesis/>
6. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 417–427 (2011).
7. Chung, A. S., Lee, J. & Ferrara, N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 505–514 (2010).
8. Nichol, D. & Stuhlmann, H. EGFL7: A unique angiogenic signaling factor in vascular development and disease. *Blood* **119**, 1345–1352 (2012).
9. Potente, M., Gerhardt, H. & Carmeliet, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* **146**, 873–887 (2011).
10. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* **285**, 1182–1186 (1971).
11. Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C. & Williams, G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J. Exp. Med.* **133**, 275–288 (1971).
12. American Cancer Society. at <http://csn.cancer.org/node/201560>
13. Jung, K.-H. & Lee, K.-H. Molecular Imaging in the Era of Personalized Medicine. *J. Pathol. Transl. Med.* **49**, 5–12 (2015).
14. Stacy, M. R., Maxfield, M. W. & Sinusas, A. J. Targeted molecular imaging of angiogenesis in PET and SPECT: A review. *Yale Journal of Biology and Medicine* **85**, 75–86 (2012).
15. Choe, Y. S. & Lee, K.-H. Targeted in vivo imaging of angiogenesis: present status and perspectives. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 17–31 (2007).
16. Cai, W. & Chen, X. Multimodality molecular imaging of tumor angiogenesis. *J. Nucl. Med.* **49 Suppl 2**, 113S–28S (2008).

17. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews* **25**, 581–611 (2004).
18. Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J. & Ferrara, N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* **267**, 26031–26037 (1992).
19. Shibuya, M. & Claesson-Welsh, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Experimental Cell Research* **312**, 549–560 (2006).
20. Yoshida, H., Yabuno, A. & Fujiwara, K. Critical appraisal of bevacizumab in the treatment of ovarian cancer. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 2351–8 (2015).
21. Oosting, S. F. *et al.* 89Zr-bevacizumab PET visualizes heterogeneous tracer accumulation in tumor lesions of renal cell carcinoma patients and differential effects of antiangiogenic treatment. *J. Nucl. Med.* **56**, 63–9 (2015).
22. Nagengast, W. B. *et al.* In vivo VEGF imaging with radiolabeled bevacizumab in a human ovarian tumor xenograft. *J. Nucl. Med.* **48**, 1313–1319 (2007).
23. Stollman, T. H. *et al.* Specific imaging of VEGF-A expression with radiolabeled anti-VEGF monoclonal antibody. *Int. J. Cancer* **122**, 2310–2314 (2008).
24. Chang, S. S. *et al.* Prostate-specific membrane antigen is produced in tumor-associated neovasculature. *Clin. Cancer Res.* **5**, 2674–2681 (1999).
25. Morris, M. J. *et al.* Pilot trial of unlabeled and indium-111-labeled anti-prostate-specific membrane antigen antibody J591 for castrate metastatic prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**, 7454–7461 (2005).
26. Sodee, D. B. *et al.* Preliminary imaging results using In-111 labeled CYT-356 (Prostascint) in the detection of recurrent prostate cancer. *Clin. Nucl. Med.* **21**, 759–767 (1996).
27. Morris, M. J. *et al.* Phase I evaluation of J591 as a vascular targeting agent in progressive solid tumors. *Clin. Cancer Res.* **13**, 2707–2713 (2007).
28. Castellani, P. *et al.* The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: A marker of angiogenesis. *Int. J. Cancer* **59**, 612–618 (1994).
29. Santimaria, M. *et al.* Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer. *Clin. Cancer Res.* **9**, 571–579 (2003).
30. Berndorff, D. *et al.* Imaging of tumor angiogenesis using 99mTc-labeled human recombinant anti-ED-B fibronectin antibody fragments. *J. Nucl. Med.* **47**, 1707–1716 (2006).

31. Sternlicht, M. D. & Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 463–516 (2001).
32. Furumoto, S. *et al.* Tumor detection using 18F-labeled matrix metalloproteinase-2 inhibitor. *Nucl. Med. Biol.* **30**, 119–125 (2003).
33. Tamkun, J. W. *et al.* Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* **46**, 271–282 (1986).
34. Ross, F. P. *et al.* Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *J. Biol. Chem.* **268**, 9901–9907 (1993).
35. Brooks, P. C., Clark, R. A. & Cheresh, D. A. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* **264**, 569–571 (1994).
36. Brooks, P. C. *et al.* Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* **79**, 1157–1164 (1994).
37. Haubner, R. *et al.* Radiolabeled alpha(v)beta3 integrin antagonists: a new class of tracers for tumor targeting. *J. Nucl. Med.* **40**, 1061–1071 (1999).
38. Garanger, E., Boturyn, D. & Dumy, P. Tumor targeting with RGD peptide ligands-design of new molecular conjugates for imaging and therapy of cancers. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **7**, 552–558 (2007).
39. Dijkgraaf, I. *et al.* Improved targeting of the $\alpha v \beta 3$ integrin by multimerisation of RGD peptides. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **34**, 267–273 (2007).
40. Zhang, C. *et al.* Specific targeting of tumor angiogenesis by RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 1.5-T magnetic resonance scanner. *Cancer Res.* **67**, 1555–1562 (2007).
41. Cao, J. *et al.* Fast clearing RGD-based near-infrared fluorescent probes for in vivo tumor diagnosis. *Contrast Media Mol. Imaging* **7**, 390–402 (2012).
42. Bozon-Petitprin, A. *et al.* Targeted radionuclide therapy with RAFT-RGD radiolabelled with (90)Y or (177)Lu in a mouse model of $\alpha v \beta 3$ -expressing tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **42**, 252–63 (2015).
43. Cai, H. & Conti, P. S. RGD-based PET tracers for imaging receptor integrin $\alpha v \beta 3$ expression. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **56**, 264–279 (2013).
44. Sundberg, L. & Porath, J. Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes. *J. Chromatogr.* **90**, 87–98 (1974).

45. Böldicke, T. *et al.* Production of specific monoclonal antibodies against the active sites of human pancreatic secretory trypsin inhibitor variants by in vitro immunization with synthetic peptides. *Eur. J. Biochem.* **175**, 259–264 (1988).
46. Barth, A. The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **74**, 141–173 (2000).
47. Stoscheck, C. M. Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* **182**, 50–68 (1990).
48. Noble, J. E. & Bailey, M. J. A. Chapter 8 Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology* **463**, 73–95 (2009).
49. Carlsson, N., Borde, A., Wölfel, S., Kerman, B. & Larsson, A. Quantification of protein concentration by the Bradford method in the presence of pharmaceutical polymers. *Anal. Biochem.* **411**, 116–121 (2011).

CAPÍTULO

9

Imagen selectiva de neutrófilos en modelos inflamatorios empleando nanopartículas duales PET/MRI

9.1.- Introducción

Los neutrófilos son el tipo de glóbulo blanco más abundante dentro del organismo humano. También conocidos como leucocitos polimorfonucleares, representan entre el 40 % y el 70 % de todos los glóbulos blancos en la mayoría de especies mamíferas. Junto con los basófilos y los eosinófilos, los neutrófilos conforman la familia de células polimorfonucleares. Este tipo de granulocito recibe su nombre de su comportamiento frente a la tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E), comúnmente utilizada en procedimientos histológicos. Mientras que los basófilos se tiñen de azul oscuro y los eosinófilos de rojo intenso, los neutrófilos permanecen sin teñirse, “neutros”, apareciendo de color rosa pálido.¹⁻³

Los neutrófilos son el tipo de células más abundantes que se encuentran circulando por el torrente sanguíneo, se producen en la médula ósea y juegan un papel fundamental dentro del sistema inmune. Cuando se produce un daño en algún tejido ya sea a causa de una infección, un trauma u otros desencadenantes, se genera un proceso inflamatorio y los neutrófilos son las células que primero responden dirigiéndose desde el torrente sanguíneo al lugar donde se está produciendo la inflamación con el fin de provocar la eliminación del patógeno a través de un proceso de fagocitosis.⁴⁻⁷

Teniendo en cuenta la importancia de los neutrófilos dentro de los organismos vivos, su detección no invasiva y cuantificación a través de técnicas de imagen avanzadas puede resultar beneficioso no solo para poder

localizar zonas inflamadas *in vivo*, sino también para evaluar la eficacia de los tratamientos con agentes anti-inflamatorios.

Es por ello que nos planteamos desarrollar una herramienta para imagen usando alguno de los nano-radiotrazadores previamente descritos. En estas aplicaciones hay que dirigir un tipo de sonda a una diana específica de las células que queremos marcar, para lo que tras encontrar el mejor candidato a través de una búsqueda bibliográfica o a través de ensayos con tecnología de genotecas de péptidos y/o anticuerpos con afinidad por un ligando de interés (phage display), se procede a funcionalizar las nanopartículas o nano-sistemas que permitan su seguimiento por técnicas de imagen. En nuestro caso, tenemos que encontrar un vector de dirección específico de neutrófilos. Realizando una búsqueda exhaustiva en la bibliografía encontramos un trabajo en el cual se describía un nuevo péptido antagonista de un receptor de formil péptido (FPR) específico de neutrófilos. Se ha demostrado que este péptido, cuya secuencia de aminoácidos es N-cinamoil-F-(D)L-F-(D)L-F, tiene una gran afinidad hacia los receptores FPR de neutrófilos con una constante de disociación receptor-ligando, K_D , de 2 nM.⁸ A parte de su elevada afinidad hacia los mencionados receptores de neutrófilos, este péptido resultó de gran interés por su estructura química. El péptido, al que llamaremos de forma abreviada c(FLFLF), contiene una amina primaria que puede ser conjugada de forma sencilla tanto con las nanopartículas descritas en el Capítulo 5 (⁶⁸Ga-IONP-DEXT) como las descritas en el Capítulo 6 (⁶⁸Ga-IONP-CIT) (figura 9.1).

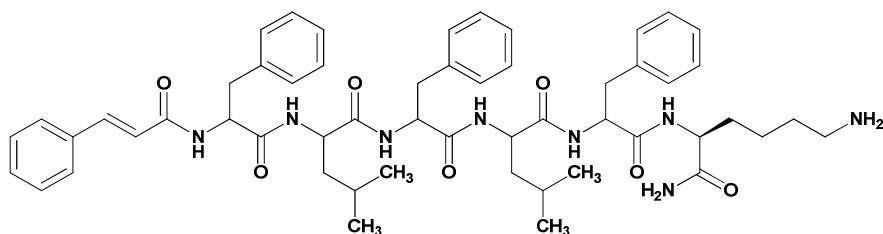


Figura 9.1. Estructura química del péptido c(FLFLF).

Al observar la estructura química del péptido es evidente que es bastante hidrofóbico. Esto es un problema si pensamos en una estrategia convencional de funcionalización utilizando agentes quelantes como el DOTA o el NOTA. De hecho, esta aproximación ya fue descrita por Landon W. Locke *et al.* en 2009. En ese caso se incorporó al agente quelante DOTA, una cadena pegilada para aumentar la hidrofilia del producto resultante y por tanto el tiempo en circulación en sangre del radiotrazador solucionando de este forma la elevada hidrofobicidad del péptido.⁹ Aunque la aproximación generó resultados positivos presenta algunos inconvenientes. En primer lugar, para llegar al producto final con el radio trazador se necesitan varios pasos de síntesis lo que provoca un gran gasto sintético. Además los procesos de purificación por HPLC hacen que el tiempo de síntesis total sea elevado y que los rendimientos de marcado finales sean bastante modestos. Por último, el radioisótopo utilizado en ese caso fue el ^{64}Cu cuyo tiempo de vida media de 12.4 horas resulta desfavorable desde un punto de vista traslacional e injustificado dada los tiempos de biodistribución de estos compuestos.

Por los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de Tesis, pensábamos que el uso de algunos de los nano-radiotrazadores que han sido descritos podría solucionar las desventajas que presenta la estrategia

quelante. Al disponer de nanopartículas bastante hidrofílicas no haría falta utilizar ningún tipo de compuesto adicional que aumente la hidrofiliidad por lo que el gasto temporal de síntesis sería menor. Además, como ha sido mostrado, la purificación de este tipo de nano-radiotrazadores es rápida y eficaz, y la incorporación del ^{68}Ga a través de la estrategia de dopaje de núcleo produce altos rendimientos de marcaje.

Teniendo en cuenta estas razones, nos fijamos el propósito de utilizar el nano-radiotrazador ^{68}Ga -IONP-CIT para su conjugación con el péptido c(FLFLF) formando la amida entre el ácido cítrico y la amina primaria del péptido. Este tipo de conjugación ya se empleó en el Capítulo 7 para funcionalizar las nanopartículas recubiertas de ácido azelaico con el bifosfonato utilizando EDC/Sulfo-NHS con excelentes resultados.¹⁰

Con todo lo descrito hasta ahora, se plantea la hipótesis de trabajo: *“La conjugación de ^{68}Ga -IONP-CIT con el péptido c(FLFLF) utilizando EDC/Sulfo-NHS permitirá obtener un nuevo nano-radiotrazador capaz de detectar y cuantificar neutrófilos de forma selectiva en modelos de inflamación”.*

9.2.- Resultados y discusión

Para la síntesis de la nueva sonda se utilizó de base, como hemos dicho anteriormente, el nano-radiotrazador ^{68}Ga -IONP-CIT. Una vez obtenido este, se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con una mezcla de EDC/Sulfo-NHS. A continuación se añadió 1 mg del péptido c(FLFLF) a pH = 8 dejándolo reaccionar durante otra hora más. Tras purificar la muestra, como se ha hecho en todos los casos anteriores, caracterizamos

las propiedades fisicoquímicas del nuevo radiotrazador, al cual llamaremos ^{68}Ga -IONP-NET.

Para empezar, se midió el tamaño hidrodinámico por DLS obteniendo un tamaño de $83.3 \text{ nm} \pm 10.5$ (figura 9.2). El incremento en el tamaño de partícula es muy claro ya que partimos de las nanopartículas de ^{68}Ga -IONP-CIT que tenían un tamaño hidrodinámico de $7.5 \pm 1 \text{ nm}$. Este comportamiento tras la conjugación con el péptido, puede deberse a que este péptido es bastante hidrófobo y de cadena lineal, por lo que un aumento tan grande del tamaño puede indicar a simple vista que la conjugación se ha realizado con éxito y quizá con buenos rendimientos.

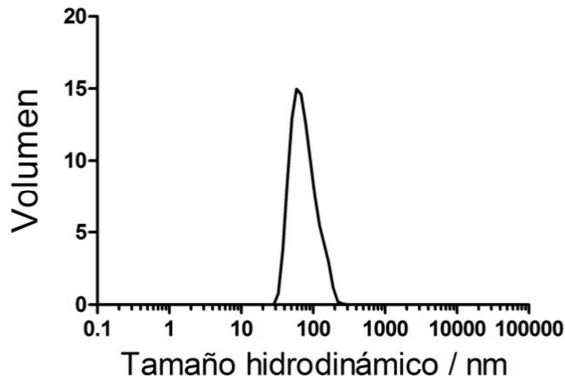


Figura 9.2. Tamaño hidrodinámico, medido por DLS, de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-NET.

Respecto al tamaño de núcleo, las imágenes realizadas por TEM, mostraron un tamaño de $1.7 \pm 0.6 \text{ nm}$, calculado como valor promedio entre 50 partículas (figura 9.3). Este valor entra dentro de lo esperado ya que el tamaño de núcleo del nano-radiotrazador precursor era de 1.5 nm y la conjugación con el péptido no afecta al núcleo de la nanopartícula.

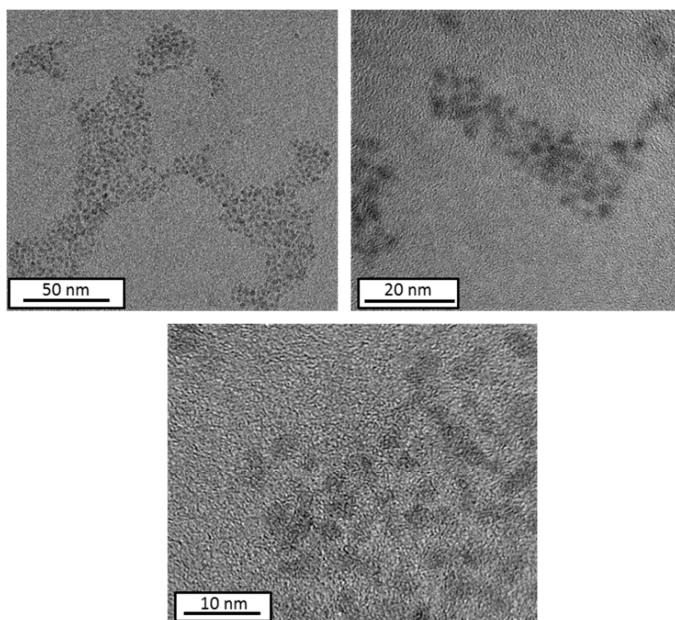


Figura 9.3. Imágenes TEM de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-NET.

El análisis de la composición superficial a través del espectro de FTIR (figura 9.4) reveló que la conjugación con el péptido se había producido. Las bandas características del ácido cítrico a 1534 cm^{-1} , 1339 cm^{-1} y 1064 cm^{-1} disminuyen en gran medida. También aparecen una pequeña banda a 1625 cm^{-1} típica del enlace amida. Además aparecen bandas pequeñas entre 800 cm^{-1} y 500 cm^{-1} que pueden deberse a los grupos aromáticos contenidos en el péptido.

La síntesis a través del dopaje del núcleo de la nanopartícula proporcionó, como esperábamos, un buen rendimiento global de radiomarcaje, siendo este del 88 % para todo el proceso. Este dato hace que la actividad específica del nano-radiotrazador sea de $7.2\text{ GBq}/\text{mmol Fe}$. Esto significa que si se quiere realizar un experimento de imagen PET a un ratón, administrando una dosis de 15 MBq , la cual resulta apropiada para obtener

imágenes de alta calidad, sólo se administrarían 1.9 μmol de Fe. Por tanto, la elevada actividad específica del nano-radiotrazador, en este caso, permitió realizar experimentos por PET *in vivo*, utilizando dosis pequeñas en términos de concentración de Fe sin comprometer la dosis radiactiva necesaria para generar una buena respuesta en la PET.

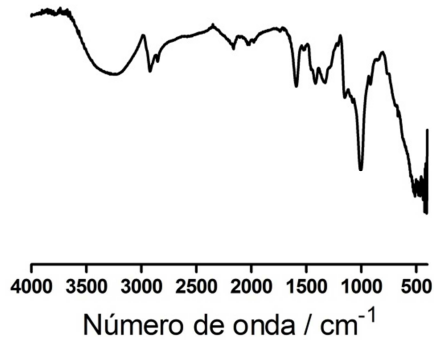


Figura 9.4. Espectro FTIR de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-NET.

Para usar las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-NET en la detección de neutrófilos, se utilizó un modelo de inflamación por infección en ratón, modelo en el que estas células responden ante un estímulo y aumentan en número localmente. De esta forma podríamos ver si las nanopartículas se encontraban en la zona inflamatoria causada por un agente externo. Hay varias formas de producir este tipo de modelo en ratones, entre ellas, una de las más utilizadas por su sencillez y rapidez es la administración de lipopolisacáridos (LPS).^{11,12} Los lipopolisacáridos son moléculas compuestas por una cadena lipídica y un polisacárido que forman parte de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Son endotoxinas que producen una fuerte respuesta del sistema inmune en mamíferos sanos. Por tanto, la inoculación de LPS en un ratón genera una respuesta inflamatoria

exacerbada con gran reclutamiento de neutrófilos que se dirigirán hacia el foco de inflamación producido por la infección.¹³

Para el estudio se procedió a la administración intratraqueal del LPS para producir una inflamación local en los pulmones del ratón. Para asegurar que en efecto se había producido una gran acumulación de neutrófilos en esa zona se realizó un conteo celular a través de citometría de flujo. En el experimento se instilaron intratraquealmente 50 µg de LPS suspendidos en 20 µL de PBS a 4 ratones sanos C57BL/6. Veinticuatro horas después de la administración se sacrificaron los ratones y se diseccionó el bloque cardiovascular, separando el tejido pulmonar para extracción y reconocimiento celular utilizando dos anticuerpos específicos, Anti-CD11b y Anti-Ly6g, para el marcaje específico de neutrófilos.¹⁴ Estos anticuerpos, conjugados con un fluoróforo, se detectan fácilmente en el citómetro mediante contado de eventos, es decir de neutrófilos, correspondientes con la longitud de onda de emisión del fluoróforo. Como control, se realizó el mismo experimento pero inoculando él mismo volumen de PBS 1X en lugar de LPS. Como se observa en la figura 9.5, el número de eventos correspondientes a los neutrófilos es muy superior en el caso de la administración con LPS, resultando evidente que veinticuatro horas tras su inoculación ya se había producido una gran acumulación neutrofílica en el pulmón.

También se realizó el análisis del modelo de ratón a través de histología. Una vez extraídos los pulmones del ratón se fijaron en formalina durante 48 h pasando después el tejido a EtOH 70 %. Los cortes realizados en

los pulmones se tiñeron con H&E y se llevaron a un microscopio de campo claro.

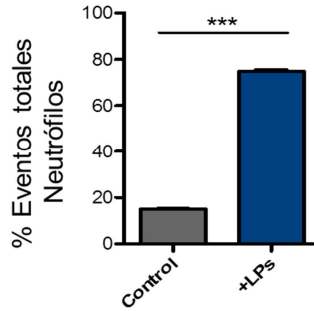


Figura 9.5. Cantidad de neutrófilos en pulmón 24 h tras la instilación del mismo volumen de PBS (control) y LPS.

Las imágenes obtenidas tanto de los animales control como de los inoculados con PBS reafirmaron los resultados obtenidos por citometría de flujo. Las imágenes de los animales con LPS mostraban, a parte de la infiltración de los neutrófilos, la formación de membranas hialinas (figura 9.6). La aparición de este tipo de estructuras son representativas en los casos de distrés respiratorio, descrita en los procesos inflamatorios agudos producidos tras la administración de LPS.^{15,16}

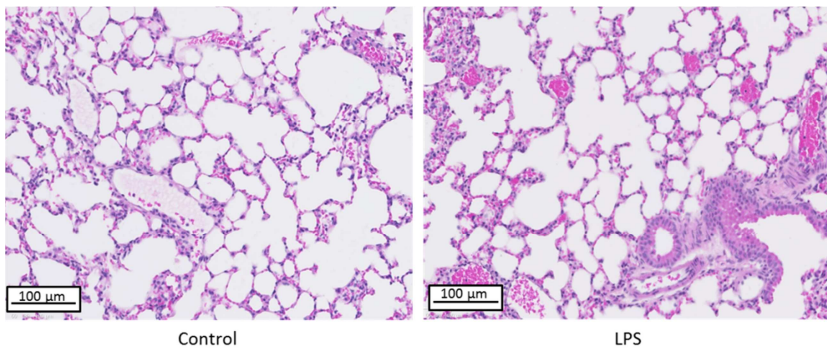


Figura 9.6. Imágenes histológicas de pulmones de ratones 24 h tras administrar intratraquealmente PBS (control) y LPS teñidos con H&E.

Una vez asegurada la presencia de inflamación en los pulmones desencadenando acumulación neutrofílica pasamos a realizar los experimentos *in vivo* con este modelo de ratón y utilizando el nano-radiotrazador ^{68}Ga -IONP-NET para ver si, efectivamente, la conjugación con el péptido c(FLFLF) facilitaba la detección de los neutrófilos. Se realizaron dos controles: un control usando el vehículo PBS empleado en la administración del LPS y otro de nanopartículas control sin el péptido de especificidad de tamaño similar a la del estudio. El primer experimento de control se realizó con inyección intravenosa de 15 MBq de ^{68}Ga -IONP-NET (1mg Fe/mL) a un ratón al que se le había administrado previamente por vía intratraqueal el vehículo PBS 1X veinticuatro horas antes. Este primer control lo incluimos para descartar que las nanopartículas cercanas a 100 nm de diámetro hidrodinámico pudieran quedar retenidas en la red de capilares pulmonares simplemente por causa de su tamaño sin tener nada que ver con una acumulación causada por su afinidad con los neutrófilos. Una hora después de la administración del nano-radiotrazador se realizó la adquisición de la imagen durante treinta minutos. Las imágenes no muestran acumulación en los pulmones, sino en los órganos habituales de eliminación de nanopartículas administrada intravenosamente como el hígado y bazo (figura 9.7). En conclusión, queda descartada la retención del nano-radiotrazador en la red capilar pulmonar por efecto del tamaño hidrodinámico de las nanopartículas.

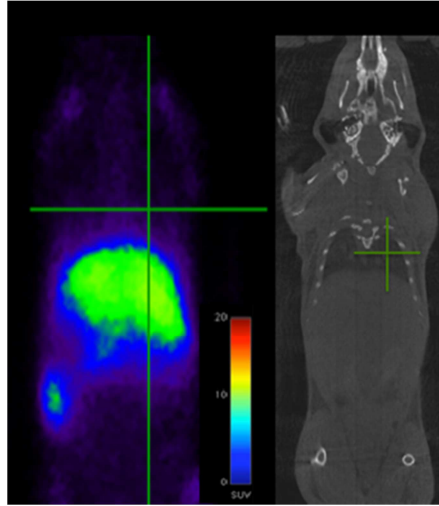


Figura 9.7. Imagen PET y CT de ratón C57BL/6, 24 h tras la administración intratraqueal de PBS 1X y 1 h tras inyectar, de forma intravenosa, 15 MBq del nano-radiotrazador ^{68}Ga -IONP-NET.

El segundo control se realizó con un ratón al que se le había instilado LPS veinticuatro horas antes y punción intravenosa de 15 MBq de las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-CIT (1 mg Fe/mL). Con esto queríamos descartar cualquier efecto que pudiera venir del sistema de partida sin funcionalizar. Como siempre, una hora tras la administración del radiotrazador se adquirió la imagen durante 30 minutos. El resultado mostrado en la figura 9.8 muestra inequívocamente que no había señal en los pulmones, sino solo de los órganos (hígado y vejiga) de eliminación. Además también se pudo observar, a través de las imágenes de CT mostrada a la izquierda de la figura 9.8, como había un engrosamiento peribronquial, causado por la administración de LPS.

Una vez descartado la inespecificidad de la nanopartícula control y la no presencia de acumulación en el pulmón tras la instilación del vehículo, se

realizó el experimento mediante la administración de LPS y del nano-radiotrazador ^{68}Ga -IONP-NET a un nuevo ratón.

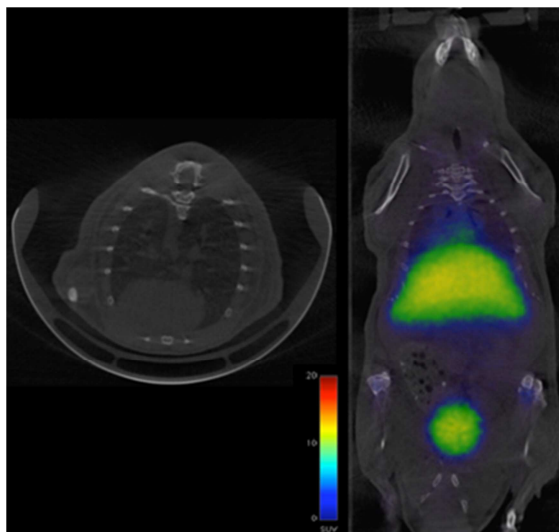


Figura 9.8. Imagen CT (axial) y PET/CT (coronal) de un ratón C57BL/6 24 horas tras instilación de 50 μg de LPS y después de una hora desde la administración intravenosa de 15 MBq del nano-radiotrazador ^{68}Ga -IONP-CIT.

La imagen PET acumulada de forma idéntica resalta, sin lugar a dudas, captación en los órganos de eliminación y una fuerte acumulación del nano-radiotrazador en los pulmones (figura 9.9). También se observó en el CT el mismo fenómeno de engrosamiento peribronquial debido a la inflamación causada por el LPS.

Estos resultados fueron confirmados a través de los estudios *ex vivo* de biodistribución por contador gamma. Para ello, se suministró, por vía intravenosa, el nano-radiotrazador control ^{68}Ga -IONP-CIT y el nano-radiotrazador conjugado con el péptido ^{68}Ga -IONP-NET a un total de cinco ratones por cada muestra de nanopartículas radiactivas, a las que se les

había instilado LPS en las mismas condiciones que los experimentos anteriormente descritos.

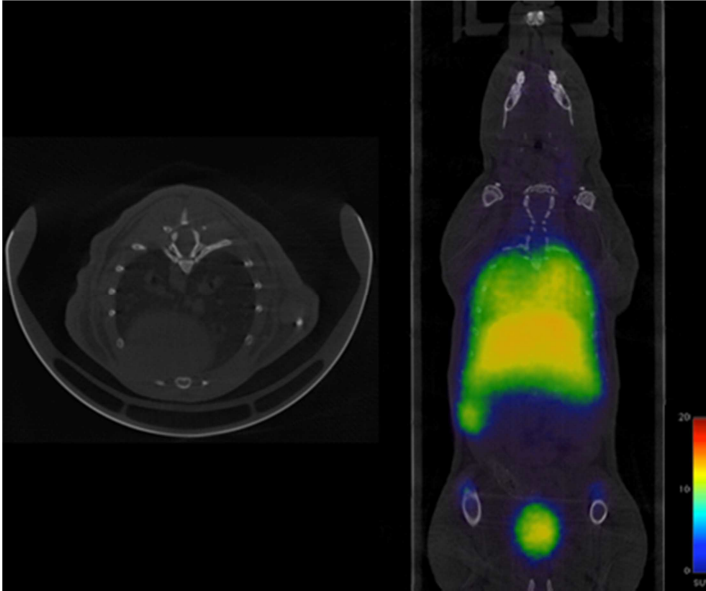


Figura 9.9. Imagen de CT (Axial) y PET/CT (coronal) de un ratón C57BL/6 24 horas tras la administración, por vía intratraqueal, de 50 μg de LPS después de una hora de la inyección intravenosa de 15 MBq del nano-radiotrazador ^{68}Ga -IONP-NET.

Como observamos en la figura 9.10, la diferencia de captación en los pulmones resultó ser muy significativa, presentando un $\%ID/g = 1.5$ para ^{68}Ga -IONP-CIT frente a un $\%ID/g = 22.3$ para ^{68}Ga -IONP-NET.

Finalmente, se realizó otro experimento por citometría de flujo para comprobar, de una forma concluyente si el nano-radiotrazador realmente estaba marcando neutrófilos. Para ello se conjugaron las nanopartículas con un fluoróforo Alexa 488®, generando unas nanopartículas Alexa488-IONP-NET (A-IONP-NET) funcionalmente y estructuralmente idénticas a las radiactivas, repitiéndose exactamente el mismo experimento anterior de citometría de flujo. Transcurrida una hora, se extrajeron los pulmones y de

ellos las células que se marcaron con los anticuerpos específicos de neutrófilos Anti-CD11b y Anti-Ly6g.

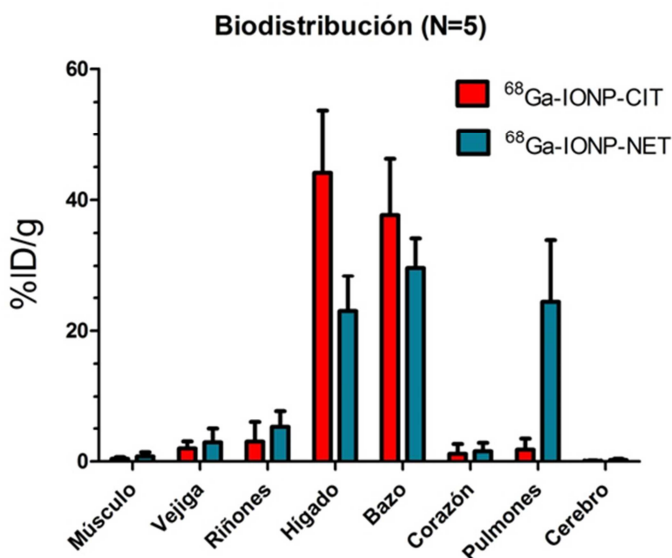


Figura 9.10. Biodistribución, por contador gamma, del nano-radiotrazador $^{68}\text{Ga-IONP-CIT}$ (rojo) y de $^{68}\text{Ga-IONP-NET}$ (azul) una hora tras su administración por vía intravenosa en cinco ratones, por cada nano-radiotrazador, a los cuales se les había suministrado LPS, por vía intratraqueal, veinticuatro horas antes.

Estos anticuerpos específicos emiten a longitudes de onda diferentes que la longitud de onda de emisión del fluoróforo conjugado con la nanopartícula, por lo que la correlación de eventos medidos por citometría de flujo correspondientes a la población de neutrófilos con la de las nanopartículas con el fluoróforo que emiten a longitud de onda distinta sugieren claramente que el nanotrazador (o nano-radiotrazador para el caso del PET) está marcando neutrófilos de manera específica (figura 9.11a). Este experimento permitió además determinar que casi un 20 % de los neutrófilos totales presentes en los pulmones estaban marcados con el nanotrazador mostrando una gran afinidad hacia los neutrófilos (figura 9.11b).

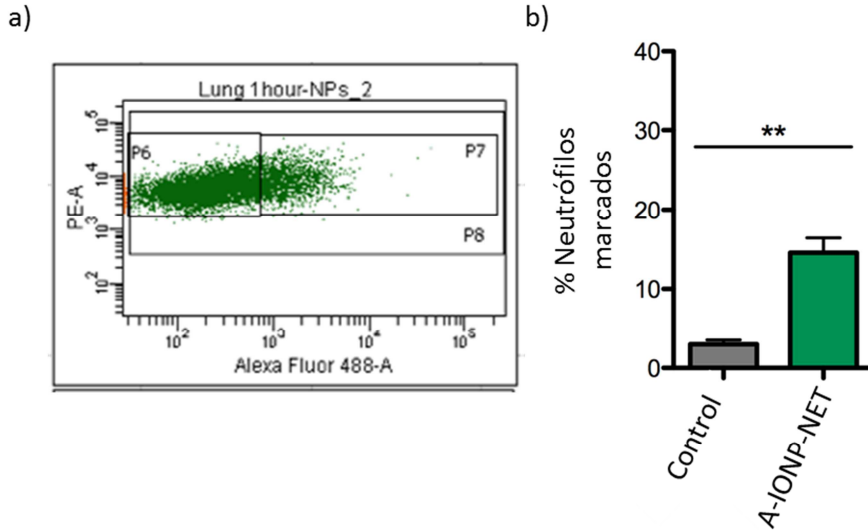


Figura 9.11. a) Diagrama de poblaciones realizado por citometría de flujo, b) % de neutrófilos marcados con nanotrazador en pulmón para un ratón con inflamación al que se le ha suministrado, por vía intravenosa, PBS (control) y las nanopartículas Alexa488-IONP-NET.

9.3.- Conclusiones

Se ha conseguido conjugar el nano-radiotrazador ^{68}Ga -IONP-CIT con el péptido c(FLFLF).

La conjugación proporcionó nanopartículas de mayor tamaño hidrodinámico, sin cambios en el núcleo y encontrándose bien dispersas en el medio.

El uso de lipopolisacáridos permitió generar un modelo de inflamación pulmonar en ratones sanos C57Bl/6 en tan solo veinticuatro horas produciendo un gran reclutamiento neutrofílico en el área afectada.

El nano-radiotrazador ^{68}Ga -IONP-NET demostró tener una gran afinidad hacia el pulmón inflamado en ratones. La gran acumulación en la zona pulmonar observada en experimentos de imagen PET *in vivo*, fue corroborada en los estudios de biodistribución.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo revelaron claramente una afinidad específica hacia los neutrófilos por parte del nuevo nano-radiotrazador.

9.4.- Bibliografía

1. Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P. & Halbwachs-Mecarelli, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.* **80**, 617–653 (2000).
2. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 173–182 (2006).
3. Summers, C. *et al.* Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* **31**, 318–324 (2010).
4. Nauseef, W. M. & Borregaard, N. Neutrophils at work. *Nat. Immunol.* **15**, 602–11 (2014).
5. Scapini, P. & Cassatella, M. a. *Social networking of human neutrophils within the immune system.* *Blood* **124**, (2014).
6. Kolaczkowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–75 (2013).
7. Wang, J. & Arase, H. Regulation of immune responses by neutrophils. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1319**, 66–81 (2014).
8. Babich JW, Dong Q, Graham W, et al. A novel high affinity chemotactic peptide antagonist for infection imaging. *J. Nucl. Med.* **38**, 268 (1997).
9. Locke, L. W. *et al.* A Novel Neutrophil-Specific PET Imaging Agent: cFLFLFK-PEG-64Cu. *J. Nucl. Med.* **50**, 790–797 (2009).
10. Pellico, J. *et al.* Microwave-driven synthesis of bisphosphonate nanoparticles allows in vivo visualisation of atherosclerotic plaque. *RSC Adv.* **5**, 1661–1665 (2015).
11. Chen, F. *et al.* Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion. *Nat. Immunol.* **15**, 938–46 (2014).
12. Liang, H., Hussey, S. E., Sanchez-Avila, A., Tantiwong, P. & Musi, N. Effect of Lipopolysaccharide on Inflammation and Insulin Action in Human Muscle. *PLoS One* **8**, e63983 (2013).
13. Nakatomi, K., Aida, Y., Kusumoto, K., Pabst, M. J. & Maeda, K. Neutrophils responded to immobilized lipopolysaccharide in the absence of lipopolysaccharide-binding protein. *J. Leukoc. Biol.* **64**, 177–184 (1998).
14. Shi, C. *et al.* Ly6G+ Neutrophils Are Dispensable for Defense against Systemic *Listeria monocytogenes* Infection. *J. Immunol.* **187**, 5293–5298 (2011).

15. Li, H., Meng, X., Liang, X., Gao, Y. & Cai, S. Administration of microparticles from blood of the lipopolysaccharide-treated rats serves to induce pathologic changes of acute respiratory distress syndrome. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **240**, 1735–41 (2015).
16. Sugamata, R. *et al.* Contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection. *Microbiol. Immunol.* **56**, 171–82 (2012).

CAPÍTULO

10

Conclusiones

Las conclusiones extraídas de este trabajo de Tesis son:

1) Se ha desarrollado un nuevo protocolo para la síntesis dirigida por microondas de nanopartículas recubiertas de ácido oleico reduciendo en gran medida el tiempo de reacción frente a la síntesis convencional.

2) La síntesis dirigida por microondas ha permitido estabilizar las nanopartículas en agua mediante modificación química del surfactante en tan solo 25 minutos.

3) Se han sintetizado nanopartículas duales PET/MRI de óxido de hierro dopadas en el núcleo con el isótopo radiactivo ^{68}Ga utilizando dextrano como surfactante.

4) Los nuevos nano-radiotrazadores presentan propiedades magnéticas que permiten su uso como agentes de contraste de realce T_1 en Resonancia Magnética

5) Dichos nano-radiotrazadores duales poseen largos tiempos de circulación en sangre generando imágenes de alta calidad tanto en PET como en angiografía por Resonancia Magnética.

5) Empleando ácido cítrico como surfactante se ha demostrado la posibilidad de generar nanopartículas para contraste T_1 o T_2 mediante mínimas modificaciones de los parámetros de síntesis.

6) El empleo de bifosfonatos como surfactante de las nanopartículas permite la visualización y caracterización de la placa de aterosclerosis por Resonancia Magnética en ratones $\text{ApoE}^{-/-}$, demostrando una acumulación rápida y selectiva.

7) La funcionalización de los nano-radiotrazadores con el péptido c(RGDfK) permite la identificación de procesos angiogénicos mediante imagen multimodal PET/CT y MRI.

8) La nanopartícula recubierta de citrato fue vectorizada con un péptido selectivo/específico de neutrófilos y empleado de forma rápida y no invasiva en el seguimiento *in vivo* y cuantificación de la inflamación en modelos inflamatorios agudos en ratón.

Anexos

Anexo I.- Técnicas instrumentales

Anexo II.- Procedimientos experimentales

Anexo

I

Técnicas Instrumentales

Las técnicas utilizadas a lo largo de la Tesis son las siguientes:

I.1.- Dispersión dinámica de luz (DLS)

Esta técnica ha sido utilizada para realizar la caracterización coloidal de las nanopartículas. La dispersión dinámica de luz permite conocer tanto el tamaño de las partículas dentro de una determinada suspensión como la carga superficial que presenten conocida como potencial ξ . En este caso se ha utilizado un equipo Nano Zetasizer ZS de Malvern Instruments equipado con un láser de He-Ne que opera a 633 nm y 4 mW y un detector de fotodiodo de avalancha.

Las medidas de tamaño hidrodinámico, en este caso de diámetro hidrodinámico (D_h), se basan en el movimiento browniano de las partículas. El movimiento browniano es un movimiento al azar que tiene lugar en las partículas, dentro de un determinado solvente, debido al choque de éstas con las moléculas del medio en que están suspendidas.¹ Este movimiento está relacionado con el tamaño hidrodinámico de las partículas a través de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D_h = \frac{k_b T}{3\pi\eta D_{\text{dif}}}$$

donde D_h es el diámetro hidrodinámico, k_b la constante de Boltzmann, T la temperatura, η la viscosidad del disolvente y D_{dif} el coeficiente de difusión de las partículas.²

El equipo utilizado en este caso hace incidir un haz de energía de la región visible sobre las nanopartículas. Al chocar este haz con las nanopartículas se produce una dispersión de la luz incidente en todas

direcciones. Esta dispersión es recogida por el fotodiodo del equipo que recoge la luz dispersa en función del ángulo sobre el que está incidiendo. El detector va registrando diferentes intensidades de luz en función del ángulo de incidencia a lo que se conoce como fluctuaciones. Finalmente, si se comparan estas fluctuaciones con el ángulo de incidencia inicial a lo largo del tiempo, se crea una función de correlación dependiente del tiempo que permite conocer el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas. Si las partículas son pequeñas, el movimiento de las partículas será rápido y por tanto la función de correlación decaerá rápidamente. Por el contrario, si las partículas son grandes, el movimiento será lento y la función decaerá de lentamente (figura I.1).³

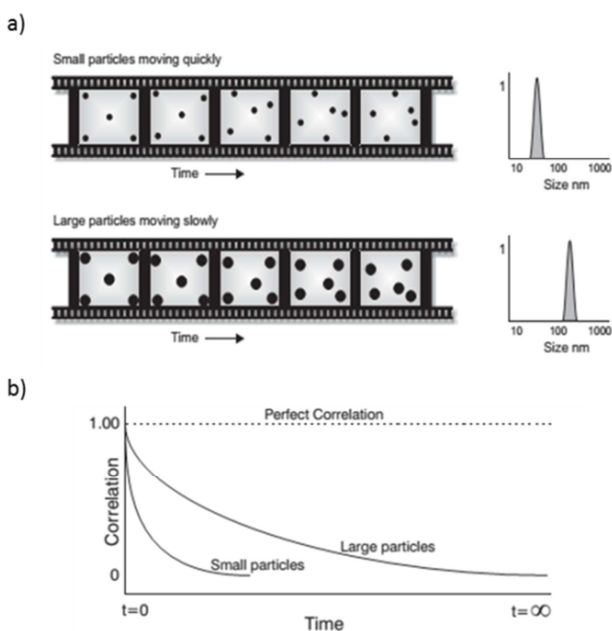


Figura I.1. a) Representación del movimiento de las partículas en función del tamaño y el tiempo; b) Función de correlación frente a tiempo en partículas grandes y pequeñas.

I.2.- Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)

La microscopía de transmisión electrónica ha sido empleada para la caracterización de los núcleos de las nanopartículas. Gracias a esta técnica podemos conocer el tamaño de los núcleos obtenidos así como su morfología e incluso su cristalinidad. Además permite visualizar la agregación de la muestra dentro de la suspensión.

Esta técnica está basada en la interacción de los electrones con la materia. Los electrones son generados por efecto termoiónico en un filamento, generalmente de wolframio. Después se genera una diferencia de potencial en un sistema a vacío para acelerarlos de forma que se produce un haz de electrones monocromático. Este haz monocromático incide sobre una fina capa de la muestra produciendo una difracción de los electrones contenidos en el haz. Este proceso genera un difractograma que puede convertirse en una imagen a través de unas lentes magnéticas. Las imágenes que se generan son la proyección de la estructura cristalina a lo largo de la dirección de los electrones.⁴

En este caso se utilizó un equipo JEOL JEM 2100 perteneciente al ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica (figura I.2). Este microscopio está equipado con un cañón de electrones termoiónico de LaB_6 y opera a un voltaje de aceleración de 200 kV. La resolución de este equipo entre puntos es de 0.25 nm.⁵

El proceso de preparación de la muestra es muy sencillo. En este caso se añadió una gota, de las nanopartículas diluidas, sobre una rejilla de

cobre recubierta de carbono dejando que el disolvente se seque por completo.



Figura I.2. Equipo JEOL JEM 2100 instalado en el ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica.

I.3.- Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).

La espectroscopía infrarroja permitió la caracterización de los grupos funcionales contenidos en los recubrimientos de las diferentes nanopartículas. Además dada la naturaleza de la técnica también se pudo evaluar la presencia del óxido de hierro que forma el núcleo de las mismas.

La espectroscopía infrarroja se fundamenta en el hecho de que los enlaces presentes en las moléculas tienen frecuencias de vibración específicas. Al someter una molécula a radiación infrarroja cambia su momento dipolar y se producen transiciones energéticas. El cambio de energía debido a las transiciones energéticas produce cambios en los modos de vibración y rotación de las moléculas. Estos cambios son únicos para cada tipo de enlace lo que permite distinguir los grupos funcionales contenidos en una molécula. Existen diferentes modos de vibración y cada tipo de enlace

entre átomos vibra de diferente forma produciendo bandas características y atribuibles a cada tipo de enlace en el espectro de FTIR (figura 1.3).⁶

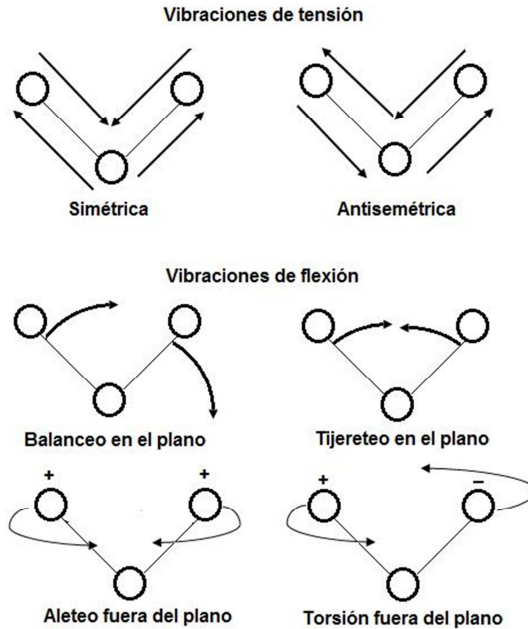


Figura 1.3. Diferentes modos de vibración de una molécula triatómica.

En este trabajo se ha utilizado un espectrómetro FT/IR-FT/NIR Perkin Elmer-Spectrum 400. Para la obtención del espectro, todas las muestras se encontraban en estado sólido realizando la medida directamente sobre el cristal del equipo.

Para obtener las muestras en estado sólido, las nanopartículas dispersas en solventes acuosos fueron previamente liofilizadas. Las muestras dispersas en disolventes orgánicos fueron secadas utilizando una placa caliente.

I.4.- Difracción de rayos X (DRX)

La difracción de rayos X es un fenómeno que se produce al interaccionar un haz de rayos X con la materia. Al incidir el haz sobre una estructura que presenta un ordenamiento concreto de átomos, se producen interferencias constructivas debidas a que los átomos están en fase con el haz produciendo radiación dispersa que viaja en una determinada dirección.

Este fenómeno sólo ocurre cuando el haz incide en un ángulo determinado. Este ángulo está relacionado con la distancia entre planos cristalinos y la longitud de onda del haz incidente a través de la ley de Bragg:

$$n\lambda = d_{hkl}\text{Sen } \theta$$

donde n es un número entero, λ la longitud de onda del haz, d_{hkl} la distancia entre los planos cristalino y θ el ángulo formado entre haz incidente y los planos cristalinos.

Por tanto a través de la difracción de rayos X se puede conocer la estructura cristalina que presenta una determinada muestra. En este caso se utilizó para comprobar la estructura cristalina del núcleo de las nanopartículas de óxido de hierro. Además, la técnica también permitió calcular el tamaño del cristal (D_{XRD}), para lo cual se utilizó la ecuación de Scherrer:

$$D_{XRD} = \frac{k\lambda}{B_c \cos \theta}$$

donde k es una constante dependiente de los parámetros experimentales utilizados, λ es la longitud de onda del haz de rayos X, B_c la anchura a media

altura del pico que posee mayor intensidad y θ es el ángulo donde se produce la difracción.⁷

El equipo utilizado fue un espectrómetro Bruker D8 Avance equipado con una línea de rayos X CuK α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$).

En este trabajo, al ser muestras de pequeño tamaño de núcleo, se utilizó un detector discriminador de energía (SOLX). Las muestras se midieron entre 5 y 90 °.

I.5.- Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico permite calcular la cantidad de masa que pierde un compuesto al aplicarle un rampa de temperatura en un tiempo determinado. En nuestro caso, esta técnica permite calcular la cantidad de surfactante que hay recubriendo el núcleo de la nanopartícula así como la fortaleza del enlace formado.

El equipo utilizado fue una termobalanza Seiko TG/DTA 320U. Para los experimentos, las muestras en estado sólido fueron sometidas a un rampa de temperatura de 10 °C/ minuto bajo flujo de aire de 100 mL/ min llegando a alcanzar los 900 °C. Se utilizó un soporte de platino y una referencia de $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$.

I.6.- Magnetómetro de muestra vibrante (VSM)

Esta técnica permite calcular el momento magnético de la muestra, parámetro de vital importancia para el estudio de las propiedades magnéticas de las nanopartículas de óxido de hierro.

El magnetómetro de muestra vibrante genera un campo electromagnético, generalmente a través de un electroimán o de una bobina superconductor, que es aplicado sobre la muestra, la cual, se encuentra vibrando a una frecuencia y amplitud conocida. Este campo magnético genera un cambio de flujo magnético que a su vez produce una fuerza electromotriz que es recogida en las bobinas de detección presentes en el equipo. La fuerza electromotriz generada al aplicar el campo magnético es proporcional al momento magnético de la muestra permitiendo el cálculo de su valor.

En este caso se congelaron 100 μl de las muestras en N_2 líquido, previamente a las medidas, para evitar la agregación de las nanopartículas por influencia del campo magnético. Las curvas de magnetización fueron obtenidas a 5 K y 250 K.

I.7.- Dispositivos superconductores de interferencia cuántica (SQUID)

Estos dispositivos pertenecen también al grupo de los magnetómetros y por tanto permiten calcular el momento magnético de una muestra en concreto.

Estos equipos están basados en el efecto Josephson, el cual permite crear una corriente eléctrica que fluya indefinidamente sin necesidad de aplicar una diferencia de potencial. Estos equipos, conocidos como unión Josephson se consiguen acoplando dos superconductores unidos a través de un eslabón débil que actúa como una barrera aislante delgada.⁸

El uso de este tipo de sistemas permite medir campos magnéticos muy sutiles pudiendo medir señales magnéticas del orden de 10^{-6} - 10^{-7} emu mientras que el límite de detección para magnetómetros de muestra vibrante es de 10^{-4} - 10^{-5} emu.

Para realizar la medida del momento magnético, se pusieron 100 μ l de nanopartículas sobre una pieza de algodón. Se dejó secar el disolvente a temperatura ambiente durante una noche. La pieza de algodón se introdujo en una cápsula de gelatina llevando a cabo las medidas de magnetización en un magnetómetro MPMS-5S a 250 K y 5 T.

I.8.- Relaxometría $^1\text{H-NMR}$

Esta técnica se ha utilizado para medir los tiempos de relajación de las nanopartículas.

Su funcionamiento está basado en el momento magnético que presenta el átomo de hidrógeno debido a que contiene un solo spin nuclear. Al someter la muestra a un campo magnético, los momentos magnéticos de los átomos de hidrógeno se alinean en la misma dirección del campo aplicado. Una vez que están alineados se produce un pulso de radiofrecuencia de 90 o 180 ° que provoca una excitación de los protones. Para volver a su estado fundamental los protones se relajan en un determinado tiempo conocido como tiempo de relajación. Existen dos tiempos de relajación diferentes en función de las coordenadas espaciales de los momentos magnéticos. Así pues, el tiempo que tardan en relajarse sobre el eje z (dirección del campo magnético) se conoce como tiempo de relajación longitudinal T_1 . A su vez al tiempo que tardan en relajarse sobre el

plano xy se le conoce como tiempo de relajación transversal T_2 . Estos tiempos de relajación determinan la capacidad de contraste de las nanopartículas de óxido de hierro y permiten calcular sus valores de relaxividad longitudinal y transversal.⁹ Para realizar este cálculo, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_{1b}} = r[Fe]$$

donde T_1 es el tiempo de relajación longitudinal de las nanopartículas, T_{1b} es el tiempo de relajación longitudinal del medio donde se encuentran dispersadas las nanopartículas, r es la relaxividad de la muestra y $[Fe]$ la concentración de hierro. Para el cálculo de los valores de relaxividad se realizaron medidas de los tiempos de relajación a diferentes concentraciones de hierro (0.24, 0.48, 0.8, 1.6 y 3.2 mM). Representando los valores obtenidos frente a dicha concentración de hierro, se obtiene una recta cuya pendiente es el valor de relaxividad. La misma ecuación puede ser utilizada tanto para el cálculo de r_1 como de r_2 , simplemente para el caso de r_2 se miden los tiempos de relajación T_2 en lugar de los T_1 .

Con esta técnica también se han calculado las concentraciones de hierro de las diferentes nanopartículas. Para ello se ha utilizado la ecuación anterior, donde la r es 10.9 calculada a partir de una curva patrón realizada a diferentes concentraciones conocidas de $FeCl_3$ (figura 1.4). Como el valor de r está calculado para Fe^{3+} , las nanopartículas sintetizadas necesitaron de un paso previo de hidrólisis en medio ácido y oxidante, liberando así todo el Fe contenido en el núcleo de las nanopartículas y oxidándolo a Fe^{3+} . Como medio de hidrólisis se ha utilizado una mezcla de H_2O , H_2O_2 y HNO_3 . Por

tanto, midiendo el T_1 en el equipo y sabiendo que r es 10.9 se pudo calcular la concentración de hierro, $[\text{Fe}]$.

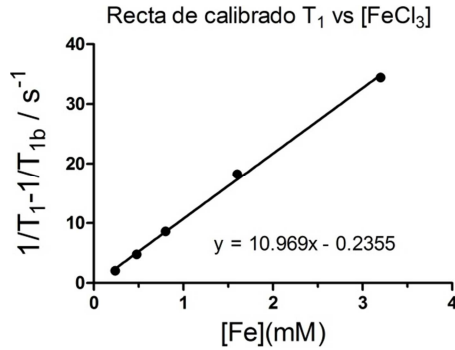


Figura I.4. Recta de calibrado, T_1 frente a concentración de Fe^{3+}

El equipo utilizado para medir las propiedades relaxométricas fue un Bruker Minispec mq60 que opera a 1.5 T (figura I.5). Todas las medidas fueron realizadas a 37 °C. Para medir la relajación longitudinal se utilizó una secuencia de pulsos $t1_ir_mb$ a diferentes tiempos de inversión según la concentración de la muestra. Para la relajación transversal la secuencia utilizada fue $t2_ir_mb$ a diferentes tiempos de eco dependiendo de dicha concentración.



Figura I.5. Bruker Minispec mq60

I.9.- Contador gamma

Para realizar los estudios de biodistribución de las nanopartículas dopadas con ^{68}Ga se utilizó un contador gamma.

El equipo utilizado fue un contador Wizard 1470 de Perkin Elmer (figura I.6). Este equipo permite calcular la radiactividad de una muestra en cuentas por minuto (cpm) de forma muy precisa. Además presenta una gran sensibilidad lo que permite medir muestras con muy poca radiactividad. El detector está basado en cristales de NaI pudiendo detectar todos los isótopos que emitan radiación gamma. En este caso el equipo presentó una eficiencia de conteo de 5.089×10^{-5} K bq/cpm. Todos los resultados de biodistribución mostrados en la Tesis están calculados como %ID/g, es decir:

$$\%ID/g = \frac{A_t/A_0}{\text{peso del tejido}}$$

donde A_t es la actividad medida en cpm por el contador gamma y transformada a K bq, A_0 es la actividad inyectada en K bq con decaimiento corregido a la hora del conteo y el *peso del tejido* es el peso de cada órgano medido expresado en gramos.



Figura I.6. Contador gamma Wizard 1470.

I-10.- Imagen *in vivo* por tomografía de emisión de positrones (PET)

El equipo utilizado para realizar las imágenes PET *in vivo* fue un sistema de imagen para animal pequeño Mediso nanoPET/CT. La temperatura de los animales se reguló en todo momento utilizando flujo de aire caliente y se puso gel ocular para evitar sequedad en los ojos. Todos los experimentos realizados en esta Tesis fueron realizados en modo estático con un tiempo de adquisición de 30 minutos. Después de realizar las adquisiciones de PET, se realizaron microCTs obteniéndose así una referencia anatómica y una corrección de atenuación. Las imágenes en una matriz 105 x 105 fueron reconstruidas utilizando un algoritmo iterativo Tera-Tomo 3D. Tanto la adquisición como la reconstrucción fueron llevadas a cabo en el software Nucline (Mediso, Hungría) proporcionado por el fabricante. Finalmente el análisis de las imágenes se realizó en el software Osirix (Pixmeo, Suiza).

I.11.- Imagen por Resonancia Magnética nuclear (MRI)

Las imágenes por Resonancia Magnética se hicieron en un equipo Agilent/Varian de 7 T (figura I.7). El sistema está equipado con una consola DD2, una bobina de gradiente 205/120 que puede trabajar a una fuerza máxima de 130 mT/m y una bobina de recepción de 2 canales.

Los animales fueron anestesiados con isofluorano al 2 % y una línea de oxígeno al 100 % y posicionados en una camilla regulada a una temperatura de 38.7 °C. En este caso también se utilizó gel óptico para evitar la sequedad de las retinas en los ratones.

Para realizar las imágenes axiales de la placa de aterosclerosis se utilizó una secuencia potenciada en T1 con los siguientes parámetros: FOV 30 x 30 mm (axial), corte de espesor de 0.8 mm (con la configuración de pequeña bobina de gradiente esto se puede reducir a 0.6 mm), TR 400 ms, TE 8 ms, matriz de datos de adquisición y reconstrucción de 256 x 256 y 8 barridos dando un tiempo de adquisición promedio de 5-8 min.

Las imágenes axiales de hígado fueron adquiridas, usando una secuencia de eco de gradiente con TE/TR 5 ms / 50 ms, BW de 50 kHz, FOV de 3 cm x 3 cm, 1 mm de grosor de corte, 30 barridos y ángulos de rotación de 30 y 20°.

Para la angiografía por resonancia se utilizó una secuencia de gradiente de eco 3D con un pre-pulso de contraste de transferencia de magnetización (MTC) que se realizó con los siguientes parámetros: TR min 11 ms; TE min, 1.75 ms, ángulo de inclinación de 20°, 3 barridos, matriz de adquisición 256 x 128 x 128, el ángulo de rotación de MTC de 810°; duración 6 ms; frecuencia de desplazamiento, 2000 Hz.



Figura I.7. Equipo Agilent/Variant 7 T.

I.12.- Bibliografía

1. Hänggi, P. & Ingold, G. L. Fundamental aspects of quantum Brownian motion. *Chaos* **15**, (2005).
2. Gittings, M. R. & Saville, D. A. The determination of hydrodynamic size and zeta potential from electrophoretic mobility and light scattering measurements. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **141**, 111–117 (1998).
3. *Zetasizer Nano Series User Manual Zetasizer Nano Series User Manual*. (2004).
4. Wang, Z. Transmission electron microscopy of shape-controlled nanocrystals and their assemblies. *J. Phys. Chem. B* **104**, 1153–1175 (2000).
5. Centro Nacional de Microscopía Electrónica. at <www.cnme.es>
6. Bates, J. B. Fourier transform infrared spectroscopy. *Science* **191**, 31–37 (1976).
7. Harding, M. M. X-ray analysis of crystal structures. *Chem. Br.* **4**, 548–553 (1968).
8. Fagaly, R. L. Superconducting quantum interference device instruments and applications. in *Review of Scientific Instruments* **77**, (2006).
9. Bulte, J. W., Brooks, R. A., Moskowitz, B. M., Bryant, L. H. & Frank, J. A. T1 and T2 relaxometry of monocrystalline iron oxide nanoparticles (MION-46L): theory and experiment. *Acad. Radiol.* **5 Suppl 1**, S137–S140; discussion S145–S146 (1998).

Anexo

II

Procedimientos experimentales

A continuación se presenta, de forma detallada, el procedimiento experimental para la síntesis de cada una de las sondas utilizadas en el desarrollo de esta Tesis:

II.1.- Síntesis por descomposición térmica de nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de ácido oleico (IONP-AO)

En un matraz de fondo redondo de tres bocas de 100 mL se disolvieron 1.42 g de $\text{Fe}(\text{acac})_3$, 3.38 g de ácido oleico, 3.2 g de oleilamina, 4.8 g de 1,2-Hexadecanodiol en 40 mL de difenil éter. Después, se pasó una corriente de N_2 por la mezcla de reacción durante 10 minutos. A continuación se calentó la mezcla a 200 °C durante 2 horas con agitación mecánica. Pasado este tiempo se incrementó la temperatura a 250 °C manteniéndose durante 30 minutos. Una vez acabado este tiempo se dejó que la mezcla alcanzara temperatura ambiente y se añadieron 30 mL de EtOH al 98 %. La disolución resultante se dejó bajo un imán de Nd-Nb-B durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 20 mL más de EtOH sometiendo la muestra a sonicación durante 10 minutos. Este proceso de purificación se repitió 5 veces más tras lo cual se resuspendieron las nanopartículas en 30 mL de CHCl_3 .

II.2.- Síntesis por microondas de nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de ácido oleico (MW-IONP-AO).

Se añadieron 0.5 g de $\text{Fe}(\text{acac})_3$, 1.4 mL de ácido oleico, 0.6 mL de oleilamina y 1.19 g de 1,2-Hexadecanodiol al vaso reactor del microondas. Los reactivos fueron disueltos en 10 mL de difenil éter. A continuación se puso el vaso en el microondas comenzando la reacción. El protocolo de reacción en el microondas consta de tres pasos diferentes. Todos ellos se

introdujeron a la vez en un mismo protocolo de forma que la síntesis transcurriera de forma secuencial:

Paso 1: temperatura 60 °C, tiempo 2 minutos, presión 250 psi, velocidad de agitación alta y potencia 150 W.

Paso 2: temperatura 200 °C, tiempo 20 minutos, presión 250 psi, velocidad de agitación alta y potencia 300 W.

Paso 3: temperatura 250 °C, tiempo 10 minutos, presión 250 psi, velocidad de agitación alta y potencia 300W.

Una vez terminado el protocolo del microondas, la mezcla de reacción fue puesta en un Erlenmeyer al que se le añadió 10 mL de EtOH 98 %. A continuación se dejó el Erlenmeyer sobre un imán de Nd-Nb-B durante 5 minutos. El sobrenadante fue eliminado con una pipeta Pasteur de vidrio, se añadieron 10 mL de EtOH 98 % y se sonicó la muestra durante 2 minutos a 40KHz y temperatura ambiente. Este proceso fue repetido 5 veces. Finalmente se resuspendieron las nanopartículas en 30 mL de CHCl₃ y se sonicó la muestra durante 5 minutos.

II.3.- Síntesis convencional de nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de ácido azelaico (IONP-AA).

Se disolvieron 0.3 g (1.9 mmol) de KMnO₄ y 0.8 g (4.3 mmol) en 40 mL de CHCl₃ y 10 mL de H₂O. Esta disolución fue añadida sobre 20 mL de nanopartículas IONP-AO a una concentración de 8 mg Fe/mL. La mezcla resultante fue agitada mecánicamente a 60 °C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo se añadieron 40 mL de tampón fosfato a pH= 2.9 y se dejó la

mezcla 24 horas más bajo agitación a 60 °C. Después, la mezcla de reacción alcanzó temperatura ambiente y se retiró la fase orgánica. A continuación, para eliminar el exceso de KMnO_4 , se añadieron 10 mL de NaHSO_3 1 % y se puso la mezcla bajo un imán de Nd-Nb-B. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 10 mL de NaOH 1 %. De nuevo se puso la mezcla sobre el imán, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 10 mL más de NaOH 1 % sonicando la muestra durante 10 minutos. Este proceso se repitió 3 veces y finalmente se resuspendieron las nanopartículas en 10 mL de tampón fosfato pH= 7.0.

II.4.- Síntesis por microondas de nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de ácido azelaico (MW-IONP-AA).

Se disolvieron 44.3 mg de KMnO_4 y 150.4 mg de BTACl en un mezcla $\text{H}_2\text{O}:\text{CHCl}_3$ (3:2 mL). Acto seguido se introdujo la muestra en el vaso reactor del microondas que previamente contenía 5 mL de las nanopartículas AO-IONP. La mezcla fue calentada en el microondas a 105 °C y 300 W de potencia durante 9 minutos. A continuación se añadieron 10 mL de tampón fosfato a pH= 2.9 y se repitió de nuevo el protocolo de microondas (temperatura 105 °C, tiempo 9 minutos, presión 250 psi y potencia 300 W). Una vez terminado el protocolo se puso la mezcla de reacción en un matraz Erlenmeyer, se recogieron las nanopartículas utilizando un imán de Nd-Nb-B y se eliminó el sobrenadante. 5 mL de NaHSO_3 10 % se añadieron al matraz y se sonicó la muestra durante 2 minutos a 40KHz y temperatura ambiente. El matraz fue puesto sobre el imán durante 2 minutos para recuperar las partículas. Se eliminó el sobrenadante y se repitió el proceso. A continuación se lavaron las nanopartículas 3 veces, repitiendo el mismo proceso, con

NaOH 1 %. Finalmente se redispersaron las nanopartículas AA-IONP en 5 mL de tampón fosfato pH= 7.2.

II.5.- Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro funcionalizadas con ácido Neridrónico (IONP-NER)

A 2 mL de IONP-AA, contenidos en un eppendorf, se añadieron 12 mg de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) y 15 mg de sal sódica de N-Hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS). Se dejó la mezcla en un vortex a temperatura ambiente durante 35 minutos. Transcurrido este tiempo, se desestabilizaron las nanopartículas poniendo un imán bajo el eppendorf, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 1.5 mL de tampón HEPES 1 mM a pH= 7. A continuación se adicionaron 5 mg de la sal sódica del ácido neridrónico y se dejó la mezcla en un vortex a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente las nanopartículas fueron purificadas utilizando un imán para recuperar la muestra, eliminando el sobrenadante y lavando 3 veces con 2 mL de tampón HEPES 1 mM y pH= 7.

II.6.- Síntesis por microondas de nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de dextrano (IONP-DEXT)

75 mg de $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (0.28 mmol) y 140 mg de dextrano (6 KDa, 0.02 mmol) fueron disueltos en 9 mL de agua destilada en el vaso reactor del microondas. A continuación se añadió 1 mL de hidrato de hidracina. Acto seguido, la mezcla de reacción fue sometida a calentamiento por microondas alcanzando 100 °C en 54 segundos. La disolución se dejó a 100 °C durante 10 minutos y 240 W de potencia. Transcurrido este tiempo, la reacción fue enfriada a 60 °C en el microondas y purificada pasando la mezcla a través de

una columna PD-10 eliminando así el exceso de reactivos pequeños. Finalmente se realizó un segundo paso de purificación por ultrafiltración a 11.300 x g durante 2 minutos eliminando así el exceso de dextrano sin reaccionar.

II.7.- Síntesis por microondas de nanopartículas duales de óxido de hierro dopadas con ^{68}Ga y recubiertas de dextrano (^{68}Ga -IONP-DEXT).

75 mg de $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (0.28 mmol), 140 mg de dextrano (6 KDa, 0.02 mmol) y 74 MBq de $^{68}\text{GaCl}_3$ en HCl (0.05 M, 3 mL) fueron disueltos en 6 mL de agua destilada en el vaso reactor del microondas. A continuación se añadió 1 mL de hidrato de hidracina. Acto seguido, la mezcla de reacción fue sometida a calentamiento por microondas alcanzando 100 °C en 54 segundos. La disolución se dejó a 100 °C durante 10 minutos y 240 W de potencia. Transcurrido este tiempo, la reacción fue enfriada a 60 °C en el microondas y purificada pasando la mezcla a través de una columna PD-10 eliminando así el exceso de reactivos pequeños y el ^{68}Ga no incorporado. Finalmente se realizó un segundo paso de purificación por ultrafiltración a 11.300 x g durante 2 minutos eliminando así el exceso de dextrano sin reaccionar. El procedimiento experimental proporcionó 9 mL de nanopartículas ^{68}Ga -IONP-DEXT con una actividad total de 56.2 MBq (medida 20 minutos después de empezar la reacción) dando un rendimiento de radiomarcaje del 93.4 %.

II.8.- Síntesis por microondas de nanopartículas duales de óxido de hierro dopadas con ^{68}Ga y funcionalizadas con el diglicidil éter del 1,4-Butanediol (^{68}Ga -IONP-EPOX).

A 2.5 mL de nanopartículas ^{68}Ga -IONP-DEXT (770 MBq) fueron añadidos 125 μL de una disolución que contenía NaOH 0.6 M y 2 mgmL^{-1} de NaBH_4 . Después, se añadieron 0.68 mmol de diglicidil éter del 1,4-Butanediol en el vaso reactor del microondas. La mezcla se calentó a 55 °C durante 20 minutos en el microondas. Pasado este tiempo se purificó la muestra primero a través de una columna PD-10, utilizando como eluyente tampón HEPES a pH= 8, y finalmente por ultrafiltración a 11.300 x g durante 2 minutos para eliminar los posibles productos secundarios de entrecruzamiento. Por último se redispersaron las nanopartículas en 2.5 mL de tampón HEPES a pH= 8 obteniéndose una actividad de 521.8 MBq (medida 35 minutos tras comenzar la reacción) para las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-EPOX, lo que proporcionó un rendimiento de marcaje del 97 %.

II.9.- Síntesis por microondas de nanopartículas duales de óxido de hierro dopadas con ^{68}Ga y funcionalizadas con c(RGDfK) para la detección de fenómenos de angiogénesis (^{68}Ga -IONP-RGD).

A 2.5 mL de nanopartículas ^{68}Ga -IONP-EPOX (515 MBq) suspendidas en tampón HEPES pH= 8, fue añadido 1 mg de c(RGDfK) disuelto en 200 μL del mismo tampón. La mezcla fue calentada en el microondas a 55 °C durante 15 minutos. Pasado este tiempo se purificó la muestra por ultrafiltración a 11.300 x g durante 2 minutos para eliminar el c(RGDfK) sin reaccionar. Finalmente se resuspendieron las nanopartículas en NaCl 0.9 %. Las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-RGD presentaban una actividad de 390 MBq

(medida 25 minutos después de empezar la reacción) dando un rendimiento de marcaje del 96 %. Posteriormente se cuantificó la cantidad del péptido contenido en las nanopartículas dando un rendimiento de reacción en la conjugación del 79 %.

II.10.- Síntesis por microondas de nanopartículas duales de óxido de hierro dopadas con ^{68}Ga y recubiertas con ácido cítrico (^{68}Ga -IONP-CIT).

75 mg de $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (0.28 mmol), 80 mg de la sal trisódica del ácido cítrico dihidrato (MW 294.09 g mol^{-1} , 0.27 mmol) y 1280 MBq de $^{68}\text{GaCl}_3$ en HCl (0.05 M, 4 mL) fueron disueltos en 5 mL de agua destilada en el vaso reactor del microondas. A continuación se añadió 1 mL de hidrato de hidracina. Acto seguido, la mezcla de reacción fue sometida a calentamiento por microondas alcanzando 100 °C en 54 segundos. La disolución se dejó a 100 °C durante 10 minutos y 240 W de potencia. Transcurrido este tiempo, la reacción fue enfriada a 60 °C en el microondas y purificada pasando la mezcla a través de una columna PD-10 eliminando así el exceso de materiales de partida sin reaccionar. La reacción proporcionó 9 mL de nanopartículas (^{68}Ga -IONP-CIT) con una actividad de 835 MBq (medida 20 minutos tras empezar la reacción) dando un rendimiento de radiomarcaje de 80.1 %.

II.11.- Síntesis por microondas de nanopartículas de óxido de hierro dopadas recubiertas de ácido cítrico (IONP-CIT100, IONP-CIT150, IONP-CIT165 y IONP-CIT180).

75 mg de $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (0.28 mmol) y 80 mg de la sal trisódica del ácido cítrico dihidrato (MW 294.09 g mol^{-1} , 0.27 mmol) fueron disueltos en 9

mL de agua destilada en el vaso reactor del microondas. A continuación se añadió 1 mL de hidrato de hidracina. Acto seguido, la mezcla de reacción fue sometida a calentamiento por microondas alcanzando 100 °C en 54 segundos (150, 165 o 180 °C). La disolución se dejó a 100 °C durante 10 minutos y 240 W de potencia. Transcurrido este tiempo, la reacción fue enfriada a 60 °C en el microondas y purificada pasando la mezcla a través de una columna PD-10 eliminando así el exceso de materiales de partida sin reaccionar.

II.12.- Síntesis por microondas de nanopartículas duales de óxido de hierro dopadas con ^{68}Ga y funcionalizadas con cFLFLF para imagen selectiva de neutrófilos en modelos de inflamación (^{68}Ga -IONP-NET).

A 2.25 mL de nanopartículas ^{68}Ga -IONP-CIT (770 MBq) fueron añadidos 14 mg de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) y 16 mg de sal sódica de N-Hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS). La disolución resultante se dejó bajo agitación durante 30 minutos en un termomixer. A continuación se purificó la reacción por ultrafiltración a 11.300 x g durante 2 minutos y se resuspendieron las nanopartículas en 1.5 mL de tampón fosfato pH= 8. Después se añadió 1 mg del péptido cFLFLF disuelto en 100 µl de tampón fosfato pH= 8 y se dejó la mezcla bajo agitación a temperatura ambiente durante 60 minutos. Finalmente, se purificó la muestra por ultrafiltración para eliminar el exceso de péptido sin reaccionar y se resuspendieron las nanopartículas en NaCl 0.9 %. Las nanopartículas ^{68}Ga -IONP-NT presentaban una actividad de 218.3 MBq (actividad medida 2 horas tras empezar la reacción) resultando en un rendimiento de radiomarcaje del 97 %.