



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Ciencias de la Conducta

Doctorado en Ciencias de la Salud

**Aplicación de la radiación Cerenkov de ^{177}Lu a
sistemas teranósticos dirigidos a los receptores
de quimiocina-4 y SR-B1**

TESIS

Para Obtener el Grado de:

Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

M. en C. Marcela Angélica Ávila Sánchez

Comité Tutorial:

Dra. en C. S. Liliana Aranda Lara

Tutora Académico

Dra. en C. Keila Isaac Olivé

Tutora Interna

Dra. en C. Nallely Patricia Jiménez Mancilla

Tutora Externa



Toluca, Estado de México, Noviembre del 2021



El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos (LANIDER), adscrito a la Gerencia de Aplicaciones Nucleares en la Salud en el Departamento de Materiales Radiactivos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Las actividades realizadas pertenecen al proyecto 337, cátedras CONACYT con clave CB-2016-286753, a cargo de la Dra. Nallely Patricia Jiménez Mancilla.

Por otra parte, también se realizaron diversas actividades en el Laboratorio de Investigación en Teranóstica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	5
I. ANTECEDENTES	
1. Radiación de Cerenkov en Medicina Nuclear.....	7
1.1. Producción y transporte de radiación de Cerenkov en tejido.....	8
1.2. Imágenes de luminiscencia de Cerenkov (CLI)	10
1.3. Propiedades del ^{177}Lu	12
1.4. Radiación Cerenkov ^{177}Lu	14
2. Receptores de péptidos reguladores sobreexpresados en células de cáncer	16
2.1. Las Citoquinas y Quimiocinas	17
2.2. Receptor de Quimiocinas-4.....	19
2.3. Receptor SR-B1.....	22
3. Sistemas Teranósticos basados en radiación Cerenkov.....	23
3.1. Terapia fotodinámica (TFD)	25
3.2. Agente fotosensibilizador (PS)	26
3.2.1. Rodaminas como agentes fotosensibilizadores.....	29
3.2.2. Sistema de nanopartículas de HDL reconstituidas como transportadores de rodaminas.....	32
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33

III. JUSTIFICACIÓN.....	35
IV. HIPÓTESIS.....	37
V. OBJETIVOS.....	39

VI. DISEÑO METODOLÓGICO

6.1. Diseño del estudio.....	41
6.2. Universo y Muestra.....	41
6.3. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	42
6.4. Procedimiento.....	43
6.4.1. Síntesis y caracterización química de HYNIC-CXCR4-L y DOTA-CXCR4-L	43
6.4.2. Obtención de los radionúclidos.....	44
6.4.3. Preparación de HYNIC-CXCR4-L conjugado con ^{99m} Tc y ¹⁷⁷ Lu.....	45
6.4.4. Determinación de la pureza radioquímica de los péptidos ^{99m} Tc-CXCR4-L o ¹⁷⁷ Lu-CXCR4-L.....	45
6.4.5. Estabilidad en suero de los péptidos ^{99m} Tc-CXCR4-L o ¹⁷⁷ Lu-CXCR4-L	46
6.4.6. Estudios <i>in vitro</i> y determinación de expresión de CXCR4.....	46
6.4.7. Estudios <i>in vivo</i> de los péptidos ^{99m} Tc-CXCR4-L o ¹⁷⁷ Lu-CXCR4-L.....	49
6.4.8. Preparación de rHDL-R.....	51
6.4.9. Caracterización fisicoquímica de rHDL-R6G, rHDL-R123 y rHDL-RB	52
6.4.10. Estudios <i>in vitro</i> de los sistemas rHDL-R6G, rHDL-R123 y rHDL- RB.....	53
6.4.11. Recolección de datos	57
6.4.12. Análisis estadístico	58
6.4.13. Aspectos éticos.....	58
6.5. Variables.....	59

VII. RESULTADOS

7.1. Artículo publicado: Synthesis and preclinical evaluation of the ^{99m}Tc -/ ^{177}Lu -CXCR4-L theranostic pair for in vivo chemokine-4 receptor-specific targeting.....61

7.2. Artículo enviado: Targeted photodynamic therapy using reconstituted high-density lipoproteins as rhodamine transporters.....63

7.2.1 Carta de envío del artículo.....64

VIII. DISCUSIÓN GENERAL.....66

IX. CONCLUSIONES GENERALES.....76

X. BIBLIOHEMEROGRAFÍA.....77

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

^{177}Lu	Lutecio-177
^{177}Lu -CXCR4-L	Conjugado peptídico acoplado con el ligando para CXCR4 y ^{177}Lu
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CXCR4-L	Conjugado peptídico acoplado con el ligando para CXCR4 y $^{99\text{m}}\text{Tc}$
Bmax	Parámetro que indica la concentración total de receptores
C6	Línea celular de glioma de rata
CLI	Imágenes de luminiscencia de Cerenkov
CXCL 12	Factor 1 derivado de células estromales, principal ligando del CXCR4
CXCR4	Receptor de quimiocinas 4
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DU-4475	Línea celular de cáncer de mama humano
Kd	Parámetro que indica el grado de afinidad con los receptores
PET	Tomografía por emisión de positrones
PET/CT	Tomografía por emisión de positrones-Tomografía computarizada

PET/MRI	Tomografía por emisión de positrones-Imagen de resonancia magnética
R	Rodamina
R123	Rodamina 123
R6G	Rodamina 6G
RB	Rodamina B
RC	Radiación de Cerenkov o Cherenkov
rHDL	Lipoproteína de alta densidad reconstituida
rHDL-R123	Nanopartículas rHDL cargadas con rodamina 123
rHDL-R6G	Nanopartículas rHDL cargadas con rodamina 6G
rHDL-RB	Nanopartículas rHDL cargadas con rodamina B
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SPECT/CT	Tomografía computarizada por emisión de fotón único-Tomografía computarizada
SR-B1	Receptor scavenger tipo B1
T47D	Línea celular de cáncer de mama humano
TFD	Terapia fotodinámica

RESUMEN

El término teranóstico hace alusión a vectores con reconocimiento molecular específico que proporcionan un diagnóstico no invasivo y/o terapia de forma simultánea y/o consecutiva para diversas enfermedades, en una misma formulación. Algunos de los sistemas teranósticos se han marcado con radionúclidos emisores de partículas cargadas. Estas partículas pueden producir radiación Cerenkov al viajar a velocidades superiores a la velocidad de la luz en un medio dieléctrico como el tejido biológico. El uso potencial de la radiación Cerenkov se ha extendido a nivel preclínico y clínico como herramienta para obtener imágenes moleculares y/o como fuente de excitación en terapia fotodinámica.

El objetivo general de la primera parte del proyecto fue preparar y caracterizar químicamente a los péptidos radiomarcados ^{99m}Tc -CXCR4-L y ^{177}Lu -CXCR4-L para la adquisición de imágenes preclínicas de tumores positivos al receptor de quimiocina-4 (receptor CXCR-4), el cual se sobreexpresa en distintos tipos de cáncer. Ambos péptidos radiomarcados se obtuvieron con alta pureza radioquímica (>98.5%). Se evaluó la capacidad de los compuestos para detectar el receptor CXCR-4, empleando las líneas celulares de cáncer de mama humano y de glioma de rata, DU-4475 y C6, respectivamente. Los valores de K_d y B_{max} calculados por ensayos de saturación, confirmaron la afinidad de ambos compuestos hacia el receptor CXCR4 expresada en las células DU-4475 y C6. Los estudios de biodistribución en ratones con tumores inducidos con células DU-4475 y C6, mostraron una rápida eliminación sanguínea,

renal y hepatobiliar de ^{99m}Tc / ^{177}Lu -CXCR4-L, así como una buena captación en los tumores para ambas líneas celulares. Las imágenes de ratones micro SPECT/CT, indican el potencial teranóstico del par ^{99m}Tc -CXCR4-L y ^{177}Lu -CXCR4-L. Los resultados justifican el realizar una investigación adicional para evaluar la eficacia terapéutica y la dosimetría de ^{177}Lu -CXCR4-L.

En la segunda parte del proyecto, se prepararon nanopartículas rHDL cargadas con rodaminas para su aplicación en terapia fotodinámica usando como fuente de excitación radiación Cerenkov (RC) proveniente del ^{177}Lu . Se prepararon y caracterizaron fisicoquímicamente los sistemas rHDL-R6G, rHDL-R123 y rHDL-RB, utilizando como fotosensibilizadores, a las rodaminas (R) 6G, B y 123. Los estudios de espectroscopia UV-Vis mostraron que la encapsulación de las R en las rHDL produjo cambios batocrómicos en el máximo de absorción de las R: R6G= 525 nm, R123= 500 nm y RB= 555 nm, mientras que en las rHDL los valores fueron: R6G= 535 nm, R123= 512 nm y RB= 560 nm. Los nanosistemas rHDL se obtuvieron con tamaños de partícula de 52.8 a 72.9 nm y potencial Z de -22.3 a -28.8 indicando estabilidad en la suspensión de las nanopartículas. La internalización de las R transportadas por las rHDL en las células T47D, fue mayor para la R6G que para R123 y RB. El bloqueo de receptores SR-B1 en las células T47D permitió confirmar que las rHDL-R tienen reconocimiento específico a SR-B1. Los estudios de citotoxicidad inducida por las rHDL-R en presencia de radiación Cerenkov derivada del Lu-177 muestra un efecto fotodinámico donde la combinación más efectiva correspondió a rHDL-R6G. Asimismo, la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) fue mayor en las células tratadas

con rHDL-6G e irradiadas con 532 nm. Estos resultados proporcionan información de la eficiencia de la terapia fotodinámica en los sistemas evaluados, ya que la cantidad de ROS intracelulares es proporcional al daño celular inducido. Todos los resultados obtenidos indican que el sistema rHDL-R6G/¹⁷⁷Lu es una alternativa viable como sistema teranóstico multimodal que combina TFD-radioterapia-imagen.

INTRODUCCIÓN

En años recientes, las investigaciones en medicina nuclear van dirigidas a identificar anomalías en etapas iniciales de la progresión de una enfermedad, lo que permitiría proporcionar un tratamiento oportuno y a un costo más accesible. Persiguiendo este propósito, se han desarrollado y evaluado agentes teranósticos (Ferro-Flores *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2019).

El término teranóstico hace alusión a vectores con reconocimiento molecular específico que proporcionan un diagnóstico no invasivo y/o terapia de forma simultánea y/o consecutiva para diversas enfermedades, en una misma formulación (Ferro-Flores *et al.*, 2015). Algunos de los sistemas teranósticos se han marcado con radionúclidos emisores de partículas cargadas β^- (^{177}Lu) o β^+ (^{18}F), las cuales además producir un efecto terapéutico y/o de diagnóstico, respectivamente; estas partículas producen RC al viajar a velocidades superiores a la velocidad de la luz en un medio dieléctrico como el tejido biológico. La RC ha emergido como herramienta para obtener imágenes de luminiscencia o como fuente de excitación en terapia fotodinámica. A pesar de que el ^{177}Lu es uno de los radionúclidos que más se utiliza en terapia y/o adquisición de imágenes nucleares (León-Rodríguez, 2013), limitados trabajos evalúan su potencial como fuente de emisión Cerenkov. La aplicación de la radiación Cerenkov del ^{177}Lu a sistemas teranósticos dirigidos a blancos moleculares como receptores de quimiocina-

4 o SR-B1, fomentan el desarrollo de alternativas terapéuticas y/o de diagnóstico. Estas alternativas pueden estar basadas en la interacción específica ligando-receptor en combinación con la incorporación de moléculas dentro de sistemas de liberación a escala nanométrica, tales como las rHDL.

La presente investigación se realizó persiguiendo dos objetivos principales, el primero fue evaluar la capacidad del sistema $^{99m}\text{Tc-CXCR4-L}$ / $^{177}\text{Lu-CXCR4-L}$ para detectar al receptor de quimiocinas-4 con la finalidad de obtener imágenes preclínicas. El segundo objetivo fue preparar y evaluar a un sistema teranóstico basado en rodaminas, las cuales previamente han demostrado propiedades fotodinámicas al ser excitadas con radiación Cerenkov. Las rodaminas se encapsularon en rHDL para facilitar la internalización específica en las células de cáncer positivas al receptor SR-B1. Además, se añadió ^{177}Lu como fuente de radiación de Cerenkov y se evaluó su potencial en terapia fotodinámica.

I. ANTECEDENTES

1. Radiación Cerenkov en Medicina Nuclear

La radiación de tipo luminoso emitida por una partícula alfa o beta, que se desplaza en un medio dieléctrico a una velocidad superior que la luz en dicho medio, se denomina radiación de Cerenkov o Cherenkov (Bernhard *et.al*, 2014). Dada la velocidad tan alta a la que se mueven las partículas, se polarizan e inmediatamente liberan energía en forma de radiación UV-visible (Figura 1) y se produce una onda de choque fotónica. La energía y el índice de refracción del medio, son factores que condicionan la emisión de RC (Jiménez-Mancilla *et al*, 2019).

Cherenkov y Vavilov, fueron pioneros en el estudio de la RC emitida por líquidos y sólidos con una fuente de ^{226}Ra , detectada mediante placas fotográficas. Sus investigaciones permitieron caracterizar a este fenómeno luminoso, estableciendo que sus propiedades eran distintas a las de la luz fluorescente. Los primeros en dar una explicación teórica a este fenómeno fueron Frank y Tamm, basándose únicamente en las ecuaciones de Maxwell (Bernhard *et.al*,2014).

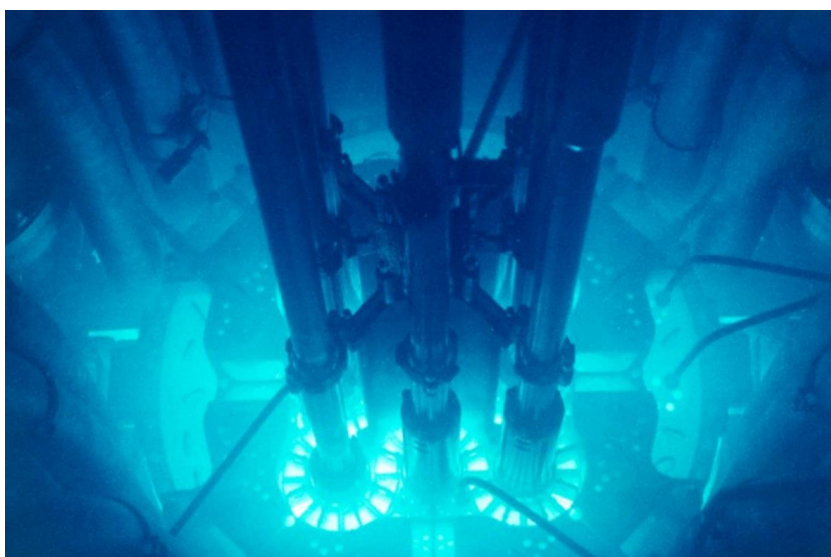


Figura 1. Resplandor azul de la radiación de Cherenkov procedente un reactor nuclear. Fuente: Revista Nature, “How a particle racing through a vacuum leaves a trail of blue light” , Mayo de 2019.

1.1. Producción y transporte de RC en tejido

En medicina nuclear, es de interés el desarrollo de técnicas no invasivas dirigidas a la obtención de imágenes moleculares (imágenes ópticas generadas por RC) y producción de un efecto terapéutico en enfermedades como el cáncer (p. ej. terapia fotodinámica). Sin embargo, la producción de RC en el tejido biológico es un proceso complicado, debido a las diferentes interacciones que pueden llevarse a cabo entre las partículas cargadas y las biomoléculas. Se han estudiado una variedad de radionúclidos como el ^{18}F , ^{13}N , ^{64}Cu , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{131}I y ^{177}Lu , para la producción de CR en el tejido biológico. Das y cols. presentaron evidencia de la obtención de imagen

preclínica por RC para el diagnóstico de linfoma empleando ^{18}F -FDG. Wood y Ackerman, realizaron una investigación referente al uso de ^{223}Ra , ^{212}Pb y ^{149}Tb en terapia alfa dirigida y en la producción de imágenes preclínicas (Das *et al.*, 2018; Wood & Ackerman, 2016).

Las partículas β cargadas, ya sean positrones o electrones liberados por desintegración radiactiva, interactúan con las moléculas de agua circundantes en los tejidos. Esta interacción se limita a unos pocos milímetros alrededor del radionúclido. Posteriormente, las moléculas de agua quedan orientadas al azar para después alinearse con las partículas cargadas que están presentes en el medio. De esta manera, los átomos circundantes quedan polarizados, originando un frente de onda coherente que emite fotones y electrones secundarios cuando el medio se relaja, de acuerdo con el principio de Huygens. La mayor parte de las interacciones con fotones, son eventos Compton, con energía cinética por debajo del umbral de Cerenkov (Ruggiero *et al.*, 2010). La producción de RC, también puede derivarse a partir de electrones secundarios con energía cinética por encima del umbral de Cerenkov.

Para los electrones y positrones, el umbral de Cerenkov en el tejido es aproximadamente 220 keV. El espectro de emisión de Cerenkov tiene un pico en el azul ultravioleta y es posible determinarlo empleando la fórmula de Frank y Tamm. Existen estudios que estiman el rendimiento de luz Cerenkov proveniente de radionúclidos. De acuerdo con Gill y cols, el rendimiento de luz de Cerenkov proveniente de ^{90}Y es de 47.3 fotones/desintegración, para ^{18}F se encuentra entre 1.0-

3.5 fotones/desintegración, para ^{11}C se calculó en 6.87 fotones/desintegración, por citar algunos (Gil *et al.*, 2015). Cuando se genera la RC dentro del cuerpo, inicia un proceso de absorción óptica debido a moléculas de grasa, agua y hemoglobina, sin embargo; en contraste con lo que sucede con los haces de radiación externa, esta absorción es mínima para la RC (Beattie *et al.*, 2012).

1.2. Imágenes de luminiscencia de Cerenkov (CLI)

La RC permite obtener imágenes de la distribución espacial de biomoléculas o niveles de expresión de genes o de proteínas específicas, marcadas con radionúclidos emisores β , utilizando dispositivos sensibles con carga acoplada e indicadores ópticos. Las CLI tienen las ventajas de contar con una buena resolución, son útiles para obtener imágenes de estructuras superficiales y que son menos costosas que otras técnicas de imágenes nucleares, como el PET (Boshi & Spinelli, 2020). Algunas aplicaciones de las imágenes por RC son: la obtención de imágenes funcionales de radioisótopos, dosimetría de superficie en radioterapia de haz externo, el uso en la terapia de protones para garantizar la calidad y dosimetría *in vivo*, la endoscopia de luminiscencia Cerenkov y extirpación quirúrgica tumoral guiada por luminiscencia Cerenkov (Ciarrocchi, Belcari, 2017).

Una porción significativa de las partículas β emitidas por radionúclidos poseen una energía por encima del umbral de la RC en el tejido, por lo que pueden producir una cantidad detectable y medible *in vivo* (Jiménez-Mancilla, 2019). En el caso de la

producción de RC mediante los radionúclidos, este valor está en función de los órganos y de las propiedades de los radionúclidos (Gil *et al.*, 2015). La emisión de fotones de RC se realiza con un espectro continuo característico de cada radionúclido y proporcional al cuadrado de la inversa de la longitud de onda.

La radiación de Cerenkov se emite en un cono alrededor de la dirección de la partícula (Figura 2), a un ángulo θ que depende de la relación $\beta=v/c$ y del índice de refracción del medio n , expresado como:

$$\cos\theta = \frac{1}{\beta n}$$

donde

β es la velocidad relativa a la de la luz en el vacío,

v es la velocidad de la partícula cargada,

c es la velocidad de la luz en el vacío.

El rango e intensidades de las longitudes de onda emitidas son propias del material. En el tejido, la luz emitida se dispersa y absorbe mucho antes de llegar a la superficie, por lo que la emisión es mínima. Debido a esto, para detectar RC, se requiere un dispositivo de carga acoplada, el cual tiene una alta sensibilidad. Algunos fotones son detectables incluso en las longitudes de onda entre 700-900 nm, con una buena penetración en tejido, permitiendo la formación de imágenes ópticas de pequeños animales (Spinelli, Boschi, 2011).

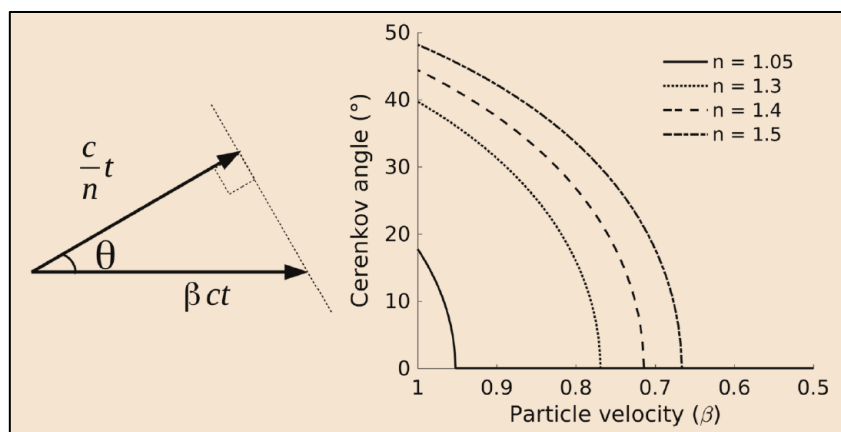


Figura 2. Emisión de radiación de Cerenkov. Ángulo de Cerenkov en función de la velocidad de la partícula, para diferentes valores de índice de refracción. Fuente: Ciarrocchi and Belcari EJNMMI Physics (2017) 4:14.

Cada vez más se indaga de las técnicas multimodales, sistemas híbridos PET/CT y PET/MRI que han permitido la localización no invasiva y temporal de tumores y otras enfermedades.

1.3. Propiedades del ^{177}Lu

El ^{177}Lu es un radionúclido que es utilizado en terapia molecular debido a sus propiedades de emisión (Figura 3). Emite partículas β negativas con energías máximas de 498 keV y 133 keV con un alcance de penetración en el tejido de 1.7 mm y 0.23 mm, respectivamente; lo que favorece el depósito de su energía en volúmenes pequeños como micrometástasis (León-Rodríguez, 2013). Cuando el ^{177}Lu está unido a

un blanco molecular a través de una molécula con reconocimiento específico, el alcance de la partícula β (0.23 mm) es ideal para depositar la energía en cada célula blanco con diámetro promedio de 0.02 mm. La dosis absorbida estimada al núcleo de la célula, es 0.075 mGy por desintegración que ocurre en la membrana de la célula y 0150 mGy por desintegración en el citoplasma. El ^{177}Lu también emite fotones γ con energías de 113 keV (6.6%) y 208 keV (11%) apropiadas para la adquisición de imágenes *in vivo* en equipos SPECT y para la realización de estudios dosimétricos personalizados, previos a la terapia con radionúclidos, que permiten establecer la dosis máxima tolerable para un determinado radiofármaco de ^{177}Lu a partir de imágenes del paciente. La emisión β y γ del ^{177}Lu son importantes para el desarrollo de agentes teranósticos (Luna-Gutiérrez *et al.*, 2013).

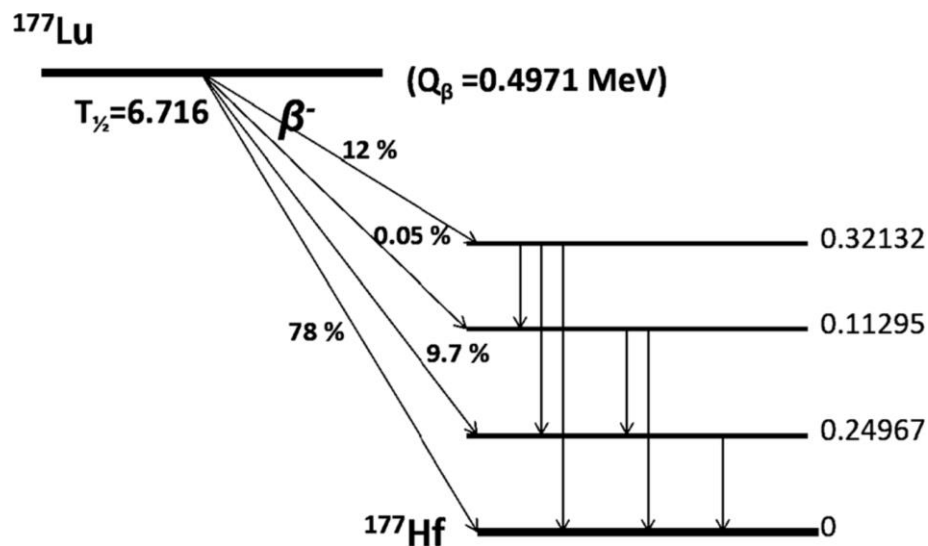


Figura 3. Esquema simplificado de decaimiento de ^{177}Lu .

El ^{177}Lu se encuentra en el estado de oxidación +3, lo que le da la posibilidad de radiomarcarse una gama amplia de péptidos, anticuerpos y otras proteínas. Existen investigaciones diversas de estudios clínicos y preclínicos, que abarcan terapia y obtención de imágenes diagnósticas.

1.4. Radiación Cerenkov de ^{177}Lu

El ^{177}Lu emite partículas β y algunas de ellas alcanzan el límite relativista, porque viajan más rápido que la velocidad de la luz en diferentes medios. La emisión y transmisión de RC generada por ^{177}Lu en tejido, permiten la obtención de imágenes preclínicas y proporcionar terapia fotodinámica para enfermedades, como es el caso del cáncer. En la Figura 4, se muestra el espectro de emisión de las partículas β obtenido de forma teórica para el ^{177}Lu (Beattie *et al.*, 2012).

Los umbrales de energía necesarios para que el ^{177}Lu emita RC en agua y tejido son de 246.06 keV y de 219.19 a 242.97 keV, respectivamente, dependiendo del índice de refracción del tejido. Aproximadamente, el 25% de las partículas β emitidas por ^{177}Lu presentan una energía mayor que la energía umbral requerida para la generación de RC (Figura 4). Esta característica permite mejorar la resolución espacial de las imágenes ópticas preclínicas y clínicas.

El espectro de RC no depende del tipo de radionúclido utilizado. Jiménez-Mancilla y cols, caracterizaron teórica y experimentalmente el espectro RC de ^{177}Lu en la ventana óptica del tejido (600-900 nm) (Jiménez-Mancilla *et al.*, 2017). Algunas conclusiones de estos estudios son que el espectro de emisión RC de ^{177}Lu emite un 45% de fotones poseen energías dentro de la ventana óptica del tejido y que pueden penetrar a una profundidad de 1.25 cm en el tejido. La RC proveniente de este radionúclido es adecuada para la obtención de imágenes preclínicas.

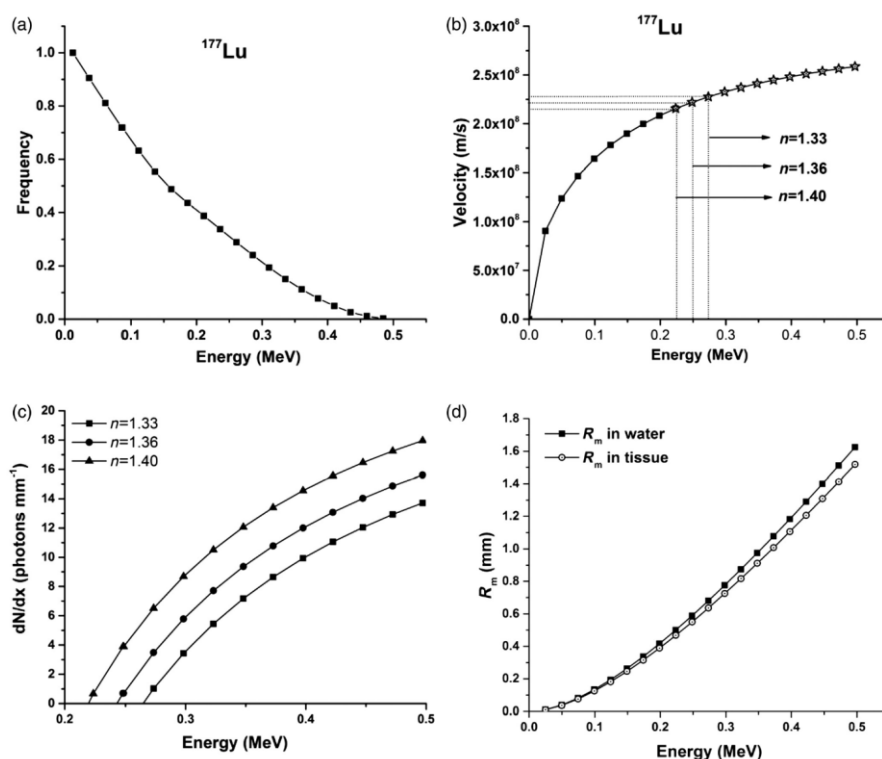


Figura 4. (a) Espectro de energía de las partículas β emitidas por ^{177}Lu . La figura (b) representa la relación entre la energía y la velocidad en el agua ($n = 1.33$) y el tejido ($n = 1.34$ a 1.36). En la figura (c) se muestra el número de fotones producido por la unidad de trayectoria recorrida de la partícula β obtenida mediante la ecuación de Frank-Tamm en agua y tejido, y (d) rango medio de las partículas β emitidas por ^{177}Lu en agua y tejidos determinados por técnicas de medicina nuclear.

2. Receptores de péptidos reguladores sobreexpresados en células de cáncer

Los receptores de membrana son proteínas o glicoproteínas que permiten la comunicación externa con la interna, al favorecer la interacción de determinadas sustancias con los mecanismos del metabolismo celular. Los receptores de membrana de células de cáncer cambian su expresión según el estado del cáncer, por ejemplo; receptores de membrana encargados de señalizaciones relacionadas con la supervivencia y proliferación celular (Demmer *et al.*, 2011). Esto permite que estos receptores sean utilizados como blancos moleculares para su localización, a través de péptidos y/o ligandos que puedan reconocer dichos receptores de tal forma que puedan unirse específicamente (Akashi *et al.*, 2008).

En la actualidad, son pocos los receptores que son blancos terapéuticos, debido a que falta conocimiento referente a las interacciones receptores-ligandos, ya que es complicado el estudio en el laboratorio de estas interacciones. No obstante, existen un sin número de contribuciones de diversos grupos científicos en el diseño y estudio de fármacos que tienen como blanco molecular a los receptores de membranas. Es destacable la aplicación clínica de los resultados de estas investigaciones, en el tratamiento y diagnóstico de enfermedades difíciles de abordar, como es el caso del cáncer.

Expertos han planteado una hipótesis que trata de vislumbrar lo que sucede a nivel de membrana celular, refiriéndose a la interacción que debe tener el ligando con la

membrana, antes de unirse al receptor, lo cual dificulta la reproducción fiel de la interacción receptor-ligando en el laboratorio. El resultado es el aumento local de la concentración del ligando, acelerando la activación del receptor (Chatterjee *et al.*, 2014).

Las proteínas que logran atravesar la membrana celular y unirse al ADN, son capaces de regular la transmisión de señales química y la transcripción genética, procesos fundamentales en el desarrollo celular y su función o funciones principales. Cuando estos procesos no están bien regulados, el resultado puede ser la aparición de estados patológicos, como el cáncer (Zhao *et al.*, 2014).

2.1. Las Citoquinas y Quimiocinas

Las citoquinas son proteínas secretadas por las células del sistema inmune y funcionan como mensajeros modulando las intrincadas interacciones entre este tipo de células. Son capaces de regular la duración e intensidad de la respuesta inmune, al estimular o inhibir la proliferación celular, la secreción de anticuerpos o la producción de las mismas citoquinas (Figura 5) (Luker *et al.*, 2012).

Un tipo de citoquina, las quimiocinas, son péptidos pequeños de 8 a 12 kDa que funcionan como citoquinas quimioatrayentes involucradas en la activación y en la diferenciación de las células del sistema inmune. Las quimiocinas son secretadas al medio extracelular y al tener un extremo carboxilo de carácter básico, tiene afinidad

para unirse a glicosaminoglicanos y moléculas de azúcar cargadas negativamente que se encuentran a la superficie celular y la matriz extracelular (Demmer *et al.*, 2011). De esta manera, pueden unirse a múltiples receptores transmembrana específicos de siete tramos acoplados a la proteína G intracelular, generando las señales necesarias para que la migración celular ocurra.

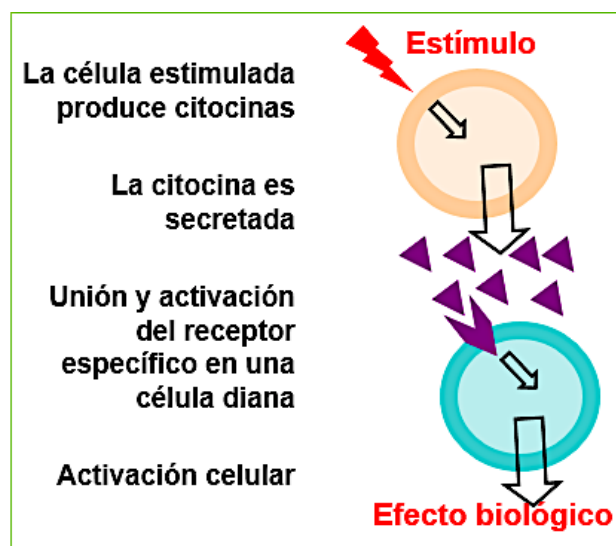


Figura 5. La unión de la citoquina al receptor genera una cascada de señalización intracelular que altera la expresión génica de la célula, lo que genera efectos biológicos: diferenciación, proliferación o activación.

Fuente: Sociedad Española de Inmunología (<https://www.inmunologia.org/index.php>).

El sistema inmune depende de la señalización de las quimiocinas para dirigir la migración de los linfocitos, organizar las respuestas inflamatorias y estimular la cicatrización. La migración celular es un complejo proceso que conlleva varios pasos

donde las quimioquinas juegan un papel central; en este movimiento participan también de forma coordinada selectinas, integrinas y citoquinas. Las quimioquinas son secretadas al medio extracelular y presentadas por los glicosaminoglicanos (GAG) en el endotelio celular (Hyafil *et al.*, 2017) a sus receptores en lugares específicos donde promueven las señales necesarias para que la migración celular ocurra.

2.2. Receptor de Quimiocinas-4

Además de su función en la homeostasis del sistema inmunológico, las quimiocinas juegan un papel crítico en el desarrollo de procesos inflamatorios y altos niveles de estos ligandos se han detectado en la circulación sistémica de pacientes con cáncer o procesos autoinmunes como artritis reumatoide, lupus o esclerosis múltiple (Lapa *et al.*, 2017). Este hecho revela el uso potencial de las quimiocinas como biomarcadores en estados patológicos con valor diagnóstico y de respuesta a los tratamientos, basado en el reconocimiento por su propio receptor dado que solo las quimiocinas son capaces de unirse a ese ligando y así es posible detectarlas.

El CXCR4 es un receptor transmembrana de siete dominios (352 aminoácidos, 48 kDa) acoplados a la proteína G. La señalización mediada el receptor de quimiocinas-4 (CXCR4) es importante en todos los aspectos de la tumorigénesis, incluida la proliferación, invasión, angiogénesis y metástasis. Se ha encontrado que el CXCR4 es un marcador de pronóstico en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama. La quimiocina CXCL12 (factor 1 derivado de células estromales o SDF-1) se une

principalmente al receptor CXCR4 y en menor medida al receptor CXCR7 (Poschenrieder *et al.*, 2016).

La quimiocina CXCL12, se expresa en la médula ósea humana y murina, fundamentalmente por las células estromales y endoteliales y por los osteoblastos del endostio. Es una quimiocina de la familia CXC que regula la quimiotaxis de los leucocitos (Wu *et al.*, 2010), la diferenciación de linfocitos T, neovascularización y reclutamiento de precursores de osteoclastos. La unión al ligando provoca la internalización de CXCR4, la degradación del receptor y la desensibilización a la señalización de CXCL12/CXCR4 (Luker *et al.*, 2012). Algunos fármacos pueden bloquear la interacción CXCL12 / CXCR4 o inhibir la señalización intracelular en sentido descendente.

La unión de CXCL12 a CXCR4 produce múltiples vías de transducción de señales que regulan la quimiotaxis, el flujo de calcio intracelular, la transcripción y la supervivencia celular. Después de la unión, el receptor sufre cambios por ubiquitinación antes de la degradación lisosomal. En el caso específico del cáncer, la señalización de CXCL12/CXCR4 promueve la migración y la invasión de las células malignas y la angiogénesis (Wu *et al.*, 2010), la disponibilidad de CXCL12 en microambientes tumorales afectan sustancialmente la progresión del cáncer. Los gradientes de CXCL12 atraen células tumorales circulantes a órganos secundarios y apoyan la proliferación posterior de células malignas, lo que contribuye a la formación de metástasis en órganos que secretan altos niveles de CXCL12, como el pulmón, los huesos y los

ganglios linfáticos (Poschenrieder *et al.*, 2016). La sobreexpresión del eje CXCL12/CXCR4, es una característica de los tumores agresivos, ya que está relacionada con el tamaño del tumor, la recurrencia y un mal pronóstico para el paciente.

En el cáncer de mama, el CXCR4 promueve la diseminación de las células tumorales a los pulmones y los ganglios linfáticos. El receptor CXCR4 predice un mal pronóstico en pacientes con carcinoma de células renales. En el caso de melanoma, induce metástasis pulmonares sin diseminación de los ganglios linfáticos (Hyafil *et al.*, 2017).

La señalización vía CXCL12, es un objetivo farmacológico con buena proyección a futuro, empleado cada vez más con éxito en terapia de cáncer de mama y otra veintena de neoplasias malignas humanas.

El plerixafor o Mozobil (AMD3100) una molécula pequeña y derivado pentapéptido cíclico conectado por un fragmento aromático y es un antagonista selectivo reversible del receptor de quimiocina CXCR4, actúa bloqueando la unión de su ligando CXCL12. Recientemente, el fármaco ⁶⁸Ga-Pentixafor®, se utiliza como un buen trazador para tomografía por emisión de positrones, permitiendo reconocer al CXCR4. El antagonista del péptido CXCR4, Ac-TZ14011 marcado con ¹¹¹In, mostró una acumulación alta en los riñones y el hígado, y una acumulación baja en tumores (Akashi *et al.*, 2008). Algunos otros antagonistas son Balixafortide, BL8040, FC131, AMD3100, GSK812397,

CTCE-9908, NOX-A12, MDX-1338. Se ha utilizado el fármaco N- [11C] metil-AMD3465, para obtener imágenes *in vivo* de la expresión de CXCR4 en células de glioma.

2.3. Receptor SR-B1

El receptor captador clase B tipo 1 (SR-B1), es un multiligando para proteínas cuya función principal es mediar la captación de ésteres de colesterol derivados de lipoproteínas de alta densidad (HDL), a partir de las lipoproteínas circulantes. Otra de sus funciones, es la salida de colesterol de los tejidos periféricos retornando al hígado. El hígado transforma el colesterol captado en ácidos biliares y lo excreta mediante la bilis. Al reducirse la afinidad de la HDL por el receptor, esta retorna al torrente sanguíneo (Jiang, 2017; Jiang *et al.*, 2019). Al aumentar el contenido de colesterol de la membrana plasmática, se incrementa la absorción de vitaminas liposolubles y la entrada de virus.

El receptor SR-B1 se sobreexpresa en la mayoría de las células de cáncer, esto lo hace un excelente marcador tumoral. La proliferación de las células de cáncer depende del colesterol, dicho de otra manera, el colesterol es el “alimento” que requieren en respuesta a su alta actividad (Gospodarowicz *et al.*, 1982).

Estudios recientes indican que el nivel de expresión de SR-B1 está relacionado con la agresividad del cáncer de mama en comparación con el tejido sano circundante. También se ha demostrado, que la eliminación selectiva de SR-B1 permite minimizar la

proliferación tumoral, probablemente al disminuir la activación de la señalización de la proteína quinasa B (Akt) (Jiang, 2017).

La proteína SR-B1 tiene dominios con una región alta en cisteína, una región intracelular N-terminal, una C-terminal. Existe una hipótesis que indica que la forma en que el SR-B1 facilita el transporte de HDL, es formando un canal hidrofóbico. Hu y cols, han concluido la importancia de los residuos de cisteína en la captación selectiva de lípidos, posiblemente debido el plegamiento erróneo de proteínas (Hu *et al.*, 2005).

3. Sistemas Teranósticos basados en radiación Cerenkov

Los agentes teranósticos proporcionan diagnóstico y tratamiento, de manera simultánea y/o consecutiva en una misma formulación. Ejemplo de ellos, son los vectores moleculares con reconocimiento molecular específico radiomarcados con radionúclidos de diagnóstico o terapia, considerando el mismo vector específico, por ejemplo, nanoplataformas funcionalizadas con más de una molécula o biomolécula capaz de realizar ya sea la función de diagnóstico y/o tratamiento. Estos sistemas, son útiles en el seguimiento de la progresión de la enfermedad y en la evaluación de la respuesta a la terapia (Xue *et al.*, 2018).

Dependiendo de la aplicación, los radiofármacos de tercera generación pueden utilizarse como agentes de diagnóstico o como agentes terapéuticos, los cuales dependerán del tipo de radionúclido utilizado en su diseño. En general, las

características de los radiofármacos deben ser tales que aporten la máxima eficiencia para el diagnóstico o tratamiento mientras que la dosis administrada sea la mínima posible. Algunas de las características que se deben considerar para el diseño y desarrollo de radiofármacos son: la farmacocinética, la selección del blanco molecular y la selección de molécula de reconocimiento específico (biomarcador). Todos estos factores modifican el tiempo de retención del radiofármaco en sangre, la cinética de interacción del biomarcador con el receptor y la ruta de excreción. Para imagen molecular, el radiofármaco debe tener su máxima captación en la región blanco en el menor tiempo posible con una señal/ruido adecuada. Para imagen y terapia molecular, el tiempo de residencia del trazador en sangre debe ser mínimo, pero, suficiente como para que el radiofármaco llegue al sitio específico. Por último, es necesario que el agente tenga una alta excreción renal para minimizar la acumulación de la radiactividad en el tracto gastrointestinal (Morín Zorrilla & Cruz Arencibia, 2012).

Recientemente, sistemas multifuncionales de dendrímeros conjugados a DOTA, Bombesina y ácido fólico y con nanopartículas de oro en su cavidad dendrítica han mejorado sus propiedades teranósticas cuando se marcan con ^{68}Ga y ^{177}Lu . En este caso particular el ^{177}Lu también se utilizó para obtener imágenes por luminiscencia Cerenkov (16). Dicha modalidad se origina por la detección de fotones con longitudes de onda entre 350-900 nm emitidos por efecto Cerenkov, el cual se produce cuando una partícula cargada atraviesa el medio con una velocidad mayor que la velocidad de propagación de la luz en ese medio, generando fotones con longitudes de onda entre

350-900 nm debido a la excitación que produce la polarización de los átomos del medio.

3.1. Terapia fotodinámica (TFD)

Es un tratamiento no invasivo de enfermedades como el cáncer y otras enfermedades, en el que sustancias fotosensibilizadoras son expuestas a fuentes de luz de una cierta longitud de onda. Las sustancias se excitan y se acumulan de manera específica en el sitio a tratar, con el propósito de producir especies reactivas de oxígeno induciendo un daño oxidativo irreversible. La TFD se puede aplicar varias veces, sin que se acumule toxicidad o sin presentar resistencia (Kwiatkowski *et al.*, 2018).

La TFD por radiación de Cerenkov, funciona con luz que tiene poca profundidad de penetración en los tejidos, ya que la luz visible o en el infrarrojo cercano penetran menos de 1 cm a través de los tejidos. Cuando se expone un fotosensibilizador a una fuente de luz, ocurre una reacción de tipo 1 o de tipo 2. La reacción de tipo 1, independiente de oxígeno, ocurre cuando un fotosensibilizador en estado excitado transfiere un electrón a las biomoléculas circundantes, produciendo radicales superóxido o hidroxilo altamente reactivos (Kavadiya *et al.*, 2019). Se da una reacción de tipo 2 o dependiente de oxígeno, cuando el fotosensibilizador transfiere energía directamente al oxígeno molecular, formando O_2 , altamente reactivo. El O_2 tiene el

potencial de destruir directamente las células tumorales mediante apoptosis o necrosis (Roblero-Bartolón *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2020).

La TFD por RC proveniente de radionúclidos, podría eliminar la necesidad de irradiación de haz externo y minimizar potencialmente la exposición de los tejidos sanos, ya que se realiza el tratamiento de forma específica. La TFD se emplea con mayor éxito para tratar tumores hipóxicos y a su vez es capaz de incrementar el estado hipóxico al causar daño en los vasos sanguíneos (Glaser *et al.*, 2015).

La fluencia de luz de la radiación de Cherenkov de estas fuentes de radiación, que tienen el potencial de ayudar a definir los límites de detección, las eficiencias y, en última instancia, el desarrollo de futuras tecnologías biomédicas. aplicaciones que utilizan radiación de Cherenkov. Estas intensidades de luz son bajas y, aunque son útiles, la aplicación práctica requerirá sistemas de imágenes altamente sensibles o alteraciones fotoquímicas altamente sensibles. La fluencia total entregada al tejido por un radionúclido, se obtiene conociendo las desintegraciones por unidad de volumen, cálculo realizado empleando el sistema MIRD.

3.2. Agente fotosensibilizador (PS)

Los fotosensibilizadores son sustancias que se excitan con la absorción de la luz UV/visible y causan daño oxidativo a las biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos,

receptores), produciendo en las células necrosis o apoptosis. Cuando estos medicamentos, se utilizar de forma controlada, pueden tener efectos anticancerígenos, antibacterianos, antifúngicos o antivirales.

La acción del PS, está en función del ambiente que lo rodea y cómo interactúe con él. Los PS se unen a las membranas celulares con mayor frecuencia, ya que tienen una mayor lipofilidad y mayor concentración de oxígeno que el medio circundante. Aún falta ahondar más en la forma de diferenciar las moléculas con daño oxidativo por PDT de forma específica; pero existen estudios basados en predicciones para tipos específicos de biomoléculas, validados posteriormente en sistemas biológicos. De forma general, en una reacción de fotooxidación el agente PS, tras excitarse con la luz, pasa a un estado de triplete para, posteriormente, convertirse en un singlete de oxígeno (agente electrófilo) y radicales libres capaces de oxidar a las biomoléculas. También puede ocurrir una reacción directa a una mayor velocidad, en donde el triplete formado reacciona con un doble enlace de algún sustrato de cadena larga lipídica de la membrana celular. Esto ocasiona un doblez en la cadena de ácidos grasos, aumentando la bicapa lipídica de la membrana, lo que probablemente explique la separación de fases de las membranas.

Estos cambios, afectan la señalización celular y son determinantes en el mecanismo de muerte celular posterior. La fotooxidación de otras biomoléculas también tiene efectos relevantes, como en el caso de los péptidos que al producir radicales libres por una reacción en cadena entre las moléculas oxidadas, son capaces de oxidar a otras

proteínas. Abrahamse y cols, han demostrado que la fotooxidación de enzimas, puede ocasionar que estas se inactiven (Abrahamse & Hamblin, 2013). Las vitaminas pueden ser donadores de electrones para el estado triplete excitado del oxígeno. Si el fotodaño es a nivel de quinasas, se puede inducir muerte celular por autofagia. Si se involucra a los orgánulos como el retículo endoplasmático o el aparato de Golgi, el efecto del daño es que se afecta la producción de biomoléculas. El ADN también puede ser diana del fotodaño, lo que provoca ruptura de cadena sencilla por el oxígeno singlete y potenciales efectos mutagénicos. Debido a que las células cancerosas son, por lo general, resistente a la apoptosis, la muerte por autofagia ocasionada por TFD es una buena alternativa.

Después de la reacción del oxígeno singlete, puede llevarse a cabo una reacción de Diels-Alder produciendo endoperóxidos o la formación de hidroperóxidos por reacción con alquenos, por mencionar algunas vías. Los hidroperóxidos son inestables y reaccionan en cadena en presencia de radicales por peroxidación, produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS). Por otra parte, también existe la posibilidad de que el singlete de oxígeno reaccione con aminoácidos, bases nitrogenadas e incluso puede ocasionar la degradación del PS. El singlete de oxígeno reacciona con iones ferrosos presentes en el ambiente biológico, dando lugar a reacciones de Fenton con la consecuente generación de radicales hidróxilo.

A continuación, se mencionan algunas propiedades del oxígeno singlete:

- 1) Vive alrededor de 3 a 4 veces más en los lípidos de la membrana celular que en agua.
- 2) Puede detectarse a 1270 nm por fluorescencia.
- 3) El alcance de difusión del oxígeno singlete dentro de la célula, es de alrededor de 100 nm.
- 4) El oxígeno singlete es una especie reactiva que actúa alrededor de su sitio de generación.

Entre algunos fotosensibilizadores utilizados para la TFD, se encuentran los derivados de porfirina, el ácido aminolevulínico (ALA o Levulan) es un medicamento que se aplica en la piel; el porfímero sódico (Photofrin) para tratar a pacientes con ciertos tipos de cánceres del esófago, pulmón, vejiga, cuello uterino, así como también las ftalocianinas y algunas rodaminas, como la B.

3.2.1. Rodaminas como agentes fotosensibilizadores

Las rodaminas son conjugados macromoleculares orgánicos heterocíclicos fluorescentes pertenecientes a la familia de los xantenos y sustratos de glicoproteínas. Son utilizados como sondas fluorescentes debido a sus notables propiedades: su alto coeficiente de absorción y emisión de fluorescencia en la región visible del espectro electromagnético, su fotoestabilidad, su solubilidad en agua y baja toxicidad. Las rodaminas no son usadas frecuentemente como PS para la TFD, debido a su bajo nivel

de producción de oxígeno singlete, poca penetración tisular, escasa selectividad y bajas secciones eficaces de absorción desde sus estados excitados (Jiménez-Mancilla, et al, 2021). Algunas de las rodaminas que se han investigado para TFD, son la rodamina 6G (R6G), la 123 (R123) y la de tipo B (RB). Jiménez-Mancilla y cols, demostraron que las rodaminas 6G, 123 y B, son compuestos fotoestables que poseen baja especificidad, también indicaron que las rodaminas excitadas con RC, producen una alta acumulación a nivel mitocondrial y una elevada citotóxicidad. La naturaleza catiónica de estas rodaminas, facilitan las reacciones de transferencia de electrones y la producción de ROS (Abrahamse, Hamblin, 2016).

La R6G, también llamada cloruro de rodamina 590, reacciona mediante transferencia de electrones con el ácido fólico. La RB es muy soluble en agua y ampliamente usado en la industria textil y alimenticia. Se utiliza como biomarcador en la vacuna antirrábica oral; ocasiona irritación en las mucosas y piel. La R123 es un marcador mitocondrial verde fluorescente, ampliamente usado con estudios de citometría de flujo. En la siguiente figura, se presentan las estructuras químicas de las tres rodaminas, antes citadas (Figura 6).

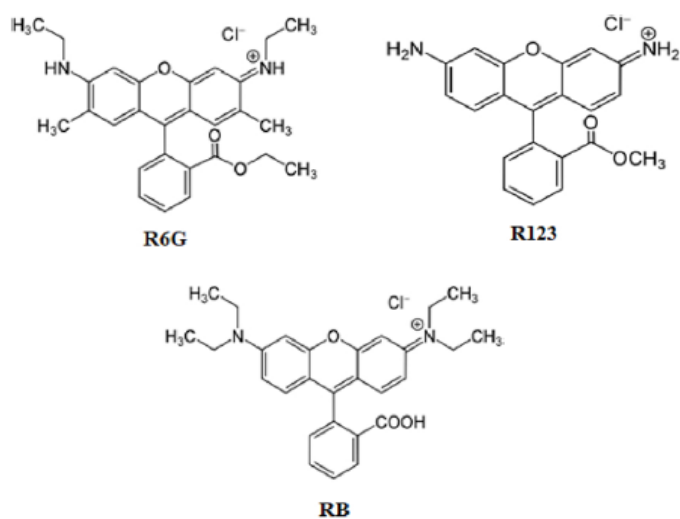


Figura 6. Estructura de las rodaminas 6G, 123 y B.
Fuente: Sociedad Española de Inmunología (<https://www.inmunologia.org/index.php>).

3.2.2. Sistema de nanopartículas de HDL reconstituidas como transportadores de rodaminas

Las rHDL se han utilizado de manera eficiente para transportar y administrar agentes para diagnóstico y / o terapia al citosol. Se ha demostrado que las nanopartículas de lipoproteínas de alta densidad reconstituidas (rHDL), facilitan la internalización de agentes terapéuticos y diagnósticos, dirigidos al receptor SR-B1 transportándolos de forma específica a células cancerosas. Uno de los objetivos de este estudio fue evaluar el daño citotóxico producido por sistema de rHDL acopladas al receptor SR-B1, empleando ciertos tipos de rodaminas como fotosensibilizadores y el radionúclido ^{177}Lu como generador de RC.

Benjamin y cols, han indicado que el uso de un radionúclido y rodaminas, han permitido aprovechar la RC en la TFD, con resultados muy favorables, consiguiendo la erradicación de tumores bien localizados en 14 días. Este efecto se encuentra asociado a roturas de doble cadena de ADN en las células cancerosas.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, durante el 2021 de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), la cuarta causa de muerte es el cáncer, precedido por la diabetes mellitus, COVID-19 y enfermedades del corazón. En 2020, el número de casos de diagnosticados con cáncer fueron 191,000 de los cuales 84,000 fallecieron. Esto indica un alto porcentaje de pacientes que no responden favorablemente al tratamiento convencional, cirugía y radio-quimioterapia concomitante (OMS,2021). Debido a esto, se requiere desarrollar nuevas alternativas que faciliten la detección oportuna del cáncer y/o con una alta eficacia en el tratamiento. En medicina nuclear se están desarrollando investigaciones para lograr terapias dirigidas con radionúclidos, no invasivas y altamente específicas con mínimo de daño a tejidos sanos. Algunos sistemas explorados recientemente, son los teranósticos basados en RC proveniente de radionúclidos como el ^{177}Lu , que muestran un reconocimiento molecular específico en células de cáncer para diagnóstico y/o terapia en una misma formulación (Glaser, 2015). Estos sistemas permiten identificar anomalías en etapas iniciales de la progresión de una enfermedad, lo que conlleva al tratamiento temprano de cáncer y con ello a la reducción del costo del mismo.

Con el propósito de evaluar un sistema teranóstico que utilice RC de ^{177}Lu dirigido a los receptores CXCR4 y SR-B1, se plantean las siguientes preguntas de investigación:

1. ¿Es posible optimizar la detección específica de las células de cáncer positivas al receptor de quimiocina 4 mediante $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-CXCR4L y ^{177}Lu -DOTA-CXCR4L con una aplicación útil en la obtención de imágenes moleculares?
2. ¿Es posible incrementar la muerte de células de cáncer positivas al receptor SR-B1 mediante el uso de rodaminas encapsuladas en nanopartículas de lipoproteínas de alta densidad reconstituidas y excitadas con RC proveniente de ^{177}Lu ?

III. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con la OMS, en 2020 19.3 millones de personas en el mundo enfermaron de cáncer y 10 millones fallecieron, lo que posicionó a este padecimiento como la segunda causa de muerte. El 70% de los decesos ocurrieron en países de tercer mundo (OMS, 2021). Por ser el cáncer una de las principales causas de muerte en nuestro país y también a nivel mundial, resulta comprensible que se realicen cada vez más investigaciones dirigidas al desarrollo de nuevas modalidades para la detección y el tratamiento oportuno de esta enfermedad.

Las técnicas de medicina nuclear que utilizan RC producidos por radionúclidos van dirigidas a la obtención de imágenes con propiedades únicas. También van encaminadas a desarrollar técnicas no invasivas que permitan introducir una fuente de luz Cerenkov dentro del tejido para aplicaciones en terapia fotodinámica. La investigación de radiofármacos teranósticos de RC, puede permitir personalizar el tratamiento de algunos tipos de cáncer, mediante un diagnóstico oportuno y un tratamiento efectivo y no invasivo, a un menor costo que los tratamientos convencionales.

En este estudio, se realizaron evaluaciones *in vitro* e *in vivo* de los sistemas ^{99m}Tc -HYNIC-CXCR4L y ^{177}Lu -DOTA-CXCR4L para detectar al receptor CXCR4 que se encuentra sobreexpresado en diferentes tipos de cáncer. También se evaluó *in vitro* el daño ocasionado por un sistema formado por rodamina-rHDL- ^{177}Lu en células de cáncer que sobreexpresan al receptor SR-B1, para verificar su uso potencial en terapia fotodinámica. Algunos tipos de cáncer que sobreexpresan a estos dos receptores, son de difícil abordaje y de mal pronóstico.

IV. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS ALTERNAS

1) El reconocimiento específico de los péptidos ^{99m}Tc -CXCR4-L y ^{177}Lu -CXCR4-L, por células de cáncer que sobreexpresan al receptor CXCR-4, como células DU-4475 de cáncer de mama humano y C6 de glioma de rata, produce una captación suficiente en los tumores y permite obtener imágenes preclínicas funcionales mediante RC y terapia dirigida.

2) El sistema formado por rodaminas encapsuladas en nanopartículas de rHDL, produce daño citotóxico al liberar de forma específica a las rodaminas en las células de cáncer que sobreexpresan al receptor SR-B1 y después de la excitación de las rodaminas con RC de ^{177}Lu , con aplicación útil en la TFD y en la obtención de imágenes de fluorescencia.

HIPÓTESIS NULAS

1) El reconocimiento específico de los péptidos ^{99m}Tc -CXCR4-L y ^{177}Lu -CXCR4-L, por células de cáncer que sobreexpresen al receptor CXCR-4, como células DU-4475 de cáncer de mama humano y C6 de glioma de rata, no producen una captación suficiente en los tumores y no permite obtener imágenes preclínicas funcionales mediante RC y terapia dirigida.

2) El sistema formado por rodaminas encapsuladas en nanopartículas de rHDL, no produce daño citotóxico al internalizarse de forma específica en células de cáncer que sobreexpresan al receptor SR-B1 y después de la excitación de las rodaminas con RC de ^{177}Lu , no siendo útil en la TFD y en la obtención de imágenes de fluorescencia.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Sintetizar, caracterizar químicamente y evaluar *in vitro* e *in vivo* a los radiofármacos ^{99m}Tc -HYNIC-CXCR4L y ^{177}Lu -DOTA-CXCR4L, con la finalidad de determinar su uso potencial en diagnóstico de cáncer que presenta sobreexpresión del receptor CXCR4.

Preparar, caracterizar fisicoquímicamente y evaluar *in vitro* a los sistemas rHDL-R6G, rHDL-R123 y rHDL-RB, para proporcionar TFD mediante radiación Cerenkov de ^{177}Lu en células de cáncer que presenta sobreexpresión del receptor SR-B1.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar y caracterizar químicamente a los conjugados HYNIC-CXCR4L y DOTA-CXCR4L.
2. Preparar a los conjugados ^{99m}Tc -CXCR4-L y ^{177}Lu -CXCR4-L.
3. Determinar la pureza radioquímica de los péptidos ^{99m}Tc -CXCR4-L y ^{177}Lu -CXCR4-L, por HPLC de fase reversa.

4. Evaluar la estabilidad en suero de los péptidos ^{99m}Tc -CXCR4-L o ^{177}Lu -CXCR4-L, mediante cromatografía de radio-HPLC.
5. Evaluar la captación *in vitro* de ^{99m}Tc -CXCR4-L o ^{177}Lu -CXCR4-L por el receptor CXCR4, en células DU-4475 o C6.
6. Determinación la expresión de CXCR4 por PCR.
7. Realizar estudios de biodistribución de ^{99m}Tc -CXCR4-L o ^{177}Lu -CXCR4-L en ratones atómicos inducidos con tumores de células DU-4475 o C6.
8. Administrar ^{99m}Tc -CXCR4-L o ^{177}Lu -CXCR4-L a ratones atómicos inducidos con tumores de células DU-4475 o C6 y obtener imágenes moleculares mediante micro-SPECT / CT.
9. Preparar y caracterizar fisicoquímicamente a los sistemas rHDL-R6G, rHDL-R123 y rHDL-RB.
- 10.10. Realizar estudios de internalización celular *in vitro* de los sistemas rHDL-R6G, rHDL-R123 y rHDL-RB.
11. Evaluar la viabilidad de las células T47D después de la irradiación con 532 nm de los sistemas rHDL-R6G o rHDL-R123 o rHDL-RB.
12. Evaluar la viabilidad de las células T47D después de la exposición a los sistemas rHDL-R6G, rHDL-R123 y rHDL-RB y radiación Cerenkov.
13. Evaluar la producción de ROS a nivel *in vitro* mediante microscopia de fluorescencia en los sistemas rHDL-R6G, rHDL-R123 y rHDL-RB expuestos a radiación Cerenkov.

VI. DISEÑO METODOLÓGICO

6.1. Diseño del estudio

Este estudio tiene un enfoque cuantitativo estructurado, transversal, observacional, descriptivo y de seguimiento de medidas experimentales con asignación aleatoria y grupo control.

6.2. Universo y Muestra

Universo:

- Línea celular de cáncer de mama humano, DU-4475.
- Línea celular de cáncer mama humano, T47D
- Línea celular de glioma de rata, C6.
- Ratones atímicos de ratones atímicos de 21 a 23 g y 7 semanas de edad con tumores inducidos con células DU-4475 y C6.

Tamaño de muestra:

- 2×10^6 de células DU-4475 o C6 para estudios de captación e internalización.
- 1×10^5 de células DU-4475 o C6 para ensayo de saturación.

- 2×10^6 de células DU-4475 o C6 inoculadas en ratones atómicos, para estudios de biodistribución.
- 18 ratones atómicos para estudios de biodistribución e imagen con micro-SPECT/CT.
- 2.5×10^5 de células T47D para estudios de internalización e igual cantidad para evaluación de ROS intracelular.
- 2.5×10^4 de células T47D para ensayos de viabilidad sin ^{177}Lu e igual cantidad para evaluar viabilidad con ^{177}Lu .

6.3. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios de inclusión:

- Pureza radioquímica de los radioconjugados $^{99\text{m}}\text{Tc-CXCR4-L}$ o $^{177}\text{Lu-CXCR4-L}$ mayor a 90 %.
- Líneas celulares DU-4475, C6 y T47D libres de bacterias, a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO_2 .
- Ratones atómicos con peso de 20 a 22 gramos.

Criterios de exclusión:

- Pureza radioquímica de los radioconjugados ^{99m}Tc -CXCR4-L o ^{177}Lu -CXCR4-L menor a 90 %.
- Cultivos celulares DU-4475 o C6 o T47D sin proliferación.
- Ratones atómicos con sospecha de inexistencia de tumor inoculado.

Criterios de eliminación:

- Líneas celulares DU-4475 o C6 o T47D contaminadas.
- Ratones que mueran durante la administración de los radiofármacos.

6.4. PROCEDIMIENTO**PRIMERA PARTE****6.4.1. Síntesis y caracterización química de HYNIC-CXCR4-L y DOTA-CXCR4-L****Síntesis**

Los péptidos HYNIC-CXCR4-L (ciclo-D-Tyr-D- [NMe] Orn [HYNIC] -Arg-Nal-Gly, PM 837 g/mol) y DOTA-HYNIC (ciclo-D-Tyr-D- [NMe] Orn-Arg-Nal-Gly, PM 1223 g/mol) fueron diseñadas en el ININ mediante el método de síntesis modificado empleado por Zhejiang Ontores Biotechnologies Co., Ltd. (China).

Caracterización Físicoquímica de HYNIC-CXCR4-L y DOTA-CXCR4-L

Los péptidos se analizaron mediante:

Espectrometría de masas con técnica de ionización MALDI-TOF. El espectro de masas se midió con el espectrómetro de masas microflex (Bruker, Billerica, MA, USA), operando en modo reflector y se utilizará como matriz el ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico.

Espectroscopia IR. El espectro de IR se obtuvo con la muestra en estado sólido con un espectrómetro Perkin-Elmer (Spectrum 400) y una plataforma de ATR (GladiaATR, Pike Technologies) utilizando una punta de diamante.

Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC): Se utilizó una columna μ Bondapak C-18, 10 μ m, 125 Å^o (3.9 mm x 300 mm).

6.4.2. Obtención de ^{99m}Tc

El tecnecio (^{99m}TcO₄Na) se obtuvo de un generador ⁹⁹Mo / ^{99m}Tc (ININ, México) y el lutecio (¹⁷⁷LuCl₃) fue adquirido de ITG Isotope Technologies Garching GmbH (Alemania, 3 TBq / mg). Los reactivos restantes fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Co.

6.4.3. Preparación de HYNIC-CXCR4-L conjugado con ^{99m}Tc y ^{177}Lu

Preparación del ^{99m}Tc -HYNIC-CXCR4-L (^{99m}Tc -CXCR4-L)

El HYNIC-CXCR4-L marcado con ^{99m}Tc , se obtuvo mediante la reconstitución de un formulación liofilizada (0.05 mg de HYNIC-CXCR4-L, 0.06 mmol; etilendiamina-N; 10 mg de N-ácido diacético; 20 mg de tricina y 50 mg de manitol) con una solución de $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ (2 mL, 925 MBq, NaCl al 0.9%). La solución radiactiva se incubó en un baño seco a 95 ° C, durante 10 min.

Preparación del ^{177}Lu -DOTA- HYNIC -CXCR4-L (^{177}Lu -CXCR4-L)

El DOTA-HYNIC-CXCR4-L marcado con ^{177}Lu , se obtuvo mediante la reconstitución de una formulación liofilizada (0.24 mg de DOTA-HYNIC-CXCR4-L, 0.20 mmol; 20 mg de ácido ascórbico y 20 mg de manitol) con una solución de $^{177}\text{LuCl}_3$ (2 mL, 3.7 GBq, buffer de acetato de sodio 1M, pH = 5). La solución se incubó a 95 ° C, durante 30 min.

6.4.4. Determinación de la pureza radioquímica de los péptidos ^{99m}Tc -CXCR4-L o ^{177}Lu -CXCR4-L

La pureza radioquímica de ^{99m}Tc -CXCR4-L y ^{177}Lu -CXCR4-L, se determinó por HPLC en fase reversa (columna μ -Bondapak C-18, 10 μm , 125 A°, Waters, 3.9 mm x 300 mm, tamaño de partícula de 5 μm) acoplado a un detector de radiactividad (Shimadzu en línea con un detector de radiactividad Gabi-Raytest). Se empleó un gradiente lineal con

dos solventes (solvente A: TFA al 0,1% en agua; disolvente B: TFA al 0,1% en acetonitrilo), con un caudal de 1 ml / min (solvente B: de 0 a 70% por 20 min).

6.4.5. Estabilidad en suero de los péptidos $^{99m}\text{Tc-CXCR4-L}$ o $^{177}\text{Lu-CXCR4-L}$

Se incubaron muestras radiactivas de $^{99m}\text{Tc-CXCR4-L}$ o $^{177}\text{Lu-CXCR4-L}$ (2.5 $\mu\text{g}/100$ μL) a 37°C con una muestra de suero humano certificada (1ml) (NIST-909c, Sigma-Aldrich). Se tomaron muestras a las 0.5, 1 y 24 h y se analizaron por radio-HPLC (columna de exclusión de tamaño Agilent Zorbax GF-250 de 9.4 x 250 mm; como eluyente PBS 0.01 M, caudal de 1 mL / min).

Los picos con un tiempo de retención de 14-16 min se asociaron con ^{99m}Tc y ^{177}Lu libres. Un cambio en el perfil del cromatograma de radio-HPLC para $^{99m}\text{Tc-CXCR4-L}$ (tR = 11.5 min) o $^{177}\text{Lu-CXCR4-L}$ (tR = 12.3 min) fue asociado a la unión de proteínas (tR = 5-8 min).

6.4.6. Estudios *in vitro* y determinación de expresión de CXCR4

Cultivo celular

Las células utilizadas para este estudio fueron las células de cáncer de mama humano DU-4475, las células C6 de glioma de rata (ambas positivas al receptor CXCR-4; ATCC, U.S.A.) y las células de ovario de hámster chino CHO-K1 (control negativo). Las tres líneas se cultivaron a 37 °C en una atmósfera al 5 % de dióxido de carbono (CO₂) y

100 % de humedad, en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640, Sigma-Adrich Co.) suplementado con suero fetal bovino al 15% y con antibióticos al 1% (estreptomomicina y penicilina). La expresión de CXCR4 en las líneas celulares se evaluó mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Determinación de la expresión de CXCR4

Para la evaluación de CXCR4, se realizó la PCR con transcripción en las células DU-4475, C6 y CHO-K1. Primero, el ARN total fue extraído con trizol de las células y se determinó por espectrofotometría (Lambda Bios, Perkin-Elmer, U.S.A.). Después, se realizó la transcripción inversa del ARN (2 µg). La PCR en tiempo real, se llevó a cabo de la siguiente manera: se activó la polimerasa y se desnaturalizó el ADN (95 °C, 10 min), seguidos de ciclos de amplificación (45 ciclos; 10 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 segundo a 72 °C) (termociclador LightCycler 480, Roche Diagnostics, Alemania). La amplificación se realizó con un primer específico para CXCR4: 5'-CTGAGAAGCATGACGGACAA-3' a la izquierda y 5'-CGCCAACATAGACCACCTTT-3' a la derecha. Se utilizó control interno, la expresión del gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

Estudios de captación

Se realizó una dilución de las células DU-4475, C6 o CHO-K1 en 0.5 ml de buffer de fosfato salino (PBS), hasta tener aproximadamente 2×10^6 células en un tubo de ensayo. Después, se incubaron las células con ^{99m}Tc -CXCR4-L o ^{177}Lu -CXCR4-L (n = 3, 0.037 MBq, 0.6 nmol) a 37 ° C durante 1 h. Después se centrifugaron los sedimentos

celulares durante 3 min; se tomó una alícuota (500 g) y se lavó con PBS, para posteriormente medir la actividad (cpm) utilizando un detector de NaI (TI). Después se añadió una solución de glicina a 50 mM /NaCl a 100 mM a los tubos, se centrifugaron y se efectuó un segundo conteo con el detector NaI (TI). El primer conteo proporcionó información para realizar la evaluación de la captación celular y el segundo conteo, permitió la evaluación de la internalización celular. Una muestra de la actividad inicial se contó como 100%, en base a esta referencia se determinaron los porcentajes de absorción e internalización celular.

Estudios de saturación

Las células DU-4475 o C6 (1×10^5) se cultivaron en una placa de 48 pozos, previamente recubiertos con poli-L-lisina. Después, las células se incubaron primero en hielo durante 30 min. Posteriormente, se añadieron 100 μ L/ pocillo de ^{99m}Tc -CXCR4-L o ^{177}Lu -CXCR4-L, a diferentes concentraciones que oscilan entre 0.01 y 100 nM ($n = 3$) y a 4 ° C durante 2 h. La unión no específica se determinó en paralelo con la adición de 2 μ M de ^{176}Lu -CXCR4-L (25 μ L), preparado con ^{176}Lu enriquecido al 82% (Isoflex, U.S.A.). Después de la incubación, el sobrenadante se removió y las células se lavaron tres veces con buffer (150 μ L; 0.1% albúmina de suero bovino, Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 1 mM, pH 7.4; después, las células fueron recolectadas en pocillos a los que previamente se le colocó NaOH 1M. La radiactividad (c.p.m.) unida a las células fue determinado usando un detector NaI(TI). Se calcularon la K_d y el B_{\max} utilizando Software de Prism GraphPad, mediante el análisis de regresión no lineal.

6.4.7. Estudios *in vivo* de los péptidos ^{99m}Tc -CXCR4-L o ^{177}Lu -CXCR4-L

Estudios de Biodistribución de ^{99m}Tc -CXCR4-L o ^{177}Lu -CXCR4-L

Se realizaron estudios de biodistribución del ^{99m}Tc -CXCR4-L y ^{177}Lu -CXCR4-L en ratones, de acuerdo con las regulaciones éticas (normas internacionales y nacionales) para el manejo de animales de laboratorio (Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999). Se indujeron tumores de células C6 o DU-4475 en la parte superior de la espalda de ratones atómicos (hembras, de 21-23 g, de 7 semanas de edad), mediante inyección subcutánea de células C6 o DU-4475 (2×10^6 células / 0.1 ml de NaCl al 0.9%). Posteriormente, se inyectó ^{99m}Tc -CXCR4-L o ^{177}Lu -CXCR4-L via vena de la cola de los ratones (0.05 ml, 3.7 MBq). A las 0.5, 1, 3 y 24 h (^{99m}Tc -CXCR4-L) o a las 3, 24, 72 y 120 h (^{177}Lu -CXCR4-L) después de la inyección (n = 3 en cada punto de tiempo), los ratones fueron sacrificados. Se disecaron algunos órganos de los ratones (hígado, bazo, páncreas, pulmón, riñones, corazón) y se recolectaron muestras de tejido (tumor, intestinos, músculo, sangre) para determinar la presencia de radiactividad (c.p.m.) con un detector de NaI(Tl). Una muestra de la solución inicial de ^{99m}Tc -CXCR4-L o ^{177}Lu -CXCR4-L (0.05 ml, 3.7 MBq) representó el 100% de la actividad inyectada, permitiendo calcular el% ID / g (porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido). A las 3 h, se llevaron a cabo estudios adicionales de biodistribución en animales coinyectados con CXCR4-L frío (1.0 μmol) (grupo con receptores CXCR4 bloqueado, n = 3).

Obtención de Imagen de ^{99m}Tc -CXCR4-L o ^{177}Lu -CXCR4-L

Fueron inducidos por inyección intravenosa tumores de células DU-4475 en los pulmones o por vía subcutánea tumores de células C6 en la parte superior de la espalda de ratones atómicos (hembras, de 21-23 g, de 7 semanas de edad) (2×10^6 células / 0.1 ml de NaCl al 0.9%). Después de ocho días, se inyectaron 3.7 MBq de ^{99m}Tc - o ^{177}Lu -CXCR4-L en la vena de la cola de los ratones y fueron anestesiados con isoflurano al 2%. Después, los ratones fueron escaneados con un micro-SPECT / CT (ONCOVISION, Albira, España), a las 3 h después de la administración del ^{99m}Tc -CXCR4-L (día = 0; n = 3, campo de visión de 60 mm, ajustado a 140 keV y 20% de ventana simétrica) o después de la administración con ^{177}Lu -CXCR4-L (día = 2; n = 3, campo de visión de 40 mm, fijado en 208 keV y ventana simétrica del 20%) en el mismo animal. Para la reconstrucción de imágenes, fue usado el algoritmo de reconstrucción OSEM (Subconjuntos Ordenados por la Máxima Aproximación). Para la adquisición de las imágenes de CT, se realizaron 600 proyecciones del micro-TC fueron obtenidas a 35 kV y 700 μA . Se realizaron estudios histopatológicos para verificar la formación del tumor en la parte superior de la espalda y los pulmones.

SEGUNDA PARTE

6.4.8. Preparación de rHDL-R

Los sistemas rHDL unida al R6G o R123 o RB se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito por Sabnis y cols. (2012), ligeramente modificado para los propósitos de este trabajo. En un frasco de vidrio, se preparó la mezcla con 300 μ L de fosfatidilcolina de yema de huevo (EYPC, 10 mg / mL), 7 μ L de colesterol libre (FC, 10 mg / mL), 7.5 μ L de éster de colesterol (EC, 4 mg / mL) y 500 μ L de R6G o R123 o RB (1 mM). Todos los reactivos se disolvieron en cloroformo. La mezcla se homogeneizó en un baño ultrasónico a 4 °C y se evaporó al vacío para eliminar cloroformo. La película lipídica que se adhirió a las paredes del vial se dispersó con 60 μ L de DMSO. Después, fueron agregados 1 mg de Apo-A1 y 140 μ L de colato de sodio (20 mg / mL en buffer) y se aforó a 2 ml con buffer Tris-EDTA (tampón Tris 10 mM, EDTA 1 mM, 0.1 M KCl, pH 8). La mezcla se homogeneizó con un vórtex durante 15 segundos.

Posteriormente, se transfirió la mezcla a una membrana de celulosa de 14 kDa y se dializó durante 48 h, manteniendo constante la agitación y con 3 a 4 cambios de buffer. La membrana se filtró con una membrana Millipore de 0.45 μ m, seguida de una membrana Millipore de 0.22 μ m. membrana y se almacenó en una botella de vidrio oscuro.

6.4.9. Caracterización fisicoquímica de rHDL-R6G, rHDL-R123 y rHDL-RB

Espectro UV-Vis

El espectro de absorción UV-Vis de rHDL-R6G, rHDL-R123 y las suspensiones de rHDL-RB, así como las soluciones de las 3 R's, se obtuvieron en un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific Genesys 10S, en un rango de 200 a 800 nm con intervalos de 0.5 nm.

Eficiencia de carga de R

La eficiencia de carga se determinó a partir de la concentración de R6G, R123 o RB en la rHDL. Para ello, se obtuvo una curva de calibración para cada R (absorbancia vs concentración). La eficiencia de carga fue determinada como la relación de la concentración de R y de rHDL y la concentración inicial de R en la preparación de rHDL ($\text{rHDL-R} / h$).

Tamaño y potencial Z

El tamaño de partícula y el potencial Z se midieron mediante de la técnica de la dispersión de la luz dinámica (DLS), utilizando un analizador Nanotract (Nanotract Wave, modelo MN401; Microtract, FL,U.S.A.), utilizando PBS 1X (pH 7.4) como diluyente. Las mediciones se realizaron usando una longitud de onda de 657 nm, a temperatura de 20 °C, con una corriente de 15.79 mA, un campo eléctrico de 14.35 V/cm y un tiempo de 128 μs .

Relación proteína/fosfolípido

La relación proteína / fosfolípido se determinó a partir de la concentración de proteínas y fosfolípidos en las suspensiones de rHDL-R a través de los métodos BCA y Stewart (Stewart, 1980), respectivamente.

6.4.10. Estudios *in vitro* de los sistemas rHDL-R6G, rHDL-R123 y rHDL-RB

Cultivo celular

La línea celular de cáncer de mama humano T47D se cultivó a 37 °C en una atmósfera de dióxido de carbono (CO₂) al 5% y 100% de humedad, en un medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Sigma-Adrich) suplementado con suero fetal bovino 10%, anfotericina B y 1% antibióticos (10000 unidades/ml de penicilina y 10 mg/ml de estreptomycin).

Internalización celular

La liberación intracelular de R, mediada por los sistemas rHDL-R6G, rHDL-R123 y rHDL-RB se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia. Las células T47D (2.5×10^5) se sembraron en una cámara de cultivo celular y se incubaron durante 24 h a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente, se incubaron las soluciones formadas con 45 µL de rHDL-R6G 1-µM, rHDL-R123 1-µM y rHDL-RB 1-µM, a 37 °C durante 1 h. El medio se retiró y se lavó con PBS 1X (pH 7.4). Las células se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 15 min a temperatura ambiente. Las preparaciones se aclararon dos veces con PBS 1X (pH 7.4). Se añadió un marcador fluorescente 4', 6-diamidino-2-fenilindol

(DAPI) a las muestras y se incubaron a 37 °C durante 5 min. Estas muestras se cubrieron con cubreobjetos. Se utilizó un microscopio de fluorescencia Eclipse de Nikon para la adquisición de imágenes.

Para corroborar la liberación específica mediada por el sistema rHDL, se utilizó como modelo el sistema rHDL-R123 y se bloquearon los receptores SR-B1. Se cultivaron 5×10^4 células T47D/pocillo, usando 9 placas de 48 pocillos y se incubaron durante 24 h, a 37 ° C y 5% de CO₂. Se les añadió un anticuerpo anti-SCARB1 (200 ng) (n = 3) y se incubaron, nuevamente, durante 1 h, a 37 ° C y 5% CO₂. Posteriormente, se colocaron 30 µL de una solución de rHDL-R123 1µM y se incubaron nuevamente por 1 h. Con fines de comparación, se utilizaron células rHDL-R123 sin bloqueo (n = 3) y células sin ningún tratamiento (n = 3) se utilizaron como grupo control.

Después del tiempo de incubación, se retiraron los sobrenadantes y se conservaron. Para estimar el nivel relativo de R123 que se internalizó en las células T47D en presencia de los receptores bloqueados, se midieron las absorbancias de los sobrenadantes utilizando el espectrofotómetro Epoch. Cada lectura se corrigió restando el control y la proporción de estas absorbancias corregidas indicó el porcentaje de liberación intracelular cuando el receptor SR-B1 estaba parcialmente bloqueado.

Ensayos de viabilidad celular a 532 nm

En una placa de 96 pocillos, las células T47D se cultivaron alternativamente (se dejó un pozo vacío entre dos pozos sembrados), cubriendo un total de 48 pozos. En cada pozo

se colocaron 2.5×10^4 células por 100 μL de medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos al 1% (10000 unidades/ml de penicilina y 10 mg/ml de estreptomicina). Las células se incubaron a 37 °C y 5% CO_2 durante 24 h. Se agregaron los siguientes tratamientos ($n = 12$) con un tiempo de incubación de 1h: (i) PBS 1X (pH 7.4; control), (ii) 30 μL de una solución de rHDL-R6G 1- μM , (iii) 30 μL de una solución de rHDL-R123 1- μM , (iv) 30 μL de una solución de rHDL-RB 1- μM . Posteriormente, se irradiaron un total de 6 pozos, de cada uno de los 12 tratamientos, usando un láser pulsado de Nd: YAG a 532 nm, 3 mW/cm², durante 5 min. El láser se colocó a una distancia de la placa que permitió que el diámetro del pozo quedara completamente cubierto por el punto de luz. Después de que se completó la irradiación, se eliminó el medio y se lavó con PBS 1X (pH 7.4). Se colocaron 100 μL de medio en cada pocillo y la placa se incubó durante 24 h y 37 °C con 5% de atmósfera de CO_2 y 85% de humedad. Finalmente, se determinó la viabilidad celular, a través del ensayo XTT.

Evaluación de ROS intracelulares

Para evaluar la producción de ROS, se cultivaron 2.5×10^5 células en 5 portaobjetos de cultivo con cámara usando medio RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10% y antibióticos al 1% (10000 unidades/mL de penicilina y 10 mg/ml de estreptomicina). Las células fueron incubadas en CO_2 al 5% durante 24 h. Pasado este tiempo, se trataron las células durante 1 h con los siguientes tratamientos: (A) PBS 1X (pH 7.4; control); (B) 30 μL de una solución R6G 1 μM ; (C) 30 μL de una solución de R6G 1 μM ; (D) 30 μL de una solución de rHDL-R6G 1 μM ; (E) 30 μL de una solución de rHDL-R6G 1 μM .

Finalizado este tiempo, las células de los portaobjetos de los tratamientos (C) y (E) se irradiaron a 532 nm durante 10 min. Después de la irradiación, se agregó el reactivo CellRox Green (485/520 nm) a una concentración de 5 μ M y se incubó durante 30 minutos a 37°C. El medio se decantó y se lavó tres veces con PBS 1X (pH 7.4). Las células de los cinco portaobjetos se fijaron con formaldehído al 2% durante 15 min y se lavaron nuevamente con PBS 1X (pH 7.4). A todas las células se les añadió el marcador fluorescente DAPI y se taparon los portaobjetos con un cubreobjetos. Posteriormente, se incubaron en la oscuridad a 37 °C durante 5 min antes de la adquisición de imágenes con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse.

Ensayos de viabilidad celular con ^{177}Lu

En una placa de 96 pozos, se sembraron células T47D (2.0×10^4 células/pozo) en 100 μ l de medio RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10% y al 1% antibióticos (10000 unidades/ml de penicilina y 10 mg/ml de estreptomina). Las células fueron incubados a 37 °C y 5% CO_2 durante 24 h. Después del tiempo de incubación, se realizaron los siguientes tratamientos con (n = 6): (i) PBS 1X (pH 7.4; control), (ii) 25 μ Ci de ^{177}Lu , (iii) 50 μ Ci de ^{177}Lu , (iv) 100 μ Ci de ^{177}Lu , (v) 30 μ l de una solución de rHDL-R6G 1 μ M, (vi) 30 μ l de una solución de rHDLR6G 1 μ M + 25 μ Ci de ^{177}Lu , (vii) 30 μ l de una solución de rHDL-R6G 1 μ M + 50 μ Ci de ^{177}Lu , (viii) 30 μ l de una solución de rHDL-R6G 1 μ M + 100 μ Ci de ^{177}Lu , (ix) 30 μ l de una solución de rHDL-R123 1 μ M , (x) 30 μ l de una solución de rHDL-R123 1 μ M + 25 μ Ci de ^{177}Lu ; (xi) 30 μ l de una solución de rHDL-R123 1 μ M + 50 μ Ci de ^{177}Lu , (xii) 30 μ L de una solución de rHDL-R123 1 μ M + 100 μ Ci de ^{177}Lu , (xiii) 30 μ l de una solución de rHDL-RB 1 μ M, (xiv) 30 μ L de una

solución rHDL-RB 1 μM + 25 μCi de ^{177}Lu , (xv) 30 μL de una solución rHDL-RB 1 μM + 50 μCi de ^{177}Lu , (xvi) 30 μL de una solución de rHDL-RB 1 μM + 100 μCi de ^{177}Lu . Se colocaron 100 μL de medio en cada pozo y la placa se incubó a 24 h y 37 °C con atmósfera de CO_2 al 5% y humedad del 85%. Finalmente, la viabilidad celular se determinó mediante la Ensayo XTT. El ^{177}Lu fue agregado como $^{177}\text{LuCl}_3$.

6.4.11. Recolección de datos

La recolección de los datos para los estudios *in vitro*, se realizó de forma directa mediante la cuantificación de la actividad de las muestras en un detector de centelleo tipo-pozo.

Para la cuantificación de la viabilidad celular, los datos se recolectaron mediante la medición espectrofotométrica de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial, con el uso del ensayo de viabilidad celular XTT, en donde se cuantifica la absorbancia producida por las muestras, y está directamente relacionada con la cantidad de células vivas.

Para los estudios de biodistribución *in vivo*, los datos se recolectaron mediante la medición de la actividad en los órganos de interés de los ratones atómicos, usando un detector de centelleo tipo-pozo. La obtención de los modelos biocinéticos y la dosis

absorbida de radiación en los ratones, se realizó mediante una aproximación teórica a partir de los datos de biodistribución.

6.4.12. Análisis estadístico

Se llevó a cabo una comparación entre los diferentes tratamientos y fueron evaluados por una prueba de *t de Student*, para considerar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Para comparar entre tratamientos con las tres R, se utilizó la prueba ANOVA de muestras independientes, seguida de la comparación de medias mediante la prueba de Tuckey ($p < 0.05$).

6.4.13. Aspectos éticos

La investigación se llevó a cabo de acuerdo a las normas: NOM-012-STPS-1999, para condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo donde se produzcan, usen, almacenen o transporten fuentes de radiación; la NOM-004-NUCL-1994, para la clasificación de los desechos radiactivos y la NOM-36-NUCL-2001 para los requerimientos de las instalaciones de tratamiento y acondicionamiento de desechos radiactivos.

Los estudios de biodistribución con ratones se realizaron de acuerdo con las reglas y regulaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Todos los estudios

fueron realizados bajo la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 para la clasificación y especificaciones de manejo de residuos peligrosos biológico infecciosos.

6.5. VARIABLES

Independientes:

Radiofármacos: ^{99m}Tc -HYNIC-CXCR4-L y ^{177}Lu -DOTA-CXCR4-L.

Dependientes:

Captación específica y afinidad *in vitro*, dosimetría *in vitro*, biodistribución *in vivo*, dosis absorbida *in vivo*, evaluación de ROS intracelulares.

Intervinientes:

Pureza radioquímica, captación celular, afinidad al CXCR-4 y SR-B1, proliferación celular.

Variable	Definición Conceptual	Definición Operativa	Tipo de Variable	Escala de Medición	Análisis Estadístico
Radiofármaco	Sustancia que contiene en su estructura un átomo radiactivo y que por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación puede ser administrada a un paciente para su diagnóstico y/o tratamiento.	HPLC	Cuantitativa	1) ^{99m} Tc-HYNIC-CXCR4-L 2) ¹⁷⁷ Lu-DOTA-CXCR4-L.	Prueba de t-de student
Captación específica y Afinidad <i>in vitro</i>	Capacidad del radiofármaco de unirse específicamente a los receptores correspondientes de las líneas celulares.	Numero de cuentas de radiación dadas por línea celular.	Cuantitativa	Kd B _{max} % de captación	Prueba de t-de student
Dosimetría <i>in vitro</i>	Energía depositada en una región blanco con masa conocida, en componentes celulares.	Efecto de los radiofármacos sobre la proliferación celular.	Cuantitativa	% de viabilidad celular	Prueba de t-de student
Biodistribución <i>in vivo</i>	Forma en la cual se encuentra distribuido el radiofármaco en los órganos del ratón en estudio.	Metodología MIRD	Cuantitativa	[Gy]	Prueba de t-de student
Evaluación de daño intracelular	Medición de la capacidad de un radionúclido de causar daño irreversible en las células.	Evaluación de ROS intracelulares.	Cuantitativa	% de producción de ROS	Prueba de t-de student

VII. RESULTADOS

7.1. Artículo Publicado

Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry
<https://doi.org/10.1007/s10967-020-07043-6>



Synthesis and preclinical evaluation of the ^{99m}Tc -/ ^{177}Lu -CXCR4-L theranostic pair for in vivo chemokine-4 receptor-specific targeting

Marcela Ávila-Sánchez^{1,2} · Guillermina Ferro-Flores¹ · Nallely Jiménez-Mancilla³ · Blanca Ocampo-García¹ · Gerardo Bravo-Villegas^{1,2} · Myrna Luna-Gutiérrez¹ · Clara Santos-Cuevas¹ · Erika Azorín-Vega¹ · Liliana Aranda-Lara⁴ · Keila Isaac-Olivé⁴ · Laura Melendez-Alafort⁵

Received: 1 August 2019
© Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2020

Abstract

This research aimed to prepare ^{99m}Tc -/ ^{177}Lu -CXCR4-L radiotracers and evaluate their in vitro and in vivo capability to detect the chemokine-4 receptor. Molecular docking calculations, K_d values (< 10 nM) of ^{99m}Tc -/ ^{177}Lu -CXCR4-L (radiochemical purities $> 98.5\%$) estimated by saturation binding assays, as well as biodistribution studies in mice with induced tumors, confirmed the affinity of radiotracers towards CXCR4, expressed in DU-4475 breast cancer cells and C6 glioblastoma cells. Micro-SPECT/CT images showed that ^{99m}Tc -CXCR4-L and ^{177}Lu -CXCR4-L could work as a theranostic pair for CXCR4 targets. Results warrant additional research to assess the therapeutic efficacy and dosimetry of ^{177}Lu -CXCR4-L.

Keywords HYNIC-CXCR4-L · DOTA-HYNIC-CXCR4-L · ^{99m}Tc -CXCR4-L · ^{177}Lu -CXCR4-L · Chemokine-4 receptor · Theranostic pair

Introduction

Recently, a ^{68}Ga -labeled cyclic pentapeptide (^{68}Ga -Pentixafor[®]) was reported as a successful positron emission tomography (PET) tracer, useful for the visualization of the chemokine-4 receptor (CXCR4), overexpressed in more than 23 types of human cancers [1–3]. Preclinical studies of another PET ligand (N-[^{11}C]methyl-AMD3465) have also

demonstrated the feasibility of obtaining in vivo imaging of CXCR4 expression in glioma tumors [4]. Both PET tracers might be useful for identifying patients to whom potential CXCR4-targeted radiotherapies could be beneficial. Nevertheless, the development of a single-photon emission computed tomography (SPECT) radiotracer based on technetium-99m and capable of accurately detecting the CXCR4 protein, would be valuable considering the availability of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ from commercial $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ generators at a low cost, the availability of single-photon emission computed tomography (SPECT) equipment worldwide and the ease of in situ preparation from lyophilized kits.

T140[®] is a cyclic 14-residue peptide with high chemokine-4 receptor-antagonistic activity. In the chemical binding between T140[®] and CXCR4, the Arg², Nal³, Tyr⁵ and Arg¹⁴ residues of T140[®] form a core with specific recognition properties through polar interactions and hydrogen bonds (Arg² and Arg¹⁴ from T140[®]) with the Asp¹⁷¹, Asp²⁶², Thr¹¹⁷ and His¹¹⁷ side chains of the CXCR4 protein, as well as a peptide anchoring site (Nal³ and Tyr⁵ of T140) to the helix V hydrophobic region of the chemokine-4 receptor [5]. Considering these four pharmacologically-significant amino acids (Tyr-Arg-Arg-Nal), Fujii et al. [6] designed a cyclic pentapeptide (cyclo-Tyr⁵-Arg¹-Arg²-Nal³-Gly⁴) with improved antagonistic activity. Demmer et al. [7] added

✉ Guillermina Ferro-Flores
guillermina.ferro@inin.gob.mx

✉ Nallely Jiménez-Mancilla
nallely.jimenez@inin.gob.mx

- ¹ Departamento de Materiales Radiactivos, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, 52750 Ocoyoacac, Estado de México, Mexico
- ² Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de México, 50180 Toluca, Estado de México, Mexico
- ³ CONACyT, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, 52750 Ocoyoacac, Estado de México, Mexico
- ⁴ Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, 50180 Toluca, Estado de México, Mexico
- ⁵ Veneto Institute of Oncology IOV-IRCCS, Via Gattamelata 64, 35128 Padua, Italy

Published online: 06 February 2020

 Springer

7.2. Artículo Enviado

Targeted photodynamic therapy using reconstituted high-density lipoproteins as rhodamine transporters.

Marcela A. Ávila-Sánchez^a, Liliana Aranda-Lara^{a,*}, Enrique Morales-Ávila^b, Adriana Plata-Becerril^b, Nallely P. Jiménez-Mancilla^c, Blanca E. Ocampo-García^c, José A. Estrada^d, Clara L. Santos-Cuevas^e, Eugenio Torres-García^e, Miguel A. Camacho-López^f, Keila Isaac-Olivé^{a,*}

^aLaboratorio de Investigación Teranóstica. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50180, Estado de México, Mexico.

^bLaboratorio de Toxicología y Farmacia, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50120, Estado de México, Mexico.

^cLaboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos-CONACyT, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, 52750, Estado de México, Mexico.

^dLaboratorio de Neuroquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50180, Estado de México, Mexico.

^eLaboratorio de Dosimetría y Simulación Monte Carlo, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50180, Estado de México, Mexico.

^fLaboratorio de Fotomedicina, Biofotónica y Espectroscopía Láser de Pulsos Ultracortos. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50180, Estado de México, Mexico.

7.2.1. Carta de envío del artículo

Confirm co-authorship of submission to Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

em.pdpdt.0.741d26.1a284a53@editorialmanager.com

<em.pdpdt.0.741d26.1a284a53@editorialmanager.com>

en nombre de

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy <em@editorialmanager.com>

Dom 20/06/2021 07:47 PM

Para: Liliana Aranda Lara <larandal@uaemex.mx>

This is an automated message.

Journal: Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

Title: Targeted photodynamic therapy using reconstituted high-density lipoproteins as rhodamine transporters.

Corresponding Author: Dr Keila Isaac-Olivé

Co-Authors: Marcela A. Ávila-Sánchez; Liliana Aranda-Lara; Enrique Morales-Ávila; Adriana Plata-Becerril; Nallely P. Jiménez-Mancilla; Blanca E. Ocampo-García; José A. Estrada; Clara L. Santos-Cuevas; Eugenio Torres-García; Miguel A. Camacho-López

Manuscript Number:

Dear Liliana Aranda-Lara,

The corresponding author Dr Keila Isaac-Olivé has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.

Submission Title: Targeted photodynamic therapy using reconstituted high-density lipoproteins as rhodamine transporters.

Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

Please read the following statement and confirm your agreement by clicking on this link:

<https://www.editorialmanager.com/pdpdt/l.asp?i=86264&l=N8QXAK5N>

I irrevocably authorize and grant my full consent to the corresponding author of the manuscript to: (1) enter into an exclusive publishing agreement with Elsevier on my behalf (or, if the article is to be published under a CC BY license, a non-exclusive publishing agreement), in the relevant form set out at www.elsevier.com/copyright; and (2) unless I am a US government employee, to transfer my copyright or grant an exclusive license of rights to Elsevier as part of that publishing agreement, effective on acceptance of the article for publication. If the article is a work made for hire, I am authorized to confirm this on behalf of my employer. I agree that the copyright status selected by the corresponding author for the article if it is accepted for publication shall apply and that this agreement is subject to the governing law of the country in which the journal owner is located.

If you did not co-author this submission, please contact the corresponding author directly at kisaaco@uaemex.mx.

Thank you,

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

More information and support

FAQ: What is copyright co-author verification?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/30181/supporthub/publishing/

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub:

<https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/

For further assistance, please visit our customer service site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/pdpdt/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

En una primera parte del proyecto de investigación, se evaluó la aplicación de la RC proveniente del ^{177}Lu en la obtención de imágenes de tumores que sobreexpresan al receptor CXCR4. En primer lugar, se demostró que el acoplamiento molecular del receptor CXCR4 con el péptido HYNIC-CXCR4-L, se llevó a cabo con una adecuada afinidad receptor-ligando, identificando dos interacciones entre el agente quelante HYNIC en el sitio de unión ligando-receptor. La primera interacción se llevó a cabo entre HYNIC con el aminoácido Trp-94 mediante fuerzas de Van der Waals, lo que sugiere que el HYNIC puede actuar como un sitio de anclaje para regiones hidrofóbicas de la molécula CXCR4. La segunda interacción identificada tuvo lugar entre el ciclo aromático heterocíclico del HYNIC y el aminoácido Asp-188, a través de un enlace de hidrógeno convencional. Wu y cols, han demostrado que existe una afinidad superior del CXCR4 por el HYNIC-CXCR4-L en comparación con otros ligandos (Wu, et al., 2010). Esto indica que el método de acoplamiento molecular empleado es válido, teniendo un papel relevante los grupos químicos cargados y los anillos aromáticos del HYNIC-CXCR4-L en la unión de los receptores acoplados a proteína G, como el CXCR4 (Mungalpara *et al.*, 2013).

La caracterización química, identificó la existencia de grupos químicos que son característicos en las secuencias de péptidos. Por ejemplo, se observó una banda de

estiramiento N–N a 1128 cm^{-1} en el HYNIC-CXCR4-L, asignado al grupo hidracina de HYNIC; este mismo dato se observa a 1130 cm^{-1} en el espectro del DOTA-HYNIC-CXCR4-L, debido al efecto de DOTA en la disminución de repulsión de pares de electrones solitarios del enlace (N–N), induciendo un aumento en la longitud del enlace. El espectro indicó una vibración de flexión a $825\text{--}830\text{ cm}^{-1}$, lo que se puede atribuir principalmente a anillos aromáticos de β -naftol. Se obtuvieron los espectros para los quelantes HYNIC y DOTA y concuerdan con los publicados por Medina-García y cols. y por Mendoza-Nava (Medina-García, *et al.*, 2015; Mendoza-Nava *et al.*, 2017), con esta información se verifica que los cambios observados en los espectros son resultado del acoplamiento con el CXCR4-L. Mediante el análisis por espectrometría de masas, se encontró un valor de $m/z=838$ para el péptido HYNIC-CXCR4-L y de 1224 para DOTA-HYNIC-CXCR4-L, esto indicó que ambos conjugados son químicamente puros. Tanto HYNIC-CXCR4-L como DOTA-HYNIC-CXCR4-L mostraron una pureza radioquímica mayor al 98%, mediante el análisis por HPLC.

Los resultados de la unión a proteínas plasmática del ^{99m}Tc -CXCR4-L fueron de $0.3 \pm 0.2\%$, $0.5 \pm 0.3\%$ y $0.8 \pm 0.2\%$, a los tiempos 0.5, 1 y 24 h, respectivamente, sin la presencia de ^{99}Tc libre y sin transquelación a la cisteína, que indica la estabilidad apropiada del radiotrazador en suero. En el caso de ^{177}Lu -CXCR4-L, se encontró una unión mayor a proteínas con valores de $1.8 \pm 0.6\%$, $4.8 \pm 0.5\%$ y $7.5 \pm 0.8\%$, a las 0.5, 1 y 24 h, respectivamente, lo que puede estar asociado a la mayor lipofilia de ^{177}Lu -CXCR4-L. No se detectó Lu libre ni ningún otro metabolito y más del 90% de ^{177}Lu -

CXCR4-L permaneció intacto, lo que indica una buena estabilidad en suero. El enlace proteico de ^{177}Lu -CXCR4-L puede ser útil para producir un tiempo prolongado de retención en sangre y, por lo tanto, aumentar la captación en tumores que expresan CXCR4-L (Choy CJ, *et al.*, 2017).

Los estudios en células de cáncer mostraron una captación significativamente mayor para el ^{177}Lu -CXCR4-L en las líneas celulares DU-4475 y C6 que lo observado para el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CXCR4-L ($p < 0.05$). También se observaron menores porcentajes de unión de ambos radiotrazadores en las células CHO-K1, que los obtenidos en células de mama o glioblastoma ($p < 0.05$). Los estudios de PCR indicaron que el nivel de la expresión de CXCR4 en las células DU-4475 y C6 es aproximadamente de 38 y 29 veces, respectivamente, en relación con las células CHO-K1. El uso de células CHO-K1 como control negativo para CXCR4 ha sido reportado por otros autores como Wester y cols. (Wester HJ, *et al.* 2015). La internalización del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CXCR4-L fue menor en comparación con ^{177}Lu -CXCR4-L, posiblemente debido al efecto químico de DOTA en la estructura (Wüstemann T., 2016). Se observó también que la internalización fue mayor ($p < 0.05$) en las células de glioblastoma C6 en comparación con las células de cáncer de mama DU-4475, probablemente esté asociado a la formación de heterómeros CXCR4 con otros receptores de quimiocinas e incluso con otros receptores acoplados a las proteínas G, que en algún momento pueden modular su afinidad e internalización (Kufareva I, *et al.*, 2014). Existe evidencia que indica que las células de cáncer de mama expresan una mayor gamma de subtipos de receptores de

quimiocinas (CXCR1, CXCR3, CXCR4, CXCR7, CCR2, CCR4, CCR5, CCR7 y CCR9), en comparación con las detectadas en gliomas (CXCR4, CCR3 y CCR5) (Hu *et al.*, 2005). Los estudios de bloqueo de receptores en las células DU-4475 y C6, indicaron una captación e internalización leve de ^{177}Lu -CXCR4-L y $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CXCR4-L, pero no significativamente mayor ($p > 0.05$) en comparación con las células desbloqueadas. Existe evidencia que permiten explicar estos resultados, los cuales indican la posibilidad que los ligandos fríos desencadenan mecanismos celulares en DU-4475 y C6 que promueven la internalización de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - o ^{177}Lu -CXCR4-L, en lugar de un efecto de bloqueo del receptor (Escudero-Castellanos *et al.*, 2017).

Los valores Kd y Bmax determinados mediante ensayos de saturación, permitieron confirmar la afinidad de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CXCR4-L y ^{177}Lu -CXCR4-L por el receptor CXCR4 expresado en las células DU-4475 y C6. No se observó diferencia significativa entre el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CXCR4-L y el ^{177}Lu -CXCR4-L ($p > 0.05$) con respecto a la afinidad (Kd), pero la absorción máxima (Bmax) de ^{177}Lu -CXCR4-L fue mayor que para el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CXCR4-L ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que el ^{177}Lu -CXCR4-L, debido a sus propiedades lipofílicas, puede tener una mayor interacción con la región hidrofóbica de la hélice V del receptor de quimiocina-4 (Tamamura *et al.*, 2000).

Los estudios de biodistribución en ratones mostraron una rápida eliminación en sangre y rápida excreción renal y hepatobiliar de ambos radiotrazadores. A las 3 h después de la inyección intravenosa, más de 2.5% ID/ g de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CXCR4-L permaneció en las

células DU-4475 y C6, esto indica que es posible obtener imágenes de buena calidad. El ^{177}Lu -CXCR4-L demostró un tiempo prolongado de retención en ambas líneas celulares, 96 h después de i.v. administración se obtuvo un valor superior a 1.5% de ID/g. En animales coinyectados con CXCR4-L frío a las 3 h, no se logró el efecto de bloqueo; lo que se observó fue una leve captación tumoral, aunque sin diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$). La captación tumoral del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CXCR4-L fue de $3.31 \pm 0.75\%$ ID/g para las células DU-4475 y de $3.18 \pm 0.89\%$ para las células C6. La absorción en tumor del ^{177}Lu -CXCR4-L fue de $4.29 \pm 0.97\%$ ID/g para las células DU-4475 y de $3.54 \pm 0.74\%$ para las células C6. Este comportamiento puede estar relacionado con la activación de mecanismos desencadenados por el exceso de CXCR4-L frío, que promueven la internalización de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - o ^{177}Lu -CXCR4-L.

Fue posible adquirir imágenes de ratones a las 3 h después de la administración de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - o ^{177}Lu -CXCR4-L en el mismo animal en diferentes días (Día 0: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CXCR4-L; Día 2: ^{177}Lu -CXCR4-L). En estas imágenes se mostró evidentemente la captación de radiofármacos en ambos tipos de tumores (DU-4475 y C6). Se realizaron análisis histopatológicos de los tumores inducidos e indicaron la existencia de células altamente indiferenciadas asociadas con cáncer de mama. Estos resultados apoyan la posibilidad de utilizar los fármacos $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -/ ^{177}Lu -CXCR4-L como par teranóstico. Para esto es importante identificar el mecanismo por el cual se promueve la expresión de CXCR4 en células tumorales primarias con potencial metastásico. Sin embargo, en el caso del radiofármaco ^{177}Lu -CXCR4-L, el ligando se utiliza en concentraciones sin

actividad farmacológica, por esto el efecto sobre la eliminación tumoral está mediado por la energía de las emisiones del ^{177}Lu beta depositadas por unidad de masa (Gy).

En una segunda parte del proyecto de investigación, se obtuvo el acoplamiento de las moléculas de rHDL encapsuladas en las nanopartículas. De acuerdo con algunos autores, las moléculas hidrofóbicas del rHDL son captadas en el núcleo lipídico de las nanopartículas, compuesto principalmente por ésteres de colesterol y triglicéridos; mientras que las moléculas hidrofílicas son captadas con más probabilidad en la superficie (Aranda-Lara *et al.*, 2020; Simosen J.B., 2016). La inserción de las rodaminas en las Np de rHDL dio como resultados eficiencias de carga del 24.1% (R123)> 19.8% (R6G)> 13.3% (RB), esto es debido a que la probabilidad de formar puentes de hidrógeno disminuye en el orden R123> R6G> RB (Kooijman *et al.*, 2007).

Los mecanismos de internalización de las moléculas transportadas por rHDL están influenciados por diferentes factores, como el tipo de célula y las características de la molécula transportada (Bacellar *et al.*, 2015; Li Z *et al.*, 2017). El mecanismo de internalización más aceptado es la vía no endocítica, según el cual el receptor SR-B1 contribuye a la liberación directa del colesterol esterificado que se encuentra en el núcleo de rHDL al citosol a través de la formación de una estructura hidrofóbica, que permite su paso a través de la membrana celular hacia el interior de la célula, sin que la rHDL sea internalizado (Raut *et al.*, 2018; Chuang *et al.*, 2020; Li Y *et al.*, 2017). Existe evidencia que sugiere que las rodaminas R6G y RB tienen una naturaleza ligeramente

más hidrofóbica que la R123, por lo que se encuentren en mayor medida en el núcleo hidrofóbico de rHDL (Jiménez-Mancilla *et al.*, 2021).

Diversos autores han indicado que las tres rodaminas antes mencionadas, tienden a acumularse en las mitocondrias, dependiendo del equilibrio entre el carácter lipofílico/hidrofílico de la molécula, los potenciales de membrana plasmática y mitocondrial y el grado de asimetría de la estructura molecular, entre otros factores (Bacellar *et al.*, 2015; Davies *et al.*, 2016; Belostotsky *et al.*, 2011; Pergande M., 2012). Para promover una acumulación exitosa en mitocondrias, se debe de tener en cuenta que el potencial de las mitocondrias es negativo y está comprendido entre -180 a -120 mV, según el tipo de célula (Belostotsky *et al.*, 2011; Pergande, 2012; Chen, 1988). La rodamina R123 disminuye apreciablemente su fluorescencia con internalización en las mitocondrias y la R6G presenta mayor intensidad de la fluorescencia, lo que puede estar asociado a su carácter ligeramente más lipofílico permitiéndole permanecer en la mitocondria durante más tiempo que la R123 (Scaduto y Grotyohann, 1999; Forster *et al.*, 2012)

Al combinar los sistemas rHDL-R y la irradiación a 532 nm, la citotoxicidad decreció en el siguiente orden rHDL-R6G> rHDL-R123> rHDL-RB (Hirakawa, 2015; Jiménez Mancilla *et al.*, 2021). Cuanto mayor fue la localización a nivel de la mitocondria, mayor fue la citotoxicidad observada, debido a que la síntesis mitocondrial de ATP está bloqueada, lo que conduce a la apoptosis (Bacellar *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2019; Li *et*

al., 2017; Bhattarai *et al.*, 2020). Dependiendo de la concentración de PS en las mitocondrias y la intensidad de la radiación, también puede ocurrir necrosis o autofagia, mecanismos útiles en células tumorales resistentes a la apoptosis (Abrahamse & Hamblin, 2016). Se ha comprobado que la muerte celular por TFD está directamente asociada con un daño tipo II. Las ROS producidas por el efecto fotodinámico interactúan con las proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y provoca un daño oxidativo irreversible con la consiguiente inducción de daño letal a las células.

Los sistemas rHDL-R6G y rHDL-R123 muestran propiedades favorables para su uso en PDT, siendo el sistema rHDL-RB el menos efectivo para PDT, ya que para este sistema sólo se produjo el 30% muerte celular. Una limitación de las rodaminas como PS para PDT es que son excitadas por fuentes externas con longitudes de onda de escasa penetración tisular (500-550 nm). Este inconveniente se puede superar utilizando una fuente de excitación localizada como la radiación de Cerenkov (CR) de un radionúclido emisor (Kotagiri *et al.*, 2015; Kamkaew *et al.*, 2016). Al depositar un radionúclido emisor en la célula tumoral, la RC producida puede excitar cualquier PS que también se deposita en la célula produciendo un efecto fotodinámico *in situ*. Cuando los sistemas rHDL-R fueron expuestos a la CR de ^{177}Lu , solo rHDL-R6G mostró un efecto citotóxico significativo ($p < 0.05$) a 50 μCi y 100 μCi .

La eficacia de la combinación rHDL-R6G / ^{177}Lu permite sentar las bases de un sistema teranóstico, ya que además del potencial efecto radioterapéutico que ya se ha

demostrado, también permite visualizar su ubicación mediante imágenes SPECT o con detectores de CR (Jiménez-Mancilla *et al.*, 2021; Das *et al.*, 2018).

IX. CONCLUSIONES GENERALES

1. Los compuestos $^{99m}\text{Tc-CXCR4-L}$ y $^{177}\text{Lu-CXCR4-L}$, se obtuvieron con alta pureza radioquímica (>95%) y presentaron alta estabilidad en suero humano.
2. Los conjugados $^{99m}\text{Tc-CXCR4-L}$ y $^{177}\text{Lu-CXCR4-L}$ mostraron capacidad *in vitro* e *in vivo* para detectar el receptor de quimiocina-4.
3. Se demostró que los conjugados $^{99m}\text{Tc-CXCR4-L}$ y $^{177}\text{Lu-CXCR4-L}$ podrían funcionar como par teranóstico para receptores CXCR4.
4. Los resultados sugieren una investigación adicional para evaluar la eficacia terapéutica y la dosimetría de $^{177}\text{Lu-CXCR4-L}$.

5. Las nanopartículas de rHDL permiten encapsular y liberar de forma dirigida a las rodaminas R6G, R123 y RB en el interior de las células de cáncer a través de la interacción con los receptores SR-B1.

6. El sistema rHDL-R6G presentó una mayor citotoxicidad relacionada con una mayor internalización celular.

7. Estos resultados justifican el diseño de un sistema teranóstico multimodal que combine PDT-radioterapia-radioimagen con alta selectividad para tumores sólidos que sobreexpresan al receptor SR-B1.

X. BIBLIOHEMEROGRAFÍA

Ablett MP, O'brien CS, Sims AH, Farnie G, Clarke RB. (2013). *A Differential Role for CXCR4 in the Regulation of Normal versus Malignant Breast Stem Cell Activity*. Vol 5. www.impactjournals.com/oncotarget.

Abrahamse H, Hamblin MR. (2016). *New photosensitizers for photodynamic therapy*. *Biochem J*. 473(4):347-364. doi:10.1042/BJ20150942.

Akashi T, Koizumi K, Tsuneyama K, Saiki I, Takano Y, Fuse H. (2008). *Chemokine receptor CXCR4 expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer*. *Cancer Sci*. Published online 2008. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00712.x.

Algorri JF, Ochoa M, Roldán-Varona P, Rodríguez-Cobo L, López-Higuera JM. (2021). *Light Technology for Efficient and Effective Photodynamic Therapy: A Critical Review*. *Cancers (Basel)*. 13(14):3484. doi:10.3390/cancers13143484.

Aranda-Lara L., Morales-Avila E., Luna-Gutiérrez M.A., Olivé-Alvarez E., Isaac-Olivé K. (2020). *Radiolabeled liposomes and lipoproteins as lipidic nanoparticles for imaging and therapy*, *Chem. Phys. Lipids*. 230 (2020) 104934. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.104934>.

Bacellar IOL, Tsubone TM, Pavani C, Baptista MS. (2015). *Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death*. *Int J Mol Sci*. 2015;16(9):20523-20559. doi:10.3390/ijms160920523.

Beattie BJ, Thorek DLJ, Schmidlein CR, Pentlow KS, Humm JL, Hielscher AH. (2012). *Quantitative modeling of Cerenkov light production efficiency from medical radionuclides*. *PLoS One*. 7(2). doi:10.1371/journal.pone.0031402.

Belostotsky, I. S. da Silva, M. Paez, G. Indig, *Mitochondrial targeting for photochemotherapy*. (2011). *Can selective tumor cell*

killing be predicted based on n -octanol/water distribution coefficients?, *Biotech. Histochem.* 86 302–314. <https://doi.org/10.3109/10520295.2010.483656>.

Bernhard Y, Collin B, Decréau RA. (2011) *Inter/intramolecular Cherenkov radiation energy transfer (CRET) from a fluorophore with a built-in radionuclide*. *Chem Commun.*50(51):6711-6713. doi:10.1039/c4cc01690d.

Boschi F, Spinelli AE. (2020). *Nanoparticles for cerenkov and radioluminescent light enhancement for imaging and radiotherapy*. *Nanomaterials.*10(9):1-24. doi:10.3390/nano10091771.

Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. (2005). *Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death*, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2 . 1–23. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00030-X).

Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. (2014). *The intricate role of CXCR4 in cancer*. In: *Advances in Cancer Research*. Vol 124. Academic Press Inc. 31-82. doi:10.1016/B978-0-12-411638-2.00002-1.

Choy CJ, Ling X, Geruntho JJ et al (2017). *¹⁷⁷Lu-Labeled phos- phoramidate-based PSMA inhibitors: the effect of an albumin binder on biodistribution and therapeutic efficacy in prostate tumor-bearing mice*. *Theranostics* 7:1928–1939.

S.T. Chuang, S. Cruz, V. (2020). *Narayanaswami, Reconfiguring Nature’s Cholesterol Accepting Lipoproteins as Nanoparticle Platforms for Transport and Delivery of Therapeutic and Imaging Agents*, *Nanomaterials.* 10. 906. <https://doi.org/10.3390/nano10050906>.

Ciarrocchi E, Belcari N. (2017). *Cerenkov luminescence imaging: physics principles and potential applications in biomedical sciences*. *EJNMMI Phys.* 4(1). doi:10.1186/s40658-017-0181-8.

L.B. Chen. (1988). *Fluorescent Labeling of Mitochondria*, *Methods Cell Biol.* [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60190-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60190-9).

Cline B, Delahunty I, Xie J. (2019). *Nanoparticles to mediate X-ray-induced photodynamic therapy and Cherenkov radiation photodynamic therapy*. Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology.11(2). doi:10.1002/wnan.1541.

Dash A, Pillai MRA, Knapp FF. (2010). *Production of ^{177}Lu for Targeted Radionuclide Therapy: Available Options*. Nucl Med Mol Imaging. 2015;49(2):85-107. doi:10.1007/s13139-014-0315-z.

Davies K.S., Linder M.K., Kryman M.W., Detty M.R. (2016). *Extended rhodamine photosensitizers for photodynamic therapy of cancer cells*, Bioorg. Med. Chem. 24. 3908–3917. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.033>.

Demmer O, Gourni E, Schumacher U, Kessler H, Wester HJ. (2011). *PET Imaging of CXCR4 Receptors in Cancer by a New Optimized Ligand*. ChemMedChem. 6(10):1789-1791. doi:10.1002/cmdc.201100320.

Derlin T, Jonigk D, Bauersachs J, Bengel FM. (2016). *Molecular Imaging of Chemokine Receptor CXCR4 in Non-Small Cell Lung Cancer Using ^{68}Ga -Pentixafor PET/CT: Comparison With ^{18}F -FDG*. Clin Nucl Med. 41(4). doi:10.1097/RLU.0000000000001092.

Escudero-Castellanos A, Ocampo-Garcia B, Ferro-Flores G et al (2017) *Preparation and in vitro evaluation of ^{177}Lu -iPSMA- RGD as a new heterobivalent radiopharmaceutical*. J Radioanal Nucl Chem 314:2201–2207

Fan JH, Fan GL, Yuan P, et al. (2019). *A Theranostic Nanoprobe for Hypoxia Imaging and Photodynamic Tumor Therapy*. Front Chem.7. doi:10.3389/fchem.2019.00868.

Ferreira CA, Ni D, Rosenkrans ZT, Cai W. (2019). *Radionuclide-Activated Nanomaterials and Their Biomedical Applications*. Angew Chemie - Int Ed. 58(38):13232-13252. doi:10.1002/anie.201900594.

Ferro-Flores G, Ocampo-García B, Santos-Cuevas C, María Ramírez F, Azorín-Vega E, Meléndez-Alafort L. (2015). *Theranostic Radiopharmaceuticals B*

ased on Gold Nanoparticles Labeled with ^{177}Lu and Conjugated to Peptides. *Curr Radiopharm.* 8(2). doi:10.2174/1874471008666150313115423.

Fujii N, Oishi S, Hiramatsu K, et al. (2003). *Molecular-size reduction of a potent CXCR4-chemokine antagonist using orthogonal combination of conformation- and sequence-based libraries.* *Angew Chemie - Int Ed.* 42(28):3251-3253. doi:10.1002/anie.200351024.

George GPC, Pisaneschi F, Nguyen Q-D, Aboagye EO. (2018). *Positron Emission Tomographic Imaging of CXCR4 in Cancer: Challenges and Promises.* *Mol Imaging.* 14(1). doi:10.2310/7290.2014.00041.

Glaser AK, Zhang R, Andreozzi JM, Gladstone DJ, Pogue BW. (2015) *Cherenkov radiation fluence estimates in tissue for molecular imaging and therapy applications.* *Phys Med Biol.* 60(17):6701-6718. doi:10.1088/0031-9155/60/17/6701.

Gourni E, Demmer O, Schottelius M, et al. (2011) *PET of CXCR4 Expression by a ^{68}Ga -Labeled Highly Specific Targeted Contrast Agent.* *J Nucl Med.* Published online 2011. doi:10.2967/jnumed.111.098798.

Hartimath SV, van Waarde A, Dierckx RA et al (2014) *Evaluation of N-[(11)C]methyl-AMD3465 as a PET tracer for imaging of CXCR4 receptor expression in a C6 glioma tumor model.* *Mol Pharm* 11:3810–3817.

Hattermann K, Holzenburg E, Hans F, et al. (2014) *Effects of the chemokine CXCL12 and combined internalization of its receptors CXCR4 and CXCR7 in human MCF-7 breast cancer cells.* *Cell Tissue Res* 357:253-66.

Heredia JD, Park J, Brubaker RJ, Szymanski SK, Gill KS, Procko E. (2018) *Mapping Interaction Sites on Human Chemokine Receptors by Deep Mutational Scanning.* *J Immunol.* 200(11):3825-3839. doi:10.4049/jimmunol.1800343.

Hernández Quintanar L, Stolik Isakina S, De La Rosa M, Mateos L, Zacatenco. (2011) . *Desarrollo de Un Sistema de Fotoirradiación*

ación Para Terapia Fotodinámica Con Control Dosimétrico Development of a Photoirradiation System for Photodynamic Therapy with Dosimetric Control. México MDF. Vol 61. Diciembre.

Herrmann K, Lapa C, Wester HJ, et al. (2015) *Biodistribution and radiation dosimetry for the chemokine receptor CXCR4-targeting probe 68Ga-pentixafor.* J Nucl Med. 56(3):410-416. doi:10.2967/jnumed.114.151647.

Hu L, Benson ML, Smith RD, Lerner MG, Carlson HA. (2005). *Proteins.* John Wiley & Sons; Available from: <https://deepblue.lib.umich.edu/handle/2027.42/48691>.

Hyafil F, Pelisek J, Laitinen I, et al. (2017). *Imaging the Cytokine Receptor CXCR4 in Atherosclerotic Plaques with the Radiotracer ⁶⁸ Ga-Pentixafor for PET.* J Nucl Med. doi:10.2967/jnumed.116.179663.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, I. (2021). *Características de las defunciones registradas en México durante enero a agosto de 2020.* https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2020_Pnles.pdf

Jiang C. (2017). *The Role of SR-B1 in Lipid Metabolism and Inflammation in 3T3-L1 Adipocytes* [.https://opencommons.uconn.edu/usp_projectshttps://opencommons.uconn.edu/usp_projects/35](https://opencommons.uconn.edu/usp_projectshttps://opencommons.uconn.edu/usp_projects/35).

Jiang Q, Sun Y, Liu X. (2019) *CXCR4 as a prognostic biomarker in gastrointestinal cancer: a meta-analysis.* Biomarkers. 24(6):510-516. doi:10.1080/1354750X.2019.1637941.

Jiménez-Mancilla N.P., Aranda-Lara L., Morales-Ávila E., Camacho-López M.A., Ocampo-García B.E., Torres-García E., Estrada-Guadarrama J.A., Santos-Cuevas C.L., Isaac-Olivé K., (2021). *Electron transfer reactions in rhodamine: Potential use in photodynamic therapy,* J. Photochem. Photobiol. A Chem. 409. 113131. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113131>.

Jiménez-Mancilla NP, Isaac-Olivé K, Torres-García E, Camacho-López MA, Ramírez-Nava GJ, Mendoza-Nava HJ. (2019). *Theoretical and experimental characterization of emission and transmission spectra of Cerenkov radiation generated by ^{177}Lu in tissue*. J Biomed Opt. 24(07):1. doi:10.1117/1.jbo.24.7.076002.

Jiménez-Mancilla NP. (2017) *Caracterización del Espectro de Emisión de la Radiación Cherenkov de ^{177}Lu* . Published online. doi:10.24254/CNIB.16.41

Kamkaew A., L. Cheng, S. Goel, H.F. Valdovinos, T.E. Barnhart, Z. Liu, W. Cai. (2016) *Cerenkov Radiation Induced Photodynamic Therapy Using Chlorin e6-Loaded Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles*, ACS Appl. Mater. Interfaces. 8 , 26630–26637. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b10255>.

Kavadiya S, Biswas P. (2019). *Design of Cerenkov radiation–assisted photoactivation of TiO₂ nanoparticles and reactive oxygen species generation for cancer treatment*. J Nucl Med. 60(5):702-709. doi:10.2967/jnumed.118.215608.

Klein JS, Sun C, Pratz G. (2019) *Radioluminescence in biomedicine: Physics, applications, and models*. Phys Med Biol. 64(4). doi:10.1088/1361-6560/aaf4de.

Kooijman E.E., Tieleman D.P., C. Testerink, T. Munnik, D.T.S. Rijkers, K.N.J. Burger, B. De Kruijff. (2007). *An electrostatic/hydrogen bond switch as the basis for the specific interaction of phosphatidic acid with proteins*, J. Biol. Chem. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609737200>.

Kufareva I, Stephens BS, Holden LG et al (2014) *Stoichiometry and geometry of the CXC chemokine receptor 4 complex with CXC ligand 12: molecular modeling and experimental validation*. Proc Natl Acad Sci USA 111:E5363–E5372.

Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, et al. (2018) *Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations*. Biomed Pharmacother. 106:1098-1107. doi:10.1016/j.biopha.2018.07.049.

Lapa C, Lückerath K, Rudelius M, et al. (2016) [⁶⁸Ga]Pentixafor-PET/CT for imaging of chemokine receptor 4 expression in small cell lung cancer - initial experience. *Oncotarget*. 7(8). doi:10.18632/oncotarget.7063.

Lapa C, Schreder M, Schirbel A, et al. (2017). [⁶⁸Ga]Pentixafor-PET/CT for imaging of chemokine receptor CXCR4 expression in multiple myeloma - Comparison to [¹⁸F]FDG and laboratory values. *Theranostics*. 7(1):205-212. doi:10.7150/thno.16576.

León-Rodríguez D. (2013). Redalyc. *A Therapeutic System of 177Lu-Labeled Gold Nanoparticles-RGD Internalized in Breast Cancer Cells*. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=47529964009>.

Liang S, Peng X, Li X, Yang P, Xie L, Li Y, et al. (2015). *Silencing of CXCR4 sensitizes triple-negative breast cancer cells to cisplatin*. *Oncotarget* [Internet]. 6(2):1020–30. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/2741>.

Li Z., Y. Zhang, D. Zhu, S. Li, X. Yu, Y. Zhao, X. Ouyang, Z. Xie, L. Li (2017). *Transporting carriers for intracellular targeting delivery via non-endocytic uptake pathways*, *Drug Deliv*. 24, 45–55. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1391889>.

Luker KE, Lewin SA, Mihalko LA, et al. (2012) *Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells*. *Oncogene*. 31(45):4750-4758. doi:10.1038/onc.2011.633.

Luna-Gutiérrez M, Ferro-Flores G, Ocampo-García BE, et al. (2013) *A therapeutic system of 177Lu-labeled gold Nanoparticles-RGD internalized in breast cancer cells*. *J Mex Chem Soc*. 57(3):212-219. doi:10.1002/pen.24521.

Mendoza-Nava H, Ferro-Flores G, De María Ramírez F, et al. (2017) *Fluorescent, plasmonic, and radiotherapeutic properties of the 177Lu-dendrimer-AuNP-folate-bombesin nanoprobe located inside cancer cells*. *Mol Imaging*. 16:1-10. doi:10.1177/1536012117704768.

Mishra RK, Shum AK, Platanias LC, Miller RJ, Schiltz GE. (2016) *Discovery and characterization of novel small-molecule CXCR4 receptor agonists and antagonists*. Sci Rep. 6. doi:10.1038/srep30155.

Mitchell GS, Gill RK, Boucher DL, Li C, Cherry SR. (2011) *In vivo Cerenkov luminescence imaging: A new tool for molecular imaging*. Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci. 369(1955):4605-4619. doi:10.1098/rsta.2011.0271.

Mungalpara J, Zachariassen ZG, Thiele S et al (2013) . *Structure-activity relationship studies of the aromatic positions in cyclopentapeptide CXCR4 antagonists*. Org Biomol Chem 11:8202–8208.

OMS. Organización Mundial de la Salud. (2021). *El cáncer mató a diez millones de personas en 2020*. <https://news.un.org/es/story/2021/02/1487492>.

Pergande, M.R. (2012) *Mitochondrial Targeting in Photodynamic Therapy. Metabolic and Drug Structure Requirements for Specific Mitochondrial Localization. A Pilot Investigation*. <https://dc.uwm.edu/etd/64>.

Ponce Gutiérrez Y, Ponce Gutiérrez A, Rodríguez León Carlos Llanes Álvarez Policlínico A, Contreras Fowler JB, Clara V. CorSalud (2013). *Las lipoproteínas de alta densidad: protectoras vasculares contra la aterosclerosis*. Oct-Dic;5(4):366-378 Sociedad Cubana de Cardiología . Published online 2009.

Poschenrieder A, Osl T, Schottelius M, Hoffmann F, Wirtz M, Schwaiger M, et al. (2016). *First 18 F-Labeled Pentixafor-Based Imaging Agent for PET Imaging of CXCR4 Expression In Vivo*. Available from: <http://dx.doi.org/10.18383/j.tom.2016.00130>.

Poschenrieder A, Schottelius M, Schwaiger M, Kessler H, Wester HJ. *The influence of different metal-chelate conjugates of pentixafor on the CXCR4 affinity*. EJNMMI Res.. doi:10.1186/s13550-016-0193-8.

Raut, L. Mooberry, N. Sabnis, A. Garud, A.S. Dossou, A. Lacko. (2016). Reconstituted HDL: Drug Delivery Platform for Overcoming Biological Barriers to Cancer Therapy, *Front. Pharmacol.* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01154>.

Roblero-Bartolón GV, Ramón-Gallegos E, Massieu W, et al. (2014). *Uso de Nanopartículas (NP) En La Terapia Fotodinámica (Photodynamic Therapy [PDT]) Contra El Cáncer Gaceta Médica De México Artículo De Revisión Correspondencia.* www.anmm.org.mx.

Ruggiero A, Holland JP, Lewis JS, Grimm J. (2010) *Cerenkov luminescence imaging of medical isotopes.* *J Nucl Med.* 51(7):1123-1130. doi:10.2967/jnumed.110.076521.

Schottelius M, Osl T, Poschenrieder A, et al. (2017). *[177Lu] pentixather: Comprehensive preclinical characterization of a first CXCR4-directed endoradiotherapeutic agent.* *Theranostics.* 7(9). doi:10.7150/thno.19119.

Simonsen J.B. (2016) *Evaluation of reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) as a drug delivery platform— a detailed survey of rHDL particles ranging from biophysical properties to clinical implications,* *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 12. 2161–2179. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.05.009>.

Spinelli AE, Boschi F, D'Ambrosio D, et al. (2011) *Cherenkov radiation imaging of beta emitters: In vitro and in vivo results.* *Nucl Instruments Methods Phys Res Sect A Accel Spectrometers, Detect Assoc Equip.* 648(SUPPL.1). doi:10.1016/j.nima.2010.11.038.

Spinelli AE, Boschi F. (2011) *Unsupervised analysis of small animal dynamic Cerenkov luminescence imaging.* *J Biomed Opt.* 16(12):120507. doi:10.1117/1.3663442.

Tamamura H, Omagaria A, Oishi S et al (2000) *Pharmacophore identification of a specific CXCR4 inhibitor, T140, leads to development of effective anti-HIV agents with very high selectivity indexes.* *Bioorg Med Chem Lett* 10:2633–2637

Vag T, Gerngross C, Herhaus P, et al. (2016). *First Experience with Chemokine Receptor CXCR4-Targeted PET Imaging of Patients with Solid Cancers*. J Nucl Med. 57(5). doi:10.2967/jnumed.115.161034.

Vag T, Steiger K, Rossmann A, et al. (2018) *PET imaging of chemokine receptor CXCR4 in patients with primary and recurrent breast carcinoma*. EJNMMI Res. 8. doi:10.1186/s13550-018-0442-0.

Wester HJ, Keller U, Schottelius M et al (2015) *Disclosing the CXCR4 expression in lymphoproliferative diseases by targeted molecular imaging*. Theranostics 5:618–630.

Wu B, Chien EYT, Mol CD, et al. (2010) *Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists*. Science (80-). 330(6007):1066-1071. doi:10.1126/science.1194396.

Xu C, Zhao H, Chen H, Yao Q. (2015) *CXCR4 in breast cancer: Oncogenic role and therapeutic targeting*. Drug Des Devel Ther.9. doi:10.2147/DDDT.S84932.

Xu L, Cheng L, Yang F, et al. (2018). *JWA suppresses the invasion of human breast carcinoma cells by downregulating the expression of CXCR4*. Mol Med Rep. Published online April 11, 2018. doi:10.3892/mmr.2018.8866.

Xue X, Huang Y, Bo R, et al. (2018). *Trojan Horse nanotheranostics with dual transformability and multifunctionality for highly effective cancer treatment*. Nat Commun. 9(1). doi:10.1038/s41467-018-06093-5.

Zhang Y, Hao Y, Chen S, Xu M. (2020) *Photodynamic Therapy of Cancers With Internal Light Sources: Chemiluminescence, Bioluminescence, and Cerenkov Radiation*. Front Chem.8. doi:10.3389/fchem.2020.00770.

Zhao H, Guo L, Zhao H, Zhao J, Weng H, Zhao B. (2014). *CXCR4 Over-Expression and Survival in Cancer: A System Review and Meta-Analysis*. Vol 6. www.impactjournals.com/oncotarget.

