



---

---

Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Enfermería y Obstetricia

Doctorado en Ciencias de la Salud

*Radiofármaco teragnóstico basado en dendrímeros conjugados a ácido fólico y Lys<sup>3</sup>-bombesina con nanopartículas de oro en la cavidad dendrítica*

TESIS

Para Obtener el Grado de  
Doctor en Ciencias de la Salud

Presenta:

Héctor Javier Mendoza Nava

Comité Tutorial

Dra. Guillermina Ferro Flores

Tutor Externo

Dra. Keila Isaac Olivé

Tutor Académico

Dr.Enrique Morales Avila

Tutor Interno





**UAEM** | Universidad Autónoma  
del Estado de México

FACULTAD DE ENFERMERÍA Y OBSTETRICIA

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

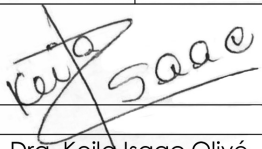


**ACTA DE VOTOS APROBATORIOS DE TESIS**

Fecha: 4 de agosto 2017

Nombre del Alumno (a): Héctor Javier Mendoza Nava

Título de la tesis: Radiofármaco teragnóstico basado en dendrímeros conjugados a ácido fólico y Lys3-bombesina con nanopartículas de oro en la cavidad dendrítica.

	Nombre	Dictamen (Aprobado o Rechazado)	Observaciones
Tutor Académico	Dra. Keila Isaac Olivé	Aprobado	Ninguna
Turno Interno	Dr. Enrique Morales Ávila	Aprobado	Ninguna
Tutor Externo	Dra. Guillermina Ferro Flores	Aprobado	Ninguna

 <u>Dra. Keila Isaac Olivé</u> TUTOR ACADÉMICO Nombre y firma	 <u>Dr. Enrique Morales Ávila</u> TUTOR INTERNO Nombre y firma	 <u>Dra. Guillermina Ferro Flores</u> TUTOR EXTERNO Nombre y firma
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------





*Este trabajo se realizó en la Gerencia de Aplicaciones Nucleares en la Salud (Departamento de Materiales Radiactivos) del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, bajo la dirección de la Dra. en C. Guillermina Ferro Flores, como parte de las actividades del Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos CONACyT.*

*Financiamiento CONACYT (CONACYT-SEP-CB-2014-01-242443).*

# Dedicatoria

*A mis amores LuLú, Amber y Xavi*

*«Cuando estás solucionando un problema, no tienes que preocuparte. Ahora, después de que has resuelto el problema, entonces sí es momento de preocuparse.»*

*Richard P. Feynman*

# Agradecimientos

A la Dra. Guillermina Ferro Flores, por ser siempre un ejemplo a seguir.

A la Dra. Flor de María, a la Dra. Blanca Eli Ocampo, a la Dra. Nallely Jimenez, a la Dra. Keila Issac Olivé, a la Dra. Clara Leticia Santos Cuevas, a la Dra. Myrna Luna Gutierrez, a la Dra. Liliana Aranda y a la Dra. Erika Azorin , por su amistad, consejos, colaboración y por siempre tener tiempo para mis dudas.

A todos mis compañeros becarios, Abraham, Andres, Karen, Brenda, Alondra Julián, etc. Por hacer ameno el tiempo.

A mis revisores, gracias por su valioso tiempo.

# Agradecimientos

Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), Gerencia de aplicaciones nucleares en la salud

A la Universidad Autónoma del Estado de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para estudios de posgrado.

# Resumen

Teragnósticos (o teranósticos) es un acrónimo de terapéuticos y diagnósticos. En este proyecto, el término se refiere a vectores moleculares/macromoleculares de reconocimiento específico y a nanoplataformas que incorporan ambas funciones, diagnóstico y terapia de forma simultánea. Además de incorporar funciones diagnósticas y terapéuticas, estas entidades pueden ser útiles en el seguimiento de la progresión de la enfermedad y en la evaluación de la respuesta a la terapia combinada.

Por otro lado, a través del uso de radiofármacos es posible registrar y detectar por imagen *in vivo*, la distribución espacio-temporal de procesos moleculares o celulares para aplicaciones diagnósticas y/o terapéuticas utilizando técnicas de medicina nuclear molecular. En particular, los radiofármacos basados en lutecio-177 son considerados teranósticos por su emisión gamma ( $208\text{ keV}$ ), útil para realizar la imagen diagnóstica, y por su emisión beta negativa ( $E_{max}\ 498\text{ keV}$ ) adecuada para aplicaciones terapéuticas.

En este trabajo de tesis se reporta por primera vez, la preparación de un nuevo radiofármaco de lutecio-177 multivalente y multifuncional basado en un dendrímero (PAMAM-G4) conteniendo nanopartículas de oro en sus cavidades y conjugado a ácido fólico y al péptido bombesina, para su posible uso en radioterapia dirigida, terapia fototérmica plasmónica e imagen molecular dual



(óptica y nuclear) de cáncer de mama.

Por tanto, el primer objetivo de esta investigación fue sintetizar  $^{177}\text{Lu}$ -**dendrímico-folato-bombesina** con nanopartículas de oro (AuNPs) en la cavidad dendrítica ( $^{177}\text{Lu}$ -**DenAuNP-Folato-Bombesina**) y evaluar el potencial del radiofármaco para la radioterapia dirigida y la detección simultánea de receptores de folato (FR) y de receptores del péptido liberador de gastrina (GRPRs) sobre-expresados en células de cáncer de mama. El **p-SCN-bencil-DOTA** se conjugó en medio acuoso básico a los grupos amino del dendrímico. Los grupos carboxilato de la Lys<sup>1</sup>Lys<sup>3</sup> (DO<sup>3</sup>TA)-bombesina y el ácido fólico se activaron con HATU y también se conjugaron al dendrímico. El conjugado se mezcló con H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> seguido de la adición de NaBH<sub>4</sub> y se purificó mediante ultrafiltración. Se realizó el análisis elemental (EDS), la distribución de tamaño de partícula (DLS), análisis de TEM, espectroscopia de UV-Vis, infrarrojo y de fluorescencia. El conjugado se marcó radiactivamente usando  $^{177}\text{LuCl}_3$  y se analizó por radio-HPLC. Los estudios confirmaron la funcionalización del dendrímico con alta pureza radioquímica (> 95%). Los resultados de fluorescencia demostraron que la presencia de AuNPs en las cavidades dendríticas confiere al radiofármaco propiedades físicas útiles para la obtención de imágenes ópticas. Los estudios de unión en células de cáncer de mama T47D mostraron una captación celular específica (41,15 ± 2,72%). Por tanto, el  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folato-Bombesina presenta propiedades adecuadas como un agente de imagen óptica y nuclear para tumores de mama que sobre-expresan GRPR y FRs, así como un nanosistema con potencial para ser utilizado en radioterapia de blancos moleculares específicos.

La integración de propiedades fluorescentes y plasmónicas en una molécula es de importancia en el desarrollo de nanosensores multifuncionales para imagen y terapia. El segundo objetivo de esta investigación fue evaluar las propiedades fluorescentes y el potencial terapéutico fototérmico-plasmónico y radioterapéutico del  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folato-Bombesina cuando se internaliza en

células T47D de cáncer de mama. La fluorescencia intensa NIR emitida a 825 *nm* del conjugado dentro de las células, corroboró la utilidad de DenAuNP-Folato-Bombesina para la formación de imágenes ópticas. Después de la irradiación láser, la presencia del nanosistema en las células provocó un aumento significativo de la temperatura del medio (46.8 ° C, comparado con 39.1 ° C sin DenAuNP-Folato-Bombesina,  $p < 0.05$ ), lo que resultó en una disminución significativa en la viabilidad celular (Hasta  $16.51 \pm 1.52\%$ ) debido a las propiedades plasmónicas del  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folato-Bombesina. Después del tratamiento con el radiofármaco, la viabilidad celular T47D disminuyó 90% debido a la dosis absorbida por radiación ( $63.16 \pm 4.20 \text{ Gy}$ ) administrada dentro de las células. Se concluye que el  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesina internalizado en células de cáncer presenta propiedades adecuadas para la obtención de imágenes ópticas, terapia fototérmica-plasmónica y radioterapia dirigida.

# Summary

Theranostics (or theranostics) is an acronym of therapeutics and diagnostics. In this project, the term refers to molecular/macromolecular vectors of specific recognition and nanoplatforms that incorporate both functions, diagnosis and therapy simultaneously. In addition, the incorporation of diagnostic and therapeutics functions may be useful in monitoring disease progress and evaluating the response to combined therapy.

By using radiopharmaceuticals, it is possible to record and detect by *in vivo* imaging the spatio-temporal distribution of molecular or cellular processes for diagnostic and therapeutic applications using nuclear medicine techniques. Lutetium-177-based radiopharmaceuticals are considered theranostic systems because of their gamma emission (208 keV) useful for performing the diagnostic image and its negative beta radiation ( $E_{max}$  0.498 MeV) suitable for therapeutic applications. In this thesis it is reported for the first time, the preparation of a new multivalent and multifunctional lutetium-177 radiopharmaceutical based on a dendrimer (PAMAM-G4) containing gold nanoparticles, folic acid, and the peptide bombesin suitable for targeted radiotherapy, plasmonic-photothermal therapy and dual molecular imaging (optic and nuclear) of breast cancer.

Therefore, the first aim of this research was to synthesize  $^{177}\text{Lu-dendrimer-folate-bombesin}$  with gold nanoparticles (AuNPs) in the dendritic cavity ( $^{177}\text{Lu-DenAuNP-Folate-}$

**Bombesin**) and to evaluate the radiopharmaceutical potential for targeted radiotherapy and the simultaneous detection of folate receptors (FRs) and gastrin-releasing peptide receptors (GRPRs) over-expressed in breast cancer cells. p-SCN-Benzyl-DOTA was linked to the dendrimer in an aqueous-basic medium. The carboxylate groups of Lys<sub>1</sub>Lys<sub>3</sub>(DOTA)-Bombesin and folic acid were activated with HATU and conjugated to the dendrimer.

The conjugate was mixed with 1% HAuCl<sub>4</sub> followed by the addition of NaBH<sub>4</sub> and purified by ultrafiltration. Elemental analysis (EDS), particle size distribution (DLS), TEM analysis, UV-Vis, infrared and fluorescence spectroscopies were performed. The conjugate was radiolabeled using <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> and analyzed by radio-HPLC. Studies confirmed the dendrimer functionalization with high radiochemical purity (> 95%). Fluorescence results demonstrated that the presence of AuNPs in the dendritic cavity confers useful photophysical properties to the radiopharmaceutical for optical imaging. Binding studies in T47D breast cancer cells showed a specific cell uptake (41.15 ± 2.72%). <sup>177</sup>Lu-Dendrimer(AuNP)-Folate-Bombesin showed suitable properties as an optical and nuclear imaging agent for breast tumors over-expressing GRPR and FRs, as well as for target-specific therapy. The integration of fluorescence and plasmonic properties into one molecule is of importance in developing multifunctional imaging and therapy nanoprobe.

The second aim of this research was to evaluate the fluorescent properties and the plasmonic-photothermal therapeutic and radiotherapeutic potential of <sup>177</sup>Lu-DenAuNP-Folate-Bombesin when it is internalized in T47D breast cancer cells. The intense NIR fluorescence emitted from the conjugate inside cells corroborated the usefulness of DenAuNP-Folate-Bombesin for optical imaging. After laser irradiation, the presence of the nanosystem in cells caused a significant increase in the temperature of the medium resulting in a significant decrease in cell viability (down to 16.51 ± 1.52%) due to the <sup>177</sup>Lu-DenAuNP-Folate-Bombesin plasmonic properties. After treatment with <sup>177</sup>Lu-DenAuNP-Folate-Bombesin, the T47D cell viability decreased 90% because of the radiation

---

absorbed dose ( $63.16 \pm 4.20$  Gy) delivered inside cells. In conclusion, the  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin nanosystem internalized in cancer cells exhibited properties suitable for optical imaging, plasmonic-photothermal therapy, and targeted radiotherapy.

# Índice general

<b>Resumen</b>	<b>VII</b>
<b>Summary</b>	<b>x</b>
<b>1. Antecedentes</b>	<b>1</b>
1.1. Radionúclidos . . . . .	1
1.2. Radiofármacos Teragnósticos . . . . .	2
1.3. Radionúclidos para Diagnóstico y Terapia . . . . .	3
1.4. Radionúclidos para Terapia . . . . .	3
1.5. Muerte celular inducida por radiación . . . . .	4
1.6. Tratamiento de cáncer por Hipertermia . . . . .	5
1.7. Bases biológicas de la hipertermia . . . . .	6
1.8. Radionúclidos como agentes de Diagnóstico . . . . .	7

---

1.9. $^{99m}\text{Tc}$ . . . . .	8
1.10. $^{177}\text{Lu}$ Como un agente teragnóstico . . . . .	9
1.11. Agentes para reconocimiento molecular . . . . .	9
1.11.1. Anticuerpos Monoclonales . . . . .	9
1.11.2. Péptidos . . . . .	10
1.11.3. Somatostatina . . . . .	12
1.11.4. Péptidos análogos a la Somatostatina (SST) . . . . .	13
1.11.5. Péptido Liberador de Gastrina . . . . .	13
1.11.6. Análogos del Péptido Liberador de Gastrina . . . . .	14
1.11.7. Ácido Fólico (AF) . . . . .	16
1.12. Radiomarcado y Agentes Quelantes . . . . .	18
1.13. Nanopartículas de Oro . . . . .	20
1.13.1. Resonancia de Plasmones de superficie en nanopartículas de oro . . . . .	21
1.13.2. Teoría de Mie . . . . .	22
1.13.3. Terapia fototérmica usando nanopartículas de oro . . . . .	25
1.14. Propiedades fluorescentes de las Nanopartículas de Oro . . . . .	25
1.15. Dendrímeros . . . . .	26
1.16. Dendrímeros en el tratamiento y diagnóstico del cáncer . . . . .	28

---

<b>2. Planteamiento del Problema</b>	<b>29</b>
2.1. Pregunta de Investigación . . . . .	29
<b>3. Justificación</b>	<b>30</b>
<b>4. Hipótesis</b>	<b>32</b>
<b>5. Objetivos</b>	<b>33</b>
5.0.1. Objetivo general . . . . .	33
5.0.2. Objetivos específicos . . . . .	33
<b>6. Material y Métodos</b>	<b>35</b>
6.1. Diseño de estudio . . . . .	35
6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación . . . . .	36
6.3. Material . . . . .	37
6.4. Procedimientos . . . . .	37
6.4.1. Conjugación de macrociclo DOTA con el Dendrímero . . . . .	37
6.4.2. Activación de grupos carboxilato del ácido fólico y bombesina . . . . .	38
6.4.3. Conjugación de bombesina y ácido fólico a los grupos amina del dendrímero . . . . .	38
6.4.4. Síntesis de DenAuNP-Folato-Bombesina . . . . .	38
6.4.5. Métodos y técnicas de caracterización . . . . .	39



---

6.4.6. Preparación de $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folato-Bombesina . . . . .	46
6.4.7. Estabilidad en suero humano . . . . .	46
6.4.8. Cultivos celulares . . . . .	47
6.4.9. Estudios de Captación en células T47D . . . . .	47
6.4.10. Modelo animal . . . . .	48
6.4.11. Inducción tumoral . . . . .	48
6.4.12. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) en Células . . . . .	48
6.4.13. Fluorescencia de DenAuNP-Folate-Bombesin dentro de las células . . . . .	49
6.4.14. Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) . . . . .	49
6.4.15. Análisis por espectroscopía de fluorescencia del DenAuNP-Folate-Bombesin dentro de las células . . . . .	51
6.4.16. Evaluación del potencial Fototérmico plasmónico del DenAuNP-Folate- Bombesin en células T47D . . . . .	52
6.5. Variables de estudio . . . . .	54
6.6. Implicaciones Bioéticas . . . . .	55
6.7. Recolección de Datos . . . . .	56
6.8. Análisis Estadístico . . . . .	56
<b>7. Resultados</b>	<b>57</b>

---

7.1. Primer Artículo . . . . .	57
7.1.1. Introduction . . . . .	60
7.1.2. Materials and Methods . . . . .	62
7.1.3. Synthesis . . . . .	62
7.1.4. Chemical characterization . . . . .	63
7.1.5. Preparation of $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin . . . . .	65
7.1.6. <i>In vitro</i> studies . . . . .	65
7.1.7. <i>In vivo</i> uptake . . . . .	66
7.1.8. Results and Discussion . . . . .	67
7.1.9. Acknowledgments . . . . .	80
7.1.10. Conflict of Interests . . . . .	80
7.1.11. References . . . . .	80
7.2. Segundo Artículo . . . . .	86
7.2.1. Introduction . . . . .	89
7.2.2. Experimental methods . . . . .	91
7.2.3. Results and Discussion . . . . .	97
7.2.4. Conclusions . . . . .	110
7.2.5. Acknowledgments . . . . .	111

---

7.2.6. References . . . . .	111
<b>8. Discusiones Generales</b>	<b>116</b>
<b>9. Conclusiones Generales</b>	<b>119</b>
<b>10.Trabajo a Futuro</b>	<b>120</b>

# Índice de figuras

1.1. Esquema ilustrativo del efecto de resonancia del plasmón de superficie. . . . .	22
1.2. Diagrama esquemático del un dendrímero PAMAM G4 . . . . .	28
7.1. Overall scheme of $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin. . . . .	68
7.2. IR-spectrum of a) Dendrimer,b) Bombesin,c) DOTA, d) Folicacid,e) DenAuNPs, f) Den-Folate-Bombesin,and g) DenAuNP-Folate-Bombesin. . . . .	70
7.3. TEM image and size distribution (DLS) of A)DenAuNP-Folate-Bombesinand B)DenAuNP. . . . .	72
7.4. SEM image (A)and X-ray analysis (B) for DenAuNP-Folate-Bombesin. . . . .	72
7.5. UV-Vis spectra in aqueous media of A) Den-Folate-Bombesin, B) DenAuNP-Folate-Bombesin, andC) DenAuNP. . . . .	74
7.6. Emission fluorescencespectra in powder at 291K of A) DenAuNP-Folate-Bombesin, B) Den-Folate-Bombesin ( $\lambda_{emi} = 311, 347, 383, 421, 444, 485, 529nm$ ) and Dendrimer ( $\lambda_{emi} = 308, 345, 384, 419, 445, 484, 520nm$ ). The three spectra were measured at $\lambda_{exc} = 222nm$ , $slit_{exc} = 5.0nm$ , $slit_{emi} = 5.0nm$ and filter= 290nm. . . . .	75

---

7.7. Size-exclusion HPLC chromatogram (220nm; continuous line) and HPLC radio-chromatogram (dotted line) of the $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin theranostic radiopharmaceutical (flow rate 1mL/min). . . . .	76
7.8. <i>In vitro</i> uptake of $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin in T47D breast cancer cells at 1h. A) Unblocked, B) Blocked with folic acid, and C) Blocked with Lys <sup>3</sup> -bombesin. . . . .	78
7.9. Optical imaging of $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin at 1h and 48h after intratumoral administration. . . . .	79
7.10. TEM micrographs. Top panels: intracellular uptake in T47D breast tumor cells treated with DenAuNP-Folate-Bombesin for 2h. Bottom panels: DenAuNP-Folate-Bombesin in membrane showing a vacuole formation. . . . .	97
7.11. High resolution XPS spectra of the Au4f core orbitals of a)DenAuNP-Folate-Bombesin and b) DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell. . . . .	99
7.12. Fluorescence emission spectra of a) DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell, b) DenAuNP-Folate-Bombesin. Excitation wavelength: 222 nm, Filter 290 nm. Excitation and emission slits: 5 nm. . . . .	102
7.13. a) Fluorescence emission spectra in the VIS-NIR region of DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell sample; Hoechst dye in cells (short dot line) and Hoechst dye (dot line). Excitation wavelength: 510nm. Emission filter: 290nm. b) Fluorescence emission spectra in the VIS-NIR region of DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell sample. Hoechst dye in cells (short dot line) and Hoechst dye (dot line). Excitation wavelength: 510nm. Emission filter: 515nm. . . . .	104
7.14. A representative microscopic field (40X) of T47D cells A) in phase contrast, B) the Hoechst stained nucleus, C) the DenAuNP-Folate-Bombesin emission after 530nm excitation, and D) the merged nuclear and AuNP fluorescence images. . . . .	106

---

7.15. Medium temperature increase after laser irradiation of T47D cells incubated on the presence of Den-Folate-Bombesin, DenAuNP-Folate-Bombesin and a control solution (irradiance $1.1926W/cm^2$ ). . .	107
7.16. Effect on viability of T47D cells incubated on the presence of Den-Folate-Bombesin, DenAuNP-Folate-Bombesin and the control after laser heating (irradiance $1.1926W/cm^2$ ). *Statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) versus DenAuNP-Folate-Bombesin . . . . .	108
7.17. Effect of the radiation dose of $^{177}LuCl_3$ , $^{177}Lu$ -DenAuNP and $^{177}Lu$ -DenAuNP-Folate-Bombesin on T47D cell viability. *Statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) versus $^{177}Lu$ -DenAuNP-Folate-Bombesin. . . . .	110

# Índice de tablas

1.1. Algunos análogos a la Somatostatina . . . . .	13
6.1. Variables . . . . .	55
7.1. Total number of disintegrations and mean absorbed doses of $^{177}\text{Lu}$ internalized in T47D cancer cells within 3 days (Monte Carlo simulation, PENELOPE 2008). . . . .	110

# Capítulo 1

## Antecedentes

### 1.1 Radionúclidos

A cada especie nuclear se le denomina núclido, es caracterizada por sus constituyentes nucleares, el número de protones que define al elemento y el número de neutrones que puede variar dando lugar a una nueva configuración o (núclido). Los núclidos pueden ser estables y no mostrar algún cambio en su estructura. Otros son inestables, presentan una transformación por medio de un decaimiento radiactivo, durante este proceso emiten fotones (útiles para imagen) y/o radiación de partículas que pueden tener una aplicación terapéutica. Se conocen hasta hoy cerca de 2,300 núclidos inestables, y 280 son estables o tienen vidas medias mayores a 1024 años [1].

La mayoría de los núclidos radiactivos (radionúclidos) son producidos artificialmente, transformando un núcleo estable en uno inestable por medio del bombardeo con elementos nucleares, principalmente neutrones, protones, deutrones, partículas alfa o rayos gamma. La fuente generadora puede ser un radionúclido, un reactor nuclear, acelerador de partículas (Van de Graaf, ciclotron, linac, etc.). La gran variedad de radionúclidos creados tienen distintas aplicaciones en física, biología



y por su puesto en Medicina Nuclear (radiofármacos), donde se pueden emplear en diagnóstico (nuclear/imagen molecular) y/o (tratamiento/manejo) de pacientes con cáncer.

## 1.2 Radiofármacos Teragnósticos

El término Teragnóstico se refiere a la combinación de herramientas de diagnóstico y terapia en un mismo elemento que actúan al mismo tiempo. Este revolucionario concepto de agente teragnóstico (**terapia + diagnóstico**) se postula como sumamente eficaz en el tratamiento y diagnóstico simultáneo de patologías de elevada morbilidad y mortalidad como el cáncer [2, 3, 4, 5].

En el contexto de la medicina nuclear en el diseño de estos sistemas multipropósitos se considera el uso de agentes radiactivos para diagnóstico y terapia. Tales agentes presentan un alto potencial para: (1) localización y estadio de la enfermedad; (2) investigar la biodistribución y dosimetría para la optimización de la dosis terapéutica; (3) posibilidad de medicina personalizada; y (4) monitoreo de la respuesta al tratamiento.

Algunos casos un mismo agente (radionúclido dual) puede emplearse con un doble fin dada su múltiple emisión de radiación útil para diagnóstico o tratamiento. Otra posibilidad para obtener esta doble función, es la combinación de varios isótopos de un mismo elemento ( $^{44}\text{Sc} - ^{47}\text{Sc}$ ,  $^{64}\text{Cu} - ^{67}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga} - ^{67}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y} - ^{90}\text{Y}$ ,  $^{124}\text{I} - ^{131}\text{I}$ )[1].

Los radionúclidos duales pueden dividirse en tres grupos por la combinación de emisores gamma para imagen, con tipos de emisores terapéuticos como electrones ( $\beta^-$ ) ( $^{47}\text{Sr}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{117\text{m}}\text{Sn}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ), electrones Auger ( $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ) y partículas alfa ( $^{211}\text{At}$ )[1].

El empleo de estos radiofármacos en el desarrollo de un agente teragnóstico no es del todo un

procedimiento simple, hay varios factores que hasta hoy han limitados su uso y desarrollo, por ejemplo, la radiación gama de altas energías en combinación con vidas media largas dan como resultado dosis adicionales de radiación no deseadas a órganos sanos durante la terapia.

### 1.3 Radionúclidos para Diagnóstico y Terapia

Los criterios de selección de un radionúclido para ser usado con fines diagnósticos o terapéuticos abarca tanto variables Física (vida media del radionúclido, tipo de radiación emitida, energía, abundancia y pureza), Biológicas (vida media biológica, fármaco cinética), Químicas (afinidad) y practicas (costo y facilidad de producción) [1, 6]. A los núclidos usados en aplicaciones médicas se les denomina radiofármacos, un radiofármaco es entonces toda sustancia que conteniendo un átomo radiactivo dentro de su estructura y que, por su forma farmacéutica, cantidad, calidad y tipo de radiación, puede ser administrado en los seres humanos con fines diagnósticos o terapéuticos [7].

### 1.4 Radionúclidos para Terapia

La emisión de los radionúclidos usados para terapia consiste de, electrones Auger, partículas alfa, partículas beta y electrones de conversión, todos excepto las partículas beta son clasificadas como radiación de alta transferencia lineal de energía (LET). Los electrones de conversión son generalmente monoenergéticos por lo que tienen un rango discreto en tejido, en contraparte las partículas beta tiene un amplio rango de energía. Los electrones Auger viajan cortas distancias, son muy efectivos para matar células solo cuando están muy próximos al ADN celular. Las partículas alfa son generalmente efectivas de (4 a 10 ) diámetros celulares. Mientras que los electrones de conversión son efectivos de (0 a 50) diámetros celulares[8]. En general todos los emisores de partículas de alta tasa de LET son mucho más eficaces para lesiones pequeñas y micrometástasis,

para tumores pequeños de 1 a  $0.2\text{mm}$  los emisores alfa son mucho más eficientes, ejemplo, el  $^{211}\text{At}$  con LET de ( $\sim 80\text{KeV}/\text{mm}$ ) es de 9-33 veces más eficiente que uno de baja LET como el  $^{90}\text{Y}$  con LET de ( $\sim 1\text{KeV}/\text{mm}$ ). En la superficie celular el  $^{211}\text{At}$  es 1200 veces más eficiente que  $^{90}\text{Y}$  [1]. Sin embargo los emisores de alta LET son poco eficientes para tratar masas tumorales grandes y macrometástasis debido a su corto alcance necesitan mayor especificidad y selectividad de los blancos tumorales.

En general la selección del radiofármaco terapéutico depende de la naturaleza, el grado y el estadio de la enfermedad.

## 1.5 Muerte celular inducida por radiación

El inducir muerte celular por radiación en un organismo es una función de probabilidad en la que influyen un gran número de factores tales como el tipo de célula irradiada, la naturaleza y energía de la radiación, la dosis suministrada, entre otros. La radiación puede inducir muerte celular por daño a distintos componentes estructurales celulares de forma no selectiva, sin embargo el punto crítico o blanco principal es la molécula de ADN; Las acciones de la radiación sobre el ADN son siempre de tipo lesivo y se manifiestan como pérdida de información en el material genético y se manifestará siempre como una pérdida de alguna función o de alguna actividad específica. La magnitud del daño dependerá del mecanismo de acción, el sitio de acción (punto crítico o volumen crítico como lo plantean Erwin Schrödinger en su obra *¿Que es la vida?* [9] ) y la cantidad de acciones, es decir la dosis suministrada. Si el objetivo es propiciar muerte celular se busca causar la mayor cantidad de daños al ADN, para evitar que la célula los pueda reparar. La fragmentación de una sola hebra, los daños a las bases y enlaces cruzados de proteínas en general son reparadas con alta fidelidad, no así las rupturas de doble hebra y las lesiones múltiples. Las lesiones que no son reparadas conllevan a mutaciones en el ADN y/o a muerte celular siguiendo diferentes rutas, como:

apoptosis, necrosis, catástrofe mitótica, autofagia y senescencia, siendo la muerte mitótica la más común después de una irradiación. Además por medio del efecto «bystander», las células con daño radiobiológico también pueden inducir muerte celular en células vecinas, no irradiadas a través de la liberación de citosinas y elementos altamente reactivos químicamente llamados radicales libres.

Existen dos mecanismos principales de daño al ADN por radiación, el primero es la ionización en la molécula causando por el impacto directo de algún fotón o partícula, este mecanismo es menos probable, ya que el ADN es un blanco relativamente pequeño. El segundo es una interacción indirecta que consiste en la generación de radicales libres de agua que interaccionan con las bases hidrogenadas provocando rompimientos, esta es la interacción más probable debido a la gran cantidad de moléculas de agua que rodean al ADN, causando una mayor cantidad de daños.

Dada la naturaleza física de la radiación ionizante se puede clasificar como radiación de partículas u ondas electromagnéticas, cada una dependiendo de su energía interacciona de forma diferente con la materia o átomos que encuentra a su paso. A esta propiedad para partículas se le denomina transferencia lineal de energía o LET *Linear Energy Transfer*, la radiación de alto LET provoca una mayor densidad de ionizaciones es decir más daños a lo largo de su camino [10].

## 1.6 Tratamiento de cáncer por Hipertermia

El uso de calor para tratar el cáncer no es algo nuevo, es probablemente una de las terapias más antiguas contra el cáncer. De hecho, la primera aplicación documentada se encuentra en *The Edwin Smith Surgical Papyrus*, un papiro egipcio de entre los años 3000 y 2500 a. C., en el que un paciente con cáncer de mama fue tratado con calor [11]. Hipócrates (460-370 a. C.) trató tumores ulcerados por medio de la cauterización de forma directa con hierros incandescentes o por medio de sustancias cauterizantes. En 1893 William Coley demostró la desaparición de tumores malignos en pacientes

con fiebre alta. El tratamiento de cáncer induciendo fiebre a los pacientes se implementó pero no tuvo mucho éxito debido a la toxicidad impredecible que presentaba. Más adelante la hipertermia fue retomada con el surgimiento de nuevas tecnologías. En 1975 en Washington tuvo lugar el primer congreso de de hipertermia denominado: "La hipertermia como una modalidad de tratamiento del cáncer". Durante los años 70 tuvo aceptación pero el interés se desvaneció al aparecer dificultades tecnológicas para controlar y localizar el calor en una determinada región.

Para suministrar calor a tejidos del cuerpo se han empleado diferentes fuentes y métodos, incluyendo lámparas infrarrojas, ultrasonido, fuentes de radiofrecuencia [12]. Sin embargo es complicado limitar el calor a una zona determinada sin dañar los tejidos circundantes sanos. Recientemente se han desarrollado nuevas técnicas como la terapia fotodinámica la cual emplea una combinación de sustancias fotosensibilizadoras y fuentes de luz láser para el tratamiento de tumoraciones, dando resultados parciales, sin embargo la citotoxicidad y la inespecificidad de los elementos sensibilizantes conllevan a efectos adversos [13].

## 1.7 Bases biológicas de la hipertermia

Cuando se induce un aumento de temperatura en células por arriba de los  $45^{\circ}\text{C}$  sufren un proceso de lisis y mueren. Los mecanismos mediante los cuales una temperatura por debajo de  $45^{\circ}\text{C}$  induce muerte celular no están completamente bien definidos. Uno de los mecanismos importantes que lleva a las células a la muerte es probablemente la desnaturalización de proteínas, que se observa a temperaturas mayores a  $40^{\circ}\text{C}$ , lo que conduce, entre otras cosas, a alteraciones en estructuras como el citoesqueleto, membranas, y cambios en complejos enzimáticos para síntesis de ADN y reparación del mismo [14].

Investigaciones han demostrado que las altas temperaturas  $43\text{-}44^{\circ}\text{C}$  pueden dañar y matar células

cancerosas, generalmente con lesión mínima a tejidos normales [15]. Cualquier tipo de tratamiento para tratar el cáncer ya sea radio o quimioterapia está basado en el hecho de que el comportamiento de las células cancerígenas es diferente al comportamiento de las células normales, es decir las células afectadas son más susceptibles al daño. La hipertermia se basa en el mismo hecho; se ha demostrado que las células cancerosas son menos resistentes a la temperatura que las células normales [16, 15, 17].

El tratamiento a temperaturas entre 40 y 44 °C es citotóxico para las células en un entorno con presión de  $O_2$  y  $pH$  bajos, que son las condiciones que se encuentran específicamente en tejido tumoral, debido a la perfusión sanguínea insuficiente[15]. En tales condiciones la radioterapia y la quimioterapia son poco eficaces debido a la baja oxigenación y a que los agentes citotoxicos llegarán a esas zonas en concentraciones más bajas que en las zonas bien perfundidas. El calor tiene un efecto sinérgico tanto en la radio como de la quimioterapia [10]. Es un potente sensibilizador de la muerte celular por radiación ionizante, que puede atribuirse al hecho de que el calor es un agente pleiotrópico perjudicial [18, 19].

## 1.8 Radionúclidos como agentes de Diagnóstico

Como agentes de diagnóstico se consideran aquellos medicamentos que se utilizan para el diagnóstico clínico de las enfermedades. Aunque no presentan un efecto terapéutico sobre la patología del paciente.

Los radiofármacos para diagnóstico son empleados sólo para la localización de inflamación, infección, diagnosticar existencia de células malignas, en estudios de funcionalidad de órganos, entre otros. Para el diagnóstico es necesario el uso de radionúclidos que minimicen la dosis absorbida al paciente y posean características de detección de acuerdo a la instrumentación actual para la detección

[20]. Los radionúclidos usados en el diagnóstico, tienen como principal característica la emisión de radiación electromagnética (Gamma  $\gamma$ ), debido a las técnicas centellográficas, la elección de una energía moderada permite obtener una mayor eficiencia en la detección. En general se recomiendan energías entre 120 y 400KeV. Si la energía es demasiado baja se producirá una seria absorción y dispersión de la radiación en el tejido [20].

## 1.9 $^{99m}Tc$

El  $^{99m}Tc$  es radionúclido más utilizado con fines diagnósticos en ( $\sim 85\%$ ) las exploraciones de medicina nuclear, con al rededor de 40 millones de procedimientos por año en todo el mundo [21].

El  $^{99m}Tc$  se desintegra por emisión beta y se transmuta a  $^{99}Ru$ . Al mismo tiempo, por transición isomérica y la emisión de radiación gamma monoenergética de 140keV (89.1%) pasa al  $^{99}Tc$ , con una vida media ( $T_{1/2}$ ) de 6.03horas [22]. Es muy adecuado para diagnóstico ya que los fotones gamma que emite tienen una longitud de onda aproximadamente igual a la de los rayos X que se producen en equipos de diagnóstico convencional. La energía de la radiación gamma es apropiada para ser detectada por los equipos actuales con cristal de centelleo o gamma cámaras.

La  $T_{1/2}$  física corta y la vida media biológica de 24horas permiten estudios diagnósticos rápidos manteniendo una dosis baja en el paciente.

Por ser metal de transición es muy versátil y puede formar compuestos y complejos (radiofármacos) con números de oxidación del +7, +6, +5, +4, +3, +2, +1, 0, -1, -2 y del -3. Esta versatilidad es sumamente útil en la Medicina Nuclear [23]. Los compuestos de coordinación pueden llevar como vector a anticuerpos, péptidos o nucleótidos y se unen al tecnecio por medio de un conector y un ligante específico. Estos radiofármacos son útiles para estudios a nivel molecular [2] .

## 1.10 $^{177}\text{Lu}$ Como un agente teragnóstico

La combinación rayos gama de relativa baja energía acompañadas de emisión beta terapéuticas y una vida media corta hacen del  $^{177}\text{Lu}$  una opción viable en el desarrollo de sistemas teragnósticos, posee un período de semi-desintegración  $T_{1/2} = 6.73$  días. Es un emisor de partículas beta menos ( $\beta^-$ ) con una energía máxima  $E_{max} = 497\text{keV}$  (abundancia 78.6%),  $384\text{keV}$  (9.1%) y  $176\text{keV}$  (12.2%). También es emisor de fotones gamas  $E_\gamma = 113\text{KeV}$  (6.4%) y  $208\text{KeV}$  (11%). La energía beta menos promedio es de  $0.134\text{MeV}$  con un alcance promedio de  $2\text{mm}$  en tejido blando[24]. La energía de las gamas es apropiada para la adquisición de imágenes *in vivo* en cámaras gamma y *single-photon emission computerized tomography* (SPECT), en la realización de estudios dosimétricos personalizados previos a la terapia radionuclídica.

## 1.11 Agentes para reconocimiento molecular

### 1.11.1 Anticuerpos Monoclonales

Todos los linfocitos B que han sido estimulados por un antígeno dan lugar a anticuerpos que reconocen una pequeña parte de la estructura del antígeno (epítipo). Cuando un animal es expuesto a un antígeno complejo algunas células B fabrican anticuerpos para ese epítipo, mientras que otras fabrican anticuerpos para otros epítipos del mismo antígeno, por consiguiente los anticuerpos presentes en el torrente sanguíneo son en realidad una mezcla de moléculas, cada una de ellas específica para un determinado epítipo. Dado que estos anticuerpos derivan de varias células B distintas se denominan *anticuerpos policlonales*[25].

Cada linfocito B formador de anticuerpos está especializado en la síntesis y secreción de un anticuerpo y solo uno. este tipo de células no proliferan en un cultivo, si estas células pudieran proliferar



en principio se podría aislar un *clon* que sintetizara un anticuerpo dirigido contra la proteína de interés. En 1975 Georges Kohler y Cesar Milstein descubrieron una forma de propagar linfocitos formadores de anticuerpos con células cultivadas procedentes de un ratón con mieloma múltiple (proliferación cancerosa de leucocitos) lo que dio lugar a la producción de anticuerpos provenientes de una sola célula B (*anticuerpo monoclonal*) [26].

En sí un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo homogéneo producido por una célula híbrida (hibridomas) que resultan de la combinación de un linfocito B con una célula de mieloma.

Durante 20 años los anticuerpos monoclonales se volvieron populares como una arma capaz de identificar, localizar y tratar neoplasmas en humanos en un estado inicial de desarrollo[27]. Esa fascinación y simple principio se tornó difícil para transportar a la realidad tan deseada, principalmente debido a la gran masa molecular ( $\sim 150kDa$ ) de los anticuerpos[28].

### 1.11.2 Péptidos

El mantenimiento de la homeostasis es fundamental para la supervivencia del individuo y propagación de su especie. Para ello, debe existir una coordinación entre las condiciones ambientales externas y los procesos fisiológicos que materializan la respuesta a ellas. Así, los seres vivos han desarrollado una serie de mecanismos y sistemas que les permiten mantener esta homeostasis y adaptarse de este modo al ambiente.

Con este fin, los mamíferos, han desarrollado un procedimiento de defensa complejo, que incluye algunos de los componentes del Sistema Nervioso Central (SNC), como son el núcleo paraventricular del hipotálamo, distintos núcleos noradrenérgicos del tallo cerebral, el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y el sistema nervioso autónomo. El objetivo de todos estos sistemas en su conjunto es mantener la homeostasis tanto en situación basal como de estrés, e intervenir en la regulación de

funciones corporales fundamentales, como el tono cardiovascular, la respiración y el metabolismo. Por otra parte, la activación de estos sistemas también altera funciones reguladas por el sistema nervioso autónomo periférico, como son la funcionalidad gastrointestinal y la respuesta inflamatoria e inmune. Los péptidos son diseñados por naturaleza para estimular, regular o inhibir estas funciones, actuando principalmente como transmisores de información y coordinadores de actividades entre tejidos del organismo.

Los péptidos son compuestos que contienen aminoácidos (ácidos  $\alpha$ -amino carboxílicos) unidos por enlaces peptídico, es decir por la unión del carboxilo terminal de un aminoácido y el amino terminal del siguiente, en contraste con las proteínas generalmente no poseen una estructura tri-dimensional bien definida (terciaria), (tienen menos de  $(10 - 12kDa)$ ), las proteínas pueden estar formadas por la unión de varios polipéptidos[28]. Un ejemplo de polipéptido es la insulina, compuesta por 51 aminoácidos y conocida como una hormona de acuerdo a la función que tiene en el organismo de los seres humanos.

Se ha encontrado que tales sustancias están presentes en las células y fluidos del cuerpo en cantidades extremadamente pequeñas; es por ello que los péptidos se consideran como agentes ideales para aplicaciones terapéuticas.

Una de las muchas razones por el creciente interés por los péptidos y sus receptores en las células es la posibilidad de usarlos como vectores para la localización y marcaje, debido a que los receptores de péptidos se sobre-expresan en el cáncer en comparación con su expresión en tejido normal. Algunos tipos de tumores, generalmente los del sistema endocrino o neurológicos, pueden expresar una concentración de receptores del péptido somatostatina hasta 1000 veces mayor que las células normales, es por tal motivo que esta molécula posee un alto potencial para su uso en diagnóstico y tratamiento [3, 23, 28, 29].

Los péptidos pueden sintetizarse de manera artificial con una función similar a los creados naturalmente denominados **péptidos análogos**. Los análogos de péptidos reguladores representan una clase de moléculas sintéticas similares en funcionalidad a las producidas en el organismo, son empleadas para marcar específicamente células de cáncer incorporando químicamente algún elemento radiactivo dando lugar a un péptido radiomarcado. Los receptores de estos péptidos, son proteínas sobre-expresadas en numerosas células de cáncer humano. Estos receptores se han utilizado como blancos moleculares para péptidos radiomarcados con el fin de localizar tumores primarios y sus metástasis [29, 7].

### 1.11.3 Somatostatina

La somatostatina es un péptido (14 amino ácidos) multifuncional, es sintetizada en el hipotálamo y páncreas, actúa como neurotransmisor a nivel del SNC y como hormona, en otros sitios. La somatostatina posee un tiempo de vida media biológica pequeño (2 – 3 minutos). Entre los varios efectos se destacan los inhibitorios: suprime la liberación de hormona del crecimiento por la glándula pituitaria anterior, así como la liberación de otras hormonas a nivel pituitario, pancreático y gastrointestinal; paralelamente, inhibe la proliferación de ciertas células[30].

Algunos tipos de tumores, generalmente los del sistema endocrino o neurológicos, pueden expresar una concentración de receptores de somatostatina hasta 1000 veces mayor que las células normales, es por tal motivo que esta molécula posee un alto potencial para su uso en diagnóstico.

La contribución clínica lograda durante la última década mediante el empleo de péptidos radiomarcados, es la generación de imágenes de tumores neuroendócrinos que sobre-expresan receptores de somatostatina. Estos resultados han sido útiles en el estudio de otros péptidos para detectar cáncer asociado con receptores de péptidos como el péptido liberador de la gastrina, colecistocinina, ligantes de péptidos para receptores de integrina o neurotensina. La mejora en

los análogos de péptidos permite obtener imágenes clínicas específicas y terapia para diferentes tipos de tumores, incluyendo, mama, próstata, pulmón, intestino, páncreas y tumores cerebrales [7, 31]. Por lo tanto, la orientación específica a través de péptidos selectivos para fines diagnósticos y terapéuticos es considerada como una estrategia prometedora en oncología.

#### 1.11.4 Péptidos análogos a la Somatostatina (SST)

La somatostatina natural tiene una vida media biológica pequeña ( $2 - 3 \text{ minutos}$ ) se degrada rápidamente por las proteasas del plasma y del tejido, esto limita su uso para la obtención de imágenes. Por esta razón se han sintetizado varios análogos de somatostatina para prolongar el tiempo de vida media *in vivo*. Cada análogo presenta distinta afinidad para distintos receptores en la célula o para unirse a algunos radionúclidos.

Tabla 1.1: Algunos análogos a la Somatostatina

Análogos	Secuencia
Octreótido	D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)
<i>Tyr</i> <sup>3</sup> -Octreótido	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)
<i>Tyr</i> <sup>3</sup> -Octreotato	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr
RC-160	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH <sub>2</sub>
Lanreótido	$\beta$ -D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH <sub>2</sub>

#### 1.11.5 Péptido Liberador de Gastrina

El Péptido Liberador de Gastrina es un péptido de 27 aminoácidos que fue aislado por Mc Donald y cols. en 1977 de tejido gástrico porcino e identificado posteriormente en el Sistema Nervioso Central (SNC) de mamíferos y en el hombre, es un estimulador potente de las secreciones pancreática y gástrica en animal de experimentación y en humano [32].

### 1.11.6 Análogos del Péptido Liberador de Gastrina

El péptido bombesina (BN) se aisló de la piel de la especie de batracio Europeo *Bombina variegata pachypus* en 1970 por Anastasi, Erspamer, y Bucci [33]. La primera bombesina de origen animal se aisló del tejido intestinal porcino, nombrada (**péptido liberador de gastrina**) (*gastrin-releasing peptide*) ( GRP) debido a su potente acción liberadora de gastrina, el GRP es un péptido de 27 aminoácidos, difiere de la bombesina en sólo 10 residuos carboxi-terminales esto explica su actividad biológica similar.

Los péptidos análogos a la bombesina se distribuyen ampliamente por todo el sistema nervioso central y el tracto gastrointestinal en mamíferos, estos péptidos juegan múltiples roles fisiológicos incluyendo la estimulación de la secreción de ácido gástrico, contracción del musculo liso y la regulación de hormonas tales como la gastrina , colecistoquinina , hormona de crecimiento, somatostatina e insulina [34].

Los receptores de GRP (GRP-r) están sobre-expresados en la membrana celular de varios tumores malignos, en particular se han encontrado receptores en cáncer de próstata, mama, tumores gastrointestinales y en los vasos peritumorales del cáncer de ovario[35, 36]. Markwalder y Reubi demostraron que los GRP-r se expresaron en 30 de 30 carcinomas prostáticos primarios invasivos con alta densidad en la mayoría de los casos [36].

La fuerte y específica unión que presenta la bombesina a los receptores GRP-r proporciona la base para marcar a la BN con radionúclidos tales como el  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{18}\text{F}$  y  $^{99m}\text{Tc}$  para imagen nuclear [37, 2]

Muchos de los análogos de la BN marcados con  $^{99m}\text{Tc}$  tienden a acumularse en el hígado e intestino como un resultado de su alta lipofilia y eliminación hepatobiliar. La alta acumulación

de radioactividad puede interferir durante la detección de cánceres positivos a receptores de BN o GRP y sus metástasis en áreas abdominales [7].

Lin y cols. reportaron otro análogo de la BN radiomarcada, DTPA,  $Lys^3(^{99m}Tc\text{-Pm-DADT})$ ,  $Tyr^4BN$ , que tiene poca eliminación hepatobiliar. Los estudios *in vivo* con este radiofármaco mostraron que tenía gran afinidad a las células cancerosas PC-3. Los estudios de biodistribución en ratones normales mostraron muy baja acumulación de radioactividad en el hígado e intestinos. Asimismo la captación en el páncreas fue significativa ya que es un órgano que expresa receptores de BN/GRP [38].

Ferro-Flores y cols. conjugaron al quelante bifuncional HYNIC (ácido 6-hidrazinopididina 3-carboxílico) y al coligante EDDA (ácido etilendimino-N,N-diacético) a la bombesina para preparar  $^{99m}Tc\text{-EDDA/HYNIC-[Lys}^3\text{]-BN}$ . La conjugación de HYNIC resultó en propiedades menos lipofílicas del péptido y consecuentemente baja eliminación hepatobiliar y principalmente excreción renal [7]. Además García-Garayoa y cols. recientemente mostraron que la introducción de un spacer hidrofílico entre la secuencia peptídica y el complejo de unión al  $^{99m}Tc$  puede reducir la alta lipofilidad y mejorar la relación tumor-tejido no blanco[39].

Nuevos análogos de la bombesina se enfocan en el sistema quelante-DOTA por sus opciones de uso multipropósito como SPECT, PET y PRRT [22]. Por ejemplo, el DOTA-PESIN (DOTA-PEG4-BN(7-14)) demostró ser un compuesto muy prometedor. A pesar de tener afinidad moderada por los GRP-r, presentó buena captación *in vivo* en estudios animales. La eliminación del compuesto fue vía renal y el tracto urinario con rápida depuración de tejidos negativos a GRP-r, pero muy alta acumulación en riñones, que no pudo ser reducida a través de la co-inyección de lisina. Otro análogo de la BN utilizando como quelante al DOTA es el  $^{177}Lu\text{-AMBA}$  [40]. Este radiofármaco mostró alta captación en tumores positivos a GRP-r en estudios animales y una razón tumor-fondo favorable. El tratamiento del tumor *in vivo* con éste compuesto resultó en una sobrevida prolongada del ratón

con el tumor y disminuyó la tasa de crecimiento del tumor contra los ratones control, también se excretó vía renal, con alta acumulación en los riñones a pesar de la co-inyección de lisina, debido probablemente a la falta de lisinas en la secuencia peptídica.

La aplicación de péptidos análogos de la bombesina radiomarcados en pacientes aún está muy limitada. Sin embargo el avance en la medicina nuclear específica y la generación de nuevos análogos de la bombesina promueve su utilización no solo con fines de diagnóstico si no también terapéuticos de diversas enfermedades. Por otra parte, como ya se menciona los péptidos análogos a la bombesina se une a receptores específicos en la membrana celular, sin embargo la aplicación de nuevos métodos novedosos en el transporte eficiente del radiofármaco al blanco más radiosensible de la célula incrementaría de forma significativa el diagnóstico y/o tratamiento[41].

### 1.11.7 Ácido Fólico (AF)

El ácido fólico (AF) es la forma sintética de la vitamina B9 que se encuentra en suplementos y alimentos fortificados, el folato que es la forma aniónica del (AF), se encuentra naturalmente en los alimentos y es en esta forma química como actúa en el organismo [42].

El ácido fólico es un componente esenciales en múltiples procesos bioquímicos del metabolismo celular, se requiere en la reacción metabólica de carbono y en consecuencia, es esencial para la síntesis de bases de nucleótidos en la síntesis de ADN. La deficiencia de ácido fólico en los seres humanos se ha relacionado con anemia megaloblástica, defectos del tubo neural en el recién nacido, y enfermedades del corazón [42].

La absorción de folatos en prácticamente todas las células del cuerpo está mediada por la reducción de folato portador [43]. En general la algunos tipos de células de cáncer muestran una sobreexpresión de Receptores de Folato (FR) comparadas con las células sanas los que hace que estas

compitan de forma más agresiva para las bajas concentraciones, sin embargo la expresión de (FR) en las células cancerosas es sorprendentemente variable para distintos tumores malignos [44, 45, 46], algunos tumores malignos expresa (FR) principalmente en la isoforma alfa ( $FR\alpha$ ) en muy alto niveles, otros a niveles intermedias y otros no muestran en absoluto [42, 47]. Estudios posteriores han descrito tres isoformas Folato Receptores (FR) denominadas ( $FR\alpha$ ), ( $FR\beta$ ) y ( $FR\gamma$ ) cada una con distribuciones específicas para cada tejido.

El ( $FR\alpha$ ) es el más ampliamente estudiado, tiene una baja expresión en células normales, esto los convierte en un biomarcador de interés en el campo del diagnóstico y tratamiento del cáncer, una tipo de ( $FR\alpha$ ) es el (FOLR1), el cual es una proteína unida a la membrana con alta afinidad para la unión y transporte de folato en las células, se han encontrado niveles (FOLR1) elevados en tumores de origen epitelial en comparación con el tejido normal, incluyendo ovario, mama, cerebro, pulmón y colorrectales[47]. La especificidad de los ( $FR\alpha$ ) (FOLR1) en los tumores hace que estos receptores sean un objetivo prometedor para las estrategias de diagnóstico y tratamiento en las distintas modalidades.

En la actualidad se han desarrollado un amplio número de radiofármacos usados para diagnóstico de de cáncer siendo de mayor uso los radiomarcados con  $^{99m}Tc$  para la formación de imágenes nucleares en la técnica de (SPECT), este tipo de radiofarmacos marcados con folatos permitiría seleccionar pacientes con tumores que sobre-expresen (FR), predecir la respuesta a las terapia utilizando a los (FR) como blancos moleculares en el cáncer de mama. Distintos estudios han confirmado la sobre-expresión del ( $FR\alpha$ ) en todos los subtipos clínicos de cáncer de mama que comprenden receptores de estrógenos positivos (ER+), receptores de progesterona positivos (PR +), positivos en el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2+) y triples negativos (TNBC) que son (ER-), (PR-), y (HER2). Los tumores (ER+) representan casi el 70 % de los canceres de mama invasivos diagnosticados, el restante 30 % estrechamente se divide en entre los cánceres de mama (HER2+)



y triples negativos ambos con un mal pronóstico en comparación con (ER+)[48, 49]. Esto confirma la viabilidad de emplear compuestos marcados con folatos para el transporte a blancos moleculares específicos.

## 1.12 Radiomarcado y Agentes Quelantes

El proceso de marcado de fármacos comenzó desde 1908 con el Dr. Paul Ehrlich, quién propuso que los agentes quimioterapéuticos podrían unirse covalentemente a sustrato ligantes como anticuerpos, los cuales tienen afinidad y especificidad para marcar tejidos que presentan tumores malignos [50], desde ese momento varios investigadores estudian diferentes ligantes y agentes quimioterapéuticos para la elaboración de bioconjugados, dando inicio a la era de los radiofármacos con la incorporación de metales radiactivos (radionúclidos) y diferentes moléculas para marcaje como: anticuerpos, péptidos, entre otros.

En la técnica conocida como premarcado se emplea un **agente quelante bifuncional** (BFCA) (*bifunctional chelating agent*) que forma un complejo con el radionúclido y después se conjuga con la biomolécula marcadora. Se denominan quelantes o antagonistas a las sustancias que tienen la propiedad de fijar los iones metálicos de un determinado complejo molecular[51], la aplicación de los quelantes es evitar la toxicidad de los metales y logra que sean metabolizados y eliminados del organismo. Un radiofármaco consiste de una molécula marcadora, un conector, un radionúclido y un BFCA [51]. Algunas de las características que debe cumplir un BFCA son las siguientes:

- Que forme un complejo metálico con alta estabilidad termodinámica para evitar la competencia con quelatos nativos como la transferrina[52].
- Minimizar la disociación *in vivo* del radionúclido.

- Formar un complejo con una alta estabilidad termodinámica a pH neutro para mantener intacto el radionúclido bajo condiciones fisiológicas así como generar un quelato metálico con la menor cantidad de isómeros posibles.
- La coordinación con el radionúclido debe ser fuerte y formar un complejo relativamente estable, que coincida con la naturaleza y estado de oxidación del radionúclido para evitar un cambio en su estado de oxidación[52].
- Debe presentar tolerancia hacia la radiólisis, ya que una dosis alta de radiación  $\beta$ , puede producir radicales libres muy reactivos, los cuales ocasionan una descomposición considerable del quelato metálico durante la distribución del radioconjugado ocasionando que este sea altamente tóxico[52].

**DTPA (ácido N<sup>α</sup>-dietilentriaminopentaácético).** Este pertenece al grupo de los quelatos poliaminocarboxílicos y es un derivado del EDTA, que fue desarrollado por Sundberg y colaboradores. El DTPA es un grupo quelato fuerte para lantánidos y algunos iones metálicos de transición incluyendo Mn (II) e In (III), no es un buen ligando para Tecnecio y Renio. El DTPA se puede unir tanto a grandes proteínas como albúminas, anticuerpos y a pequeños péptidos como los análogos de la somatostatina[53].

El agente quelante DOTA (ácido dodecanatetraacético) junto con sus derivados son una buena alternativa que puede ser utilizada en lugar del DTPA, ya que los complejos metálicos de dicho compuesto han mostrado tener una liberación del radionúclido bajo condiciones fisiológicas [54]. El DOTA forma complejos muy estables con una variedad de radionúclidos trivalentes, tales como  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{79,90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ [55, 52].

Se han desarrollado dos metodologías de conjugación del DOTA con biomoléculas. En el primer método, uno de los cuatro grupos carboxílicos en la molécula de DOTA es activado para facilitar su

reacción con aminas primarias en la biomolécula y formar un enlace amida estable. Mientras que en el segundo método, la biomolécula se une covalentemente a los derivados de DOTA con cadenas laterales, como es el caso de la molécula p-SCN-Bz-DOTA.

### 1.13 Nanopartículas de Oro

Las nanopartículas de metales nobles y en especial las nanopartículas de oro (AuNPs) son una de las plataformas más atractivas usadas en aplicaciones biomédicas debido a sus únicas propiedades físicas, químicas y su magnífica biocompatibilidad y baja toxicidad [56, 57]. También son conocidas como oro coloidal, que hace referencia a soluciones con partículas de oro que contienen de 20 a 15000 átomos con tamaños entre 2 – 100nm con un estado de oxidación de cero y propiedades superficiales en escala nanométrica diferentes de las que presenta el mismo material a macroescala. La utilidad de las AuNPs para cualquier aplicación biomédica es dependiente de dichas propiedades, siendo posible modificar su superficie al hacerlas reaccionar con diferentes biomoléculas, lo que permite la formación de conjugados de elevada estabilidad química [58]. La unión de varias moléculas de proteínas, péptidos u oligonucleótidos a la superficie de una nanopartícula AuNp produce sistemas estables y multifuncionales capaces de incrementar las uniones multivalentes de las AuNp-biomoléculas a sus receptores sobre expresados en las células, lo que permite el reconocimiento, ubicación y tratamiento de blancos moleculares específicos.

Las AuNPs funcionan como nano-transportadores para la vectorización selectiva de fármacos, radiofármacos y macromoléculas terapéuticas. También destaca su utilidad en la elaboración de «**sistemas transportadores inteligentes**» que permiten controlar, en el espacio y en el tiempo, la liberación del compuesto terapéutico transportado, con una activación desencadenada por un estímulo biológico interno (por ejemplo una variación en la concentración de glutatión entre el exterior y el interior de la célula) [59] o por activación de un estímulo externo (por ejemplo luz

láser)[60].

En los últimos años, se han dirigido notables esfuerzos a la investigación y aplicación de las AuNPs en la detección temprana, diagnóstico y tratamiento del cáncer [61, 62, 63, 64]. En este sentido, es preciso subrayar el interés de éste proyecto dirigido a diseñar nanoplataformas «duales», en las que se combinan gracias a la utilización de AuNPs y Dendrímeros los principios de diagnóstico y terapia del cáncer en un mismo elemento.

### 1.13.1 Resonancia de Plasmones de superficie en nanopartículas de oro

A medida que se reduce el tamaño de un metal hasta llevarlo a una escala nanométrica sus propiedades cambian y aparecen nuevas propiedades físicas diferentes a las que presenta el material a nivel macroscópico. Estas propiedades dependen en gran medida de su tamaño y estructura principalmente debido a dos razones [65]: (i) El tamaño de estos sistemas está en el orden de las longitudes típicas de algunos fenómenos físicos, la respuesta del sistema dependerá de las condiciones de contorno ya que no son periódicas como se presentan en el material a una escala macroscópica. (ii) Debido al incremento de la cantidad de átomos en la superficie en comparación con los de volumen en la partícula, los efectos de superficie cobran una mayor importancia. Cuando el tamaño de las partículas disminuye hay un incremento enorme en la fracción de átomos superficiales. Por lo tanto, cuando el tamaño de partículas tiende a unos pocos *nm* los efectos de superficie adquieren mucha importancia.

Las dimensiones de nanopartículas de oro son tan pequeñas que la luz puede fácilmente penetrar toda la nanopartícula e interactuar con el conjunto de electrones de la banda de conducción. El resultado de la interacción de la onda electromagnética (luz) con la nanopartícula, que como ya se mencionó posee una gran cantidad de electrones de conducción, hace que esta nube de electrones se desplace con respecto a los iones cargados positivamente. Si el campo electromagnético

induce oscilaciones coherentes en la nube electrónica, aparecerán efectos de resonancia denominados Resonancia del plasmón de superficie, por sus siglas en ingles *Surface plasmon resonance* (SPR), ver Fig.1.1. La frecuencia de resonancia está determinada principalmente por la resistencia de la fuerza restauradora, que a su vez depende de la separación de las cargas superficiales, es decir, el tamaño de partícula, la polarizabilidad del medio entre y alrededor de las cargas y la polarizabilidad de los electrones internos de la partícula de metal. Este fenómeno puede describirse por medio de la teoría de Mie que se describe a continuación.

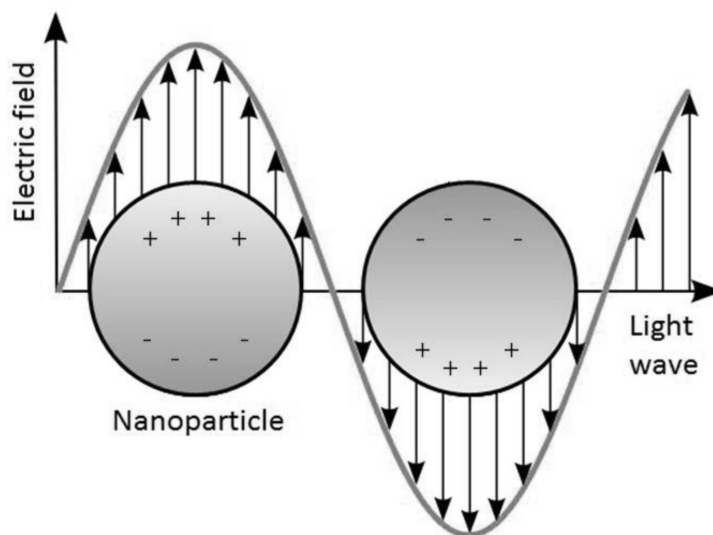


Figura 1.1: Esquema ilustrativo del efecto de resonancia del plasmón de superficie.

### 1.13.2 Teoría de Mie

Gustav Mie, en 1908 desarrolló una teoría para explicar rigurosamente el problema de dispersión de la luz por una partícula esférica de un material arbitrario [66], dando explicación teórica a los fenómenos ópticos que se presentaban en coloides [67]. Esta teoría es muy compleja y excede con mucho los objetivos de este trabajo. Sólo se exponen aquí de forma general algunos fundamentos físicos de la misma y los resultados más significativos enfocados a explicar el fenómeno de (SPR).

Esta teoría describe la interacción de una onda plana con un dieléctrico esférico partiendo de la solución analítica de las ecuaciones de Maxwell. Es basada en la hipótesis de que mientras el campo electromagnético interactúa con la partícula tiene lugar una separación de cargas (electrones) en la superficie de la partícula. La solución de las ecuaciones de Maxwell conduce a una relación para la sección transversal de extinción de una partícula  $C_{ext}$  la cual se define como la pérdida de energía en la dirección de propagación de la luz incidente, debido tanto a la dispersión y absorción por la partícula:

$$C_{ext} = C_{abs} + C_{dis} \quad (1.1)$$

donde  $C_{ext}$ ,  $C_{abs}$ ,  $C_{dis}$  es la sección transversal de extinción, absorción y dispersión respectivamente.

Usando la expresión para la función dieléctrica:

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon'(\omega) + i\varepsilon''(\omega) \quad (1.2)$$

donde  $\varepsilon'$  y  $\varepsilon''$  son la parte real e imaginaria de la función dieléctrica, mientras que  $\omega$  es la frecuencia angular de la onda incidente de acuerdo al modelo de Drude. Tomando las consideraciones del mismo, es decir que se trata de partículas esféricas envueltas en un medio no absorbente e isotrópico con una constante dieléctrica  $\varepsilon_m$ , Mie calculó la sección transversal de extinción dada por la siguiente ecuación:

$$C_{ext}(\omega) = 9 \frac{\omega}{c} \varepsilon_m^{\frac{2}{3}} V_0 \frac{\varepsilon''(\omega)}{[\varepsilon'(\omega) + 2\varepsilon_m]^2 + \varepsilon''(\omega)^2} \quad (1.3)$$

donde  $c$  es la velocidad de la luz en el vacío,  $V_0$  es el volumen de la nanopartícula esférica denotado como:  $V_0 = (4\pi/3)R^3$  y  $\varepsilon_m$  la constante dieléctrica del medio.

Como puede verse a partir de la ecuación 1.3 la sección transversal de extinción de una partícula depende de la función dieléctrica del metal del que se componen las partículas. Esto da lugar a características de absorción y dispersión muy diferentes para diferentes nanopartículas metálicas.

El valor máximo para el  $C_{ext}(\omega)$  o la **condición de resonancia** se lleva a cabo cuando el denominador de la ecuación 1.3 es mínimo. Esto se cumple cuando  $\varepsilon'(\omega) \approx -2\varepsilon_m$ . En este punto también se da la máxima absorción por la nanopartícula. Las condiciones de resonancia del plasmón dependen en gran medida de la constante dieléctrica del medio  $\varepsilon_m$  y por lo tanto las tonalidades en el color de las soluciones coloidales de oro cambian al usar distintos disolventes.

De la ecuación 1.3 pueden deducirse dos casos para que el coeficiente de extinción  $C_{ext}$  sea igual a cero. El primer caso es que la parte compleja de la función dieléctrica sea cero  $\varepsilon''(\omega) = 0$ , es decir, que la partícula no absorba en el espectro visible (esto pasa en algunos materiales por ejemplo el cuarzo que no absorbe en la región del visible). El segundo caso es que la parte compleja sea muy grande  $\varepsilon''(\omega) \rightarrow \infty$  esto significa que el material refleja toda la luz incidente.

Para una dispersión coloidal de NPs metálicas los efectos combinados de absorción y dispersión pueden ser descritos por la ley de Beer-Lambert que se denota por la siguiente ecuación:

$$I(z) = I_0 \exp(-n_0 C_{ext} z) \quad (1.4)$$

donde  $I_0$  es la intensidad del haz incidente,  $I(z)$  es la intensidad del haz después de atravesar una distancia  $z$  a través de la muestra,  $n_0$  es la densidad de número y por último  $C_{ext}(= C_{abs} + C_{dis})$  es la sección transversal de extinción de una partícula.

El espectro de absorción de las nanopartículas puede ser determinado por espectroscopia UV-Vis que en realidad es una medida de la atenuación causada por la dispersión de nanopartículas y está relacionada con la sección transversal de absorción que como ya se mencionó considera el tamaño y forma.

La importancia de determinar las condiciones de máxima absorción o las condiciones de resonancia del plasmón en soluciones coloidales de nanopartículas de oro radica en el hecho de que al ser

absorbida la energía de los fotones incidentes, las nanopartículas de oro rápidamente la convierten en energía térmica, que a través de un mecanismo no radiativo conduce a un incremento de temperatura en el medio que las rodea [62]. Esta elevada temperatura en una célula es suficiente para inducir un daño irreversible [68, 69].

### **1.13.3 Terapia fototérmica usando nanopartículas de oro**

Los estudios realizados por El-Sayed et al. en el 2006 demostraron el potencial de las AuNPs empleadas para generar calor de manera selectiva. Conjugaron anticuerpos monoclonales anti-receptor de factor de crecimiento epidérmico (anti-EGFR) logrando una selectividad y localización de nanopartículas en las células tumorales [69, 70].

La terapia fototérmica plasmónica emplea el efecto de resonancia del plasmón de superficie generado por la interacción del campo electromagnético (luz láser) con los electrones en la superficie de las nanopartículas. Este efecto convierte eficientemente la energía electromagnética en calor, proporcionando una fuente de calentamiento localizado, este calentamiento alcanza temperaturas al rededor de 700°C alrededor de cada nanopartícula, provocando la destrucción celular térmica irreversible de los tejidos cancerosos [71].

## **1.14 Propiedades fluorescentes de las Nanopartículas de Oro**

La forma en que la radiación electromagnética interacciona con la materia depende fundamentalmente de las longitudes de onda de la radiación y la naturaleza eléctrica de la superficie del material, por ejemplo las AuNPs los tamaños de superficie están en el orden de las longitudes de onda de la luz visible, la absorción del plasmón de superficie es uno de los fenomenos que predomina a esta escala, donde la absorción de distintas longitudes de onda cambia dependiendo del tamaño de las



AuNPs. Para tamaños de nanopartícula con un radio mayor a las longitudes de onda ( $R > \lambda$ ), la frecuencia y el ancho de banda de los plasmones de superficie pueden describirse cuantitativamente por medio de la teoría de Mie. Cuando las nanopartículas son más pequeñas aproximadamente del tamaño de la longitud de onda de Fermi o el camino libre medio del electrón ( $\sim 50 \text{ nm}$  para el oro) predominan nuevas propiedades luminiscentes [72]. En la última década distintos estudios han reportado sistemas luminiscentes de nanopartículas de oro con tamaños de 0.3 a 20  $\text{nm}$  sintetizados variando distintos parámetros estructurales, ligandos superficiales, estados de valencia y tamaño de grano, cada combinación con influencia diferente en las propiedades de luminiscencia y emisión del sistema.

En 2000, Mohamed y col. Observó la luminiscencia a 560  $\text{nm}$  en Nanorods de oro con un rendimiento cuántico (QY) un millón de veces más alto que el de oro a escala macroscópica. En el mismo año Whetten y col reportaron luminiscencia en el infrarrojo cercano en AuNPs de 1.1 y 1,7  $\text{nm}$  con QY Hasta  $(4.4 \pm 1.5) \times 10^{-5}$  [73], en 2001, Huang y Murray observaron Fluorescencia a 770  $\text{nm}$  con una QY de  $3 \times 10^{-3}$  para AuNPs de 1.7  $\text{nm}$  y Link y col. Observaron emisión a 770  $\text{nm}$  en Nanoclusters de  $\text{Au}_{25}$  con un QY De  $2 \times 10^{-3}$ , que son más de  $10^7$  veces superiores a la obtenida en películas de oro.

## 1.15 Dendrímeros

El término «dendrímero» procede del griego «dendron» que significa «árbol» o «rama», y el sufijo «mero», que significa «segmento», por su semejanza con las ramificaciones de los árboles. Son macromoléculas poliméricas ramificadas o hiper-ramificadas, versátiles, tridimensionales de síntesis química con forma bien definida, tamaño nanoscópico y con propiedades físico-químicas similares a biomoléculas naturales. Los dendrímeros han recibido gran atención en los últimos años debido a su posible utilización en aplicaciones tan variadas como catálisis a nanoescala,

sensores químicos, micelas unimoleculares, imitación de la función de las enzimas, encapsulación de moléculas, reconocimiento molecular, agentes de diagnóstico y también como vehículos para el transporte de genes y fármacos [74].

La estructura dendrímica está caracterizada por «capas» entre cada punto focal llamadas «generaciones». La definición exacta del término «generación» ha sido objeto de controversia, aceptándose generalmente el número de puntos focales (o puntos «cascada») que aparecen desde el core (núcleo central) hasta la superficie. Un dendrímero de generación 5 (G5) presenta por tanto 5 puntos focales entre el núcleo y la superficie. El núcleo es denominado a veces «generación cero» (G0), ya que no presenta ningún punto focal. Los dendrímeros G(4-6) son estructuras semirígidas capaces de retener y liberar fármacos en su interior mientras los G(7-10) son estructuras rígidas incapaces de aceptar moléculas en su interior y de limitada permeabilidad superficial [75].

En los dendrímeros tipo polipropileno-imina (PPI), el núcleo es 1,4-diaminobutano; para los dendrímeros poliamidoamina (PAMAM), el núcleo es bien amonio o bien 1,2 etilendiamina. En el caso de los PAMAM, los compuestos intermedios que presentan grupos carboxilato en superficie se denominan dendrímeros de «media generación», presentan un crecimiento de aproximadamente 1nm por generación[76].

Los PAMAM fue la primer familia de dendrímeros que fue sintetizada, caracterizada y comercializada, presenta un mimetismo con las proteínas globulares y algunas otros ensamblajes biológicos, coinciden en cuanto a tamaño y superficie. Por ejemplo, insulina ( $\approx 40\text{\AA}$ ) citocromo C ( $\approx 40\text{\AA}$ ) y la hemoglobina ( $\approx 55\text{\AA}$ ) son aproximadamente del mismo tamaño y forma que las generaciones 3, 4 y 5, respectivamente, de dendrímeros PAMAM [76], de aquí sus magníficas características para aplicaciones biomédicas.

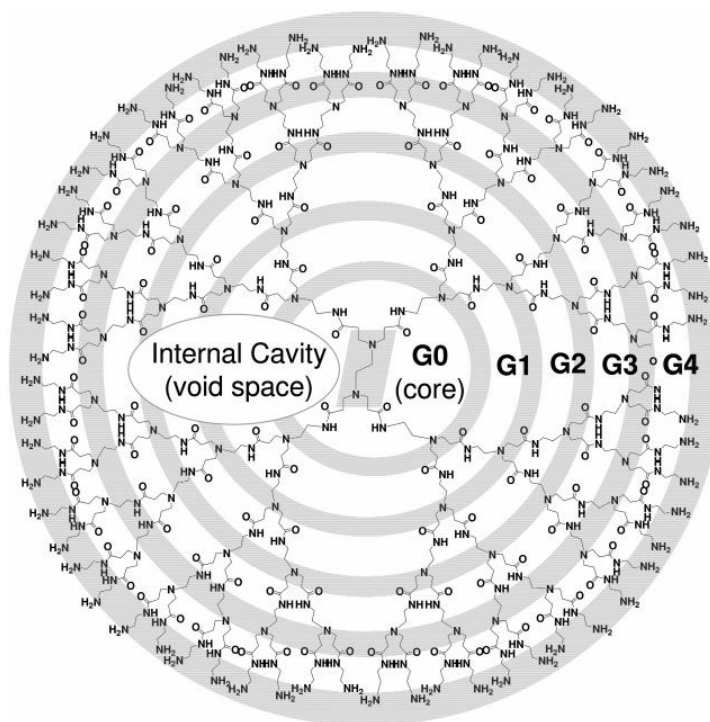


Figura 1.2: Diagrama esquemático del un dendrímero PAMAM G4 .

## 1.16 Dendrimeros en el tratamiento y diagnóstico del cáncer

En recientes estudios se ha postulado a los dendrímeros como plataformas altamente versátiles para el transporte y liberación de fármacos en aplicaciones de terapia génica, de diagnóstico y terapéuticas para células específicas de cáncer [77]; Se pueden diseñar con superficies positivas, negativas o neutras, lo que hace posible conjugar distintos elementos, como anticuerpos monoclonales, péptidos, radionúclidos, moléculas fluorescentes, fotosensibilizadores, etc [78, 79, 80]. Como vehículos transportadores específicos han tenido resultados prometedores, dendrímeros PAMAM generación 3.5 con grupos terminales carboxilato fueron conjugados con cisplatino obteniendo sistemas menos tóxicos (de 3 a 15 veces) que el cisplatino administrado directamente [81].

## Capítulo 2

# Planteamiento del Problema

### 2.1 Pregunta de Investigación

¿El radiofármaco teragnósticos basados en dendrímeros PAMAM G4 funcionalizado con ácido fólico, *Lys*<sup>1</sup> *Lys*<sup>3</sup>-bombesina y con derivados DOTA radiomarcados con <sup>117</sup>*Lu* (Lu-DOTA-Folato-DENPs-*Lys*<sup>3</sup>-bombesina-AuNP) podrá presentarse como alternativa útil en la obtención de imágenes ópticas y nucleares, radioterapia dirigida y terapia fototérmica-plasmónica para el tratamiento de tumores en cáncer de ovario, cervicouterino, mama?

## Capítulo 3

# Justificación

El aumento del cáncer en todo el mundo es un obstáculo considerable para el desarrollo y el bienestar humanos. Cualquier tipo de estudio o generación de nuevos conocimientos que arrojen luz a esta problemática es bien justificada.

Según la OMS en su informe mundial sobre cáncer 2014 [82], establece que la carga de cáncer está creciendo a un ritmo alarmante. «Se precisan urgentemente mayores esfuerzos en materia de detección precoz y prevención complementadas con tratamientos eficaces, para hacer frente al alarmante aumento de la carga de cáncer a nivel mundial».

Según dicho reporte, se calcula que en 2012 la carga mundial de cáncer alcanzó los 14 millones de casos nuevos al año, una cifra que se prevé que aumente hasta los 22 millones anuales en los próximos dos decenios. En el mismo periodo, se prevé que las muertes por cáncer aumenten desde los aproximadamente 8,2 millones de casos anuales hasta los 13 millones de casos anuales. En 2012, los cánceres diagnosticados con más frecuencia a nivel mundial fueron el de pulmón (1,8 millones de casos, esto es, el 13,0 % del total), el de mama (1,7 millones, esto es, el 11,9 %) y el cáncer colorectal

(1,4 millones, esto es, el 9,7%). Los tipos de cáncer que provocaron un mayor número de muertes fueron los de pulmón (1,6 millones, esto es, el 19,4% del total), hígado (0,8 millones, esto es, el 9,1%) y estómago (0,7 millones, esto es, el 8,8%). Más del 60% del total de casos en el mundo se producen en África, Asia y América Central y del Sur, y estas regiones representan alrededor del 70% de las muertes por cáncer en el mundo, una situación que se agrava por la falta de detección temprana y el acceso al tratamiento[82].

Cada año, en todo el mundo, se diagnostican más de un millón de casos de cáncer de mama, sin embargo se ha tenido una disminución favorable debido a mejores estrategias de detección temprana y terapias mejoradas, especialmente los tratamientos dirigidos a biomarcadores específicos. A pesar de todas estas mejoras, hay aproximadamente 230.000 muertes por año en todo el mundo debido al cáncer de mama, incluyendo alrededor de 40.000 muertes en los Estados Unidos [83].

Los resultados favorables debidos al desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento y diagnóstico de el cáncer en especial los relacionados con biomarcadores específicos son un indicio prometedor para continuar con la investigación de nuevas plataformas, nuevas combinaciones de vectorización dirigidas a biomarcadores específicos, nuevas modalidades de tratamiento o combinación sinérgica de los mismos así como la evaluación inmediata de la eficacia del tratamiento y la combinación de métodos de diagnóstico, justifican el objetivo de este trabajo.

## Capítulo 4

# Hipótesis

La presencia de nanopartículas de oro con propiedades fluorescentes (¡2nm) en las cavidades de dendrímeros radiomarcados con un emisor beta-gamma con probadas propiedades terapéuticas ( $^{177}\text{Lu}$ ) y funcionalizados con ácido fólico y  $\text{Lys}^3$ -bombesina, permitirá obtener un sistema multivalente útil para la evaluación de la actividad metabólica, la obtención de imágenes moleculares específicas (óptica y nuclear) y la radioterapia de blancos moleculares para tumores que sobre-expresen receptores GRP y de folato.

# Capítulo 5

## Objetivos

### 5.0.1 Objetivo general

Diseñar y preparar radiofármacos teragnósticos basados en dendrímeros PAMAM G4 y/o G5 funcionalizados con ácido fólico y  $Lys^3$ -bombesina y con derivados DOTA para su radiomarcado con  $^{177}Lu$  útiles en la obtención de imágenes ópticas y radioterapia dirigida para tumores en cáncer de mama.

### 5.0.2 Objetivos específicos

1. Preparar, caracterizar y estudiar las propiedades fisicoquímicas de dendrímeros (DENPs) funcionalizados con ácido fólico (AF) y/o  $Lys^3$ -bombesina.
2. Preparar, caracterizar y estudiar las propiedades fisicoquímicas de dendrímeros funcionalizados con AF- $Lys^3$ -bombesina y conjugados a diferentes macrociclos: DOTA-para-isotiocianato bencilo (DOTA-Bn-NCS) DOTA-amino bencilo (DOTA-Bn-NH<sub>2</sub>) y DOTA-mono-N-hidroxisuccinimida (DOTA-mono-NHS).



3. Preparar y caracterizar radiofármacos teragnósticos basados en complejos de  $^{176}\text{Lu}$  (estable) y  $^{177}\text{Lu}$  (radiactivo) del sistema DOTA-Folato-DENPs- $\text{Lys}^3$ -bombesina.
4. Preparar y caracterizar el sistema Lu-DOTA-Folato-DENPs- $\text{Lys}^3$ -bombesina con AuNPs atrapadas en la cavidad dendrímica.
5. Estudiar las propiedades fluorescentes del sistema Lu-DOTA-Folato-DENPs- $\text{Lys}^3$ -bombesina-AuNP.
6. Estudiar la estabilidad en suero humano, la afinidad y captación *in vitro* del radioconjugado de  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Folato-DENPs- $\text{Lys}^3$ -bombesina-AuNP en células de cáncer de mama T47D.
7. Evaluar *in vitro* el efecto del sistema  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Folato DENPs- $\text{Lys}^3$ -bombesina-AuNP sobre la viabilidad de células de cáncer de mama T47D.
8. Obtener el modelo biocinético por imagen óptica Cerenkov y nuclear, así como los cálculos dosimétrico del  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Folato-DENPs- $\text{Lys}^3$ -bombesina-AuNP en ratones atímicos con tumores inducidos con células T47D (mama).
9. Evaluar la eficacia terapéutica y toxicidad sistémica del conjugado  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Folato-DENPs- $\text{Lys}^3$ -bombesina-AuNP en modelos murinos experimentales con tumores inducidos, T47D (mama).

# Capítulo 6

## Material y Métodos

### 6.1 Diseño de estudio

#### 6.1.0 Diseño de estudios

Enfoque cuantitativo estructurado, transversal, observacional, descriptivo y de seguimiento de medidas experimentales con asignación aleatoria y grupo control.

#### 6.1.0 Universo

- Ratones atómicos de 20 a 22*gramos* con tumores inducidos con células, T47D (mama).
- Línea celular T47D (mama), obtenidas del ATCC (*American Type Culture Collection*) positivas a receptores GRPr y FR

#### 6.1.0 Método de muestreo

Muestras no probabilísticas.

### 6.1.0 Tamaño de la muestra

- 10 ratones atómicos de 20 a 30gramos con tumores inducidos con células T47D.
- 31,000,000 de células para estudios de afinidad de receptores, aplicación de estudios de dosimetría de radiación y aplicación de casos experimentales de fototerapia térmica.

## 6.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

### 6.2.0 Criterios de Inclusión

- Pureza radioquímica del nanoconjugado **Lu-DOTA-Folato-DENPs-Lys<sup>3</sup>-bombesina-AuNP** mayor a 90 %.
- Líneas celulares T47D (mama), obtenidas del ATCC (*American Type Culture Collection*) libres de bacterias, a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad, en medio RPMI con suplemento de suero de ternero recién nacido al 10% y antibióticos (100µg/mL de estreptomycin).
- Ratones atómicos con un peso de 20 a 22gramos, con tumores cancerosos inducidos con las líneas celulares anteriores.

### 6.2.0 Criterios de Exclusión

- Pureza radioquímica del nanoconjugado **Lu-DOTA-Folato-DENPs-Lys<sup>3</sup>-bombesina-AuNP** menor al 90 %.
- Ratones con sospecha de inexistencia de tumor.

- Líneas celulares sin proliferación o contaminadas.

### 6.2.0 Criterios de Eliminación

- Líneas celulares contaminadas y/o inestables en crecimiento durante los procesos de medición.
- Ratones que mueran durante la administración del radiofármaco, ratones con presencia de más de un tumor canceroso.

## 6.3 Material

El dendrímero  $G4-PAMAM-(NH_2)_{64}$  (10 %wt. en metanol, densidad 0,813g/ml) [Dendrímero] y ácido fólico se adquirieron de *Sigma-Aldrich Chemical Co.* (St Louis, Missouri, EE.UU.). El péptido  $H_2N-Lys^1Lys^3(DOTA)-Bombesina(1-14)$  [Bombesina] con una pureza > 90 % (HPLC), se obtuvo de *piChem Laboratory* (Graz, Austria). El agente quelante bifuncional S-2- (4-isotiocianatobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano tetraacético (p-SCN-Bn-DOTA) [DOTA] se obtuvo de *Macrocyclics* (Dallas, TX, USA). Se adquirieron también otros productos químicos de *Sigma-Aldrich Chemical Co.* y se usaron sin purificación adicional.

## 6.4 Procedimientos

### 6.4.1 Conjugación de macrociclo DOTA con el Dendrímero

Se secaron a vacío cincuenta microlitros de dendrímero (0,3  $\mu$ mol) en metanol y se volvieron a disolver en 0,5ml de tampón de bicarbonato sódico 0,2M, pH9,5. La solución anterior luego se incubó con DOTA (5,38  $\mu$ mol, 3,7mg en 0,5ml de tampón de bicarbonato de sodio 0,2M, pH9,5)

a 37°C durante 1h (relación molar DOTA / dendrímero de 18/1). La mezcla de reacción final se lavó tres veces con agua de tipo I mediante filtración para eliminar el tampón de bicarbonato (*Ultrafree-PFL Filters*, MWCO 10.000Da, membrana de polisulfona, *Millipore*) y finalmente se liofilizó.

#### 6.4.2 Activación de grupos carboxilato del ácido fólico y bombesina

Se disolvieron ácido fólico (2,27 $\mu$ mol, 1mg) y bombesina (0,55 $\mu$ mol, 1,1mg) en 200 $\mu$ l de dimetilformamida (DMF) y se añadieron a una mezcla que contenía 100 $\mu$ l de diisopropiletilamina 0,2M (DIPEA, para proporcionar un medio básico) (114,83 $\mu$ mol, 14,84mg en 300 $\mu$ L de DMF) y 100 $\mu$ l del agente activador de carboxilato HATU (1- [bis (dimetilamino) metileno] - 1 H -1,2,3-triazolo [4,5- b ] piridinio 3-óxido, N - [(dimetilamino) -1 H - 1,2,3 - triazolo [4,5- b ] piridin 1-ilmetileno] - N metilmetanamino hexafluorofosfato de N -óxido) (15,78 $\mu$ mol, 6mg en 100 $\mu$ l de DMF) La mezcla de reacción se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente (20°C).

#### 6.4.3 Conjugación de bombesina y ácido fólico a los grupos amina del dendrímero

El DOTA-dendrímero liofilizado (0,35 $\mu$ mol) se disolvió en 100 $\mu$ l de DMF y se añadió a la solución de carboxilato-Folato-Bombesina activada anteriormente. La mezcla se incubó durante 1,5h a temperatura ambiente. El precipitado obtenido se lavó con DMF y se secó al vacío. La relación molar de dendrímero a folato fue 1 : 6,5 y 1 : 1,5 para dendrímero a bombesina.

#### 6.4.4 Síntesis de DenAuNP-Folato-Bombesina

A una solución acuosa de Den-Folato-Bombesina (1,4mg/ml, 0,1 $\mu$ mol) de HAuCl<sub>4</sub> al 1% (170 $\mu$ l, 5 $\mu$ mol) se añadió bajo agitación vigorosa. Después de 60min, se agregaron 0,56ml de una solución

de  $\text{NaBH}_4$  enfriada en hielo ( $1\text{mg/ml}$ ,  $15\mu\text{mol}$ ) a la mezcla de dendrímero oro bajo agitación. En pocos segundos, la mezcla de reacción se volvió rojo intenso y el proceso de agitación se continuó durante  $2\text{h}$  para completar la reacción. El producto final se purificó por ultrafiltración (*Ultrafree-PFL Filters*, MWCO  $10.000\text{Da}$ , membrana de polisulfona, *Millipore*), y finalmente se liofilizó para obtener DenAuNP-Folate-Bombesina. Para efectos comparativos, el compuesto DenAuNP se preparó también bajo el mismo procedimiento.

#### 6.4.5 Métodos y técnicas de caracterización

En esta sección se pretende introducir a cada una de las técnicas de caracterización de la materia prima y los sistemas sintetizados en este trabajo de tesis. No se pretende proporcionar una revisión completa de cada una de estas técnicas, ya que esto puede resultar tan complejo como se desee, además existe amplia literatura publicada que abarca desde enfoques clásicos hasta teorías cuánticas. Más bien, se expondrá la importancia de cada una de estas técnicas para caracterizar y demostrar las propiedades los sistema nanométricos sintetizados.

#### ESPECTROSCOPIA IR-TF

Todas las técnicas de espectroscopia se fundamentan en la absorción y emisión de energía electromagnética. Las interacciones de la radiación electromagnéticas con la materia provocan absorción o emisión, la absorción de energía por la materia provoca movimiento de electrones entre niveles cuánticos o discretos, vibración de enlaces, rotaciones moleculares y transición de electrones entre orbitales atómicos y moleculares, etc. Todas estas perturbaciones dan lugar a nuevas señales electromagnéticas que proporcionan información de composición y estructura del compuesto analizado.

La región infrarroja se refiere a la parte del espectro electromagnético comprendida entre el visible y la región de microondas. Se encuentra entre  $12800 - 10\text{cm}^{-1}$ . Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de los aparatos se puede dividir en tres zonas: IR cercano (NIR):  $12800 - 4000\text{cm}^{-1}$ , IR medio:  $4000 - 400\text{cm}^{-1}$ ; IR lejano:  $400 - 10\text{cm}^{-1}$ , siendo en el IR medio donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas.

La absorción de la radiación IR al interactuar con la materia provoca pequeñas alteraciones en los distintos estados vibracionales y rotacionales en las moléculas. Estas perturbaciones pueden ser detectadas y medidas en el espectro IR, y dado que las moléculas están constituidas por átomos distintos, o tienen distinta distribución isotópica, o configuración, o se encuentran en ambientes distintos, los espectros infrarrojos serán distintos, de tal modo que una sustancia definida puede identificarse por su espectro infrarrojo. Estos espectros pueden ser considerados como las huellas digitales de dicha sustancia. Un espectro IR muestran bandas que son típicas de grupos funcionales particulares y que tienen localizaciones e intensidades específicas dentro de los espectros infrarrojos de tal modo que es posible inferir estructuras moleculares o conocer la formación de nuevas estructura en una reacción química.

Existen dos tipos básicos de vibraciones moleculares: tensión y flexión; las vibraciones de tensión y compresión pueden aproximarse por la ley de Hooke. La frecuencia exacta a la que ocurre una vibración, es función de la fuerza de los enlaces en cuestión y la masa de los átomos. En una aproximación simple de dos átomos el enlace ente ellos se trata como un oscilador armónico simple compuesto por dos masas y un resorte donde la frecuencia de la vibración está dada por la siguiente ecuación:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (6.1)$$

donde  $k$  es la constante del resorte,  $m$  es la masa.

En el modelo clásico de oscilador armónico  $E = 1/2kx^2 = h\nu$ , donde  $x$  es el desplazamiento del resorte. Esta energía depende del estiramiento o compresión del resorte. Si este modelo fuera cierto, una molécula podría absorber la energía de cualquier longitud de onda. Sin embargo, el movimiento de vibración de una molécula está cuantizado: se deben seguir las reglas de la mecánica cuántica y las transiciones en estados vibracionales sólo son los permitidos por la siguiente ecuación:

$$E = (n + 1/2)h\nu \quad (6.2)$$

donde  $\nu$  es la frecuencia de vibración,  $n$  es el número cuántico (0, 1, 2, 3,...). El nivel más bajo de energía es  $E_0 = 1/2h\nu$  y el siguiente  $E_1 = 3/2h\nu$  y así sucesivamente aunque no siempre en forma gradual, es decir, es posible alcanzar un estado de mayor energía sin pasar por estados intermedios. Estos estados corresponden a las bandas denominadas armónicos en un espectro de IR y son de menor intensidad de las bandas de vibración fundamentales.

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier emplea un arreglo óptico (interferómetro), con el cual se puede construir un perfil espectral a partir de la medida de la intensidad en función del tiempo que contiene la información de la radiación absorbida y emitida por la muestra para todas las frecuencias del haz inicial, la decodificación del interferograma se realiza a través de la transformadas de Fourier lo cual aumenta dramáticamente la calidad de los espectros infrarrojos y minimiza el tiempo para adquirir la información.

### **Metodología Espectroscopia IR-TF**

Se obtuvieron espectros IR de dendrímero, folato, Lys<sup>1</sup>Lys<sup>3</sup> (DOTA) Bombesin (1-14), p-SCN-Bn-DOTA, Den-Folato-Bombesina y Den (AuNP) -Folato-Bombesina, en estado sólido, en un sistema Espectrómetro Perkin Elmer (*Spectrum 400*) (Waltham, MA, EE.UU.) con una plataforma de reflexión total atenuada (*Diamond GLADIATOR*, Pike Technologies, Madison, WI, EE.UU.), de 500 a 4000 $cm^{-1}$ .



## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

El Microscopio Electrónico de Transmisión utiliza un haz de electrones acelerados al aplicar un potencial negativo de  $100kV - 1000kV$ . Este haz es conducido a través de una columna a vacío de entre  $10^{-7} - 10^{-17}$  bares, es decir, por debajo de una millonésima parte de la presión atmosférica. Los electrones se dirigen gracias a lentes electromagnéticas, hasta atravesar una muestra delgada, transparente a los electrones. En este proceso, el haz es desviado en función de la densidad electrónica de las distintas estructuras de la muestra. La interacción de los electrones incidentes con la muestra produce una serie de radiaciones secundarias: electrones secundarios, electrones retrodispersados, electrones transmitidos, radiación X, electrones Auger, cátodo luminiscencia y energía absorbida (por la muestra). La utilización de una u otra permite obtener distintas informaciones. Después de pasar a través de la muestra los electrones transmitidos son recogidos y focalizados por la lente objetivo dentro de una imagen intermedia ampliada. La imagen es ampliada aún más gracias a las lentes proyectoras, las cuales controlan la ampliación de la imagen en la pantalla fluorescente. La imagen final se proyecta sobre una pantalla fluorescente o una película fotográfica que proporciona información estructural del compuesto.

### Metodología TEM

Las imágenes de TEM de los compuestos se realizaron utilizando un equipo JEOL-EMDSC-U10A (JEOL, *Japan*) a un potencial de 200 kV. Las muestras de cada compuesto (DenAuNP o DenAuNP-Folato-Bombesina) se analizaron con y sin recubrimiento de oro. Las muestras se depositaron en sobre una rejilla de cobre revestida con carbono y se dejaron evaporar bajo vacío antes de las mediciones. Algunas muestras de ambos compuestos se tiñeron con una solución acuosa de ácido fosfotúngstico ( $2\%w/w$ ) y se secaron antes de la toma de imágenes.

DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ *Dynamic Light Scattering* (DLS) Y POTENCIAL ZETA

Las mediciones del DLS y Zeta potencial se realizaron utilizando un equipo *Nanotracs Wave* (Modelo MN401, *Microtract*, FL, EE.UU.). La temperatura en la celda porta muestra se ajustó a 22,6°C. Los datos se obtuvieron a partir de muestras DenAuNP y DenAuNP-Folate-Bombesin diluidas en agua MilliQ ( $n = 3$ ). Se obtuvieron el diámetro hidrodinámico y el potencial Zeta para cada muestra.

## ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS

La espectroscopia Ultravioleta-Visible utiliza radiación electromagnética en las longitudes de onda comprendidas entre los 100 a los 800nm donde el efecto es producir transiciones electrónicas entre los orbitales atómicos o moleculares de las sustancias que se analizan. La interacción de la radiación electromagnética con el sistema causa transiciones electrónicas de estados fundamentales a estados excitados. La energía de una transición está relacionada con la longitud de onda a través de la ecuación de Planck

$$E = h\nu \quad (6.3)$$

El general en los espectros Uv-vis se observan las señales a las transiciones electrónicas de los estados excitados a los estados fundamentales. Los átomos dan líneas agudas, mientras las moléculas poliatómicas dan un conjunto denominado bandas. Para una sustancia determinada la longitud de onda a la cual se produce un máximo de absorbancia en el espectro se le conoce como  $\lambda_{max}$ . Cuando la radiación electromagnética interacciona con la materia, pueden ocurrir varios procesos como reflexión, dispersión, absorbancia, fluorescencia/fosforescencia (absorción y reemisión) o una reacción fotoquímica (absorbancia y rotura de enlaces). En general, cuando se miden espectros UV-visible, sólo es deseable que ocurra absorbancia. Como la luz es una forma de energía, la absorción de la luz por la materia causa que aumente el contenido de energía de las moléculas (o átomos). La

energía potencial total de una molécula, generalmente se representa como la suma de sus energías electrónica, vibracional y rotacional [84].

$$E_{total} = E_{electronica} + E_{vibracional} + E_{rotacional}$$

La cantidad de energía que una molécula posee en cada forma no es un continuo, sino una serie de niveles o estados discretos o en términos de la constante de Planck. La diferencias de energía entre los diferentes estados siguen el orden:

$$E_{electronica} > E_{vibracional} > E_{rotacional}$$

En algunas moléculas y átomos, los fotones de luz UV y visible tienen suficiente energía para causar transiciones entre los diferentes niveles. La longitud de onda de la luz absorbida es aquella que tiene la energía requerida para mover un electrón desde un nivel de energía inferior a uno superior.

Cuando los fotones inciden sobre los átomos estas transiciones resultan en un espectro de bandas de absorbancia muy estrechas, a longitudes de onda características de la diferencia entre los niveles de energía de las especies absorbentes. Esto es cierto para los átomos, sin embargo en las moléculas, los niveles de energía vibracional y rotacional están superpuestos sobre los niveles de energía electrónica, Como pueden ocurrir muchas transiciones con diferentes energías, las bandas se ensanchan [84].

En general la espectroscopía UV-visible puede utilizarse para determinar muchas características físico-químicas de los compuestos y, por tanto, puede proporcionar información como la identidad del compuesto.

### **Metodología UV-vis**

El espectro de UV-vis para la caracterizar la materia prima y los compuestos se obtuvieron en el rango de 200 – 700nm con el espectrómetro Perkin-Elmer Lambda-Bio (Waltham, MA, USA)

utilizando una celda de cuarzo de  $1\text{cm}$ .

## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) Y ANÁLISIS DE RAYOS X

El microscopio electrónico de barrido, conocido por sus siglas inglesas SEM *Scanning Electron Microscope*, utiliza electrones para formar una imagen. El equipo cuenta con un dispositivo (filamento) que genera un haz de electrones para iluminar la muestra y con diferentes detectores se recogen después los electrones generados de la interacción con la superficie de la misma para crear una imagen que refleja las características superficiales de la misma, pudiendo proporcionar información de las formas, texturas y composición química.

### Metodología SEM

El compuesto multifuncional DenAuNP-Folato-Bombesin se visualizó por microscopía electrónica de barrido (SEM). La muestra se montó en un soporte de aluminio con cinta adhesiva doble cara. La muestra revestida se examinó utilizando una tensión de aceleración de electrones de  $20 - 25\text{keV}$  (JEOL JSM-5900 *Low Vacuum*, EE.UU.). El análisis por rayos X se obtuvo a partir de un área seleccionada de la muestra.

## ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Los espectros de fluorescencia de emisión de la materia prima, Dendrímero, DOTA, Ácido fólico, Bombesina y de los compuestos DenAuNP-Folate-Bombesin, Den-Folate-Bombesin en estado sólido (polvo) se leyeron a  $291\text{K}$  en un espectrómetro de luminescencia de baja resolución *Perkin-Elmer* LS-55 de  $200$  a  $900\text{nm}$ . Los mejores resultados se obtuvieron usando una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) de  $222\text{nm}$ , filtro de emisión de  $290\text{nm}$  y ranuras de excitación y emisión (*slits*) de  $5\text{nm}$  para los tres compuestos.

#### 6.4.6 Preparación de $^{177}\text{Lu-DenAuNP-Folato-Bombesina}$

El radiomarcado se llevó a cabo añadiendo una solución de  $^{177}\text{LuCl}_3$  ( $20\mu\text{l}$ ,  $1,1\text{GBq}$ ,  $3\text{TBq/mg}$ , ITG, *Germany*) al conjugado DenAuNP-Folato-Bombesina ( $15\mu\text{g}$  en una solución de  $200\mu\text{l}$  de tampón acetato  $0,25\text{M}$ ,  $\text{pH}5,5$ ) e incubando a  $37,5^\circ\text{C}$  durante  $20\text{min}$ . La pureza radioquímica se determinó utilizando un sistema de exclusión de tamaños radio-HPLC (*ProteinPak 300SW*, Waters,  $1\text{mL/min}$ ,  $\text{NaHCO}_3$   $0,2\text{M}$ ,  $\text{pH}9,5$ ). Los perfiles cromatográficos se obtuvieron utilizando dos detectores diferentes, un detector UV-Vis y un detector radiométrico. La muestra primero pasó a través del detector UV-Vis (*photodiode array*) y después de  $0,5\text{min}$  ( $0,5\text{mL}$ ,  $1\text{mL/min}$ ), pasó a través del detector de radiactividad. Los tiempos de retención en este sistema fueron  $t_R = 7,80$  y  $8,31\text{min}$  en el cromatograma y el radio-cromatograma, respectivamente. La correspondencia en los tiempos de retención de los picos de interés en el cromatograma se acepta comúnmente como una prueba de la identidad química del producto radiofarmacéutico. Para estudios comparativos, también se preparó la  $^{177}\text{Lu-Folato-Bombesina}$ , tal como se reportó previamente por Aranda et al.[85].

#### 6.4.7 Estabilidad en suero humano

Una de las características que debe poseer un radiofármaco es que se mantenga estable químicamente en las condiciones fisiológicas dentro del organismo. Para determinar la estabilidad de  $^{177}\text{Lu-DenAuNP-Folato-Bombesina}$  en suero, se diluyeron  $200\mu\text{l}$  de radiotrazador en una proporción de  $1 : 10$  con suero humano fresco y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$ . La estabilidad radioquímica se determinó con una muestra de  $100\mu\text{l}$  tomada a las  $24\text{h}$  para análisis de exclusión de tamaño de radio-HPLC (*ProteinPak 300SW*, Waters,  $1\text{mL/min}$ , PBS *phosphate buffered saline*).

#### 6.4.8 Cultivos celulares

La línea celular de cáncer de mama T47D se obtuvo originalmente de la *American Type Culture Collection* (Atlanta, GA, EE.UU.). Las células se cultivaron rutinariamente a  $37^{\circ}\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  y 85% de humedad en el medio RPMI *Roswell Park Memorial Institute* (*Sigma-Aldrich Co.*) suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos (penicilina  $100\text{U}/\text{mL}$  y estreptomina  $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Estas células se seleccionaron ya demuestran una captación importante de  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folato-Bombesina.

#### 6.4.9 Estudios de Captación en células T47D

Se suspendieron células T47D en medio fresco y se diluyeron con PBS para obtener una densidad de  $1 \times 10^6$  células / tubo, se incubaron con  $20\mu\text{l}$  ( $0,9\text{MBq}$ ) de  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesina o  $^{177}\text{Lu}$ -Folato-Bombesina por triplicado a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 h. Los tubos de ensayo se centrifugaron a  $2500\text{rpm}$  durante  $5\text{min}$  y se lavaron con solución buffer de fosfatos. La radioactividad en el sedimento *pellet* de células representa tanto radiofármaco unido a membrana como el internalizado, el *pellet* se midió en un detector de tipo pozo con detector de cristal centelleo (Auto In-v-tron 4010, NML, Inc.). Se eliminó la actividad unida a la membrana con  $1\text{mL}$  de solución de ácido acético  $0,2\text{M}$  /  $\text{NaCl}$   $0,5\text{M}$  añadida al sedimento celular. Los tubos de ensayo se centrifugaron y se midió la actividad de los *pellets*, que se consideró como internalización al núcleo. Los estudios de bloqueo se llevaron a cabo en paralelo. Las células se preincubaron con  $50\mu\text{L}$  de ácido fólico en  $\text{NaOH}$   $0,01\text{M}$  ( $0,5\text{mM}$ ) o  $50\mu\text{L}$  de  $\text{Lys}^3$ -Bombesina ( $0,5\text{mM}$ ) durante 30 minutos antes de la adición del radiofármaco.

#### 6.4.10 Modelo animal

Los estudios *in vivo* en ratones se llevaron a cabo de acuerdo a las reglas y regulaciones de la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999. Se emplearon ratones atómicos, de 6-7 semanas de edad y de 18-20g de peso, se mantuvieron en jaulas estériles con camas viruta de madera, a temperatura constante, humedad, ruido y período de luz de 12 : 12h. Los ratones atómicos se mantuvieron con una dieta libre de folato durante 3 semanas antes de los estudios de imagen para una mejor captación del radiofármaco.

#### 6.4.11 Inducción tumoral

Se inocularon ratones atómicos hembra (6-7 semanas de edad) por vía subcutánea en la parte superior de la espalda con  $2 \times 10^6$  células de cáncer T47D suspendidas en 0,1 ml de PBS. Se observaron sitios de inyección a intervalos regulares para la formación y progresión del tumor.

#### 6.4.12 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) en Células

Los análisis por TEM en células se realizaron con el fin de corroborar la internalización de DenAuNP-Folate-Bombesin en células T47D. Las células ( $5 \times 10^5$ ) se sembraron en placas de 6 pozos (*Cyto-One*, USA *Scientific*) durante 24h para permitir su adherencia en los pozos. Se añadió DenAuNP-Folato-Bombesina a las células en cada pozo seguido de 1h de incubación a 37°C. Las células se lavaron tres veces con PBS para remover el remanente del compuesto que no se internalizó, se centrifugaron hasta obtener una pequeña pastillas *Pellet* y se fijaron con glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 2% (PFA) en tampón de cacodilato sódico (0,1M). Las células se fijaron adicionalmente con tetraóxido de osmio al 1% en 5mM-2-mercaptoetanol (tampón fosfato-mercaptoetanol), se deshidrataron en series de acetona graduadas y se embebieron

en resina epoxídica *Epon-Spurr*. Las secciones se cortaron a  $85nm$  usando un cuchillo de diamante (*Diatome, Hatfield PA*). Las secciones se tiñeron con tinción triple de Sato y acetato de uranilo acuoso al 5% para la visualización de organelos. Las muestras preparadas se examinaron en un microscopio TEM JEOL 1400 (JEOL, *Peabody, MA*) operando a un potencial de  $80kV$ .

#### 6.4.13 Fluorescencia de DenAuNP-Folate-Bombesin dentro de las células

Se cultivaron células T47D ( $2 \times 10^3$ ) sobre cubreobjetos de vidrio en las condiciones rutinarias antes descritas, posteriormente se quitó el medio de cultivo y se puso PBS y se agregaron los tratamientos con Dendrímero (Den), Dendrímero-AuNP (DenAuNP) y DenAuNP-Folato-Bombesina, se incubaron  $1h$ , se removió el PBS con los compuestos, se lavaron con PBS enfriado con hielo, se fijaron en acetona y se lavaron dos veces con PBS. Después de la adición de  $250 \mu l$  ( $1\mu g/ml$ ) de Hoechst (tinción de ADN), las células se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y se enjuagaron con PBS antes de agregar el medio de montaje sobre placas (*ProLong Gold, Molecular Probes, Invitrogen Life Technologies, CA, USA.*). DenAuNP-Folato-Bombesina-Célula. Las imágenes de los AuNPs fluorescentes de DenAuNP-Cell y DenAuNP-Folato-Bombesina-Cel se tomaron usando un microscopio epifluorescente (*MeijiTechno MT6200, Saitama, Japan*). El Hoechst dentro de los núcleos se visualizó con un filtro de excitación de  $330 - 385nm$  y utilizando un filtro de emisión de  $420nm$ . Los AuNPs se observaron utilizando un filtro de excitación de  $530 - 550nm$  y un filtro de emisión de  $590nm$ .

#### 6.4.14 Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)

Esta técnica se desarrolló a mediados de la década de 1960 por Dr. Siegbahn y su grupo de investigación y en 1981, el Dr. Siegbahn fue galardonado con el Premio Nobel de Física.

La técnica XPS se basa en el análisis de la energía de los electrones que emite un sólido cuando



es irradiado con rayos X monocromáticos. A partir de este espectro se puede obtener información acerca de la composición de la muestra a analizar [86].

El fundamento teórico de la espectroscopia está basado en el efecto fotoeléctrico descrito por Einstein en 1905 y resumido por la siguiente ecuación:

$$h\nu = E_b + E_{kin} \quad (6.4)$$

donde  $h\nu$  es la energía del fotón,  $\nu$  la frecuencia y  $h$  la constante de Planck,  $E_b$  es la energía de amarre del electrón en el material y  $E_{kin}$  es la energía cinética del electrón expulsado. Para que un electrón escape del material debe sobrepasar la energía de amarre. Para los gases, la energía de amarre de un electrón es igual a su energía de ionización. En cambio, en los sólidos existe una influencia por parte de la superficie, y una energía adicional es necesaria para remover un electrón de la misma. Esta energía extra es denominada función de trabajo  $\varphi$  la cual es debida a la diferencia entre el nivel de vacío  $E_v$  y el nivel de energía de Fermi  $E_f$  [87].

Por lo que la relación anterior puede escribirse de la siguiente manera:

$$E_b = h\nu - E_{kin} - \varphi \quad (6.5)$$

La técnica XPS mide la energía cinética de los electrones que logran escapar del material donde cada energía será característica de una especie atómica que se encuentre en la muestra. El número de electrones libres se grafica contra la energía de amarre  $E_b$ . Los electrones de valencia dan información de los enlaces químicos y los internos proporcionan información sobre cambios químicos. Cualquier cambio en el ambiente químico de un átomo recae en las energías de enlace de los electrones internos y se pueden ver como desplazamientos en las líneas espectrales en XPS. Por lo tanto esta técnica proporciona información química y molecular del material analizado.

## Metodología XPS

Los espectros de fotoelectrones de rayos X se adquirieron en un espectrómetro Thermo K-Alpha equipado con una fuente de rayos X  $AlK_{\alpha}$  (1486,68eV). La fuente se calibró usando  $Au 4f_{7/2}$  (84,0eV) y  $Ag 3d_{5/2}$  (368,2eV) a partir de muestras laminadas. Se utilizó un haz de argón para compensar la carga en las muestras. Las muestras de DenAuNP-Folato-Bombesina y DenAuNP-Folato-Bombesina-Célula se introdujeron en una cámara de ultra alto vacío (UHV) del espectrómetro ( $1 \times 10^{-7}$  -  $1 \times 10^{-8} Pa$ ) y se midieron a 297K. El tamaño del punto en el haz fue de  $200\mu m$ . Se realizaron 20 exploraciones para  $Au4f$  con un tamaño de paso en energía de 0,03eV. Los espectros generales *survey spectra* se midieron en el intervalo de 0 a 1320 eV para las muestras DenAuNP-Folate-Bombesin y DenAuNP-Folato-Bombesin-Célula. Las energías de amarre se referenciaron al pico C1s a 285eV. Se aplicó la corrección *Shirley background* a todos los espectros. El espectro de alta resolución se obtuvo para las bandas  $Au4f$ , C1s y O1s. El espectro  $Au4f$  se analizó estadísticamente utilizando el software *Origin 8.1*. El mejor ajuste se logró para cuatro picos con un modelo multipico y la función gaussiana con un factor de correlación  $R^2 = 0,987$  (DenAuNP-Folate-Bombesina) y para seis picos y la función Lorentziana Con  $R^2 = 0,994$  para la (DenAuNP-Folato-Bombesina-célula).

#### 6.4.15 Análisis por espectroscopía de fluorescencia del

##### DenAuNP-Folate-Bombesin dentro de las células

Los espectros de fluorescencia de emisión de los compuestos a) DenAuNP-Folate-Bombesin-Célula b) células T47D + *Hoechst Stain solution* y c) muestras de células T47D se midieron a 291K en un espectrómetro de luminiscencia de baja resolución *Perkin – Elmer LS-55*, De 200 a 900nm. Todas las muestras fueron excitadas con longitudes de onda en la región UV a la región del visible con el fin de distinguir entre las bandas de emisión de DenAuNP-Folate-Bombesin-Célula, las de las células y las que se tiñeron con *Hoechst Stain solution*, e identificar bandas de dispersión Raleigh y

Raman de las longitudes de onda de excitación utilizadas que aparecen como bandas de armónicos en la región Visible para las bandas de emisión en la región UV. Los mejores resultados para las tres muestras se obtuvieron usando longitudes de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) de 222, 270, 300 y 510nm; Con filtro de emisión de 290, 390, 430 y 515nm, y ranuras *slit* de excitación y emisión de 5nm y una velocidad de paso de 50nm/min. Para confirmar algunas bandas de emisión se empleo también ranura de excitación de 7nm y una ranura de emisión de 10nm. Los parámetros de origen fueron: Tiempo de retardo= 10ms, Intervalo de sincronización = 20ms, Tiempo de ciclo= 33ms, tiempo de destello= 3ms.

#### **6.4.16 Evaluación del potencial Fototérmico plasmónico del DenAuNP-Folate-Bombesin en células T47D**

Se sembraron células T47D en una placa de 96 pozos con una densidad de  $5 \times 10^3$  células / pozo. y se incubaron por durante 24 bajo la metodología rutinaria antes descrita. A continuación, se retiró el medio de cultivo y se remplazo por PBS, se colocó la placa de pozos en un calentador de bloque seco a 37°C y administraron los siguientes tratamientos:

- 100 $\mu$ L de Den-Folato-Bombesina Y 100 $\mu$ L de PBS, pH7 con irradiación de (1,19W/cm<sup>2</sup>).
- 100 $\mu$ L de DenAuNP-Folato-Bombesina y 100 $\mu$ L de PBS pH7 con irradiación (1,19W/cm<sup>2</sup>).
- 100 $\mu$ L de PBS pH7 con irradiación (1,19W/cm<sup>2</sup>).
- 100 $\mu$ L de agua destilada (sin nanopartículas).
- Sin tratamiento solo PBS.

La irradiación con láser en todos los experimentos se realizó utilizando un láser compacto pulsado Nd: YAG (*Q-Smart 100, Quantel laser*) pulsos de 5ns a 532nm (energía= 50mJ/pulso) con una

frecuencia de repetición de  $10Hz$ . La potencia láser por pulso se midió utilizando un medidor de potencia / contador de pulsos de doble canal (*Molelectron EPM 2000, Coherent*). Se utilizó una lente divergente en la trayectoria del haz láser de tal manera que la placa de pozo fue completamente cubierta por el haz dando un tamaño de *spot* (diámetro=  $7mm$ , área=  $0,38cm^2$ ). La irradiancia en la placa de pozo se calculó como la potencia del láser por pulso dividido por el área del *spot*. La irradiación se realizó durante 6 min a  $1,19W/cm^2$  de irradiancia promedio.

Durante la irradiación, se midió el incremento de temperatura con un termopar tipo K (modelo TPK-01) de reacción inmediata calibrado previamente (diámetro de la sonda=  $0,8mm$ ). El termopar se introdujo en el pozo sin interferir con el proceso, la temperatura se registró cada segundo por medio de un convertidor digital (MAX6675, *Maxim Integrated TM*) conectado a una placa con un microcontrolador (Arduino Uno) con conexión USB a una Laptop. Después de la irradiación, se retiró la solución de cada pozo y se reemplazó con medio de cultivo fresco.

La viabilidad celular en cada pozo tratado se evaluó por espectrofotométrica mediante el ensayo (XTT *Cell Proliferation Assay*). Es ensayo se basa en la escisión de la sal de tetrazolio XTT en presencia de un reactivo de acoplamiento de electrones, produciendo una sal de formazan soluble. como una función de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial, para producir cristales anaranjados de formazan que se disuelven en isopropanol acidificado (*kit XTT, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany*). Se midió la absorbancia resultante de la solución se a  $480nm$  en un lector de absorbancia de microplacas (Epoch<sup>TM</sup>, BioTek, VT, USA). La absorbancia de las células no tratadas se consideró como 100% de la viabilidad celular.

## 6.5 Variables de estudio

### 6.5.0 Independientes

- Nanoconjugado (DOTA-Folato-DENPs-*Lys*<sup>3</sup>-Bombesina-AuNP)

### 6.5.0 Dependientes

- Dosis de radiación.
- Efecto terapéutico.
- Generación de imágenes moleculares.

### 6.5.0 Intervinientes

- Pureza radioquímica.
- Proliferación celular.
- Captación.
- Retención.
- Afinidad a los receptores.
- Estabilidad *in vivo* del nanoconjugado.
- Eliminación del nanoconjugado

Tabla 6.1: Variables

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis Estadísticos
Radiofármaco (Lu-DOTA-Folato-DENPs- $^{67}\text{Lu}$ -bombesina-AuNP)	Toda aquella sustancia que contiene un átomo radiactivo en su estructura y que por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación puede ser administrada en humanos para fines de diagnóstico y terapia	HPLC, ITLC, Ultrafiltración	Cuantitativa	Razón=Rf/total	ANOVA
Dosis absorbida en tumor	Es la energía deposita en una región blanco con masa conocida.	Metodología MIRD	Cuantitativa	Gy	Distribución Normal
Dosis absorbida en ratón	Es la energía deposita en una región blanco con masa conocida	Metodología MIRD	Cuantitativa	Gy	Distribución Normal

## 6.6 Implicaciones Bioéticas

El estudio se llevó a cabo bajo la norma NOM-012-STPS-1999 para condiciones de seguridad e higiene en centros de trabajo donde se produzcan, usen, almacenen o transporten fuentes de radiación, la norma NOM-004-NUCL-1994 de clasificación de desechos radiactivos y norma NOM-36-NUCL-2001 de requerimientos para instalaciones de tratamiento y acondicionamiento de desechos radiactivos.

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

Los desechos biológicos tanto de animales como de las células de cáncer, se manejaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana de Bioseguridad NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

## 6.7 Recolección de Datos

En estudios de Biodistribución y producción de calor la recolección de datos se realizó de forma directa. La dosimetría tanto celular como en ratones se realizó mediante una aproximación teórica.

## 6.8 Análisis Estadístico

Para los estudios de pureza radioquímica del nanoconjugado (DOTA-Folato-DENPs-*Lys*<sup>3</sup>-Bombesina-AuNP) se aplicó un diseño factorial de niveles mixtos para su análisis por ANOVA.

Para el cálculo de la dosis absorbida tanto celular como en ratones atómicos, se utilizara un análisis estadístico de distribución normal.

La comparación entre grupos control y grupos con tratamiento se utilizó un análisis estadístico por T student's.

## Capítulo 7

# Resultados

### 7.1 Primer Artículo



## Research Article

# <sup>177</sup>Lu-Dendrimer Conjugated to Folate and Bombesin with Gold Nanoparticles in the Dendritic Cavity: A Potential Theranostic Radiopharmaceutical

Héctor Mendoza-Nava,<sup>1,2</sup> Guillermina Ferro-Flores,<sup>1</sup> Flor de María Ramírez,<sup>1</sup>  
Blanca Ocampo-García,<sup>1</sup> Clara Santos-Cuevas,<sup>1</sup>  
Liliana Aranda-Lara,<sup>1,2</sup> Erika Azorín-Vega,<sup>1</sup> Enrique Morales-Avila,<sup>2</sup> and Keila Isaac-Olivé<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), 52750 Ocoyoacac, MEX, Mexico

<sup>2</sup>Universidad Autónoma del Estado de México, 50180 Toluca, MEX, Mexico

Correspondence should be addressed to Guillermina Ferro-Flores; [ferro\\_flores@yahoo.com.mx](mailto:ferro_flores@yahoo.com.mx)

Received 15 April 2016; Revised 28 June 2016; Accepted 29 June 2016

Academic Editor: Piersandro Pallavicini

Copyright © 2016 Héctor Mendoza-Nava et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<sup>177</sup>Lu-labeled nanoparticles conjugated to biomolecules have been proposed as a new class of theranostic radiopharmaceuticals. The aim of this research was to synthesize <sup>177</sup>Lu-dendrimer(PAMAM-G4)-folate-bombesin with gold nanoparticles (AuNPs) in the dendritic cavity and to evaluate the radiopharmaceutical potential for targeted radiotherapy and the simultaneous detection of folate receptors (FRs) and gastrin-releasing peptide receptors (GRPRs) overexpressed in breast cancer cells. p-SCN-Benzyl-DOTA was conjugated in aqueous-basic medium to the dendrimer. The carboxylate groups of Lys<sup>1</sup>Lys<sup>3</sup>(DOTA)-bombesin and folic acid were activated with HATU and also conjugated to the dendrimer. The conjugate was mixed with 1% H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> followed by the addition of NaBH<sub>4</sub> and purified by ultrafiltration. Elemental analysis (EDS), particle size distribution (DLS), TEM analysis, UV-Vis, and infrared and fluorescence spectroscopies were performed. The conjugate was radiolabeled using <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> or <sup>68</sup>GaCl<sub>3</sub> and analyzed by radio-HPLC. Studies confirmed the dendrimer functionalization with high radiochemical purity (>95%). Fluorescence results demonstrated that the presence of AuNPs in the dendritic cavity confers useful photophysical properties to the radiopharmaceutical for optical imaging. Preliminary binding studies in T47D breast cancer cells showed a specific cell uptake (41.15 ± 2.72%). <sup>177</sup>Lu-dendrimer(AuNP)-folate-bombesin may be useful as an optical and nuclear imaging agent for breast tumors overexpressing GRPR and FRs, as well as for targeted radiotherapy.

## 1. Introduction

Dendrimers are hyperbranched polymeric structures varying in their initiator core, repeating units, terminal functionality, charge, and solubility profile. A drug can be entrapped either within the internal cavities or conjugated to peripheral functional groups of the dendrimer. Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers are spherical macromolecules composed of repeating polyamidoamine units which are known to have low biological toxicity, good biocompatibility, and in vivo stability [1, 2].

Gold nanoparticles (AuNPs) conjugated to peptides or biomolecules with target-specific recognition produce stable

multimeric systems with target-specific molecular recognition. Plasmonic AuNPs can be fluorescent when they are prepared by thermal reduction procedures or when they are designed to absorb in the near infrared region; therefore, AuNPs can also function as optical imaging agents [3, 4].

Over the last two decades, several experimental evidences have suggested that the gastrin-releasing peptide (GRP) and other bombesin-like peptides act as growth factors in many types of cancer [5]. Overexpression of gastrin-releasing peptide receptors (GRPR) is present in 96% of breast cancer tissues [6]. Different bombesin analogues with high affinity for GRPR have been evaluated in preclinical studies for receptor-specific imaging and therapy [5]. Clinical studies

# **$^{177}\text{Lu}$ -dendrimer conjugated to folate and bombesin with gold nanoparticles in the dendritic cavity: A potential theranostic radiopharmaceutical**

Héctor Mendoza-Nava<sup>1,2</sup>, Guillermina Ferro-Flores<sup>1,\*</sup>, Flor de María Ramírez<sup>1</sup>, Blanca Ocampo García<sup>1</sup>, Clara Santos-Cuevas<sup>1</sup>, Liliana Aranda-Lara<sup>1,2</sup>, Erika Azorín-Vega<sup>1</sup> and Keila Isaac-Olivé<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), Ocoyoacac, 52750, Estado de México.

<sup>2</sup>Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50180, MEXICO.

\*Corresponding author:

Guillermina Ferro-Flores, Ph.D.

Departamento de Materiales Radiactivos,

Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

Carretera México-Toluca S/N. La Marquesa,

Ocoyoacac, Estado de México. C.P. 52750, México.

Tel. + (52) (55)-53297200 ext. 13871,

guillermina.ferro@inin.gob.mx

## **Abstract**

$^{177}\text{Lu}$ -labeled nanoparticles conjugated to biomolecules have been proposed as a new class of theranostic radiopharmaceuticals. The aim of this research was to synthesize  $^{177}\text{Lu}$ -Dendrimer(PAMAM-G4)-Folate-Bombesin with gold nanoparticles (AuNPs) in the dendritic cavity and to evaluate the radiopharmaceutical potential for targeted radiotherapy and the simultaneous detection of folate

receptors (FRs) and gastrin-releasing peptide receptors (GRPRs) over-expressed in breast cancer cells. p-SCN-Benzyl-DOTA was conjugated in aqueous-basic medium to the dendrimer. The carboxylate groups of Lys<sub>1</sub>Lys<sub>3</sub>(DOTA)-Bombesin and folic acid were activated with HATU and also conjugated to the dendrimer. The conjugate was mixed with 1% HAuCl<sub>4</sub> followed by the addition of NaBH<sub>4</sub> and purified by ultrafiltration. Elemental analysis (EDS), particle size distribution (DLS), TEM analysis, UV-Vis, infrared and fluorescence spectroscopies were performed. The conjugate was radiolabeled using <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> and analyzed by radio-HPLC. Studies confirmed the dendrimer functionalization with high radiochemical purity (> 90%). Fluorescence results demonstrated that the presence of AuNPs in the dendritic cavity confers useful photophysical properties to the radiopharmaceutical for optical imaging. Preliminary binding studies in T47D breast cancer cells showed a specific cell uptake ( $38.43 \pm 2.72\%$ ). <sup>177</sup>Lu-Dendrimer(AuNP)-Folate-Bombesin may be useful as an optical and nuclear imaging agent for breast tumors over-expressing GRPR and FRs, as well as for targeted radiotherapy.

### 7.1.1 Introduction

Dendrimers are hyperbranched polymeric structures varying in their initiator core, repeating units, terminal functionality, charge, and solubility profile. A drug can be entrapped either within the internal cavities or conjugated to peripheral functional groups of the dendrimer. Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers are spherical macromolecules composed of repeating polyamidoamine units which are known to have low biological toxicity, good biocompatibility and in vivo stability [1, 2]. Gold nanoparticles (AuNPs) conjugated to peptides or biomolecules with target-specific recognition produce stable multimeric systems with target-specific molecular recognition. Plasmonic AuNPs can be fluorescent when they are prepared by thermal reduction procedures or when they are designed to absorb in the near infrared region, therefore, AuNPs can also function as optical imaging agents [3,

4]. Over the last two decades, several experimental evidences have suggested that the gastrin-releasing peptide (GRP) and other bombesin-like peptides act as growth factors in many types of cancer[5]. Over-expression of gastrin-releasing peptide receptors (GRPR) is present in 96 % of breast cancer tissues [6]. Different bombesin analogues with high affinity for GRPR have been evaluated in preclinical studies for receptor-specific imaging and therapy [5]. Clinical studies in women using radio-bombesin derivatives have shown successful radionuclide imaging of breast tumors[7-10]. In particular, the GRPR is highly expressed in T47D human breast cells, and that is the reason why these cells have been used as tumor models to evaluate new bombesin probes [6, 11-13].

Folate receptor- $\alpha$  (FR $\alpha$ ) is a membrane-bound protein with high affinity for binding and transporting folate into cells. Folate is a basic component of cell metabolism and DNA synthesis and repair. Cancer cells, which rapidly divide, have an increased requirement for folate to maintain DNA synthesis, an observation supported by the widespread use of antifolates in cancer chemotherapy[14, 15]. The over-expression of FR $\alpha$  protein has been confirmed in all clinical breast cancer subtypes, comprised of estrogen receptor-positive (ER+), progesterone receptor-positive (PR+), human epidermal growth factor receptor-positive (HER2+), and triple negative (ER-, HER2, PR-) tumors[16-18]. Recent polymerase chain reaction studies confirmed that FR $\alpha$  is highly expressed in T47D cells[19]. In the field of nuclear medicine,  $^{177}\text{Lu}$ -labeled AuNPs conjugated to different peptides have been proposed as a new class of theranostic radiopharmaceuticals [20]. These multifunctional systems could be useful for the identification of malignant tumors and monitoring of treatment (SPECT/NIR fluorescence optical imaging), for targeted radiotherapy ( $\beta^-$  particle-energy delivered per unit of targeted mass) and for photothermal therapy (localized heating). Therefore, a multifunctional system of dendrimer-AuNP conjugated to bombesin and folate, is expected to improve both the recognition of breast cancer cells positive to FR and GRPR, and its theranostic properties when labeled with  $^{177}\text{Lu}$ . The aim of this work was to synthesize  $^{177}\text{Lu}$ -

Dendrimer-Folate-Bombesin with gold nanoparticles in the dendritic cavity ( $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin) and to evaluate the radiopharmaceutical potential for targeted radiotherapy and the simultaneous detection of FRs and GRPRs over-expressed in T47D breast cancer cells.

### 7.1.2 Materials and Methods

#### MATERIALS

G4-PAMAM-(NH<sub>2</sub>)<sub>64</sub> dendrimer (10%wt. in methanol, density 0.813g/mL) [dendrimer] and folic acid were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, Missouri, USA). H<sub>2</sub>N-Lys<sup>1</sup>Lys<sup>3</sup>(DOTA)-Bombesin (1-14) peptide [bombesin] with a purity of > 90% (HPLC), was obtained from piChem Laboratory (Graz, Austria). The bifunctional chelating agent S-2-(4-Isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane tetraacetic acid (p-SCN-Bz-DOTA) [DOTA] was obtained from Macrocyclics (Dallas, TX, USA). All other chemicals were also purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. and used without additional purification.

### 7.1.3 Synthesis

#### Conjugation of DOTA to the dendrimer

Fifty microliters of dendrimer (0.3  $\mu\text{mol}$ ) in methanol were dried under vacuum and re-dissolved in 0.5 mL of 0.2 M sodium bicarbonate buffer, pH 9.5. The above solution was then incubated with DOTA (5.38  $\mu\text{mol}$ ; 3.7 mg in 0.5 mL of 0.2 M sodium bicarbonate buffer, pH 9.5) at 37°C during 1 h (DOTA/dendrimer molar ratio of 18/1). The final reaction mixture was washed three times with type I water by ultrafiltration to remove bicarbonate buffer (Ultrafree-PFL Filters, MWCO 10,000, polysulfone membrane, Millipore), and finally lyophilized.

#### Activation of carboxylate groups of folic acid and bombesin

Folic acid ( $2.27\mu\text{mol}$ ;  $1\text{mg}$ ) and bombesin ( $0.55\mu\text{mol}$ ,  $1.1\text{mg}$ ) were dissolved in  $200\mu\text{L}$  of dimethylformamide (DMF) and were added to a mixture containing  $100\mu\text{L}$  of  $0.2\text{M}$  diisopropylethylamine (DIPEA, to provide a basic medium) ( $114.83\mu\text{mol}$ ;  $14.84\text{mg}$  in  $300\mu\text{L}$  of DMF) and  $100\mu\text{L}$  of the carboxylate activating agent HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluoro phosphate ( $15.78\mu\text{mol}$ ,  $6\text{mg}$  in  $100\mu\text{L}$  of DMF). The reaction mixture was incubated for  $15\text{min}$  at room temperature ( $20^\circ\text{C}$ ).

### **Conjugation of bombesin and folic acid to the amine groups on the dendrimer**

The lyophilized DOTA-dendrimer ( $0.35\mu\text{mol}$ ) was dissolved in  $100\mu\text{L}$  of DMF and added to the above activated carboxylate Folate-Bombesin solution. The mixture was incubated during  $1.5\text{h}$  at room temperature. The obtained precipitate was washed with DMF and dried under vacuum. The molar ratio of dendrimer to folate was  $1 : 6.5$  and  $1 : 1.5$  for dendrimer to bombesin.

### **Synthesis of DenAuNP-Folate-Bombesin**

To an aqueous solution of Den-Folate-Bombesin ( $1.4\text{mg}/\text{mL}$ ,  $0.1\mu\text{mol}$ )  $1\%$   $\text{HAuCl}_4$  ( $170\mu\text{L}$ ,  $5\mu\text{mol}$ ) was added under vigorous stirring. After  $60\text{min}$ ,  $0.56\text{mL}$  of an ice-cold  $\text{NaBH}_4$  solution ( $1\text{mg}/\text{mL}$ ,  $15\mu\text{mol}$ ) was added to the gold dendrimer mixture under stirring. Within a few seconds, the reaction mixture turned deep-red and the stirring process was continued for  $2\text{h}$  to complete the reaction. The final product was purified by ultrafiltration (Ultrafree-PFL Filters, MWCO 10,000, polysulfone membrane, Millipore), and finally lyophilized to obtain DenAuNP-Folate-Bombesin. For comparative purposes the DenAuNP compound was also prepared under the same procedure.

## **7.1.4 Chemical characterization**

### **IR spectroscopy**

IR spectra of dendrimer, folate, Lys<sup>1</sup>Lys<sup>3</sup>(DOTA)Bombesin (1-14), p-SCN-Bz-DOTA, Den-Folate-Bombesin and Den(AuNP)-Folate-Bombesin, in solid state, were obtained on a Perkin Elmer System spectrometer (Spectrum 400) (Waltham, MA, USA) with an attenuated total reflection platform (Diamond GLADIATOR, Pike Technologies; Madison, WI, USA), from 500 to 4000 $cm^{-1}$ .

### **Transmission Electron Microscopy (TEM)**

TEM was performed using a JEOL-EMDSC-U10A instrument (JEOL, Japan) operating at 200 $kV$ . The samples of each compound (DenAuNP or DenAuNP-Folate-Bombesin) were analyzed stained and unstained. The samples were dropped onto a carbon-coated copper grid and allowed to evaporate under vacuum before measurements. Some samples of both compounds were then stained with an aqueous solution of phosphotungstic acid (2% $w/w$ ) and dried.

### **Dynamic Light Scattering (DLS) and Zeta potential measurement**

The DLS and Zeta potential measurement were performed using a Nanotracs Wave (Model MN401, Microtract, FL, USA). The temperature of the cell housing was set to 22.6°C. The data was acquired from DenAuNP and DenAuNP-Folate-Bombesin samples diluted in Milli-Q water ( $n = 3$ ). The hydrodynamic diameter and Zeta potential were obtained for each sample.

### **Scanning Electron Microscopy (SEM) and X-ray analysis**

The multifunctional DenAuNP-Folate-Bombesin was visualized by scanning electron microscopy (SEM). The sample was mounted on an aluminum stub using double-sided tape. The coated sample was examined using an electron acceleration voltage of 20 – 25 $keV$  (JEOL JSM-5900 Low Vacuum, USA). The X-ray analysis was obtained from a selected area of the sample using the above system.

### **Fluorescence spectroscopy**

Emission fluorescence spectra of DenAuNP-Folate-Bombesin, Den-Folate-Bombesin and Dendrimer

samples in solid state (powder) at 291K were recorded on a Perkin-Elmer LS-55 low-resolution luminescence spectrometer, from 200 to 900nm. The best results were obtained using an excitation wavelength ( $\lambda_{exc}$ ) of 222nm, emission filter of 290nm, and excitation and emission slits of 5nm for the three samples.

### 7.1.5 Preparation of $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin

Radiolabeling was carried out by adding  $^{177}\text{LuCl}_3$  solution (20 $\mu\text{L}$ , 1.1GBq, 3TBq/mg, ITG, Germany) to the DenAuNP-Folate-Bombesin conjugate (15 $\mu\text{g}$  in a solution of 200 $\mu\text{L}$  of 0.25M acetate buffer, pH5.5) and incubating it at 37.5°C for 20min. The radiochemical purity was determined using a radio-HPLC size exclusion system (ProteinPak 300SW, Waters, 1mL/min,  $\text{NaHCO}_3$  0.2M, pH9.5). Chromatographic profiles were obtained using two different detectors, the UV-Vis detector and a radiometric detector. The sample first passed through the UV-Vis detector (photodiode array) and after 0.5min (0.5mL, 1mL/min), it passed through the radioactivity detector. The retention times in this system were  $t_R = 7.80$  and 8.31min in the chromatogram and radio-chromatogram, respectively. Correspondence in retention times of the peaks of interest in the chromatogram is commonly accepted as a proof of the chemical identity of the radiopharmaceutical. For comparative studies,  $^{177}\text{Lu}$ -Folate-Bombesin was also prepared as previously reported by Aranda et al. [21].

### 7.1.6 *In vitro* studies

#### Stability in human serum

To determine the stability of  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin in serum, 200 $\mu\text{L}$  of radiotracer were diluted at a ratio of 1 : 10 with fresh human serum and incubated at 37°C. Radiochemical stability was determined with a 100 $\mu\text{L}$  sample taken at 24h for radio HPLC size exclusion analysis (Protein



Pak 300SW, Waters,  $1\text{mL}/\text{min}$ , PBS).

### **Cell culture**

A T47D human breast cancer cell line (obtained from ATCC, USA) was grown at  $37^{\circ}\text{C}$  with 5%  $\text{CO}_2$  and 85% humidity in folate-free RPMI-1640 culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics (streptomycin and penicillin).

### **Cell uptake studies**

T47D cancer cells suspended in fresh medium were diluted to  $1 \times 10^6$  cells/tube with PBS and incubated with  $20\mu\text{L}$  ( $0.9\text{MBq}$ ) of  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin or  $^{177}\text{Lu}$ -Folate-Bombesin in triplicate at  $37^{\circ}\text{C}$  for  $1\text{h}$ . The test tubes were centrifuged at  $2500\text{rpm}$  for  $5\text{min}$  and washed with phosphate buffered saline. Radioactivity in the cell pellet represents both membrane-bound and internalized radiopharmaceutical and was measured in a crystal scintillation well-type detector (Auto In-v-tron 4010, NML, Inc.). The membrane-bound activity was removed with  $1\text{mL}$  of  $0.2\text{M}$  acetic acid/  $0.5\text{M}$  NaCl solution added to the cell pellet. The test tubes were centrifuged and the pellet activity, which was considered as internalization, was measured. Blocking studies were carried out in parallel. The cells were pre-incubated with  $50\mu\text{L}$  of folic acid in  $0.01\text{M}$  NaOH ( $0.5\text{mM}$ ) or  $50\mu\text{L}$  of Lys<sub>3</sub>-Bombesin ( $0.5\text{mM}$ ) for  $30\text{min}$  before addition of the radiopharmaceutical.

#### **7.1.7 *In vivo* uptake**

##### **Animal model**

*In vivo* studies in mice were carried out according to the rules and regulations of the Official Mexican Norm 062-ZOO-1999. Athymic mice, 6 – 7 weeks old and 18 – 20g weight, were kept in sterile cages with sterile wood-shaving beds, constant temperature, humidity, noise and 12 : 12 light

periods. Athymic mice were maintained on a folate-free diet for 3 weeks before imaging studies.

### **Tumor induction**

Athymic female mice (6 – 7 weeks old) were inoculated subcutaneously in the upper back with  $2 \times 10^6$  T47D cancer cells suspended in 0.1 mL of phosphate-buffered saline. Injection sites were observed at regular intervals for tumor formation and progression.

### **$^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin Imaging**

To verify the *in vivo* radionanoconjugate retention in tumors, optical images were acquired at 1h and 48h after  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin intratumoral administration (37 MBq) in T47D tumor-bearing mice using a preclinical optical/X-ray imaging system (*In vivo* X-Treme, Bruker BioSpin Corp., USA). Mice under 2% isoflurane anesthesia were placed in the prone position and whole imaging was performed. Counts in the tumor were quantified at 1 and 48h after injections.

## **7.1.8 Results and Discussion**

### **Synthesis and chemical characterization**

Synthesis. The overall scheme of the theranostic radiopharmaceutical  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin is shown in 7.1. The DenAuNP-Folate-Bombesin conjugate was obtained as a black solid with an overall yield of 72%.

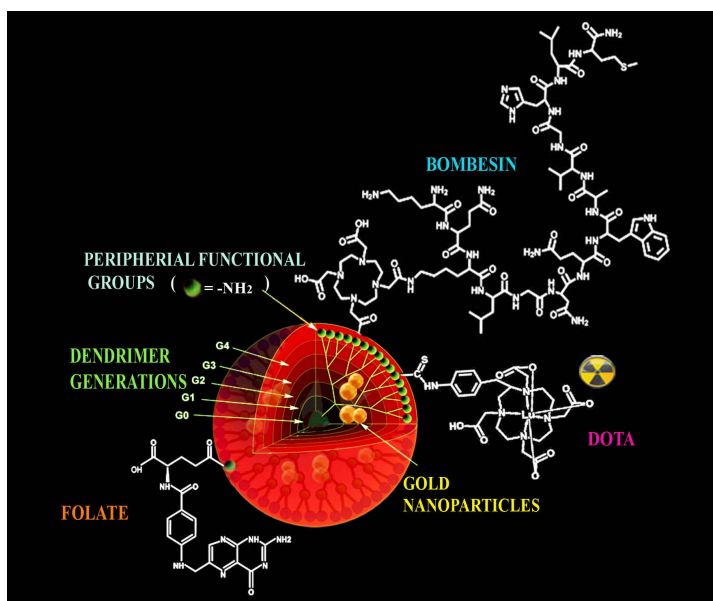


Figura 7.1: Overall scheme of  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin.

### IR Spectroscopy.

The IR spectra of the dendrimer, bombesin, DOTA, folic acid, DenAuNP, Den-Folate-Bombesin and DenAuNP-Folate-Bombesin are presented in (Fig.7.2). The IR-spectrum of Den-Folate-Bombesin reveals some characteristic bands from the dendrimer, bombesin, DOTA and folic acid, which change in intensity, positions, or disappear because of the conjugation to the dendrimer. In agreement with the IR spectra of bombesin and folic acid described by Aranda-Lara et al [22], the strong bands in the  $1646 - 1533\text{cm}^{-1}$  region from the bombesin spectrum (Fig.7.2b) and  $1687^{-1}$  and  $1637^{-1}$  from folic acid (Fig.7.2d) which correspond to amide I and amide II vibrations, disappeared or decreased in intensity in the Den-Folate-Bombesin. A change of symmetry occurs in this supramolecule and bands associated to the formation of new secondary amides increase the absorbance of bands at  $839$  and  $555^{-1}$ , which correspond to a symmetrical C-N-C stretching vibration and to the bending motion of O=C-N group, respectively [23]. In the dendrimer spectrum (Fig.7.2a), three weak well-

defined bands at 1152, 1130, 1032 $cm^{-1}$  are observed. After conjugation (Den-Folate-Bombesin), the spectrum (Fig.7.2f) revealed two red-shifted bands (7 $cm^{-1}$  and 5 $cm^{-1}$ ) at 1171 and 1123 $cm^{-1}$ , from bombesin; one band at 1033 $cm^{-1}$  from the dendrimer and two semi shoulders at 1100 and 1065 $cm^{-1}$ , from DOTA (Fig.7.2c) and folic acid (Fig.7.2d). In the DenAuNP spectrum, two bands at 1146 and 1031 $cm^{-1}$ , from the dendrimer, are observed and the pattern of the spectrum changed (Fig.7.2e), which indicates the encapsulation of the AuNPs with effect on the molecular symmetry of the dendrimer. Structured new regions between 3900 and 3600 $cm^{-1}$  (centered at 3747 $cm^{-1}$ ), and between 2250 and 1700 $cm^{-1}$  (centered at 2011 $cm^{-1}$ ), are observed and seem to correspond to weak hydrogen bonding between the dendrimer amides as the result of the entrapped AuNPs. The change in the spectrum of Den-Folate-Bombesin after the encapsulation of AuNPs (DenAuNP-Folate-Bombesin), (Fig.7.2g) suggests a new molecule with particular physicochemical properties. The weak bands between 1200 – 900 $cm^{-1}$  observed in Den-Folate-Bombesin spectrum, are the most strong in that of DenAuNP-Folate-Bombesin. The bands at 1157 and 1029 $cm^{-1}$  are from the dendrimer and those at 1102 and 1051 $cm^{-1}$  (14 $cm^{-1}$  red-shifted) are from the molecules conjugated to the dendrimer (Fig.7.2g). Their increase in absorbance seems to be the result of the encapsulation of AuNPs in the dendritic cavity. The bands observed between 1200 – 1000 $cm^{-1}$  correspond to C-N stretching vibrations from primary amides, secondary amides and tertiary aliphatic amines [23]. In particular, CN vibrations from tertiary aliphatic amines are located between 1040 – 1020 $cm^{-1}$  [23].

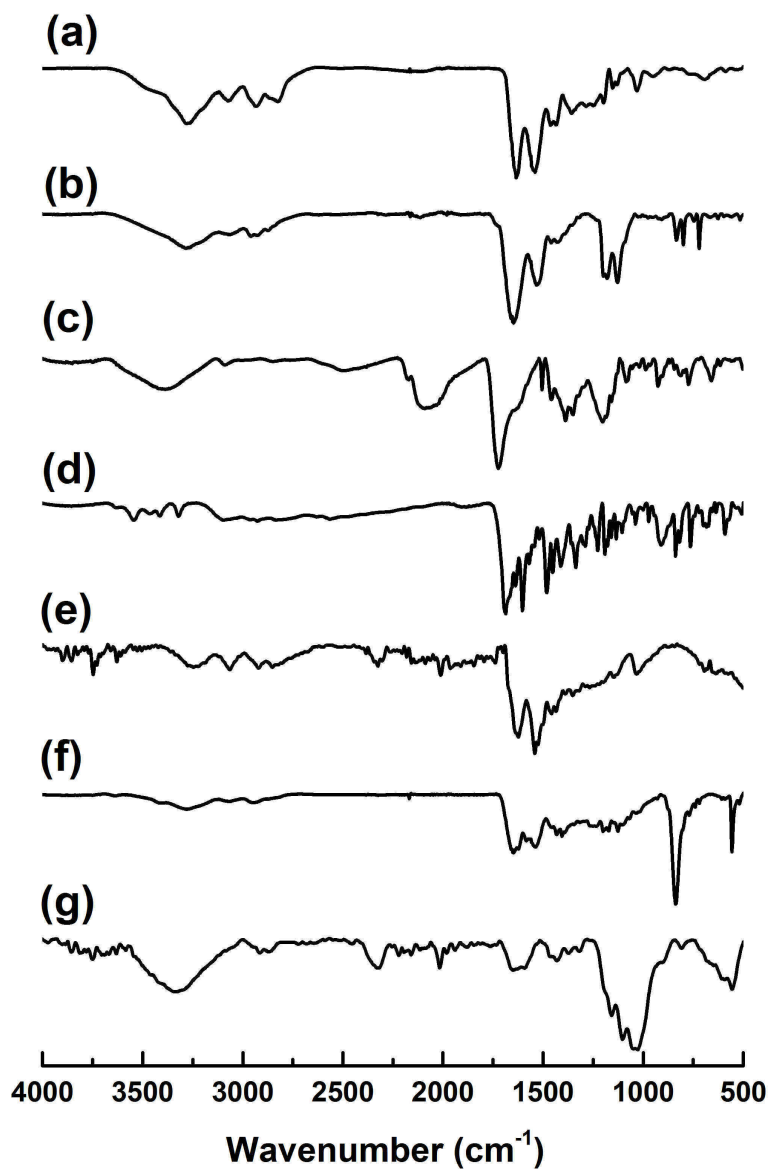


Figura 7.2: IR-spectrum of a) Dendrimer, b) Bombesin, c) DOTA, d) Folic acid, e) DenAuNPs, f) Den-Folate-Bombesin, and g) DenAuNP-Folate-Bombesin.

In the DenAuNP-Folate-Bombesin spectrum, two new structured regions with two maximum bands at 3753 and 2015  $\text{cm}^{-1}$  slightly blue shifted with respect to those of the DenAuNP are observed, which demonstrates that the entrapped AuNPs favored weak interactions in the dendrimer cavity. IR suggests that AuNPs are entrapped in the dendritic cavity in Den-AuNPs and in Den-AuNP-

Folate-Bombesin, but in the former the bands of the dendrimer are not strong. In contrast, the conjugation of bombesin, folic acid and DOTA to the dendrimer induces a particular structural arrangement which allows the encapsulation of the AuNPs in the dendritic cavity and affords a larger stability and an adequate symmetry to the supramolecule, which is revealed in the particular feature of the spectrum and the very strong bands associated to the -C-N- groups.

### **Transmission electron microscopy**

TEM images of DenAuNP-Folate-Bombesin (Fig.7.3A) shows single units of the compounds as grayish round objects with a mean diameter of  $5.6 \pm 0.4nm$ , which is slightly greater than that of DenAuNP ( $4.53 \pm 1.33nm$ , (Fig.7.3B) because of the conjugation with Folate and Bombesin. The increase in the hydrodynamic diameter of DenAuNP-Folate-Bombesin by the conjugation effect was observed by TEM as a halo around the compound due to the poor interaction of the electron beam with the folate and bombesin molecules (low electron density), in contrast to the strong scattering of the electron beam when it interacted with the metallic nanoparticles [24]. Each compound shows small black dots that correspond to the gold nanoparticles with approximate average diameter of  $2.5 \pm 0.4nm$ . According to the previous studies, the black dots indicate that gold nanoparticles are in the dendritic cavity [25].

### **Particle size and zeta potential**

The hydrodynamic diameter of DenAuNPs and DenAuNP-Folate-Bombesin by DLS was  $5.00 \pm 1.47nm$  and  $18.6 \pm 8.0nm$ , respectively (Fig.7.3). The Z potential of the DenAuNP-Folate-Bombesin was  $86.3 \pm 3.8mV$ , versus  $28.6 \pm 2.7mV$  for the DenAuNPs, indicating that the Folate and Bombesin conjugation confers a high colloidal stability to the multifunctional system. Scanning Electron Microscopy. The SEM image (Fig.7.4A) showed that the DenAuNP-Folate-Bombesin conjugate has a granular and homogeneous structure. The qualitative elemental content determined by X-ray

analysis for DenAuNP-Folate-Bombesin (Fig.7.4B) shows the presence of Au and S as well as C, N and O.

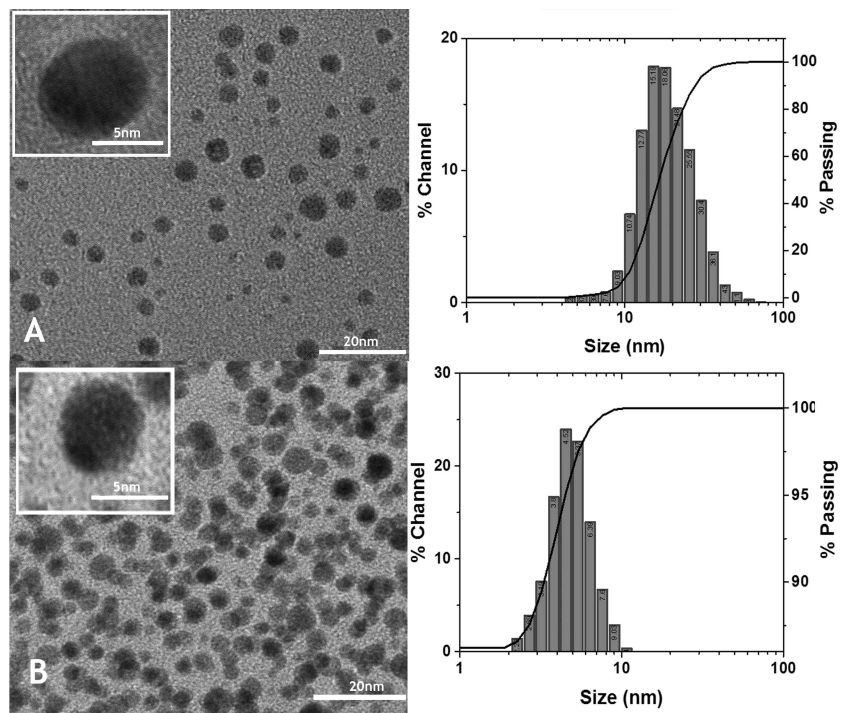


Figura 7.3: TEM image and size distribution (DLS) of A)DenAuNP-Folate-Bombesin and B)DenAuNP.

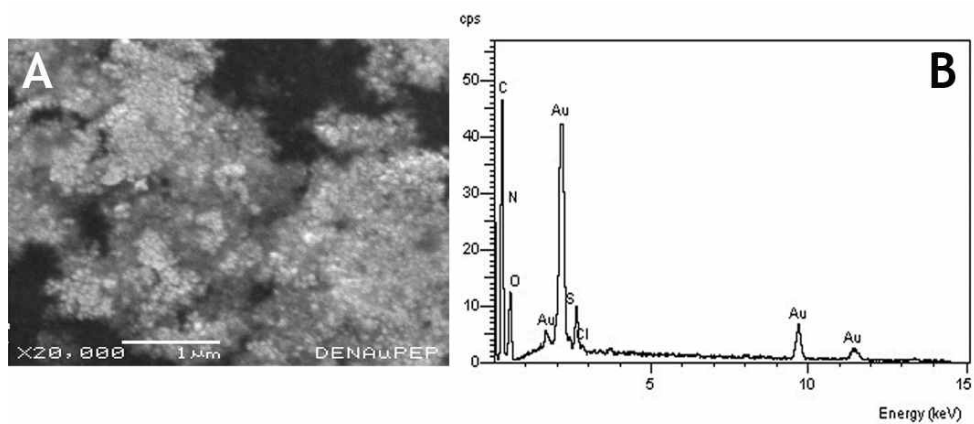


Figura 7.4: SEM image (A) and X-ray analysis (B) for DenAuNP-Folate-Bombesin.

## UV-Vis

The Den-Folate-Bombesin spectrum showed bands associated to DOTA (shoulder at  $258nm$ ), bombesin ( $278nm$ ) and folate ( $284nm$  and a shoulder at  $340nm$ ) (Fig.7.5A), which were masked in the presence of the entrapped AuNPs (Fig.7.5B). The DenAuNP-Folate-Bombesin spectrum exhibited a surface plasmon resonance as a shoulder at approximately  $510nm$  (Fig.7.5B). The plasmon band is associated to the average contribution of the entire AuNP population, but only the AuNPs with diameters larger than  $2.5nm$  significantly contribute to the plasmon band absorption at  $510nm$  [25, 26]. Several groups have reported the presence of intradendrimer encapsulated nanoparticles, in which the nanoparticle resides within the interior void space of the dendrimer, as well as interdendrimer-stabilized nanoparticles, in which the nanoparticle surface is stabilized by multiple dendrimers through their terminal amine groups. Intradendrimer nanoparticles are usually smaller than  $4.5nm$ ; in contrast, interdendrimer particles are always larger than  $5nm$  [26]. In this research, the encapsulation of  $2.1-2.9nm$  diameter nanoparticles within single dendrimers observed in TEM images suggests that formation of gold interdendrimer particles did not occur, possibly due to the steric effect of bombesin, folate and DOTA on the dendrimer surface. The band at  $290nm$  is reproducibly observed during the syntheses of AuNPs through the use of dendrimers as templates [27]. This band and the plasmon band absorption are also observed in the DenAuNPs spectrum (Fig.7.5C).



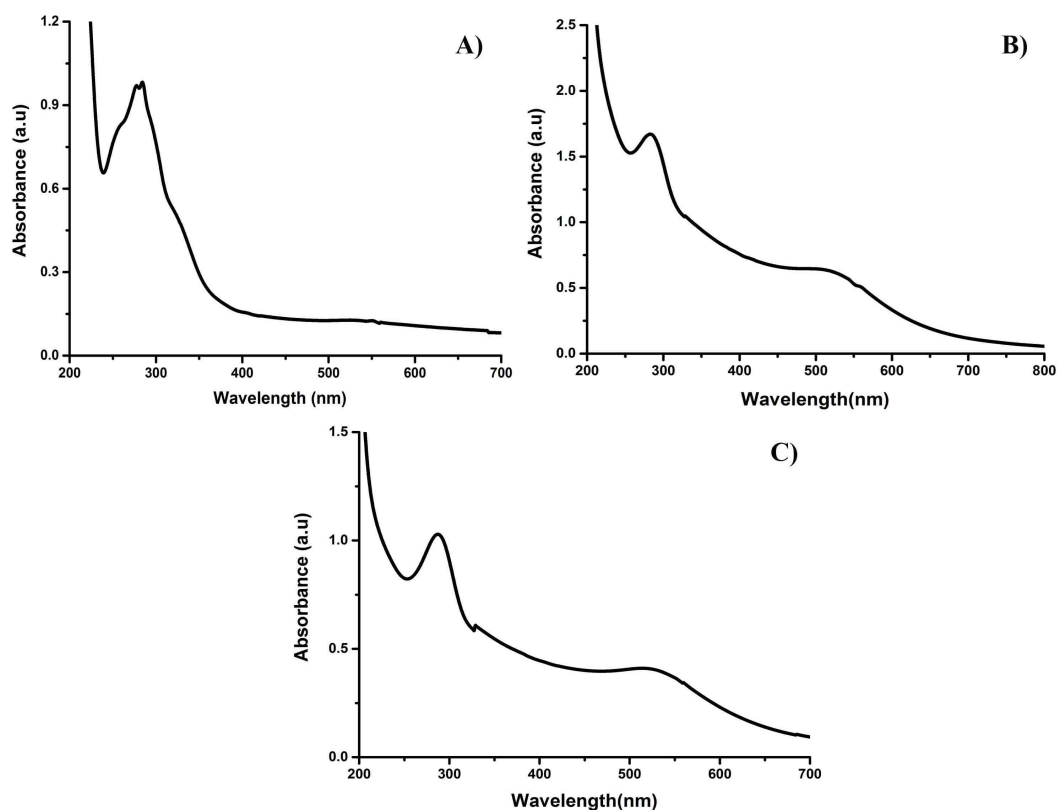


Figura 7.5: UV-Vis spectra in aqueous media of A) Den-Folate-Bombesin, B) DenAuNP-Folate-Bombesin, and C) DenAuNP.

The surface plasmon resonance observed at  $510\text{nm}$  opens the possibility for further studies related to plasmonic photothermal therapy[28]. Several trials have demonstrated a significant improvement in the clinical outcome when radiotherapy was conducted under hyperthermic conditions in patients [29]. Hyperthermia increases the efficacy of radiotherapy by improving tumor oxygenation and interfering with the DNA repair mechanisms. By exposing  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin to laser irradiation, could be possible to heat a localized area in the tumor without any harmful heating of the surrounding healthy tissues.

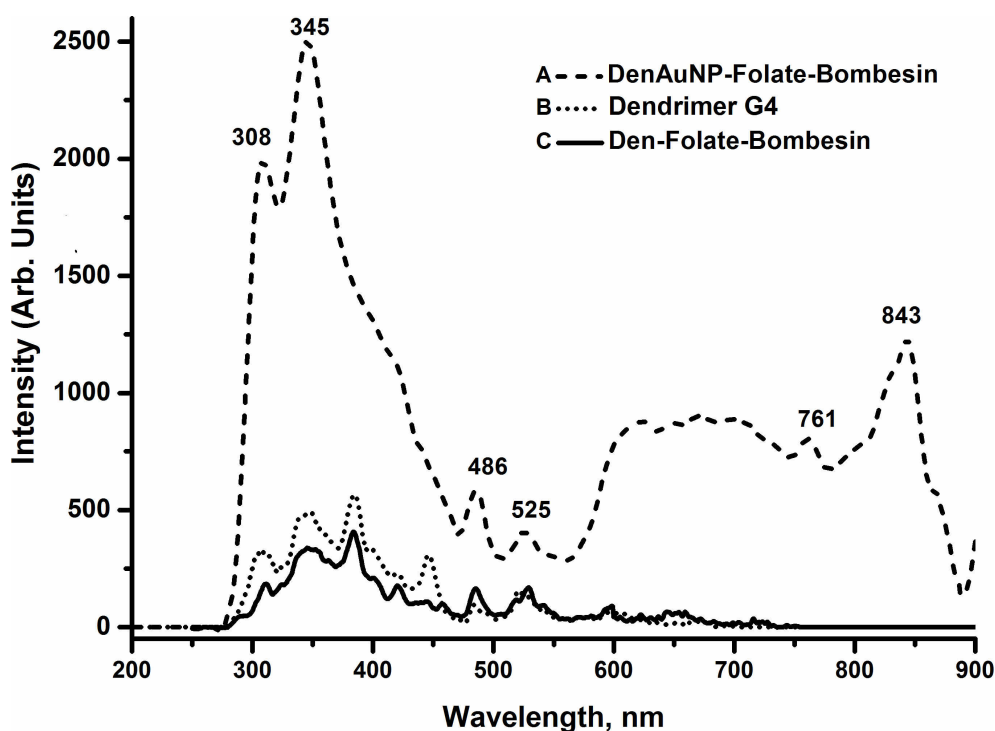


Figura 7.6: Emission fluorescence spectra in powder at 291K of A) DenAuNP-Folate-Bombesin, B) Den-Folate-Bombesin ( $\lambda_{emi} = 311, 347, 383, 421, 444, 485, 529nm$ ) and Dendrimer ( $\lambda_{emi} = 308, 345, 384, 419, 445, 484, 520nm$ ). The three spectra were measured at  $\lambda_{exc} = 222nm$ ,  $slit_{exc} = 5.0nm$ ,  $slit_{emi} = 5.0nm$  and filter = 290nm.

### Fluorescence spectroscopy

Figure 7.6 shows the selected fluorescence emission spectra of the dendrimer, Den-Folate-Bombesin and Den-AuNP-Folate-Bombesin from the luminescence studies. Two important aspects are observed, the enhanced luminescence of the DenAuNP-Folate-Bombesin (Fig. 7.6A) with respect to the dendrimer and Den-Folate-Bombesin, and the presence of new peaks at 761 and 843 nm. The high luminescence intensity is caused by the encapsulated small AuNPs that induce the stabilization of the molecule and the NIR emissions. This fact pointed to the presence of NIR-emitting gold nanoclusters (NCs), possibly in the form of  $(Au^0)_{50}$ -dendrimer-G4. Recent developments in the NC field have demonstrated that metal NCs are excellent luminescent materials [3, 30]. The

luminescent properties of the DenAuNP-Folate-Bombesin conjugate are relevant because it could be used in animal imaging. Recently, Wu et al. investigated tumor targeting of NIR-emitting BSA-stabilized AuNCs, and the NIR fluorescence significantly improved tissue penetration depth upto few millimeters[31].

### Radiolabeling

The size-exclusion HPLC chromatogram and radio-chromatogram of the purified multifunctional system (Fig.7.7) show that  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin was obtained with a radiochemical purity of  $93 \pm 2\%$ , without post-labeling purification ( $n=12$ ). After incubation of the  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin radiopharmaceutical in human serum (24h at  $37^\circ\text{C}$ ), the radio-HPLC chromatogram showed a radiochemical purity of  $> 90\%$ , which demonstrates its high stability in serum.

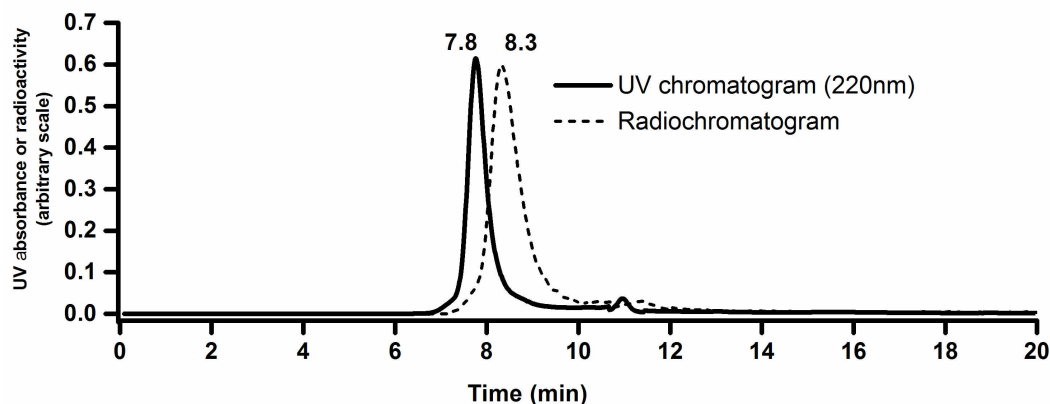


Figura 7.7: Size-exclusion HPLC chromatogram (220nm; continuous line) and HPLC radio-chromatogram (dotted line) of the  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin theranostic radiopharmaceutical (flow rate  $1\text{mL}/\text{min}$ ).

### T47D cancer cell studies

Preliminary cell studies showed an important uptake of  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin in T47D cancer cells, which was significantly (t-student,  $p < 0.05$ ) inhibited by pre-incubation with

cold Lys<sup>3</sup>-bombesin peptide or folic acid alone, indicating that the multifunctional system has specific recognition for GRPRs and FRs (Fig.7.8). The T47D cell uptake of <sup>177</sup>Lu-DenAuNP was  $8.84 \pm 1.14\%$ , mainly attributed to a passive uptake mechanism [24], and significantly (t-student,  $p < 0.05$ ) lower than that of <sup>177</sup>Lu-DenAuNP-Folate-Bombesin ( $41.15 \pm 2.72\%$ ). The pre-incubation with cold Lys<sup>3</sup>-bombesin showed greater blocking effect on the multifunctional system ( $62.14\%$  less uptake) compared with that of the cold folic acid ( $36.53\%$  less uptake) (Fig.7.8). This difference in blocking effect is consistent with the GRP and folate receptors' expression levels in T47D breast cancer cells [21, 22], which suggest that the specific targeting of the <sup>177</sup>Lu-DenAuNP-Folate-Bombesin in T47D is mainly dominated by the specific recognition of the bombesin moiety through GRP receptors. The in vitro T47D cell uptake was higher for <sup>177</sup>Lu-DenAuNP-Folate-Bombesin ( $41.15 \pm 2.72\%$ ) than that reported for the <sup>177</sup>Lu-Folate-Bombesin conjugate ( $33.27 \pm 2.52\%$ ) [22]. This effect could be related to the multivalent ligand-receptor binding of the <sup>177</sup>Lu-DenAuNP-Folate-Bombesin, since the peptide-nanoparticle conjugate provides a surface for simultaneous interactions with the cell surface, giving rise to multivalent effects (defined as an affinity enhancement) [24], as well as to the contribution of dendrimer passive uptake [24]. Nevertheless, further studies related to cell internalization and affinity must be carried out.

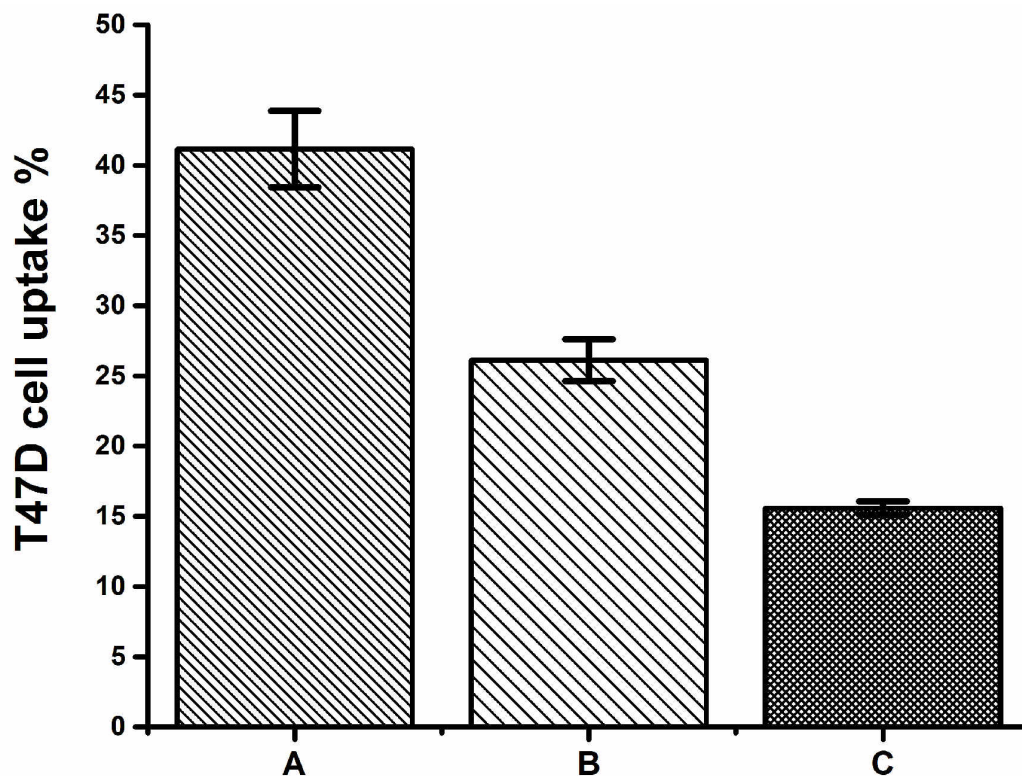


Figura 7.8: *In vitro* uptake of  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin in T47D breast cancer cells at 1h. A) Unblocked, B) Blocked with folic acid, and C) Blocked with Lys<sup>3</sup>-bombesin.

Preliminary *in vivo* imaging studies demonstrated that  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin remained in the T47D tumor up to 48h after intratumoral radiopharmaceutical administration, since in all mice the tumor intensity in the optical imaging correlated with the radionuclide decay (at 1h = 11354 photons/s/mm<sup>2</sup>; at 48h = 8360 photons/s/mm<sup>2</sup>) with negligible biological elimination (Fig.7.9). Considering that one Becquerel (Bq) of Lu-177 produces 841558 disintegrations until total decay (total disintegrations =  $\int_0^t A(t) dt$ ) with a maximum  $\beta^-$  particle energy of 0.498MeV, it is expected that with the high  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin retention observed in tumors, the total radiation absorbed dose to the malignant tissue could easily reach 2Gy per MBq [32]. Nevertheless, further preclinical studies must be carried out in order to evaluate the toxicity,

biokinetics and dosimetry of this radiopharmaceutical. An important benefit of receptor-specific radiopharmaceuticals is their potential for use in targeted radiotherapy. Multiple peptides, specific to target receptors that are over expressed in breast cancer cells, appended to one nanoparticle and radiolabeled with an imaging and  $\beta^-$  particle-emitting radionuclide ( $^{177}\text{Lu}$ ), act as a multifunctional system that could be useful in identifying malignant tumors and metastatic sites (by single photon emission computed tomography imaging, “SPECT”), for targeted radiotherapy (high  $\beta^-$  particle-energy delivered per unit of targeted mass), and for thermal therapy (localized heating after laser irradiation). However, for therapeutic purposes, NPs should be administered by intratumoral injection or into a selective artery to avoid high uptake by organs of the reticulo-endothelial system due to the colloidal nature of NPs [32]. Injection into a breast tumor would allow high uptake into a tumor, possible micro metastases, or individual cancer cells. Therefore,  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin has potential application in medical diagnosis and therapeutic treatments due to its unique combination of radioactive, optical and thermoablative properties. This study demonstrated that the nanosystem exhibited physical and chemical properties that are suitable for plasmonic-photothermal therapy and targeted radiotherapy in the treatment of breast cancer.

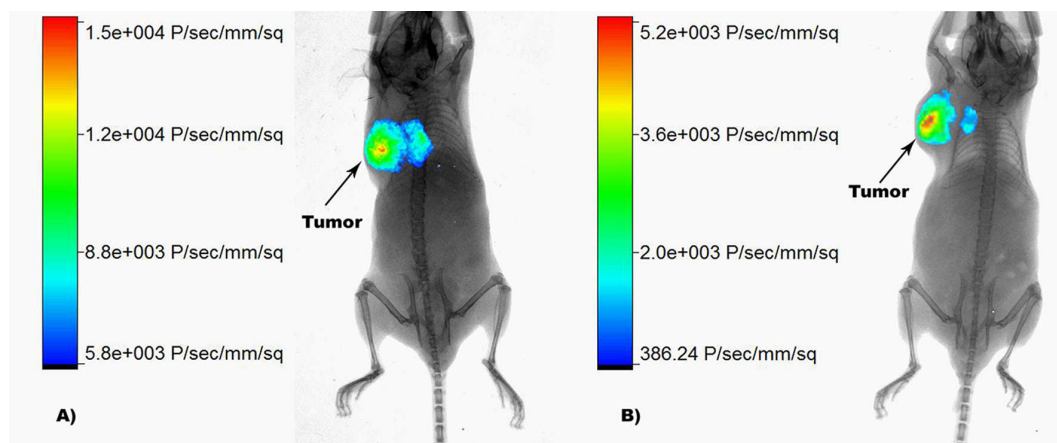


Figura 7.9: Optical imaging of  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin at 1h and 48h after intratumoral administration.

## Conclusions

Elemental analysis and spectroscopy techniques showed that folic acid, bombesin and DOTA molecules were successfully conjugated to one molecule of the PAMAM dendrimer. Chromatographic studies showed that the  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin conjugate was obtained with high radiochemical purity ( $> 90\%$ ). Preliminary binding studies in T47D breast cancer cells showed a specific cell uptake and high retention in T47D-induced tumors in mice.

Luminescence results show that AuNPs in the conjugate increase the fluorescence intensity, resulting in a multifunctional system that may be useful as an optical and nuclear imaging agent for breast tumors over-expressing GRPRs and FRs, as well as for targeted radiotherapy.

### 7.1.9 Acknowledgments

This study was supported by the Mexican National Council of Science and Technology (CONACYT-SEP-CB-2014-01-242443).

### 7.1.10 Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

### 7.1.11 References

1. D. Astruc, E. Boisselier and C. Ornelas, "Dendrimers designed for functions: from physical, photophysical, and supramolecular properties to applications in sensing, catalysis, molecular electronics, photonics, and nanomedicine," *Chem. Rev.*, vol. 110, no. 4, pp. 1857-1959, 2010.
2. P. Szymanski, M. Markowicz and E. Mikiciuk-Olasik, "Nanotechnology in pharmaceutical and biomedical applications: Dendrimers," *Nano*, vol. 6, no. 06, pp. 509-539, 2011.

3. C. Zhou, S. Yang, J. Liu, M. Yu and J. Zheng, "Luminescent gold nanoparticles: a new class of nanoprobes for biomedical imaging," *Exp. Biol. Med.*, vol. 238, no. 11, pp. 1199-1209, 2013.
4. C. Zhou, J. Yu, Y. Qin and J. Zheng, "Grain size effects in polycrystalline gold nanoparticles," *Nanoscale*, vol. 4, no. 14, pp. 4228-4233, 2012.
5. V. Sancho, A. Di Florio, T. W. Moody and R. T. Jensen, "Bombesin receptor-mediated imaging and cytotoxicity: review and current status," *Curr. Drug Deliv.*, vol. 8, no. 1, pp. 79-134, 2011.
6. S. U. Dalm, J. W. Martens, A. M. Sieuwerts, C. H. van Deurzen, S. J. Koelewijn, E. de Blois, T. Maina, B. A. Nock, L. Brunel, J. A. Fehrentz, J. Martinez, M. de Jong and M. Melis, "In vitro and in vivo application of radiolabeled gastrin-releasing peptide receptor ligands in breast cancer," *J. Nucl. Med.*, vol. 56, no. 5, pp. 752-757, 2015.
7. C. L. Santos-Cuevas, G. Ferro-Flores, C. A. de Murphy and P. A. Pichardo-Romero, "Targeted imaging of gastrin-releasing peptide receptors with  $^{99m}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-bombesin: biokinetics and dosimetry in women," *Nucl. Med. Commun.*, vol. 29, no. 8, pp. 741-747, 2008.
8. F. Scopinaro, A. Varvarigou, W. Ussof, G. De Vincentis, T. Sourlingas, G. Evangelatos, J. Datsteris and S. Archimandritis, "Technetium labeled bombesin-like peptide: preliminary report on breast cancer uptake in patients," *Cancer Biother. Radiopharm.*, vol. 17, no. 3, pp. 327-335, 2002.
9. F. Shariati, K. Aryana, A. Fattahi, M. N. Forghani, A. Azarian, S. R. Zakavi, R. Sadeghi, N. Ayati and K. Sadri, "Diagnostic value of  $^{99m}\text{Tc}$ -bombesin scintigraphy for differentiation of malignant from benign breast lesions," *Nucl. Med. Commun.*, vol. 35, no. 6, pp. 620-625, 2014.
10. C. Van de Wiele, P. Phonteyne, P. Pauwels, I. Goethals, R. Van den Broecke, V. Cocquyt



and R. A. Dierckx, "Gastrin-releasing peptide receptor imaging in human breast carcinoma versus immunohistochemistry," *J. Nucl. Med.*, vol. 49, no. 2, pp. 260-264, 2008.

11. S. Ait-Mohand, P. Fournier, V. Dumulon-Perreault, G. E. Kiefer, P. Jurek, C. L. Ferreira, F. Benard and B. Guerin, "Evaluation of  $^{64}\text{Cu}$ -labeled bifunctional chelate-bombesin conjugates," *Bioconjugate Chem.*, vol. 22, no. 8, pp. 1729-1735, 2011.

12. J. J. Parry, R. Andrews and B. E. Rogers, "MicroPET imaging of breast cancer using radiolabeled bombesin analogs targeting the gastrin-releasing peptide receptor," *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 101, no. 2, pp. 175-183, 2007.

13. A. F. Prasanphanich, L. Retzlöff, S. R. Lane, P. K. Nanda, G. L. Sieckman, T. L. Rold, L. Ma, S. D. Figueroa, S. V. Sublett and T. J. Hoffman, "In vitro and in vivo analysis of [ $^{64}\text{Cu}$ -NO<sub>2</sub>A-8-Aoc-BBN (7?14) NH<sub>2</sub>]: a site-directed radiopharmaceutical for positron-emission tomography imaging of T-47D human breast cancer tumors," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 36, no. 2, pp. 171-181, 2009.

14. L. E. Kelemen, "The role of folate receptor  $\alpha$  in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander?," *Int. J. Cancer*, vol. 119, no. 2, pp. 243-250, 2006.

15. L. Teng, J. Xie, L. Teng and R. J. Lee, "Clinical translation of folate receptor-targeted therapeutics," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 9, no. 8, pp. 901-908, 2012.

16. B. M. Necela, J. A. Crozier, C. A. Andorfer, L. Lewis-Tuffin, J. M. Kachergus, X. J. Geiger, K. R. Kalari, D. J. Serie, Z. Sun and A. M. Aspita, "Folate Receptor- $\alpha$  (FOLR1) Expression and Function in Triple Negative Tumors," *PLoS one*, vol. 10, no. 3, pp. e0122209, 2015.

17. D. J. O'Shannessy, E. B. Somers, J. Maltzman, R. Smale and Y.-S. Fu, "Folate receptor alpha (FRA) expression in breast cancer: identification of a new molecular subtype and association with triple negative disease," *SpringerPlus*, vol. 1, no. 1, pp. 1-9, 2012.

18. Z. Zhang, P. Li, H. Chen, B. Wei, X. Xiao, J. Da, K. Skinner and D. G. Hicks, "Folate Receptor [alpha] Associated With Triple-Negative Breast Cancer and Poor Prognosis," *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 138, no. 7, pp. 890-895, 2014.
19. J. Renukuntla, S. Shah, S. Boddu, A. Vadlapudi, R. Vadlapatla, D. Pal and A. K. Mitra, "Functional characterization and expression of folate receptor- $\alpha$  in T47D human breast cancer cells," *Drug Develop. Therap.*, vol. 6, no. 2, pp. 52-61, 2015.
20. G. Ferro-Flores, B. E. Ocampo-Garcia, C. L. Santos-Cuevas, F. M. Ramirez, E. P. Azorin-Vega and L. Melendez-Alafort, "Theranostic Radiopharmaceuticals Based on Gold Nanoparticles Labeled with (177)Lu and Conjugated to Peptides," *Curr. Radiopharm.*, vol. 8, no. 2, pp. 150-159, 2015.
21. L. Aranda-Lara, G. Ferro-Flores, F. M. Ramirez, B. Ocampo-García, C. Santos-Cuevas, L. Díaz-Nieto and K. Isaac-Olivé, "Improved radiopharmaceutical based on  $^{99m}\text{Tc}$ -Bombesin-folate for breast tumour imaging," *Nucl. Med. Commun.*, vol. 37, no. 4, pp. 377-386 2016.
22. L. Aranda-Lara, G. Ferro-Flores, E. Azorin-Vega, F. M. Ramirez, N. Jimenez-Mancilla, B. Ocampo-Garcia, C. Santos-Cuevas and K. Isaac-Olive, "Synthesis and evaluation of Lys(alpha,gamma-Folate)Lys(Lu-DOTA)-Bombesin(1-14) as a potential theranostic radiopharmaceutical for breast cancer," *Appl. Radiat. Isot.*, vol. 107, pp. 214-219, 2016.
23. G. Socrates, *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*, John Wiley & Sons, 2004.
24. E. Orocio-Rodriguez, G. Ferro-Flores, C. L. Santos-Cuevas, F. M. Ramirez, B. E. Ocampo-Garcia, E. Azorin-Vega and F. M. Sanchez-Garcia, "Two Novel Nanosized Radiolabeled Analogues of Somatostatin for Neuroendocrine Tumor Imaging," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 15, no. 6, pp.

4159-4169, 2015.

25. J. C. Garcia-Martinez and R. M. Crooks, "Extraction of Au nanoparticles having narrow size distributions from within dendrimer templates," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 49, pp. 16170-16178, 2004.

26. X. Shi, S. Wang, H. Sun and J. R. Baker, "Improved biocompatibility of surface functionalized dendrimer-entrapped gold nanoparticles," *Soft Matter*, vol. 3, no. 1, pp. 71-74, 2006.

27. Y.-G. Kim, S.-K. Oh and R. M. Crooks, "Preparation and characterization of 1-2 nm dendrimer-encapsulated gold nanoparticles having very narrow size distributions," *Chem. Mater.*, vol. 16, no. 1, pp. 167-172, 2004.

28. H. Mendoza-Nava, G. Ferro-Flores, B. Ocampo-García, J. Serment-Guerrero, C. Santos-Cuevas, N. Jiménez-Mancilla, M. Luna-Gutiérrez and M. A. Camacho-López, "Laser heating of gold nanospheres functionalized with octreotide: in vitro effect on HeLa cell viability," *Photomed. Laser Surg.*, vol. 31, no. 1, pp. 17-22, 2013.

29. R. A. Canters, M. M. Paulides, M. F. Franckena, J. van der Zee and G. C. van Rhoon, "Implementation of treatment planning in the routine clinical procedure of regional hyperthermia treatment of cervical cancer: An overview and the Rotterdam experience," *Int. J. Hyperthermia*, vol. 28, no. 6, pp. 570-581, 2012.

30. N. Goswami, Q. Yao, Z. Luo, J. Li, T. Chen and J. Xie, "Luminescent Metal Nanoclusters with Aggregation-Induced Emission," *J. Phys. Chem. Lett.*, 2016.

31. X. Wu, X. He, K. Wang, C. Xie, B. Zhou and Z. Qing, "Ultrasmall near-infrared gold nanoclusters for tumor fluorescence imaging in vivo," *Nanoscale*, vol. 2, no. 10, pp. 2244-2249, 2010.


32. M. Luna-Gutiérrez, G. Ferro-Flores, B. Ocampo-García, N. Jiménez-Mancilla, E. Morales-Avila,

---

D. León-Rodríguez and K. Isaac-Olivé, "<sup>177</sup>Lu-labeled monomeric, dimeric and multimeric RGD peptides for the therapy of tumors expressing  $\alpha(\nu)\beta(3)$  integrins," *J. Label. Compd. Radiopharm.*, vol. 55, no. 4, pp. 140-148, 2012.

## 7.2 Segundo Artículo

# Fluorescent, Plasmonic, and Radiotherapeutic Properties of the $^{177}\text{Lu}$ -Dendrimer-AuNP-Folate-Bombesin Nanoprobe Located Inside Cancer Cells

Molecular Imaging  
Volume 16 : 1-10  
© The Author(s) 2017  
Reprints and permission:  
sagepub.com/journalsPermissions.nav  
DOI: 10.1177/1536012117704768  
journals.sagepub.com/home/mix  


Héctor Mendoza-Nava, PhD<sup>1,2</sup>, Guillermina Ferro-Flores, PhD<sup>1</sup>, Flor de María Ramírez, PhD<sup>3</sup>, Blanca Ocampo-García, PhD<sup>1</sup>, Clara Santos-Cuevas, PhD<sup>1</sup>, Erika Azorín-Vega, PhD<sup>1</sup>, Nallely Jiménez-Mancilla, PhD<sup>4</sup>, Myrna Luna-Gutiérrez, PhD<sup>1</sup>, and Keila Isaac-Olivé, PhD<sup>2</sup>

## Abstract

The integration of fluorescence and plasmonic properties into one molecule is of importance in developing multifunctional imaging and therapy nanoprobes. The aim of this research was to evaluate the fluorescent properties and the plasmonic–photothermal, therapeutic, and radiotherapeutic potential of  $^{177}\text{Lu}$ -dendrimer conjugated to folate and bombesin with gold nanoparticles in the dendritic cavity ( $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-folate-bombesin) when it is internalized in T47D breast cancer cells. The intense near-Infrared (NIR) fluorescence emitted at 825 nm from the conjugate inside cells corroborated the usefulness of DenAuNP-folate-bombesin for optical imaging. After laser irradiation, the presence of the nanosystem in cells caused a significant increase in the temperature of the medium (46.8°C, compared to 39.1°C without DenAuNP-folate-bombesin,  $P < 0.05$ ), resulting in a significant decrease in cell viability (down to 16.51%  $\pm$  1.52%) due to the  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-folate-bombesin plasmonic properties. After treatment with  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-folate-bombesin, the T47D cell viability decreased 90% because of the radiation-absorbed dose (63.16  $\pm$  4.20 Gy) delivered inside the cells. The  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-folate-bombesin nanoprobe internalized in cancer cells exhibited properties suitable for optical imaging, plasmonic–photothermal therapy, and targeted radiotherapy.

## Keywords

lutetium-177, radiolabeled dendrimers, radiolabeled nanoprobe, multifunctional radiopharmaceuticals, heterobivalent molecules, breast cancer, dendrimers, gold nanoparticles

## Introduction

Different-sized gold nanoparticles (AuNPs) can be classified into molecular luminescent AuNPs (from 0.3 to 2 nm) and conventional plasmonic AuNPs (from 2 to 100 nm).<sup>1</sup> Luminescent AuNPs lack the characteristic surface plasmon resonance (SPR) due to the limited number of free electrons but can give a broad range of emissions from visible to near-Infrared (NIR) regions.<sup>1</sup> Due to their SPR, AuNPs can be used as localized heat sources for cancer treatment.<sup>2,3</sup> The photothermal conversion effect in AuNPs is based on the collective oscillations of the electrons under optical excitation, which provide strong localized heating when they are irradiated with a laser or exposed to a certain radio-frequency field.<sup>3–5</sup> The localized heating, reaching temperatures about of 700°C around AuNPs, causes irreversible thermal destruction of cancer tissues.<sup>6–8</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Materiales Radiactivos, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, Estado de México, Mexico

<sup>2</sup> Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Mexico

<sup>3</sup> Departamento de Química, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, Estado de México, Mexico

<sup>4</sup> CONACyT, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, Estado de México, Mexico

Submitted: 30/12/2016. Revised: 10/03/2017. Accepted: 21/03/2017.

### Corresponding Author:

Guillermina Ferro-Flores, Departamento de Materiales Radiactivos, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera México-Toluca S/N, La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México. C.P. 52750, México.  
Emails: ferro\_flores@yahoo.com.mx; guillermina.ferro@inin.gob.mx



Creative Commons CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

# Fluorescent, Plasmonic, and Radiotherapeutic Properties of the $^{177}\text{Lu}$ -Dendrimer-AuNP-Folate-Bombesin Nanoprobe Located Inside Cancer Cells

Héctor Mendoza-Nava<sup>1,4</sup>, Guillermina Ferro-Flores<sup>1,\*</sup>, Flor de María Ramírez<sup>2</sup>, Blanca Ocampo García<sup>1</sup>, Clara Santos-Cuevas<sup>1</sup>, Erika Azorín-Vega<sup>1</sup>, Nallely Jiménez-Mancilla<sup>3</sup>, Myrna Luna-Gutiérrez<sup>1</sup> and Keila Isaac-Olivé<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), Ocoyoacac, 52750, Estado de México.

<sup>2</sup>Departamento de Química. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, 52750, Estado de México.

<sup>3</sup>CONACyT. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, 52750, Estado de México, MEXICO.

<sup>4</sup>Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50180, MEXICO.

\*Corresponding author:

Guillermina Ferro-Flores, Ph.D.

Departamento de Materiales Radiactivos,

Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

Carretera México-Toluca S/N. La Marquesa,

Ocoyoacac, Estado de México. C.P. 52750, México.

Tel. + (52) (55)-53297200 ext. 13871,

guillermina.ferro@inin.gob.mx

**Abstract:** The integration of fluorescence and plasmonic properties into one molecule is of importance in developing multifunctional imaging and therapy nanoprobes. The aim of this research was to evaluate the fluorescent properties and the plasmonic-photothermal therapeutic and radiotherapeutic potential of  $^{177}\text{Lu}$ -dendrimer conjugated to folate and bombesin with gold nanoparticles in the dendritic cavity ( $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin) when it is internalized

in T47D breast cancer cells. The intense NIR fluorescence emitted at  $825\text{nm}$  from the conjugate inside cells corroborated the usefulness of DenAuNP-Folate-Bombesin for optical imaging. After laser irradiation, the presence of the nanosystem in cells caused a significant increase in the temperature of the medium ( $46.8^\circ\text{C}$ , compared to  $39.1^\circ\text{C}$  without DenAuNP-Folate-Bombesin,  $p < 0.05$ ) resulting in a significant decrease in cell viability (down to  $16.51 \pm 1.52\%$ ) due to the  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin plasmonic properties. After treatment with  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin, the T47D cell viability decreased 90% because of the radiation absorbed dose ( $63.16 \pm 4.20\text{Gy}$ ) delivered inside cells. The  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin nanoprobe internalized in cancer cells exhibited properties suitable for optical imaging, plasmonic-photothermal therapy and targeted radiotherapy.

**Keywords:** Lutetium-177; radiolabeled dendrimers; radiolabeled nanoprobe; multifunctional radiopharmaceuticals; heterobivalent molecules; breast cancer; dendrimers; gold nanoparticles.

### 7.2.1 Introduction

Different-sized gold nanoparticles (AuNPs) can be classified into molecular luminescent AuNPs (from  $0.3\text{to}2\text{nm}$ ) and conventional plasmonic AuNPs (from  $2$  to  $100\text{nm}$ )(1). Luminescent AuNPs lack the characteristic surface plasmon resonance (SPR) due to the limited number of free electrons, but can give a broad range of emissions from visible to NIR regions(1). Due to their SPR, AuNPs can be used as localized heat sources for cancer treatment (2, 3). The photothermal conversion effect in AuNPs is based on the collective oscillations of the electrons under optical excitation which provide strong localized heating when they are irradiated with a laser or exposed to a certain radiofrequency field(3-5). The localized heating, reaching temperatures about of  $700^\circ\text{C}$  around AuNPs, causes irreversible thermal destruction of cancer tissues (6-8).

The integration of fluorescence and plasmonic properties into one molecule is of importance in



developing multifunctional imaging and therapy nanoprobe (9, 10).

Lutetium-177 is a  $\beta^-$  and  $\gamma$  emitting radionuclide with a physical half-life of 162h (6.73 days). In the field of nuclear medicine, an in vivo theranostic approach combines the potential of both diagnosis and therapy in the same targeting molecule by labeling with either a diagnostic (e.g.  $^{68}\text{Ga}$ ) or a suitable therapeutic (e.g.  $^{177}\text{Lu}$ ) radionuclide (11, 12). Dendrimers are hyperbranched polymeric structures. Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers are spherical macromolecules composed of repeating polyamidoamine units which are known to have high in vivo stability(13, 14). **Unmodified cationic PAMAM dendrimers have been shown to be haemolytic, a property that was associated with their cationic nature. However, the construction of novel dendrimers with biocompatible components through the surface modification of commercially available dendrimers by PEGylation, acetylation, glycosylation, amino acid, vitamins and peptide functionalization, have solved the safety problem of dendrimer-based nanotherapeutics (13).**

Over the last two decades, several experimental evidences have suggested that the gastrin-releasing peptide (GRP) and other bombesin-like peptides act as growth factors in many types of cancer(15). Overexpression of gastrin-releasing peptide receptors (GRPR) is present in 96 % of breast cancer tissues(16). The overexpression of Folate receptor- $\alpha$  (FR $\alpha$ ) has been confirmed in all clinical breast cancer subtypes comprised of estrogen receptor positive (ER+), progesterone receptor positive (PR+), human epidermal growth factor receptor positive (HER2+), and triple negative (ER-, HER2-, PR-) tumors(17-19). Therefore, heterobivalent conjugates of bombesin and folate are expected to improve the recognition of breast cancer cells positive to FR and GRPR.

The multifunctional theranostic radiopharmaceutical composed of gold nanoparticles (size range: 1.0 – 2.9nm) entrapped within internal cavities of  $^{177}\text{Lu}/^{68}\text{Ga}$ -labeled PAMAM, and conjugated to target-specific molecules (bombesin and folate) at the periphery of the dendrimer, has been

recently synthesized as a potential optical and nuclear imaging agent for breast tumors, as well as for targeted radiotherapy and plasmonic photothermal therapy(20).

Nevertheless, fluorescent and plasmonic properties of radiopharmaceuticals based on gold nanoparticles can significantly differ from those observed *in vitro* due to the possible AuNP aggregation inside cells(21, 22) The aim of this research was to evaluate the fluorescent properties and the plasmonic photothermal therapeutic, and radiotherapeutic potential of the  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Dendrimer-AuNP-Folate-Bombesin ( $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin) nanoprobe when it is internalized in T47D breast cancer cells.

## 7.2.2 Experimental methods

### Preparation of $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin and DenAuNP-Folate-Bombesin

In this research, we used a  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin conjugate for which the carboxylate groups of bombesin and folic acid were covalently conjugated to the free amine groups of the dendrimer surface (20). Elemental analysis (EDS), particle size distribution (DLS), TEM analysis, UV-Vis, scanning electron microscopy (SEM) and X-ray analysis, infrared and fluorescence spectroscopies and radio-HPLC analyses, confirmed the dendrimer functionalization with high radiochemical purity ( $> 95\%$ ) (20). Briefly, p-SCN-Benzyl-DOTA ( $5.38\mu\text{mol}$ , Macrocyclics, Dallas, TX, USA) was conjugated in aqueous-basic medium (bicarbonate buffer,  $0.2\text{M}$ ,  $\text{pH}9.5$ ) to the G4-PAMAM-( $\text{NH}_2$ )<sub>64</sub> dendrimer ( $0.3\mu\text{mol}$ , Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, Missouri, USA). The carboxylate groups of  $\text{Lys}^1\text{Lys}^3(\text{DOTA})$ -bombesin ( $0.55\mu\text{mol}$ , piChem, Graz, Austria) and folic acid ( $2.27\mu\text{mol}$  Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, Missouri, USA), were activated with HATU in DMF/DIPEA and also conjugated to the terminal amine groups of the PAMAM-G4 dendrimer. The conjugate was mixed with  $1\%$   $\text{HAuCl}_4$  followed by the addition of  $\text{NaBH}_4$  and purified by ultrafiltration. A  $15\mu\text{L}$  aliquot ( $1.5\text{mg}/\text{mL}$ ) of the Dendrimer-AuNP-Folate-Bombesin

conjugate was diluted with 1M acetate buffer ( $35\mu\text{L}$ ,  $\text{pH}5$ ), followed by the addition of  $^{177}\text{LuCl}_3$  ( $20\mu\text{L}$ ,  $40\text{GBq/mL}$ ,  $> 3\text{TBq/mg}$ , ITG, Germany). The mixture was incubated at  $90^\circ\text{C}$  for  $30\text{min}$ . Radiochemical purity was  $> 95\%$  determined by size-exclusion radio-HPLC (ProteinPak 300SW, Waters,  $1\text{mL/min}$ , injectable grade water). This complex will be referred as  $^{177}\text{Lu}$  DenAuNP-Folate-Bombesin. Since radioactive material cannot be handled in TEM and fluorescent spectroscopy equipment, DenAuNP-Folate-Bombesin was used in these studies considering that few  $^{177}\text{Lu}$  atoms (traces) are present in the  $^{177}\text{Lu}$  DenAuNP-Folate-Bombesin system ( $\text{MW} \approx 30,000\text{g/mol}$ ).

### Cell culture

The T47D breast cancer cell line was originally obtained from the American Type Culture Collection (Atlanta, GA, USA). The cells were routinely cultured at  $37^\circ\text{C}$  with  $5\%$   $\text{CO}_2$  and  $85\%$  humidity in Roswell Park Memorial Institute medium (Sigma-Aldrich Co.) supplemented with  $10\%$  fetal bovine serum and antibiotics ( $100\text{U/mL}$  penicillin and  $100\mu\text{g/mL}$  streptomycin). These cells were selected since previously we have demonstrated an important uptake of  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin in T47D, which was significantly inhibited by pre-incubation with cold  $\text{Lys}^3$ -bombesin peptide or folic acid alone, indicating that the multifunctional system has specific recognition for GRPRs and FRs (20).

### Transmission Electron Microscopy (TEM)

TEM analyses were performed in order to corroborate the internalization of DenAuNP-Folate-Bombesin in T47D cells. Cells ( $5 \times 10^5$ ) were seeded into 6-well plates (Cyto-One, USA Scientific) for  $24\text{h}$  to allow adherence. DenAuNP-Folate-Bombesin was added to cells followed by  $1\text{h}$  of incubation at  $37^\circ\text{C}$ . The cells were washed three times with PBS, centrifuged into small pellets, and fixed with  $2\%$  glutaraldehyde and  $2\%$  paraformaldehyde (PFA) in sodium cacodylate buffer ( $0.1\text{M}$ ). The cells were further fixed with  $1\%$  osmium tetroxide in  $5\text{mM}$ -2-mercaptoethanol (phosphate-

mercaptoethanol buffer), dehydrated in graded acetone series and embedded in Epon-Spurr epoxy resin. Sections were cut at  $85\text{nm}$  using a diamond knife (Diatome, Hatfield PA). The sections were stained with Sato's triple lead stain and 5% aqueous uranyl acetate for organelle visualization. The prepared samples were examined on a JEOL 1400 TEM microscope (JEOL, Peabody, MA) operating at  $80\text{kV}$ .

### **Fluorescence imaging of DenAuNP-Folate-Bombesin inside cells**

T47D cells ( $2 \times 10^3$ ) were grown on glass cover slips and following treatment with Dendrimer (Den), Dendrimer-AuNP (DenAuNP) and DenAuNP-Folate-Bombesin, were rinsed with ice cold PBS, fixed in acetone and washed twice with PBS. After the addition of  $250\mu\text{L}$  ( $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of Hoechst (DNA stain), cells were incubated for  $1\text{min}$  at room temperature and rinsed with PBS before being mounted onto slides (ProLong Gold; Molecular Probes, Invitrogen Life Technologies, CA, USA). Hereinafter, the preparation of DenAuNP-Folate-Bombesin internalized in the T47D cells will be referred to as DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell. Images of the fluorescent AuNPs of DenAuNP-Cell and DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell were taken using an epifluorescent microscope (Meiji Techno MT6200, Saitama, Japan). Hoechst dye inside the nuclei was visualized with an excitation filter of  $330\text{--}385\text{nm}$  and using an emission filter of  $420\text{nm}$ . The AuNPs were detected by using an excitation filter of  $530\text{--}550\text{nm}$  and an emission filter of  $590\text{nm}$ .

### **X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)**

X-ray photoelectron spectra were acquired on a Thermo K-Alpha spectrometer equipped with an Al  $K_\alpha$  X-ray source ( $1486.68\text{eV}$ ). The source was calibrated using Au  $4f_{7/2}$  ( $84.0\text{eV}$ ) and Ag  $3d_{5/2}$  ( $368.2\text{eV}$ ) from foil samples. An argon ion beam was used for charge compensation in the samples. The DenAuNP-Folate-Bombesin and DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell samples were introduced into an ultra-high vacuum (UHV) chamber of the spectrometer ( $1 \times 10^{-7}$  to  $1 \times 10^{-8}\text{Pa}$ ) and measured

at 297K. The spot size in the beam was 200 $\mu$ m. 20 scans for Au4f were performed with an energy step size of 0.03eV. Survey spectra were measured in the range of 0 to 1320eV for DenAuNP-Folate-Bombesin (Fig.S1, Supplemental information) and DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell samples. The binding energies were referenced to the C1s peak at 285eV. Shirley background subtraction was applied to all spectra. High resolution spectrum was obtained for Au4f, C1s and O1s bands. The Au4f spectrum was statistically analyzed using the Origin 8.1 software. The best fit was achieved for four peaks with a multiplex model and the Gaussian function with a correlation factor  $R^2$  equals to 0.987 (DenAuNP-Folate-Bombesin), and for six peaks and the Lorentzian function with  $R^2 = 0.994$  for the DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell.

### **Fluorescence spectroscopy analysis of DenAuNP-Folate-Bombesin inside cells**

Emission fluorescence spectra at 291K of a) DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell sample, b) T47D cells + Hoechst (matrix emission), and c) T47D cell samples were recorded on a Perkin-Elmer LS-55 low-resolution luminescence spectrometer, from 200 to 900nm. All the samples were excited with wavelengths in the UV region to VIS region in order to distinguish between emission bands from the DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell and those from the cells and remaining Hoechst dye themselves, and to identify bands from Rayleigh and Raman scatterings of the excitation lights used as well as harmonics bands in the VIS region from emission bands in the UV region (see supplemental material). The best results for the three samples were obtained using excitation wavelengths ( $\lambda_{exc}$ ) of 222, 270, 300 and 510nm; emission filter of 290, 390, 430 and 515nm, and excitation and emission slits of 5nm and 50nm/min. To confirm some emission bands, excitation slit equals to 7nm and emission slit equals to 10nm were also tested. The source parameters were: Delay time (ms): 10, Gate time(ms): 20, Cycle time(ms): 33, Flash time: 3.

### **Photothermal plasmonic potential of DenAuNP-Folate-Bombesin inside cells**

T47D cells were incubated in a 96-well plate at a density of  $5 \times 10^3$  cells/well. The cells were cultured for 24h at  $37^\circ\text{C}$  with 5%  $\text{CO}_2$  and 85% humidity. Then, the culture medium was removed, the well plate was placed in a dry block heater at  $37^\circ\text{C}$  and the cells were exposed to one of the following treatments ( $n = 6$ ): (a)  $100\mu\text{L}$  of Den-Folate-Bombesin and  $100\mu\text{L}$  of PBS,  $\text{pH}7$  with irradiation ( $1.19\text{W}/\text{cm}^2$ ); (b)  $100\mu\text{L}$  of DenAuNP-Folate-Bombesin and  $100\mu\text{L}$  of PBS  $\text{pH}7$  with irradiation ( $1.19\text{W}/\text{cm}^2$ ); (c)  $100\mu\text{L}$  of distilled water (without nanoparticles) and  $100\mu\text{L}$  of PBS  $\text{pH}7$  with irradiation ( $1.19\text{W}/\text{cm}^2$ ), or (d) no treatment.

Laser irradiation in all experiments was conducted using a compact pulsed Nd:YAG laser (Q Smart 100, Quantel laser) pulsed for  $5\text{ns}$  at  $532\text{nm}$  ( $\text{energy} = 50\text{mJ}/\text{pulse}$ ) with a repetition rate of  $10\text{Hz}$ . The per-pulse laser power was measured using a Dual-Channel Joulemeter/Power Meter (Molelectron EPM 2000, Coherent). A diverging lens was used in the path of the laser beam such that the well plate was fully covered by the laser (diameter =  $7\text{mm}$ , area =  $0.38\text{cm}^2$ ). The irradiance at the well plate was then calculated as the laser power per pulse divided by the laser spot area. Irradiation was performed for  $6\text{min}$  while delivering  $1.19\text{W}/\text{cm}^2$  of average irradiance.

During laser irradiation, the temperature increase was measured using a type K thermocouple (model TPK-01) of immediate reaction that had been previously calibrated (probe diameter =  $0.8\text{mm}$ ). The thermocouple was introduced into the well and the temperature was registered each second using a cold-junction-compensated K-thermocouple to digital converter (MAX6675, Maxim Integrated TM) connected to a microcontroller board (Arduino Uno) with USB computer connection. After irradiation, the solution of each well was removed and replaced with fresh medium. The percentage of surviving cells in each well was evaluated by the spectrophotometric measurement of cell viability as a function of mitochondrial dehydrogenase activity, which involves the cleavage of the tetrazolium ring of sodium 3'-[1-[phenylaminocarbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis[4-methoxy-6-nitro] benzene sulfonic acid hydrate (XTT) in viable cells to yield orange formazan crystals that are dissolved in acidified isopropanol (XTT kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

The resulting absorbance of the orange solution was measured at 480nm in a microplate absorbance reader (Epoch TM, BioTek, VT, USA). The absorbance of the untreated cells was considered as 100 % of T47D cell viability.

### **Radiotherapeutic potential: cell dosimetry**

T47D cells were incubated in a 96-well plate at a density of  $5 \times 10^3$  cells/well for 24h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> and 85% humidity. Then, the culture medium was removed and the cells were exposed for 2h (at 37°C, with 5% CO<sub>2</sub> and 85% humidity) to one of the following treatments ( $n = 6$ ): (a) 100μL of <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> (74 kBq) and 100 μL of PBS, pH7; (b) 100 μL of <sup>177</sup>Lu-DenAuNP (74kBq) and 100 μL of PBS, pH7; (c) 100 μL of <sup>177</sup>Lu-DenAuNP-Folate-Bombesin (74kBq) and 100μL of PBS, pH7 or (d) no treatment.

After 2h, the solution in each well was removed and replaced with fresh culture medium. The cells were maintained for 3 days at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> and 85% humidity. After that, the percentage of cell viability in each well was evaluated using the XTT kit method, as described earlier. The absorbance of the untreated cells was considered as 100 % of T47D cell viability.

The calculation of absorbed dose in the cell was carried out by the MIRD methodology using the cell internalization factors for <sup>177</sup>Lu-DenAuNP-Folate-Bombesine and <sup>177</sup>Lu-DenAuNP previously reported by Mendoza et al.(20). The internalized activity is considered the initial activity  $A_0$ . From the calculation of the total number of disintegrations during 3 days, and the cell geometric factor (determined by Monte-carlo using PENELOPE) the absorbed dose was computed.

### **Statistical Analysis**

Comparisons between groups in laser irradiation and <sup>177</sup>Lu irradiation studies were made using the Student's t-test (significance was defined as  $P < 0.05$ ).

### 7.2.3 Results and Discussion

#### Transmission Electron Microscopy

Figure 7.10 shows that DenAuNP-Folate-Bombesin is internalized in T47D cells and exhibits vacuoles in the cell cytoplasm (Fig.7.10, top three panels) and on the cell membrane (Fig. 7.10, bottom two panels). This specific recognition and internalization into the cell cytoplasm is attributed to the biological behaviour conferred by Bombesin and Folate on the dendrimer surface which binds to GRPr and FR on the cell membrane(20, 23).

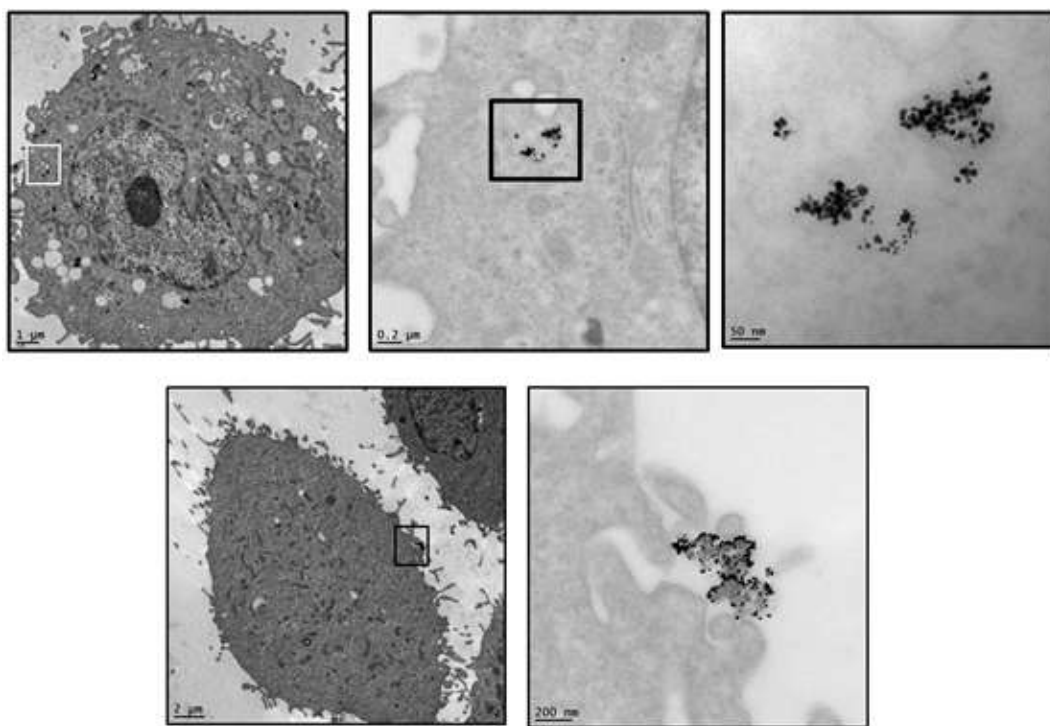


Figura 7.10: TEM micrographs. Top panels: intracellular uptake in T47D breast tumor cells treated with DenAuNP-Folate-Bombesin for 2h. Bottom panels: DenAuNP-Folate-Bombesin in membrane showing a vacuole formation.

#### XPS spectroscopy

The XPS spectra of Au4f core orbitals of the DenAuNP-Folate-Bombesin system (Fig.7.11a)



revealed four peaks corresponding to two doublets of the  $4f_{7/2}$  and  $Au4f_{5/2}$  orbitals of gold which are shifted to larger binding energies with respect to those of the bulk gold metal ( $Au^0$  atoms),  $84.0eV$  and  $87.6eV$ , ( $3.67$  separation) respectively. The separation of the first doublets was  $3.7eV$  and the second one was of  $3.8eV$ .  $Au4f_{7/2}$  peaks at  $84.3$  and  $84.6eV$  (shifted  $0.3$  and  $0.6eV$ ) with  $FWHM = 0.8eV$ , and  $Au4f_{5/2}$  at  $88.0$  and  $88.4eV$  (shifted  $0.4$  and  $0.8eV$ ) with  $FWHM = 1eV$ , indicate that in the DenAuNP-Folate-Bombesin system, the encapsulated AuNPs are interacting with the amides and amines of the dendritic cavity with different degrees of strength because of the AuNP sizes that are between  $2.1nm$  and  $2.9nm$  (20) and the coexistence of  $Au^0$  and any oxidized form. The treatment of the XPS spectrum and the extent of the shift suggest the presence of the AuNPs with the shorter diameter or/ and the  $Au^{1+}$  oxidation state in the surface in about 20%. The shift of core  $Au4f$  electron peaks is inversely proportional to the grain size(24). In AuNP-S-derivatives, where sulphur atoms are covalently bonded to AuNP, the peak of  $Au1+$  shifted significantly between  $0.8 - 2.0eV$  with respect to the  $Au^0$  peak position. The coexistence of  $Au^0$  and  $Au^{1+}$  atoms in the encapsulated AuNPs (diameter  $2.5 \pm 0.4nm$ ), and the stabilization that the conjugated dendrimer affords to the system, explain the particular fluorescence-plasmonic properties observed in the studied samples.

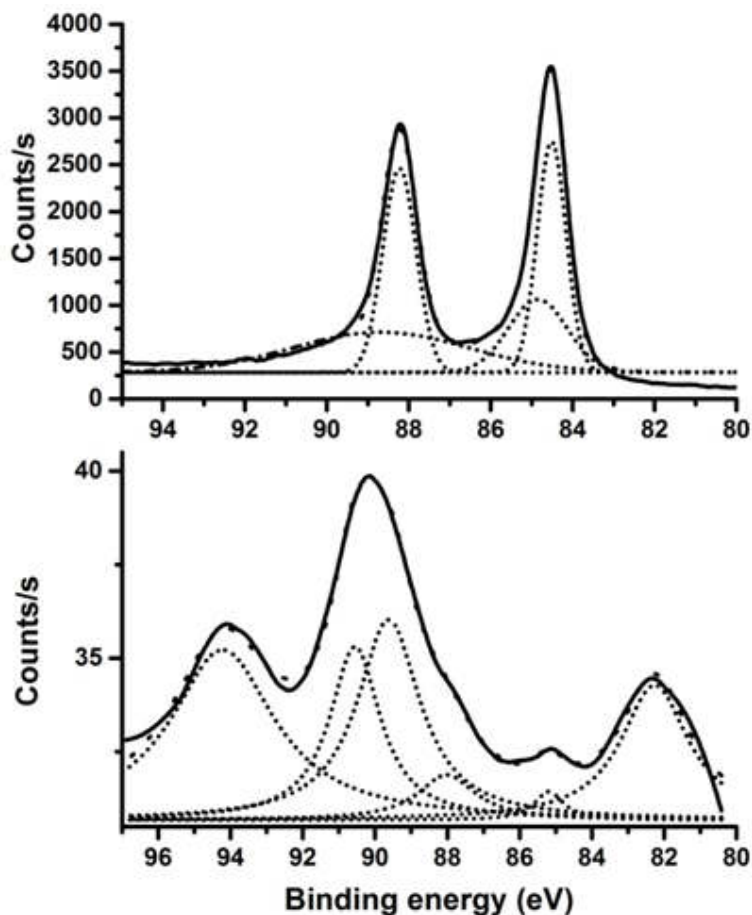


Figura 7.11: High resolution XPS spectra of the Au4f core orbitals of a) DenAuNP-Folate-Bombesin and b) DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell.

DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell sample presented a particular XPS spectrum (Fig.7.11b). The positions of the peaks indicate the presence of 4 defined Au peaks centered at 82.3, 85.2, 89.6 and 94.2 eV but the multipeak model using the Lorentzian function revealed two additional peaks on the left side (88.0 eV) and right side (90.6 eV) of the peak at 89.6 eV. The large shifts with respect to DenAuNP-Folate-Bombesin definitely point to a strong interaction of the conjugate system with the cells, which demonstrate that the conjugate was internalized in the cell where it is not homogeneously distributed and then exposed to different types of interaction with the cell. The 4f<sub>7/2</sub> peak is

located at  $85.2\text{eV}$  and  $4f5/2$  at  $89.6\text{eV}$  which has been associated to  $\text{Au}^{1+}$  with shifts of  $0.9$  and  $1.6\text{eV}$  with respect to the conjugate system before contact with the cell. This shift can also be due to the interaction of the encapsulated AuNPs with the amine and amide groups of cell proteins. However, the  $4f5/2$  peak is the most intense and broader than the  $4f7/2$  peak because of the contribution of the two peaks found by the fitting. This is an anomaly, since usually the  $4f5/2$  is less intense than the  $4f7/2$  peak. The band at  $88.00\text{eV}$  is associated to  $\text{Au}^0$  but the other one seems to be an oxidized form of Au. The band at  $82.3\text{eV}$  is too low in energy to correspond to  $\text{Au}^0$  and that at  $94.2\text{eV}$  is too high for  $\text{Au}^{1+}$  oxidation states. This brings us to propose that once the DenAuNP-Folate-Bombesinis inside the cell, several interactions of the conjugate with anion- and cation-transport cellular processes occur, which leads to chemical changes in the surface of the encapsulated AuNPs. Gold can have less common oxidation states such as  $-1$ ,  $+2$  and  $+5$ . Therefore, it would be possible that  $\text{Au}^0$  atoms could be reduced to  $\text{Au}^{-1}$  atoms (auride anion), which is relatively stable due to the very high Pauling electronegativity of gold, and its ability to form salts with Ca, K, Cs, Rb(25) and be oxidized to oxidation states higher than  $\text{Au}^{1+}$  ions (possibly  $2+$  and  $3+$  oxidation state). The presence of remaining  $\text{Au}^0$  atoms and electrons from the  $\text{Au}^{1-}$  atoms on the surface of the encapsulated AuNPs (diameter  $2.5 \pm 0.4\text{nm}$ ) did not allow the plasmonic resonance band to extinguish in the DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell sample.

### Fluorescence spectroscopy

The analysis of spectra recorded under different excitation wavelengths and emission filters allowed the discarding of emission bands from the cells and Hoechst dye, excitation light scatterings and harmonic bands in the VIS-NIR region (which are broad usually) from the emission band in the UV region.

In Figure 7.12, is presented the fluorescence emission spectrum of the DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell (Fig. 7.12a) comparatively to that of the DenAuNP-Folate-Bombesin conjugate (Fig. 7.12b)

obtained under the same experimental conditions. Regardless of the extent of the intensities, the intensity ratio of the UV/VIS-NIR bands of Figure 7.12a changed with respect to that of Figure 7.12b and bands enveloped in the spectrum of the latter are revealed in the former. From 200 – 500nm, the emission bands correspond to the organic components such as the functionalized dendrimer, the cells and the Hoechst dye. Main bands in the VIS-NIR region(525 to 900nm) of Figure 7.12b are clearly revealed in Figure 7.12a though slightly shifted. This points to the interaction of the DenAuNP-Folate-Bombesin with the cell. However, a sharp intense band at 825nm is revealed. This lead to search of the origin of such a band. It was found that this band does not correspond to any scattered excitation light nor to first harmonic bands from the emission bands of the sample (for this test, the emission slit was larger than the excitation slit, Fig. S2, supplemental information) since it is present in the DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell sample at the same position ( $\pm 2nm$ ) for all experimental conditions (Fig. 7.12a, Fig. 7.13 and Fig. S2 in supplemental information). It was seen as a poor band in the T47D cells and Hoechst dye spectra, and the relationship between them is probably that imines, imide or imidazole groups are present in proteins and dyes such as Hoechst. The DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell spectrum reveals more pronounced bands in the VIS (valence state effect) and NIR (surface ligand effect) regions than the DenAuNP-Folate-Bombesin, which indicates its internalization in T47D cells.

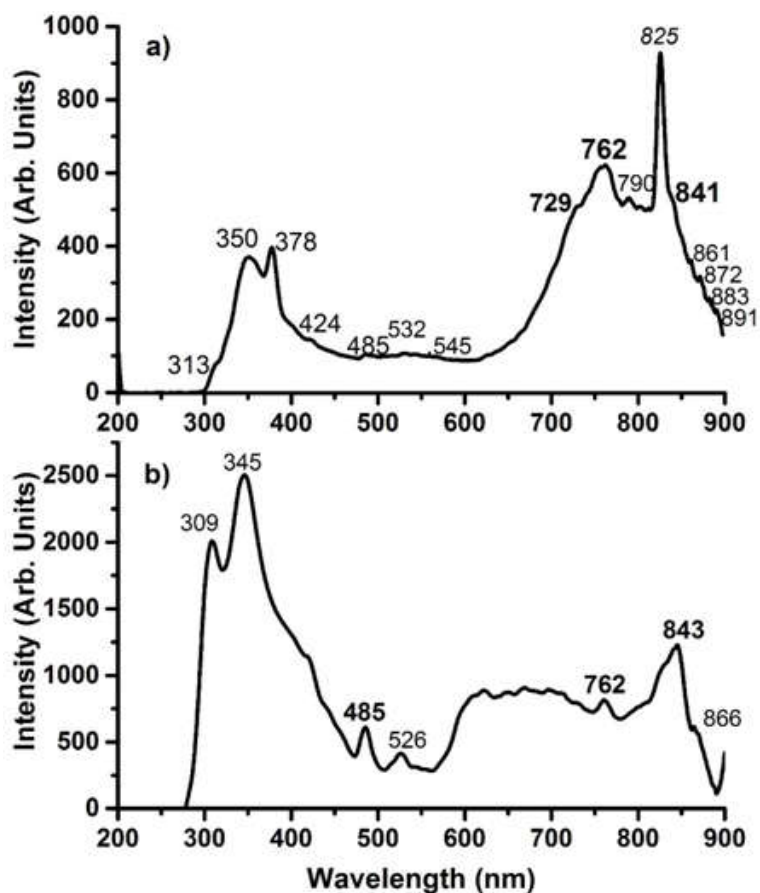


Figura 7.12: Fluorescence emission spectra of a) DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell, b) DenAuNP-Folate-Bombesin. Excitation wavelength: 222 nm, Filter 290 nm. Excitation and emission slits: 5 nm.

In Figure 7.13, the fluorescence emission spectra in the VIS-NIR region (525 to 900nm) excited at 510nm and with variable emission filters of a) DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell sample, b) T47D cells + Hoechst, and c) Hoechst, are presented. The spectra from 200 to 900nm are given in Figs. S3 and S4 of the supplemental information. In the spectra of the three samples (Fig S3, S4), a shoulder at about 461nm is observed, which corresponds to the fluorescence emission of the Hoechst dye. However, this emission is not the origin of the sharp band observed at 825nm because the Stokes shift would be too large for any energy transfer and neither corresponds to a harmonic band since these would appear beyond 900nm. Figure 7.13 reveals an enhanced

luminescence in the NIR region with a  $515nm$  emission filter and the sharp band at  $825nm$  was the most intense at this condition. The emission filters did not diminish intensity in the a) DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell sample but disappeared in the b) T47D cells + Hoechst sample and it was negligible in the c) Hoechst sample. The results demonstrated that DenAuNP-Folate-Bombesin was internalized in the cell, and that the encapsulated stabilized AuNP of the DenAuNP-Folate-Bombesin system transfers its emission energy to a excited emission level already present in a component of the T47D cell proteins (receptors), where it is harvested and then re-emitted with greater intensity. The emission bands from the DenAuNP-Folate-Bombesin system between  $650 - 770nm$  can act as an energy emission donor. However, in the T47D cells the energy emission acceptor is the defined sharp band at  $825nm$  since being of low intensity became the most intense band excited at  $510nm$  with a  $515nm$  emission filter (Fig. 7.13b) and excited at  $222nm$  with a  $290nm$  emission filter (Fig. 7.12a). The enhanced emission fluorescence spectra of the DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell sample under two extreme excitation light sources and those emission filters demonstrate that DenAuNP-Folate-Bombesin acts as a whole in the cells. The Stokes shifts between the bands in the  $650 - 770nm$  interval and that at  $825nm$ , would be from  $55$  to  $175nm$  and point to a FRET mechanism in the energy transfer of DenAuNP-Folate-Bombesin to T47D cells (Förster resonance energy or fluorescence resonance energy transfer,(26-28)) since the emission bands of DenAuNP-Folate-Bombesin are poorly shifted ( $1 - 3nm$ ) and the typical Förster distance for FRET ( $R_o = 1 - 100nm$ ) had to be fulfilled in DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell.

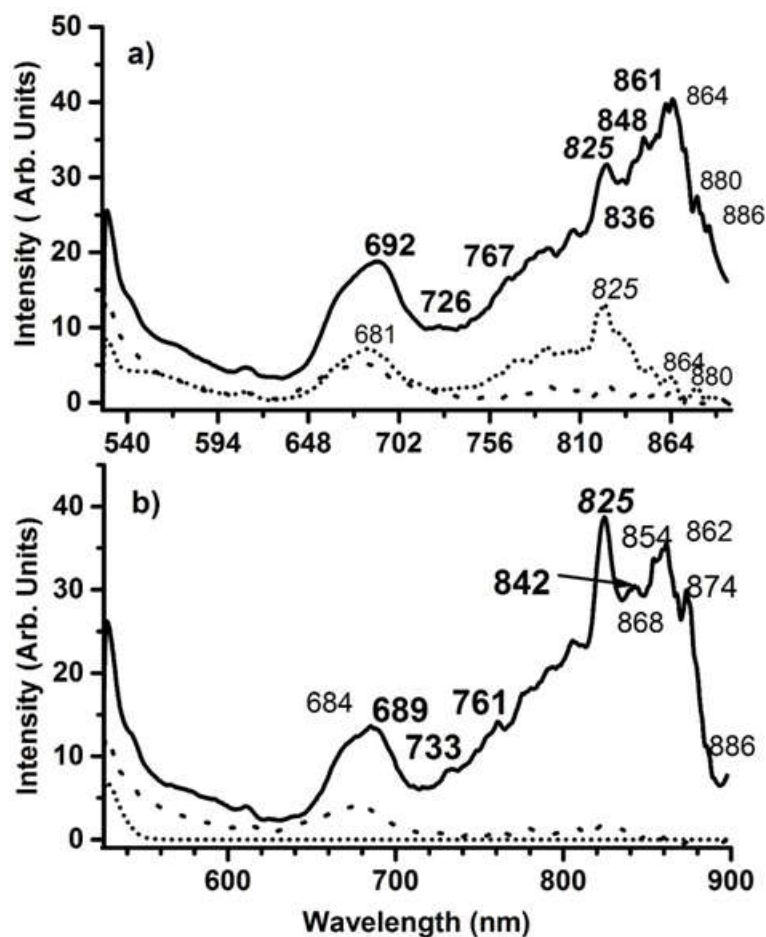


Figura 7.13: a) Fluorescence emission spectra in the VIS-NIR region of DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell sample; Hoechst dye in cells (short dot line) and Hoechst dye (dot line). Excitation wavelength: 510nm. Emission filter: 290nm. b) Fluorescence emission spectra in the VIS-NIR region of DenAuNP-Folate-Bombesin-Cell sample. Hoechst dye in cells (short dot line) and Hoechst dye (dot line). Excitation wavelength: 510nm. Emission filter: 515nm.

Small luminescent AuNPs (1.5-3.0nm) can emit in the VIS region (valence state effect) and in the NIR region (surface ligand effect). This is the case of the DenAuNP-Folate-Bombesin, where the encapsulated AuNP has a diameter size between 2.1 to 2.9nm(20). The optical properties of the AuNPs are enhanced by their encapsulation in such a functionalized dendrimer because of the conformation and stabilization afforded by the macromolecule whose dendritic cavity interacts with

AuNP through the tertiary amines and secondary amides. As a result of this interaction, about 16 % of Au<sup>0</sup> atoms are oxidized to Au<sup>1+</sup> atoms (see XPS section) and the resulting luminescence (fluorescence) is significant, the rest are Au<sup>0</sup> atoms (enough electron charge density), which is the main reason why the SPR band is still seen as a defined shoulder in the UV/VIS absorption spectrum but shifted to higher energy (aprox. 510 – 515nm) because of the small size of the AuNPs. It has been demonstrated that the SPR band of AuNP typically observed at 520nm shifts to lower or higher energy in an inversely-proportional mode to nanoparticle size (29). In fact it has been reported that an entrapped AuNP in a functionalized Dendrimer. G5(Au-TOS-FA-DENPs) with AuNP size of 3.3nm, enhanced its luminescence and maintained its SPR at 520nm(30). Every day new theoretical and experimental evidences appear, which demonstrate that AuNPs of diameters sizes between 1.5 – 4nm are luminescent, that the SPR does not disappear and that those with larger size where the SPR effect predominates, also present luminescence. Although the fluorescence-plasmonic properties of AuNPs are dominated by the valence states of gold atoms and their particle sizes, it is clear from the above evidence that the type and extent of their chemical environments can modify photophysical properties of AuNPs systems significantly.

### **Fluorescence imaging**

Fluorescence images corroborate TEM results, demonstrating that DenAuNP-Folate-Bombesin is internalized in the cell. In this figure, the fluorescence of the nanoconjugate is seen as bright red dots which are localized either in the nuclei or in the cytoplasm of the cell. The fluorescence spectra of DenAuNP-Folate-Bombesin-Cellsample (Fig. 7.13) reveal emissions in the near-infrared region when it is excited at 510nm and 222nm. The emission bands between the 650 – 850nm region are responsible for the visualization of the nanoparticles in the fluorescence imaging (Fig. 7.14), under the recording conditions employed.



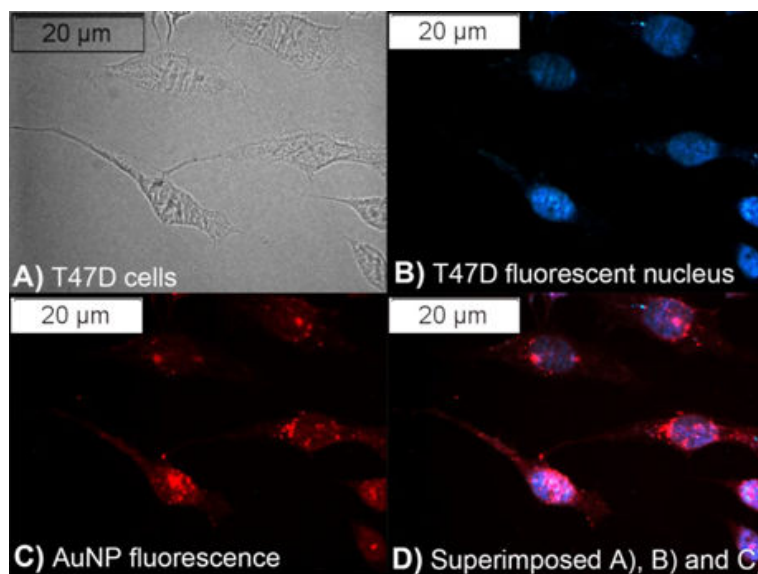


Figura 7.14: A representative microscopic field (40X) of T47D cells A) in phase contrast, B) the Hoechst stained nucleus, C) the DenAuNP-Folate-Bombesin emission after 530nm excitation, and D) the merged nuclear and AuNP fluorescence images.

### Effect of laser irradiation on cell viability

Figure 7.15 shows that the presence of gold nanoparticles in the dendrimer significantly increased the temperature of the medium after laser irradiation ( $46.8^{\circ}\text{C}$ , compared to  $39.1^{\circ}\text{C}$  without AuNP within the dendrimer,  $p < 0.05$ ). As expected, the increase in temperature of Den-Folate-Bombesin was similar to the control sample (PBS), which indicates that changes in temperature are only determined by the presence of gold nanoparticles within the dendrimer in the medium.

The effect of the temperature increase (plasmonic photothermal potential) in the studied treatments after laser irradiation is shown in Figure 7.15.

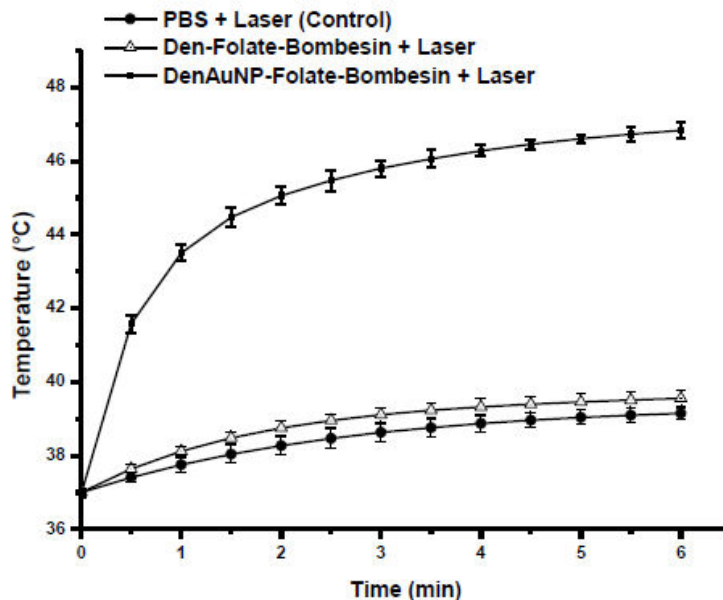


Figura 7.15: Medium temperature increase after laser irradiation of T47D cells incubated on the presence of Den-Folate-Bombesin, DenAuNP-Folate-Bombesin and a control solution (irradiance  $1.1926W/cm^2$ ).

The DenAuNP-Folate-Bombesin system caused a significant decrease in cell viability ( $p < 0.05$ ) down to  $16.51\% \pm 1.52\%$  by the end of treatment (6 minutes) when compared with Den-Folate-Bombesin ( $80.1\% \pm 2.28\%$ ) (Fig. 7.16). This result corroborated that the release of heat due to the nanoparticle (the expected temperature around each nanoparticle is  $700^\circ C$ ) in the cytoplasm and nucleus of T47D cells is the reason for the significant reduction in cell viability, and not just the temperature increase in the medium during those few minutes.

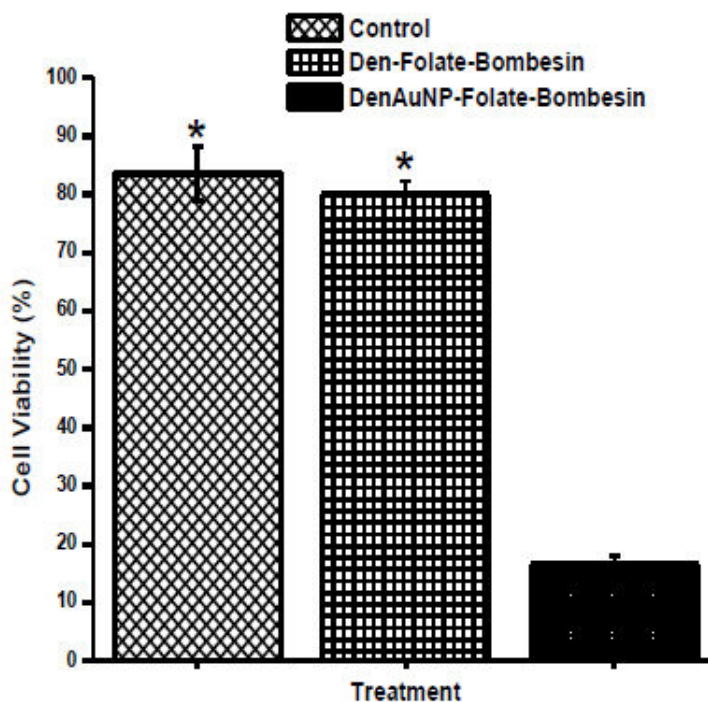


Figura 7.16: Effect on viability of T47D cells incubated on the presence of Den-Folate-Bombesin, DenAuNP-Folate-Bombesin and the control after laser heating (irradiance  $1.1926W/cm^2$ ). \*Statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) versus DenAuNP-Folate-Bombesin

Several trials have demonstrated a significant improvement in the clinical outcome when radiotherapy was conducted under hyperthermic conditions in patients. Hyperthermia increases the efficacy of radiotherapy by improving tumor oxygenation and interfering with the DNA repair mechanisms. However, the current techniques for hyperthermia induction display low spatial selectivity in the tissues heated. Lasers have been used to induce hyperthermia and spatial selectivity can be improved by adding gold nanoparticles within the dendrimer to the tissue to be treated. By exposing nanoparticles within the dendrimer to laser irradiation, it is possible to heat a localized area in the targeted cell without any harmful heating to the surrounding healthy tissues. The previous studies using AuNP for hyperthermia have demonstrated that the functionalization of AuNPs with probe molecules improves the particle accumulation in cell models significantly(7, 8). In

this study, we have demonstrated that the system DenAuNP-Folate-Bombesin significantly reduces T47D breastcancer cell viability in comparison with Den-Folate-Bombesin after laser irradiation.

### **Radiotherapeutic potential**

As shown in Figure 7.16, the three studied treatments reduced the T47D cell viability, being significantly inhibited by  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin ( $p < 0.05$ ). This effect is attributable to the greater T47D cell internalization of  $\beta^-$  particles due to the folate and bombesin moiety.  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP does not affect cell viability as much as  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin but is higher than  $^{177}\text{LuCl}_3$ .  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP can be internalized in the cell by passive endocytosis, while  $^{177}\text{LuCl}_3$  should not undergo cell internalization. The results of the cell viability (Fig. 7.16) indicate that  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin is about 4 times more lethal than  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP. This experimental value is in accordance with the theoretical calculation of the absorbed dose shown in 7.1, where the absorbed dose of  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin is 4 times greater than that of  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP. For absorbed dose calculation (Table 1), in each treatment an activity of  $14.8\text{Bq/cell}$  ( $74\text{kBq}/5000$  cells) was used and the percentage of cell internalization of approximately 41 % ( $6.07\text{Bq/cell}$ ) for  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin and 9.8 % ( $1.45\text{Bq/cell}$ ) for  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP was considered as reported by Mendoza et al., with the consequent delivery of a therapeutic dose. The factor 4 : 1 obtained from the internalization fraction between  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folate-Bombesin and  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP is in accordance with the lethality factor (4 : 1) and with the absorbed dose calculation (4 : 1).

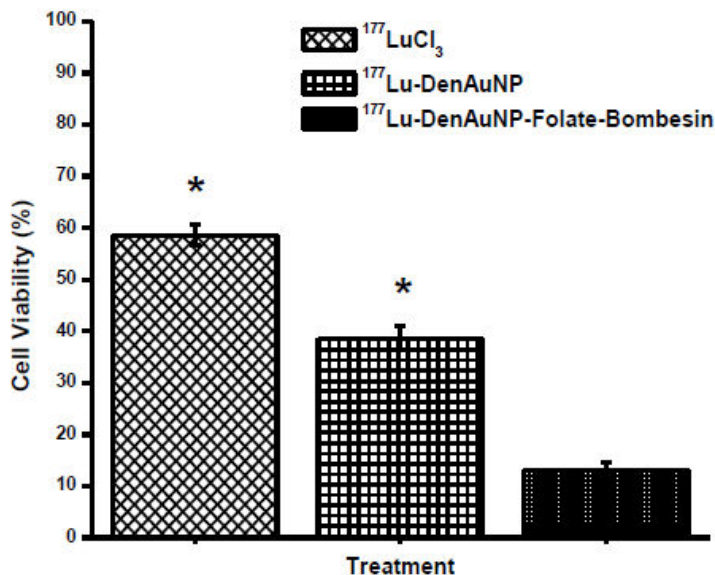


Figura 7.17: Effect of the radiation dose of  $^{177}\text{LuCl}_3$ ,  $^{177}\text{Lu-DenAuNP}$  and  $^{177}\text{Lu-DenAuNP-Folate-Bombesin}$  on T47D cell viability. \*Statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) versus  $^{177}\text{Lu-DenAuNP-Folate-Bombesin}$ .

System	Source Region	Target Region	Total Disintegrations ( $Bq * s$ ) inside T47D Cells in 3 Days $\int_0^{t=3days} A(t) dt$	Absorbed Dose Per Disintegration ( $Gy/Bq * s$ )	Absorbed Dose, $Gy$
$^{177}\text{LuDenAuNP}$	Cell	Cell	323 295	$4.67 \times 10^{-5} \pm 3.11 \times 10^{-6}$	$15.10 \pm 1.10$
$^{177}\text{LuDenAuNP-Folate-Bombesin}$			1 352 561		$63.16 \pm 4.20$

Tabla 7.1: Total number of disintegrations and mean absorbed doses of  $^{177}\text{Lu}$  internalized in T47D cancer cells within 3 days (Monte Carlo simulation, PENELOPE 2008).

### 7.2.4 Conclusions

The  $^{177}\text{Lu-DenAuNP-Folate-Bombesin}$  nanosystem internalized in cancer cells exhibited properties suitable for optical imaging, plasmonic-photothermal therapy and targeted radiotherapy.

### 7.2.5 Acknowledgments

This study was supported by the Mexican National Council of Science and Technology (CONACYT-SEP-CB-2014-01-242443). This research was carried out as part of the activities of the "Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos, CONACyT".

We thank Mr. Rafael Basurto for his contribution with the XPS analysis.

### 7.2.6 References

1. Zhou C, Yang S, Liu J, Yu M, Zheng J. Luminescent gold nanoparticles: a new class of nanoprobe for biomedical imaging. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013 Nov 1;238(11):1199-209. PubMed PMID: 24108449. Epub 2013/10/11. eng.
2. Fay BL, Melamed JR, Day ES. Nanoshell-mediated photothermal therapy can enhance chemotherapy in inflammatory breast cancer cells. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:6931.
3. Wang L, Xu Y, Chen C. Near-infrared light-mediated gold nanoplatforms for cancer theranostics. *Advances in Nanotheranostics I: Springer*; 2016. p. 3-52.
4. Sanchez-Hernandez L, Ferro-Flores G, Jimenez-Mancilla NP, Luna-Gutierrez MA, Santos-Cuevas CL, Ocampo-Garcia BE, et al. Comparative effect between laser and radiofrequency heating of RGD-gold nanospheres on MCF7 cell viability. *J Nanosci Nanotechnol*. 2015;15(12):9840-8.
5. Mendoza-Nava H, Ferro-Flores G, Ocampo-Garcia B, Serment-Guerrero J, Santos-Cuevas C, Jimenez-Mancilla N, et al. Laser heating of gold nanospheres functionalized with octreotide: in vitro effect on HeLa cell viability. *Photomed Laser Surg*. 2013;31(1):17-22.
6. Letfullin RR, Iversen CB, George TF. Modeling nanophotothermal therapy: kinetics of thermal ablation of healthy and cancerous cell organelles and gold nanoparticles. *Nanomedicine*.

2011;7(2):137-45.

7. Luna-Gutierrez M, Ferro-Flores G, Ocampo-Garcia BE, Santos-Cuevas CL, Jimenez-Mancilla N, Leon-Rodriguez D, et al. A therapeutic system of  $^{177}\text{Lu}$ -labeled gold nanoparticles-RGD internalized in breast cancer cells. *J Mex Chem Soc.* 2013;57(3):212-9.

8. Jimenez-Mancilla N, Ferro-Flores G, Santos-Cuevas C, Ocampo-Garcia B, Luna-Gutierrez M, Azorin-Vega E, et al. Multifunctional targeted therapy system based on  $^{99\text{mTc}}$ / $^{177}\text{Lu}$ -labeled gold nanoparticles-Tat (49-57)-Lys3-bombesin internalized in nuclei of prostate cancer cells. *J Labelled Comp Radiopharm.* 2013;56(13):663-71.

9. Ferro-Flores G, E Ocampo-Garcia B, L Santos-Cuevas C, Morales-Avila E, Azorin-Vega E. Multifunctional radiolabeled nanoparticles for targeted therapy. *Curr Med Chem.* 2014;21(1):124-38.

10. Cantelli A, Battistelli G, Guidetti G, Manzi J, di Giosia M, Montalti M. Luminescent gold nanoclusters as biocompatible probes for optical imaging and theranostics. *Dyes and Pigments.* 2016;doi:10.1016/j.dyepig.2016.06.019.

11. Ferro-Flores G, Ocampo-Garcia BE, Santos-Cuevas CL, de Maria Ramirez F, Azorin-Vega EP, Melendez-Alafort L. Theranostic Radiopharmaceuticals Based on Gold Nanoparticles Labeled with ( $^{177}\text{Lu}$ ) and Conjugated to Peptides. *Curr Radiopharm.* 2015;8(2):150-9. PubMed PMID: 25771363. Epub 2015/03/17. eng.

12. Banerjee S, Pillai M, Knapp F. Lutetium-177 therapeutic radiopharmaceuticals: linking chemistry, radiochemistry, and practical applications. *Chem Rev.* 2015;115(8):2934-74.

13. Astruc D, Boisselier E, Ornelas C. Dendrimers designed for functions: from physical, photophysical, and supramolecular properties to applications in sensing, catalysis, molecular

electronics, photonics, and nanomedicine. *Chem Rev.* 2010 Apr 14;110(4):1857-959. PubMed PMID: 20356105. Epub 2010/04/02. eng.

14. Orocio-Rodriguez E, Ferro-Flores G, Santos-Cuevas CL, Ramirez FM, Ocampo-Garcia BE, Azorin-Vega E, et al. Two Novel Nanosized Radiolabeled Analogues of Somatostatin for Neuroendocrine Tumor Imaging. *J Nanosci Nanotechnol.* 2015 Jun;15(6):4159-69. PubMed PMID: 26369025. Epub 2015/09/16. eng.

15. Sancho V, Di Florio A, Moody TW, Jensen RT. Bombesin receptor-mediated imaging and cytotoxicity: review and current status. *Curr Drug Deliv.* 2011;8(1):79-134.

16. Dalm SU, Martens JW, Sieuwerts AM, van Deurzen CH, Koelewijn SJ, de Blois E, et al. In vitro and in vivo application of radiolabeled gastrin-releasing peptide receptor ligands in breast cancer. *J Nucl Med.* 2015 May;56(5):752-7. PubMed PMID: 25791989. Epub 2015/03/21. eng.

17. Necela BM, Crozier JA, Andorfer CA, Lewis-Tuffin L, Kachergus JM, Geiger XJ, et al. Folate Receptor- $\alpha$  (FOLR1) Expression and Function in Triple Negative Tumors. *PloS one.* 2015;10(3):e0122209.

18. O'Shannessy DJ, Somers EB, Maltzman J, Smale R, Fu Y-S. Folate receptor alpha (FRA) expression in breast cancer: identification of a new molecular subtype and association with triple negative disease. *SpringerPlus.* 2012;1(1):1-9.

19. Zhang Z, Li P, Chen H, Wei B, Xiao X, Da J, et al. Folate Receptor [alpha] Associated With Triple-Negative Breast Cancer and Poor Prognosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(7):890-5.

20. Mendoza-Nava H, Ferro-Flores G, Ramírez FdM, Ocampo-García B, Santos-Cuevas C, Aranda-Lara L, et al.  $^{177}\text{Lu}$ -Dendrimer Conjugated to Folate and Bombesin with Gold Nanoparticles in the Dendritic Cavity: A Potential Theranostic Radiopharmaceutical. *J Nanomaterials.* 2016;Article



ID 1039258:<http://dx.doi.org/10.1155/2016/1039258>.

21. Goswami N, Yao Q, Luo Z, Li J, Chen T, Xie J. Luminescent Metal Nanoclusters with Aggregation-Induced Emission. *J Phys Chem Lett.* 2016;7(6):962-75.
22. Wang S-H, Lee C-W, Pan M-Y, Hsieh S-Y, Tseng F-G, Wei P-K. Chromatogram analysis on revealing aggregated number and location of gold nanoparticles within living cells. *Plasmonics.* 2015;10(4):873-80.
23. Aranda-Lara L, Ferro-Flores G, Azorin-Vega E, Ramirez FM, Jimenez-Mancilla N, Ocampo-Garcia B, et al. Synthesis and evaluation of Lys(alpha,gamma-Folate)Lys(Lu-DOTA)-Bombesin(1-14) as a potential theranostic radiopharmaceutical for breast cancer. *Appl Radiat Isot.* 2016 Oct 28;107:214-9. PubMed PMID: 26545016. Epub 2015/11/07. Eng.
24. Zheng J, Zhou C, Yu M, Liu J. Different sized luminescent gold nanoparticles. *Nanoscale.* 2012;4(14):4073-83.
25. Jansen M. Effects of relativistic motion of electrons on the chemistry of gold and platinum. *Solid State Sci.* 2005;7(12):1464-74.
26. Surujpaul PP, Gutierrez-Wing C, Ocampo-García B, Ramirez FdM, de Murphy CA, Pedraza-Lopez M, et al. Gold nanoparticles conjugated to [Tyr 3] octreotide peptide. *Biophys Chem.* 2008;138(3):83-90.
27. Oh E, Hong M-Y, Lee D, Nam S-H, Yoon HC, Kim H-S. Inhibition assay of biomolecules based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) between quantum dots and gold nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2005;127(10):3270-1.
28. Kraayenhof R, Visser AJ, Gerritsen H. Fluorescence spectroscopy, imaging and probes: new tools in chemical, physical and life sciences: Springer Science & Business Media; 2012.

- 
29. Huang X, El-Sayed MA. Gold nanoparticles: optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *J Adv Res.* 2010;1(1):13-28.
30. Zhu J, Zheng L, Wen S, Tang Y, Shen M, Zhang G, et al. Targeted cancer theranostics using alpha-tocopheryl succinate-conjugated multifunctional dendrimer-entrapped gold nanoparticles. *Biomaterials.* 2014;35(26):7635-46.

## Capítulo 8

# Discusiones Generales

La síntesis del radiofármaco teragnóstico  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bz-SCN-Folato-Lys<sup>1</sup>Lys<sup>3</sup> (DOTA)Bombesina-Dendrímtero-AuNPs [ $^{177}\text{Lu-DenAuNP-Folato-Bombesina}$ ] se efectuó en distintas fases. Como primera etapa se conjugaron las moléculas de reconocimiento mediante la reacción de los grupos aminos primarios sobre la superficie del dendrímtero con los grupos carboxilato del [**Folato**] y Lys<sup>1</sup>Lys<sup>3</sup>(DOTA)-Bombesina [**Bombesina**]. La molécula p-SCN-Bz-DOTA [**DOTA**] también se conjugó con dendrímtero como un agente quelante bifuncional para  $^{177}\text{Lu}$ . Como segunda etapa se sinterizaron las nanopartículas de oro (AuNPs) dentro del dendrímtero por reducción química usando una solución de  $\text{NaBH}_4$ . El producto final se purificó por ultrafiltración y se liofilizó, obteniéndose un sólido amarillento.

Posterior a la síntesis el compuesto fue caracterizado por espectroscopia IR-FT y UV-Vis, microscopia TEM y SEM, se analizó la estabilidad del compuesto mediante el potencial Z, se corroboró el tamaño de sistema mediante DLS y se caracterizaron la propiedades fluorescentes del conjugado.

La estructura del espectro IR del conjugado muestra bandas bien definidas, correlacionadas con las del Folato Bombesina y dendrímero pero características del nuevo compuesto debido a los cambios de altas o bajas energías aumentando la intensidad de las bandas. En el nuevo conjugado el carbonilo de la nueva amida define una nueva banda centrada en  $838\text{ cm}^{-1}$ . En presencia de AuNPs, las bandas vibracionales ( $1102$ ,  $1051$ ,  $1029\text{ cm}^{-1}$ ) que se corresponden con el dendrímero multifuncional son más fuertes como resultado del cambio de simetría molecular.

Del estudio de fluorescencia realizado al nanoconjugado se observó que el dendrímero por sí solo muestra una intensidad de fluorescencia baja. La conjugación del Folato y Bombesina desfavorece la fluorescencia del compuesto con una reducción en la intensidad. Es notable el incremento en la intensidad de fluorescencia del compuesto cuando se incorporan las AuNps en el conjugado con un incremento uniforme en las bandas características y la aparición nuevas bandas en la región de  $600$  a  $900\text{ nm}$ . con una banda muy pronunciada centrada en  $843\text{ nm}$ .

Las imágenes de SEM mostraron que el sistema DenAuNP-folato-bombesina tiene una estructura granular y homogénea. El análisis elemental por rayos X indicó la presencia de oro en el compuesto y los elementos característicos del compuesto lo que es congruente con lo esperado.

Las imágenes de TEM mostraron objetos con un diámetro medio de  $(4.53 \pm 1.33\text{ nm})$  en compuesto sin péptidos conjugados, para el compuesto conjugado se mostró un tamaño de  $5.6 \pm 0.4\text{ nm}$ , ligeramente mayor debido a la conjugación del AF y la Bombesina.

De los estudios *in vivo* en las células T47D, el sistema multifuncional mostró que tiene un reconocimiento específico para GRPRs y Receptores de Folato. La pre-incubación con Lys<sup>3</sup>-bombesina frío mostró un mayor efecto de bloqueo en el sistema multifuncional (59.5 4% menos de absorción) en comparación con la del ácido fólico frío (32.1% menos de absorción). Esta diferencia en el efecto del bloqueo es consistente con el niveles de expresión de los receptores GRP y Folato

en las células T47D.

Los estudios de imagen *in vivo* demostraron que radiofármaco  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-folato-bombesina permaneció en el tumor hasta 48 h después de la administración intratumoral del radiofármaco.

## Capítulo 9

# Conclusiones Generales

Las técnicas de análisis elemental y espectroscopía mostraron que el ácido fólico, bombesina y las moléculas de DOTA se conjugaron con éxito a cada molécula de dendrímero PAMAM.

Los estudios cromatográficos mostraron que el conjugado  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-folato-bombesina se obtuvo con alta pureza radioquímica ( $> 95\%$ ). Los Estudios preliminares de captación en células de cáncer de mama T47D indicaron captación celular específica y alta retención en tumores inducidos por T47D en ratones.

Los resultados de luminiscencia muestran que los AuNPs en el conjugado son capaces de aumentar la intensidad de la fluorescencia, dando como resultado un sistema que puede ser útil como sistema de diagnóstico por imágenes ópticas para los tumores de mama que sobreexpresan los GRPR y FRs, así como para la radioterapia dirigida.

El nanosistema  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-folato-bombesina internalizado en las células cancerosas T47D mostró propiedades adecuadas para la producción de imágenes ópticas, la terapia fototérmica-plasmónica y la radioterapia.

## Capítulo 10

# Trabajo a Futuro

Como ya se mencionó la familia de dendrímeros PAMAN son plataformas altamente versátiles para el transporte y liberación de fármacos en aplicaciones de terapia genética, de diagnóstico y terapéuticas, este trabajo de tesis ha explorado una de la muchas configuraciones que podrían obtenerse con estas nanoplataformas, teóricamente se podrían generarse distintas configuraciones o ampliar el número de blancos moleculares con diferentes péptidos o quizá buscar el péptido personalizado para un determinado paciente.

Este trabajo exploró el potencial fototérmico del nanoconjugado  $^{177}\text{Lu}$ -DenAuNP-Folato-Bombesina en desde un enfoque *in vitro* usando un láser Nd: YAG operando a 532 nm, el siguiente paso es investigar el comportamiento del conjugado en sistemas vivos con tumores inducidos en ratones, investigar los parámetros de irradiación adecuados para lograr un efecto térmico considerable a distintas profundidades de tejido o quizá investigar la posibilidad de suministrar la luz en el interior de los tumores haciendo huso de fibras ópticas he investigando los parámetros de irradiación adecuados para un sistema *in vivo*.

---

Por otra parte, cuando se analizan las concentraciones del nanoconjugado en el interior de la células se encuentra que son relativamente bajas para mostrar un efecto de aumento de temperatura a un nivel macroscópico, es decir el gradiente entra la nanopartícula y el medio es muy alto, teóricamente se tendrían puntos nanométricos calientes, lo cual abre la tarea de estudiar los mecanismos por los cuales se logra la muerte celular cuando el calor se produce en el interior de la célula a diferencia de los tratamiento convencionales de termoterapia donde el calor se suministra por fuentes externas.



# Bibliografía

- [1] Srivastava SC, Mausner LF. Therapeutic Radionuclides: Production, Physical Characteristics, and Applications. In: Baum RP, editor. Therapeutic Nuclear Medicine. Verlag Berlin Heidelberg: Springer; 2013. p. 11–50.
- [2] Mendoza A, Ferro FG, Ocampo BE, Morales E, Ramirez F, et al. Lys3-bombesin conjugated to <sup>99m</sup>Tc-labelled gold nanoparticles for in vivo gastrin releasing peptide-receptor imaging. *J Biomed Nanotechnol.* 2010;6(4):375–84.
- [3] Reubi JC. Peptides Receptors as Molecular Targets for Cancer Diagnosis and Therapy. *Endocr Rev.* 2003;24(4):389–424.
- [4] Warner S. Diagnostics + therapy = theranostics. *The Scientist.* 2008;18(16):38–39.
- [5] Sumer B, Gao J. Theranostic Nanomedicine for Cancer. *Nanomedicine.* 2008;3(2):137–140.
- [6] Chen X, Wong S. *Cancer Theranostics.* 1st ed. Oxford, UK: Academic Press and print of Elsevier; 2014.
- [7] Ferro-Flores G, Arteaga-de M C, Melendez AL. Third generation radiopharmaceuticals for imaging and targeted therapy. *CurrPharm Anal.* 2006;2(4):339–52.

- 
- [8] Srivastava SC. Paving the way to personalized medicine: production of some promising therapeutic radionuclides at Brookhaven National Laboratory. *Semin Nucl Med.* 2012;42(3):151–163.
- [9] Costa JN. Què és la vida, segons Erwin Schrödinger. *In vitro veritas.* 2015;16(30):34.
- [10] Hall EJ, Giaccia AJ. *Radiobiology for the Radiologist.* Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
- [11] Varela AS. *El cáncer: epidemiología, etiología, diagnóstico y prevención;* 2002.
- [12] Wiersma J, et al. Hyperthermia treatment planning: for the AMC-4 system using the WF-CGFFT method. 2005;.
- [13] D’Cruz AK, Robinson MH, Biel MA. mTHPC-mediated photodynamic therapy in patients with advanced, incurable head and neck cancer: a multicenter study of 128 patients. *Head & neck.* 2004;26(3):232–240.
- [14] Gogoi M, Kumar N, Patra S. *Multifunctional Magnetic Liposomes for Cancer Imaging and Therapeutic Applications.* 2016;.
- [15] Van der Zee J. Heating the patient: a promising approach? *Annals of oncology.* 2002;13(8):1173–1184.
- [16] Armour EP, McEachern D, Wang Z, Corry PM, Martinez A. Sensitivity of human cells to mild hyperthermia. *Cancer research.* 1993;53(12):2740–2744.
- [17] Huilgol NG. Renaissance of Hyperthermia an Addition of a New Therapeutic Option. *Health Administrator.* 2006;17(1):158–161.
- [18] Streffer C. Molecular and cellular mechanisms of hyperthermia. In: *Thermoradiotherapy and thermochemotherapy.* Springer; 1995. p. 47–74.
- [19] George K, Singh B. Synergism of chlorpromazine and hyperthermia in two mouse solid tumours. *British journal of cancer.* 1982;45(2):309.

- 
- [20] de Cabrejas ML. Tomografía en medicina nuclear. Comité de Instrumentación y garantía de Calidad del ALASBIMN; 1999.
- [21] Eckelman WC. Unparalleled Contribution of Technetium-99m to Medicine Over 5 Decades. *J Cardiovasc Imaging*. 2009;2(3):364–368.
- [22] Smith EM. Properties, uses, radiochemical purity and calibration of Tc-99m. *J Nucl Med*. 1964;5(11):871–82.
- [23] Shuang L, Scott DE. <sup>99m</sup>Tc-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals. *Chem Rev*. 1999;99(9):2235–2268.
- [24] Chandia M, Medel J, Ochoa P. Development of Therapeutic Radiopharmaceuticals Based on Lu-177 for Radionuclide Therapy. Vienna, Austria: International Atomic Energy Agency (IAEA); 2006. IAEA Headquarters (A2775).
- [25] Montgomery R, Conway TW, Spector A, Chappel D. *Bioquímica*. 6th ed. St. Francisco: Harcourt Brace; 1999.
- [26] Mathews CK, Holde KE, Ahern KG. *Bioquímica*. 3rd ed. Madrid: Pearson Education; 2002.
- [27] Goldenberg DM, DeLand F, Kim E, Bennett S, Primus FJ, vanNagell Jr JR, et al. Use of radiolabeled antibodies to carcinoembryonic antigen for the detection and localization of diverse cancers by external photoscanning. *N Engl J Med*. 1978;298(1):1384–1386.
- [28] Claude JR. Peptide Receptors as Molecular Targets for Cancer Diagnosis and Therapy. *Endocr Rev*. 2003;24(4):389–427.
- [29] Ferro-Flores G, Ramírez F, Meléndez AL, Santos-Cuevas CL. Peptides for In Vivo Target-Specific Cancer Imaging. *R Med Chem*. 2010;10(1):87–97.

- [30] Liebow C, Reilly C, Serrano M, Schally AV. Somatostatin analogues inhibit growth of pancreatic cancer by stimulating tyrosine phosphatase. *Medical Sciences*. 1989;86:2003–2007.
- [31] De Visser M, Verwijnen SM, De Jong M. Update: improvement strategies for peptide receptor scintigraphy and radionuclide therapy. *Cancer BiotherRadiopharm*. 2008;23(2):137–57.
- [32] Bunnett NW, Clark B, Debas HT, Del-Milton RC, Kovacs TO, Orloff MS, et al. Canine bombesin-like gastrin releasing peptides stimulate gastrin release and acid secretion in the dog. *J Physiol*. 1985;365:121–130.
- [33] Erspamer V, Erpamer GF, Inselvini M. Some pharmacological actions of alytesin and bombesin. *J Pharm Pharmacol*. 1970;22(11):875–6.
- [34] Konturek SJ, Król R, Tasler J. Effect of bombesin and related peptides on the release and action of intestinal hormones on pancreatic secretion. *J Physiol*. 1976;257(3):663–72.
- [35] Abiraj K, Mansi R, L TM, et al. Bombesin Antagonist-Based Radioligands for Translational Nuclear Imaging of Gastrin-Releasing Peptide Receptor-Positive Tumors. *J Nucl Med*. 2011;51(12):1970–1978.
- [36] Markwalder R, Reubi JC. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. *Cancer Res*. 1999;59:1152–1159.
- [37] Jiménez-Mancilla N, Ferro-Flores G, Santos-Cuevas CL, et al. Multifunctional Targeted Therapy System Based on  $^{99m}\text{Tc}/^{177}\text{Lu}$ -labeled Gold Nanoparticles-Tat(49-57)-Lys3-Bombesin Internalized in Nuclei of Prostate Cancer Cells. *J Labelled Compds Radiopharm*. 2013;56:663–671.
- [38] Lin KS, Luu A, Baidoo KE, Hashemzadeh-Gargari H, Chen MK, Brenneman K, et al. A new high affinity technetium-99mbombesin analogue with low abdominal accumulation. *Bioconjug Chem*. 2005;16(1):43–50.

- [39] E GG, Ruegg D, Blauenstein P, et al. Chemical and biological characterization of new  $\text{Re}(\text{CO})_3/[(99 \text{ m})\text{Tc}](\text{CO})_3$  bombesin analogues. *Nucl Med Biol.* 2007;34(1):17–28.
- [40] Lantry LE, Cappelletti E, Maddalena ME, et al.  $^{177}\text{Lu}$ -AMBA: Synthesis and characterization of a selective  $^{177}\text{Lu}$ -labeled GRP-R agonist for systemic radiotherapy of prostate cancer. *J Nucl Med.* 2006;47(7):1144–1152.
- [41] Ferro-Flores G, Ramírez FdM, Meléndez-Alafort L Santos-Cuevas CL. Peptides for In Vivo Target-Specific Cancer Imaging. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* 2010;10(1):87–97.
- [42] Parker N, Turk MJ, Westrick E, Lewis JD, Low PS, Leamon CP. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Analytical biochemistry.* 2005;338(2):284–293.
- [43] Matherly ZDY LH Hou. Human reduced folate carrier translation of basic biology to cancer etiology and therapy. *Cancer Metast Rev.* 2007;1(26):111–128.
- [44] Weitman SD, Lark RH, Coney LR, et al. Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues. *Cancer Res.* 1992;52:3396–401.
- [45] Ross JF, Chaudhuri PK, Ratnam M. Differential Regulation of Folate Receptor Isoforms in Normal and Malignant Tissues In Vivo and in Established Cell Lines. *Cancer.* 1994;73(9):2432–43.
- [46] Muller C. Folate based radiopharmaceuticals for imaging and therapy of cancer and inflammation. *Current pharmaceutical design.* 2012;18(8):1058–1083.
- [47] Nutt J, Razak A, O’toole K, Black F, Quinn A, Calvert A, et al. The role of folate receptor alpha ( $\text{FR}\alpha$ ) in the response of malignant pleural mesothelioma to pemetrexed-containing chemotherapy. *British journal of cancer.* 2010;102(3):553–560.

- [48] Zhang Z, Wang J, Tacha DE, Li P, Bremer RE, Chen H, et al. Folate receptor  $\alpha$  associated with triple-negative breast cancer and poor prognosis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2013;138(7):890–895.
- [49] O'Shannessy DJ, Somers EB, Maltzman J, Smale R, Fu YS. Folate receptor alpha (FRA) expression in breast cancer: identification of a new molecular subtype and association with triple negative disease. *Springerplus*. 2012;1(1):22.
- [50] Bosch F, Rosich L. The Contributions of Paul Ehrlich to Pharmacology: A Tribute on the Occasion of the Centenary of His Nobel Prize. *Pharmacology*. 2008;82:171–179.
- [51] Leyva E, Leyva S, García C. Bifunctional chelating agents used in the synthesis of radiopharmaceuticals. *Rev Mex Cienc Farm*. 2012;44(1):1–23.
- [52] Liu S, Edward DS. Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. *Bioconjugate Chem*. 2001;12(1):7–34.
- [53] Fichna J, Janecka A. Synthesis of target-specific radiolabeled peptides for diagnostic imaging. *Bioconjugate Chem*. 2003;14(1):3–17.
- [54] Saly J, DeNardo DL, Kukis LA, Miers MD, Winthrop L, Kroger Q. Yttrium-90-DOTA-Peptide-Chimeric L6 Radioimmunoconjugate: Efficacy and Toxicity in Mice Bearing p53 Mutant Human Breast Cancer Xenografts. *J Nucl Med*. 1998;38(5):842–849.
- [55] Jamous M, Haberkorn U, Mier W. Synthesis of Peptide Radiopharmaceuticals for the Therapy and Diagnosis of Tumor Diseases. *Molecules*. 2013;18:3379–3409.
- [56] Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of metal nanoparticles. *Adv Drug Delivery Rev*. 2008;60(1):1289–306.

- [57] Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*. 2005;1(3):325–327.
- [58] Kogan MJ, Olmedo I, Hosta L, Guerrero AR, Cruz LJ, Albericio F. Peptides and metallic nanoparticles for biomedical applications. *Nanomedicine*;2(4):287.
- [59] Hong R, Han G, Fernández JM, Kim BJ, Forbes NS, Rotello VM. Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers. *J Am Chem Soc*;128(1):1078–1079.
- [60] Han G, You CC, Kim BJ, Turingan RS, Forbes NS, Martin CT, et al. Light-regulated release of DNA and its delivery to nuclei by means of photolabile gold nanoparticles. *Angew Chem Int*. 2006;45(1):3165–3169.
- [61] Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology and medicine. *Acc Chem Res*. 2008;41(12):1578–1586.
- [62] Huang X, Jain PK, El-Sayed IH. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostic and therapy. *Nanomed*. 2007;2(5):681–93.
- [63] Paciotti GF, Kingston DGI, Tamarkin L. Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors. *Drug Dev*. 2006;67(2):47–54.
- [64] Paciotti GF, Myer L, Weinreich D, Goia D, Pavel N, McLaughlin RE, et al. Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Deliv*. 2004;11(2):169–183.
- [65] Carabías I, Venta Jdl, Quesada A, García M, Kolodziejczyk L, Martínez de la Fuente J, et al. AFM characterization of small metallic nanoparticles. 2006;.

- 
- [66] Mie G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen der physik.* 1908;330(3):377–445.
- [67] Horvath H. Gustav Mie and the scattering and absorption of light by particles: Historic developments and basics. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer.* 2009;110(11):787–799.
- [68] Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *The lancet oncology.* 2002;3(8):487–497.
- [69] El-Sayed IH, Huang X, El-Sayed MA. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer letters.* 2006;239(1):129–135.
- [70] Huang X, El-Sayed IH, Qian W, El-Sayed MA. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *Journal of the American Chemical Society.* 2006;128(6):2115–2120.
- [71] Letfullin RR, Iversen CB, George TF. Modeling nanophotothermal therapy: kinetics of thermal ablation of healthy and cancerous cell organelles and gold nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2011;7(2):137–145.
- [72] Zheng J, Zhou C, Yu M, Liu J. Different sized luminescent gold nanoparticles. *Nanoscale.* 2012;4(14):4073–4083.
- [73] Bigioni T, Whetten R, Dag Ö. Near-infrared luminescence from small gold nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry B.* 2000;104(30):6983–6986.
- [74] Gillies ER, Fréchet JM. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discovery Today.* 2005;10(1):35–43.



- [75] Astruc D, Boisselier E, Ornelas C. Dendrimers Designed for Functions: From Physical, Photophysical and Supramolecular Properties to Applications in Sensing, Catalysis, Molecular Electronics, Photonics and Nanomedicine. *Chem Rev.* 2010;110(4):1857–1959.
- [76] Esfand R, Tomalia DA. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *research focus.* 2001;6(8):427–36.
- [77] Hecht S, Fréchet JM. Dendritic encapsulation of function: applying nature's site isolation principle from biomimetics to materials science. *Angewandte Chemie International Edition.* 2001;40(1):74–91.
- [78] Sampathkumar SG, Yarema KJ. Dendrimers in cancer treatment and diagnosis. *Nanotechnologies for the Life Sciences.* 2007;.
- [79] Tekade RK, Kumar PV, Jain NK. Dendrimers in oncology: an expanding horizon. *Chemical reviews.* 2008;109(1):49–87.
- [80] Sun C, Wirsching P, Janda KD. Enabling ScFvs as multi-drug carriers: A dendritic approach. *Bioorganic & medicinal chemistry.* 2003;11(8):1761–1768.
- [81] Malik N, Evagorou EG, Duncan R. Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy. *Anti-cancer drugs.* 1999;10(8):767–776.
- [82] Stewart BW, Wild CP. *World Cancer Report 2014.* Lyon/London: Agency for Research on Cancer; 2014. Report No.:ISBN-13 9789283204299. Contract No.: 17600031. Sponsored by World Health Organization.
- [83] DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2014;64(1):52–62.

- 
- [84] Owen T. Fundamentos de la espectroscopia UV-visible moderna (conceptos básicos). Alemania, Agilent Technologies. 2000;.
- [85] Aranda-Lara L, Ferro-Flores G, de María Ramírez F, Ocampo-García B, Santos-Cuevas C, Díaz-Nieto L, et al. Improved radiopharmaceutical based on  $^{99m}\text{Tc}$ -Bombesin-folate for breast tumour imaging. *Nuclear medicine communications*. 2016;37(4):377–386.
- [86] Seah MP, Briggs D, Seah M. *Practical Surface Analysis: By Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy*. Wiley New York; 1983.
- [87] Tougaard S. Surface nanostructure determination by x-ray photoemission spectroscopy peak shape analysis. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*. 1996;14(3):1415–1423.