



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ESTUDIO DE BIODISTRIBUCIÓN DEL NANOCOLOIDE RADIOMARCADO
 ^{99m}Tc -AuNP-Manosa COMO MEDIO DE CONTRASTE EN LA LOCALIZACIÓN Y
MAPEO DE GANGLIOS LINFÁTICOS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA
ÓSCAR JOSUÉ ESTUDIANTE MANRÍQUEZ



-MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO,

AÑO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M. en F. Luis Jesús García Aguirre
VOCAL: Dr. Carlos Juárez Osornio
SECRETARIO: Dr. José Andrés de la Cruz Rodríguez Galván
1er. SUPLENTE: Dr. Fabio Alexis Vengoechea Gómez
2° SUPLENTE: Dr. Gerardo Leyva Gómez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Unidad de Investigación Biomédica en
Cáncer INCan-UNAM, Instituto Nacional de Cancerología, 14080 Cd. México, México.

ASESOR DEL TEMA: Dr. José Andrés de la Cruz Rodríguez Galván
(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: Dr. Luis Alberto Medina Velázquez
(nombre y firma)

SUSTENTANTE: Óscar Josué Estudiante Manríquez
(nombre y firma)

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por permitirme ser parte de su distinguida comunidad. Espero regresarle parte de tanto que me ha brindado.

A la **Facultad de Química** por permitirme aprender, valorar y concluir mis estudios de licenciatura como Químico Farmacéutico Biólogo en tan prestigiosa institución.

Al **Instituto Nacional de Cancerología** y en especial al **Laboratorio de Física Médica e Imagen Molecular de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer**, por facilitarme el uso de sus instalaciones, equipos y materiales para la realización de este proyecto.

Al **Programa de Apoyo de investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT-UNAM** (Proyecto **DGAPA-PAPIIT IN104910** y **DGAPA-PAPIIT IA204521**) por los apoyos recibidos para la realización del presente trabajo.

Al **Laboratorio Central de Microscopía del instituto de Física**, por el valioso apoyo técnico del T.C. Diego Quiterio y T.C. Roberto Hernández que complementan esta investigación.

A la **Facultad de Estudios Superiores Iztacala**, por permitirnos ocupar sus instalaciones y equipos para la realización del estudio de FTIR.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al Dr. Luis Alberto Medina Velázquez, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo durante mis últimas etapas de la licenciatura. Brindarme su apoyo, conocimientos y confianza para la realización de este proyecto.

Al Dr. José Andrés de la Cruz Rodríguez Galván, por ser mi tutor y guiarme a lo largo de este proyecto. Por apoyarme y brindarme sus conocimientos. Y por confiar en mi trabajo.

A mis sinodales M. en F. Luis Jesús García Aguirre, Dr. Carlos Juárez Osornio, Dr. Fabio Alexis Vengoechea Gómez y Dr. Gerardo Leyva Gómez. Por tomarse el tiempo de revisar mi trabajo y evaluar mi desempeño.

A todos mis profesores de la licenciatura. Por enseñarme, guiarme y formarme como un futuro profesionista egresado de la orgullosa Universidad Nacional Autónoma de México.

A la QFB. Josefina García. Por brindarme su apoyo en el cuidado de mis animales en el Bioterio. Por ser una buena amiga y hacer de mis mañanas más amenas.

A la Física Medica Itzel Torres. Por asesorarme en las buenas prácticas en el manejo de material radiactivo. Por ser una amiga y hacer de mis mañanas más amenas en mi estancia en el Laboratorio.

Al QFB. David Ramírez. Por enseñarme y colaborar en el proceso de radiomarcado. Por asesorarme y ser un excelente compañero.

Índice

Lista de abreviaturas	VI
1 Resumen	01
2 Introducción	02
3 Hipótesis	06
4 Objetivos	06
4.1 Objetivo general.....	06
4.2 Objetivos particulares	06
5 Material y métodos	06
5.1 Reactivos.....	06
5.2 Métodos.....	07
5.2.1 Adsorción de AuNPs con ácido lipoico.....	08
5.2.2 Reacción de ácido lipoico con manosa.....	08
5.2.3 Adsorción de AuNPs con HYNIC.....	08
5.2.4 Saturación de AuNP con ácido lipoico.....	09
5.2.5 Saturación de AuNP con HYNIC.....	09
5.2.6 Espectrofotometría UV-VIS.....	10
5.2.7 Diámetro hidrodinámico.....	11
5.2.8 Potencial zeta.....	11
5.2.9 Espectroscopia FTIR.....	11
5.2.10 Análisis de microscopia y análisis elemental.....	11
5.2.11 Radiomarcado de HYNIC-AuNP-Manosa con ^{99m} Tc.....	12
5.2.11.1 Eficiencia de radiomarcado.....	12
5.2.11.2 Pureza del radiomarcado.....	12
5.2.11.3 Estabilidad del radiomarcado.....	13
5.2.12 Estudio de Cinética.....	13
5.2.12.1 Animales de experimentación.....	13
5.2.12.2 Rastreo linfático mediante SPECT/CT.....	14
5.2.12.3 Cuantificación <i>ex vivo</i> a 3 horas.....	15
6 Resultados	15
6.1 Estimación del número de moléculas de ALA que se adsorbieron a las AuNPS.....	15

6.2 Cuantificación del número de moléculas de HYNIC.....	17
6.3 Funcionalización de AuNPs con manosa y HYNIC.....	19
6.4 Análisis de estabilidad de nanocoloides.....	25
6.5 Análisis por microscopía electrónica.....	28
6.6 Radiomarcado de HYNIC-AuNP-Manosa y HYNIC-AuNP-ALA con ^{99m} Tc.....	31
6.7 Estudio de Cinética <i>in vivo</i> por SPECT/CT	32
6.8 Cuantificación <i>ex vivo</i> a 3 horas.....	35
6.9 Estudio de cinética <i>in vivo</i> del ^{99m} Tc-Azufre coloidal por SPECT/CT.....	36
7 Discusión.....	39
8 Conclusión.....	46
9 Perspectivas	46
Anexo I	47
I Cáncer.....	47
II Cáncer de cabeza y cuello.....	48
III Ganglios linfáticos.....	49
III.I Ganglio linfático centinela en cáncer de cabeza y cuello.....	50
IV Métodos de detección de ganglio linfático centinela.....	51
IV.I Técnica con el colorante azul de metileno.....	52
IV.II Técnica con radionúclidos.....	52
V Células endoteliales linfáticas con receptor a manosa.....	53
VI Macrófagos relacionados con el ganglio linfático centinela.....	53
VII Nanotecnología.....	54
VIII Nanopartículas de oro.....	55
IX Técnica de radiomarcado con ^{99m} Tc.....	55
IX.I Radiomarcado directo.....	56
IX.II Radiomarcado indirecto.....	57
IX.II.I Agente quelante HYNIC.....	58
IX.III Controles de calidad	58
X Técnicas de imagen molecular.....	58
XI Biodistribución.....	59
10 Artículo	60
11 Bibliografía	74

Lista de abreviaturas

HNC: Cáncer de cabeza y cuello (en inglés Head and Neck cancer)

SLNs: Ganglios linfáticos centinela (en inglés Sentinel lymph node)

SPECT: Tomografía computarizada por emisión de fotón única (en inglés *single photon emission computed tomography*)

CT: Tomografía computarizada (en inglés *computed tomography*)

^{99m}Tc: Tecnecio 99 metaestable

AuNPs: Nanopartículas de oro

MR: Receptor a manosa (en inglés *Mannose Receptor*)

Tamb: Temperatura ambiente

ALA: Acido lipoico (en inglés *Alpha lipoic acid*)

EDC: Clorhidrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

NaOH: Hidróxido de sodio

KCl: Cloruro de potasio

SSI: Solución Salina Isotónica

EDDA: Ácido etilendiamina-N, N'-diacetico

SnCl₂: Cloruro de estaño II

N₂: Nitrógeno gaseoso

Na^{99m}TcO₄: Pertecnetato de sodio radioactivo

SSI: Solución salina isotónica

Manosa-NH₂: Clorhidrato de 2-Aminoetil 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosido

PBS: Buffer de fosfatos (en inglés *Phosphate-buffered saline*)

HYNICGGC: Hidrazinonicotinamida-Glicina-Glicina-Cisteína

mL: Mililitro

nM: Nanomolar

μ L: Microlitro

rpm: Revoluciones por minuto

h: Hora

min: Minuto

M: Molar

mM: Milimolar

mg: Miligramo

ITLC: Cromatografía instantánea en capa fina (en inglés *Instant Thin Layer Chromatography*)

PO: Nódulo poplíteo

Man: Manosa

FTIR-ATR: Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier con reflexión total atenuada (en inglés *Fourier transform infrared - Attenuated Total Reflection*)

XPS: Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (por sus siglas en inglés de X-ray photoelectron spectroscopy)

VPH: Virus del Papiloma Humano

CCE: Carcinoma de células escamosas

END: Disección electiva del cuello (en inglés *elective neck dissection*)

EMT: Transición epitelial a mesenquimatosa (en inglés *epithelial-mesenchymal transition*)

TAM: Macrófago asociado a tumores (en inglés *Tumor-associated macrophages*)

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

⁹⁹Mo: Molibdeno 99

NPs: Nanopartículas

1. Resumen

La hipótesis del ganglio linfático centinela es sencilla y atractiva, pues el flujo linfático eferente de las neoplasias sólidas malignas no se distribuye al azar, sino sigue un patrón en algunos tipos de cáncer. La localización y consiguiente biopsia selectiva de este primer ganglio es importante al ofrecer una valoración directa de cuál sería la histología de diseminación de metástasis del tumor primario en cáncer de cabeza y cuello. Los ganglios linfáticos son órganos importantes del sistema inmune periférico, sus dos principales funciones son la filtración de la linfa y el reconocimiento y procesamiento inmunológico. Las metodologías actuales para llevar a cabo la localización y biopsia del ganglio centinela se basan en colorantes vitales y radiotrazadores.^{1,2}

En la práctica clínica existen nanocoloides de 2 a 200 nanómetros, que incluyen compuestos radiomarcados con ^{99m}Tc como:

- Seroalbúmina humana.
- Azufre coloidal.
- Dextrano.
- Trisulfuro de antimonio.

Que *in vivo* muestran una gran difusión, con una visualización rápida de canales venosos y linfáticos, y aparición de numerosos ganglios de drenaje.³⁻⁵ Sus desventajas son una pobre selectividad a ganglios y además es posible que no se produzca una migración efectiva del trazador y de que éste quede retenido por fagocitosis rápida en el lugar de la inyección.⁶

En este proyecto se desarrolló, caracterizó y evaluó mediante estudios de imagen molecular preclínica un nanocoloide ^{99m}Tc -AuNP-Manosa como medio de contraste para tomografía computarizada por emisión de un solo fotón (SPECT) con una selectividad incrementada por los componentes y estructuras de los ganglios linfáticos.

1. Introducción

El cáncer es un grupo de enfermedades que se caracteriza por la presencia de células anormales con características como:

- Pérdida de control en sus mecanismos de regulación en su división celular.
- Evasión de la muerte celular.
- Capacidad de iniciar angiogénesis.
- Capacidad de invadir tejidos cercanos y diseminarse a otras partes del cuerpo a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático.⁷⁻⁹

El cáncer de cabeza y cuello (HNC, en inglés) es un tipo de tumor maligno que puede afectar las células escamosas que revisten las superficies húmedas y mucosas del interior de la cabeza y del cuello, por ejemplo: dentro de la boca, de la nariz y de la garganta.¹⁰ El HNC se ubica a nivel mundial como el sexto cáncer más común. En 2015 se reportó que 359,718 personas padecían cáncer de faringe y de la cavidad bucal.¹¹ Se estima que 600,000 nuevos casos surgirán anualmente a nivel mundial y alrededor del 40-50% de los pacientes tendrá un promedio de vida de 5 años.¹² El cáncer de cabeza y cuello se ubica en el séptimo lugar en mortalidad mundial; se estiman 375,000 muertes anuales, de las cuales el 5.8% (21,762) ocurrieron en América Latina.¹³ México se encuentra entre los primeros cinco lugares de mayor frecuencia en América Latina, con un riesgo relativo de 7.5/100,000 habitantes y del 0.88%. Diversas instituciones en el país coinciden en que existe un incremento en la prevalencia de esta enfermedad.⁹ (Léase más en Anexo I).

A pesar de los avances considerables en cirugía, quimioterapia, radiación y terapias dirigidas en HNC, el diagnóstico temprano representa las mayores probabilidades de superar la enfermedad. La estadificación del tumor es de gran importancia ya que se puede otorgar el tratamiento más adecuado para mejorar el pronóstico del paciente.¹⁴ (Léase más en Anexo I). La biopsia del ganglio centinela (SLNs, en inglés) es un procedimiento quirúrgico en el que se identifica, se extirpa y se examina el ganglio más próximo que recibe la linfa del tumor primario, y es el lugar más próximo para localizar células cancerosas, individuales o micrometástasis cuando se separan del tumor.¹⁵ La presencia de células cancerosas en el ganglio (o los ganglios) centinela

se interpreta como la progresión del tumor a metástasis.¹⁴ Este diagnóstico es de gran valor ya que puede ayudar al médico a determinar el estadio del cáncer (la extensión de la enfermedad en el cuerpo) y a formular un plan de tratamiento adecuado.¹⁶ El análisis de ganglios linfáticos es de particular importancia en HNC, ya que se sabe que frecuentemente producen metástasis vía los conductos linfáticos y los nódulos linfáticos.¹⁷ (Léase más en Anexo I)

Para identificar la presencia o ausencia de células cancerosas en los SLNs se requiere extirpar los nódulos y hacer un análisis bajo microscopio. El procedimiento se denomina linfogammagrafía o linfoescintigrafía y consiste en la:

1. Administración de un agente de contraste radiactivo y un contraste colorido que viaja a través de los conductos linfáticos hasta los ganglios¹.
2. Por la fisiología de los ganglios los medios de contraste son retenidos temporalmente al menos durante 4 horas.³
3. Posteriormente, el cirujano en el quirófano utiliza un sensor para ubicar áreas de emisión radiactiva en zonas aledañas al tumor.
4. Después, de localizarlas y marcarlas, realiza una pequeña incisión para extraer el ganglio para su análisis. El medio de contraste colorido ayuda a confirmar visualmente la extirpación del nódulo linfático.
5. La localización correcta de los SLNs para su extirpación es de gran importancia ya que impacta en los pasos a seguir en el tratamiento de los pacientes.^{1,3,18} (Léase más en Anexo I).

Recientemente, se ha visto que la visualización del sistema linfático previo a la extirpación en el quirófano impacta significativamente en la planeación del procedimiento y en la recuperación del paciente.^{2,3} La tomografía computarizada por emisión de un solo fotón (SPECT, en inglés) junto con la tomografía computarizada (CT, en inglés) se han convertido en el caballo de batalla para la visualización previa a la intervención quirúrgica. Esta técnica híbrida ha demostrado una mejora en la sensibilidad y especificidad de los estudios gammagráficos, acortando los tiempos de

adquisición y brindando imágenes corregidas por atenuación para facilitar el análisis de ellas.⁴ (Léase más en Anexo I).

Los medios de contraste radiactivos más comunes para la localización de SLNs son partículas coloidales radiomarcadas con tecnecio 99 metaestable radiactivo (^{99m}Tc), tales como:

- ^{99m}Tc-azufre coloidal.
- ^{99m}Tc-albumina coloidal.
- ^{99m}Tc-trisulfuro de antimonio.

Estas son partículas coloidales entre 10-20 nm de tamaño, suficientemente pequeñas para migrar rápidamente hacia los ganglios y suficientemente grandes para quedar atrapadas en estos; sin embargo, carecen de especificidad hacia los ganglios y una gran cantidad de coloides permanecen en el sitio de inyección.³⁻⁵ (Léase más en Anexo I).

Actualmente, se están desarrollando medios de contraste que son altamente específicos para identificar SLNs.¹⁹ El direccionamiento activo se está explorando como alternativa para incrementar la especificidad de los medios de contraste. Este consiste en la unión, al medio de contraste, de biomoléculas de alta afinidad por estructuras o componentes del SLNs.¹⁶ Particularmente, se han desarrollado sistemas que se orientan específicamente a macrófagos polarizados.²⁰ (Léase más en Anexo I). Una invención reciente es el radiofármaco ^{99m}Tc-Tilmanocept que ha sido diseñado para la identificación de SNLs y está registrado para este propósito tanto en los Estados Unidos como en Europa. Es una macromolécula que consta de múltiples unidades de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y manosa, unida sintéticamente a un esqueleto de dextrano de 10 kDa. La manosa actúa como sustrato para el receptor (CD206) y el DTPA sirve como agente quelante para radiomarcarse con ^{99m}Tc.²¹

La nanotecnología es un área emergente que se prevé tendrá un impacto significativo en la detección y tratamiento del cáncer. Entre sus principales objetivos se encuentra

el desarrollo de sistemas nanométricos que maximicen el efecto terapéutico de fármacos y ayuden a disminuir los efectos colaterales y tóxicos.²² Algunos nanofármacos en el mercado para el tratamiento del cáncer actualmente son: Doxil y Abraxane.²³ Entre otros de los nanomateriales más prometedores se encuentran las nanopartículas de oro (AuNP), las cuales por sus propiedades químicas, ópticas y su biocompatibilidad se han posicionado como una plataforma ideal para el diseño de medios de contraste para la detección precisa de tejidos, células y biomarcadores de diversas patologías.^{24, 25} (Léase más en Anexo I).

Este trabajo se enfocó en el diseño, síntesis y la prueba de concepto de un nuevo medio de contraste utilizando nanopartículas de oro (AuNP) como plataforma. Para ello se sintetizó el nanocoloide ^{99m}Tc-AuNP-Manosa (vea figura 1.1) para asistir en la localización y mapeo de ganglios linfáticos centinela. El nanocoloide consiste en una AuNP funcionalizada con manosa y radiomarcada con el radionúclido ^{99m}Tc. Se utilizaron nanopartículas de oro ya que su química permite su rápida modificación con moléculas orgánicas y biológicas²⁵, y se utilizó el polisacárido manosa ya que en el sistema linfático hay células endoteliales linfáticas y macrófagos polarizados que tienen receptores a manosa (MR, en inglés).^{26,27} El ^{99m}Tc es ampliamente utilizado para el diagnóstico de diversas enfermedades en Medicina Nuclear mediante imagen molecular con SPECT.^{5,28}

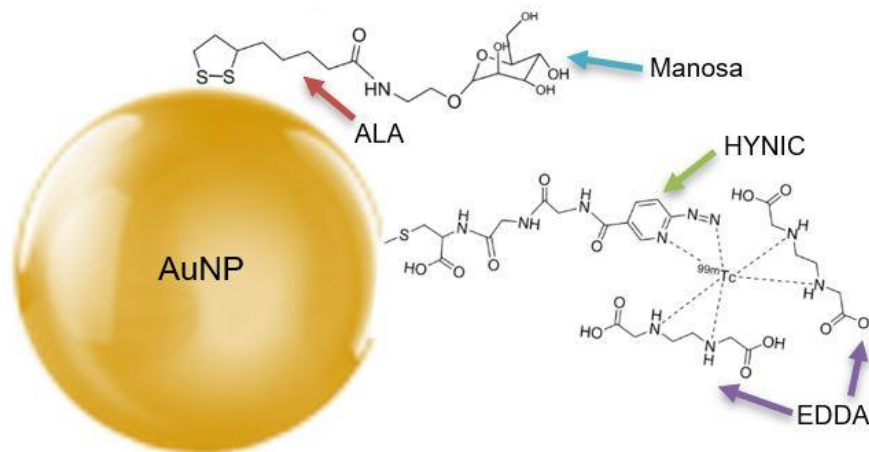


Figura 2.1 Esquema representativo del nanocoloide ^{99m}Tc-AuNP-Manosa.²⁹

3. Hipótesis

El nanocoloide ^{99m}Tc -AuNP-Manosa funciona como medio de contraste en la localización y mapeo de ganglios linfáticos mediante imagenología SPECT, compitiendo con nanocoloides usados en clínica para la detección de ganglios linfáticos.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general: Evaluar la eficiencia del nanocoloide radiomarcado ^{99m}Tc -AuNP-Manosa como medio de contraste en la localización y mapeo de ganglios linfáticos comparado con el nanocoloide ^{99m}Tc -Azufre coloidal.

4.2 Objetivos particulares:

- Desarrollo y caracterización fisicoquímica del nanocoloide radiomarcado ^{99m}Tc -AuNP-manosa.
- Evaluación de la captación del nanocoloide ^{99m}Tc -AuNP-manosa en ganglios linfáticos de un modelo experimental en rata mediante imagen molecular microSPECT/CT.

5. Materiales y métodos

5.1 Reactivos

Las nanopartículas de oro (AuNPs) de 20 nm se compraron en Sigma- Aldrich (St. Luis, MO, USA). Para la funcionalización de la nanopartícula de oro se utilizó: Ácido lipoico (ALA) de Sigma- Aldrich, St. Luis, MO, USA; Clorhidrato de 2-Aminoetil 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosido (Synthose Inc, Canadá); Clorhidrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida [EDC] (Sigma- Aldrich, St. Luis, MO, USA); : Hidrazinonicotinamida-Glicina-Glicina-Cisteína (HYNICGGC) (Peptides International, Kentucky, USA); Hidróxido de Sodio [NaOH] (Reactivos y Productos Químicos Finos, S.A. De C.V.); Etanol anhidro (Sigma- Aldrich, St. Luis, MO, USA); Agua desionizada (Sistema de purificación de agua Milli-Q® Advantage A10).

Para la evaluación fisicoquímica se utilizó: BI-ZR3 Zeta, estándar para potencial (Brookhaven Instruments Corporation, U.S.A); Nanoesferas™, estándar de

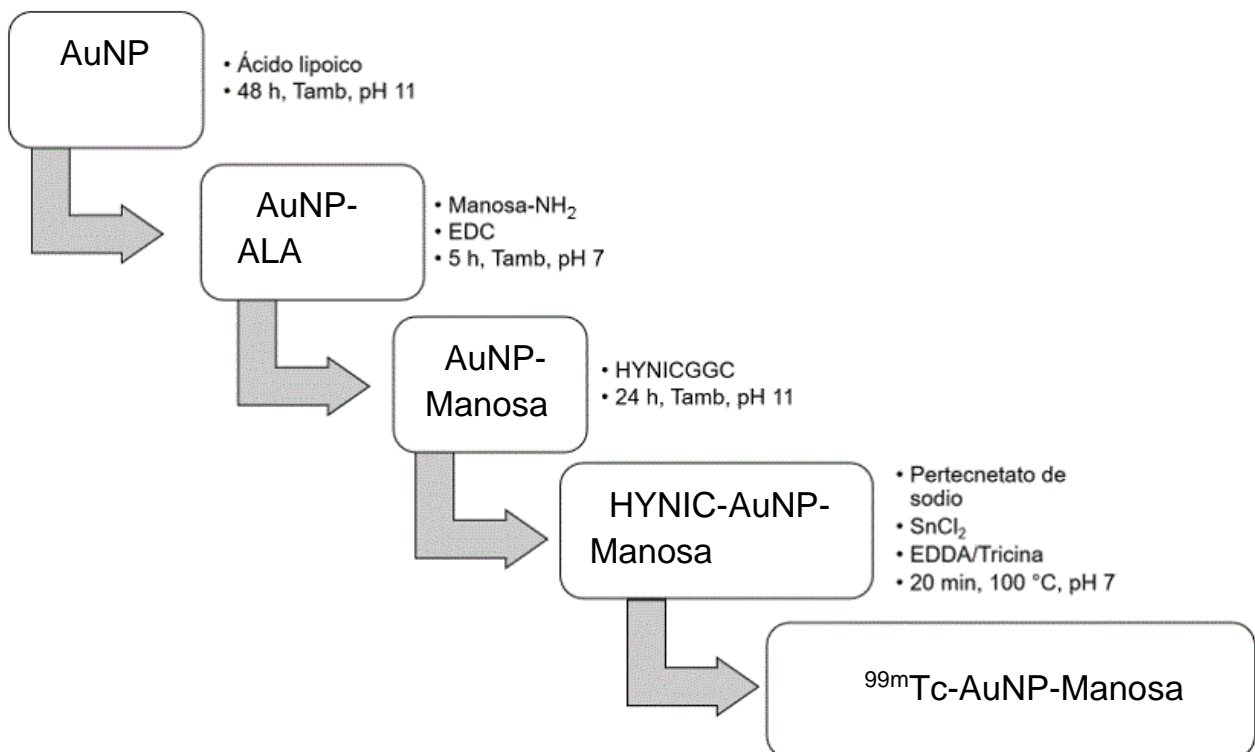
referencia para tamaño de partícula (Thermo Scientific, Waltham Massachusetts USA); Cloruro de Potasio, [KCl] (Reactivos Y Productos Químicos Finos, S.A. De C.V.).

En el radiomarcado se utilizó ácido etilendiamino-N, N'- diacetico [EDDA], (Sigma-Aldrich St. Luis, MO, USA); Tricina (Sigma-Aldrich St. Luis, MO, USA); Cloruro de Estaño II [SnCl₂], (Sigma-Aldrich St. Luis, MO, USA), Gas de Nitrógeno [N₂] (PRAXAIR, Guildford, Reino Unido), Ácido Clorhídrico, [HCl], (Fermont, Monterrey, México), Pertecnetato de sodio [Na^{99m}TcO₄] (MiYMSA, CDMX, México); Solución salina isotónica, (SSI), (Pisa, México).

Para los estudios de SPECT/CT en rata se utilizó como anestesia SOFLORAN ® (Isoflurano), (PiSA, México); ^{99m}Tc-pertecnetato y ^{99m}Tc-Azufre coloidal, (ININ, Edo. de México, México).

5.2 Métodos

Mapa de flujo general



(Tamb: Temperatura ambiente)

5.2.1 Adsorción de AuNPs con ácido lipoico (AuNP-ALA)³⁰

Para funcionalizar las AuNPs con ácido lipoico, las AuNPs 1 nM con buffer de citrato comerciales se centrifugaron durante 30 min a 11500 rpm (Centrifuga MiniSpin Plus, Eppendorf AG, Alemania), se forma un sedimento y con ayuda de una micropipeta de 1 mL de extrajo el sobrenadante. Se agrego agua desionizada ajustada a pH 11 con NaOH 1 M y se repite el proceso de nuevo, centrifugando a 30 min a 11500 rpm, este procedimiento se realizó por triplicado. Se colocó 1 mL de AuNPs dispersas en una disolución NaOH a pH 11 (agua desionizada ajustada con NaOH 1 M) y se agregaron 100 μ L de una disolución 10 mM de ácido lipoico (disuelto en etanol anhidro). Se realizaron 4 metodologías diferentes donde sólo se varea el tiempo de agitación en: 2 h, 24 h, 48 h y 72 h. Posteriormente, se centrifugaron por 30 min a 11500 rpm (Centrifuga MiniSpin Plus, Eppendorf AG, Alemania) y se lavaron tres veces con agua desionizada a pH 11.

5.2.2 Reacción de ácido lipoico con manosa (AuNP-Manosa)³¹

Para llevar a cabo la reacción de ácido lipoico con manosa y formar un grupo amida, se agregó 1 mL de AuNP-ALA suspendidas en agua desionizada a pH 7 (ajustada con NaOH 1 M); se agregaron 10 μ L de EDC 40 mM (en agua desionizada a pH 5 ajustada con HCl 1M) y 2 μ L de Clorhidrato de 2-Aminoetil 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosido (Manosa-NH₂) 100 mg/mL (en etanol anhidro). Se dejó en agitación constante por 5 h, Posteriormente, se centrifugaron durante 30 min a 11500 rpm (Centrifuga MiniSpin Plus, Eppendorf AG, Alemania) y se lavaron con agua desionizada a pH 11 en tres ocasiones. Se dejó en hidrolisis básica a pH 11 por 24 h para desacetilar la Manosa-NH₂.

5.2.3 Adsorción de AuNPs con HYNIC (HYNIC-AuNP-Manosa)²⁶

Para funcionalizar las AuNPs con HYNIC, se agregó 1 mL de AuNP-Manosa dispersas en agua desionizada a pH 11 y 5 μ L de HYNICGGC 1 mM (disolvente: etanol anhidro) y se dejó en agitación constante por 24 h. Al finalizar, se centrifugaron durante 30 min a 11500 rpm (Centrifuga MiniSpin Plus, Eppendorf AG, Alemania), se formó un sedimento y con ayuda de una micropipeta de 1 mL de extrajo el sobrenadante. Se agrego agua desionizada ajustada a pH 11 con NaOH y se repitió la centrifugación a 30 min a 11500 rpm, este procedimiento se realizó por triplicado.

5.2.4 Saturación de AuNP con ácido lipoico

Para determinar el número de moléculas de ácido lipoico que se adsorben a una AuNP, se utilizó como referencia la absorbancia de ALA a 330 nm, la cual se midió en un espectrofotómetro (Beckman Coulter, U.S.A.).³⁶

Se preparó un stock de ácido lipoico 10 mM en etanol.

Se realizó una curva patrón de ácido lipoico por triplicado como se muestra en la tabla.

nmol	Volumen de Stock de ácido lipoico 10 mM (µL)	Volumen de Etanol anhidro (µL)	Volumen de H ₂ O pH 11 (µL)
484	50	100	850
727	75	75	850
969	100	50	850
1211	125	25	850
1454	150	0	850

Se prepararon por triplicado muestras de 1 mL AuNP en solución acuosa a pH 11 con 100 µL de ácido lipoico a 10 mM y se incubaron durante los tiempos: 2 h, 24 h, 48 h, 65 h, 72 h. Al finalizar el tiempo de incubación se centrifugaron las AuNP-ALA por 5 min a 12 000 rpm (Centrifuga MiniSpin Plus, Eppendorf AG, Alemania) en tubos Amicon Ultra (0.5 mL Ultracel – 100 K) se recolectó el sobrenadante y con ayuda de una micropipeta 1 mL se colocó en una celda de cuarzo para posteriormente leer la absorbancia a 330 nm.

5.2.5 Saturación de AuNP con HYNIC²⁶

Para determinar el número de moléculas de HYNIC que se adsorben a una AuNP, se utilizó como referencia la observancia de HYNIC a 280 nm, la cual se midió en un espectrofotómetro (Beckman Coulter, U.S.A.).

Se preparó un stock de HYNIC 1 mM en etanol.

Se realizó una curva patrón de HYNIC por triplicado como se muestra en la siguiente tabla.

nmol	Volumen de Stock de HYNIC 1mM (μ L)	Volumen de Etanol anhidro (μ L)	Volumen de H2O pH 11 (μ L)
2	2	5	993
3	3	4	993
4	4	3	993
5	5	2	993
6	6	1	993
7	7	0	993

Se prepararon por triplicado muestras de 1 mL AuNP en solución acuosa a pH 11 con 5 μ L de HYNIC 1 mM y se incubaron durante 20 min, 2 h, 24 h, 48 h. Al finalizar el tiempo de incubación se centrifugaron las AuNP-HYNIC por 30 min a 12 500 rpm (Centrifuga MiniSpin Plus, Eppendorf AG, Alemania) en tubos Amicon Ultra (0.5 mL Ultracel – 3 K) se recolectó el sobrenadante y con ayuda de una micropipeta de 1 mL se colocó en una celda de cuarzo para posteriormente leer la absorbancia a 280 nm.

5.2.6 Espectrofotometría UV-VIS

Para determinar la estabilidad del nanocoloide HYNIC-AuNP-Manosa a lo largo de la síntesis se fue analizando los espectros de UV-VIS, se utilizó un espectrofotómetro (Beckman Coulter, U.S.A.). Se tomo 1 mL de muestra al inicio de AuNP, al finalizar la reacción de AuNP-ALA se volvió a analizar, luego al obtener el nanocoloide AuNP-Manosa se continuo con el análisis y al final el nanocoloide HYNIC-AuNP-Manosa se analizó para obtener los 4 resultados a lo largo de todo el proceso de manufactura, se desarrollaron 4 síntesis diferentes, donde la única variación fue el tiempo de incubación con ácido lipoico (ALA) en los tiempos 2h, 24 h, 48 h, 72 h. A cada una se le realizó el mismo procedimiento haciendo un barrido de 400 a 1000 nm en cada una colocando en una celda de cuarzo 1 mL. Los 16 nanocoloides que se analizaron fueron:

Síntesis 1	AuNP	AuNP-ALA 2 h	AuNP-Manosa 2 h	HYNIC-AuNP-Manosa 2 h
Síntesis 2	AuNP	AuNP-ALA 24 h	AuNP-Manosa 24 h	HYNIC-AuNP-Manosa 24 h
Síntesis 3	AuNP	AuNP-ALA 48 h	AuNP-Manosa 48 h	HYNIC-AuNP-Manosa 48 h
Síntesis 4	AuNP	AuNP-ALA 72 h	AuNP-Manosa 72 h	HYNIC-AuNP-Manosa 72 h

5.2.7 Diámetro hidrodinámico

El diámetro hidrodinámico se determinó usando un equipo Zetasizer Analyzer 90 PLUS/BI-MAS (Brookhaven Instruments Corporation, U.S.A). Se utilizaron 10 μ L de nanoesferas de poliestireno como estándar de referencia (Duke Scientific, U.S.A) suspendidas en aproximadamente 2 mL de KCl 10 mM para verificar el funcionamiento del equipo.

Para realizar la medición de las AuNPs, se tomó 1 mL de AuNPs y 1 mL de KCl 1 mM (ajustado a pH 7 con NaOH 1 M). Todas las disoluciones de KCl fueron filtradas con un filtro millipore de 0.22 μ m.

5.2.8 Potencial zeta

El potencial Z se determinó, al igual que el diámetro hidrodinámico, en el equipo Zetasizer Analyzer 90 PLUS/BI-MAS (Brookhaven Instruments Corporation, U.S.A). Se determinó el potencial Z empleando un electrodo de paladio con una celda de acrílico de cuatro lados claros. Como estándar se utilizó una solución de BI-ZR3 Zeta en una disolución de KCl 1 mM. La medición se realizó con 1.5 mL de AuNPs dispersas en una disolución de KCl 1 mM (ajustada a pH 7 con NaOH 1 M). Todas las disoluciones de KCl fueron filtradas con un filtro millipore de 0.22 μ m.

5.2.9 Espectroscopia FTIR

Los espectros FTIR-ATR se registraron en un espectrómetro Perkin-Elmer Spectrum 100 (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT, EE. UU.). Ubicado en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Edo. de México, México.

5.2.10 Análisis de microscopía y análisis elemental

Las muestras de AuNP-ALA 48 h, AuNP-Manosa-HYNIC y AuNPs desnudas se analizaron por microscopía electrónica de transmisión. Las muestras se colocaron en rejillas de cobre con una cubierta de carbono se dejaron secar y se observaron en el equipo JEM2010 FEG del laboratorio de microscopía del Instituto de Física de la UNAM.

5.2.11 Radiomarcado de HYNIC-AuNP-Manosa con ^{99m}Tc ($^{99m}\text{Tc-AuNP-Manosa}$)²⁶

Para llevar a cabo el radiomarcado de las HYNIC-AuNP-Manosa con ^{99m}Tc se desgasificaron con nitrógeno gaseoso durante 15 min las disoluciones de SnCl_2 10 mM, EDDA 20 mM, Tricina 30 mM y SSI. Posteriormente se colocaron las disoluciones para incubar a 30°C por 15 min con agitación de 500 rpm (Multi-therm, heat – shake, Benchmark) de 0.5 mL de pertecnetato de sodio (1 mCi) con 60 μL de SnCl_2 10 mM (pH 1) y se agregó 2 μL HCl 12 N. Terminando la incubación se ajustó el pH a 7 con NaOH 1 M. Después se agregaron 40 μL de Tricina 30 mM (en PBS 0.1 M pH 7.4) y se incubó durante 10 min a 30°C con agitación de 500 rpm. Por último, se agregaron 40 μL de EDDA 20 mM (en PBS 0.1 M pH 7.4) y 1 mL de AuNP-Manosa-HYNIC, se incubó por 20 min a 100°C con agitación de 500 rpm.

5.2.11.1 Eficiencia de radiomarcado

La eficiencia de radiomarcado se llevó a cabo centrifugando la suspensión radiomarcada en el punto anterior en un tubo Amico Ultra (0.5 mL Ultracel – 100 K). Se centrifugó por 5 min a 12 000 rpm (Centrifuga MiniSpin Plus, Eppendorf AG, Alemania). Posteriormente se cuantificó la actividad del sobrenadante y el sedimento de $^{99m}\text{Tc-AuNP-Manosa}$ en un activímetro (34-056 Deluxe Isotope Calibrator II, Nuclear Associates, Division of victoreen. INC.).

Se obtiene la relación de la actividad del sedimento ($^{99m}\text{Tc-AuNP-Manosa}$) y la suma del sedimento y el sobrenadante, multiplicada por cien, se obtiene la eficiencia del radiomarcado con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Eficiencia del radiomarcado} = \frac{A \text{ Sedimento}}{A \text{ Sedimento} + B \text{ Sobrenadante}} \times 100$$

5.2.11.2 Pureza del radiomarcado

La pureza radioquímica se determinó mediante cromatografía en capa fina (ITLC SG. PALL Corporation), la fase móvil fue SSI. En una tira de ITLC (1 x 10 cm) se colocaron 2 μL de $^{99m}\text{Tc-AuNP-Manosa}$, y ésta se dejó eluir con la SSI. Al terminar la elusión se cortó la tira a la mitad, para posteriormente cuantificar la radiactividad en la sección inferior (el bottom) y la superior (el top) en un contador de centelleo de tipo pozo

(Modelo 2200 scaler ratemeter, LUDMUM). Se obtuvo la relación de la actividad en la parte inferior (Bottom) y la suma de la parte inferior (Bottom) y la superior (Top) de la placa cromatográfica (PALL, ITLCTMSG), multiplicada por cien. La pureza del radiomarcado se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Pureza del radiomarcado} = \frac{A \text{ Bottom}}{A \text{ Bottom} + B \text{ Top}} \times 100$$

5.2.11.3 Estabilidad del radiomarcado

La prueba de estabilidad del radiomarcado se realizó en suero humano a 37 °C y en SSI a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µL del coloide ^{99m}Tc-AuNP-Manosa en un tubo con 500 µL de suero humano y en un tubo con 500 µL de SSI. Las pruebas se realizaron por triplicado. Las muestras en suero se colocaron en un Multi-therm (heat – shake, Benchmark) a 37 °C por 6 h a 300 rpm, mientras que las muestras en SSI se mantuvieron en agitación constante a temperatura ambiente. Se tomaron muestras a los 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h y 6 h. La estabilidad radioquímica se determinó mediante cromatografía en capa fina (ITLC SG. PALL Corporation) tal como se describió anteriormente; la fase móvil fue SSI. La estabilidad del radiomarcado se determinó en términos del porcentaje de radiactividad presente en el coloide (el bottom de la tira de ITLC) a los distintos tiempos, después de corregir con la ecuación de decaimiento.

$$A = A_0 e^{-\lambda t}$$

Donde:

A: actividad final.

A₀: actividad inicial.

λ: constante de decaimiento, particular de cada radionúclido.

t: tiempo.

5.2.12 Estudio de Cinética de biodistribución.

5.2.12.1 Animales de experimentación

Se utilizaron 15 ratas sanas Wistar macho entre 6-8 semanas de edad, adquiridos del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM en Ciudad universitaria. Los

animales se mantuvieron en el Bioterio del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) siguiendo la norma vigente NOM-062-ZOO-1999, en un ambiente libre de patógenos, con agua y alimento *ad libitum*, con fotoperiodo día/noche 12/12, a una temperatura de 22 °C y humedad del 40%. Todos los procedimientos involucrados en el uso y manejo de los animales de experimentación fueron aprobados por los Comités Científico y de Ética del INCan (Protocolo (019/010/IBI) (CEI/1349/18) (2019/0403/CB1)).

5.2.12.2 Rastreo linfático mediante SPECT/CT

Los estudios de imagen molecular fueron realizados a las 0, 3 y 6 h posteriores a la inyección para observar y comparar la cinética de ^{99m}Tc -AuNP-Manosa, ^{99m}Tc -AuNP-ALA y el ^{99m}Tc -Azufre coloidal en el sitio de inyección y en el ganglio poplíteo (PO) de las ratas. Se utilizó un equipo microPET/SPECT/CT (Albira, Bruker).

Para hacer el seguimiento de los coloides, se administró el radiofármaco (vea tabla 5.1) por vía subcutánea en la almohadilla de las extremidades inferiores de los animales. Durante el estudio las ratas fueron anestesiadas con Isoflurano/oxígeno (3:100%). Para la cuantificación de las imágenes se utilizó el software PMOD³² que se utiliza para el análisis de estudios de SPECT y PET en neurología, cardiología y oncología. El análisis estadístico se realizó mediante el establecimiento de ROIs (región de interés, en inglés region of interest), en la cuales se determinó las cuentas por segundo, con las cuales se determina la actividad en las regiones seleccionadas, en nuestro caso es el sitio de inyección y en ganglio poplíteo al ser el más próximo al sitio de inyección.

Tabla 5.1 Datos de la administración de radiofármacos en Rata.

	Grupo 1 (n = 6)	Grupo 2 (n = 6)
Radiofarmacos	^{99m}Tc -AuNP-Manosa vs. ^{99m}Tc -AuNP-ALA	^{99m}Tc -AuNP-Manosa vs. ^{99m}Tc -Azufre coloidal
Peso (g)	245 ± 61	263 ± 12
Pata derecha	^{99m}Tc -AuNP-Manosa	^{99m}Tc -AuNP-Manosa
Volumen (μL)	38 ± 15	38 ± 4
Actividad (μCi)	54 ± 14	67 ± 7
Pata izquierda	^{99m}Tc -AuNP-ALA	^{99m}Tc -Azufre coloidal
Volumen (μL)	37 ± 13	43 ± 8
Actividad (μCi)	55 ± 12	48 ± 13
Tiempos de Estudio (h)	0, 3, 6	0, 3, 6

5.2.12.3 Cuantificación *ex vivo* a 3 horas

Para este estudio se utilizaron 3 ratas wistar sanas macho de 250 – 300 g sin previa experimentación para la comparación de los coloides ^{99m}Tc -AuNP-Manosa y ^{99m}Tc -AuNP-ALA. Se obtuvieron imágenes de la cinética de ambos coloides tal como se describió anteriormente, pero en este caso los animales se sacrificaron al final de la imagen de 3 h. La extirpación de los ganglios y del sitio de inyección se realizó después de sacrificar a los animales mediante dislocación cervical bajo condiciones de anestesia con isoflurano.

6. Resultados

6.1 Estimación del número de moléculas de ALA que se adsorbieron a las AuNPs.

Para la cuantificación se usaron curvas patrón de ALA (vea figura 6.1). La curva de saturación de la figura 6.1 b determinó el número de moléculas de ALA que se adsorben a las AuNPs como se muestra en la Tabla 6.1 a diferentes tiempos de incubación. Como se observa, el número de moléculas adsorbidas se incrementa en función del tiempo, a las 24 horas se observó una saturación. Las moléculas de ALA tienen un grupo tiol (-SH) y un grupo carboxilo (-COOH) como grupos funcionales, el tiol es el grupo que se adsorbe con los átomos de oro (Au) y los grupos carboxílicos quedan expuestos al solvente y serán utilizados para unir las moléculas de manosa-NH₂. La cuantificación del número de moléculas de ALA adsorbidas permite estimar el número de moléculas de manosa unidas a las nanopartículas. Los cálculos matemáticos fueron realizados usando el número de Avogadro ($6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)

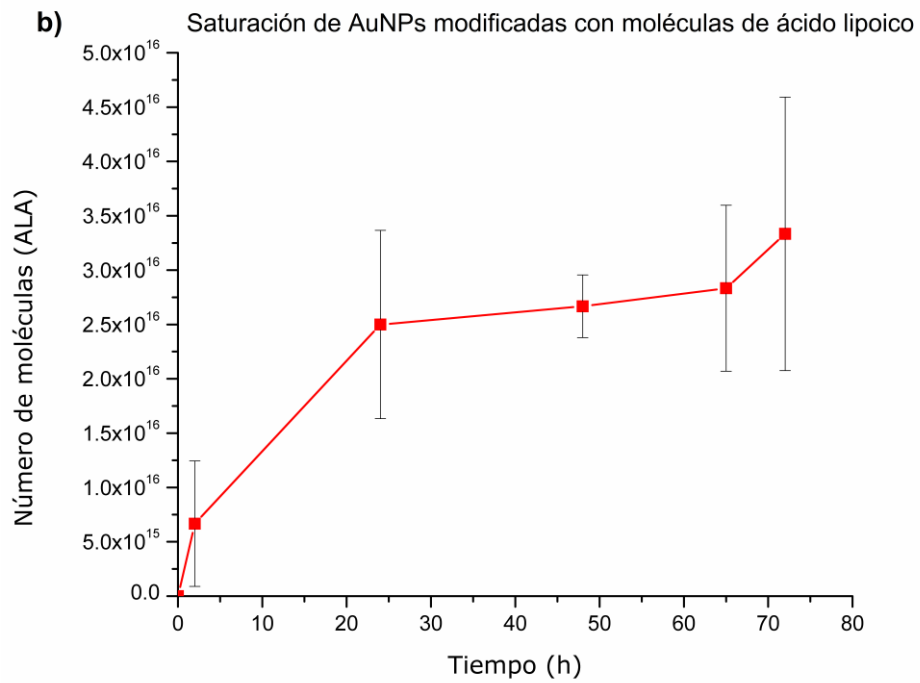
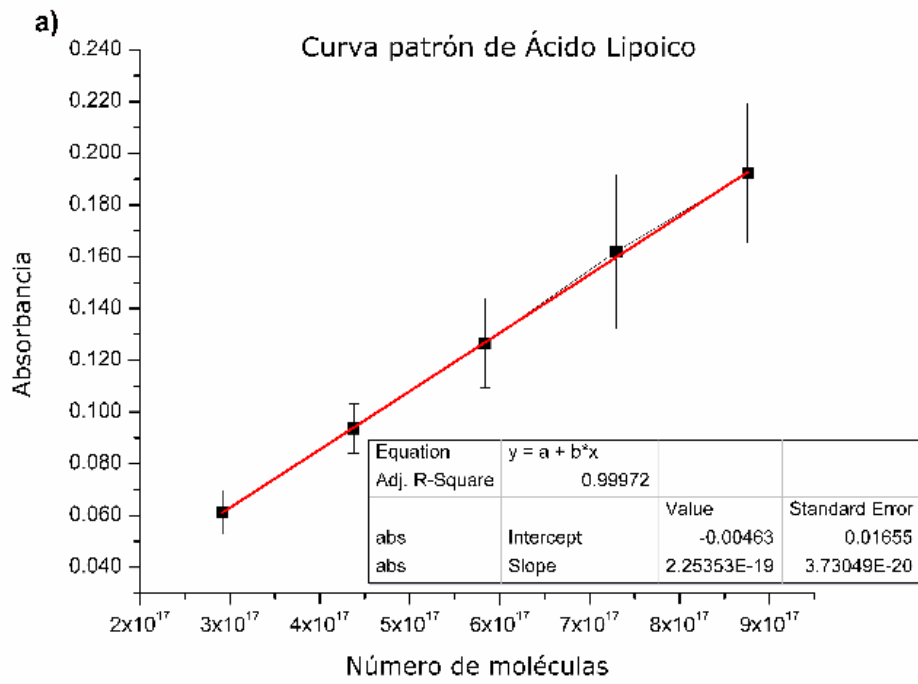


Figura 6.1 a) Curva patrón de ácido lipoico $r^2 = 0.9997$ ($n = 3$); **b)** Curva de saturación de AuNPs modificadas con moléculas de ácido lipoico ($n = 3$).

Tabla 6.1 Número de moléculas de ácido lipoico adsorbidas a una AuNP

Tiempo (h)	Moléculas de ALA / AuNP
2	11071 ± 9587
24	41514 ± 14381
48	44282 ± 4794
65	47050 ± 12683
72	55353 ± 20895

6.2 Cuantificación del número de moléculas de HYNIC.

- La cuantificación del número de moléculas de HYNIC adsorbidas a las AuNPs en función del tiempo sirve como referencia para estimar el número de ^{99m}Tc que se unirán a las nanopartículas.
- En la cuantificación se utilizó una curva patrón (Vea figura 6.2 a) para determinar el número de moléculas de HYNIC unidas a las AuNPs.
- La curva de saturación de HYNIC, al igual que la curva de ALA, mostró que el número de moléculas adsorbidas se incrementa en función del tiempo como se muestra en la figura 6.2 b.
- La saturación se alcanzó a las 24 horas, con alrededor de 3 mil moléculas por partícula, valores que concuerdan con resultados de AuNPs funcionalizadas.²⁶
- Este experimento se realizó para encontrar el tiempo adecuado para adsorción de HYNIC en AuNPs para obtener una cantidad de HYNIC adecuada para su posterior radiomarcado.

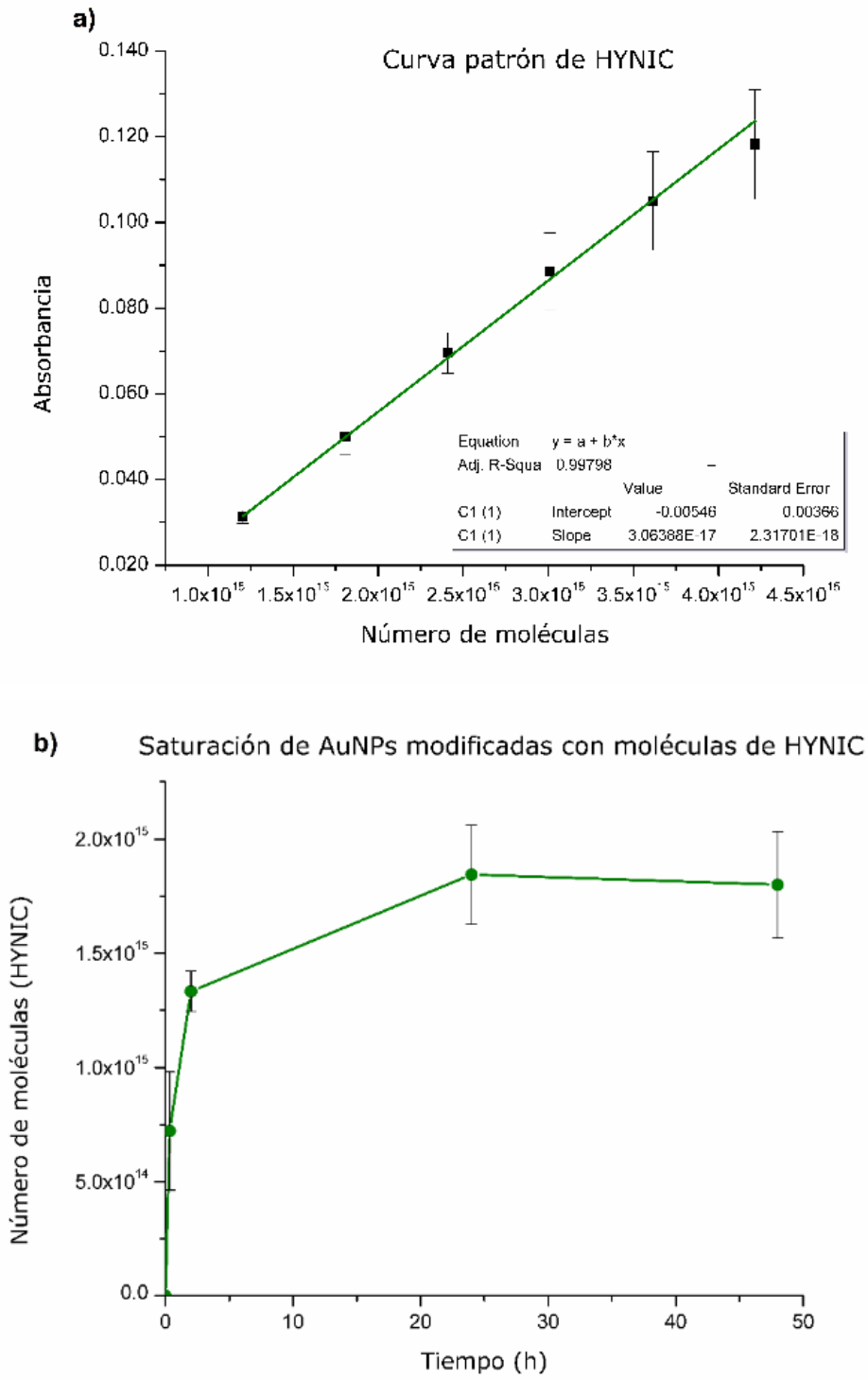


Figura 6.2 a) Curva patrón de HYNIC $r^2 = 0.9980$ ($n = 3$); **b)** Curva de saturación de AuNPs modificadas con moléculas de HYNIC ($n = 3$).

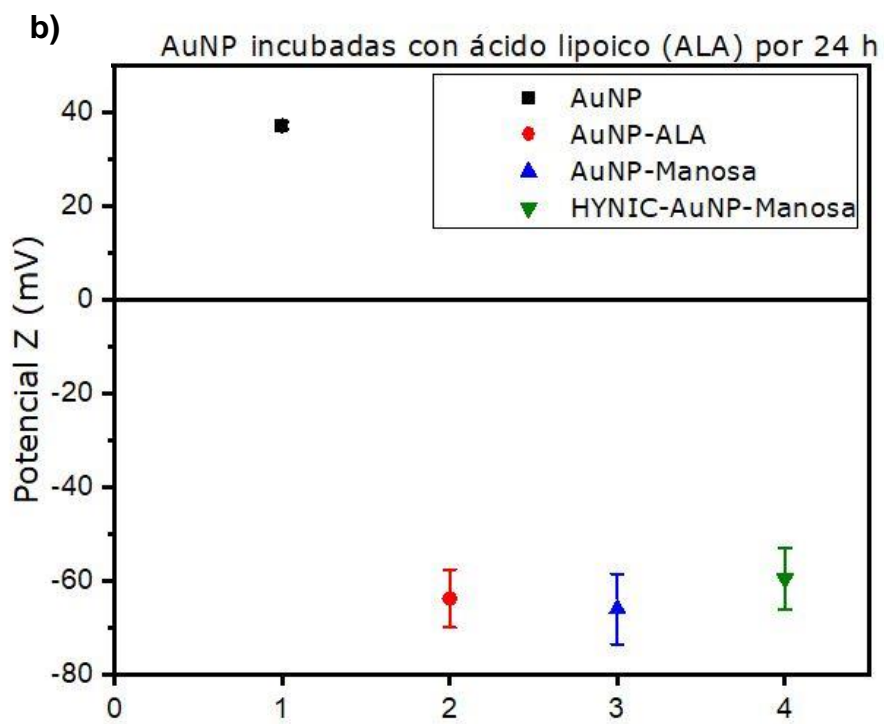
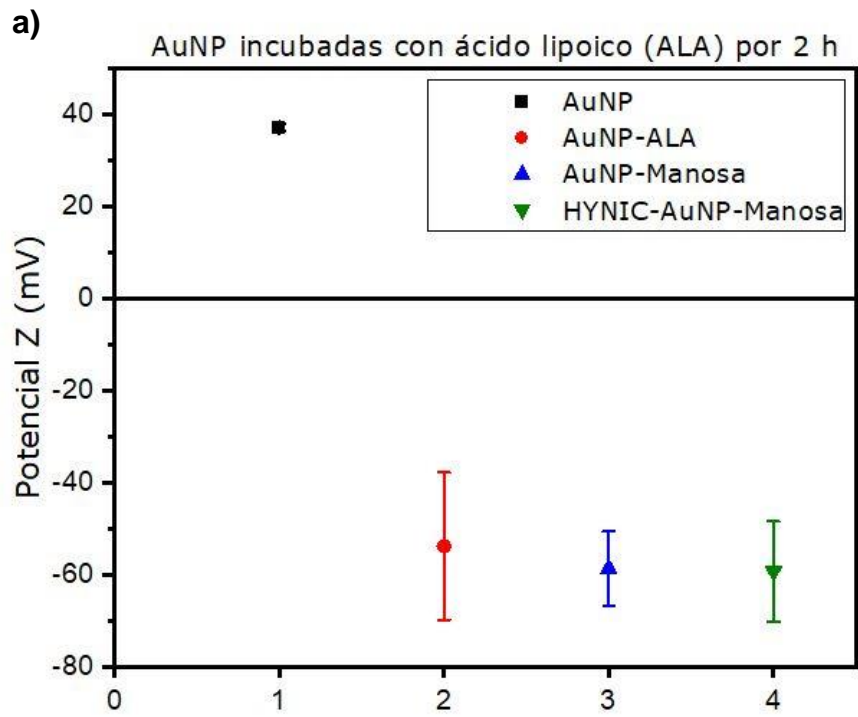
Tabla 6.2 Número de moléculas de HYNIC adsorbidas a una AuNP

Tiempo (h)	Moléculas de HYNIC / AuNP
0.3	1199 ± 430
2	2214 ± 146
24	3063 ± 360
48	2989 ± 387

6.3 Funcionalización de AuNPs con manosa y HYNIC

- El análisis de potencial Z y del diámetro hidrodinámico de los nanocoloides como se observa en la figura 6.3 y 6.4, permiten corroborar de forma indirecta la adsorción de las nanopartículas con los materiales orgánicos.
- Con respecto al potencial Z, se infiere la carga eléctrica superficial de las nanopartículas o bien se explica como la diferencia entre el potencial eléctrico en la superficie de corte de la nanopartícula y el potencial eléctrico de la solución³³.
- Por lo tanto, las nanopartículas de oro desnudas (lavadas del buffer de citrato) tienen un potencial Z de alrededor de 37.18 mV (trazo negro en Figura 6.3) y después de su adsorción con ALA cambiaron su polaridad a -53.74 mV, -63.76 mV, -73.04 mV y -64.21 mV, respectivamente, de acuerdo con las horas en que se incubó la reacción (trazo rojo en Figura 6.3).
- Se considera que este resultado se debe a la adsorción con ALA ya que las nanopartículas de oro desnudas mostraron una carga superficial positiva, en tanto que al ser modificadas con ALA los grupos carboxílicos quedan expuestos y probablemente le otorgan la carga negativa.
- El cambio de carga fue constante a los distintos tiempos de incubación, y se observó un pequeño incremento en la negatividad de menos 10 mV al pasar de 2 a 24 horas de incubación.

- En contraste al unir las moléculas de manosa a las AuNP-ALA, los cambios fueron muy sutiles (trazo azul en Figura 6.3). Solo se observó una disminución en la negatividad en los tiempos de incubación de 48 h con -67.87 mV y 72 h con -60.25 mV.
- Después de incubar el nanocoloide AuNP-manosa con HYNIC, el potencial Z cambio ligeramente a uno menos negativo alrededor de -59 mV (trazo verde en Figura 6.3). Esto pudo deberse a que las moléculas de HYNIC están unidas a un tripéptido de glicina, glicina y cisteína (Gly-Gly-Cys) los cuales tienen grupos amino (-NH₂).
- La presencia de estos grupos puede favorecer la disminución en la negatividad de la partícula. Consideramos importante señalar que basados en las curvas de incubación de HYNIC con respecto al tiempo, se tomó el tiempo de incubación de 24 h como referencia para incubar con AuNP-manosa, ya que a este tiempo se observó una saturación en la AuNP, esperando llenar los espacios disponibles después de la reacción con manosa.
- Con respecto a los análisis de diámetro hidrodinámico (DLS), se observó un incremento de ~ 30 nm en el tamaño de las nanopartículas después de su adsorción con ALA, en comparación con las desnudas como se ve en la figura 6.4. Al realizar la reacción con manosa se observó un incremento en el tamaño de los nanocoloides y una ligera reducción después de la modificación con HYNIC, salvo el tiempo de incubación de 72 horas como se ve en la figura 6.3.
- Como podemos observar el tamaño fue superior al esperado, esto pudo deberse a que las nanopartículas están formando pequeños agregados, como se ve reflejado en la polidispersión final de los nanocoloides HYNIC-AuNP-Manosa: 2h con 0.239 ; 24 h con 0.252; 48 h con 0.247 y 72 h con 0.257, pues en valores mayores a 0.200 (vea figura 6.4) se puede pensar que existe más de una población de tamaños.³⁴



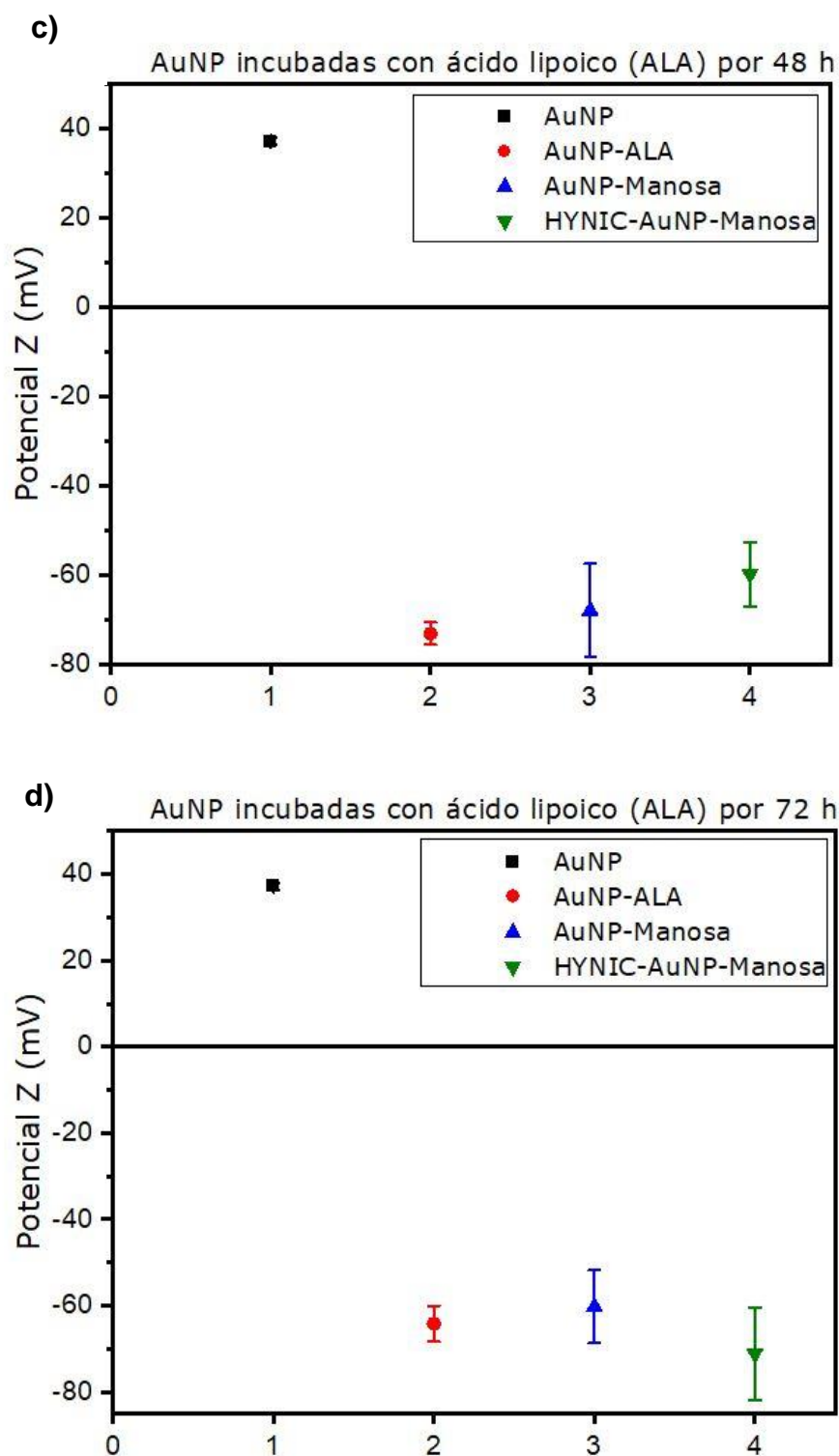
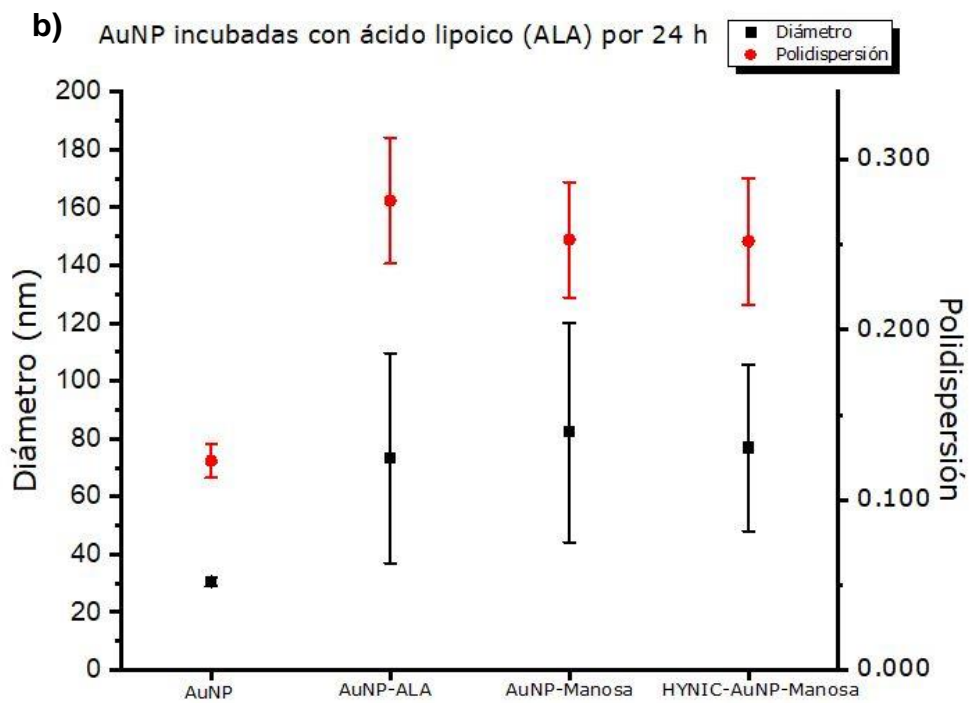
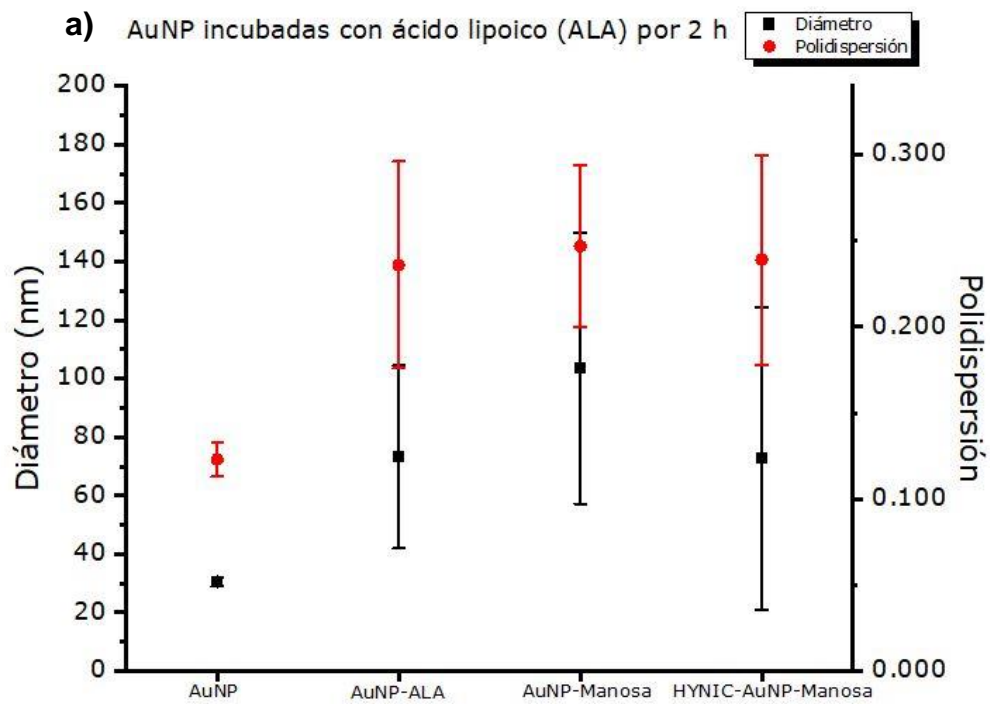


Figura 6.3 Gráficos de potencial zeta. (n = 3) a) Potencial Z de la síntesis de AuNPs funcionalizadas con ácido lipoico incubadas por 2 h y seguimiento del proceso hasta la adsorción con HYNIC; **b)** Potencial Z de la síntesis de AuNPs funcionalizadas con ácido lipoico incubadas por 24 h y seguimiento del proceso hasta la adsorción con HYNIC; **c)** Potencial Z de la síntesis de AuNPs funcionalizadas con ácido lipoico incubadas por 48 h y seguimiento del proceso hasta la adsorción con HYNIC; **d)** Potencial Z de la síntesis de AuNPs funcionalizadas con ácido lipoico incubadas por 72 h y seguimiento del proceso hasta la adsorción con HYNIC;



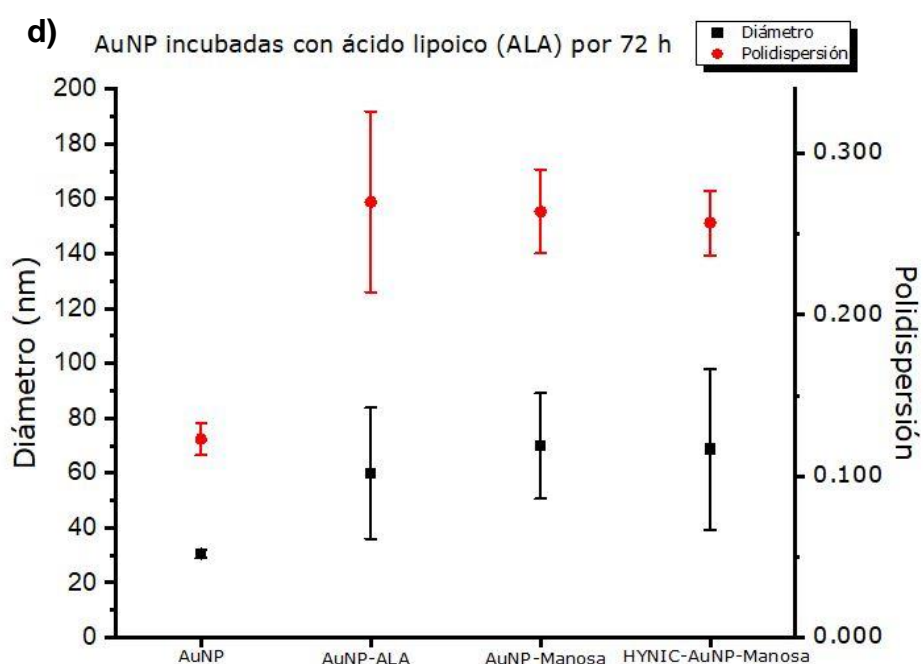
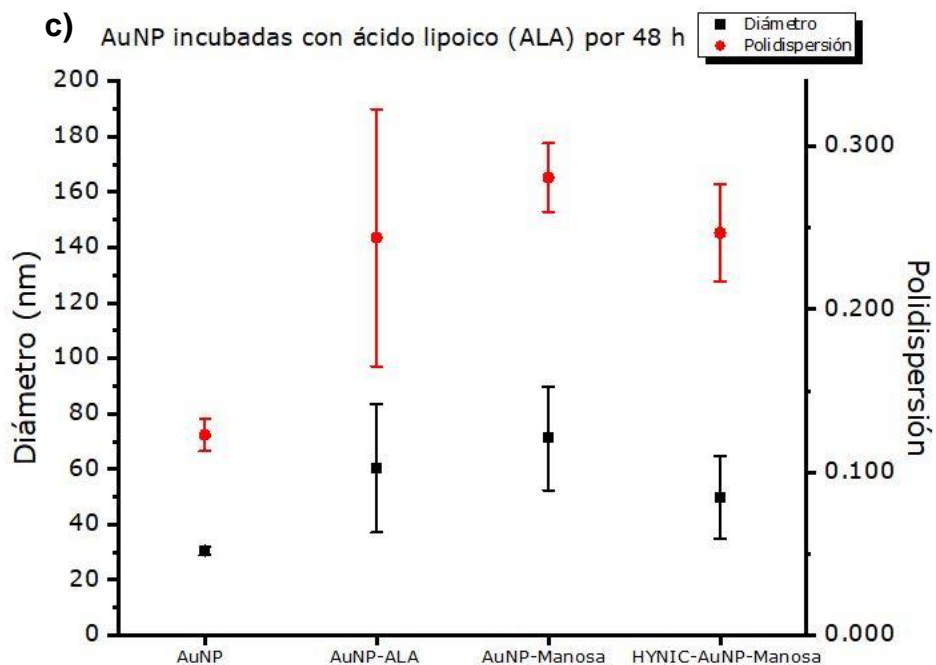


Figura 6.4 Gráficos de diámetro hidrodinámico y polidispersión. (n = 3) **a)** Diámetro hidrodinámico y polidispersión de la síntesis de AuNPs funcionalizadas con ácido lipoico incubadas por 2 h y seguimiento del proceso hasta la adsorción con HYNIC; **b)** Diámetro hidrodinámico y polidispersión de la síntesis de AuNPs funcionalizadas con ácido lipoico incubadas por 24 h y seguimiento del proceso hasta la adsorción con HYNIC; **c)** Diámetro hidrodinámico y polidispersión de la síntesis de AuNPs funcionalizadas con ácido lipoico incubadas por 48 h y seguimiento del proceso hasta la adsorción con HYNIC; **d)** Diámetro hidrodinámico y polidispersión de la síntesis de AuNPs funcionalizadas con ácido lipoico incubadas por 72 h y seguimiento del proceso hasta la adsorción con HYNIC.

La Figura 6.5 muestra los resultados del análisis por FTIR-ATR para corroborar la formación del enlace amida. Se muestra los espectros de AuNP-ALA 48 h antes y después de su adsorción con manosa-NH₂. El nanocoloide AuNP-ALA 48 h mostró bandas a 1700 cm⁻¹ y 2927 cm⁻¹ que se asignaron a los enlaces de tensión de los grupos carbonilo (C = O) y -CH₂-, y la banda a 1250 cm⁻¹ se asignó al grupo hidroxilo (O-H).³⁵ Después de la reacción, AuNP-Manosa 48 h mostró bandas en ~3400 cm⁻¹ y 3318 cm⁻¹ que fue asignado al estiramiento del enlace O-H, esta banda apareció ya que la molécula de manosa-NH₂ es rica en grupos hidroxilo. La banda a 2900 cm⁻¹ fue asignado al estiramiento del enlace C-H de los anillos piranosicos. La banda de 1140 cm⁻¹ a 1070 cm⁻¹ se asignó al estiramiento del enlace C-O, esta región es compleja y es característica de los carbohidratos. La banda a 1641 cm⁻¹ se asignó al enlace de estiramiento de C = O y la banda de 1580 cm⁻¹ se asignó como enlace curvo de flexión N-H en el plano y la banda a 1280 cm⁻¹ se asignó al estiramiento del enlace de tensión de C-N.³⁶

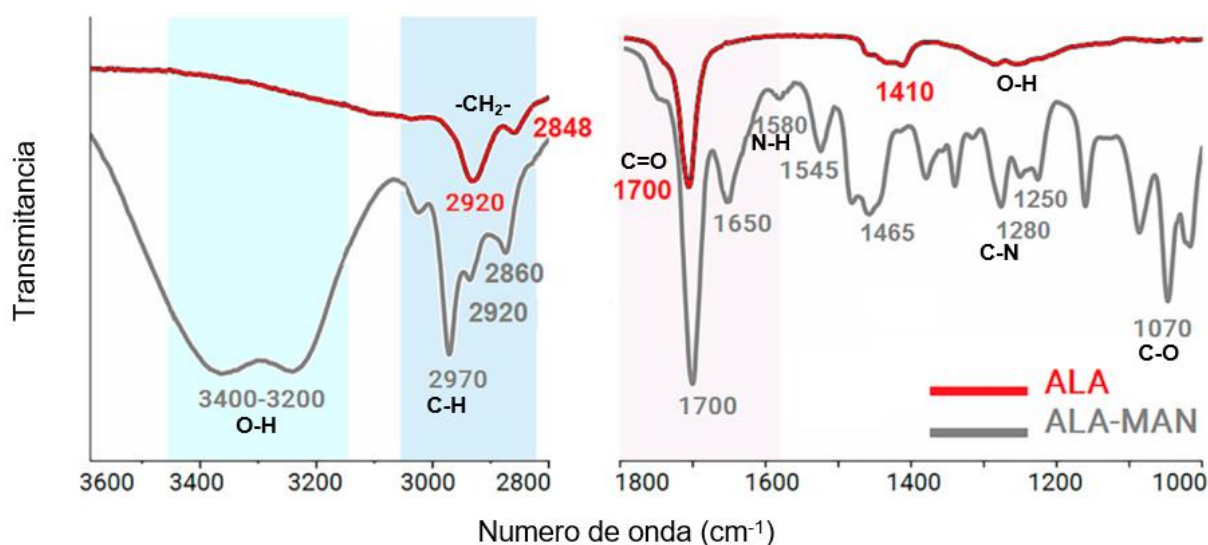


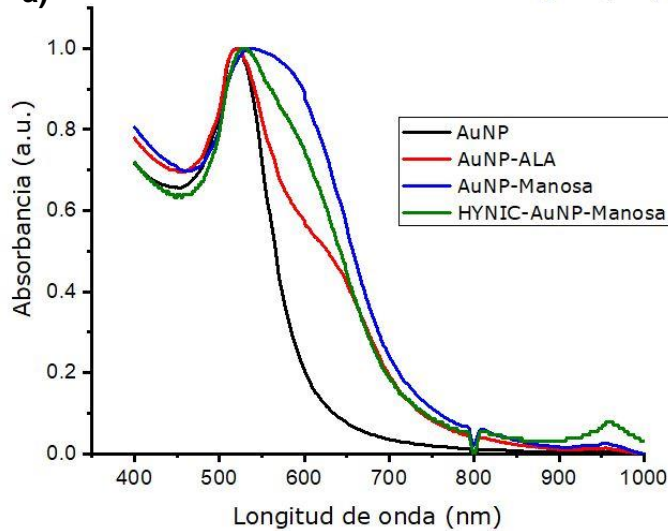
Figura 6.5 Espectros infrarrojos de transformada de Fourier para el enlace covalente entre las moléculas de manosa-NH₂ (MAN) y las moléculas de ácido lipoico (ALA).

6.4 Análisis de estabilidad de nanocoloides

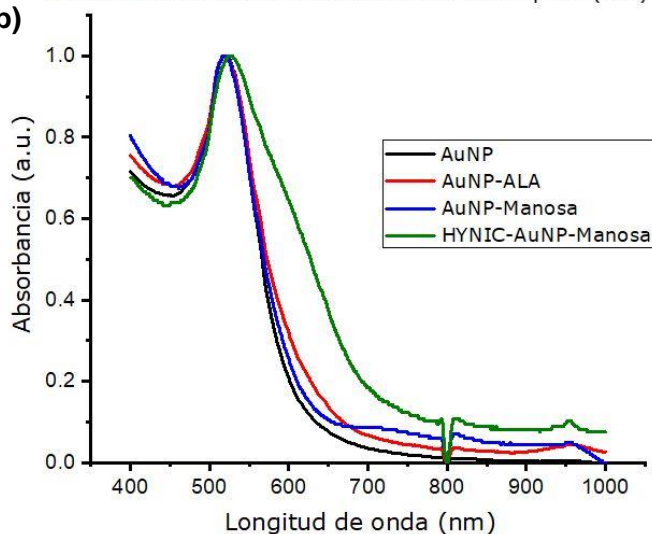
La figura 6.6 muestra los espectros de absorción UV-Vis donde se observa que las AuNPs desnudas de 20 nm presentan un pico de plasmones superficiales alrededor de los 520 nm, donde se aprecia un espectro delgado y bien definido. En contraste, en el tiempo de adsorción de dos horas se observó un ligero corrimiento al rojo mayormente en el nanocoloide AuNP-Manosa que absorbió a 597 a 600 nm, lo cual indicó la formación de agregados. En el tiempo de incubación de 24 horas también se

observó un corrimiento al rojo, sin embargo, fue inferior al observado al tiempo de dos horas. En contraste, los tiempos de 48 y 72 horas no mostraron desplazamientos, pues se mantuvieron entre los 518 y 523 nm. En todos los espectros de absorción se observó un ensanchamiento inversamente proporcional al tiempo de incubación con ALA. Los más anchos fueron los de 2 horas. Estos resultados indicaron el tiempo de incubación con ALA se relaciona con la estabilidad de los nanocoloides. Es importante señalar que a través del tiempo los nanocoloides de 2 horas de incubación con ALA mostraron visualmente una mayor agregación que los demás tratamientos.

a) Funcionalización de AuNPs incubadas con ácido lipoico (ALA) por 2 h



b) Funcionalización de AuNPs incubadas con ácido lipoico (ALA) por 24 h



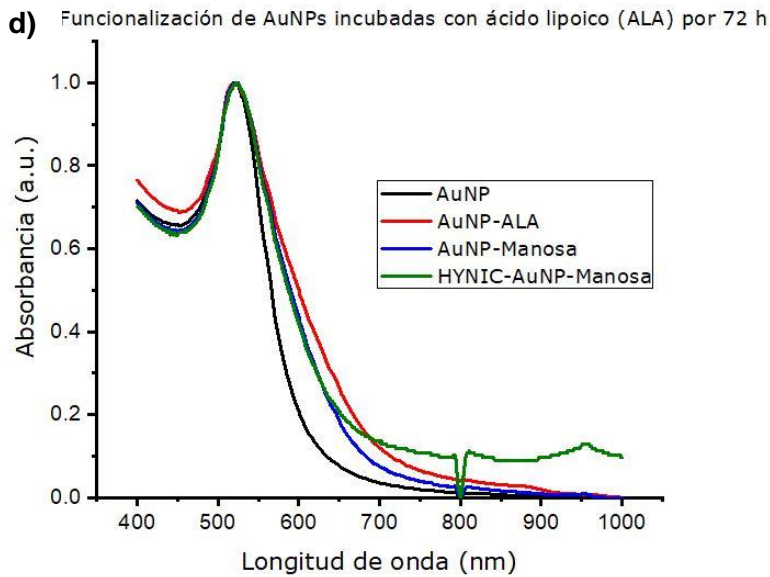
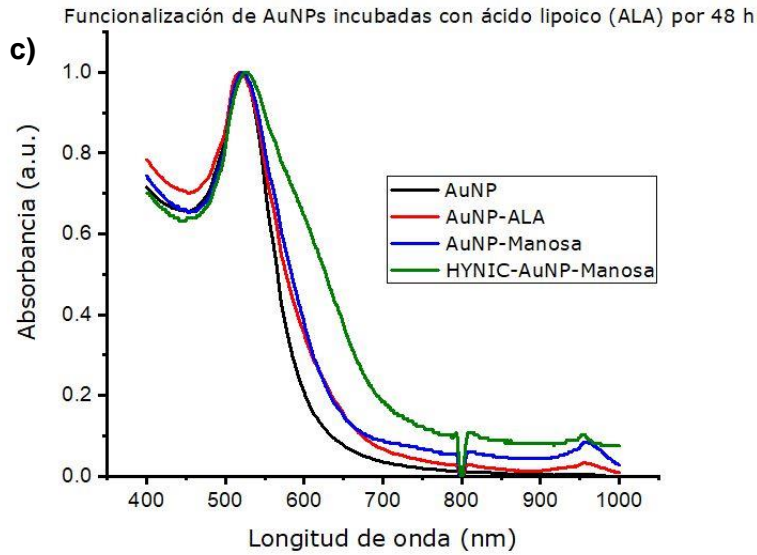


Figura 6.6 Espectros de UV-Vis de 400 a 1000 nm. A 520 nm absorben las AuNP de 20 nm. **a)** Espectro de UV-Vis de la síntesis de AuNPs funcionalizadas con ácido lipoico incubadas por 2 h y seguimiento del proceso hasta la adsorción con HYNIC; **b)** Espectro de UV-Vis de la síntesis de AuNPs funcionalizadas con ácido lipoico incubadas por 24 h y seguimiento del proceso hasta la adsorción con HYNIC; **c)** Espectro de UV-Vis de la síntesis de AuNPs funcionalizadas con ácido lipoico incubadas por 48 h y seguimiento del proceso hasta la adsorción con HYNIC; **d)** Espectro de UV-Vis de la síntesis de AuNPs funcionalizadas con ácido lipoico incubadas por 72 h y seguimiento del proceso hasta la adsorción con HYNIC.

6.5 Análisis por microscopía electrónica

- En la Figura 6.7 se presentan las microscopías TEM de las nanopartículas en las que se midió el núcleo de alta densidad electrónica, los valores en los que oscila son entre los 14 y 26 nm. No se observaron cambios estructurales visibles en el núcleo al modificarlas con las distintas cubiertas.
- Comparando el tamaño observado en TEM con el radio hidrodinámico observado en DLS (vea Figura 6.4) se puede deducir que no hay un incremento de tamaño en las nanopartículas al funcionalizarlas con manosa y HYNIC, en cambio, la formación de agregados es visible incluso en TEM.
- Con esta observación podemos reconocer que las nanopartículas tienden a formar cúmulos, lo cual concuerda con los valores observados de polidispersión.³⁷
- Al analizar individualmente las nanopartículas, se observó en la figura 6.8 una cubierta sobre la superficie de las nanopartículas. La cubierta fue visible solo en las partículas modificadas como se ve en las imágenes b y c.
- El análisis elemental de las nanopartículas mostró un ligero incremento en la presencia de azufre (S), nitrógeno (N) y oxígeno (O) en las partículas modificadas con ALA y HYNIC.
- Los picos correspondientes al cobre (Cu), silicio (Si) y carbón (C) se deben al soporte y a trazas de grasa de silicona de vacío presentes en el equipo.

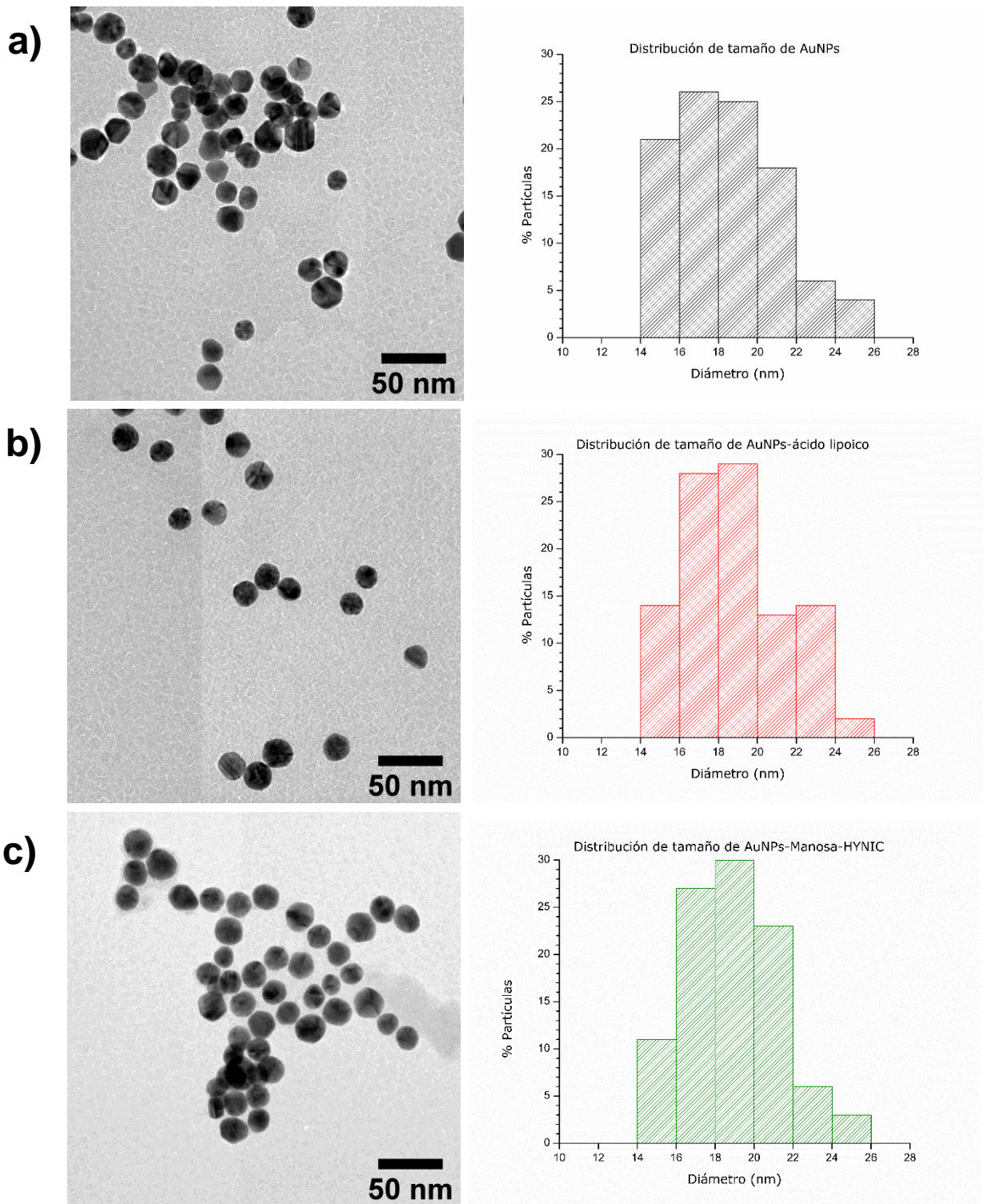


Figura 6.7 Imágenes HRTEM (Escala 50 nm) e histogramas de distribución de tamaños. a) AuNPs prístinas; b) AuNP-ALA 48 h; c) AuNP-Manosa-HYNIC incubadas 48 h con ácido lipoico).

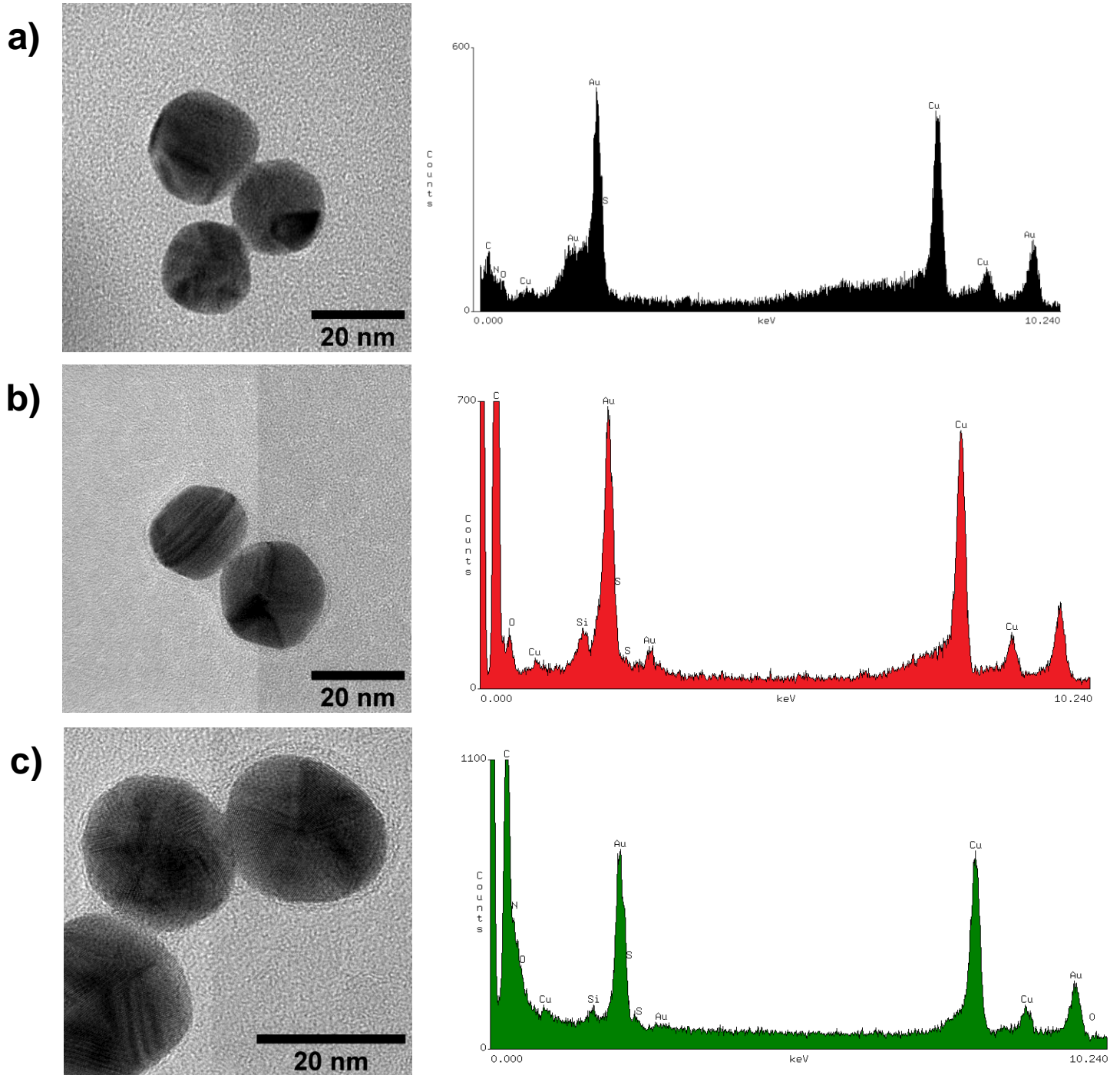


Figura 6.8 Imágenes HRTEM (Escala 20 nm) y análisis elemental. a) AuNPs prístinas; b) AuNP-ALA; c) AuNP-Manosa-HYNIC (síntesis de 48 h incubadas con ácido lipoico).

6.6 Radiomarcado de HYNIC-AuNP-Manosa y HYNIC-AuNP-ALA con ^{99m}Tc

- Después de analizar los distintos nanocoloides se decidió radiomarcarse las formulaciones HYNIC-AuNP-Manosa con tiempos de incubación de 48 y 72 horas con ALA y la formulación HYNIC-AuNP-ALA 48 h, considerando que sus espectros de UV-VIS mostraron mayor estabilidad en términos de agregación como se observa en la figura 6.5.
- La eficiencia de radiomarcado del coloide HYNIC-AuNP-Manosa 48 h fue mayor a la del coloide HYNIC-AuNP-Manosa 72 h como se ven la figura 6.9, además su desviación estándar fue menor comparando ambas síntesis.
- La eficiencia de radiomarcado del coloide HYNIC-AuNP-Manosa 48 h fue del $86 \pm 14 \%$, mientras que la del coloide HYNIC-AuNP-ALA fue del $86 \pm 9 \%$.
- Se realizaron las pruebas de radiomarcado para el coloide HYNIC-AuNP-ALA debido a que se utilizará como control en la siguiente fase de imagen molecular SPECT/CT.
- La pureza radioquímica del nanocoloide HYNIC-AuNP-Manosa 48 h fue mayor, en comparación con el coloide HYNIC-AuNP-Manosa 72 h como se ve en la figura 6.9, esto pudo deberse a que, en pasos anteriores, la eficiencia de radiomarcado también fue menor.
- La pureza radioquímica del nanocoloide HYNIC-AuNP-Manosa 48 h es de $97 \pm 2 \%$ y la del coloide HYNIC-AuNP-ALA es de $95 \pm 7 \%$.
- La estabilidad radioquímica de ambas formulaciones fue estable en suero y solución salina isotónica, no hubo evidencia de inestabilidad en los conjugados durante el tiempo de análisis (seis horas). Por lo tanto, se pudieron realizar los estudios de SPECT.

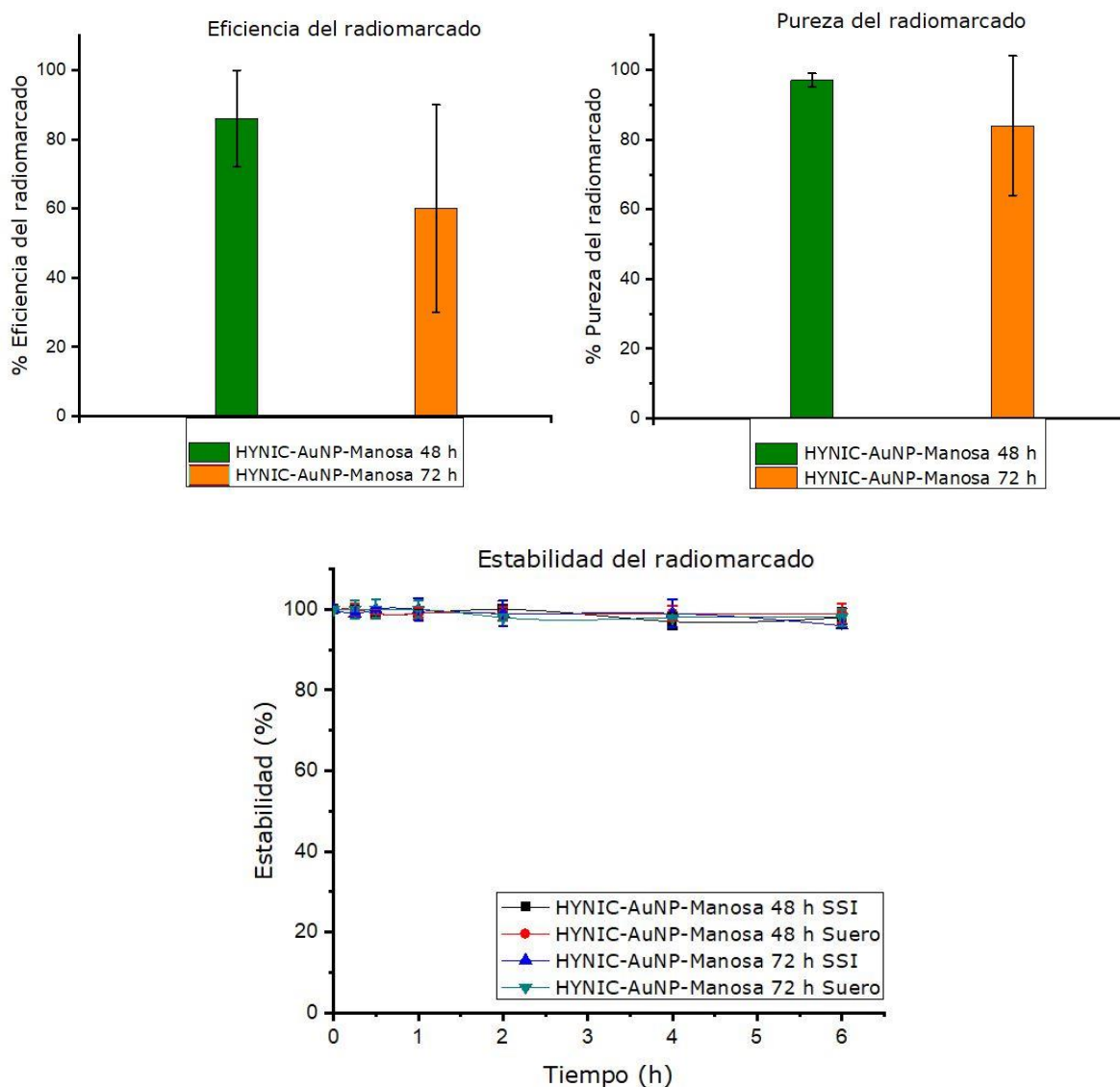


Figura 6.9 Eficiencia radioquímica (n = 3) realizada con cromatografía en capa fina (ITLC SG, PALL Corporation), fase móvil SSI. **Pureza radioquímica** (n = 3). La purificación se llevó a cabo con tubos Amico Ultra (0.5 mL Ultracel – 100 K) se centrifugo por 5 min a 12 000 rpm (Centrifuga MiniSpin Plus, Eppendorf AG, Alemania). Estabilidad radioquímica (n = 3). **La estabilidad radioquímica** se tomó a los tiempos: 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h y 6 h. Se incubaron los nanocoloides -HYNICAuNP-Manosa 48 h y HYNIC-AuNP-Manosa 72 h a 37 °C en Suero humano y solución salina isotónica a 300 rpm.

6.7 Estudio de Cinética *in vivo* por SPECT/CT

En esta sección se describen los resultados obtenidos de los análisis de cinética del nanocoloide radiomarcado ^{99m}Tc -AuNP-manosa. Para los efectos de este trabajo nos restringimos a la fracción de la actividad administrada que se localiza en el nódulo poplíteo (PO) como se observa en la figura 6.10. Las nanopartículas se inyectaron en la planta de las patas traseras, por lo que se espera el nódulo poplíteo sea marcado,

el cual drena centralmente hacia el nódulo iliaco y renal a lo largo de la línea media. El PO también drena hacia el nódulo inguinal y después a lo largo de la línea media. El drenaje del PO al nódulo axilar solo ocasionalmente es observado (línea punteada).³⁸

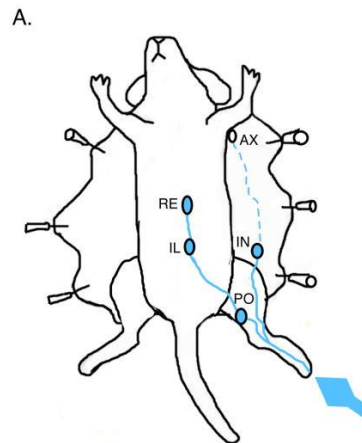


Figura 6.10 Esquema de sistema linfático en rata, los trazos en azul muestran los vasos y nódulos linfáticos y la flecha el sitio de administración de la actividad. Las abreviaturas son: AX, nódulo axilar; IL, nódulo iliaco; IN, nódulo inguinal; PO, nódulo poplíteo; RE, nódulo renal (imagen tomada de ref.³⁸).

Después de inyectar las nanopartículas, se tomaron imágenes SPECT/CT en tiempos definidos. Las manchas que se observan en la reconstrucción de las imágenes 2D del SPECT/CT corresponden a la actividad presente en el sitio marcado, donde el color rojo representa una concentración mayor y se va degradando hasta el color azul que representa una concentración menor. Inmediatamente después de administrar las dosis (T1), tres horas después (T2) y una medición final a las seis horas (T3). A continuación, se muestra una serie de imágenes de la administración de nanopartículas modificadas con manosa y como control nanopartículas modificadas únicamente con ácido lipoico (vea figura 6.11). Al T1 en ambos nanocoloides únicamente se observó una alta actividad en los sitios de inyección, en tanto que al tiempo T2 se observó una migración al nódulo poplíteo únicamente en las nanopartículas modificadas con manosa. Al tiempo T3 se observó que ambas nanopartículas migran a los ganglios poplíteos. Resulta importante remarcar que en las series de imágenes observadas no se observó la migración de los conjugados a los ganglios próximos AX, IL, IN o RE.

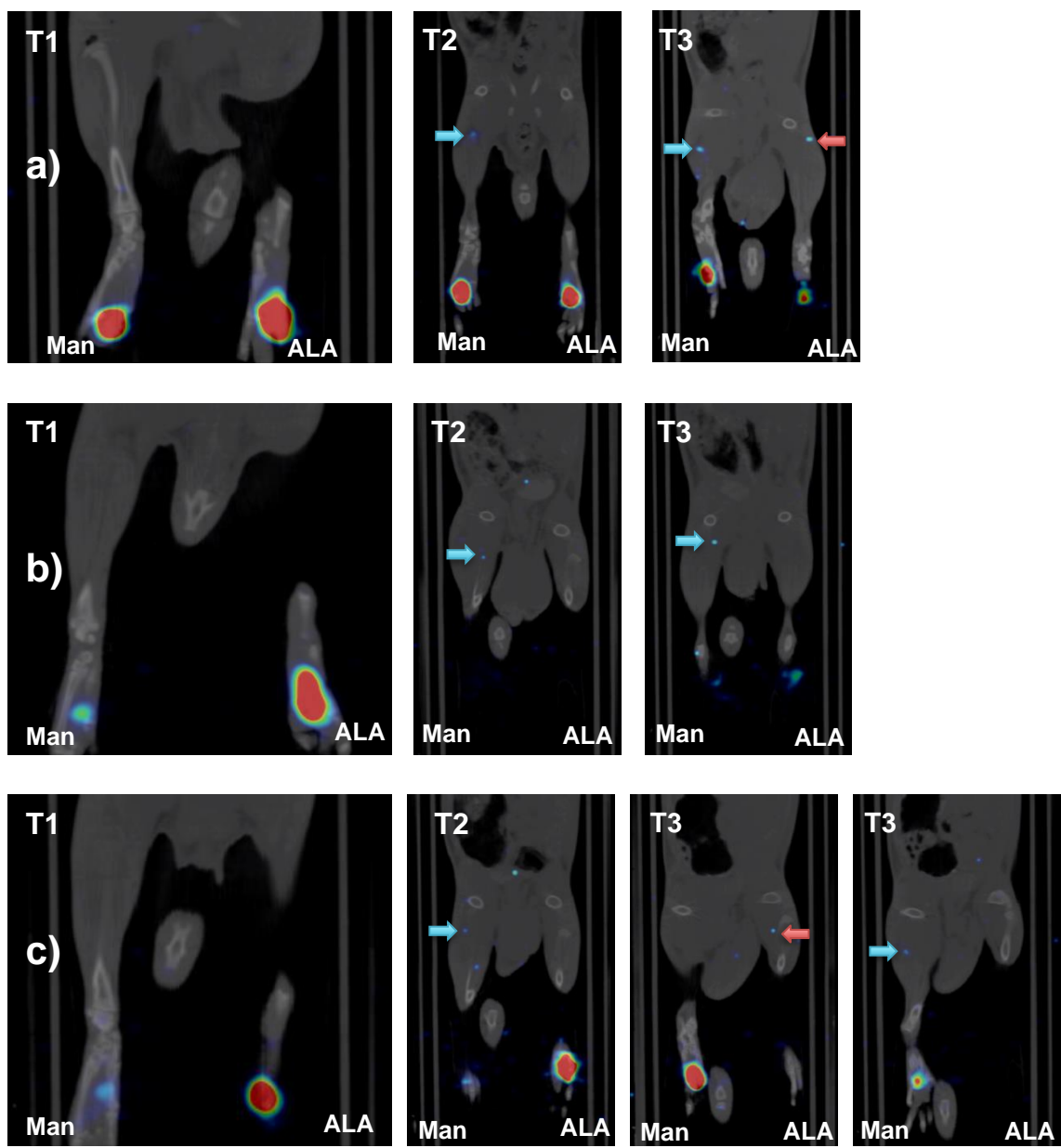


Figura 6.11 Imágenes SPECT/CT de ratas Wistar después de inyectar con formulación ^{99m}Tc -AuNP-Manosa y ^{99m}Tc -AuNP-ALA. a) Rata 1; b) Rata 2; c) Rata 3. T1 corresponde a 0 h; T2 corresponde a 3 h; T3 corresponde a 6 h. Man: ^{99m}Tc -AuNP-Manosa; ALA: ^{99m}Tc -AuNP-ALA. Reconstrucción de imágenes con software PMOD. La flecha azul indica la localización del ganglio poplíteo marcada con el coloide ^{99m}Tc -AuNP-Manosa y la flecha roja indica la localización del ganglio poplíteo marcada con el coloide ^{99m}Tc -AuNP-ALA.

Análisis SPECT	^{99m} Tc-AuNP-Manosa		^{99m} Tc-AuNP-ALA	
	Sitio de inyección	Ganglio poplíteo	Sitio de inyección	Ganglio poplíteo
0 h	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
3 h	67.5 ± 1.6	1.4 ± 0.6	48.5 ± 11.1	1.5 ± 0.5
6 h	45.0 ± 8.4	2.2 ± 0.6	32.9 ± 8.3	2.5 ± 1.3

Tabla 6.3 Cinética por SPECT de ^{99m}Tc-AuNP-Manosa y ^{99m}Tc-AuNP-ALA. (n = 6). Biodistribución en patas traseras y ganglios poplíteos de las ratas wistar administradas con ^{99m}Tc-AuNP-Manosa y ^{99m}Tc-AuNP-ALA a los tiempos 3 h y 6 h. Datos extraídos del programa PMOD. (Corrección de datos por decaimiento).

6.8 Cuantificación *ex vivo* a las 3 horas

- Para corroborar lo observado por las técnicas de imagen molecular SPECT/CT, se comparó los resultados obtenidos por la cuantificación de radiación *ex vivo* y los generados por el estudio SPECT/CT como se presenta en la tabla 6.4.
- La captación en el sitio de inyección se comportó de manera similar en ambos casos, mientras que en el ganglio poplíteo en la formulación ^{99m}Tc-AuNP-Manosa, hubo una menor captación identificada por el estudio SPECT/CT.
- Esto se puede deber a que el equipo microPET/SPECT/CT no es tan sensible a radiaciones muy pequeñas. Por lo que los resultados *ex vivo* son más confiables.

Análisis	^{99m} Tc-AuNP-Manosa		^{99m} Tc-AuNP-ALA	
	Sitio de inyección	Ganglio poplíteo	Sitio de inyección	Ganglio poplíteo
0 h	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
3 h <i>in vivo</i>	74.2 ± 9.4	1.0 ± 0.3	79.3 ± 11.5	3.1 ± 2.7
3 h <i>ex vivo</i>	80.4 ± 6.9	3.4 ± 1.3	77.4 ± 5.3	3.1 ± 0.9

Tabla 6.4 Cuantificación ex vivo a las 3 h. (n = 3). Extracción de patas traseras y ganglios poplíteos de las ratas Wistar administradas con ^{99m}Tc-AuNP-Manosa y ^{99m}Tc-AuNP-ALA. (Corrección de datos por decaimiento).

6.9 Estudio de cinética *in vivo* del ^{99m}Tc-Azufre coloidal por SPECT/CT

- El siguiente experimento fue probar el desempeño del coloide ^{99m}Tc-AuNP-manosa contra un estándar de oro, ^{99m}Tc-azufre coloidal.
- Al tiempo T1 sólo se acumulan los nanocoloides en el sitio de inyección, para el T2 ya hay migración en ambos ganglios poplíteos que se mantienen hasta el T3 (vea figura 6.13), sin presencia de migración de los conjugados a los ganglios próximos AX, IL, IN o RE.
- Sin embargo, al procesar las imágenes en 3D, se observa en la figura 6.14 una mayor acumulación en el ganglio poplíteo que se marcó con el coloide ^{99m}Tc-AuNP-manosa a las 3 y 6 h.

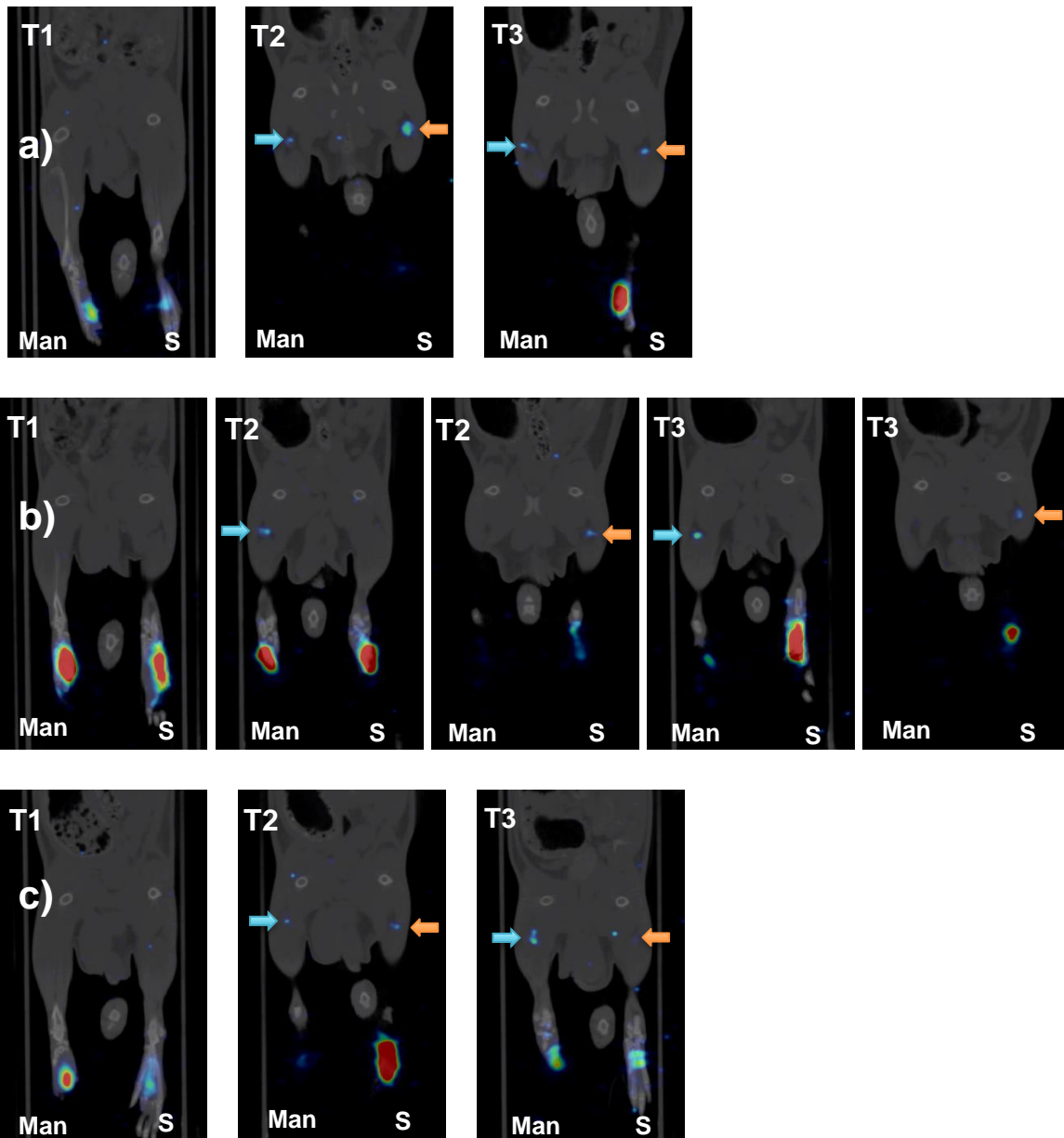


Figura 6.12 SPECT/CT 2D de ratas Wistar después de inyectar con formulación ^{99m}Tc -AuNP-Manosa y ^{99m}Tc -Azufre coloidal. a) Rata 1; b) Rata 2; c) Rata 3. T1 corresponde a 0 h; T2 corresponde a 3 h; T3 corresponde a 6 h. Man: ^{99m}Tc -AuNP-Manosa; S: ^{99m}Tc -Azufre coloidal. La flecha azul indica la localización del ganglio poplíteo marcada con el coloide ^{99m}Tc -AuNP-Manosa y la flecha naranja indica la localización del ganglio poplíteo marcada con el ^{99m}Tc -Azufre coloidal. Reconstrucción de imágenes con software PMOD.

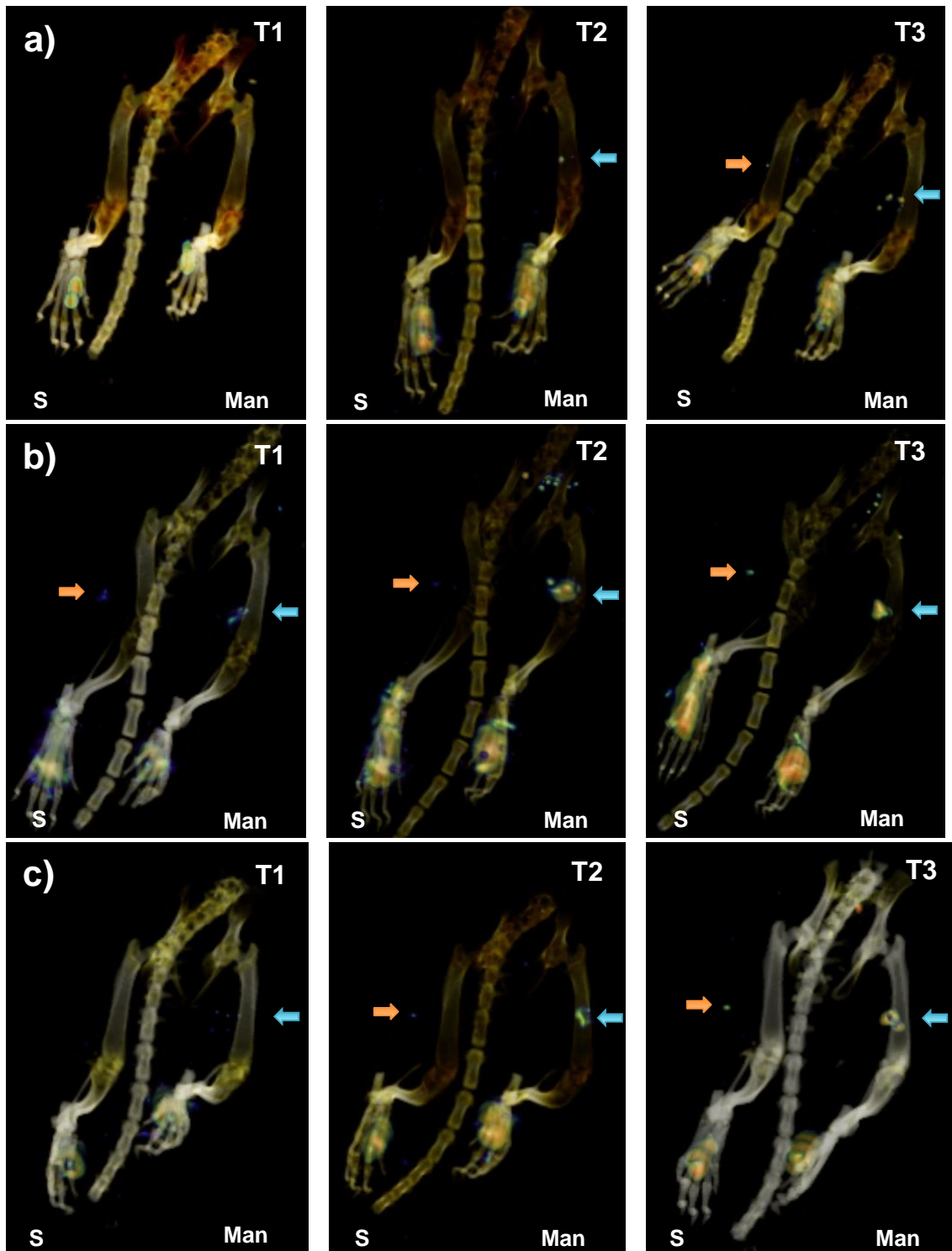


Figura 6.13 SPECT/CT en 3D de ratas Wistar después de inyectar con formulación ^{99m}Tc -AuNP-Manosa y ^{99m}Tc -Azulfre coloidal. a) Rata 1; b) Rata 2; c) Rata 3. T1 corresponde a 0 h; T2 corresponde a 3 h; T3 corresponde a 6 h. Man: ^{99m}Tc -AuNP-Manosa; S: ^{99m}Tc -Azulfre coloidal. La flecha azul indica la localización del ganglio poplíteo marcada con el coloide ^{99m}Tc -AuNP-Manosa y la flecha naranja indica la localización del ganglio poplíteo marcada con el ^{99m}Tc -Azulfre coloidal. Reconstrucción de imágenes con software OsiriX.

Se determinó la actividad con ayuda del programa PMOD, en cada zona (patas traseras y ganglios poplíteos) para obtener una relación de la cantidad de coloide que se encuentra en la zona.

Se puede observar que conforme transcurre el tiempo después de la administración del radiofármaco, la actividad en las patas va disminuyendo y va migrando a los ganglios poplíteos de cada extremidad. (vea tabla 6.5).

Análisis SPECT	^{99m} Tc-AuNP-Manosa		^{99m} Tc-Azufre coloidal	
	Sitio de inyección	Ganglio poplíteo	Sitio de inyección	Ganglio poplíteo
0 h	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
3 h	78.8 ± 6.9	3.3 ± 1.2	73.2 ± 10.0	4.2 ± 1.2
6 h	58.5 ± 9.7	4.5 ± 1.4	53.4 ± 7.2	4.5 ± 0.7

Tabla 6.5 Cinética por SPECT de ^{99m}Tc-AuNP-Manosa y ^{99m}Tc-azufre coloidal. (n = 5). Biodistribución en patas traseras y ganglios poplíteos de las ratas wistar administradas con ^{99m}Tc-AuNP-Manosa y ^{99m}Tc-azufre coloidal a los tiempos 3 h y 6 h. (Corrección de datos por decaimiento).

7. Discusión

A partir de un trabajo previo de Ocampo-García *et al*, se planteó el desarrollo de nanopartículas de oro funcionalizadas con manosa y radiomarcadas con ^{99m}Tc, este coloide funcionaría como medio de contraste en la localización y mapeo de ganglios linfáticos.²⁶

Se ha investigado en la literatura que los medios de contraste actuales para la localización y mapeo de ganglio centinela, no son selectivos a ganglios. Por lo que su migración y estancia son cortas para tener una correcta selección de SLNs para su posterior biopsia y análisis.^{15,16} Dando por consecuencia falsos negativos y por consiguiente una mala estadificación y planteamiento de terapia del paciente.^{1,3}

Se realizó la funcionalización de Manosa, mediante una reacción química sencilla entre Manosa-NH₂ y ALA, y se planteó mejorar la eficiencia del radiomarcado obtenida con el ^{99m}Tc y realizar estudios de cinética *in vivo* por técnicas de imagen molecular, para que, en un trabajo posterior, haya un seguimiento a los estudios preclínicos del coloide ^{99m}Tc-AuNP-Manosa.

La caracterización fisicoquímica que se realizó es indispensable para cualquier nanocoloide que se utilice en el área médica.³³ Nuestro primer experimento fue determinar el número de moléculas de ácido lipoico y el número de moléculas de HYNIC que se adsorbieron a una nanopartícula de oro, para obtener datos de un proceso reproducible, además de tener un control y conocimiento de las moléculas de manosa disponibles para interactuar con los receptores a manosa de las células linfáticas y de los macrófagos presentes en los ganglios linfáticos.^{17,27,39,40}

Por otro lado saber el número de moléculas de HYNIC, porque será el agente quelante con el que se llevara a cabo el radiomarcado con ^{99m}Tc. De igual manera se observa si los procedimientos planteados para ambas funcionalizaciones son correctos para obtener el coloide que deseamos.

Como se observa en los resultados, en la figura 6.1 se muestra la adsorción de moléculas de ácido lipoico con las AuNPs, el ALA va disminuyendo del sobrenadante y, por consiguiente, se va quedando retenido en las AuNPs por la interacción de oro (Au) con los azufres (S) del ácido lipoico.³⁰ Sin embargo, no es posible obtener resultados confiables del número de moléculas de ácido lipoico que se adsorbieron a cada nanopartícula de oro, pues en la curva de saturación del ALA, se visualiza que las desviaciones estándar son grandes, por lo que el método de espectrofotometría UV-VIS no es sensible a esta molécula y por lo tanto no es el adecuado para calcular este parámetro. Un método para obtener esta información es la Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS por sus siglas en inglés de X-ray photoelectron spectroscopy)³⁰, pero debido a que en nuestro laboratorio no se cuenta con este instrumento, no se realizó este método, aunque para posteriores publicaciones sería indispensable contar con el número de moléculas de ácido lipoico, para tener un control en el número de moléculas de manosa que se le van a adsorber a la AuNP.

Por otro lado, en la figura 6.2 y en la tabla 6.2 se observa que el método de espectrofotometría UV-VIS con la molécula de HYNICGGC fue sensible, dando como resultado 1199 ± 430 moléculas de HYNIC por cada AuNP a los 20 min de incubación. En el artículo de Ocampo-García *et al*, se reporta de 1000 a 1100 moléculas de HYNIC adsorbidas a los 20 min. Por lo tanto, nuestro método es reproducible, además de

corroborar que las moléculas de HYNICGGC se están adsorbiendo con las AuNPs, al interactuar el grupo tiol (-SH) del aminoácido cisteína con los átomos de oro (Au) de la nanopartícula.

En el siguiente estudio se realizaron las mediciones del potencial Z, como se observa en la figura 6.3, después de la adsorción del ácido lipoico a las AuNPs se presenta un cambio de potencial Z de positivo a negativo en las 4 formulaciones, y se conserva en potenciales negativos (-60 mV a -80 mV) durante los demás procesos, demostrando la estabilidad del sistema. Se reporta en la literatura que un gran valor positivo o negativo del potencial zeta en nanocoloides indica una buena estabilidad física de la suspensión debido a la repulsión electrostática de partículas individuales. Y en general, se considera que un valor potencial zeta distinto de -30 mV a +30 mV tiene suficiente fuerza repulsiva para lograr una mejor estabilidad coloidal física.⁴¹

Posteriormente, se obtuvieron los diámetros hidrodinámicos de las 4 formulaciones, con este parámetro fisicoquímico obtenemos información sobre el tamaño de los coloides en solución acuosa. Se observa en la figura 6.4 en el inciso a) que las desviaciones estándar son mayores. La formulación de 2 h de incubación con ALA es inestable, al tener pocas moléculas de ALA estabilizando a las nanopartículas, las AuNPs sin cobertura son muy propensas a aglomerarse y precipitar, por lo que los diámetros hidrodinámicos son muy variados. Mientras que, las formulaciones de 24 h, 48 h y 72 h de incubación con ALA son más estables, por lo que su dispersión en sus diámetros hidrodinámicos será óptima. Existe una polidispersión de 0.200 a 0.300 debido a que hay más de una población de tamaños, donde se ve reflejado en las desviaciones estándar de las mediciones.

Se realizó la técnica de microscopía FTIR-ATR, para poder corroborar el enlace de la reacción entre la Manosa-NH₂ con un grupo amino primario disponible para reaccionar con el grupo carboxilo (-COOH) del ALA y formar un enlace amida ⁴², como se observa en la figura 6.5, la reacción se llevó a cabo, por lo que se deduce que las AuNPs estarán recubiertas por las moléculas de manosa, actuando como vector para los receptores a manosa que se encuentren en las células linfáticas epiteliales y los macrófagos presentes en el ganglio. ^{17,27}

El siguiente estudio que se realizó, fue conocer si las AuNPs son estables después de pasar por los procesos de adsorción que se llevan a cabo, se realizó por métodos espectrofotométricos UV-VIS sabiendo que las AuNPs presentan propiedades plasmónicas que dependen del tamaño, por lo tanto, serán identificadas con un intervalo de longitudes de onda máxima, las AuNPs de 20 nm tienen una absorción máxima entre los 518 - 522 nm⁴³, si existe una inestabilidad en el sistema, las AuNPs se aglomerarán y cambiara su intervalo de absorción máxima con un corrimiento hacia el rojo en el espectro electromagnético.⁴⁴ En la figura 6.6 se observan los 4 espectros de las 4 formulaciones que se propusieron, cambiando únicamente el tiempo de incubación de la reacción de funcionalización del ácido lipoico. Como se puede observar, en el inciso a) que corresponde a 2 h de funcionalización con ALA, las AuNPs que no están completamente saturadas, sufrirán de inestabilidad al momento de realizar los procesos subsecuentes, incluso este comportamiento se ve reflejado en los resultados del potencial Z y los diámetros hidrodinámicos de esta formulación, en cambio como se incrementa el tiempo de incubación de adsorción con ALA, las AuNPs serán más estables en los procesos siguientes, observando en el inciso c) y d) mayor estabilidad, siendo los tiempos de 48 h y 72 h de incubación con ácido lipoico, por lo que se espera que ambas formulaciones puedan tomarse para seguir con los siguientes estudios.

Por último, en los análisis fisicoquímicos se realizó microscopia TEM y análisis elemental, se observa en la figura 6.7 que los tamaños físicos sólo tienen una población que ronda entre los 14 nm a 26 nm, confirmando el tamaño de nuestras AuNPs, además de corroborar que el coloide AuNP-Manosa y AuNP-ALA tienden a formar dímeros o trímeros de nanopartículas, y por este motivo el equipo para determinar diámetro hidrodinámico no distingue entre las partículas individuales, por lo tanto se observan valores más altos a los esperados. Pues la compañía Sigma Alrich reporta que las AuNPs comerciales de 20 nm deben tener un diámetro hidrodinámico entre 28 nm y 36 nm, con un índice de polidispersión menor o igual a 0.2.⁴³

Por otro lado, en la figura 6.8, se puede observar en los incisos b) y c) que existe un halo rodeando a las AuNPs y al realizar el análisis elemental, incrementan los picos de Azufre (S), Oxígeno (O) y Nitrógeno (N), aunque se ven enmascarados por los

picos del carbón (C) y oro (Au). El azufre presente en el inciso b) corresponde a los azufres del ácido lipoico unidos a la AuNP, mientras que en el inciso c) corresponde a los grupos tiol (-SH) del aminoácido cisteína del HYNICGGC.

Para el radiomarcado del coloide AuNP-Manosa-HYNIC con ^{99m}Tc se probaron las dos formulaciones más estables y con mejores resultados en las pruebas fisicoquímicas, siendo las formulaciones de AuNPs de 48 h y 72 h de incubación con ALA. Dando una eficiencia de radiomarcado mayor la formulación de 48 h (86 ± 14 %), como se muestra en la figura 6.9. Obteniendo un resultado favorable en comparación con la eficiencia de radiomarcado de 30 ± 8 % reportada por Ocampo-García *et al.*²⁶

Después de la purificación por ultrafiltración se obtuvo una pureza del nanocoloide ^{99m}Tc -AuNP-Manosa 48 h del 97 ± 2 %. De acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 12ª edición⁴⁵, la suspensión coloidal de ^{99m}Tc -Azufre debe tener una pureza mayor al 92%, este coloide de igual manera se utiliza para la localización y mapeo de ganglios linfáticos, por lo que se deduce que la pureza de nuestro coloide cumple con los estándares mexicanos.

Mientras tanto, la prueba de estabilidad radioquímica informa que ambas formulaciones fueron estables a las 6 h. La estabilidad en suero humano del nanocoloide ^{99m}Tc -AuNP-Manosa 48 h a las 6 h fue de 99 ± 2 %. De acuerdo con los análisis realizados, se llegó a la conclusión de que el nanocoloide ^{99m}Tc -AuNP-Manosa 48 h es estable y se necesita de menor tiempo de incubación que el nanocoloide ^{99m}Tc -AuNP-Manosa 72 h. Por consiguiente, se propuso seguir la prueba de cinética por SPECT/CT con el nanocoloide ^{99m}Tc -AuNP-Manosa 48 h.

En los resultados obtenidos en el estudio de cinética *in vivo* por imagen SPECT/CT se observa que prácticamente el nanocoloide ^{99m}Tc -AuNP-Manosa 48 h y ^{99m}Tc -AuNP-ALA 48 h se comportan de manera similar en la retención que presentan en el PO, pero experimentalmente en algunas ratas el coloide ^{99m}Tc -AuNP-ALA 48 h no se retenía a las 3 h, sino fue hasta las 6 h después de administrar como se observa en la figura 6.11. Esto se debe a que, al no tener una molécula selectiva al ganglio, este migra y no se retendrá por las células epiteliales linfáticas y los macrófagos con MR.

Mientras que, al momento de realizar el estudio *ex vivo*, se observa en la tabla 6.4 que el coloide $^{99m}\text{Tc-AuNP-Manosa}$ 48 h se retiene en un 3.4 ± 1.3 % y el coloide $^{99m}\text{Tc-AuNP-Manosa}$ 48 h se retiene en un 3.1 ± 0.9 % a las 3 h. Sin embargo, al momento de procesar la imagen en 3D en el programa OsiriX nos percatamos que se logra observar una mayor acumulación en el PO de la formulación $^{99m}\text{Tc-AuNP-Manosa}$ 48 h. Por lo que se recomienda un estudio que corrobore la unión del reconocimiento de MR por las moléculas de manosa presentes en la AuNP. Para corroborar que la retención se debe a la vectorización de la AuNP y no solamente a las propiedades fisicoquímicas del nanocoloide.

Al momento de comparar el nanocoloide $^{99m}\text{Tc-AuNP-Manosa}$ contra el $^{99m}\text{Tc-Azufre}$ coloidal, que es el estándar que se utiliza en la clínica del INCa. Podemos observar en la figura 6.12 y 6.12 que se comportan similarmente. Dando como resultado a las 6 h un % de retención en PO de 4.5 ± 1.4 % para $^{99m}\text{Tc-AuNP-Manosa}$ y 4.5 ± 0.7 % para el $^{99m}\text{Tc-Azufre}$ coloidal. Aunque uno de los problemas que se observó y se ha presentado en clínica al momento de administrar el $^{99m}\text{Tc-Azufre}$ coloidal, es que se presenta irritación. Ocasionando inflamación y dolor en el sitio de inyección. Se reporta en *Drugbank* que el $^{99m}\text{Tc-Azufre}$ coloidal provoca reacciones locales en el sitio de inyección, que incluyen ardor, palidez, eritema, esclerosis, hinchazón y cicatrices.⁴⁶ Y nuestro nanocoloide $^{99m}\text{Tc-AuNP-Manosa}$ no ha presentado hasta el momento, una toxicidad similar. Por lo que podría ser una ventaja favorable para su uso en clínica.

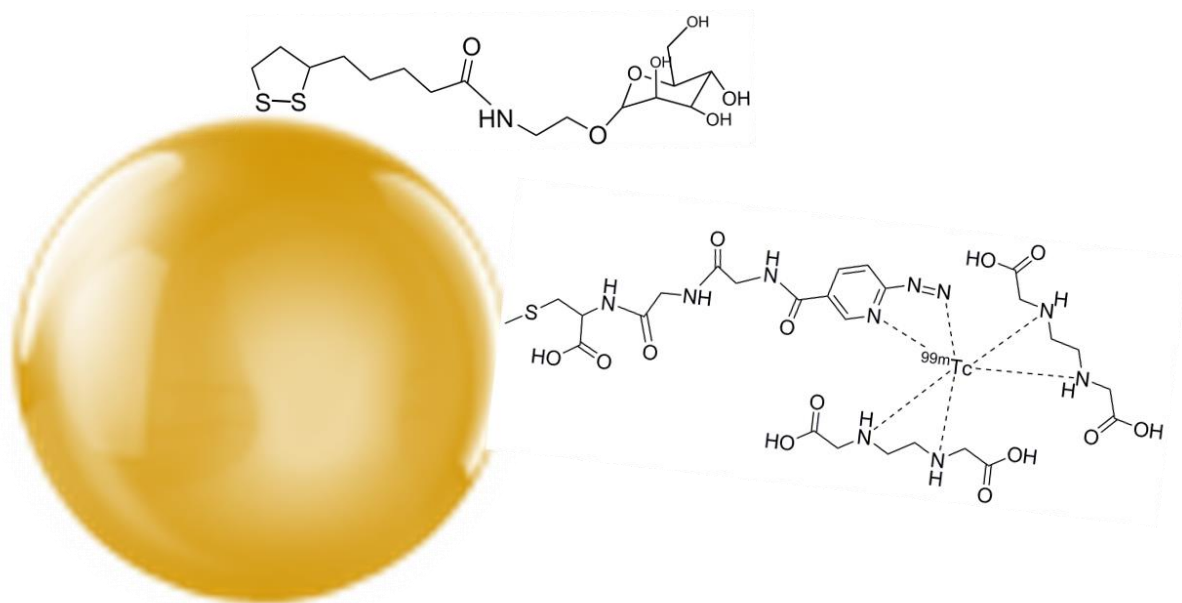


Figura 7.1 Diagrama del coloide ^{99m}Tc -AuNP-Manosa. La esfera dorada representa la AuNP de 20 nm, la molécula que se encuentra en la parte superior representa el ácido lipoico unido a la Manosa- NH_2 , y la molécula que se encuentra a un costado de la esfera representa el HYNICGGC quelando al ^{99m}Tc y para a completar la esfera de coordinación se encuentran dos moléculas de EDDA.

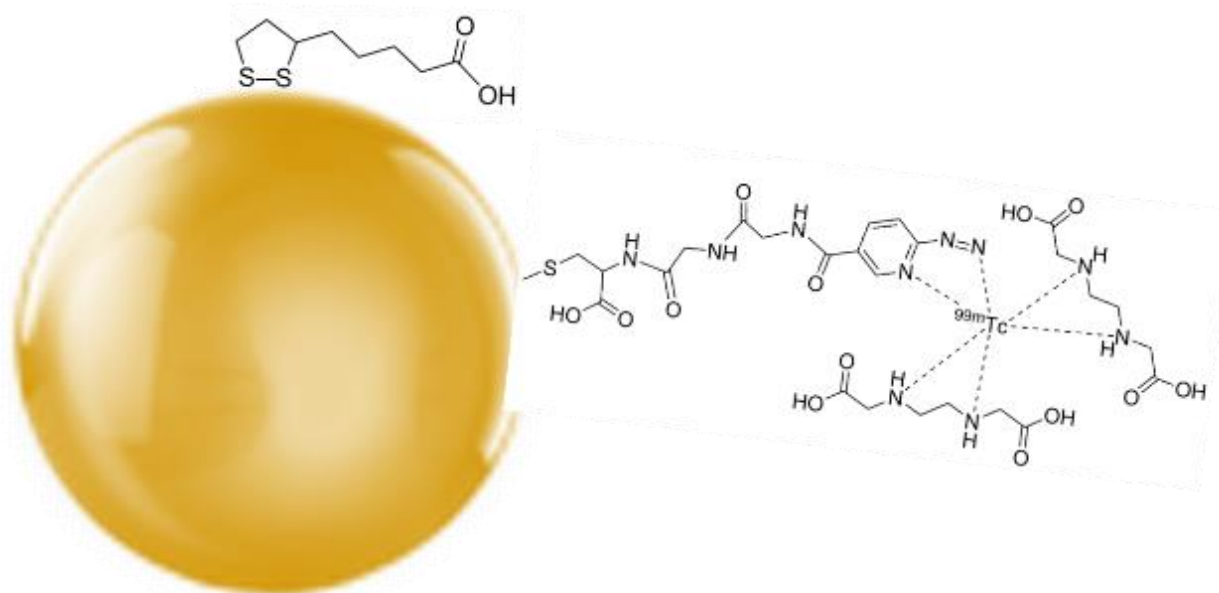


Figura 7.2 Diagrama del coloide ^{99m}Tc -AuNP-ALA. La esfera dorada representa la AuNP de 20 nm, la molécula que se encuentra en la parte superior representa el ácido lipoico y la molécula que se encuentra a un costado de la esfera representa el HYNICGGC quelando al ^{99m}Tc y para a completar la esfera de coordinación se encuentran dos moléculas de EDDA.

8. Conclusión

El nanocoloide radiomarcado ^{99m}Tc -AuNP-Manosa funciona como medio de contraste en la localización y mapeo de ganglios linfáticos mediante SPECT.

9. Perspectivas

- Realizar estudios para obtener el número de moléculas de manosa que se conjugan a la AuNP.
- Realizar estudios que sustenten el reconocimiento de moléculas de manosa con los receptores a manosa de las células linfáticas epiteliales y macrófagos presentes en el sistema linfático.
- Extender los estudios de biodistribución en órganos, farmacocinética del nanocoloide, estabilidad acelerada, reactogenicidad, hipersensibilidad, irritación, toxicidad aguda, toxicidad a dosis repetidas.

Anexo I

Conceptos clave

I Cáncer

Las células cancerosas crecen y se dividen a una velocidad anormalmente rápida, están poco diferenciadas y tienen membranas y morfología anormal. La anomalía en las células puede ser progresiva con una transición lenta de células normales a tumores benignos a tumores malignos.⁴⁷

En el 2000, los biólogos del cáncer Robert Weinberg y Douglas Hanahan publicaron un artículo titulado “Los distintivos del cáncer” (su título en inglés: *"The Hallmarks of Cancer"*). Aunque reconocieron que los cánceres ocurrieron a través de una serie de mutaciones en cualquiera de los genes.⁸ Se enumeran seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que caracterizaron la malignidad:

- Autosuficiencia en señales de crecimiento: las células cancerosas adquieren un impulso autónomo para proliferar (mitosis patológica) en virtud de la activación de oncogenes como ras o myc.
- Insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento (anti-crecimiento): las células cancerosas inactivan los genes supresores de tumores, como Rb, que normalmente inhiben el crecimiento.
- Evasión de la muerte celular programada (apoptosis): las células cancerosas suprimen e inactivan los genes y vías que normalmente permiten que las células mueran.
- Potencial de replicación ilimitado: las células cancerosas activan vías genéticas específicas que las hacen inmortales incluso después de generaciones de crecimiento.
- Angiogénesis sostenida: las células cancerosas adquieren la capacidad de extraer su propio suministro de sangre y vasos sanguíneos: la angiogénesis tumoral.
- Invasión de tejidos y metástasis: las células cancerosas adquieren la capacidad de migrar a otros órganos, invadir otros tejidos y colonizar estos órganos, lo que resulta en su diseminación por todo el cuerpo.⁸

II Cáncer de cabeza y cuello

Los cánceres de cabeza y cuello se categorizan, a su vez, de acuerdo con la zona de la cabeza o del cuello en la que empiezan, estas zonas son: Cavity oral, Faringe, Laringe, Senos paranasales y cavidad nasal y glándulas salivales. (Figura 2.1). Los principales factores de riesgo que se han identificado en el cáncer de cabeza y cuello incluyen el tabaco, alcohol e infecciones con el VPH (virus del papiloma humano).¹⁰

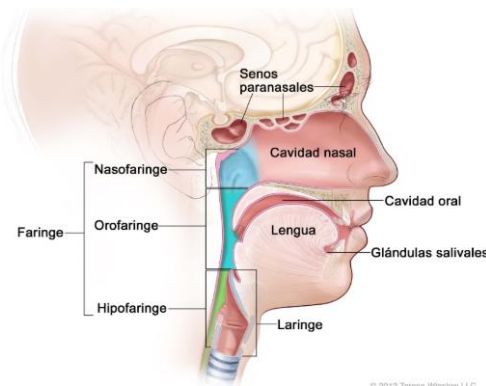


Figura 1 Regiones en el Cáncer de cabeza y cuello.
(Tomada de referencia 1).

Las opciones para el diagnóstico y estratificación del HNC son: i) La laringoscopia indirecta o el examen con nasofaringoscopia de fibra óptica flexible, la cual es el primer procedimiento que se realiza en la búsqueda de cáncer que no afecte a la cavidad oral.⁴⁸ ii) La evaluación radiológica se emplea para evaluar la extensión de la diseminación local y regional del tumor, la profundidad de la invasión y la presencia de linfadenopatía. iii) El examen endoscópico con el paciente bajo anestesia es el diagnóstico definitivo y el procedimiento de estadificación. Incluye laringoscopia directa, esofagoscopia y broncoscopia.¹⁸

La detección temprana sigue siendo la mejor opción para los pacientes, en etapas iniciales pueden recibir el tratamiento adecuado, cirugía o radioterapia y sus pronósticos son favorables; por el contrario, los pacientes en etapas avanzadas o con recurrencia tienen pronósticos pobres con tasas de supervivencia bajas. Esto se debe a que, en estadios avanzados, como la etapa 4, los tumores presentan metástasis.¹⁴

La tabla 2.1 Muestra los diferentes estadios del cáncer de cabeza y cuello, y la tabla 2.2 Muestra las neoplasias malignas de cabeza y cuello de acuerdo con el registro histopatológico de las neoplasias en México.

Tabla 1 Estadios del Cáncer de Cabeza y Cuello.

Estadio	Tumor primario	Ganglios	Metástasis
0	Carcinoma	No hay metástasis en ganglios	No hay evidencia de metástasis a distancia
I	Tumor ≤ 2 cm	No hay metástasis en ganglios	No hay evidencia de metástasis a distancia
II	Tumor > 2 cm, pero ≤ 4 cm	No hay metástasis en ganglios	No hay evidencia de metástasis a distancia
III	Tumor > 4 cm	Metástasis en ganglio linfático ipsilateral	No hay evidencia de metástasis a distancia
IV	Tumor de cualquier tamaño	Metástasis en ganglios linfáticos	Metástasis a distancia

Modificado de referencia¹⁴

Tabla 2 Neoplasias malignas de cabeza y cuello

Neoplasias malignas de la cabeza y el cuello de acuerdo con el Registro Histopatológico de las Neoplasias en México			
Labio	Amígdala	Hipofaringe	Fosas nasales
Lengua	Base de la lengua	Laringe	Parótida
Encía	Bucofaringe	Nasofaringe	Glándulas en cabeza y cuello
Piso de boca	Seno periforme	Senos paranasales	Salivales mayores
Tiroides	Ojo y anexos	Encéfalo	Otras partes de la boca

Modificado de referencia⁴⁹

III Ganglios linfáticos

Los ganglios linfáticos son estructuras de forma ovoide o redondeada, se encuentran intercalados a lo largo del sistema linfático (Vea Figura 2.2). Suelen medir desde 3 a 5 milímetros hasta 2 a 3 centímetros de longitud. Se localizan en mayor cantidad en regiones del cuello, las ingles, axilas, cavidad abdominal y mediastino.⁵⁰

Los ganglios linfáticos son órganos importantes del sistema inmune periférico, sus dos principales funciones son:

1. Filtración de la linfa.
2. Reconocimiento y procesamiento inmunológico.

III.I Ganglio linfático centinela en cáncer de cabeza y cuello

El ganglio linfático centinela es el ganglio más próximo que recibe la linfa del tumor primario, y es el lugar más próximo para localizar células cancerosas, individuales o micrometástasis, cuando se separan del tumor. La ausencia de células cancerosas en el ganglio (o los ganglios) centinela se interpreta como la ausencia de metástasis.¹⁶ El factor más importante que afecta el pronóstico en los cánceres de cabeza y cuello es la metástasis linfática del cuello. El ganglio linfático positivo detectado en el cuello es muy importante en la estadificación y el tratamiento de la enfermedad. Se sugiere que la afectación de los ganglios linfáticos regionales reduce al 50% la tasa de supervivencia a cinco años en el carcinoma de células escamosas (CCE) de cabeza y cuello.⁵¹ Por lo tanto, se recomienda la disección electiva del cuello (END) en algunos cánceres de cabeza y cuello T1-T2 con una tasa de metástasis latente de 15 a 20%. Este abordaje sigue siendo controvertido, ya que la disección del cuello aumenta la morbilidad y mortalidad del paciente y aumenta los gastos hospitalarios, si no hay un correcto diagnóstico en la localización y biopsia del ganglio linfático centinela.¹⁵

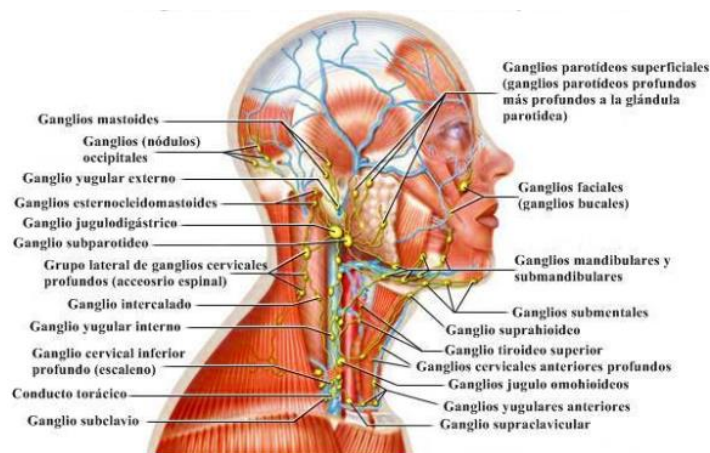


Figura 2 Ganglios linfáticos de la cabeza y cuello

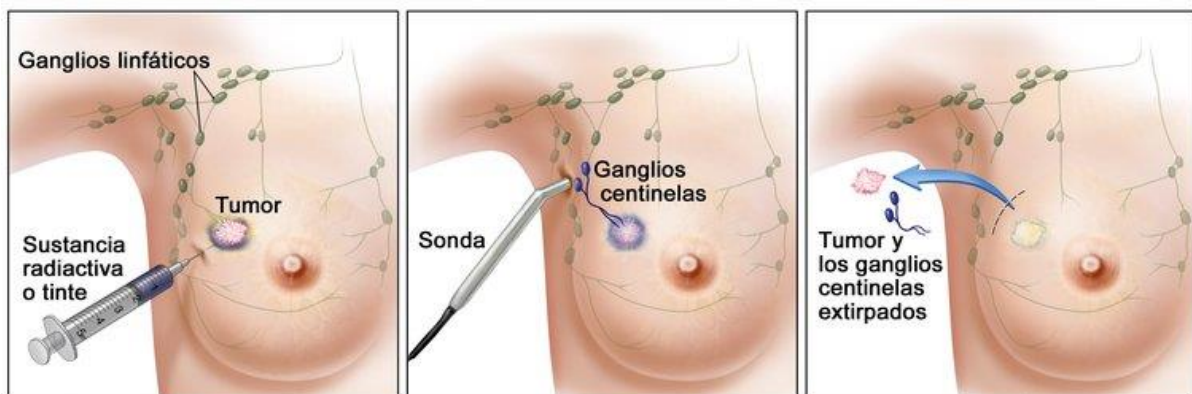
(Tomada de referencia ⁵²)

IV Métodos de detección de ganglio linfático centinela

El mapeo linfático en pacientes con cáncer se remonta a principios de los años 50. El objetivo había sido la detección de ganglios linfáticos potencialmente infiltrados por visualización indirecta para determinar el alcance de la intervención quirúrgica. Pero los resultados no alcanzaron relevancia clínica. Durante los años 60 y 70, se desarrolló el concepto de los ganglios linfáticos como indicadores de metástasis. Actualmente, el método ha alcanzado la aplicación clínica en pacientes con melanoma y cáncer de mama.¹⁶

Actualmente, el mapeo adecuado de la organización del sistema linfático del área del tumor primario es un prerrequisito esencial para planear el tratamiento más adecuado; sin embargo, también se requieren métodos menos invasivos para disminuir la morbilidad.¹⁶

Las dos principales técnicas para localizar el ganglio linfático centinela son: Técnica con el colorante azul de metileno y por el método de radionúclidos.



© 2010 Terese Winslow
U.S. Govt. has certain rights

Figura 3 Linfogammagrafía en Cáncer de mama

(Tomada de referencia ⁵³)

IV.I Técnica con el colorante azul de metileno

En esta técnica se inyecta azul de metileno en la zona peritumoral, y después de 10 minutos de la inyección, se realiza una incisión y disección. Se seleccionará y extirpará el primer nodo linfático marcado y se examinará. Esta técnica suele ser rápida y barata, aunque tiene la desventaja de sufrir algún daño el paciente y se necesita de alguien con gran experiencia para realizarla.¹⁶

IV.II Técnica de radionúclidos

Esta técnica se basa en la inyección peritumoral de una solución de albumina o azufre coloidal radiomarcada con ^{99m}Tc . Después de 1 hora y justo antes de la cirugía se realizará una linfogammagrafía para evaluar si hay uno o más ganglios linfáticos centinelas y en qué área se pueden encontrar. La detección intraoperatoria del nodo centinela se utilizará para extirpar de forma selectiva el ganglio linfático radiomarcado. Se verificará, si el ganglio linfático extirpado corresponde al nodo centinela y si hay otros puntos de acumulación de núclidos en el área de los ganglios linfáticos y se procederá a la extirpación selectiva de otros ganglios linfáticos centinela si corresponde.¹⁶

Los medios de contraste más comunes en SPECT (tomografía por emisión de fotón único) para la localización de SLNs son partículas coloides radiomarcadas con tecnecio metaestable radiactivo (^{99m}Tc), tales como: ^{99m}Tc -azufre coloidal, ^{99m}Tc -albumina coloidal o ^{99m}Tc -trisulfuro de antimonio. Estas son partículas coloidales entre 40-80 nm de tamaño, suficientemente pequeñas para migrar rápido y suficientemente grandes para quedar atrapadas eficientemente en ganglios centinela; sin embargo, carecen de especificidad hacia los ganglios y una gran cantidad de coloides permanecen en el sitio de inyección.^{4,5}

V Células endoteliales linfáticas con receptor a manosa

El receptor de manosa (MR) puede expresarse en el endotelio linfático sano. Se ha visto su expresión está estrictamente restringida al endotelio linfático y participa en la migración de linfocitos de la piel a los nódulos, media la adherencia de linfocitos uniéndose a la L-selectina de la superficie de los linfocitos.^{17,39}

Heikki Irjala *et al.* sugieren que la expresión de MR en la región linfática intratumoral se asocia con la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales en el momento del diagnóstico de cáncer de mama.¹⁷

VI Macrófagos relacionados con el ganglio linfático centinela

Los macrófagos son definidos como células altamente patogénicas que internalizan y degradan partículas y patógenos y liberan mediadores que alertan el sistema inmune adaptativo contra invasores.⁵⁴ Los macrófagos se encuentran en todos los tejidos del cuerpo y tienen propiedades específicas que les ayudan a soportar sus funciones particulares en cada tejido de residencia. Los macrófagos asociados a ganglio linfático son macrófagos que residen en los ganglios linfáticos y se encuentran directamente expuestos al líquido linfático. Se caracterizan por su alta capacidad para tomar antígenos transmitidos por linfa. Esos macrófagos son la línea de defensa del sistema inmune en los nódulos linfáticos, se encargan de limitar la propagación de patógenos como virus y bacterias por el sistema linfático. Los macrófagos en tejidos expresan el receptor a manosa, el cual participa en el reconocimiento de patógenos, limpieza de glicoproteínas séricas endógenas, y presentación de antígenos.^{27,55} Ashleigh R. Poh y Matthias Ernst⁵⁶ mencionan que los macrófagos son un componente importante del microentorno del tumor y organizan diversos aspectos de la inmunidad. Dentro de los tumores, los macrófagos pueden alterar reversiblemente su endotipo en respuesta a señales ambientales, que incluyen la hipoxia y los estímulos derivados de otras células inmunitarias, así como la matriz extracelular. Dependiendo de su estado de activación, los macrófagos pueden ejercer influencias duales en la tumorigénesis antagonizando las células inmunes de la actividad citotóxica o mejorando las respuestas antitumorales. En la mayoría de los cánceres sólidos, el aumento de la infiltración con TAMs se ha asociado durante mucho tiempo con un mal pronóstico del paciente, destacando su valor como posibles biomarcadores de diagnóstico y

pronóstico en el cáncer. Se han investigado varios enfoques centrados en los macrófagos de la terapia contra el cáncer, e incluyen estrategias para bloquear sus actividades de promoción de tumores o explotar sus funciones efectoras antitumorales.

Takuya Shiota *et al.* ⁵⁷ Reporto que la disminución de la infiltración de linfocitos T citotóxicos CD8+ en el tumor se ha asociado con metástasis en los ganglios linfáticos y una mala respuesta a la quimioterapia neoadyuvante. Mientras que una mayor densidad de linfocitos CD8+ en el tumor primario está asociada con una mayor densidad de macrófagos CD169+ en el ganglio centinela y una baja incidencia de metástasis en un caso de alto grado de cáncer de mama. Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que los macrófagos CD169+ en ganglio centinela podrían ser un marcador útil para evaluar el estadio clínico, incluidos los estados de los ganglios linfáticos, en pacientes con cáncer de mama.

VII Nanotecnología

La Nanotecnología es el área encargada del diseño, desarrollo, caracterización y aplicación de materiales con tamaños en escala nanométrica (1×10^{-9} m). Los nanomateriales por definición son estructuras con al menos una de sus dimensiones (largo, ancho o alto) en la escala nanométrica (< 100 nanómetros). Debido a su tamaño las propiedades físicas y químicas de los nanomateriales difieren de las del bulto y los hacen atractivos en un gran número de aplicaciones.^{22,58} Particularmente, se ha explorado su aplicación en medicina, como medios de contraste para la detección y visualización de tejidos.⁵⁸ La incursión de los nanomateriales en imagen medica se debe a que la tecnología en el área evoluciono rápidamente en cuanto a hardware y software, sin embargo, los medios de contraste se han quedado rezagados, particularmente en tomografía computarizada por SPECT y PET (vea apartado 2.10).⁵⁹

VIII Nanopartículas de oro

Las AuNPs son una prometedora alternativa a los típicos colorantes usados en la visualización *in vitro* e *in vivo* de tejidos, al presentar una gran fluorescencia, una elevada resistencia al Photobleaching, y la capacidad de marcar específicamente tipos celulares concretos en función del ligando conjugado a la superficie de la nanopartícula.⁶⁰ Las nanopartículas de oro se pueden sintetizar y modificar fácilmente con moléculas orgánicas y biológicas, lo que las convierte en nanomateriales inorgánicos atractivos para la administración de fármacos y diagnóstico molecular. La superficie de las AuNPs es compatible con la unión eficiente de varias biomacromoléculas a través de la quimisorción, la conjugación química y la interacción electrostática.^{24,25,60-62} Sobre la base de las ventajas de la fácil modificación de la superficie y de sus propiedades ópticas únicas, las AuNPs se han utilizado ampliamente como portadores de fármacos para la administración intracelular de agentes terapéuticos, así como nanopelículas moleculares para la detección y monitoreo de las moléculas diana de interés.²⁵

Blanca E. Ocampo-García et al.²⁶ sintetizó un sistema multifuncional de AuNPs marcadas con ^{99m}Tc conjugadas a HYNICGGC/Manosa puede actuar como un posible radiofármaco para la localización de ganglios linfáticos centinelas. Este radiofármaco es considerado específico porque existe la unión específica a los receptores de manosa expresados en los macrófagos de los ganglios linfáticos. Según sus resultados el nanocoloide ^{99m}Tc-AuNP-manosa permanece dentro del primer ganglio linfático durante 24 h, por lo que podría ser útil como un radionanoconjugado específico para la detección de ganglios linfáticos centinelas utilizando protocolos convencionales de "1 día" o "2 días".

IX Técnica de radiomarcado con ^{99m}Tc

El tecnecio es un elemento químico cuyo radioisótopo ^{99m}Tc, con vida media de 6.02 h y mecanismo de decaimiento por transición isomérica emitiendo fotones y de 140 keV. Se obtiene a partir de un generador de Molibdeno ⁹⁹Mo-^{99m}Tc, que es su radionúclido padre. El resultado es una elución salina de pertecnetato de sodio estéril y apirógena. En Medicina Nuclear el ^{99m}Tc se utiliza en el diagnóstico de enfermedades, por ejemplo, se emplea pertecnetato de sodio en el diagnóstico de

alteraciones en glándulas como tiroides o glándulas salivares. De igual forma, si el ^{99m}Tc se une a biomoléculas de reconocimiento molecular se incrementa la habilidad para detectar tejidos o células específicas. La unión de ^{99m}Tc a biomoléculas o moléculas orgánicas se denomina radiomarcado.²⁸

Los dos tipos de estrategias más utilizados en radiomarcado de moléculas orgánicas o biomoléculas son la del marcado directo e indirecto.

IX.I Radiomarcado directo

En el radiomarcado directo se utilizan agentes reductores capaces de producir especies electrofílicas de los átomos radiactivos los cuales reaccionan con grupos funcionales de la molécula a radiomarcarse. El ejemplo, más común es el marcado con ^{99m}Tc el cual se une a los tioles formados por la reducción de los puentes disulfuro. La mayor ventaja del marcado directo es la facilidad con que se lleva a cabo la reacción. Sin embargo este método solo sería aplicable a aquellos péptidos cuyos residuos de cisteína forman un ciclo, y debido a que la ciclización del péptido muchas veces es indispensable para proveer la configuración necesaria para ser reconocido por el receptor, existe una alta posibilidad de inactivar al péptido con el marcado directo.⁶³

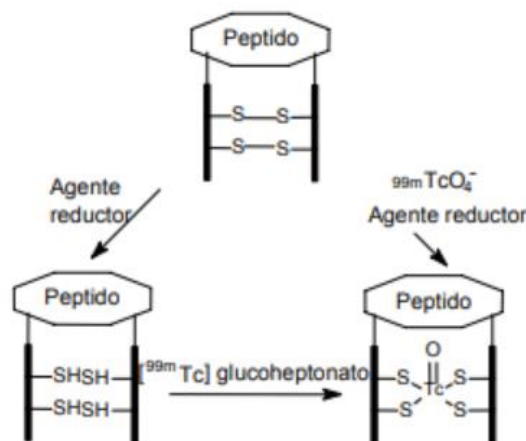


Figura 4. Radiomarcado directo

(Tomada de referencia ⁶³)

IX.II Radiomarcado indirecto

El marcado indirecto es un poco más complejo, ya que requiere de pequeñas moléculas, capaces de unirse por un lado al péptido y por el otro al átomo radiactivo, llamadas agentes bifuncionales.

El marcado indirecto se puede realizar por dos métodos, marcado por pre-conjugación, y post conjugación. En la pre-conjugación, el agente biquelante es radiomarcado antes de ser conjugado al péptido, con el fin de no exponer al péptido a condiciones extremas de temperatura o pH usadas algunas veces para llevar a cabo el marcado. En caso de existir más de un grupo reactivo en el péptido, al marcar por este método es necesario protegerlos antes de la conjugación y desprotegerlos una vez terminada para evita la formación de múltiples especies. Además como la mayoría de las reacciones no tiene una eficiencia del 100% es necesario purificar el producto del péptido no conjugado y del agente biquelante radiomarcado remanente.⁶³

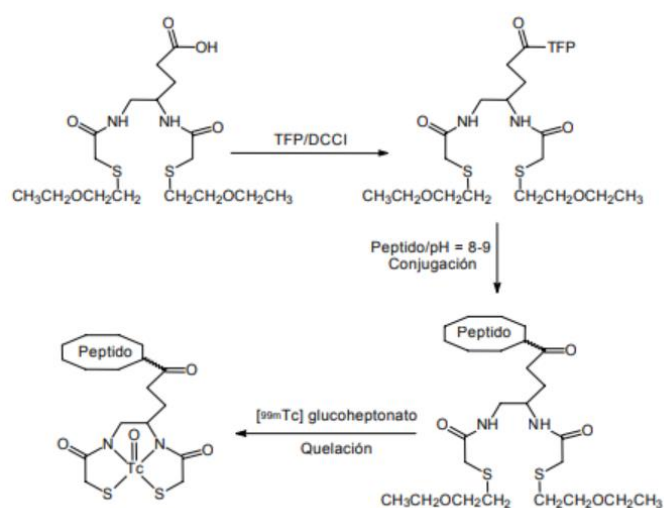


Figura 5. Marcado Indirecto

(Tomada de referencia ⁶³)

IX.II.I Agente quelatante HYNIC

Entre los quelatantes, HYNIC (Hidrazinonicotinamida) es una molécula de interés, porque muestra una alta eficiencia de etiquetado (rápido y alto rendimiento de radiomarcaje) y su uso con varios co-ligandos (por ejemplo, ácido etilendiaminodiacético, tricina y glucoheptonato) permite una fácil modificación de la hidrofiliidad y farmacocinética de los péptidos pequeños marcados con ^{99m}Tc .⁶³

IX.III Controles de calidad

Es el factor más importante para tener en cuenta en el cuidado del paciente.

La calidad del radiofármaco debe encontrarse dentro de un estándar aceptable antes de ser administrado a los pacientes. Los radiofármacos impuros pueden provocar problemas no deseados y podría ocasionar un falso diagnóstico.⁶⁴

Algunas evaluaciones son: Identidad, Pureza de radiomarcado, Estabilidad de radiomarcado y Eficiencia de radiomarcado.

X Técnicas de imagen molecular

La tomografía computarizada por emisión de fotón única (SPECT) es una técnica de imagen de medicina nuclear que basa su principio en la detección de los fotones con energías comprendidas entre 59 y 364 keV, los cuales se producen como parte del proceso de desintegración radiactiva del núcleo atómico. Esta modalidad brinda una información funcional valiosa acerca de procesos que ocurren a nivel celular o tisular, a partir de la biodistribución de determinadas moléculas marcadas con radionúclidos emisores de radiación gamma.⁴ La elevada sensibilidad de esta técnica permite visualizar concentraciones de sustancias en el orden de 10^{-9} a 10^{-12} moles, lo cual resulta de gran interés en el diagnóstico médico. Sin embargo, sus mayores limitaciones se deben a que las imágenes obtenidas son ruidosas, de baja resolución espacial (en el rango de ~12 mm para el ^{99m}Tc) y, a veces, con cierto grado de complejidad en su interpretación.⁶⁴

La tomografía computarizada (CT), por su parte, proporciona al médico reconstrucciones tridimensionales de la anatomía del paciente con una elevada resolución espacial. No obstante, sus principales limitaciones están dadas por la

imposibilidad de ofrecer información acerca de la actividad funcional o metabólica de los tejidos, lo cual puede conllevar a falsos positivos o falsos negativos en los resultados del estudio. De esta forma, surgió la idea de unir ambas modalidades de imagen con el fin de obtener lo mejor de cada una.⁶⁴




El SPECT/CT ha significado no solo la posibilidad de adquirir las imágenes anatómicas y funcionales en un único estudio, sino una verdadera revolución en la medicina nuclear diagnóstica, a partir de lo mejor que es capaz de aportar cada modalidad de imagen. Esta técnica híbrida ha mostrado que mejora la sensibilidad y la especificidad de los estudios gammagráficos, a la vez que acorta los tiempos de adquisición y brinda imágenes corregistradas corregidas por atenuación que facilitan el mejor análisis de las mismas.⁴

XI Biodistribución

Los radiofármacos exhiben un amplio rango de propiedades químicas y físicas que determinaran su biodistribución en el organismo. Es importante tener en mente que la biodistribución observada en un dado radiofármaco no puede ser explicada en términos de un solo mecanismo sino más bien como la resultante de la interacción entre diferentes mecanismos que incluyen la dilución inicial en el torrente sanguíneo, la posible unión a proteínas plasmáticas, el transporte transmembranal activo o pasivo, la posible metabolización del compuesto y su eliminación y excreción. El radiofármaco también puede experimentar degradación no biológica debido a una falta de estabilidad química o radioquímica, lo que deriva en que la biodistribución observada del compuesto radiomarcado no es necesariamente la del compuesto intacto.^{5,65}

Article

Technetium-Radiolabeled Mannose-Functionalized Gold Nanoparticles as Nanoprobes for Sentinel Lymph Node Detection

Oscar J. Estudiante-Mariquez ^{1,2}, Andrés Rodríguez-Galván ^{3,*} , David Ramírez-Hernández ^{1,2}, Flavio F. Contreras-Torres ⁴  and Luis A. Medina ^{1,5,*} 

¹ Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer INCan-UNAM, Instituto Nacional de Cancerología, Cd. México 14080, Mexico; ojem96@gmail.com (O.J.E.-M.); 350davidramirez@gmail.com (D.R.-H.)

² Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Cd. México 04510, Mexico

³ Carrera de Biología, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Estado de México 54090, Mexico

⁴ Escuela de Ingeniería y Ciencias, Tecnológico de Monterrey, Nuevo León 64849, Mexico; contreras.flavio@itesm.mx

⁵ Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Cd. México 04510, Mexico

* Correspondence: andresrodriguezga@gmail.com (A.R.-G.); medina@fisica.unam.mx (L.A.M.);

Tel.: +52-55-3693-5200 (ext. 228) (A.R.-G.); +52-55-5622 5000 (ext. 2120) or

+52-55-3693-5200 (ext. 228) (L.A.M.)

Received: 6 March 2020; Accepted: 20 April 2020; Published: 23 April 2020



Abstract: Gold nanoparticles (AuNPs) are considered valuable nanomaterials for the design of radiolabeled nanoprobes for single-photon emission computed tomography (SPECT) imaging. Radiolabeled and functionalized AuNPs could improve lymphatic mapping by enhancing the radioactive signaling of individual particles in the sentinel node. In this study, an alternative method for functionalizing commercial AuNPs with mannose is described. The chemical derivatization and biofunctionalization of AuNPs were performed with lipoic acid and mannose, respectively. Several levels of mannose were tested; the thiolate hydrazinonicotinamide-glycine-glycine-cysteine (HYNIC) molecule was also used for ^{99m}Tc radiolabeling. Physicochemical characterization of this system includes U-V spectroscopy, dynamic light scattering, Fourier-transform infrared spectroscopy, and transmission electron microscopy. The most stable nanoprobe, in terms of the aggregation, radiolabeling efficiency, and purity, was tested in a sentinel lymph node model in a rat by microSPECT/computed tomography (CT) imaging. The SPECT images revealed that ^{99m}Tc-radiolabeled AuNPs functionalized with mannose can track and accumulate in lymph nodes in a similar way to the commercial ^{99m}Tc-Sulfur colloid, commonly used in clinical practice for sentinel lymph node detection. These promising results support the idea that ^{99m}Tc-AuNPs-mannose could be used as a SPECT contrast agent for lymphatic mapping.

Keywords: gold nanoparticles; mannose; SPECT; sentinel lymph node; ^{99m}Tc

1. Introduction

Gold nanoparticles (AuNPs) have unique physical and chemical properties that make them valuable nanomaterials for many clinical applications, including their use as contrast media in diagnostic imaging [1]. The binding affinity of sulfur-based groups to gold surfaces facilitates the derivatization and functionalization of AuNPs with small molecules and biomolecules, allowing the manufacture of contrast agent systems with active targeting capabilities for multimodal imaging [2].

Functionalized AuNPs are ideal contrast agents for hybrid imaging techniques, for instance, single-photon emission computed tomography (SPECT) with computed tomography (CT) [3]. Radiolabeled AuNPs have been widely explored with SPECT imaging due to its high sensitivity, unlimited tissue penetration, and clinic translational capability. For example, ^{125}I , ^{111}In , ^{131}I , and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radionuclides have been attached to functionalized AuNPs [4–6], while the dual deposition of radionuclides (e.g., ^{125}I and ^{111}In) has been used to prepare multimodal probes for SPECT bioimaging [7]. In particular, SPECT/CT mapping has demonstrated a high potential to improve preoperative sentinel lymph node (SLN) localization and the reduction of false negatives compared to either CT or ultrasound scans [8,9]. The SLN denotes the first node in the lymphatic chain draining a primary tumor and provides critical diagnostic and prognostic information for patients, since it can help to identify those with signs of metastasis. In fact, there is a growing interest in the development of new and improved SPECT contrast agents for SLN detection [10].

New contrast agents should improve SLN imaging by enhancing the radioactive signaling of individual particles in the tracking of the lymphatic net and/or increase the radiotracer delivery and retention in the sentinel node [10]. Functionalized nanoparticles are relevant in SLN imaging and targeting not only because these particles can be synthesized at well-defined sizes, but also because different radionuclides can be attached to their surface, which is prepared with ligands for the active targeting of structures located at the SLN. Precise localization of unclear lymphatic nodes requires radiolabeled contrast agents exhibiting size range variation between 20 and 50 nm to be easily removed from the injection site, transported within the lymphatic network, and retained for many hours in the nodes [11]. For the efficient imaging of lymphatic tracking, the $^{99\text{m}}\text{Tc}$ is an ideal radionuclide because of its short 6-h half-life and photon energy of 140 keV, as well as its commercial availability and low cost [11,12].

In a previous study, a multifunctional system of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled gold nanoparticles conjugated to HYNIC-GGC/mannose was prepared to evaluate its biological behavior as a potential radiopharmaceutical for sentinel lymph node detection in a rat model [13]. It was concluded that $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -AuNP-mannose remains within the first lymph node (the popliteal node) of Wistar rats for 24 h, showing the potential of this radioconjugate for the specific targeting of SLN. In the current study, an alternative method for functionalizing commercial AuNPs with mannose (AuNPs-MAN) using lipoic acid is reported. This AuNPs-MAN system was also radiolabeled with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ to evaluate its potential for lymph node mapping using microSPECT/CT imaging in a rat model. Physicochemical characterization of this system includes U-V spectroscopy, dynamic light scattering, Fourier-transform infrared spectroscopy, and transmission electron microscopy.

2. Results

2.1. Preparation and Characterization of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -AuNPs-MAN

Table 1 shows the Z-potential value and hydrodynamic diameter of AuNP conjugates. The incubation of AuNPs at different times with lipoic acid (ALA) showed no significant changes. The conjugation with 2-aminoethyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranoside hydrochloride (MAN) or hydrazinonicotinamide-glycine-glycine-cysteine (HYNIC) did not modify the Z-potential value. Previous studies have shown that AuNPs functionalized with carboxylic acids exhibited negative Z-potential values close to -60 mV [14], suggesting that ALA can be attached to gold nanoparticles via the dithiol ring, with the carboxylic acid extending out into solution. A successful covalent functionalization between $-\text{NH}_2$ (MAN) and $-\text{COOH}$ (ALA) moieties would lead to the formation of amide groups.

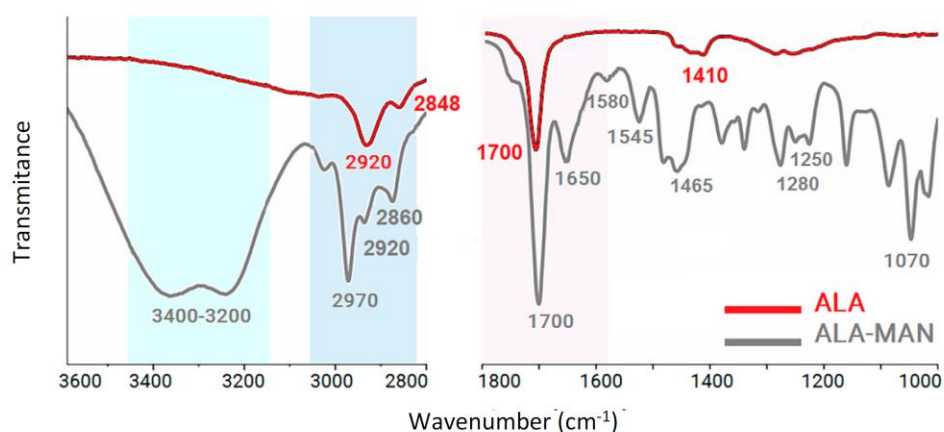
Table 1. Z-potential values and hydrodynamic diameter (in parentheses) for synthesized particles. Values represent the mean value \pm SD.

	2 h *	24 h *	48 h *	72 h *
AuNPs	(30 \pm 1.6)	(33 \pm 6.5)	(38 \pm 5.6)	(31 \pm 4.1)
AuNPs-ALA	-53.7 \pm 16.0 (73. \pm 31.3)	-63.7 \pm 6.2 (73. \pm 36.3)	-73.6 \pm 1.4 (60.3 \pm 23.2)	-64.2 \pm 4.1 (59.9 \pm 23.9)
AuNPs-MAN	-58.5 \pm 8.1 (103.5 \pm 46.4)	-65.9 \pm 7.4 (82.1 \pm 37.9)	-67.8 \pm 10.4 (71.1 \pm 18.7)	-60.25 \pm 8.38 (69.8 \pm 19.3)
HYNIC-AuNPs-MAN	-59.2 \pm 10.8 (72.6 \pm 51.6)	-59.5 \pm 6.5 (76.8 \pm 28.7)	-59.7 \pm 7.2 (49.8 \pm 14.)	-71.1 \pm 10.6 (68.6 \pm 29.4)

* Z-potential is presented in mV and size is presented in nm. All measurements were conducted in deionized water at pH 7.0 adjusted with NaOH (1 M).

Increments in the hydrodynamic diameter were also not statistically significant; in fact, the Polydispersity Index was greater than 0.2 in all groups, indicating the presence of different size populations. It is well-known that the Dynamic Light Scattering (DLS) method gives an estimation of the hydrodynamic diameter of the particle, but it can be greatly affected by the particle shape and structure. In addition, a small portion of large contaminant or aggregated particles can greatly contribute to scattering; it is possible that the inclusion of ALA, MAN, and HYNIC attached to the surface of AuNps affects the estimation of the hydrodynamic diameter, giving information on the AuNp core, along with the coating and the layer of solvent particles attached to its surface [15]. These observations are consistent with the amount of ALA molecules chemisorbed on the surface of AuNP nanoparticles.

Figure 1 illustrates the attenuated total reflection Fourier transform infrared (FTIR-ATR) studies for the covalent bonding of MAN molecules on ALA moieties. The AuNPs-ALA₄₈ spectra (red line) show a peak at 1700 cm⁻¹ that was assigned to C=O double bond stretching. The lipid hydrocarbon chains contribute peaks at about 2848 cm⁻¹ (CH₂, symmetric stretching) and 2920 cm⁻¹ (CH₂, asymmetric stretching). After the covalent bond (gray line), AuNPs-MAN₄₈ shows a peak at ~3400 that was assigned to O-H stretching. The peak at 2970 cm⁻¹ was assigned to C-H stretching of the pyranosic sugar rings, while the peak at 1650 cm⁻¹ was assigned to the stretching band of C=O stretching and C-N stretching. Furthermore, the 1580 cm⁻¹ peak was associated with in-plane N-H bending and C-N stretching, while the peak at 1280 cm⁻¹ was related to C-N stretching. Finally, the peak at 1070 cm⁻¹ was related to C-O stretching [16].

**Figure 1.** The attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectra for the covalent bonding of 2-aminoethyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -*D*-mannopyranoside hydrochloride (MAN) molecules on lipoic acid (ALA) moieties.

The UV-Vis spectroscopy analysis of AuNPs-ALA, AuNPs-MAN, and HYNIC-AuNPs-MAN conjugates is presented in Figure 2. The AuNPs have an extinction maximum peak (λ_{max}) at about 521 nm. Although the localized surface plasmon resonance (LSPR) spectrum is very sensitive to changes in the nanoparticle's shape, size, stability, surrounding medium, and/or surface modifications [14], the location of the maximum peak does not change significantly after conjugation with ALA (Figure 2a). However, some broadening was observed for the 2 and 24 h conjugates after the covalent functionalization with MAN (Figure 2b). After conjugation with HYNIC, only the 2 h conjugate maintained the shift broadening (Figure 2c). The UV-Vis analysis indicates that in terms of aggregation, the conjugate with 48 h incubation is the most stable system.

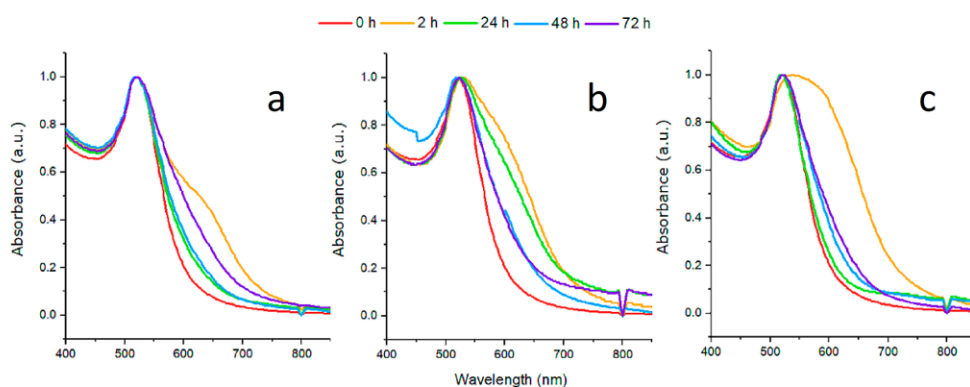


Figure 2. Ultraviolet-visible spectra for: (a) Gold nanoparticles (AuNPs)-ALA, (b) AuNPs-MAN, and (c) hydrazinonicotinamide-glycine-glycine-cysteine (HYNIC)-AuNPs-MAN. The red color indicates the spectra of pristine gold nanoparticles and the yellow, green, blue, and purple colors indicate the incubation times at 2, 24, 48, and 72 h, respectively.

Figure 3 shows the transmission electron microscopy images and HRTEM analysis. It was observed that the conjugates were spherical and no evident changes in the average particle size occurred (see the histograms of the size distribution). The average size of pristine AuNPs was 18.57 ± 2.55 nm and the size after functionalization with ALA and HYNIC was 18.95 ± 2.54 and 18.87 ± 2.37 , respectively; no statistical differences were observed. A halo of low electron density material was observed around the functionalized gold nanoparticle, which was related to the presence of an ALA or MAN coating. The HRTEM elemental analysis confirmed the metallic nature of nanoparticles, as well as the presence of N and S elements in the organic molecules related to ALA and MAN.

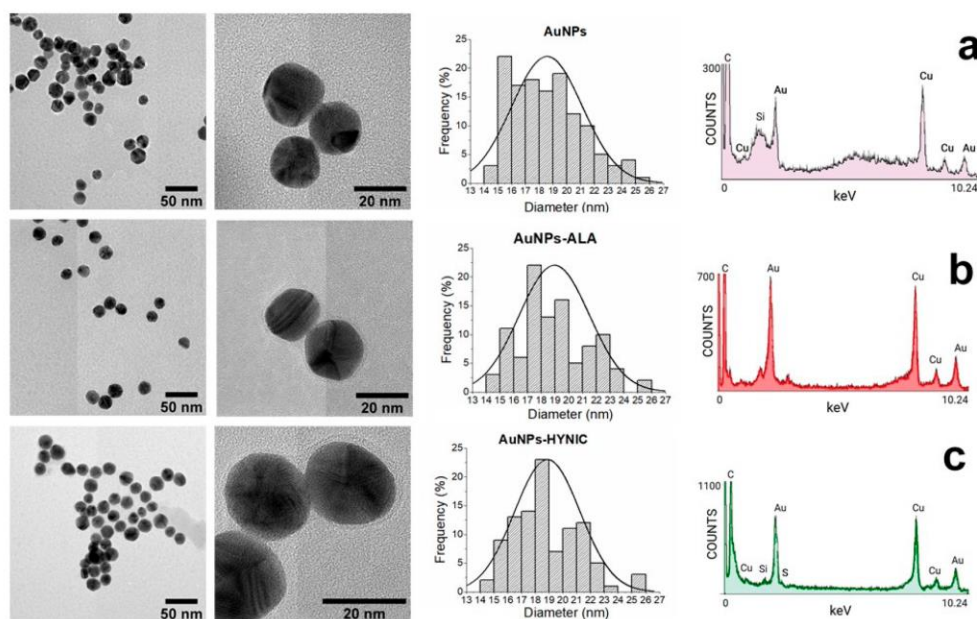


Figure 3. Representative transmission electron microscopy images, size histogram distribution, and HRTEM analysis for (a) AuNPs, (b) AuNPs-ALA, and (c) AuNPs-MAN. Results correspond to the 48 h incubation group.

2.2. Radiolabeling Analysis

According to the DLS, Z-potential and UV-Vis results, the AuNPs-MAN_{48h} and AuNPs-MAN_{72h} conjugates were selected for ^{99m}Tc radiolabeling. Table 2 shows the results for the radiolabeling efficiency and stability, and the radiochemical purity. The radiochemical purity is important in radiopharmacy and SPECT imaging since it is the radiochemical form that determines the pharmacokinetics and biodistribution of the radiopharmaceutical. Given these results, AuNPs-MAN_{48h} was used for the in vivo SPECT/CT imaging study.

Table 2. Radiolabeling results.

Conjugate	Radiolabeling Efficiency	Radiochemical Purity	Radiolabeling Stability *
^{99m} Tc-AuNPs-MAN _{48h}	86 ± 14%	97 ± 2%	99 ± 2.3%
^{99m} Tc-AuNPs-MAN _{72h}	60 ± 30%	84 ± 20%	96 ± 2.1%

* In vitro stability assay in saline solution (NaCl 0.9%) and fresh human serum for a 6 h period.

2.3. In Vivo SPECT/CT Imaging

Figure 4 depicts the procedure used to evaluate the lymphatic mapping of the ^{99m}Tc-AuNPs-MAN_{48h}. After an injection in the footpad, the contrast agent drained from the administration site (AA) into the first lymphatic node, i.e., the popliteal lymph node (PO). Next, the contrast followed the lymphatic drainage toward the iliac lymph node (IL) and then the renal node (RE). During the injection of the contrast agents, it was noticed that the ^{99m}Tc-Sulfur colloid induced a significant irritation (observed as a pain reaction in the footpad during and after inoculation); this situation was not observed with the conjugated gold nanoparticles.

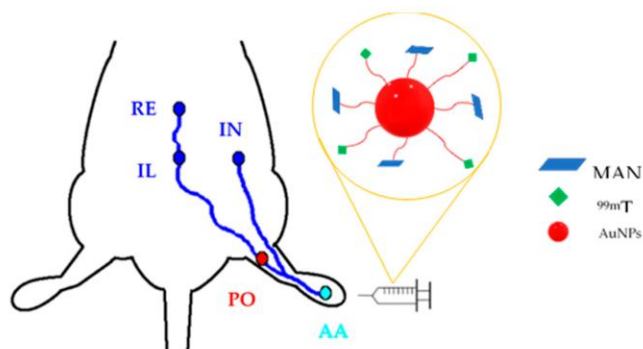


Figure 4. Illustrative picture of the ^{99m}Tc -AuNPs-MAN_{48h} mapping in lymphatic vessels and nodes in a rat. The lymph nodes are identified as popliteal (PO), iliac (IL), inguinal (IN), and renal (RE).

Figure 5 shows representative 3D microSPECT/CT images for Group A. Here, ^{99m}Tc -AuNPs-MAN_{48h} was injected in the right footpad, while ^{99m}Tc -AuNPs-ALA_{48h} was injected in the left one. Lead covers were placed at the footpads to block the signal from the injection site. The images depict a preferential accumulation of AuNPs-MAN_{48h} in the PO node 3 h post injection. A minimal accumulation of AuNPs-ALA_{48h} was observed in the left PO node, except for the third rat (R3 in the figure). In this rat, accumulation in the IL and right IN nodes was also noticed. These results demonstrate mannose's ability to promote gold nanoparticle retention within the lymph nodes.

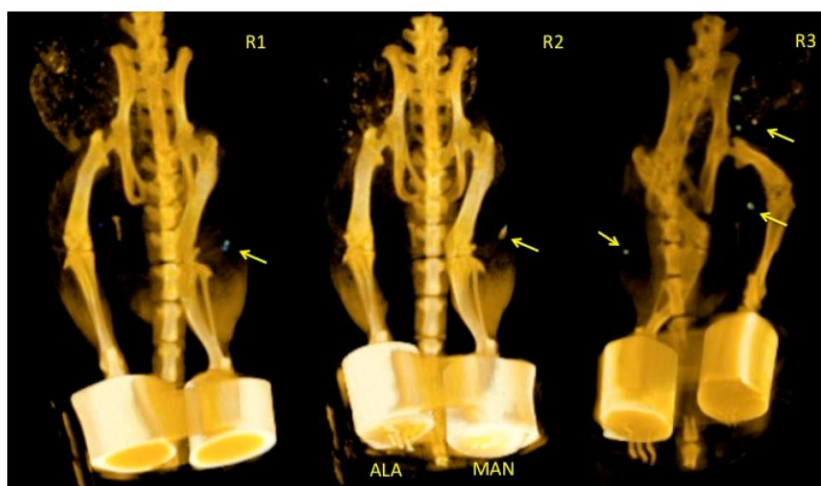


Figure 5. Micro single-photon emission computed tomography (SPECT)/computed tomography (CT) images depicting AuNPs-MAN_{48h} vs. AuNPs-ALA_{48h} accumulation in the popliteal lymph node. Arrows indicate the location of the nodes. ALA and MAN notation indicates the injection of AuNPs-ALA_{48h} and AuNPs-MAN_{48h} in the left and right footpad, respectively. Animals were oriented in a prone position.

Table 3 depicts the average percentage of the injected dose of AuNPs-MAN_{48h} and AuNPs-ALA_{48h} that stays at the injection site and the popliteal nodes. Values were calculated from the in vivo images and the ex vivo radioactivity quantification after animal sacrifice. Differences between in vivo and ex vivo results were not significant.

Table 3. Average percentage of injected dose at injection site and popliteal nodes.

	AuNPs-ALA _{48h}		AuNPs-MAN _{48h}	
	Injection Site	Popliteal Node	Injection Site	Popliteal Node
In vivo	74.2 ± 9.4	1.0 ± 0.3	79.3 ± 11.5	3.1 ± 2.7
Ex vivo	80.4 ± 6.9	3.4 ± 1.3	77.4 ± 5.3	3.1 ± 0.9

Values represent the average ± SD from n = 3. Values were corrected by radioactive decay.

Figure 6 shows representative 3D microSPECT/CT images from Group B, illustrating the lymphatic mapping sequence in two different rats at 0, 3, and 6 h after injection of ^{99m}Tc-Sulfur colloid (left footpad) and ^{99m}Tc-AuNPs-MAN_{48h} (right footpad). The accumulation of both contrast agents in the popliteal nodes could be observed from the beginning of the study; both contrast agents were retained in the popliteal nodes in different proportions and some moved to the next lymph nodes. Similar behavior was observed in the rest of the rats. This temporal retention of the contrast agent in the lymph nodes means that it can be employed in “radioactive staining” in order to improve SLN detection and identification.

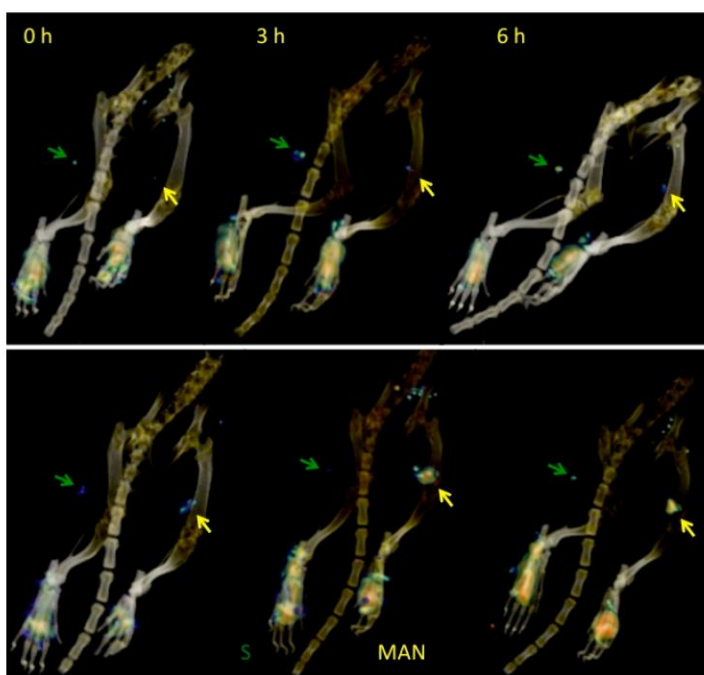


Figure 6. MicroSPECT/CT images of two different rats at different times, illustrating the differences in the lymphatic mapping of ^{99m}Tc-Sulfur colloid (S) and ^{99m}Tc-AuNPs-MAN_{48h} (MAN). Arrows indicate the location of the lymph nodes. Animals were oriented in a prone position.

A quantitative image analysis is presented in Figure 7; this figure describes variations as a function of time in terms of the percentage of injected dose at the injection site and popliteal lymph node. A box and whisker plot was used to illustrate the variability observed in the lymphatic mapping of each rat after the injection of both contrast media. The analysis indicates that the median and mean are almost equal. Certainly, the sample size is small, with n = 5 (one rat was not used because the images showed a dissimilar distribution of the contrast agents, related to a bad injection procedure), but it exposes the tendency of data. No statistical differences were observed, indicating a similar behavior in the lymphatic mapping and node targeting of both contrast media. The results indicate that both contrast media moved to the next nodes (the IL and IN nodes (Figure 5)). However, the percentage of

injected dose accumulated in the popliteal node (median values of 3.1–4.3 and 4.5–4.7, at 3 and 6 h, respectively) allowed their detection and identification.

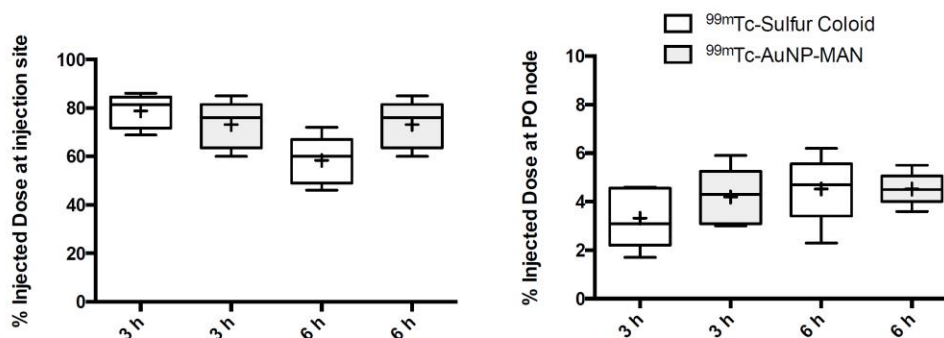


Figure 7. A box and whisker plot showing the results of the percentage of injected dose at the injection site (left) and popliteal node (right) at 3 and 6 h after the injection of either ^{99m}Tc -Sulfur colloid or ^{99m}Tc -AuNPs-MAN_{48h}. Boxes extend from 1st to 3rd quartiles; thick lines and + symbols inside boxes represent the median and mean (n = 5), respectively; whiskers go from the smallest to the largest values in each group and there were no outliers. No statistical difference was observed after ANOVA.

3. Discussion

There is current interest in developing new contrast media for sentinel lymph node mapping [17,18]. In cancer therapy, the lymph node status is a good indicator of the aggressiveness of neoplasm diseases, being the factor with the greatest prognostic importance and of fundamental consideration in treatment [19]. The sentinel lymph node (SLN) is the closest node that receives lymph from the primary tumor and is the most likely place for individual cancer cells or micrometastases to be located. The presence of cancer cells in the lymph node (or nodes) is interpreted as the presence of metastasis in the patient [18]. SLN biopsy is a highly reliable method for determining the stage of the tumor, and it also helps to calculate the risk of tumor cells spreading through the lymphatic system and to plan the most appropriate treatment (radiotherapy and/or dissection). Current SLN mapping methods are intraoperative; they need to use blue dye and/or a nanometer-sized radioactive colloid injection in order to perform a visual and radioactive detection of SLN. This method is limited by the rapid movement of blue dye and the low spatial resolution and sensitivity of radiation counters in detecting radioactive colloids [20]. One of the great advantages of the timely detection of SLN is that it can help prevent more extensive lymph node surgeries. Desirable characteristics for the new contrast media includes specificity towards molecular or cellular components that characterize the lymph nodes, multifunctionality to be able to add components for imaging and/or therapy, and a cost that competes with the contrast media currently used in the clinic [6,10,13].

In the current work, we have evaluated a simple method for functionalizing commercial AuNPs (~20 nm) with mannose in order to be used in SLN detection. The HRTEM, spectroscopy, and DLS techniques implemented in this study have demonstrated that AuNPs can be successfully functionalized with ALA, MAN, and HYNIC. The TEM results have shown that the average core size of gold nanoparticles does not change throughout the functionalization process (Figure 3); DLS sizing of AuNPs-MAN₄₈ results in hydrodynamic diameters (i.e., the size that indicates how the particle behaves in a fluid) in the range of 50–70 nm (Table 1). These sizes are similar in range to the current ^{99m}Tc -labeled colloids employed for SLN detection: Nanocoll (albumin colloid, size ranging from 80 to 200 nm.), Nanocis (colloidal rhenium sulphide, size range of 8–68 nm); and Hepatate (tin colloid, size range of 33–255 nm) [21]. The most stable nanoprobe, in terms of their physicochemical characteristics and radiochemical's purity and stability, were further radiolabeled with ^{99m}Tc and successfully tested for lymph node mapping by microSPECT/CT in a rat model (Figures 5 and 6).

To date, there are no commercial contrast agents with an optimal particle range size; however, there is a consensus that the contrast should be small enough to be rapidly removed from the injection site and transported to lymphatic nodes, and yet large enough to be retained for many hours in lymph nodes [22]. Small particles of less than 20 nm are usually cleared from the injection site and exchanged through blood capillaries. Particles of around 50 and 200 nm travel across the lymphatic capillaries and are trapped in the first lymph node [8]; large particles of hundreds of nanometers are trapped in the interstitial space and can be retained for long periods. Therefore, the hydrodynamic size of the AuNPs-MAN₄₈ nanoprobe is the standard size of commercial colloids used in SLN detection.

As was shown with the SPECT/CT studies, the conjugate ^{99m}Tc-AuNPs-MAN₄₈ stained the popliteal lymph node (i.e., the first draining lymph node in our experimental model) in a similar way to commercial ^{99m}Tc-Sulfur colloid, which is commonly used in clinical practice. This result partially supports the potential use of ^{99m}Tc-AuNPs-MAN₄₈ in lymphatic mapping. A significant difference observed between both agents was the minimal irritation induced by AuNPs-MAN₄₈ at the injection site compared with the sulfur colloid, which is a common side effect reported in the clinic. Another advantage of mannose-functionalized AuNPs is their potential use for multimodal photoacoustic SLN mapping, where binding to specific macrophage receptors is needed in order to improve the specificity of the method [23,24]. Here, the use of mannose molecules for active targeting of the lymph node could increase the high affinity of the macrophage mannose receptor (MR, CD206), which is a C-type lectin predominantly expressed by most tissue macrophages, dendritic cells, and specific lymphatic or endothelial cells [25]. This receptor is found in lymphoid tissue at a high density and recognizes and binds to the mannose's carbohydrate side chains [2,3]. Because the AuNPs-MAN contains a high number of mannose molecules, it shows a multivalence effect that promotes a high binding affinity (avidity) for the mannose receptor [4,26].

Finally, a slow rate of movement from the injection site was noticed for both contrast agents (Figure 3). It is important to mention that the rat's footpads were massaged for a short period of time (1 min) after the injection, resulting in a poor stimulation for promoting the draining of the agents into the lymphatic track. It is possible that longer massaging times could result in better draining from the injection site, promoting fast accumulation of the contrast agents in the lymph nodes. However, slow draining could also permit the injection site to become a contrast depot, allowing continuous irrigation into the lymph nodes for a longer period of time.

4. Conclusions

In this study, we have reported a simple but efficient method for elaborating a radioactive contrast agent (^{99m}Tc-AuNPs-MAN) with a high potential for lymphatic mapping using SPECT/CT imaging. In vivo studies have shown that this system can track and accumulate in lymph nodes in a similar way to the commercial ^{99m}Tc-Sulfur colloid, which is commonly used in clinical practice for SLN detection. These results support the promising use of ^{99m}Tc-AuNPs-MAN in SLN detection; however, more studies are required to evaluate the AuNPs-MAN's toxicity, biodistribution, and pharmacokinetics before validating its potential clinical use for sentinel lymph node detection and targeting in cancer treatment.

5. Materials and Methods

5.1. Materials

Gold nanoparticles (AuNPs) with a 20 nm diameter (stabilized suspension in citrate buffer); lipoic acid (ALA), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), sodium hydroxide (NaOH), ethylenediamine-*N,N'*-diacetic acid (EDDA), tricine, tin(II) chloride (SnCl₂), and hydrochloric acid (HCl) were purchased from Sigma-Aldrich (Mexico City, Mexico). 2-aminoethyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranoside hydrochloride (MAN) was purchased from Synthose Inc, (Ontario, Canada). The modified peptide hydrazinonicotinamide-glycine-glycine-cysteine (HYNIC) was acquired from Peptides International (Kentucky, US). The ^{99m}Tc pertechnetate and ^{99m}Tc-Sulfur

colloid were purchased from Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (Mexico, Mexico). All reagents were used as received, without further purification. Deionized water (18.2 M Ω cm) was used in the experiments.

5.2. Preparation of ^{99m}Tc -AuNPs-MAN

5.2.1. AuNPs-ALA

Pristine AuNPs (3 mL, 1 nM) in sodium citrate were washed three times (11,500 rpm, 30 min) and resuspended in deionized water at pH 11 (NaOH, 1 M). Then, 2.5 mL of AuNPs (1 nM) was incubated with 250 μL of ALA (10 mM) for 2, 24, 48, or 72 h at room temperature and constant stirring of 3000 rpm [25]. For each time of incubation, free ALA was removed by ultrafiltration (Ultrafree-PF filters 10,000 NWWL, Millipore); the AuNPs-ALA pellets were washed three times (11,500 rpm, 30 min) and resuspended in deionized water at pH 7 and adjusted to a nanoparticle concentration of 1 nM using Equation (1) [27]:

$$c = A_{450}/\epsilon_{450} \quad (1)$$

where A_{450} is the absorption of gold nanoparticles at 450 nm for a standard path length l of 1 cm and ϵ_{450} is the molar decadic extinction coefficient at $\lambda = 450$ nm for 20 nm gold nanoparticles. These conjugates were labeled according the incubation time, AuNPs-ALA_(h), (where, h = 2, 24, 48, or 72 h).

The number of ALA molecules bonded to AuNPs was estimated by a UV-vis calibration curve of ALA concentrations (from 0.5 to 1.5 mM, plus a blank sample). The specific absorption peak at 330 nm of the five-membered ring in lipoic acid [28] was selected for the quantification. A UV-vis spectrophotometer (Beckman Coulter, California, US) was used to obtain the absorption spectrum as a function of the number of ALA molecules at each molar concentration. From a linear fit of data, the number of remaining free ALA molecules in solution after centrifugation was calculated; these values were used to estimate the number of ALA molecules per AuNP: 1107 ± 587 at 2 h, 4151 ± 4381 at 24 h, 4428 ± 479 at 48 h, and 5535 ± 2089 at 72 h. The number of nanoparticles was calculated using equation (2):

$$N = M_C/m \quad (2)$$

where M_C is the mass concentration of gold (g/mL) and m is the mass of an individual nanoparticle (g/particle).

5.2.2. AuNPs-MAN

One milliliter of each AuNPs-ALA_(h) (1 nM, pH 7) was mixed with 2 μL of MAN (100 mg/mL in ethanol) and 10 μL of EDC (40 mM, pH 6.5). These conjugates were labeled as AuNPs-MAN_(h) (h = 2, 24, 48, or 72 h). The solutions were incubated with constant stirring (3000 rpm, 5 h), centrifuged at 11,500 rpm (30 min), washed three times in deionized water at pH 11, and left in basic hydrolysis at pH 11 for 24 h; finally, AuNPs-MAN_(h) conjugates were adjusted to a nanoparticle concentration of 1 nM.

5.2.3. HYNIC-AuNPs-MAN

One milliliter of each AuNPs-MAN_(h) (1 nM) was incubated with HYNIC (5 μL , 1 mM in ethanol) with constant stirring (3000 rpm, 20 min). The conjugates were labeled as HYNIC-AuNPs-MAN_(h) (h = 2, 24, 48, or 72 h). Unbound HYNIC was removed by ultrafiltration (Ultrafree-PF filters 10,000 NWWL, Millipore). The nanoparticles were washed three times (11,500 rpm, 30 min), resuspended in deionized water at pH 11, and adjusted to a nanoparticle concentration of 1 nM.

The number of HYNIC molecules per AuNP was also estimated by a UV-vis calibration curve from HYNIC (from 2 to 7 μM , plus a blank sample). The absorbance peak at 254 nm was used [29]; the absorption spectrum was plotted as a function of the number of HYNIC molecules at each molar concentration. The parameters from the linear fit of data were used to calculate the remaining free HYNIC molecules in solution after centrifugation; then, the number of HYNIC molecules per

nanoparticle was estimated as 1199 ± 430 at 20 min, 2214 ± 146 at 2 h, 3063 ± 360 at 24 h, and 2989 ± 387 at 48 h. The number of nanoparticles was calculated using Equation (2).

5.2.4. Characterization

Absorption spectra (400–1000 nm) for each AuNPs-MAN_(h) were obtained with a Beckman Coulter DU-530 Life science UV/Vis spectrophotometer using a 1 cm quartz cuvette. UV/Vis analysis was used to monitor the AuNP surface plasmon band (520 nm) shift in order to evaluate the conjugation stability.

The hydrodynamic diameter and Z-potential were measured by Dynamic Light Scattering (DLS) and Electrophoretic Light Scattering, respectively, using a Z-sizer 90Plus Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, Long Island, NY, USA). In this equipment, the default calculation employs the Smoluchowski limit to calculate the Z-potential and the Stokes–Einstein equation for particle sizing. Smoluchowski approximation is valid for nanoparticles in aqueous media, even though the smallest nanoparticles (<20 nm diameter) may not have $\kappa a \gg 1$ necessary to justify the application of Smoluchowski approximation [30]. $\kappa a \gg 1$ indicates that the particle radius (*a*) is large compared to the Debye length ($1/\kappa$) ($1/\kappa$ is ~10 nm for 1 mM aqueous salt solutions), which is used in Henry's function ($F(\kappa a)$) to calculate the electrophoretic mobility using Henry's equation [30]. In this work, samples (~20 nm AuNPs) were analyzed in deionized water and adjusted to pH 7 with 1 M NaOH at 25 °C, and the final concentration was 1 mM of NaOH. Polystyrene nanospheres (100 nm) (Duke Scientific, California, US) and BI-ZR3 zeta potential reference material (Brookhaven Instruments Corp., New York, US) were used as standards to verify the equipment performance before measurements.

The attenuated total reflection Fourier transform infrared (FTIR-ATR) spectra, from 1000 to 3800 cm^{-1} , of the covalent reaction for ALA-MAN, were recorded on a Perkin-Elmer Spectrum 100 spectrometer (Perkin Elmer, Ohio, US) to corroborate the formation of amide I and II bonds by comparing the spectra of AuNPs-ALA₄₈ before and after its conjugation with MAN. Samples were deposited on the ATR crystal by the drop casting technique and deposition was repeated several times.

Morphology and chemical composition analysis were performed using a JEM-2010F FASTEM instrument (JEOL, Massachusetts, US) coupled to a NORAN energy dispersive spectrophotometer (EDS) operating at 20 kV. Samples were prepared by applying 30 μL of a diluted nanoparticle solution onto carbon-coated copper grids (Ted Pella, California, US). Excess solution was removed with filter paper and the sample was allowed to dry at room temperature overnight. The resulting images were analyzed using ImageJ version 1.40 software (NIH, Wayne Rasband); for size analysis, at least 100 nanoparticles were evaluated per sample and the statistical analysis was performed with OriginPro2020 software (Northampton, US).

5.2.5. Radiolabeling

Radiolabeling was performed as previously reported [13]. Briefly, 0.5 mL of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pertechnetate (1 mCi) with 60 μL of SnCl_2 (10 mM, pH 1) and 2 μL of HCl (12 M) were incubated at 30 °C under constant stirring (500 rpm, 15 min). Then, the pH was adjusted to 7 (NaOH, 1 M) for further adding 40 μL of tricine (30 mM, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) at 30 °C under constant stirring (500 rpm, 10 min). Finally, 1 mL of each HYNIC-AuNPs-MAN_(h) (1 nM) and 10 μL of EDDA (20 mM, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) were added to the previous solution and incubated for 20 min at 100 °C under stirring at 500 rpm. Purification was performed by filtration using Amicon centrifugal filters (0.5 mL ultracel, 100 K) at 12,000 rpm, for 5 min. Radiolabeled nanoparticles ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -AuNPs-MAN_(h)) remained in the filter, while free pertechnetate ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) and hydrolyzed/reduced technetium ($^{99\text{m}}\text{TcO}_2$) passed through the filter. The radiolabeling efficiency was evaluated by measuring the radioactivity (mCi) in the supernatant and pellet, using a dose calibrator (34-056 Deluxe Isotope Calibrator II, Nuclear Associates).

The radiochemical purity (RP) was determined by ITLC-SG (General Electric, Santa Clara, CA, USA). The samples (2 μL) were spotted on ITLC strips and 2-butanone and saline solution (NaCl-0.9%) were used as mobile phases. The 2-butanone was used to evaluate the percentage of free $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$

and the saline solution was employed to measure the percentage of hydrolyzed/reduced technetium ($^{99m}\text{TcO}_2$). The strips were cut in half and the radioactivity in each segment was measured using a well-type gamma counter (Ludlum 2200, Sweetwater, TX, USA). The % RP was calculated as

$$\%RP = \frac{B}{B + T} \times 100 \quad (3)$$

where B and T represent the radioactivity (cps) measured at the bottom (i.e., $^{99m}\text{Tc-AuNPs-MAN}$) and top segments (i.e., $^{99m}\text{TcO}_4^-$ or $^{99m}\text{TcO}_2$), respectively.

The radiolabeling stability was measured in saline solution (NaCl 0.9%) at room temperature and in fresh human serum (37 °C). A total of 100 μL of $^{99m}\text{Tc-AuNPs-MAN}_{(h)}$ was added to 500 μL of either saline solution or human serum and incubated for 6 h. The stability, as a function of time, was determined by ITLC-SG/NaCl-0.9%, as previously described, after collecting samples (15 μL) at 15 min; 30 min; and 1, 2, 4, and 6h. All measurements were corrected by radioactivity decay.

5.3. Animal Model

Male Wistar rats (250–300 g) were obtained from the UNAM's Medical School animal facility (Mexico City). Animals were kept in a pathogen-free environment and fed with autoclaved food and water ad libitum. The procedures for care and use of the animals were approved by local institutional Scientific and Ethics Committees at INCan (019/010/IBI) (CEI/1349/18) (2019/0403/CB1) and all applicable institutional and governmental regulations were followed in accordance with the Federal Regulations for Animal Production, Care and Experimentation (NOM-062-ZOO-1999, Ministry of Agriculture, Mexico, Mexico). The guidelines from the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institute of Health (NIH, Washington D. C., US) were also followed. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in the experiments.

To evaluate the potential of $^{99m}\text{Tc-AuNPs-MAN}$ as a contrast agent for SLN mapping, the foot-draining popliteal lymph node model of rats was chosen. This model is widely used to test diagnostic techniques of metastasis and for drug delivery to lymphatic nodes. In this model, the administration of $^{99m}\text{Tc-AuNPs-MAN}$ was performed in the footpad of Wistar rats. It is expected that $^{99m}\text{Tc-AuNPs-MAN}$ will drain from the administration area to the first lymphatic node, i.e., the popliteal lymph node.

5.4. In Vivo SPECT/CT Imaging

A microPET/SPECT/CT imaging system (Albira ARS, Bruker, Billerica, Spain) was used to analyze the in vivo lymphatic mapping of the radiolabeled conjugates in healthy rats. Nine rats were used in this study, organized into two experimental groups. In the first group (Group A), three rats were used to compare the popliteal node targeting of $^{99m}\text{Tc-AuNPs-MAN}_{48h}$ vs. $^{99m}\text{Tc-AuNPs-ALA}_{48h}$. This experiment was designed to verify the lymphatic node accumulation of nanoparticles coated with mannose. The other six rats (Group B) were used to evaluate the targeting efficiency of $^{99m}\text{Tc-AuNPs-MAN}_{48h}$ vs. $^{99m}\text{Tc-Sulfur}$ colloid. This colloid is commonly used in clinical practice for the assessment of lymphatic tracking and sentinel node targeting and was used here as a gold standard.

The radiolabeled complexes were injected subcutaneously into the footpad of rats under anesthesia using a mixture of oxygen/isoflurane at 3%. The footpad of each animal received a single injection (~50 μCi) of $^{99m}\text{Tc-AuNPs-MAN}_{48h}$, $^{99m}\text{Tc-AuNPs-ALA}_{48h}$, or $^{99m}\text{Tc-Sulfur}$ colloid in approximately 35 μL . After the injection, the footpad was gently massaged for one minute to promote the movement of the complex into the lymphatic pathway. For the first experiment (Group A), images were acquired at 1 and 3 h post injection and the animals were sacrificed by cervical dislocation after acquiring the 3 h image; popliteal lymph nodes and the injection site were dissected. The nodes were harvested, weighed, and counted for radioactivity using the well-type gamma counter (Ludlum Model 2200 Scaler/Ratemeter, Texas, US). For the second experiment (Group B), images were acquired at 1, 3, and 6 h post injection.

All images were reconstructed with Albira's reconstruction software and the quantification analysis and image processing were performed with PMODE (PMODE Technologies, Ltd. Zurich, Switzerland) and Osirix MD (Pixmeo SARL), respectively.

5.5. Statistical Analysis

The results are expressed as the mean \pm SD (standard deviation). Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA). Significance was assumed at $p < 0.05$. All assays were performed with at least three independent triplicates.

Author Contributions: Conceptualization, L.A.M.; methodology, O.J.E.-M., A.R.-G., D.R.-H., and L.A.M.; imaging acquisition, processing, and analysis, O.J.E.-M., A.R.-G., D.R.-H., and L.A.M.; formal analysis, A.R.-G., F.F.C.-T., O.J.E.-M., and L.A.M.; writing—original draft preparation, A.R.-G.; writing—review and editing, A.R.-G., F.F.C.-T., and L.A.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the National Autonomous University of Mexico (UNAM; Grant DGAPA-IN104919) and the National Institute of Cancerology (INCan) (Grant 019/010/IBI).

Acknowledgments: Roberto De los Santos for his technical assistance with the imaging acquisition and processing.

Conflicts of Interest: No conflicts of interest exist in the submission of this manuscript.

References

1. Koo, H.; Huh, M.S.; Ryu, J.H.; Lee, D.-E.; Sun, I.-C.; Choi, K.; Kim, K.; Kwon, I.C. Nanoprobes for biomedical imaging in living systems. *Nano Today* **2011**, *6*, 204–220. [[CrossRef](#)]
2. Daniel, M.-C.; Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293–346. [[CrossRef](#)]
3. Mariani, G.; Bruselli, L.; Kuwert, T.; Kim, E.E.; Flotats, A.; Israel, O.; Dondi, M.; Watanabe, N. A review on the clinical uses of SPECT/CT. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2010**, *37*, 1959–1985. [[CrossRef](#)]
4. Ng, Q.K.T.; Olariu, C.I.; Yaffee, M.; Taelman, V.F.; Marincek, N.; Krause, T.; Meier, L.; Walter, M.A. Indium-111 labeled gold nanoparticles for in-vivo molecular targeting. *Biomaterials* **2014**, *35*, 7050–7057. [[CrossRef](#)]
5. Zhang, Y.; Zhang, Y.; Yin, L.; Xia, X.; Hu, F.; Liu, Q.; Qin, C.; Lan, X. Synthesis and Bioevaluation of Iodine-131 Directly Labeled Cyclic RGD-PEGylated Gold Nanorods for Tumor-Targeted Imaging. *Contrast Media Mol. Imaging* **2017**, *2017*, 6081724. [[CrossRef](#)]
6. Morales-Avila, E.; Ferro-Flores, G.; Ocampo-García, B.E.; De León-Rodríguez, L.M.; Santos-Cuevas, C.L.; García-Becerra, R.; Medina, L.A.; Gómez-Oliván, L. Multimeric System of ^{99m}Tc -Labeled Gold Nanoparticles Conjugated to c[RGDfK(C)] for Molecular Imaging of Tumor $\alpha(v)\beta(3)$ Expression. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 913–922. [[CrossRef](#)]
7. Black, K.C.; Akers, W.J.; Sudlow, G.; Xu, B.; Laforest, R.; Achilefu, S. Dual-radiolabeled nanoparticle SPECT probes for bioimaging. *Nanoscale* **2015**, *7*, 440–444. [[CrossRef](#)]
8. Wagner, T.; Buscombe, J.; Gnanasegaran, G.; Navalkissoor, S. SPECT/CT in sentinel node imaging. *Nucl. Med. Commun.* **2013**, *34*, 191–202. [[CrossRef](#)]
9. Marcinow, A.M.; Hall, N.; Byrum, E.; Teknos, T.N.; Old, M.O.; Agrawal, A. Use of a Novel Receptor-Targeted (CD206) Radiotracer, ^{99m}Tc -Tilmanocept, and SPECT/CT for Sentinel Lymph Node Detection in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: Initial Institutional Report in an Ongoing Phase 3 Study. *JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2013**, *139*, 895–902. [[CrossRef](#)]
10. Kim, C.; Zukotynski, K. Desirable Properties of Radiopharmaceuticals for Sentinel Node Mapping in Patients with Breast Cancer Given the Paradigm Shift in Patient Management. *Clin. Nucl. Med.* **2017**, *42*, 275–279. [[CrossRef](#)]
11. Keshtgar, M.R.S.; Ell, P.J. Sentinel lymph node detection and imaging. *Eur. J. Nucl. Med.* **1999**, *26*, 57–67. [[CrossRef](#)]
12. Maccora, D.; Dini, V.; Battocchio, C.; Fratoddi, I.; Cartoni, A.; Rotili, D.; Castagnola, M.; Faccini, R.; Bruno, I.; Scotognella, T.; et al. Gold Nanoparticles and Nanorods in Nuclear Medicine: A Mini Review. *Appl. Sci.* **2019**, *9*, 3232. [[CrossRef](#)]

13. Ocampo-García, B.E.; Ramírez, F.; Flor de, M.; Ferro-Flores, G.; De León-Rodríguez, L.M.; Santos-Cuevas, C.L.; Morales-Avila, E.; de Murphy, C.A.; Pedraza-López, M.; Medina, L.A.; et al. 99mTc-labelled gold nanoparticles capped with HYNIC-peptide/mannose for sentinel lymph node detection. *Nucl. Med. Biol.* **2011**, *38*, 1–11. [[CrossRef](#)]
14. Volkert, A.A.; Subramaniam, V.; Ivanov, M.R.; Goodman, A.M.; Haes, A.J. Salt-Mediated Self-Assembly of Thioctic Acid on Gold Nanoparticles. *ACS Nano* **2011**, *5*, 4570–4580. [[CrossRef](#)]
15. Toro-Cordova, A.; Flores-Cruz, M.; Santoyo-Salazar, J.; Carrillo-Nava, E.; Jurado, R.; Figueroa-Rodriguez, P.A.; Lopez-Sanchez, P.; Medina, L.A.; Garcia-Lopez, P. Liposomes Loaded with Cisplatin and Magnetic Nanoparticles: Physicochemical Characterization, Pharmacokinetics, and In-Vitro Efficacy. *Molecules* **2018**, *23*, 2272. [[CrossRef](#)]
16. Krimm, S.; Bandekar, J. Vibrational Spectroscopy and Conformation of Peptides, Polypeptides, and Proteins. In *Advances in Protein Chemistry*; Anfinsen, C.B., Edsall, J.T., Richards, F.M., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1986; Volume 38, pp. 181–364.
17. Winter, A.; Engels, S.; Wawroschek, F. Sentinel lymph node surgery in prostate cancer using magnetic particles. *Curr. Opin. Neurol.* **2018**, *28*, 184–190. [[CrossRef](#)]
18. Seim, N.B.; Wright, C.L.; Agrawal, A. Contemporary use of sentinel lymph node biopsy in the head and neck. *WJOHNS* **2016**, *2*, 117–125. [[CrossRef](#)]
19. Whiteside, T.L. Head and Neck Carcinoma Immunotherapy: Facts and Hopes. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 6–13. [[CrossRef](#)]
20. Krag, D.N.; Weaver, D.L.; Alex, J.C.; Fairbank, J.T. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. *Surg. Oncol.* **1993**, *2*, 335–340. [[CrossRef](#)]
21. Jimenez, I.; Roca, M.; Vega, E.; García, M.; Benitez, A.; Bajén, M.; Martín-Comín, J. Particle sizes of colloids to be used in sentinel lymph node radiolocalization. *Nucl. Med. Commun.* **2008**, *29*, 166–172. [[CrossRef](#)]
22. Alazraki, N.P.; Eshima, D.; Eshima, L.A.; Herda, S.C.; Murray, D.R.; Vansant, J.P.; Taylor, A.T. Lymphoscintigraphy, the sentinel node concept, and the intraoperative gamma probe in melanoma, breast cancer, and other potential cancers. *Semin. Nucl. Med.* **1997**, *27*, 55–67. [[CrossRef](#)]
23. Akers, W.J.; Edwards, W.B.; Kim, C.; Xu, B.; Erpelding, T.N.; Wang, L.V.; Achilefu, S. Multimodal sentinel lymph node mapping with single-photon emission computed tomography (SPECT)/computed tomography (CT) and photoacoustic tomography. *Transl. Res.* **2012**, *159*, 175–181. [[CrossRef](#)]
24. Li, M.; Liu, C.; Gong, X.; Zheng, R.; Bai, Y.; Xing, M.; Du, X.; Liu, X.; Zeng, J.; Lin, R.; et al. Linear array-based real-time photoacoustic imaging system with a compact coaxial excitation handheld probe for noninvasive sentinel lymph node mapping. *Biomed. Opt. Express BOE* **2018**, *9*, 1408–1422. [[CrossRef](#)]
25. Azad, A.K.; Rajaram, M.V.S.; Schlesinger, L.S. Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics. *J. Cytol. Mol. Biol.* **2014**, *1*, 5.
26. Rosenblum, D.; Joshi, N.; Tao, W.; Karp, J.M.; Peer, D. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1410. [[CrossRef](#)]
27. Haiss, W.; Thanh, N.T.K.; Aveyard, J.; Fernig, D.G. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4215–4221. [[CrossRef](#)]
28. Gu, F.; Hu, C.; Tai, Z.; Yao, C.; Tian, J.; Zhang, L.; Xia, Q.; Gong, C.; Gao, Y.; Gao, S. Tumour microenvironment-responsive lipoic acid nanoparticles for targeted delivery of docetaxel to lung cancer. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36281. [[CrossRef](#)]
29. Ogawa, K.; Mukai, T.; Inoue, Y.; Ono, M.; Saji, H. Development of a Novel 99mTc-Chelate-Conjugated Bisphosphonate with High Affinity for Bone as a Bone Scintigraphic Agent. *J. Nucl. Med.* **2006**, *47*, 2042–2047.
30. Lowry, G.V.; Hill, R.J.; Harper, S.; Rawle, A.F.; Hendren, C.O.; Klaessig, F.; Nobbmann, U.; Sayre, P.; Rumble, J. Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. *Environ. Sci. Nano* **2016**, *3*, 953–965. [[CrossRef](#)]



11. Bibliografía

1. Giammarile F, Schilling C, Gnanasegaran G, et al. The EANM practical guidelines for sentinel lymph node localisation in oral cavity squamous cell carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2019;46(3):623-637. doi:10.1007/s00259-018-4235-5
2. Stanzel S, Pernthaler B, Schwarz T, Bjelic-Radisic V, Kerschbaumer S, Aigner RM. Diagnostic and prognostic value of additional SPECT/CT in sentinel lymph node mapping in breast cancer patients. *Nukl Nucl Med*. 2018;57(3):92-99. doi:10.3413/Nukmed-0929-17-09
3. García-Rozado González A, Peña C, Vieira V, Uriarte I, López-Cedrún JL. Papel de la biopsia de ganglio centinela en el manejo diagnóstico-terapéutico del melanoma de cabeza y cuello. *Rev Esp Cir Oral Maxilofac*. 2005;27(5). doi:10.4321/S1130-05582005000500005
4. Perera Pintado A, Torres Aroche LA, Vergara Gil A, Batista Cuéllar JF, Prats Capote A. SPECT/CT: principales aplicaciones en la medicina nuclear. *Nucleus*. 2017;(62):2-9.
5. Chain Y, Illanes L. Radiofármacos en medicina nuclear, Fundamentos y aplicación Clínica. *edul*. Published online 2015:189.
6. Amor MFL. Biopsia del ganglio centinela en pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales. *Univ Autònoma Barc*. Published online 2002:109.
7. ¿Qué es el cáncer? - Instituto Nacional Del Cáncer. Accessed July 22, 2019. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
8. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
9. García MG, Rodríguez OGA, Gómez JH. *Tratamiento del cáncer: Oncología médica, quirúrgica y radioterapia*. Editorial El Manual Moderno; 2016.
10. Head and Neck Cancers. National Cancer Institute. Published November 2, 2013. Accessed May 29, 2019. <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet>
11. Cáncer de Cabeza y Cuello. CancerQuest. Accessed August 5, 2019. <https://www.cancerquest.org/es/para-los-pacientes/cancer-por-tipo/cancer-de-cabeza-y-cuello>
12. Whiteside TL. Head and Neck Carcinoma Immunotherapy: Facts and Hopes. *Clin Cancer Res*. 2018;24(1):6-13. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-1261
13. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *The Lancet*. 2008;371(9625):1695-1709. doi:10.1016/S0140-6736(08)60728-X
14. Deschler DG, Day TA, Sharma AK, et al. *Pocket Guide to Neck Dissection Classification and TNM Staging of Head and Neck Cancer*. American Academy of Otolaryngology--Head and Neck Surgery Foundation; 2008.
15. Demir D. The Role of Sentinel Lymph Node Biopsy in Head and Neck Cancers and Its Application Areas. *Turk Arch Otorhinolaryngol*. 2016;54(1):35-38. doi:10.5152/tao.2016.1129

16. Bembenek A, Schlag PM. *Sentinel Node Detection*. Zuckschwerdt; 2001. Accessed May 29, 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6977/>
17. Irjala H, Alanen K, Grénman R, Heikkilä P, Joensuu H, Jalkanen S. Mannose Receptor (MR) and Common Lymphatic Endothelial and Vascular Endothelial Receptor (CLEVER)-1 Direct the Binding of Cancer Cells to the Lymph Vessel Endothelium. *Cancer Res*. 2003;63(15):4671-4676.
18. Pruebas para detectar los cánceres de laringe y de hipofaringe. Accessed May 29, 2019. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-laringe-e-hipofaringe/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/como-se-diagnostica.html>
19. Identification of sentinel lymph nodes by contrast-enhanced ultrasonography with Sonazoid in patients with breast cancer: a feasibility study in three hospitals. Accessed July 22, 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5548878/>
20. Hatami E, Mu Y, Shields DN, et al. Mannose-decorated hybrid nanoparticles for enhanced macrophage targeting. *Biochem Biophys Res*. 2019;17:197-207. doi:10.1016/j.bbrep.2019.01.007
21. Tilmanocept Tc 99m - an overview | ScienceDirect Topics. Accessed November 24, 2022. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/tilmanocept-tc-99m>
22. What is Nanotechnology? | Nano. Accessed May 29, 2019. <https://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition>
23. Rojas-Aguirre Y, Aguado-Castrejón K, González-Méndez I, Rojas-Aguirre Y, Aguado-Castrejón K, González-Méndez I. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educ Quím*. 2016;27(4):286-291. doi:10.1016/j.eq.2016.07.002
24. R. M. Chavan HNV. Gold nanoparticle: synthesis and characterization. *Vet World*. 2014;7.
25. Jeong EH, Jung G, Hong CA, Lee H. Gold nanoparticle (AuNP)-based drug delivery and molecular imaging for biomedical applications. *Arch Pharm Res*. 2014;37(1):53-59. doi:10.1007/s12272-013-0273-5
26. Ocampo-García BE, Ramírez F de M, Ferro-Flores G, et al. 99mTc-labelled gold nanoparticles capped with HYNIC-peptide/mannose for sentinel lymph node detection. *Nucl Med Biol*. 2011;38(1):1-11. doi:10.1016/j.nucmedbio.2010.07.007
27. Marttila-Ichihara F, Turja R, Miiluniemi M, et al. Macrophage mannose receptor on lymphatics controls cell trafficking. *Blood*. 2008;112(1):64-72. doi:10.1182/blood-2007-10-118984
28. Casado SS, López JP. Tecnecio 99m: radiofármaco de diagnóstico utilizado en la actualidad. *Univ Complut*. 2016;Tesis:20.
29. FLORES GF, GARCÍA BEO, CUEVAS CLS, GUTIÉRREZ MAL, VEGA EPA, MANCILLA NPJ. 99mtc-edda/hynic-ipsma como un radiofármaco para la detección de la sobre-expresión del antígeno prostático de membrana. Published online December 28, 2017. Accessed November 24, 2022. <https://patents.google.com/patent/WO2017222362A1/es>

30. Volkert AA, Subramaniam V, Ivanov MR, Goodman AM, Haes AJ. Salt-Mediated Self-Assembly of Thioctic Acid on Gold Nanoparticles. *ACS Nano*. 2011;5(6):4570-4580. doi:10.1021/nn200276a
31. Carbodiimide Crosslinker Chemistry - MX. Accessed November 24, 2022. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html>
32. PMOD Base Functionality Introduction. Accessed November 24, 2022. <https://www.pmod.com/files/download/v35/doc/pbas/875.htm>
33. Zielińska A, Szalata M, Gorczyński A, et al. Cancer Nanopharmaceuticals: Physicochemical Characterization and In Vitro/In Vivo Applications. *Cancers*. 2021;13(8):1896. doi:10.3390/cancers13081896
34. Polydispersity Index - an overview | ScienceDirect Topics. Accessed January 10, 2020. <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/polydispersity-index>
35. Moyano MA, Broussalis AM, Segall AI. Thermal analysis of lipoic acid and evaluation of the compatibility with excipientes. *J Therm Anal Calorim*. 2010;99(2):631-637. doi:10.1007/s10973-009-0351-6
36. Tabla de espectros infrarrojos. Accessed November 24, 2022. <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table>
37. Yahaya ML, Zakaria ND, Noordin R, Abdul Razak K. Synthesis of large and stable colloidal gold nanoparticles (AuNPs) by seeding-growth method. *Mater Today Proc*. 2022;66:2943-2947. doi:10.1016/j.matpr.2022.06.563
38. Harrell MI, Iritani BM, Ruddell A. Lymph node mapping in the mouse. *J Immunol Methods*. 2008;332(1):170-174. doi:10.1016/j.jim.2007.11.012
39. Irjala H, Johansson EL, Grenman R, Alanen K, Salmi M, Jalkanen S. Mannose Receptor Is a Novel Ligand for L-Selectin and Mediates Lymphocyte Binding to Lymphatic Endothelium. *J Exp Med*. 2001;194(8):1033-1042. doi:10.1084/jem.194.8.1033
40. Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J Leukoc Biol*. 2012;92(6):1177-1186. doi:10.1189/jlb.0512231
41. Zeta Potential - an overview | ScienceDirect Topics. Accessed November 21, 2019. <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/zeta-potential>
42. Nakajima N, Ikada Y. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. *Bioconjug Chem*. 1995;6(1):123-130. doi:10.1021/bc00031a015
43. Gold nanoparticles 20 nm diameter, OD 1, stabilized suspension in citrate buffer | Au NP | Sigma-Aldrich. Accessed November 21, 2019. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/741965?lang=es®ion=MX>

44. Localized surface plasmon resonance (LSPR) of polyelectrolyte-functionalized gold-nanoparticles for bio-sensing - ScienceDirect. Accessed January 29, 2020. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927775708006110>
45. : FEUM - Sitio Web :. Accessed November 21, 2019. <https://www.farmacopea.org.mx/publicaciones-detalle.php?m=3&pid=1>
46. PubChem. Technetium Tc-99M sulfur colloid. Accessed February 10, 2020. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/76957057>
47. Cánceres de cabeza y cuello. National Cancer Institute. Published May 20, 2013. Accessed May 29, 2019. <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cabeza-cuello/hoja-informativa-cabeza-cuello>
48. Exámenes de detección del cáncer. Instituto Nacional del Cáncer. Published February 6, 2015. Accessed July 31, 2019. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/deteccion/examen-de-deteccion>
49. Epidemiología y Etiología del Cáncer de la Cabeza y el cuello. Accessed July 31, 2019. <http://incan-mexico.org/revistainvestigacion/documentos/Portada/1181662434.pdf>
50. Arenas CEM. TEJIDO LINFÁTICO Y ÓRGANOS LINFÁTICOS. *Fac Med.*:28.
51. García Kass AI, Domínguez Gordillo AA, García Núñez JA, Cancela Rivas G, Torres Salcines J, Esparza Gómez GC. Revisión y puesta al día en cáncer de lengua. *Av En Odontostomatol.* 2013;29(5):255-269.
52. Gánglios linfáticos inflamados en el cuello: causas, síntomas y más. Conozcamos Todas Las Partes De Nuestro Cuerpo. Published September 6, 2018. Accessed February 11, 2020. <https://tucuerpohumano.com/c-sistema-linfatico/ganglios-linfaticos-inflamados-en-el-cuello/>
53. Terese Winslow LLC, Medical and Scientific Illustration. Terese Winslow LLC, Medical and Scientific Illustration. Accessed February 11, 2020. <https://www.teresewinslow.com>
54. Gray EE, Cyster JG. Lymph Node Macrophages. *J Innate Immun.* 2012;4(5-6):424-436. doi:10.1159/000337007
55. Louie DAP, Liao S. Lymph Node Subcapsular Sinus Macrophages as the Frontline of Lymphatic Immune Defense. *Front Immunol.* 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.00347
56. Poh AR, Ernst M. Targeting Macrophages in Cancer: From Bench to Bedside. *Front Oncol.* 2018;8. doi:10.3389/fonc.2018.00049
57. Shiota T, Miyasato Y, Ohnishi K, et al. The Clinical Significance of CD169-Positive Lymph Node Macrophage in Patients with Breast Cancer. *PLoS ONE.* 2016;11(11). doi:10.1371/journal.pone.0166680
58. Boisseau P, Loubaton B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Phys.* 2011;12(7):620-636. doi:10.1016/j.crhy.2011.06.001
59. Monsky WL, Vien DS, Link DP. Nanotechnology Development and Utilization: A Primer for Diagnostic and Interventional Radiologists. *RadioGraphics.* 2011;31(5):1449-1462. doi:10.1148/rg.315105238

60. Costa AB, de Bioquímica G. Estudio de la conjugación de antifolatos a nanopartículas de oro. :32.
61. Compostella F, Pitirollo O, Silvestri A, Polito L. Glyco-gold nanoparticles: synthesis and applications. *Beilstein J Org Chem*. 2017;13:1008-1021. doi:10.3762/bjoc.13.100
62. Ernestina Castro-Longoria. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. *Mundo Nano Rev Interdiscip En Nanociencia Nanotecnología*. 2016;9(16):128. doi:10.22201/ceiich.24485691e.2016.16.56907
63. Alafort LM. Radiomarcado de péptidos para diagnóstico y terapia. *UAEM*. 2002;Tesis:9.
64. Steven W. Falen, Richard J. Kowalsky. *Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy & Nuclear Medicine*. 2 edition. APhA Publications; 2004.
65. Lipka J, Semmler-Behnke M, Sperling RA, et al. Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection. *Biomaterials*. 2010;31(25):6574-6581. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.009