

Nano-radiotrazadores de óxido de hierro: Aproximación multidisciplinar a la imagen molecular

Juan Pellico, Jesús Ruiz-Cabello y Fernando Herranz

Resumen: La combinación de dos campos como la nanotecnología y la radioquímica está abriendo nuevas posibilidades en el desarrollo de materiales para biomedicina. El impacto de esta nueva aproximación es especialmente importante en la imagen molecular. La posibilidad de emplear una única sonda para la obtención de imagen funcional-anatómica, junto con el uso de propiedades dependientes del tamaño de las nanopartículas ofrece un rango completamente nuevo de posibilidades. En este contexto es clave el diseño y síntesis de sondas de elevada complejidad en las que hay que elegir el tipo de material, su síntesis, el tipo de radioisótopo y su unión al material, siendo necesario combinar métodos propios de la química de materiales y la química orgánica.

Palabras clave: Nano-radioquímica; óxido de hierro; imagen molecular; nanopartículas; radioisótopos.

Abstract: The new field created by the combination of nanotechnology and radiochemistry is opening new exciting possibilities in the development of materials for biomedicine. This approach is particularly important in molecular imaging, the possibility of using a single probe for functional and anatomical imaging together with the size-dependent properties of nanomaterials pave the way for completely different approaches. The key step in this field is the design and synthesis of highly complex probes by choosing the right material and radioisotope, their synthesis and combination, for that researches on the field must carefully combine tools from materials chemistry and organic synthesis.

Keywords: Nano-radiochemistry; iron oxide; molecular imaging; nanoparticles; radioisotopes.

INTRODUCCIÓN

La imagen molecular consiste en la visualización, caracterización y medida de procesos biológicos a escala molecular y celular en seres vivos.^[1] De manera habitual se incluye imagen, 2D o 3D, así como cuantificación de uno o varios parámetros a lo largo del tiempo. Por lo que se refiere a las técnicas de imagen se ha pasado del uso exclusivo de la imagen nuclear (PET, positron emission tomography; SPECT, single-photon emission computed tomography) al uso de otras como por ejemplo la imagen por resonancia magnética (MRI, magnetic resonance imaging), ultrasonidos (US) y, sobre todo en los últimos años, al empleo de técnicas de imagen híbridas, particularmente PET/CT y PET/MRI. Un concepto clave, sin el que no existiría la imagen molecular, es el de sonda o trazador. Estos son compuestos, endógenos o más comúnmente exógenos, que permiten visualizar, caracterizar y medir los procesos biológicos en sistema vivos. Como suele ocurrir en otras

muchas disciplinas suele minusvalorarse la posición central de la química en el desarrollo de la imagen molecular, sin embargo, viendo la definición de imagen molecular y de sonda es evidente que la primera no existiría sin la segunda. Este hecho es evidente en técnicas como el PET, sin el desarrollo de trazadores la propia técnica no tendría sentido, pero además es clave en otras como la MRI y los US. En este sentido la química de la imagen molecular ha estado centrada hasta hace poco casi exclusivamente en lo que podríamos llamar radiofarmacia tradicional; a saber, el diseño de procesos sintéticos para la incorporación de radioisótopos en moléculas orgánicas pequeñas, normalmente de forma covalente, siendo el ejemplo paradigmático el desarrollo de la ¹⁸F-fluorodesoxiglucosa (FDG) o los complejos de ^{99m}Tc. Pese al éxito incontestable del uso de FDG para una multitud de ensayos de imagen molecular esta aproximación presenta varias limitaciones que han llevado a la búsqueda de nuevas soluciones que permitan una mayor flexibilidad sintética y sobre todo una mejora del comportamiento *in vivo*. Es en este contexto en el que en los últimos años, en los últimos 4-5 años de hecho, ha cobrado fuerza el campo de la nano-radioquímica. Las ventajas de combinar la nanotecnología y la radioquímica son muchas y abarcan desde aspectos del diagnóstico, en los que nos centraremos aquí, a aspectos también terapéuticos. Además, el cada vez mayor uso de técnicas de imagen híbrida, especialmente el PET/MRI, requiere del uso de sondas que exploten esta propiedad. El empleo de nanopartículas permite conseguir dicho tipo de sondas de forma relativamente sencilla, sin embargo resulta bastante complicado e ineficiente con radioquímica tradicional.



J. Pellico



J. Ruiz-Cabello



F. Herranz

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)
c/ Melchor Fernández-Almagro 3. 28029 Madrid.
C-e: fherranz@cnic.es

Recibido: 19/11/20. Aceptado: 17/12/2015.

NANOPARTÍCULAS E IMAGEN MOLECULAR MULTIMODAL

La variedad de nanopartículas que se emplean en imagen molecular abarca prácticamente la totalidad de tipos de nanomateriales existentes. Sin embargo, ateniéndonos a la definición que hemos hecho de imagen molecular la lista se reduce drásticamente. Por ejemplo si consideramos que se debe tratar de imagen *in vivo* y que pueda ser trasladado a humanos, deben tenerse en cuenta cuestiones como la falta de toxicidad, la escalabilidad de la síntesis y la estabilidad coloidal con el tiempo. Con todo eso en cuenta el ejemplo más importante, en nuestra opinión, son las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro. Esta elección se ve reforzada si nos centramos en el campo de la nano-radioquímica donde la práctica totalidad de ejemplos se centran en el uso de nanopartículas de óxido de hierro (IONP).

Las nanopartículas (NPs) de óxido de hierro, principalmente magnetita ($(\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}})\text{O}_4$) y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), han sido empleadas desde hace tiempo en una gran variedad de aplicaciones, incluyendo el almacenamiento de datos, catálisis y en biomedicina (Figura 1).^[2-7] En biomedicina se emplean en distintos ámbitos que van desde la purificación de biomoléculas, el diagnóstico mediante MRI, el tratamiento por hipertermia, la liberación de fármacos y, en su aplicación más nueva, como sondas para la técnica de Imagen de Partículas Magnéticas (MPI, de sus siglas en inglés). La principal característica fisicoquímica de este nanomaterial, que posibilita todas estas aplicaciones, es su carácter superparamagnético. Este fenómeno se produce al llevar al material ferromagnético a la escala nanométrica. Al ser el tamaño del sólido menor al del dominio magnético la energía térmica es suficiente para invertir la dirección del momento dipolar. Por debajo del tamaño del dominio magnético y en ausencia de campo los dipolos están alineados al azar por lo que la magnetización resultante del material será cero (superparamagnetismo). El fenómeno del superparamagnetismo es lo que posibilita la

principal aplicación en imagen, al menos hasta hace poco, de este nanomaterial; su uso como agente de contraste T_2 , “negativo”, en MRI. De forma muy breve, en la resonancia magnética nuclear se “juega” con la magnitud y dirección del vector momento magnético de los protones del agua al situar al organismo en un campo magnético intenso. Una vez los espines del agua se han alineado con el campo magnético externo se excita la muestra mediante la aplicación de un pulso de radiofrecuencia que desvía el vector de la magnetización un cierto ángulo respecto al campo externo. Después del pulso de excitación de radiofrecuencia el sistema tiende a volver a la situación de equilibrio térmico. La velocidad a la que esto ocurre está caracterizada por dos magnitudes; por el tiempo de relajación longitudinal (T_1) para la recuperación de la magnetización a lo largo del eje z (longitudinal) de coordenadas y por el tiempo de relajación transversal (T_2) para la pérdida de magnetización en el plano xy. Aquellos agentes de contraste que, debido a su elevado momento magnético, reducen principalmente el T_2 darán una señal negativa, negra, en la imagen, mientras que los agentes T_1 , que reducen significativamente el tiempo necesario para recuperar la magnetización longitudinal proporcionan una señal brillante, positiva, en la imagen. En ambos casos el parámetro que determina cómo de bueno es un agente de contraste para MRI es el valor de la relaxividad (o relajatividad) tanto para la magnetización longitudinal, r_1 , como la transversal, r_2 . Ejemplo típico de los agentes de contraste T_1 son los complejos de Gd. Dichos compuestos son los más empleados en clínica, con diferencia, a pesar de que se sabe su toxicidad, en particular para pacientes con patologías renales.^[8] El ejemplo tradicional de agente T_2 lo constituyen las nanopartículas de óxido de hierro. Debido a su carácter superparamagnético y la anisotropía magnética que crean en el tejido presentan valores excelentes de r_2 con mucha mayor sensibilidad que los agentes de Gd. Además son compuestos con casi nula toxicidad. Si esto así ¿por qué estas partículas no han

© 2016 Real Sociedad Española de Química

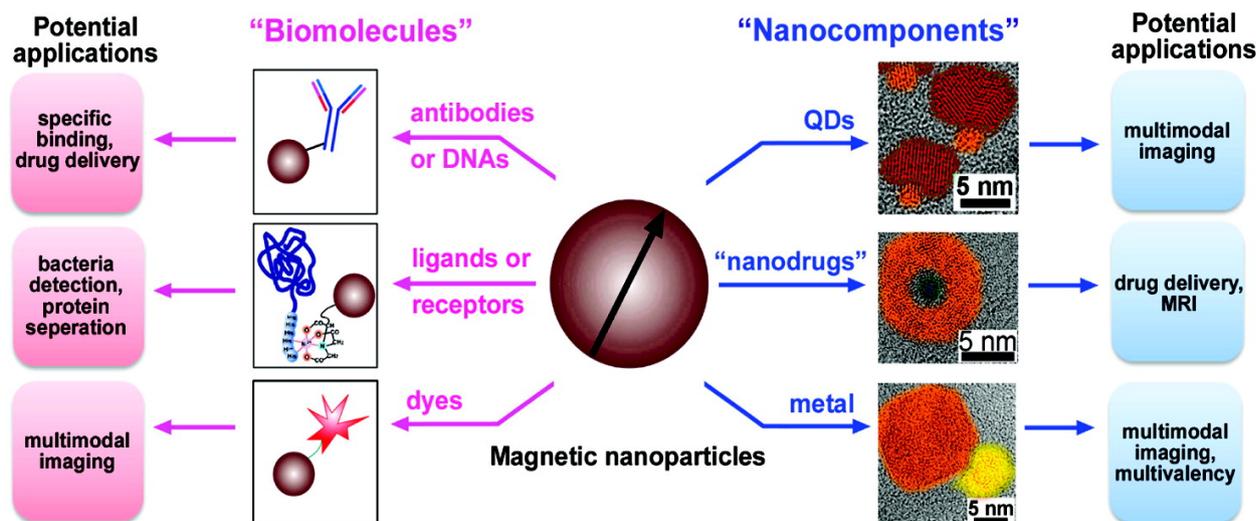


Figura 1. Estrategias para la síntesis de nanopartículas magnéticas multifuncionales (reproducido con permiso de *Acc. Chem. Res.*, 2009, 42 (8), 1097-1107)

reemplazado a los complejos de Gd en la clínica? La razón es que el contraste negativo que producen es en muchas ocasiones difícil de identificar en la imagen debido, entre otros motivos, a la presencia de zonas que ya producen ausencia o cancelación de señal, como pueden ser las calcificaciones, zonas de sangrado, artefactos de susceptibilidad magnética, flujo, etc. Este hecho además de impedir su uso extensivo en la clínica limita su uso como trazadores para imagen molecular. Esto ha llevado a una intensa investigación para la obtención de nanopartículas de óxido de hierro que produzcan realce positivo. Como se explica en la Figura 2, esto se puede conseguir con la reducción del tamaño del cristal.^[9,10]

NANO-RADIOQUÍMICA

La combinación de la nanotecnología y radioquímica es un campo relativamente nuevo y que para muchos investigadores incluso hoy, con varios ejemplos en la literatura, son dos mundos aparte uno del otro. Los factores que han llevado al desarrollo de este nuevo campo son muy variados pero podríamos resumirlos en los siguientes: multifuncionalidad, propiedades dependientes del tamaño y farmacocinética.

Multifuncionalidad

La multifuncionalidad y las propiedades dependientes del tamaño son las dos principales características de las nanopartículas (Figura 1). Por lo que se refiere a la primera,

la posibilidad de, en un único compuesto, unir una o varias biomoléculas que aporten especificidad biológica y/o tratamiento, así como el componente nanoparticulado que habitualmente aporta señal para varias técnicas de imagen, es algo relativamente fácil de conseguir empleando nanopartículas pero extremadamente complejo, si no imposible, con los radiotrazadores habituales. Directamente relacionado con el concepto de multifuncionalidad está el de los experimentos “teranósticos” palabra derivada del inglés “theranostics” de la combinación de therapy + diagnosis. En dichos experimentos se emplean partículas que además de dar señal en, al menos, un técnica de imagen incorporan algún fármaco para tratar la patología en cuestión, algo que solo puede conseguirse debido a las propiedades de multifuncionalización. Por último y relacionado con este aspecto está el de la carga de ligando; debido a la enorme relación superficie-volumen de las nanopartículas se pueden unir una gran cantidad de ligandos (péptidos, proteína, etc.), en la superficie lo que aumenta la respuesta *in vivo* de estas sondas.

Propiedades dependientes del tamaño

El que un compuesto, una nanopartícula, presente propiedades dependientes del tamaño se puede considerar como la característica definitoria de nanomaterial. Ejemplos de este hecho son la resonancia del plasmón de superficie en las nanopartículas de oro, la longitud de onda a la que emiten fluorescencia los quantum dots y, centrándonos en los óxidos de hierro, modulan su comportamiento magnético. Este último aspecto ha cobrado

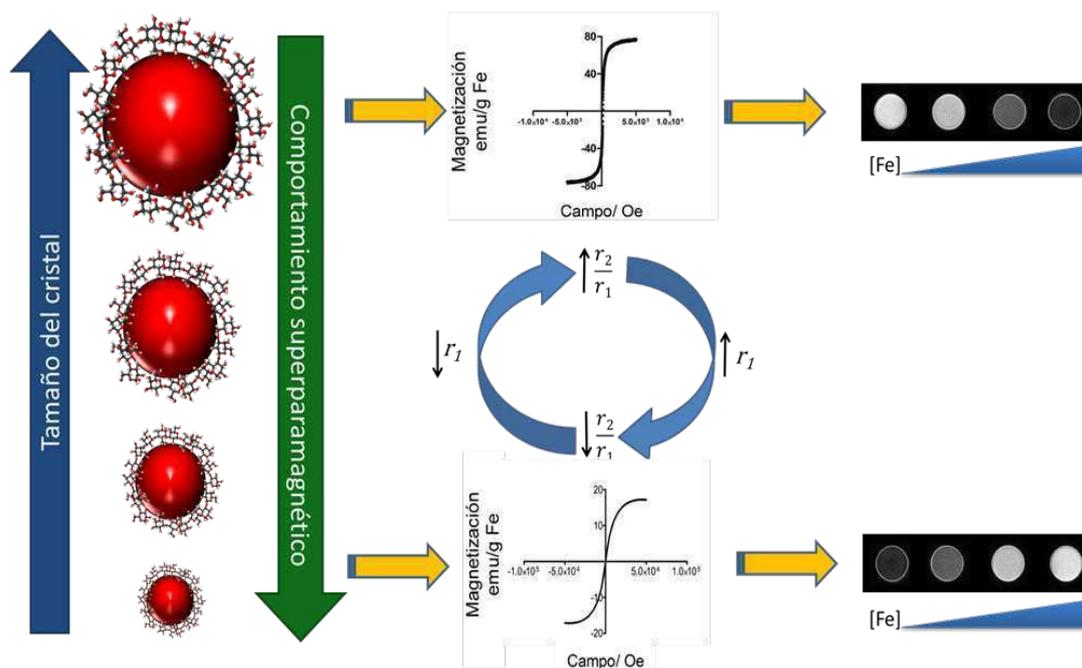


Figura 2. Ilustración de la dependencia de las propiedades magnéticas de las nanopartículas de óxido de hierro con el tamaño de cristal. A menor tamaño de nanopartícula aumenta la cantidad de spines en la superficie (canted spins) lo que reduce el momento magnético de la nanopartícula, resultando en un comportamiento magnético más próximo al paramagnetismo que al superparamagnetismo

aún mayor relevancia en los últimos años debido a las características para imagen de las nanopartículas de óxido de hierro. Esto es debido a que las habituales IONP presentan carácter superparamagnético, por tanto un elevado momento magnético, produciendo lo que se conoce como contraste negativo en la imagen por resonancia magnética (Figura 2). La señal hipointensa provoca una zona negra muy evidente allá donde las partículas se han acumulado, según el órgano y aplicación para la que se quieran utilizar esa ausencia de señal puede ser una gran ventaja (mejor contraste) o un problema (confusión con otras señales similares) que impide el diagnóstico. Por esta razón en los últimos años ha habido bastantes trabajos donde se han desarrollado IONP extremadamente pequeñas de manera que su carácter es más paramagnético y por tanto dan señal “positiva”, brillante, en Resonancia Magnética, que por lo general mejoran las posibilidades de diagnóstico en muchas patologías (Figura 2). Esta posibilidad de, con la misma composición, presentar un rango de propiedades fisicoquímicas diferentes es la característica básica de materiales con propiedades dependientes del tamaño. La posibilidad de tener esta modulación de las propiedades en función del tamaño es algo, lógicamente, imposible de conseguir con los radiotrazadores habituales que están “limitados” a las propiedades *in vivo* de la molécula y, en imagen, a las características del radioisótopo.

Farmacocinética

El aspecto farmacocinético de los nano-radiotrazadores resulta mejorado tanto desde el punto de vista de la partícula como de los radioisótopos. La gran ventaja de usar nanopartículas es el hecho de que se puede confeccionar a medida la biodistribución al aprovechar todas las ventajas de la nanotecnología. Además en el caso de partículas de óxido de hierro, cuya cuantificación por imagen de Resonancia Magnética convencional o de susceptibilidad magnética es difícil, el incorporar una cantidad conocida de un isótopo radiactivo permite su cuantificación. Esto se traduce en una mejor caracterización de la sonda y control

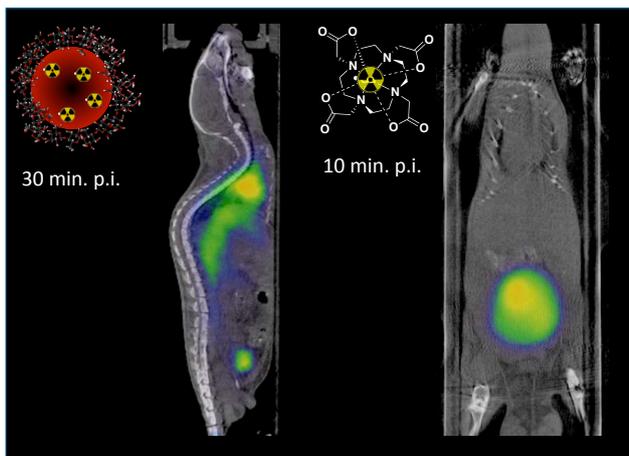


Figura 3. Farmacocinética de un nano-radiotrazador de óxido de hierro y uno tradicional, ⁶⁸Ga-DOTA

de las vías de eliminación *in vivo*. Por lo que se refiere a los radioisótopos, su empleo integrados en nanopartículas permite modular fácilmente el tiempo de circulación en sangre así como la vía de eliminación. Un ejemplo claro de esto se presenta en la Figura 3.

En esta imagen se compara el comportamiento *in vivo* tras inyección intravenosa de dos compuestos, el primero consistente en IONP dopadas en el núcleo con ⁶⁸Ga y el segundo con la misma cantidad de radiactividad dentro de un complejo de DOTA-⁶⁸Ga, siendo DOTA el quelante más habitual para el ⁶⁸Ga. Como puede apreciarse en el primer caso la señal del radioisótopo está distribuida por el corazón, la aorta y una pequeña señal en la vejiga 30 minutos tras la inyección. Mientras en el caso del radioquelante tradicional a los 10 minutos de la inyección toda la actividad se encuentra ya acumulada en la vejiga, un tiempo de circulación normalmente corto para conseguir su acumulación en la zona patológica a diagnosticar o donde tenga que hacer su efecto terapéutico.

SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO

Existen varios métodos diferentes para la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro. Entre ellos, cabe destacar el método de coprecipitación y el método de descomposición de precursores orgánicos. Estos son los más empleados debido a las características de la nanopartículas que se obtienen a través de ellos. Otro método que está emergiendo con fuerza en los últimos años es la síntesis dirigida por microondas. El método de coprecipitación se basa en hacer reaccionar una mezcla de disoluciones que contengan cationes Fe³⁺ y Fe²⁺ en una relación molar 2:1 y a pH básico. Bajo estas condiciones se produce un precipitado negro correspondiente a la formación de las nanopartículas de magnetita. La reacción que se produce es la siguiente:



Este método, diseñado por Massart en 1981 permite obtener nanopartículas estables en medios fisiológicos en un solo paso de reacción, siendo esta la ventaja más notable del método.^[11] Sin embargo, también presenta algunas desventajas como son la obtención de distribuciones de tamaño de partícula anchas, producción de muestras por lo general poco homogéneas y contener pocos grupos funcionales en la superficie de la nanopartícula para posteriores funcionalizaciones.

Como su propio nombre indica, el método de descomposición de precursores orgánicos utiliza la descomposición térmica de compuestos organometálicos para la síntesis de las nanopartículas. Estos compuestos se acompañan de diferentes surfactantes para darle estabilidad y poder posteriormente recubrir la superficie de la nanopartícula. Existen diferentes combinaciones para obtener nanopartículas de óxido de hierro a través de este método. Una de las más utilizadas es la síntesis por descomposición del acetilacetonato de hierro (III) (Fe(acac)₃) en presencia de ácido oleico y oleilamina como surfactantes

y éter difenílico como disolvente. Este tipo de aproximación permite controlar el tamaño de las nanopartículas que se deseen obtener en un rango de entre 3 y 20 nm en función de la cantidad de surfactante empleada y del tiempo de reacción.^[12,13]

El método de descomposición ofrece varias ventajas frente a otros métodos. Entre ellas, cabe destacar la gran homogeneidad que se obtiene en la distribución de tamaños así como la alta cristalinidad de las nanopartículas obtenidas a través de este método. Sin embargo, también presenta un inconveniente, la hidrofobicidad de las nanopartículas. Al utilizarse surfactantes hidrófobos, la superficie de las nanopartículas hace que las nanopartículas solo se estabilicen en medios orgánicos como el CHCl_3 o el hexano. Por tanto, para poder utilizar este tipo de nanopartículas en cualquier aplicación biomédica, habrá que realizar un paso adicional de funcionalización que permita estabilizar las nanopartículas en medios fisiológicos. Aunque los métodos de coprecipitación y descomposición térmica son los más utilizados en la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro, se han descrito otros que permiten obtener este tipo de partículas, entre ellos, se encuentran la síntesis hidrotermal, la pirolisis láser y la sonoquímica.^[14-16]

Otro método que está emergiendo en los últimos años es la síntesis dirigida por microondas. El uso de las microondas como fuerza conductora en reacciones químicas es de sobra conocido. Este tipo de síntesis ha sido utilizada en diferentes reacciones dentro de la química orgánica consiguiendo buenos rendimientos en tiempos más cortos que en los respectivos procedimientos térmicos.^[17,18] La razón por la cual el uso del microondas es cada vez más popular reside en el calentamiento dieléctrico. Al contrario que en métodos de calentamiento convencionales, baños de aceite, de arena o mantas calefactoras, donde se produce una transferencia de calor desde la fuente al recipiente de reacción y de este a la muestra, el calentamiento dieléctrico produce el aumento de la temperatura directamente sobre la muestra haciendo que se alcance la temperatura deseada en un tiempo mucho más reducido que por calentamiento convencional.^[19] Debido a este comportamiento, el uso del microondas creemos que se establecerá como método de síntesis de nanopartículas de óxido de hierro. Mientras que los métodos de síntesis convencionales de nanopartículas pueden durar desde horas hasta días, el uso de las microondas permite obtenerlas con las mismas características físico-químicas en cuestión de minutos.^[20] Diferentes publicaciones ya han mostrado la capacidad de las microondas como método de síntesis de nanopartículas de óxido de hierro, en tiempos muy reducidos, como nanopartículas recubiertas con ácido oleico o con dextrano.^[10,21,22] Además, también se ha utilizado este método para estabilizar nanopartículas hidrófobas en medios fisiológicos disminuyendo el tiempo de reacción de 24 horas a 20 minutos.^[23] Otra de las ventajas que facilita la síntesis dirigida por microondas es la posibilidad casi inmediata de obtener nanopartículas de óxido de hierro que produzcan un realce positivo de la señal. Como se comentaba anteriormente, la reducción del tamaño del núcleo

cristalino (alrededor de los 2-3 nm) aumenta el número de spines en la superficie y la disminución del momento magnético. El uso de las microondas permite obtener nanopartículas con un tamaño de cristal muy pequeño debido al aumento de la velocidad de reacción producido por el calentamiento dieléctrico. Además, la síntesis rápida y reproducible (principal problema de las síntesis de óxido de hierro) de estas nanopartículas de óxido de hierro que permiten contraste positivo en algunas aplicaciones puede desbancar el uso de agentes de contraste basados en Gd en el uso clínico, especialmente en aquellos casos donde la toxicidad sea un problema. Por último, la posibilidad de obtener nanopartículas en un período de tiempo tan corto permite trabajar fácilmente con isótopos de vida media relativamente corta como el ^{68}Ga , por ejemplo.

RADIOMARCAJE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO

Para diseñar la síntesis de un nano-radiotrazador, hay dos aspectos importantes a tener en cuenta. El primero de ellos es elegir la combinación nanomaterial-radioisótopo y el segundo la forma en la cual se van a unir ambos componentes. Respecto al primer punto, ya se han mostrado las ventajas de las nanopartículas de óxido de hierro, su biocompatibilidad, la alta relación superficie/volumen y sus características magnéticas, hacen de este nanomaterial una plataforma atractiva para la síntesis de sondas multifuncionales. En lo que concierne al radioisótopo, existen diferentes posibilidades dentro de la técnica que se quiera emplear. Debido a su alta y mayor sensibilidad con respecto a otras técnicas de imagen nuclear, el PET, es la técnica por excelencia ya que proporciona información funcional con límites de detección muy bajos. El PET utiliza como radioisótopos emisores β^+ . Estos isótopos, decaen a un isótopo estable emitiendo positrones y neutrinos. Los positrones en contacto con electrones, producen dos fotones gamma de 511 KeV que viajan en sentidos opuestos en un proceso conocido como aniquilación de positrones. Estos fotones gamma son detectados como fotones coincidentes por el detector del equipo para ser después procesados y generar una imagen que proporciona información funcional (Figura 4).

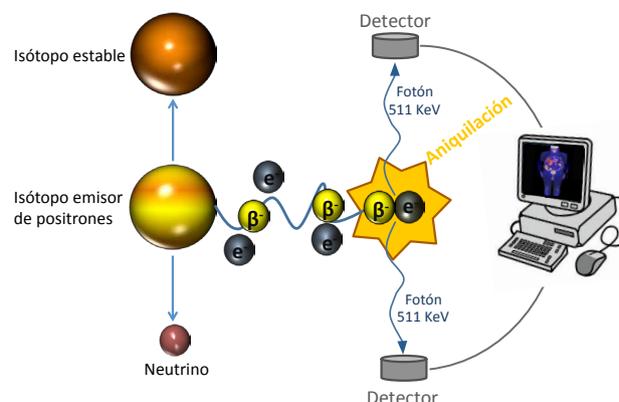


Figura 4. Ilustración del fenómeno de aniquilación y detección en PET

Existe una gran variedad de radioisótopos utilizados en PET. Estos suelen ser clasificados en función de su tiempo de semidesintegración y/o en la forma de producción (Tabla 1). El isótopo radiactivo más utilizado en la práctica clínica es el ^{18}F . Este radioisótopo se une a la deoxi-2-glucosa produciendo el radiotrazador más conocido en PET, el ^{18}F FDG (^{18}F -fluorodesoxiglucosa) que permite obtener información metabólica del ciclo glicolítico celular.^[24,25]

Tabla 1. Radioisótopos PET más comunes

Radioisótopo	Tiempo de vida media	Modo de producción
Carbono-11	20,4 minutos	$^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ (ciclotrón)
Nitrógeno-13	9,9 minutos	$^{14}\text{O}(p,\alpha)^{13}\text{N}$ (ciclotrón)
Oxígeno-15	122 segundos	$^{14}\text{N}(d,n)^{15}\text{O}$ (ciclotrón)
Flúor-18	110 minutos	$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ (ciclotrón)
Cobre-62	9,74 minutos	$^{63}\text{Cu}(p,n)^{62}\text{Zn}$ (ciclotrón) $^{62}\text{Zn} \rightarrow ^{62}\text{Cu}$ (generador)
Cobre-64	12,7 horas	$^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ (ciclotrón) $\text{Zn}(\text{varios})^{64}\text{Cu}$ (ciclotrón)
Galio-68	67,7 minutos	$^{69}\text{Ga}(p,2n)^{68}\text{Ge}$ (ciclotrón) $^{68}\text{Ge} \rightarrow ^{68}\text{Ga}$ (generador)
Bromo-76	16,2 horas	$^{76}\text{Se}(p,n)^{76}\text{Br}$ (ciclotrón)
Yodo-124	4,15 días	$^{124}\text{Te}(p,n)^{124}\text{I}$ (ciclotrón)
Circonio-89	78,4 horas	$^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ (ciclotrón)

Otro radioisótopo que ha ganado relevancia en los últimos años es el ^{68}Ga . El hecho de poder producir este radioisótopo en un generador de sobremesa, sin necesidad de ciclotrones ni grandes instalaciones hace que el uso de este radioisótopo esté cada vez más extendido. Además, presenta un tiempo de vida media relativamente corto de 67,8 minutos, haciendo que la tasa de radiactividad recibida por el paciente sea muy baja, algo esencial en medicina nuclear.^[26]

El segundo punto, crucial a la hora de diseñar un nano-radiotrazador de óxido de hierro, es elegir la forma en la cual la nanopartícula se conjuga con el radioisótopo. Existen dos métodos de síntesis que se diferencian en la posición que ocupa el radioisótopo en la nanopartícula. La síntesis por formación de complejos entre el radioisótopo y la nanopartícula a través de agentes quelantes, produce nano-radiotrazadores con el radioisótopo localizado en la superficie de la nanopartículas. La síntesis a través de una mezcla de precursores radiactivos y no radiactivos proporciona nanopartículas con el radioisótopo incorporado en el núcleo de la nanopartícula (Figura 5).

1. Formación de complejos entre el radioisótopo y la nanopartícula a través de agentes quelantes

Esta estrategia de síntesis incorpora el radioisótopo en la superficie de la nanopartícula una vez que se ha sintetizado esta. La idea es funcionalizar, una vez obtenida, la superficie de la nanopartícula incorporando un quelante

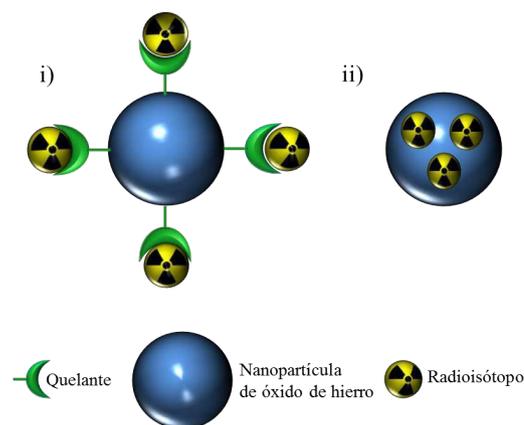


Figura 5. i) Formación de complejos entre el radioisótopo y la nanopartícula a través de agentes quelantes, ii) Síntesis a través de una mezcla de precursores radiactivos y no radiactivos

que pueda formar complejos de coordinación con el radioisótopo elegido.^[27,28] Teniendo en cuenta la naturaleza de este tipo de aproximación, es necesario tener en consideración dos aspectos, que aun siendo diferentes, están relacionados. El primero es la forma de funcionalizar la superficie de la nanopartícula con el quelante. La unión entre ambos debe ser una unión fuerte a través de la formación de enlaces covalentes, ya que si esto no fuera así, cabría la posibilidad de que al inyectarlo en el torrente sanguíneo, el quelante se eliminara de la superficie de la nanopartícula y por tanto la señal recogida por el PET se debiera al quelante con el radioisótopo y no al nano-radiotrazador. Para evitar que esto ocurra, se utilizan reacciones que produzcan un enlace fuerte entre la superficie de la nanopartícula y el quelante.

La elección del quelante es el segundo punto a determinar dentro de esta aproximación. Esta depende del radioisótopo que se quiera utilizar. Es importante que el radioisótopo y el quelante formen un complejo de coordinación fuerte para evitar posibles reacciones de transmetalación entre el nano-radiotrazador y los cationes metálicos y proteínas presentes en el organismo.

Entre los quelantes más utilizados, se encuentran los quelantes cíclicos ya que son capaces de formar complejos de coordinación estables con una velocidad de disociación del orden de $10^5 - 10^7$ más lenta que los complejos formados por sus análogos abiertos. Estos compuestos macrocíclicos dejan atrapado el catión metálico en el espacio interno que forma el ciclo confiriendo aún más estabilidad al complejo coordinado.^[29] Uno de los quelantes más utilizados es el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético también conocido como DOTA. Este compuesto es un macrociclo con 4 brazos que contienen ácidos carboxílicos capaces de formar complejos de coordinación [2+4] y/o [3+4] con radioisótopos emisores de positrones como el ^{68}Ga y el ^{64}Cu (Figura 6).

En la reacción de quelación intervienen 2 ó 3 de los 4 ácidos presentes en el compuesto, los ácidos carboxílicos restantes suelen utilizarse para realizar funcionalizaciones con algún tipo de biomolécula que dirija la sonda a una diana específica. La unión de dicha biomolécula suele

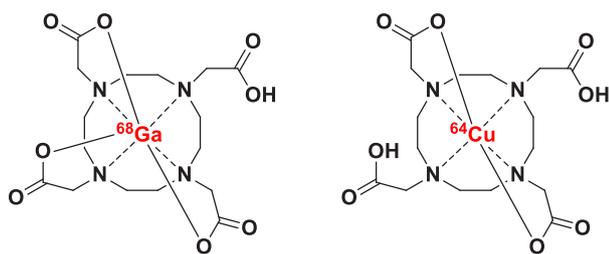


Figura 6. Formación de complejos ^{68}Ga -DOTA y ^{64}Cu -DOTA

hacerse con anterioridad al marcaje con el radioisótopo. El uso del DOTA como quelante está muy extendido, con multitud de productos comerciales derivados de DOTA que contienen diferentes grupos funcionales para poder conjugarlos con cualquier tipo de molécula (Figura 7). En el caso de la síntesis de nano-radiotrazadores, la estrategia a seguir con estos quelantes comienza con la formación de la nanopartícula, la funcionalización de la superficie con alguna biomolécula y la conjugación con el quelante para finalmente realizar la reacción de marcaje con el isótopo radiactivo. Esto conlleva un gran número de pasos y por tanto una carga sintética alta, lo que representa la mayor desventaja de este método. Además, las reacciones de radiomarcaje con este tipo de quelantes requiere altas temperaturas (60°C - 90°C) y pH ácido (~ 4) dado que el Ga forma hidróxidos estables a pH más alto, condiciones que en ocasiones perjudican la estabilidad de las biomoléculas.^[30]

Otro quelante que puede ser utilizado para la síntesis de nano-radiotrazadores de óxido de hierro es la deferoxamina (DFO). Esta se utiliza comúnmente en radioquímica para formar complejos con el ^{89}Zr . El ^{89}Zr es un emisor de positrones que presenta un tiempo de semidesintegración relativamente largo (78,4 h). Dado este tiempo de vida media, el ^{89}Zr se utiliza habitualmente para seguir la biodistribución de diferentes anticuerpos a través del PET.^[31] Para su uso en la síntesis de nano-radiotrazadores, la deferoxamina se conjuga a la superficie de la nanopartícula y posteriormente se marca con el ^{89}Zr .^[32] Por tanto, este sistema se puede utilizar para estudios de biodistribución de nanopartículas de óxido de hierro a tiempos largos. Una ventaja del uso de la deferoxamina es que las condiciones de marcaje son más suaves que en el caso del DOTA, produciendo buenos rendimientos de marcaje a temperatura ambiente. Este quelante también puede utilizarse para marcar las nanopartículas con ^{68}Ga , sin embargo, el complejo que forma con la deferoxamina es más débil que el formado con el DOTA.^[33]

2. Síntesis a través de precursores radiactivos y no radiactivos

Este método de síntesis proporciona nano-radiotrazadores con el radioisótopo situado en el núcleo de la nanopartícula. Se trata de formar el sistema en un solo paso, es decir, al utilizar una mezcla de precursores adecuada se consigue formar la nanopartícula a la vez que el radioisótopo

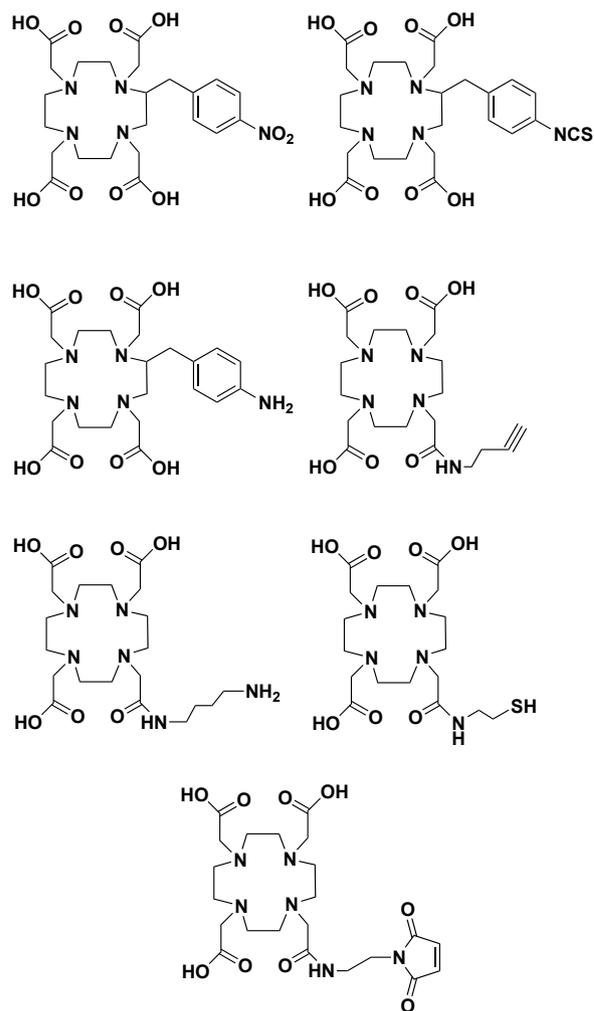


Figura 7. Estructuras DOTA derivados comerciales

po queda atrapado en la estructura cristalina de la misma, formando el nano-radiotrazador en una sola reacción. La reacción se lleva a cabo añadiendo a la mezcla de precursores iniciales una pequeña cantidad, del orden de nanomoles, de la solución radiactiva produciendo el dopaje radiactivo del núcleo de la nanopartícula. Este sistema presenta ciertas ventajas frente al método de quelante. Una de las más importantes es que el radioisótopo se encuentra dentro de la estructura cristalina de la nanopartícula por lo que no existe riesgo de que se produzcan reacciones posteriores de transmetalación además de conferir una gran estabilidad radioquímica al trazador. Además la síntesis del nano-radiotrazador se realiza en un solo paso por lo que el coste sintético es mucho menor que en el caso de la aproximación de quelante.

Esta aproximación, relativamente nueva, ha sido llevada a cabo para sintetizar nano-radiotrazadores basados en nanopartículas de oro y quantum dots dopados con ^{64}Cu .^[34,35] Respecto a nano-radiotrazadores basados en nanopartículas de óxido de hierro, la estrategia de dopaje de núcleo se ha empleado a través de síntesis dirigida por microondas. Como dijimos anteriormente, con

el uso de la tecnología microondas se pueden obtener nanopartículas de óxido de hierro de forma muy rápida (~ 5 min), esencial para utilizar radioisótopos de vida media corta como el ^{68}Ga . El primer ejemplo descrito de esta aproximación para el dopaje de óxidos de hierro fue realizado por Ray M. Wong *et al.* en 2012. En el trabajo de obtención de nanopartículas dopadas con ^{64}Cu se lleva a cabo una reacción de hidrólisis utilizando como precursores FeCl_3 , FeCl_2 y $^{64}\text{CuCl}_2$ y el microondas como fuerza conductora de la síntesis.^[36] Aunque el método era muy novedoso, la actividad específica obtenida para el nano-radiotrazador era muy baja lo que dificulta la obtención de imágenes *in vivo*.

Una metodología desarrollada por nuestro grupo en los últimos meses, ha permitido la obtención de nanopartículas de óxido de hierro dopadas con ^{68}Ga .^[37] La síntesis por microondas de la nanopartícula ha permitido, por primera vez, incorporar un isótopo de vida corta como el ^{68}Ga en el núcleo de la nanopartícula con un rendimiento radioquímico del 93%. Este alto rendimiento de marcaje hace que la actividad específica de nuestro nano-radiotrazador sea de 7,60 GBq/ mmol de Fe lo que permite su uso no solo en modelos de pequeño (ratón y rata) y gran animal (conejo y cerdo) sino que permitiría –sintetizada en condiciones de manufacturación adecuadas– también su uso en humanos. Además el uso del microondas para la síntesis de las nanopartículas permite obtener tamaños de núcleo pequeños, produciendo un comportamiento más paramagnético de las nanopartículas generando un fuerte contraste positivo.

APLICACIONES DE LOS NANO-RADIOTRAZADORES DE ÓXIDO DE HIERRO

Los nano-radiotrazadores de óxido de hierro han sido utilizados para multitud de aplicaciones. Sin duda, el campo dónde se encuentran más ejemplos del uso de este sistema es el de la oncología. La resolución que ofrece la resonancia magnética de imagen así como la sensibilidad que proporciona la tomografía por emisión de positrones hacen que la detección de diferentes procesos tumorales se pueda realizar de forma rápida, selectiva y no invasiva.

Existen diversos ejemplos donde se emplea la síntesis por formación de complejos. Para dirigir el nano-radiotrazador hacia la zona tumoral, se conjuga este con un péptido o un anticuerpo de forma previa al radiomarcaje.

Los péptidos más utilizados para este tipo de estudios están basados en la secuencia Arginina-Glicina-Ácido aspártico (Arg-Gly-ASP) conocidos como péptidos RGD. Estes tipo de péptidos dirigen la sonda, en este caso el nano-radiotrazador, hacia las integrinas $\alpha_v\beta_3$ sobre-expresadas en el proceso de angiogénesis que se desarrolla en la formación del tumor.^[38,39] Normalmente, la síntesis de nano-radiotrazadores con este tipo de péptidos comienza con la formación de la nanopartícula, la funcionalización de este con el quelante, la conjugación con el péptido y por último el marcaje radiactivo con el emisor de positrones.^[40,41] Existe una alternativa para reducir el número de pasos de síntesis en esta aproximación utilizando la síntesis por formación de micelas. La idea de este procedimiento

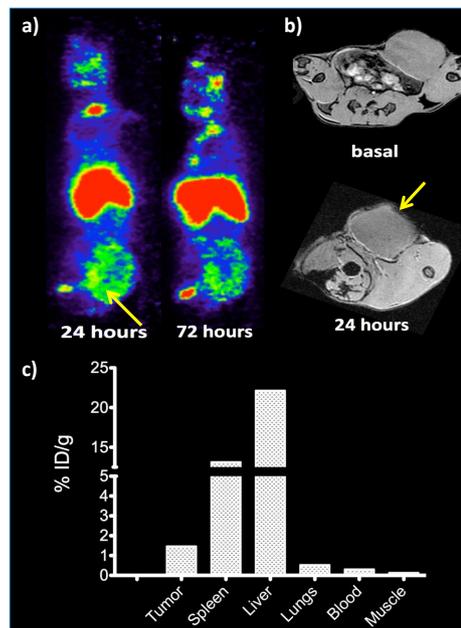


Figura 8. a) Imagen PET 24 y 72 horas tras inyectar el nano-radiotrazador, b) Imagen MRI basal y 24 horas tras inyectar el nano-radiotrazador, c) Cuantificación por contador gamma 72 horas tras inyectar el nano-radiotrazador

es sintetizar los precursores de forma individual para después formar una micela con todos ellos produciendo una nanopartícula final que contenga el núcleo de óxido de hierro, el quelante y el péptido en un solo paso. Este procedimiento novedoso ha sido empleado para la detección de tumores en modelos murinos a través del radiomarcaje de las nanopartículas con ^{89}Zr , obteniéndose buenos resultados tanto en la detección por MRI como en la detección y cuantificación por PET (Figura 8).^[42]

La aproximación de síntesis por precursores radiactivos y no radiactivos también ha sido utilizado para la detección y cuantificación de zonas tumorales por conjugación del péptido c(RGDfK). En este caso, se utilizó como emisor de positrones ^{68}Ga y la síntesis dirigida por microondas para realizar la conjugación de forma rápida.^[37] Teniendo en cuenta las ventajas que ofrece este método de síntesis, se consiguió obtener el nano-radiotrazador con una carga de ligando muy alta, 18,1 moléculas de RGD por nanopartícula lo que permitió obtener imágenes de alta calidad con gran acumulación del nano-radiotrazador en tan solo 1 hora tras su administración tanto por PET como por MRI, donde gracias a la metodología de síntesis, se obtuvo un fuerte contraste de realce T_1 en lugar del contraste de realce T_2 , típico de las nanopartículas de óxido de hierro. Finalmente la cuantificación a través del contador gamma permitió corroborar la alta cantidad de nano-radiotrazador presente en la zona tumoral.^[37]

CONCLUSIONES

La combinación de nanotecnología y radioquímica es un nuevo campo altamente interdisciplinar y que ofrece un nuevo campo de aplicaciones. Los avances que se pueden producir cuando esta aproximación vaya madurando

exceden con mucho los ejemplos que aquí hemos podido plantear y van desde la imagen a la terapia así como aplicaciones en otros campos diferentes a la biomedicina. Este hecho será aún más evidente cuando nuevos materiales se incorporen a la lista de posibles nano-radiomateriales incluyendo otras propiedades, ya sean ópticas, electrónicas o magnéticas. Llegue donde llegue esta nueva aproximación lo que es evidente es que la química jugará un papel central en su desarrollo implicando además a la mayoría de especialidades con especial relevancia para la química de materiales y la química orgánica.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo económico al Ministerio de Economía y Competitividad (MAT2013-47303-P) y la Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2326, Inmunothercan-CM).

BIBLIOGRAFÍA

- [1] D. A. Mankoff, *J. Nucl. Med.*, **2007**, *48*, 18n, 21n.
- [2] Y. Jun, J. Choi, y J. Cheon, *Chem. Commun.*, **2007**, 1203.
- [3] W. Wu, Q. He, y C. Jiang, *Nanoscale Res. Lett.*, **2008**, *3*, 397-415.
- [4] S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, P. Veverka, G. Goglio, A. Demourgues, J. Portier, E. Pollert, y E. Duguet, *Prog. Solid State Chem.*, **2006**, *34*, 237-247.
- [5] M. Zhao, L. Josephson, Y. Tang, y R. Weissleder, *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2003**, *42*, 1375-1378.
- [6] D. Patel, J. Y. Moon, Y. Chang, T. J. Kim, y G. H. Lee, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, **2008**, *313-314*, 91-94.
- [7] P. D. Stevens, J. Fan, H. M. R. Gardimalla, M. Yen, y Y. Gao, *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 2085-2088.
- [8] M. A. Perazella, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, **2009**, *4*, 461-9.
- [9] H. Jung, B. Park, C. Lee, J. Cho, J. Suh, J. Park, Y. Kim, J. Kim, G. Cho, y H. Cho, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, **2014**, *10*, 1679-1689.
- [10] R. Bhavesh, A. Lechuga-Vieco, J. Ruiz-Cabello y F. Herranz, *Nanomaterials*, **2015**, *5*, 1880-1890.
- [11] R. Massart, *IEEE Trans. Magn.*, **17**, 1247-1248.
- [12] A. G. Roca, M. P. Morales y C. J. Serna, **2006**, *42*, 3025-3029.
- [13] F. Herranz, M. P. M. del P. Morales, A. G. G. Roca, M. Desco y J. Ruiz-Cabello, *Chem. - A Eur. J.*, **2008**, *14*, 9126-30.
- [14] T. J. Daou, G. Pourroy, S. Bégin-Colin, J. M. Grenèche, C. Ul-haq-Bouillet, P. Legaré, P. Bernhardt, C. Leuvre y G. Rogez, *Chem. Mater.*, **2006**, *18*, 4399-4404.
- [15] R. Costo, V. Bello, C. Robic, M. Port, J. F. Marco, M. Puerto Morales y S. Veintemillas-Verdaguer, *Langmuir*, **2012**, *28*, 178-85.
- [16] R. Vijayakumar, Y. Koltypin, I. Felner y A. Gedanken, *Mater. Sci. Eng. A*, **2000**, *286*, 101-105.
- [17] C. O. Kappe, *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2004**, *43*, 6250-6284.
- [18] A. de la Hoz, Ángel Díaz-Ortiz y A. Moreno, *Chem. Soc. Rev.*, **2005**, *34*, 164.
- [19] C. Oliver Kappe, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, 1127-1139.
- [20] S. Horikoshi y N. Serpone, *Microwaves in Nanoparticles synthesis*, Wiley-VCH, **2013**.
- [21] O. Pascu, E. Carenza, M. Gich, S. Estradé, F. Peiró, G. Herranz y A. Roig, *J. Phys. Chem. C*, **2012**, *116*, 15108-15116.
- [22] E. a Osborne, T. M. Atkins, D. a Gilbert, S. M. Kauzlarich, K. Liu y A. Y. Louie, *Nanotechnology*, **2012**, *23*, 215602.
- [23] J. Pellico, A. V Lechuga-Vieco, M. Benito, J. M. García-Segura, V. Fuster, J. Ruiz-Cabello y F. Herranz, *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 1661-1665.
- [24] J. S. Fowler y A. P. Wolf, *Int. J. Rad. Appl. Instrum. A.*, **1986**, *37*, 663-668.
- [25] A. Zhu, D. M. Marcus, H.-K. G. Shu y H. Shim, *Radiat. Res.*, **2012**, *177*, 436-448.
- [26] I. Velikyan, *Molecules*, **2015**, *20*, 12913-12943.
- [27] J. Xie, G. Liu, H. S. Eden, H. Ai, and X. Chen, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, *44*, 883-892.
- [28] S. M. Kim, M. K. Chae, M. S. Yim, I. H. Jeong, J. Cho, C. Lee y E. K. Ryu, *Biomaterials*, **2013**, *34*, 8114-8121.
- [29] V. Alexander, *Chem. Rev.*, **1995**, *95*, 273-342.
- [30] C. Decristoforo, R. Knopp, E. von Guggenberg *et al.*, *Nucl. Med. Commun.*, **2007**, *28*, 870-875.
- [31] M. J. W. D. Vosjan, L. R. Perk, G. W. M. Visser, M. Budde, P. Jurek, G. E. Kiefer y G. a M. S. van Dongen, *Nat. Protoc.*, **2010**, *5*, 739-743.
- [32] C. Pérez-Medina, D. Abdel-Atti, Y. Zhang, V. A. Longo, C. P. Irwin, T. Binderup, J. Ruiz-Cabello, Z. A. Fayad, J. S. Lewis, W. J. M. Mulder y T. Reiner, *J. Nucl. Med.*, **2014**, *55*, 1706-11.
- [33] P. M. Smith-Jones, B. Stolz, C. Bruns, R. Albert, H. W. Reist, R. Fridrich y H. R. Mäcke, *J. Nucl. Med.*, **1994**, *35*, 317-325.
- [34] M. Zhou, R. Zhang, M. Huang, W. Lu, S. Song, M. P. Melancon, M. Tian, D. Liang y C. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 15351-15358.
- [35] Y. Zhao, D. Sultan, L. Detering, S. Cho, G. Sun, R. Pierce, K. L. Wooley y Y. Liu, *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2014**, *53*, 156-159.
- [36] R. M. Wong, D. A. Gilbert, K. Liu y A. Y. Louie, *ACS Nano*, **2012**, *6*, 3461-7.
- [37] J. Pellico, J. Ruiz-Cabello, M. Saiz-Alía, G. del Rosario, S. Caja, M. Montoya, L. F. de Manuel, M. P. Morales, L. Gutiérrez, B. Galiana, J. A. Enríquez y F. Herranz, *Contrast Media Mol. Imaging*, **2015**, DOI: 10.1002/cmml.1681.
- [38] S. Zitzmann, V. Ehemann y M. Schwab, *Cancer Res.*, **2002**, *62*, 5139-5143.
- [39] H. Cai y P. S. Conti, *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **2013**, *56*, 264-279.
- [40] X. Yang, H. Hong, J. J. Grailer, I. J. Rowland, A. Javadi, S. a. Hurley, Y. Xiao, Y. Yang, Y. Zhang, R. J. Nickles, W. Cai, D. a. Steeber y S. Gong, *Biomaterials*, **2011**, *32*, 4151-4160.
- [41] H.-Y. Lee, Z. Li, K. Chen, A. R. Hsu, C. Xu, J. Xie, S. Sun y X. Chen, *J. Nucl. Med.*, **2008**, *49*, 1371-1379.
- [42] H. Groult, J. Pellico, A. V Lechuga-vieco, R. Bhavesh, M. Zamaí, E. Almarza, E. Cantelar y P. Mart, *Bioconjug. Chem.*, **2015**, *26*, 153-160.