

Marta Baselga Lahoz

Desarrollo de vectores nano y  
microparticulados para el tatuaje  
del ganglio linfático centinela en  
pacientes con cáncer de mama  
quimioterapia neoadyuvante

Director/es

Güemes Sánchez, Antonio  
Arruebo Gordo, Manuel

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

**DESARROLLO DE VECTORES NANO Y  
MICROPARTICULADOS PARA EL TATUAJE DEL  
GANGLIO LINFÁTICO CENTINELA EN PACIENTES  
CON CÁNCER DE MAMA QUIMIOTERAPIA  
NEOADYUVANTE**

Autor

**Marta Baselga Lahoz**

Director/es

**Güemes Sánchez, Antonio  
Arruebo Gordo, Manuel**

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA  
Escuela de Doctorado**

Programa de Doctorado en Medicina

**2024**



Tesis Doctoral



Universidad  
Zaragoza

# Desarrollo de vectores nano y microparticulados para el tatuaje del ganglio linfático centinela en pacientes con cáncer de mama previa quimioterapia neoadyuvante

Autora: **Marta Baselga**

Directores: **Antonio Güemes, Manuel Arruebo**

**Programa de Doctorado en Medicina y Cirugía**

Universidad de Zaragoza – Instituto de Investigación Sanitaria Aragón

**Grupo de Investigación Quirúrgica, Clínica y Experimental (GIIS2)**

**Grupo de Investigación Advanced Materials in Biomedicine (AMiB)**

2020-2024





## Tesis Doctoral

Desarrollo de vectores nano y microparticulados para el tatuaje del ganglio linfático centinela en pacientes con cáncer de mama previa quimioterapia neoadyuvante

*Development of nano- and microparticulate vectors for sentinel lymph node tattooing in breast cancer patients prior to neoadjuvant chemotherapy*

Autora

**Marta Baselga Lahoz**

Directores

**Antonio Güemes Sánchez**

**Manuel Arruebo Gordo**

Tesis presentada como requisito para la obtención del título  
de Doctora en Medicina por la Universidad de Zaragoza

Instituto de Investigación Sanitaria Aragón  
Grupo de Investigación Quirúrgica, Clínica y Experimental (GIIS2) y  
Grupo Advanced Materials in Biomedicine (AMiB)

**Programa de Doctorado en Medicina y Cirugía**  
**Departamento de Cirugía, Ginecología y Obstetricia**

**2020-2024**



**A mi querido tío Pepe,**

porque las lecciones más valiosas que se  
pueden aprender me las has enseñado tú.





Este proyecto de investigación ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (referencia de la financiación: DTS20-00131) y por el Instituto de Investigación Sanitaria Aragón.



El desarrollo experimental de la Tesis ha sido realizado en los laboratorios del Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón) y del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA).



VALENCIA BIOMEDICAL  
RESEARCH FOUNDATION  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRÍNCIPE FELIPE



Universidad  
Zaragoza



Los estudios de Microscopía Electrónica de esta Tesis han sido realizados en el Servicio de Microscopía Electrónica (CIPF, Valencia, España), en el Servicio de Microscopía Electrónica de Sistemas Biológicos y en el Laboratorio de Microscopías Avanzadas de la Universidad de Zaragoza.



Institut Universitari Cavanilles  
de Biodiversitat i Biologia Evolutiva

Durante el periodo de formación predoctoral, la doctoranda realizó una estancia de investigación en el grupo de Neurobiología Comparada (Dr. J.M. García-Verdugo) del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva (Valencia, España).

Como resultado de la investigación de esta Tesis Doctoral, se han realizado **2 artículos de investigación** (ver Anexo 1) y **2 comunicaciones en congresos internacionales** en formato de póster (ver Anexo 2).



# Agradecimientos

A mis directores de Tesis, el **Dr. Antonio Güemes** y el **Dr. Manuel Arruebo**, sin los cuales esta Tesis no habría tenido lugar.

**Antonio**, gracias por confiar en mi desde el primer momento. Has sido mi punto de apoyo en el "mundo de la investigación". Espero que nos quede un largo camino por recorrer juntos. *Ihr seid die Besten!*

**Manuel**, por tu paciencia y confianza. Gracias por acompañarme en este camino, por siempre estar dispuesto a resolver cualquier duda y por iniciarme en el trabajo de laboratorio. Estaré siempre agradecida.

A la **Dra. Concha Junquera**, por enseñarme biología y buenas prácticas, por ser mi "madre científica" y por siempre estar a mi lado. No tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí.

A la **Dra. Eva Monleón**, por siempre estar dispuesta a dar lo mejor de ti y por tu paciencia enseñándome histología.

A la **Dra. Cristina Yus**, por enseñarme a utilizar una pipeta en mi primer día de laboratorio, pero también por tu ayuda constante y tu disposición. Ha sido un placer trabajar contigo.

A la **Dra. Dolores Arribas** por su participación en la cirugía experimental y por siempre acudir con una sonrisa.

Al **Dr. Víctor Sebastián**, a la **Dra. Teresa Alejo** y a la **Dra. Nuria Navascués**, por su apoyo en la caracterización de los nanomateriales.

Al **Dr. Alberto J. Schuhmacher** por acompañarme en cada paso y siempre estar dispuesto a todo por la ciencia.

Al **Dr. Ángel Lanas**, por su apoyo en el acceso al programa de doctorado en Medicina.

Al **Dr. García Verdugo** por hacer de mi estancia de Tesis un periodo de formación constante y motivación. Fue un lujo aprender de ti. También a **Susana González**, por formarme en técnicas de microscopía electrónica.

A **Mario Soriano**, por ofrecer siempre lo mejor de sí mismo y apoyar de manera tan destacada en la investigación.

Al **Servicio de Microscopía Electrónica de Sistemas Biológicos** de la Universidad de Zaragoza. M<sup>a</sup> José, Rosa, gracias por vuestra disposición y dedicación. Al **Laboratorio de Microscopías Avanzadas** de la Universidad de Zaragoza, por facilitarme los estudios de microscopía electrónica.

A mi **familia**, pero especialmente a ti, mamá, por apoyarme incondicionalmente y por tu amor infinito. Eres luz en mi oscuridad, y nunca podré devolverte todo lo que has hecho por mí. Sin ti nada hubiera sido posible.

# Resumen

En cáncer de mama, la metástasis en ganglios linfáticos axilares es uno de los indicadores pronósticos de mayor relevancia clínica. La diseminación más frecuente ocurre a través de los ganglios axilares homolaterales, siendo el estadiaje ganglionar indispensable para la estadificación del tumor y la elección de tratamiento. Históricamente, la linfadenectomía axilar (LA) constituía el procedimiento estándar para el estadiaje axilar. Sin embargo, en las últimas décadas la LA se ha sustituido por técnicas menos invasivas como la biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC), que consiste en la extirpación individual del ganglio linfático centinela (GC). El GC recibe de forma directa y en primer lugar el drenaje linfático desde la lesión tumoral, por lo que, si el GC no muestra afectación metastática, el resto de los ganglios axilares probablemente permanecen libres de enfermedad. La probabilidad de diseminación preferente en ganglios no centinela es inferior al 0,1 %, por lo que la BSGC ha sustituido la LA para la estadificación del GC, reduciendo la morbilidad de la intervención. La detección del GC se basa en la inyección de radiotrazadores, que migran por vía linfática, al igual que las células tumorales, hasta el primer ganglio regional, donde se acumulan temporalmente antes de migrar al resto de los ganglios regionales. En las pacientes que han recibido quimioterapia neoadyuvante (QTNA), las vías de drenaje linfático resultan modificadas y los GC pueden reducir su tamaño como consecuencia del tratamiento. Estas pacientes presentan mayor dificultad para la identificación del GC respecto a las pacientes que no son tratadas, por lo que se hace necesario marcar previamente los ganglios afectados o sospechosos. Para salvar esta limitación, los ganglios afectados detectados previamente a la QTNA son localizados y marcados. Existen varias técnicas para el marcaje del GC, incluyendo la colocación de clips metálicos radiolúcidos, magnéticos o detectados por sondas radar, el uso de semillas radioactivas y el tatuaje del GC. Este último consiste en la administración de suspensiones de carbono en el tejido ganglionar, consiguiendo una pigmentación negra que permanece en el ganglio hasta la cirugía definitiva y facilita su detección visual en el momento quirúrgico. El tatuaje con suspensiones de carbono ha demostrado ser una técnica simple, asequible y de bajo coste con altas tasas de identificación, además de no interferir durante la evaluación anatopatológica. Sin embargo, esta técnica es novedosa y todavía no se ha generalizado en las unidades de mama. Además, todavía se requiere de más investigación sobre su permanencia a largo plazo y su posible migración a otros ganglios cercanos para garantizar la seguridad del tratamiento.

Con base a lo anterior, el objetivo de esta Tesis fue desarrollar y validar experimentalmente un método de marcaje de GC metastatizados en pacientes con cáncer de mama previa QTNA para la disección axilar dirigida (DAD). Partimos de la hipótesis de que las diferentes variables fisico-químicas de los vectores de marcaje producen un efecto biológico diferente en el ganglio linfático. Para este fin, optimizamos y caracterizamos 6 tipos de vectores de marcaje para su inoculación directa en los ganglios linfáticos de los animales de experimentación. Utilizamos 10 cerdos *White Landrace* para la experimentación *in vivo*; 5 para estudiar los efectos sobre los ganglios linfáticos de la inoculación a corto plazo (1-6 semanas) y otros 5 en los estudios a largo plazo (16 semanas). En los estudios experimentales a corto plazo, se inocularon vectores para comparar el efecto de la encapsulación de nanopartículas de carbono (C-NPs) en partículas poliméricas de ácido (polí(láctico-co-glicólico), PLGA) respecto a la inoculación de C-NPs no encapsuladas, el efecto de la concentración de las partículas en el vector (10 y 20 mg/ml) el efecto de la encapsulación de C-NPs o melanina como elemento colorante y el efecto del tamaño de partícula. Para estudiar esta última variable se encapsularon C-NPs en nano (CS) y micropartículas (CE) de PLGA de tamaños entorno a ~100 nm (nanopartículas, NPs) y a ~1 μm (micropartículas, MPs). En los estudios experimentales a largo plazo, además de mantener estas variables, se exploró el uso de otro PLGA base para conseguir una degradación más lenta, así como la coencapsulación de cloroquina (CQ), la cual reduce la internalización de las partículas por parte de los macrófagos, además de las C-NPs. Las NPs de PLGA con C-NPs y melanina encapsulada (M) fueron sintetizadas por emulsión, mientras que las MPs de PLGA-C-NPs se obtuvieron por electrosprayado.

En este estudio, se tatuaron un total de 112 ganglios linfáticos en los animales de experimentación con los diversos métodos señalados. Tras los diferentes tiempos de estabilización, se estudiaron diversas variables macro y microscópicas para la comparación de los diferentes vectores. A ni-

vel macroscópico se analizaron la facilidad en la identificación intraoperatoria y el área marcada, mientras que a nivel microscópico se estudió la localización de las partículas, el tamaño de los cúmulos formados por los aglomerados de partículas y la intensidad de la reacción inflamatoria. A nivel macroscópico, la tasa de identificación fue del 50–100 % de los ganglios tras 16 semanas dependiendo del tipo de partícula inoculada. No se identificó ninguno de los ganglios marcados con C-NPs no encapsuladas (control). El porcentaje de área marcada fue similar en todos los marcas (10.3 %), a excepción de las C-NPs no encapsuladas, que solo tatuaron el 2.5 % de la superficie del ganglio. Microscópicamente, en todos los ganglios apareció reacción inflamatoria de tipo cuerpo extraño asociada a la presencia de las partículas, caracterizado por la presencia de macrófagos y células gigantes multinucleadas. En ocasiones, además, se encontraron pequeños focos necróticos, especialmente en los ganglios marcados con vectores basados en melanina. En los estudios ultraestructurales, encontramos que los macrófagos fagocitaron y aislaron las partículas administradas desde la primera semana tras la inoculación. Tras su internalización en fagosomas en un intento por degradar las partículas, tanto las C-NPs como los fragmentos de melanina cristalizada rompen la membrana de los fagosomas, derramando las hidrolasas lisosomales al citoplasma y produciendo la lisis celular. En consecuencia, nuevos macrófagos fagocitan los restos celulares y de partículas presentes en el medio extracelular, y así sucesivamente hasta las 16 semanas estudiadas. Además, estudiamos secuencialmente por microscopía electrónica la migración transendotelial transcelular como un mecanismo asociado a la reacción inflamatoria, donde las células inmunitarias circulantes son reclutadas en regiones específicas de los vasos y extravasadas para orquestar una respuesta inmunitaria.

En los estudios estadísticos de las variables estudiadas, encontramos leves correlaciones positivas entre el área marcada y la extensión de la inflamación ( $p<0.043$ ), el área marcada y la tasa de identificación ( $p<0.001$ ), la inflamación y la tasa de identificación ( $p<0.001$ ), y negativa entre la tasa de identificación y el tamaño de los cúmulos ( $p<0.044$ ). Además, el tiempo es el factor que más afecta a las variables estudiadas. Comparando las variables en los estudios a corto y largo plazo encontramos una reducción significativa del área marcada ( $p<0.001$ ), de la facilidad en la identificación ( $p<0.001$ ), de la extensión de la inflamación ( $p=0.002$ ) y del tamaño de los cúmulos ( $p=0.007$ ) conforme aumenta el tiempo. Según el tipo de marcaje (CS, CE y M) se encontraron diferencias en la extensión de la inflamación ( $p=0.041$ ), siendo las partículas cargadas de melanina las que mayor inflamación desencadenan, y en el tamaño de los cúmulos ( $p=0.039$ ), siendo también los vectores de melanina los que formaron agregados de partículas más grandes. Finalmente, el tamaño de la partícula en el vector de marcaje (CS y CE) solo mostró diferencias estadísticamente significativas en la extensión de la inflamación ( $p=0.044$ ), produciendo las partículas más pequeñas (CS) mayor reacción inflamatoria en los estudios a largo plazo. El cambio de PLGA en los estudios a largo plazo solo reportó diferencias significativas en las distribuciones de la variable del tamaño de los cúmulos para ambos grupos, mientras que la coencapsulación de CQ no pareció tener efecto.

En conclusión, observamos que la encapsulación de C-NPs en una matriz polimérica no solo aumenta la estabilidad del marcaje en el ganglio a lo largo del tiempo (reduciendo la migración y evitando el marcaje de ganglios secundarios), sino que también reduce la intensidad de la respuesta inflamatoria y mejora la tasa de identificación intraoperatoria tras 4 meses. A nivel clínico, la facilidad de identificación y la reducción de la reacción inflamatoria son las variables más importantes. Nuestros resultados preliminares indican que las nanopartículas (CS) generan mayor reacción inflamatoria que las micropartículas (CE). Aunque a priori se sospechó que la melanina produjera menor citotoxicidad al tratarse de un pigmento endógeno, encontramos que produce mayor reacción inflamatoria y más necrosis en el tejido ganglionar, por lo que las C-NPs son las candidatas más adecuadas. La tasa de identificación fue ligeramente superior en las CE respecto a las CS. Sin embargo, la identificación fue similar en ambas concentraciones (20 versus 10 mg/ml), lo que sugiere que esa dosis de NPs/MPs es suficiente para tatuarse los ganglios a largo plazo. Por tanto, según estos estudios preliminares, los vectores de micropartículas de PLGA con C-NPs encapsuladas en su interior parecen ser los candidatos más adecuados para el marcaje del CG, mejorando la técnica actual de tatuaje ganglionar.

# Abstract

In breast cancer, axillary lymph node metastasis is one of the most clinically relevant prognostic indicators. The most frequent dissemination occurs through the regional axillary lymph nodes, making the lymph node study indispensable for tumour staging and choice of treatment. Historically, axillary lymphadenectomy (AL) was the standard procedure for axillary staging. However, in recent decades LA has been replaced by less invasive techniques such as sentinel node selective biopsy (SLNB), which involves the removal of the individual sentinel lymph node (SLN). The LN is the lymph node that directly and firstly receives lymphatic drainage from the tumour lesion, so if the LN does not show metastatic involvement, the rest of the axillary nodes probably also remain disease-free. The probability of preferential spread in non-sentinel nodes is less than 0.1%, so BSGC has replaced LA for SLN staging, reducing the morbidity of the procedure. Essentially, BSGC relies on a periareolar injection of methylene blue during surgery, which can lead to high false negative rates in patients with axillary involvement who have undergone neoadjuvant chemotherapy (NACT) due to the modification of the lymphatic drainage pathways and the reduction in lymph node size. To overcome these limitations, in directed axillary dissection (DAD) a marker is placed in the SLN pre-NACT. There are several techniques for marking the SLN, including the placement of surgical clips, the use of radioactive seeds and SLN tattooing. The latter involves the administration of carbon suspensions in the lymph node tissue, achieving a black pigmentation that facilitates visual detection at the time of surgery. Tattooing with carbon suspensions has demonstrated high identification rates and does not interfere with the pathological evaluation. However, further studies are still needed to ensure the safety of the treatment.

Based on the above, the aim of this Thesis was to develop and experimentally validate a marking method for metastatic SLN in patients with breast cancer previously treated with NAC for SLNB. We started with the hypothesis that the different physicochemical variables of the marking vectors produce a different biological effect in the lymph node. Therefore, we optimized and characterized 6 types of marking vectors for the administration in pig lymph nodes. We used 10 White Landrace pigs for in vivo experimentation; 5 in short-term studies (1-6 weeks) and another 5 in long-term studies (16 weeks). In short-term experimental studies, vectors were inoculated to compare the effect of encapsulating carbon nanoparticles (C-NPs) in polymeric particles (poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA) versus inoculating non-encapsulated C-NPs, the effect of particle concentration in the vector (10 and 20 mg/ml), the effect of CNP encapsulation versus melanin as a coloring element, and the effect of particle size. To study this last variable, C-NPs were encapsulated in nano (CS) and microparticles (CE) of PLGA with sizes around ~100 nm and ~1 µm. In long-term experimental studies, in addition to maintaining these variables, the effect of using another PLGA as carrier having slower degradation and the co-encapsulation of chloroquine (CQ) in addition to C-NPs were studied. PLGA nanoparticles with C-NPs and encapsulated melanin (M) were synthesized by simple (o/w) and double (w/o/w) emulsions, respectively, while PLGA-C-NPs microparticles were obtained by electrospraying.

In this study, a total of 112 lymph nodes were marked in the experimental animals. After various periods of stabilizing, various macroscopic and microscopic variables were studied to compare the different vectors. At the macroscopic level, ease of intraoperative identification and marked area were analyzed, while at the microscopic level, particle localization, cluster size formed by particle aggregates, and intensity of the inflammatory reaction were studied. Macroscopically, the identification rate was 50–100% of the nodes after 16 weeks depending

on the type of particle inoculated. None of the nodes marked with non-encapsulated C-NPs (control) were identified. The percentage of marked area was similar in all markings (10.3 %), except for non-encapsulated C-NPs, which only tattooed 2.5% of the node surface. Microscopically, foreign body inflammatory reaction associated with particle presence appeared in all nodes, characterized by the presence of macrophages and multinucleated giant cells. Occasionally, small necrotic foci were also found, especially in nodes marked with melanin-based vectors. In ultrastructural studies, we found that macrophages phagocytized and isolated the administered particles from the first week after inoculation. After internalization into phagosomes to digest the particles, both C-NPs and fragments of crystallized melanin ruptured the phagosome membrane, spilling lysosomal hydrolases into the cytoplasm and causing cell lysis. Consequently, new macrophages phagocytized the cellular and particle remnants present in the extracellular medium, and so on until the 16 weeks studied. Additionally, we sequentially studied transendothelial migration (TEM) as a mechanism associated with the inflammatory reaction by electron microscopy, where circulating immune cells are recruited to specific regions of the vessels and extravasate to orchestrate an immune response.

In the statistical studies of the variables studied, we found slight positive correlations between the marked area and the extent of inflammation ( $p<0.043$ ), the marked area and the identification rate ( $p<0.001$ ), inflammation and the identification rate ( $p<0.001$ ), and negative correlations between the identification rate and the size of the clusters ( $p<0.044$ ). In addition, time is the factor that most affects the variables studied. Comparing the variables in the short and long-term studies, we found a significant reduction in the marked area ( $p<0.001$ ), ease of identification ( $p<0.001$ ), extent of inflammation ( $p=0.002$ ) and size of the clusters ( $p=0.007$ ) with increasing time. According to the type of labelling (CS, CE and M), differences were found in the extent of inflammation ( $p=0.041$ ), with melanin-loaded particles triggering the highest inflammation, and in the size of the clusters ( $p=0.039$ ), with melanin vectors also forming the largest particle aggregates. Finally, particle size in the tagging vector (CS and CE) only showed statistically significant differences in the extent of inflammation ( $p=0.044$ ), with the smaller particles (CS) producing a greater inflammatory reaction in the long-term studies. PLGA switching in the long-term studies only reported significant differences in the distributions of the cluster size variable for both groups, while CQ coencapsulation appeared to have no effect.

In conclusion, we observed that the encapsulation of C-NPs in a polymeric matrix not only increases the stability of the marking in the lymph node over time (reducing migration and avoiding the marking of secondary nodes), but also reduces the intensity of the inflammatory response and improves the intraoperative identification rate after 4 months. At clinical level, ease of identification and reduction of the inflammatory reaction are the most important variables. Our preliminary results indicate that nanoparticles (CS) generate a greater inflammatory response than microparticles (EC). Although melanin was a priori considered to produce less cytotoxicity as an endogenous pigment, we found that it produces a greater inflammatory reaction and more necrosis in the ganglion tissue, making C-NPs the most suitable candidates. The identification rate was slightly higher in ECs than in CSs. However, identification was similar at both concentrations (20 versus 10 mg/ml), suggesting that this dose of NPs/MPs is sufficient to tattoo lymph nodes in the long term. Therefore, according to these preliminary studies, PLGA microparticle vectors with encapsulated C-NPs inside appear to be the best candidates for GC tattooing, improving the current technique of lymph node tattooing.

# Abreviaturas

<b>AcEt</b>	Acetato de Etilo
<b>AJCC</b>	<i>The American Joint Committee of Cancer</i>
<b>BSGC</b>	Biopsia Selectiva del Ganglio Centinela
<b>CDI</b>	Carcinoma Ductal Infiltrante
<b>CDIS</b>	Carcinoma Ductal <i>In Situ</i>
<b>CIBA</b>	Centro de Investigación Biomédica de Aragón
<b>CIPF</b>	Centro de Investigación Príncipe Felipe
<b>CK19</b>	Citoqueratina 19
<b>C-NPs</b>	Nanopartículas de Carbono
<b>CRC</b>	Células reticulares CXCL12+
<b>CQ</b>	Cloroquina
<b>DAD</b>	Disección Axilar Dirigida
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DLS</b>	Dispersión de Luz Dinámica ( <i>Dynamic Light Scattering</i> )
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DTG</b>	Primera Derivada de la Curva Termogravimétrica
<b>DRC</b>	Células Dendrítico-Reticulares
<b>EGFR</b>	Rec. del Factor del Crecimiento Epidérmico ( <i>Epidermic Growth Factor Receptor</i> )
<b>EKG</b>	Electrocardiograma
<b>EMT</b>	Transición Epitelio-Mesenquimal ( <i>Epithelium-Mesenchymal Transition</i> )
<b>ER</b>	Receptores de Estrógenos
<b>FBS</b>	Suero Fetal Bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FDC</b>	Células Dendríticas Folículares
<b>FRC</b>	Células Reticulares Fibroblásticas
<b>GC</b>	Ganglio Linfático
<b>GLC</b>	Ganglio Linfático Centinela
<b>HER</b>	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano
<b>HEV</b>	Células del Endotelio Alto ( <i>High Endothelial Venules</i> )
<b>HIF</b>	Factor Inducible por Hipoxia ( <i>Hypoxia-Inducible Factor</i> )
<b>IACS</b>	Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud
<b>ICC</b>	Células Intersticiales de Cajal ( <i>Interstitial Cajal Cells</i> )
<b>IFZ</b>	Zona Interfolicular
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>IMC</b>	Índice de Masa Corporal
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina/Eosina
<b>IFRC</b>	Células Reticulares Interfolículares
<b>ITC</b>	Células Tumorales Aisladas ( <i>Isolated Tumour Cells</i> )
<b>LA</b>	Ácido Láctico ( <i>Lactic Acid</i> )
<b>LCI</b>	Carcinoma Lobulillar Infiltrante
<b>LDIS</b>	Carcinoma Lobulillar <i>In Situ</i>
<b>GA</b>	Ácido Glicólico ( <i>Glycolic Acid</i> )
<b>GLOBOCAN</b>	Global Cancer Observatory
<b>LA</b>	Linfadenectomía Axilar
<b>MC</b>	Metilcelulosa
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular
<b>medRC</b>	Células Reticulares de la médula
<b>Mel-NPs</b>	Nanopartículas cargadas de Melanina

<b>MHC</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
<b>MPs</b>	Micropartículas
<b>MTE</b>	Migración Transendotelial
<b>MRC</b>	Célula Reticular Marginal ( <i>Marginal Reticular Cell</i> )
<b>MSC</b>	Célula Madre Mesenquimal ( <i>Mesenchymal Stem Cell</i> )
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>NET</b>	Trampas Extracelulares de Neutrófilos
<b>NIR</b>	Infrarrojo Cercano ( <i>Near Infra-Red</i> )
<b>NK</b>	(Células) Asesinas Naturales ( <i>Natural Killer</i> )
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OSNA</b>	<i>One-Step Nucleid Acid Amplification</i>
<b>PAMAM</b>	Poliamidoamina amino-terminal
<b>PB</b>	Tampón Fosfatado Salino ( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )
<b>PBS</b>	Tampón Fosfatado ( <i>Phosphated Buffer</i> )
<b>PC</b>	Pericito
<b>PDI</b>	Índice de Polidispersión ( <i>Polidispersity Index</i> )
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PLGA</b>	Ácido (poli(láctico-co-glicólico)
<b>PvC:</b>	Células Perivasculares
<b>PR</b>	Receptores de Progesterona
<b>Qdots</b>	<i>Quantum Dots</i>
<b>QTNA</b>	Quimioterapia Neoadyuvante
<b>RER</b>	Retículo Endoplasmático Rugoso
<b>RM</b>	Resonancia Magnética
<b>ROS</b>	Especies Reactivas del Oxígeno ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>RT-LAMP</b>	Amplificación Isotérmica mediada por Bucle de Transcripción Inversa
<b>SEM</b>	Microscopía Electrónica de Barrido ( <i>Scanning Electron Microscopy</i> )
<b>SPECT</b>	Tomografía por Emisión de Fotón Único ( <i>Single Photon Em. Comp. Tomography</i> )
<b>TEM</b>	Microscopía Electrónica de Transmisión ( <i>Transmission Electron Microscopy</i> )
<b>TBRC</b>	Células Dendríticas Reticulares de la Corteza
<b>TC</b>	Tomografía Computarizada
<b>TCZ</b>	Zona de Células (Linfocitos) T
<b>TG</b>	Termogravimétrico
<b>TGA</b>	Análisis Termogravimétrico
<b>TNBC</b>	Tumor de Mama Triple Negativo ( <i>Triple Negative Breast Cancer</i> )
<b>TRC</b>	Células Reticulares de zonas de linfocitos T
<b>TNM</b>	Tumor, Ganglio y Metástasis ( <i>Tumor, Node, Metastasis</i> )
<b>o/w</b>	Aceite-en-agua ( <i>Oil-in-Water</i> )
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-Visible (en espectrofotometría)
<b>VEGF</b>	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular ( <i>Vascular End. Growth Factor</i> )
<b>VVO</b>	Orgánulos vesiculo-vacuolares ( <i>Vesicle-Vacuolar Organelles</i> )
<b>w/o/w</b>	Agua-en-aceite-en-agua ( <i>Water-in-Oil-in-Water</i> )



# Tabla de contenidos

<b>Capítulo 1. Antecedentes</b>	<b>28</b>
<b>1.1. Cáncer de mama y metástasis ganglionar</b>	<b>29</b>
1.1.1. Epidemiología del cáncer de mama	29
1.1.2. Etiopatogenia del cáncer de mama	29
1.1.3. Clasificación histológica	30
1.1.3.1. Carcinomas <i>in situ</i>	30
1.1.3.2. Carcinomas infiltrantes	30
1.1.4. Clasificación molecular	31
1.1.4.1. Luminales	32
1.1.4.2. HER2+	32
1.1.4.3. Triple negativo o «basal-like»	32
1.1.5. Estadificación TNM	32
1.1.6. Factores pronósticos	34
1.1.6.1. Tamaño tumoral	34
1.1.6.2. Infiltración linfovascular	34
1.1.6.3. Afectación ganglionar axilar	35
1.1.7. Manejo clínico	35
1.1.7.1. Tratamiento sistémico neoadyuvante	35
1.1.7.2. Cirugía de la mama	36
1.1.8. Metástasis en cáncer de mama y estadiaje ganglionar	37
1.1.8.1. Metástasis ganglionar	37
1.1.9. Técnicas quirúrgicas de estadiaje ganglionar	38
1.1.9.1. Linfadenectomía axilar (LA)	39
1.1.9.2. Biopsia Selectiva del Ganglio Centinela (BSGC)	39
1.1.9.3. Disección Axilar Dirigida (DAD)	40
<b>1.2. Histología y fisiología de los ganglios linfáticos</b>	<b>41</b>
1.2.1. Función y estructura del sistema linfático	41
1.2.2. Anatomía de las cadenas ganglionares mamarias	42
1.2.3. Estructura y función del ganglio linfático	43
1.2.4. Tipos celulares en el ganglio linfático	47
1.2.4.1. Linfocitos y células plasmáticas	47
1.2.4.2. Células del estroma	47
1.2.4.3. Células accesorias	50
<b>1.3. Técnicas de marcaje del ganglio centinela</b>	<b>51</b>
1.3.1. Técnicas de marcaje ganglionar para la BSGC	51
1.3.1.1. Radiocoloides	51
1.3.1.2. Colorantes	52
1.3.1.3. Trazadores superparamagnéticos	52
1.3.1.4. Contraste con microburbujas	53
1.3.1.5. Quantum dots	53
1.3.1.6. Dendrímeros de Gd	54
1.3.1.7. Marcajes duales	54
1.3.2. Técnicas de marcaje ganglionar para la DAD	55
1.3.2.1. Alambres y clips quirúrgicos	55
1.3.2.2. Semillas radioactivas	55
1.3.2.3. Semillas magnéticas	55
1.3.2.4. Radar reflector	55
1.3.2.5. Tatuaje de carbono	56

<b>1.4. Nanopartícula dirigidas al ganglio linfático</b>	<b>59</b>
1.4.1. Nanopartículas en biomedicina	59
1.4.2. Sistemas nanoestructurados dirigidos al ganglio linfático	60
1.4.3. Biodistribución y captación linfática de las nanopartículas	60
1.4.3.1. Tamaño	60
1.4.3.2. Concentración	61
1.4.3.3. Características superficiales	61
1.4.3.4. Peso molecular	61
1.4.3.5. Hidrofobicidad	61
1.4.4. Interacción entre el sistema inmunitario y las nanopartículas	61
1.4.4.1. Captación y eliminación de nanopartículas por fagocitosis	61
1.4.4.2. Efectos citotóxicos tras la internalización de las nanopartículas	62
1.4.4.3. Efectos de la residencia a largo plazo de nanopartículas no degradables	62
<b>Capítulo 2. Justificación y objetivos</b>	<b>64</b>
2.1. Justificación y enfoque del trabajo	65
2.2. Objetivos generales y específicos	65
<b>Capítulo 3. Materiales y métodos</b>	<b>68</b>
<b>3.1. Materiales y métodos para la síntesis de nano y micro-partículas</b>	<b>69</b>
3.1.1. Materiales	69
3.1.1.1. Ácido polí(láctico-co-glicólico) (PLGA)	69
3.1.1.2. Nanopartículas de carbono (C-NPs)	69
3.1.1.3. Melanina	70
3.1.1.4. Cloroquina	70
3.1.1.5. Surfactantes y disolventes	71
3.1.2. Métodos	71
3.1.2.1. Encapsulación de C-NPs por emulsión simple	71
3.1.2.2. Encapsulación de melanina por emulsión doble	72
3.1.2.3. Coencapsulación de C-NPs y CQ por emulsión simple	72
3.1.2.4. Encapsulación de C-NPs y CQ por electrosprayado	72
3.1.2.5. Caracterización morfológica por microscopía electrónica de barrido	73
3.1.2.6. Caracterización morfológica por microscopía electrónica de transmisión	73
3.1.2.7. Determinación del diámetro hidrodinámico por dispersión de luz dinámica	73
3.1.2.8. Cuantificación de C-NPs encapsuladas por termogravimetría	73
3.1.2.9. Cuantificación indirecta de la melanina encapsulada por UV-Vis	74
3.1.2.10. Determinación de la concentración coloidal final	74
3.1.2.11. Determinación del índice de polidispersión de los coloides	74
3.1.2.12. Ensayos de liberación <i>in vitro</i> de C-NPs, melanina y CQ	74
3.1.2.13. Ensayos de viabilidad celular	74
<b>3.2. Materiales y métodos para la preparación de los vectores particulados</b>	<b>75</b>
3.2.1. Materiales	75
3.2.1.1. Metilcelulosa	75
3.2.1.2. Polietilenglicol	75
3.2.3. Métodos	75
3.2.3.1. Preparación del medio de metilcelulosa	75
3.2.3.2. Preparación del medio de polietilenglicol	75
3.2.3.3. Preparación y esterilización de los vectores particulados	75
3.2.3.4. Evaluación <i>in vitro</i> de la estabilidad de los vectores	75
3.2.3. Nomenclatura y justificación de los vectores desarrollados	76

<b>3.3. Estudios experimentales <i>in vivo</i></b>	<b>77</b>
3.3.1. Animales	77
3.3.2. Metodología	77
3.3.2.1. Diseño experimental	77
3.3.2.2. Aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal	77
3.3.2.3. Procedimientos de estabilización de los animales	77
3.3.2.4. Procedimientos anestésicos	77
3.3.2.5. Procedimientos quirúrgicos	78
3.3.2.6. Sacrificio de los animales	78
3.3.3. Variables macroscópicas	78
3.3.3.1. Facilidad de identificación	78
3.3.3.2. Área marcada	79
<b>3.4. Estudios histopatológicos y de microscopía electrónica</b>	<b>79</b>
3.4.1. Microscopía óptica	79
3.4.2. Microscopía electrónica de transmisión	79
3.4.3. Variables microscópicas	80
3.4.3.1. Localización de las partículas	80
3.4.3.2. Tamaño de los cúmulos	80
3.4.3.3. Extensión de la reacción inflamatoria	80
<b>3.5. Estudio estadístico</b>	<b>81</b>
<b>Capítulo 4. Resultados</b>	<b>83</b>
<b>4.1. Síntesis y caracterización de los vectores de marcaje</b>	<b>84</b>
4.1.1. Encapsulación de C-NPs en nanopartículas por emulsión simple	84
4.1.1.1. Optimización de la concentración de polímero en la síntesis de NPs	84
4.1.1.2. Optimización de la concentración de C-NPs en la síntesis de NPs	85
4.1.1.3. Caracterización morfológica de las NPs cargadas de C-NPs	86
4.1.1.4. Determinación de la eficiencia en la encapsulación de C-NPs en NPs	87
4.1.1.5. Perfil de liberación <i>in vitro</i> de C-NPs de las NPs	88
4.1.1.6. Ensayos de viabilidad celular de NPs cargadas con C-NPs	89
4.1.2. Coencapsulación de C-NPs y CQ en nanopartículas por emulsión simple	90
4.1.2.1. Coencapsulación de C-NPs y CQ en NPs por emulsión simple	90
4.1.2.2. Determinación de la eficiencia en la encapsulación de CQ en las NPs	90
4.1.2.3. Perfil de liberación <i>in vitro</i> de CQ de las NPs	92
4.1.2.4. Ensayos de viabilidad celular de NPs cargadas con CQ	92
4.1.3. Encapsulación de melanina en nanopartículas por emulsión doble	93
4.1.3.1. Optimización de la concentración de melanina encapsulada en NPs	93
4.1.3.2. Caracterización morfológica de las NPs cargadas de melanina	94
4.1.3.3. Determinación de la eficiencia en la encapsulación de melanina en las NPs	95
4.1.3.4. Perfil de liberación <i>in vitro</i> de melanina de las NPs	95
4.1.3.5. Ensayos de viabilidad celular	96
4.1.4. Encapsulación de C-NPs en micropartículas por <i>electrosprayado</i>	96
4.1.4.1. Optimización de los polímeros y reactivos utilizados	96
4.1.4.2. Optimización de la síntesis de MPs por <i>electrosprayado</i> con DCM y DMF	97
4.1.4.3. Optimización de la síntesis de MPs por <i>electrosprayado</i> con CHCl <sub>3</sub>	100
4.1.4.4. Efecto del Tween en la síntesis de MPs cargadas de C-NPs	102
4.1.4.5. Efecto del cambio de polímero en la síntesis de MPs por <i>electrosprayado</i>	102
4.1.4.6. Coencapsulación de C-NPs y CQ en MPs	103
4.1.4.7. Caracterización morfológica de las MPs cargadas de C-NPs	103
4.1.4.8. Determinación de la eficiencia en la encapsulación de C-NPs en MPs	104
4.1.4.9. Perfil de liberación <i>in vitro</i> de C-NPs de las MPs	105

4.1.4.10. Ensayos de viabilidad celular de las MPs cargadas con C-NPs	105
4.1.5. Preparación de los vectores nano y micro-particulados	106
4.1.5.1. Optimización de los vectores basados en medios de PEG y MC	107
<b>4.2. Estudio histológico y ultraestructural del ganglio linfático porcino</b>	<b>107</b>
<b>4.3. Evaluación de los vectores de marcaje en animal de experimentación</b>	<b>117</b>
4.3.1. Desarrollo de los estudios experimentales <i>in vivo</i>	117
4.3.1.1. Procedimiento quirúrgico para la administración de los vectores	117
4.3.1.2. Procedimiento quirúrgico para la disección ganglionar	119
4.3.2. Relación de vectores y ganglios linfáticos administrados	119
4.3.3. Tasa de identificación y facilidad de identificación intraoperatoria	121
4.3.3.1. Efecto del tipo del marcaje en la facilidad de identificación	121
4.3.3.2. Efecto del tiempo en la facilidad de identificación	122
4.3.3.3. Efecto de la concentración en la facilidad de identificación	123
4.3.3.4. Efecto del tamaño de partícula en la facilidad de identificación	123
4.3.3.5. Efecto del cambio de polímero en la facilidad de identificación	123
4.3.3.6. Efecto de la coencapsulación de CQ en la facilidad de identificación	123
4.3.3.7. Efecto del cambio de polímero y de adición de CQ en la facilidad de identificación	124
4.3.3.8. Correlación de la variable de facilidad de identificación con otras variables	124
4.3.4. Determinación del área marcada	125
4.3.4.1. Efecto del tipo del marcaje en el área ganglionar marcada	125
4.3.4.2. Efecto del tiempo en el área ganglionar marcada	125
4.3.4.3. Efecto de la concentración en el área ganglionar marcada	126
4.3.4.4. Efecto del tamaño de partícula en el área ganglionar marcada	126
4.3.4.5. Efecto del cambio de polímero en el área ganglionar marcada	126
4.3.4.6. Efecto de la coencapsulación de CQ en el área ganglionar marcada	126
4.3.4.7. Efecto del cambio de polímero y de adición de CQ en el área ganglionar marcada	127
4.3.4.8. Correlación de la variable de área marcada con otras variables	127
<b>4.4. Valoración histopatológica</b>	<b>127</b>
4.4.1. Hallazgos histopatológicos	127
4.4.2. Localización de las partículas	128
4.4.2.1. Efecto del tipo del marcaje en la localización de las partículas	130
4.4.2.2. Efecto del tiempo en la localización de las partículas	130
4.4.2.3. Efecto de la concentración en la localización de las partículas	132
4.4.2.4. Efecto del tamaño de partícula en la localización de las partículas	132
4.4.2.5. Efecto del cambio de polímero en la localización de las partículas	132
4.4.2.6. Efecto de la coencapsulación de CQ en la localización de las partículas	132
4.4.2.7. Efecto del cambio de polímero y de la coencapsulación de CQ en la localización de las partículas	132
4.4.2.8. Correlación de la variable de la localización de las partículas y el resto de las variables	132
4.4.3. Morfometría de los cúmulos de partículas	133
4.4.3.1. Efecto del tipo del marcaje en el tamaño de los cúmulos	134
4.4.3.2. Efecto del tiempo en el tamaño de los cúmulos	134
4.4.3.3. Efecto de la concentración en el tamaño de los cúmulos	135
4.4.3.4. Efecto del tamaño de las partículas en el tamaño de los cúmulos	135
4.4.3.5. Efecto del cambio de polímero en el tamaño de los cúmulos	135
4.4.3.6. Efecto de la coencapsulación de CQ en el tamaño de los cúmulos	135
4.4.3.7. Efecto del cambio de polímero y de la coencapsulación de CQ en el tamaño de los cúmulos	135
4.4.3.8. Correlación de la variable de tamaño de los cúmulos con otras variables	135
4.4.4. Extensión de la reacción inflamatoria	136

4.4.4.1. Efecto del tipo de marcaje en la extensión de la reacción inflamatoria	136
4.4.4.2. Efecto del tiempo en la extensión de la reacción inflamatoria	136
4.4.4.3. Efecto de la concentración en la extensión de la reacción inflamatoria	137
4.4.4.4. Efecto del tamaño de partícula en la extensión de la reacción inflamatoria	137
4.4.4.5. Efecto del cambio de polímero en la extensión de la reacción inflamatoria	137
4.4.4.6. Efecto de la coencapsulación de CQ en la extensión de la reacción inflamatoria	137
4.4.4.7. Efecto del cambio de polímero y de la coencapsulación de CQ en la extensión de la reacción inflamatoria	137
4.4.4.8. Correlación de la variable de extensión de la inflamación con otras variables	138
<b>4.5. Estudio ultraestructural</b>	<b>139</b>
4.5.1. Fagocitosis de las partículas y efectos en los macrófagos	139
4.5.2. Reclutamiento de células inmunitarias circulantes para enfrentar la inflamación	148
<b>Capítulo 5. Discusión</b>	<b>158</b>
<b>Capítulo 6. Conclusiones</b>	<b>165</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>168</b>
<b>Anexo 1: Artículos publicados</b>	<b>183</b>
Artículo 1. "Synthetized Carbon-based Nano and Microparticles for Sentinel Lymph Node Tattooing. Experimental, Histopathological and Ultrastructural Study".	184
Artículo 2. "Melanin-based Nanoparticles for Lymph Node Tattooing: Experimental, Histopathological and Ultrastructural Study".	212
<b>Anexo 2: Pósters presentados en congresos</b>	<b>229</b>
Póster 1. "Carbon-based Nanoparticles for Sentinel Node Labeling: Ultrastructural Study".	230
Póster 2. "Carbon and Melanin-based Nanoparticles for lymph node labeling".	232

# Índice de Figuras

<b>Figura 1.1.</b>	Metástasis ganglionar de células tumorales aisladas detectada por inmunohistoquímica de citoqueratina (CK) AE1/3.	38
<b>Figura 1.2.</b>	Anatomía de los ganglios linfáticos mamarios.	42
<b>Figura 1.3.</b>	Estructura del ganglio linfático humano (sección medial sagital).	43
<b>Figura 1.4.</b>	Región de la corteza y de la paracorteza del ganglio linfático humano.	45
<b>Figura 1.5.</b>	Región medular del ganglio linfático humano.	46
<b>Figura 1.6.</b>	Origen de las líneas hematopoyéticas de la estirpe mieloide y linfoide.	47
<b>Figura 1.7.</b>	Distribución de las células estromales del ganglio linfático.	48
<b>Figura 1.8.</b>	Diagrama esquemático de los pasos de la fagocitosis mediada por el receptor Fc.	62
<b>Figura 3.1.</b>	Micrografías electrónicas de las C-NPs dispersas en acetato de etilo.	69
<b>Figura 3.2.</b>	Estructura química de la CQ.	70
<b>Figura 3.3.</b>	Micrografías electrónicas de barrido de la melanina cristalizada.	70
<b>Figura 3.4.</b>	Breve esquema del efecto de la cloroquina en la polarización de macrófagos.	70
<b>Figura 3.5.</b>	Representación esquemática del proceso de síntesis por emulsión simple de las nanopartículas de PLGA con C-NPs encapsuladas.	71
<b>Figura 3.6.</b>	Representación esquemática del proceso de síntesis por emulsión doble de las nanopartículas de PLGA con melanina encapsulada.	72
<b>Figura 3.7.</b>	Esquema simplificado de un <i>electrospinner</i> .	73
<b>Figura 3.8.</b>	Estructura química de la metilcelulosa.	75
<b>Figura 3.9.</b>	Estructura química del polietilenglicol.	75
<b>Figura 3.10.</b>	Esquema de los grupos de animales de experimentación utilizados.	77
<b>Figura 3.11.</b>	Escala de facilidad en la identificación intraoperatoria de los ganglios linfáticos.	78
<b>Figura 3.12.</b>	Esquema del método de cuantificación de tejido ganglionar marcado.	79
<b>Figura 3.13.</b>	Clasificación de la localización predominante de las partículas en el ganglio linfático.	80
<b>Figura 4.1.</b>	Micrografías SEM de las nanopartículas de PLGA obtenidas durante la optimización de la concentración de polímero. Las imágenes se acompañan de sus respectivos histogramas de distribución de diámetros.	84
<b>Figura 4.2.</b>	Efecto de la concentración de PLGA RG504H y RG858S en el tamaño de partícula medido mediante DLS.	85
<b>Figura 4.3.</b>	Morfología de las nanopartículas de PLGA con carbono encapsulado durante la optimización de la síntesis al SEM con sus respectivos histogramas de distribución de diámetros, donde se aprecia la emulsión utilizando 0.1, 0.2, 0.5 y 1.0 mg/l de C-NPs.	85
<b>Figura 4.4.</b>	Síntesis de nanopartículas con C-NPs encapsuladas a diferentes concentraciones (0, 0.1, 0.2, 0.5 y 1 mg/ml).	86
<b>Figura 4.5.</b>	Micrografías TEM de la encapsulación de C-NPs en PLGA RG504H.	86
<b>Figura 4.6.</b>	Micrografías SEM de las NPs cargadas de C-NPs tras la optimización.	87
<b>Figura 4.7.</b>	Curvas TG y DTG de las NPs con C-NPs encapsuladas en PLGA RG504H.	87
<b>Figura 4.8.</b>	Curvas TG y DTG de las NPs con C-NPs encapsuladas PLGA RG858S.	88
<b>Figura 4.9.</b>	Curva UV-Vis y recta de calibrado de las C-NPs.	88
<b>Figura 4.10.</b>	Curvas de la liberación de C-NPs de las NPs de PLGA RG504H y PLGA RG858S.	89
<b>Figura 4.11.</b>	Viabilidad celular en las líneas MDA-MB-231, fibroblastos y macrófagos (J774) tras 24 h de incubación con NPs cargadas de C-NPs y C-NPs libres sin encapsular en PLGA.	89
<b>Figura 4.12.</b>	Morfología de las NPs que coencapsulan con C-NPs y CQ vistas al SEM con sus respectivos histogramas de distribución de diámetros.	90
<b>Figura 4.13.</b>	Curvas TG y DTG de las NPs con CQ o CQ y C-NPs encapsuladas en PLGA RG504H y PLGA RG858S (CQ-PLGA RG504H/CQ-PLGA RG858S y CS-CQ-PLGA RG504H/CS-CQ-PLGA RG858S, respectivamente), incluyendo las curvas de los materiales utilizados en la síntesis por separado.	91
<b>Figura 4.14.</b>	Curva UV-Vis y recta de calibrado de la cloroquina.	92
<b>Figura 4.15.</b>	Curvas de la liberación de CQ de las NPs de (a) PLGA RG504H y (b) PLGA RG858S.	92
<b>Figura 4.16.</b>	Viabilidad celular en las líneas MDA-MB-231, fibroblastos y macrófagos (J774) tras 24 h de incubación con NPs cargadas de CQ y PLGA.	93
<b>Figura 4.17.</b>	Morfología de las nanopartículas de PLGA con melanina encapsulada durante la optimización de la síntesis al SEM con sus respectivos histogramas de distribución de diámetros, donde se aprecia la emulsión utilizando 0.15, 0.3, 0.5 y 1.0 mg/l de melanina.	93
<b>Figura 4.18.</b>	Micrografías TEM de la encapsulación de melanina en NPs de PLGA RG504H.	94
<b>Figura 4.19.</b>	Micrografías SEM de las Mel-NPs optimizadas, donde se aprecian residuos de melanina no encapsulados y a menudo cristalizados.	94

<b>Figura 4.20.</b> Curvas TG y DTG de las NPs de PLGA RG504H con melanina encapsulada.	95
<b>Figura 4.21.</b> Curva UV-Vis y recta de calibrado de la melanina.	95
<b>Figura 4.22.</b> Curva de la cinética de liberación de la melanina de las NPs de PLGA RG504H.	96
<b>Figura 4.23.</b> Viabilidad celular en las líneas MDA-MB-231, fibroblastos y macrófagos (J774) tras 24 h de incubación con Mel-NPs.	96
<b>Figura 4.24.</b> Micrografías SEM de las MPs de PLGA obtenidas por electrosprayado utilizando DCM y DMF como disolventes.	97
<b>Figura 4.25.</b> Micrografías SEM de las MPs de PLGA obtenidas por electrosprayado utilizando DCM y DMF (9:1).	97
<b>Figura 4.26.</b> Micrografías SEM de las MPs de PLGA obtenidas por electrosprayado utilizando DCM y DMF (4:1).	98
<b>Figura 4.27.</b> Micrografías SEM de las MPs de PLGA obtenidas por electrosprayado utilizando DCM y DMF (4:1) y (1:1) aumentando la concentración de PLGA a 15%(p/v).	98
<b>Figura 4.28.</b> Micrografías SEM de las MPs cargadas de C-NPs utilizando DCM y DMF.	99
<b>Figura 4.29.</b> Micrografías SEM de las MPs cargadas de C-NPs añadiendo DCM:DMF (9:1) en proporción 1:1 y 4:2.	100
<b>Figura 4.30.</b> Micrografías SEM de las MPs cargadas de C-NPs añadiendo con la técnica coaxial para separar la fase de disolución de C-NPs en AcEt a 1 mg/ml y la fase de DCM:DMF (9:1) con 15%(p/v) PLGA a unos flujos de 1-1 ml/h, 3-1 ml/h y 5-1 ml/h.	100
<b>Figura 4.31.</b> Micrografías SEM de las MPs cargadas de C-NPs utilizando disoluciones de DCM y CHCl <sub>3</sub> .	101
<b>Figura 4.32.</b> Micrografías SEM de las MPs cargadas de C-NPs utilizando 5%(p/v) de PLGA y 5 mg/ml de C-NPs en una disolución de DMC:CHCl <sub>3</sub> (4:1) con 10 mg/ml de Tween, h=15 cm y el flujo modificado a 0.25, 0.5 y 1.0 ml/h.	101
<b>Figura 4.33.</b> Micrografías SEM comparativas entre CMPs de PLGA RG504H producidas con y sin surfactante Tween 80 en la disolución.	102
<b>Figura 4.34.</b> Muestras de CMPs obtenidas con PLGA RG858S y RG504H. Con el polímero 858S la coloración macroscópica es menos intensa que con el PLGA RG504H.	102
<b>Figura 4.35.</b> Micrografías SEM de la coencapsulación de CQ y C-NPs en MPs de PLGA RG 504S utilizando diferentes velocidades de flujo para la fase acuosa con cloroquina y la fase orgánica con PLGA, Tween y C-NPs.	103
<b>Figura 4.36.</b> Micrografías SEM y TEM, distribución de tamaños y vista macroscópica de las MPs cargadas de C-NPs obtenidas por electrosprayado.	104
<b>Figura 4.37.</b> Curvas TG y DTG de las MPs de PLGA RG504H con C-NPs encapsuladas obtenidas por electrosprayado.	104
<b>Figura 4.38.</b> Curva de la cinética de liberación de las C-NPs de las MPs de PLGA RG504H.	105
<b>Figura 4.39.</b> Viabilidad celular en las líneas MDA-MB-231, fibroblastos y macrófagos (J774) tras la administración de MPs cargadas con C-NPs.	105
<b>Figura 4.40.</b> Vectores de MC 1.5%(p/v) con 20 y 40 mg/ml MPs cargadas de C-NPs, 20 y 40 mg/ml de NPs cargadas de C-NPs, 20 y 40 mg/ml de Mel-NPs inyectados en tejido adiposo de porcino.	106
<b>Figura 4.41.</b> Muestras de tejido disecadas y suspendidas en PBS.	107
<b>Figura 4.42.</b> Panorámica de un ganglio mesentérico de cerdo. H&E.	108
<b>Figura 4.43.</b> Distribución cortical y medular del ganglio linfático porcino.	108
<b>Figura 4.44.</b> Linfocitos densamente empaquetados en la región de la corteza ganglionar.	109
<b>Figura 4.45.</b> Células estromales del ganglio linfático.	110
<b>Figura 4.46.</b> Región medular del ganglio linfático (H&E).	111
<b>Figura 4.47.</b> Región medular del ganglio linfático (micrografía electrónica de transmisión).	111
<b>Figura 4.48.</b> Linfocitos en parénquima ganglionar.	112
<b>Figura 4.49.</b> Contactos entre diferentes tipos celulares en la región medular.	112
<b>Figura 4.50.</b> Células plasmáticas del ganglio linfático.	112
<b>Figura 4.51.</b> Macrófagos y monocitos del ganglio linfático.	113
<b>Figura 4.52.</b> Eosinófilos y neutrófilos del ganglio linfático.	114
<b>Figura 4.53.</b> Cápsula del ganglio linfático porcino (tejido conjuntivo denso), ubicada entre la región medular y el tejido adyacente al ganglio.	115
<b>Figura 4.54.</b> Fibroblastos y haces de colágeno en la cápsula del ganglio linfático.	115
<b>Figura 4.55.</b> Detalle de una célula mesenquimal en la región capsular rodeada de haces de colágeno.	116
<b>Figura 4.56.</b> Vasos sanguíneos y linfáticos.	116
<b>Figura 4.57.</b> Pericitos en un capilar del ganglio linfático.	117

<b>Figura 4.58.</b> Procedimiento quirúrgico paso a paso para la administración de los vectores de marcaje en los animales de experimentación.	118
<b>Figura 4.59.</b> Procedimiento quirúrgico paso a paso para la disección ganglionar en los animales de experimentación.	119
<b>Figura 4.60.</b> Fotografías de ganglios linfáticos marcados con vectores CS10, CS20, M10, M20, CE10, CE20 y control (C-NPs).	120
<b>Figura 4.61.</b> Fotografías de ganglios linfáticos marcados con vectores CS10, CS20, CS20-P858, CS10-P858, CS10-CQ, CS20-CQ, CS10-P858-CQ y CS20-P858-CQ.	121
<b>Figura 4.62.</b> Tasas de identificación y facilidad de identificación de los ganglios en función del tipo de marcaje administrado.	122
<b>Figura 4.63.</b> Tasas de identificación (a) y facilidad de identificación (b) de los ganglios marcados con CS20, CE20, M20 y C-NPs (control) en función del tiempo.	122
<b>Figura 4.64.</b> Tasas de identificación y facilidad de identificación de los ganglios marcados en función de la concentración de partículas del vector de marcaje.	123
<b>Figura 4.65.</b> Tasas de identificación y facilidad de identificación de los ganglios marcados en función del tamaño de las partículas del vector de marcaje, del polímero utilizado en la síntesis, de la coencapsulación de CQ y del polímero utilizado en la síntesis y la coencapsulación de CQ.	124
<b>Figura 4.66.</b> Área marcada promedio en los ganglios linfáticos en función del tipo de marcaje administrado.	125
<b>Figura 4.67.</b> Área marcada promedio en los ganglios linfáticos en función del tiempo.	125
<b>Figura 4.68.</b> Área marcada promedio en los ganglios linfáticos en función del tiempo.	126
<b>Figura 4.69.</b> Área marcada promedio en los ganglios linfáticos en función del tamaño de las partículas, del polímero utilizado en la síntesis, de la coencapsulación de CQ y de la coencapsulación de CQ y el cambio de polímero.	126
<b>Figura 4.70.</b> Células gigantes multinucleadas (CGM) en el del ganglio linfático aislando NPs del vector CS20.	127
<b>Figura 4.71.</b> Focos necróticos asociados a la reacción inflamatoria de tipo cuerpo extraño en el ganglio en ganglios tatuados con el vector M20.	128
<b>Figura 4.72.</b> Localizaciones de las C-NPs en los vectores de control.	128
<b>Figura 4.73.</b> Localizaciones de las partículas de los vectores CS20, CS10, CE20 y CE10.	129
<b>Figura 4.74.</b> Localizaciones de las partículas de los vectores M20, M10, CS20-P858 y CS10-P858.	129
<b>Figura 4.75.</b> Localizaciones de las partículas de los vectores CS20-CQ, CS10-CQ, CS20-P858-CQ y CS10-P858-CQ.	130
<b>Figura 4.76.</b> Localización de las partículas en los ganglios linfáticos en función del tiempo.	130
<b>Figura 4.77.</b> Porcentaje de ganglios linfáticos con diferentes localizaciones de las partículas en los vectores utilizados.	131
<b>Figura 4.78.</b> Localización de las partículas en los ganglios linfáticos en función de la concentración de partículas.	131
<b>Figura 4.79.</b> Localización de las partículas en los ganglios linfáticos en función del tamaño de las partículas, del polímero utilizado en la síntesis, de la coencapsulación de CQ y de la coencapsulación de CQ y el cambio de polímero.	132
<b>Figura 4.80.</b> Morfometría de los cúmulos de partículas.	133
<b>Figura 4.81.</b> Tamaño de los cúmulos de partículas en los ganglios en función del tipo de marcaje.	133
<b>Figura 4.82.</b> Tamaño de los cúmulos de partículas en los ganglios en función del tiempo.	134
<b>Figura 4.83.</b> Tamaño de los cúmulos de partículas en los ganglios en función de la concentración.	134
<b>Figura 4.84.</b> Tamaño de los cúmulos de partículas en los ganglios en función del tamaño de las partículas, del polímero utilizado en la síntesis, de la coencapsulación de CQ y de la coencapsulación de CQ y el cambio de polímero.	135
<b>Figura 4.85.</b> Extensión de la reacción inflamatoria en función del tipo de marcaje.	136
<b>Figura 4.86.</b> Extensión del tejido inflamatorio en función del tiempo en los ganglios marcados con los vectores CS20, CE20, M20 y C-NPs (control).	136
<b>Figura 4.87.</b> Extensión de la reacción inflamatoria en los estudios experimentales a corto y largo plazo en ganglios tratados con CS20, CE20, M20 y C-NPs (control).	137
<b>Figura 4.88.</b> Extensión del tejido inflamatorio en función de la concentración de partículas.	138
<b>Figura 4.89.</b> Extensión del tejido inflamatorio en función del tamaño de las partículas, del polímero utilizado en la síntesis, de la coencapsulación de CQ y de la coencapsulación de CQ y el cambio de polímero.	139

<b>Figura 4.90.</b>	Macrófagos con numerosos lamelipodios y filopodios para la fagocitosis de las partículas.	140
<b>Figura 4.91.</b>	Partículas C-NPs, CS, CE y M en el interior de los fagosomas de los macrófagos en las muestras de ganglios de los estudios experimentales a corto plazo.	141
<b>Figura 4.92.</b>	Dos fagosomas con partículas en su interior se fusionan con un fagosoma de mayor tamaño y liberan las partículas en su interior.	142
<b>Figura 4.93.</b>	Detalle de la membrana de un fagolisosoma rota por el contacto con las C-NPs.	142
<b>Figura 4.94.</b>	Detalle de fagolisosoma con melanina cristalizada en su interior y un macrófago con las membranas de los fagolisosomas rotas por el contacto con las aristas de la melanina cristalizada.	143
<b>Figura 4.95.</b>	Lisis de la membrana plasmática y derrame de orgánulos al espacio extracelular.	143
<b>Figura 4.96.</b>	Macrófagos fagocitando restos celulares de macrófagos lisados.	144
<b>Figura 4.97.</b>	C-NPs aisladas en células gigantes multinucleadas.	145
<b>Figura 4.98.</b>	Partículas CS, CE y M fagocitadas en estudios experimentales a largo plazo.	146
<b>Figura 4.99.</b>	Partículas C -NPs liberadas de las NPs en los estudios a largo plazo.	146
<b>Figura 4.100.</b>	Partículas CS-P858, CS-CQ y CS-P858-CQ en fagosomas en los estudios experimentales a largo plazo.	147
<b>Figura 4.101.</b>	Macrófagos cargados de C-NPs en los estudios experimentales a largo plazo.	147
<b>Figura 4.102.</b>	Linfocitos circulantes establecen contacto con el endotelio.	148
<b>Figura 4.103.</b>	Linfocito con morfología aplanada, para aumentar los puntos de contacto con el endotelio, establece uniones con las células endoteliales.	149
<b>Figura 4.104.</b>	Las células endoteliales emiten prolongaciones citoplasmáticas para englobar una célula inmune en la copa transmigratoria.	150
<b>Figura 4.105.</b>	Formación de copas transmigratorias y domos endoteliales.	151
<b>Figura 4.106.</b>	Formación de cúpulas endoteliales y proyección de podosomas.	152
<b>Figura 4.107.</b>	Apertura de las células endoteliales para la salida de los linfocitos.	153
<b>Figura 4.108.</b>	Los linfocitos adaptan su morfología para facilitar la extravasación.	154
<b>Figura 4.109.</b>	Migración transcelular de neutrófilos y mastocitos.	154

# Índice de Tablas

<b>Tabla 1.1.</b>	Clasificación molecular del cáncer de mama.	31
<b>Tabla 1.2.</b>	Clasificación TNM: T (tumor primario).	32
<b>Tabla 1.3.</b>	Clasificación TNM: N (estado ganglionar).	33
<b>Tabla 1.4.</b>	Clasificación TNM: M (metástasis).	33
<b>Tabla 1.5.</b>	Clasificación TNM por estadios.	33
<b>Tabla 1.6.</b>	Clasificación TNM: pN (estado ganglionar patológico).	34
<b>Tabla 1.7.</b>	Tipos de mastectomía y la extirpación que conllevan.	37
<b>Tabla 1.8.</b>	Localización, marcadores, factores secretados y función del subconjunto de células estromales FRC.	48
<b>Tabla 1.9.</b>	Localización, marcadores, factores secretados y función del subconjunto de células estromales BRC.	49
<b>Tabla 1.10</b>	Localización, marcadores, factores secretados y función del subconjunto de células estromales perivasculares.	49
<b>Tabla 1.11.</b>	Resumen de los ensayos clínicos donde se ha utilizado el tatuaje del GLC en DAD.	58
<b>Tabla 1.12.</b>	Principales sistemas de marcaje y localización del ganglio linfático centinela axilar en cáncer de mama.	59
<b>Tabla 3.1.</b>	Ventajas y limitaciones de diferentes sistemas de liberación de fármacos en el ganglio linfático.	60
<b>Tabla 3.2.</b>	Propiedades de las variantes de PLGA.	69
<b>Tabla 4.1.</b>	Prueba de Shapiro-Wilk de las variables.	81
<b>Tabla 4.2.</b>	Diámetros hidrodinámicos medidos por DLS de C-NPs durante la optimización.	86
<b>Tabla 4.3.</b>	Porcentaje de C-NPs liberadas <i>in vitro</i> de las NPs de PLGA RG504H y PLGA RG858S.	89
<b>Tabla 4.4.</b>	Porcentaje de CQ liberada <i>in vitro</i> de las NPs de PLGA RG504H y PLGA RG858S.	92
<b>Tabla 4.5.</b>	Diámetros hidrodinámicos medidos por DLS de Mel-NPs durante la optimización de la emulsión.	94
<b>Tabla 4.6.</b>	Porcentaje de melanina liberada <i>in vitro</i> de las NPs de PLGA RG504H.	96
<b>Tabla 4.7.</b>	Porcentaje de C-NPs liberadas <i>in vitro</i> de las MPs de PLGA RG504H.	105
<b>Tabla 4.8.</b>	Número de ganglios marcados por vector de marcaje en los animales de experimentación.	121
<b>Tabla 4.9.</b>	Correlaciones entre la facilidad de identificación y el resto de las variables utilizando la Tau de Kendall.	124
<b>Tabla 4.10.</b>	Correlaciones entre el área marcada y el resto de las variables utilizando la Tau de Kendall.	127
<b>Tabla 4.11.</b>	Correlaciones entre el área marcada y el resto de las variables utilizando la Tau de Kendall.	133
<b>Tabla 4.12.</b>	Correlaciones entre el tamaño de los cúmulos y el resto de las variables utilizando la Tau de Kendall.	135
<b>Tabla 4.13.</b>	Correlaciones entre la extensión de la inflamación y el resto de las variables utilizando la Tau de Kendall.	139



# Capítulo 1.

# Antecedentes

<b>1.1. Cáncer de mama y metástasis ganglionar</b>	<b>29</b>
1.1.1. Epidemiología del cáncer de mama	29
1.1.2. Etiopatogenia del cáncer de mama	29
1.1.3. Clasificación histológica	30
1.1.4. Clasificación molecular	31
1.1.5. Estadificación TNM	32
1.1.6. Factores pronósticos	34
1.1.7. Manejo clínico	35
1.1.8. Metástasis en cáncer de mama y estadiaje ganglionar	37
1.1.9. Técnicas quirúrgicas para el estadiaje axilar	38
<b>1.2. Anatomía y fisiología de los ganglios linfáticos</b>	<b>41</b>
1.2.1. Función y estructura del sistema linfático	41
1.2.2. Anatomía de las cadenas ganglionares mamarias	42
1.2.3. Anatomía y fisiología del ganglio linfático	43
1.2.4. Tipos celulares en el ganglio linfático	47
<b>1.3. Técnicas de marcaje del ganglio centinela</b>	<b>51</b>
1.3.1. Técnicas de marcaje ganglionar para la BSGC	51
1.3.2. Técnicas de marcaje ganglionar para la DAD	55
<b>1.4. Nanopartículas dirigidas al ganglio linfático</b>	<b>59</b>
1.4.1. Nanopartículas en biomedicina	59
1.4.2. Sistemas nanoestructurados dirigidos al ganglio linfático	60
1.4.3. Biodistribución y captación linfática de las nanopartículas	60
1.4.4. Interacción entre el sistema inmunitario y las nanopartículas	61

# 1.1. Cáncer de mama y metástasis ganglionar

## 1.1.1. Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama es la neoplasia sólida más frecuentemente diagnosticada en la mujer.<sup>1,2</sup> Según la última versión publicada en 2022 por el *Global Cancer Observatory (GLO-BOCAN)*, se diagnosticaron 2,310,051 nuevos casos con una tasa de mortalidad del 29 % a nivel mundial, siendo el segundo cáncer con mayor incidencia y el cuarto con mayor tasa de mortalidad.<sup>2</sup> En España, se diagnosticaron alrededor de 35,000 casos en 2022, alcanzando una incidencia de 81.7 nuevos casos y una tasa de mortalidad de 10.7 por cada 100,000 habitantes.<sup>2,3</sup>

La incidencia del cáncer de mama aumenta progresivamente a lo largo de los años, mientras que la tasa de mortalidad disminuye.<sup>4</sup> Las tasas de incidencia y mortalidad son significativamente superiores en países con índices de desarrollo humano altos, lo que puede estar asociado a una mayor prevalencia de riesgo reproductivo y hormonal y factores de riesgo asociados al estilo de vida, además de una mayor tasa de detección a través de estudios diagnósticos.<sup>2,5</sup> La elevada tasa diagnóstica en países desarrollados ha supuesto el tratamiento precoz de la enfermedad consiguiendo mejor pronóstico a largo plazo y una reducción de la mortalidad.<sup>6,7</sup> Aun así, en 2022 el cáncer de mama fue la causa de muerte de 6,647 mujeres y 77 hombres en España.<sup>8</sup>

## 1.1.2. Etiopatogenia del cáncer de mama

El cáncer de mama es una patología diversa y heterogénea, fenotípicamente variable con multitud de subtipos biológicos asociados a diferentes tasas de supervivencia. Si bien su etiología es aún desconocida, existen numerosos factores predisponentes de cáncer de mama, como los factores demográficos, los factores reproductivos, los factores hormonales, los factores hereditarios, los factores patológicos previos y los factores relacionados con el estilo de vida.

**Factores demográficos.** La incidencia de cáncer de mama resulta prácticamente exclusiva en el género femenino, siendo raramente detectada en hombres (1%).<sup>9</sup> A pesar de las diferencias específicas de género, el cáncer de mama en hombres y mujeres presenta características similares.<sup>10</sup> La tasa de incidencia de cáncer de mama aumenta significativamente con la edad, alcanzando su apogeo en la edad menopáusica.<sup>11</sup> Los tumores malignos de mama en mujeres más jóvenes suelen presentarse de mayor tamaño, en estadios más avanzados, con positividad en ganglios linfáticos y peor pronóstico a medio y largo plazo.<sup>12,13</sup>

**Factores reproductivos.** El riesgo de cáncer de mama aumenta significativamente en mujeres con edades menárquicas tempranas y con edad menopáusica avanzada.<sup>14–16</sup> La probabilidad de cáncer de mama también se reduce con el embarazo, especialmente en mujeres jóvenes.<sup>17</sup>

**Factores hormonales.** Existe controversia sobre la influencia de las terapias hormonales y la incidencia de cáncer de mama. Aunque todavía no hay resultados concluyentes, se ha descrito un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama con el uso de métodos anticonceptivos<sup>18,19,20,21</sup> o con la ingesta de fármacos estimulantes de la ovulación.<sup>22</sup>

**Factores genéticos.** La aparición temprana de un cáncer de mama puede ser indicador de un factor genético predisponente.<sup>23</sup> Se han identificado más de 750 mutaciones de la línea germinal en los genes *BRCA1* y *BRCA2* responsables de la predisposición heredada de algunos subtipos de cáncer de mama y ovario.<sup>24</sup> Este origen genético es causante del 4 al 10 % de los casos.<sup>24,25,26,27</sup>

**Factores asociados a patologías previas.** La hiperplasia ductal y lobulillar y la adenosis esclerosante se presentan como lesiones proliferativas benignas que suponen un factor de riesgo para contraer cáncer de mama. La hiperplasia ductal atípica ha sido descrita como un factor de riesgo en carcinomas invasivo y ductales *in situ*,<sup>28,29</sup> mientras que la de subtipo histológico lobulillar resulta más determinante en pacientes premenopáusicas.<sup>30</sup> La adenosis esclerosante posee un papel todavía indefinido en la carcinogénesis mamaria, aunque ha sido frecuentemente propuesta como un factor de riesgo.<sup>30</sup>

**Factores asociados al estilo de vida.** La obesidad se ha correlacionado con la aparición de cáncer de mama, así como el consumo de alcohol, los hábitos dietéticos inadecuados o la reducida actividad física.<sup>31-33</sup>

### 1.1.3. Clasificación histológica

El cáncer de mama abarca un espectro heterogéneo de tumores con diferente fenotipo, comportamiento biológico y pronóstico. La clasificación de los tumores de mama más actualizada fue propuesta en la quinta edición de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2019, aunque continúa evolucionando.<sup>34</sup> Estos carcinomas derivan de las células epiteliales del parénquima mamario, con especial incidencia en las células de la unidad terminal ductal y lobular. Suelen agruparse en carcinomas *in situ* o infiltrantes (invasivos). Sin embargo, existen subtipos menos comunes, que incluyen: carcinomas tubulares, carcinomas cribiformes, carcinomas mucinosos, carcinomas con componente medular, carcinomas con diferenciación apocrina o carcinomas con diferenciación de células en anillo de sello, entre otros.<sup>34</sup>

#### 1.1.3.1. Carcinomas *in situ*

Los carcinomas *in situ* constituyen un amplio subgrupo tumoral caracterizado por la formación de lesiones proliferativas malignas confinadas en los ductos o lóbulos mamarios, sin ruptura de la membrana basal, sin invasión del estroma de canales vasculares o linfáticos, y sin proliferación vascular. Los carcinomas *in situ* pueden ser subdivididos según su origen en carcinomas ductales *in situ* (CDIS) y en carcinomas lobulillares *in situ* (LCIS).<sup>35</sup> Los CDIS representan el 40-75 % de los carcinomas *in situ* mamarios y el 10-15 % del conjunto de carcinomas mamarios y se asocian a altas tasas de recurrencia tras cirugía conservadora.<sup>36,37</sup> Estos subtipos se consideran el primer estadio de un carcinoma mamario con estructura reconocible y pueden ser precursores de carcinomas infiltrantes.<sup>38,39</sup> En los CDIS, las células malignas proliferan en el interior de los conductos galactóforos. Por tanto, la detección de microcalcificaciones agrupadas durante las mamografías puede resultar clave para el diagnóstico. No obstante, el diagnóstico más fiable se basa en los estudios histológicos e inmunohistoquímicos. Los hallazgos histopatológicos permiten clasificar el tumor, pudiendo diferenciar entre no comedocarcinomas (sólido, cribiforme, papilar y micropapilar) y comedocarcinomas.<sup>35</sup> Los LCIS constituyen el 5-15 % de los carcinomas *in situ* y el 0.5-3.6 % del total de tumores de la mama.<sup>44,45</sup> Estos subtipos presentan mayor incidencia de bilateralidad (30-40 %) y multicentricidad (60 %) respecto a los CDIS.<sup>36</sup> Además, muestran mayor incidencia en mujeres mayores y una estructura morfológica de mayor tamaño.<sup>42</sup> Los LCIS no presentan una estructura morfológica específica, lo que supone un difícil diagnóstico radiológico. Habitualmente, estos subtipos tumorales aparecen como masas tisulares normales o pueden ser erróneamente asociados a displasias mamarias o fibroadenomas.<sup>35</sup>

#### 1.1.3.2. Carcinomas infiltrantes

Los carcinomas infiltrantes se extienden al tejido mamario adyacente. El carcinoma infiltrante de mayor incidencia es el carcinoma ductal infiltrante (CDI), que constituye la lesión maligna más frecuente en cáncer de mama con una tasa del 65-80 % de los casos.<sup>43</sup> Este subtipo de tumor tiene su origen en las células epiteliales y mioepiteliales de los conductos galactóforos y se caracteriza por presentar un crecimiento sólido, con un grado de fibrosis asociada variable. Es frecuente la aparición de metástasis por diseminación linfática.<sup>44</sup> El carcinoma lobulillar infiltrante (LCI) representa del 8 al 14 % de los cánceres de mama.<sup>45,46</sup> Su morfología difiere del CDI al presentar células pequeñas

y redondeadas con escasa componente citoplasmática, que se infiltran en el estroma en una sola fila y rodean los tejidos benignos de manera organizada.<sup>45</sup> Es por esto que, a menudo es complejo diferenciar las masas tumorales y no son fácilmente detectables de manera precoz con palpación.<sup>47</sup> Este subtipo de carcinoma tiende a una distribución multicéntrica y bilateral.<sup>48</sup> Existen otros subtipos de carcinomas infiltrantes, como el carcinoma medular, que representa el 1-10 % de los carcinomas infiltrantes, el carcinoma micropapilar (<2 % de los casos), el carcinoma mucinoso (1-2 % de los casos) y el carcinoma tubular, que es muy poco frecuente.<sup>43</sup>

## 1.1.4. Clasificación molecular

Existe una clasificación inmunohistoquímica de los tumores de mama con arreglo a una serie de parámetros histoquímicos, incluyendo la expresión de los receptores estrogénicos (ER), progestágenos (PR) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2), así como el índice de proliferación (marcado como porcentaje de captación del marcador Ki67). En tumores de mama, el estudio de ER, PR, el oncogén HER2 y el antígeno Ki67 es crucial para el diagnóstico y la planificación terapéutica.<sup>49-51</sup>

Los receptores hormonales ER y PR son receptores de superficie con un papel mediador en los procesos de transcripción celular en la glándula mamaria. En condiciones fisiológicas normales, estos receptores se unen a hormonas esteroideas, regulan la transcripción de genes y mantienen el equilibrio celular. Sin embargo, en condiciones patológicas, resultan sobreexpresados e inducen a un rápido crecimiento del tumor. Si bien el pronóstico de la paciente está sujeto a otros factores, como el tamaño tumoral o la aparición de metástasis linfática, entre otros, la presencia de ER y/o PR en cáncer de mama se asocia a una mayor supervivencia libre de enfermedad y a una mayor supervivencia global.<sup>52-55</sup> Por tanto, en tumores en estadios bajos la presencia de ER es indicativa de mejor pronóstico y mejor respuesta frente a terapia endocrina.<sup>57</sup> El oncogén HER2 codifica una proteína ubicada en la membrana que pertenece a la familia del factor del receptor crecimiento epidérmico (EGFR, del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*). La sobreexpresión de HER2 implica tumores de mayor grado histológico, alto índice proliferativo y propensión a la metástasis ganglionar, lo que supone peor pronóstico a medio y largo plazo.<sup>58</sup> El anticuerpo monoclonal Ki67 detecta un antígeno nuclear presente en células en las fases proliferativas del ciclo celular, siendo indicativo del crecimiento tumoral y útil para medir la respuesta ante tratamientos adyuvantes.<sup>56</sup>

La clasificación molecular propuesta por Perou *et al.*<sup>59</sup> constituye un estándar que agrupa los subtipos de cáncer de mama en cinco categorías atendiendo a su perfil inmunohistoquímico. Según esta clasificación es posible diferenciar: Luminal A, Luminal B (HER2+ y HER2-), triple negativo y HER2+ (**Tabla 1.1**).

**Tabla 1.1.** Clasificación molecular del cáncer de mama. Adaptada de Perou *et al.*<sup>59</sup>

	Luminal A	Luminal B		HER2+	TNBC
		HER2-	HER2+		
<b>ER</b>	+	+	+	-	-
<b>PR</b>	+	-	-/+	-	-
<b>HER2</b>	-	-	+	+	-
<b>Ki67</b>	Bajo	Alto	Bajo/Alto	Alto	Alto
<b>Incidencia</b>	40-50 %	—	20-30 %	—	10-20 %
<b>Grado histológico</b>	Grado I	—	Grado II	—	Grado III

### 1.1.4.1. Luminales

Los subtipos luminales representan el 60-80 % de los carcinomas mamarios y se caracterizan por sobreexpresar ER. El subtipo Luminal A (ER+, PR+, HER2- y Ki67 bajo) constituye el 40-50 % de los tumores mamarios y presenta mejor pronóstico a largo plazo, con menor incidencia de recidivas y mayor supervivencia en recaídas. Presenta buen comportamiento frente a hormonoterapia, aunque escasa respuesta a la quimioterapia.<sup>60</sup> El Luminal B se subdivide en HER2- (RE+, PR-, Ki67 alto) y HER2+ (RE+, PR-/+; Ki67 bajo/alto) y representa el 20-30 % del total de cánceres de mama. Ambos presentan buen comportamiento ante terapias endocrinas y quimioterapias. Sin embargo, estos subtipos presentan peor pronóstico a largo plazo con elevada tasa de recidivas viscerales y menor supervivencia global.<sup>60</sup>

### 1.1.4.2. HER2+

Los subtipos tumorales HER2+ (HER2+, ER-, PR-, Ki alto) presentan mejor respuesta a fármacos que bloquean la actividad del HER2, como el trastuzumab o el pertuzumab.<sup>60</sup> Estos tumores están asociados a mal pronóstico y constituyen el 15-20 % de los cánceres de mama.<sup>59</sup>

### 1.1.4.3. Triple negativo o «basal-like»

Los tumores triple negativos (TNBC, por sus siglas en inglés *Triple Negative Breast Cancer*) o «basal-like» se caracterizan por un perfil inmunohistoquímico ER-, PR-, HER2- y Ki67 alto. Estos tumores representan el 15-20 % de los carcinomas mamarios y presentan buen comportamiento frente a quimioterapia, además de poder ser tratados terapéuticamente con inhibidores de la enzima poli ADP ribosa polimerasa (PARP, del inglés poly-ADP ribose polymerase).<sup>59</sup> No obstante, estos tumores presentan mal pronóstico clínico. Habitualmente, estos subtipos están relacionados con la mutación BRCA1/2 y del EGFR.<sup>61</sup>

## 1.1.5. Estadificación TMN

**Tabla 1.2.** Clasificación TNM: T (tumor primario). Adaptada de Hortobagyi *et al.*<sup>63</sup>

Tumor primario (T)	
Tx	No es posible evaluar el tumor primario.
TO	No existe prueba del tumor primario.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
Tis (CDIS)	Carcinoma ductal <i>in situ</i> .
Tis (CLIS)	Carcinoma lobulillar <i>in situ</i> .
Tis (Paget)	Enfermedad de Paget del pezón.
T1	Tamaño del tumor ≤20 mm en su mayor dimensión.
T1mi	Tamaño del tumor ≤1 mm.
T1a	Tamaño del tumor >1 mm y ≤5 mm.
T1b	Tamaño del tumor >5 mm y ≤10 mm.
T1c	Tamaño del tumor >10 mm y ≤15 mm.
T1d	Tamaño del tumor >15 mm y ≤20 mm.
T2	Tamaño del tumor >20 mm y ≤50 mm en su mayor dimensión.
T3	Tamaño del tumor >50 mm en su mayor dimensión.
T4	Cualquier tamaño tumoral con extensión a la pared costal o a la piel.
T4a	Extensión a la pared torácica.
T4b	Ulceración o nódulos satélites ipsilaterales o edema.
T4c	Ambos, T4a y T4b.
T4d	Carcinoma inflamatorio.

La estadificación del cáncer de mama basada en Tumor, Ganglio y Metástasis (TNM, por sus siglas en inglés *Tumor, Node, Metastasis*) fue propuesta por The American Joint Committee on Cancer (AJCC) y constituye un estándar clínico para determinar la etapa de la enfermedad. Actualmente, este estándar se encuentra en su octava edición.<sup>62</sup>

Este estándar se basa en el tamaño y la detección del tumor primario (T), en el estado ganglionar regional (N) y en la afectación metastásica a distancia (M). Los tumores se asignan a un grupo de riesgo clínico (cTNM) previa cirugía según los hallazgos preliminares (**Tablas 1.2-1.5**). Tras el procedimiento quirúrgico, se establece una estadificación anatomiopatológica definitiva (pTNM) (**Tabla 1.6**).

**Tabla 1.3.** Clasificación TNM: N (estado ganglionar). Adaptada de Hortobagyi *et al.*<sup>63</sup>

Estado ganglionar (N)	
Nx	No es posible evaluar el ganglio linfático regional.
NO	No existe metástasis en ganglios linfáticos.
N1	Metástasis en grado ipsilateral móvil I, II ganglio linfático axilar o axilares.
N2	Metástasis en grado ipsilateral I, II ganglios linfáticos axilares fijos o apelmazados.
	Metástasis en ganglios mamarios ipsilaterales internos detectados en ausencia de metástasis manifestada en ganglios linfáticos axilares.
N2a	Metástasis ipsilateral en grado I, II a ganglios linfáticos axilares fijos.
N2b	Metástasis solo en ganglios mamarios internos ipsilaterales.
N3	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) infraclavicular(es) ipsilateral(es) en grado III axilar con implicación de ganglio linfático axilar de grado I, II.
	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) mamario(s) ipsilateral(es) interno(s) con metástasis manifiesta en ganglios linfáticos axilares grados I, II.
	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) supraclavicular(es) ipsilateral(es) con implicación axilar o mamaria interna de ganglios linfáticos o sin esta.
N3a	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) infraclavicular(es) ipsilateral(es).
N3b	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) mamario(s) interno(s) ipsilateral(es) y ganglio(s) linfático(s) axilar(es).
N3c	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) ipsilateral(es) superclavicular(es).

**Tabla 1.4.** Clasificación TNM: M (metástasis). Adaptada de Hortobagyi *et al.*<sup>63</sup>

Afectación metastásica a distancia (M)	
MO	No hay prueba de metástasis a distancia.
cMO(i+)	No hay prueba de metástasis a distancia, pero sí detección de depósitos de células tumorales moleculares o microscópicas en sangre circulante, médula ósea o tejidos ganglionares no regionales ≤0.2 mm.
M1	Hay metástasis a distancia >0.2 mm.

**Tabla 1.5.** Clasificación TNM por estadios. Adaptada de Hortobagyi *et al.*<sup>63</sup>

	O	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IIIC										
T	Tis	T1	TO	T1	TO	T1	T2	T2	T3	TO	T1	T2	T3	T3	T4	T4	T4	T1/2/3/4	T1/2/3/4
N	NO	NO	N1mi	N1mi	N1	N1	NO	N1	NO	N2	N2	N2	N1	N2	NO	N1	N2	N3	N1/2/3
M	MO	MO	MO	MO	MO	MO	MO	MO	MO	MO	MO	MO	MO	MO	MO	MO	MO	MO	M1

**Tabla 1.6.** Clasificación TNM: pN (estado ganglionar patológico). Adaptada de Hortobagyi *et al.*<sup>63</sup>

Estado ganglionar patológico (pN)	
<b>pNX</b>	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.
<b>pNO</b>	No se identifica metástasis en ganglios linfáticos regionales.
<b>pNO (i-)</b>	No se observa metástasis regional a ganglio linfático regional.
<b>pNO (i+)</b>	Malignidad celular en ganglio(s) linfático(s) regional(es) ≤0.2 mm.
<b>pNO (mol-)</b>	No se observa metástasis a ganglio linfático regional con hallazgos moleculares negativos RT-PCR.
<b>pNO (mol+)</b>	No se observa metástasis a ganglio linfático regional con hallazgos moleculares positivos por RT-PCR.
<b>pN1</b>	<p><b>pN1mi</b> Micrometástasis (&gt;0.2 mm o &gt;200 células pero ninguna &gt;2.0 mm).</p> <p><b>pN1a</b> Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos axilares, al menos &gt;2.0 mm.</p> <p><b>pN1b</b> Metástasis en ganglios mamarios internos con micro o macrometástasis.</p> <p><b>pN1c</b> Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos mamarios internos con micro o macrometástasis.</p>
<b>pN2</b>	<p><b>pN2a</b> Metástasis en 4-9 ganglios linfáticos axilares con depósito tumoral &gt;2 mm detectada clínicamente en ausencia de afectación axilar ganglionar.</p> <p><b>pN2b</b> Metástasis en ganglios linfáticos mamarios internos detectados en ausencia de metástasis a ganglio linfático axilar detectada clínicamente en ausencia de afectación axilar ganglionar.</p>
<b>pN3</b>	<p><b>pN3a</b> Metástasis en ≥10 ganglios linfáticos axilares con al menos un depósito tumoral &gt; 2 mm o metástasis a los ganglios infraclaviculares (grado III) detectada clínicamente en cadena mamaria interna ipsilateral.</p> <p><b>pN3b</b> Metástasis en &gt;3 ganglios linfáticos axilares y ganglios mamarios internos con o sin micro o macrometástasis detectadas mediante biopsia pero no detectadas clínicamente.</p> <p>Metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales supraclaviculares.</p>

## 1.1.6. Factores pronósticos

Además de las características histológicas y moleculares, existen otros factores pronósticos en cáncer de mama, incluyendo el tamaño tumoral, la infiltración linfovascular y la afectación ganglionar.

### 1.1.6.1. Tamaño tumoral

El tamaño tumoral es considerado uno de los factores pronósticos de mayor relevancia. En pacientes sin afectación ganglionar, las masas tumorales de gran tamaño están asociadas a una mayor tasa de recidivas y de mortalidad.<sup>64-66</sup>

### 1.1.6.2. Infiltración linfovascular

La infiltración linfovascular ocurre cuando células cancerosas irrumpen en espacios con revestimiento endotelial de vasos sanguíneos o linfáticos, aumentando el riesgo de extensión del tumor (metástasis). Constituye un factor indicativo independiente de mal pronóstico en cáncer de mama, asociándose a una reducción de la supervivencia sin progresión y de la supervivencia global de la paciente.<sup>67</sup>

### **1.1.6.3. Afectación ganglionar axilar**

En cáncer de mama, la diseminación metastásica más frecuente ocurre en los ganglios linfáticos regionales, especialmente en la axila homolateral. La invasión metastásica en ganglios axilares es uno de los indicadores pronósticos de mayor relevancia clínica por resultar íntimamente relacionado con el aumento de probabilidad de recidiva y mortalidad, además de tener una influencia directa en la estrategia del tratamiento. Además, es un parámetro clave para el estadiaje tumoral e influye en el manejo quirúrgico y la terapia sistémica. Kurnaz et al.<sup>68</sup> asociaron la metástasis ganglionar a la histopatología tumoral en 286 pacientes, encontrando afectación axilar en el 60.5 % de tumores CDI y en el 44.4 % del resto de tumores infiltrantes. A partir de ONCOPOOL, una base de datos recopilada retrospectivamente en carcinomas infiltrantes de 16,944 pacientes, Blamey et al.<sup>69</sup> establecieron relaciones entre el grado histológico, el estadio y el tamaño tumorales y la tasa de afectación ganglionar, reportando una afectación del 29 % en Grado I, del 41 % en Grado II y del 30 % en Grado III. En tumores con un tamaño promedio de 1.8 cm, observaron afectación en 1-3 ganglios en el 66 % de las pacientes, en más de 4 ganglios en el 10 % de las pacientes y no se encontró metástasis en el 24 % restante.

## **1.1.7. Manejo clínico**

El tratamiento estándar del cáncer de mama no metastásico es la resección quirúrgica, la radioterapia, la quimioterapia y la hormonoterapia, aunque algunos subtipos tumorales presentan buen comportamiento frente a terapias dirigidas e inmunoterapias. No obstante, es frecuente utilizar terapias combinadas. En ocasiones es indicado aplicar terapia neoadyuvante con el objetivo dual de reducir el tamaño tumoral y eliminar pequeñas metástasis para optar a una cirugía conservadora y valorar la sensibilidad del tumor frente a quimio u hormonoterapia. En etapas posquirúrgicas, puede ser necesario un tratamiento adyuvante para prevenir la recurrencia.

### **1.1.7.1. Tratamiento sistémico neoadyuvante**

La neoadyuvancia es un tratamiento preoperatorio sistémico que tiene por objetivo eliminar posibles micrometástasis y reducir la masa tumoral para optar a cirugías más conservadoras de la mama y de la axila. La opción de tratamiento más frecuente es la quimioterapia neoadyuvante (QTNA), aunque en función de la entidad molecular tumoral, el abordaje terapéutico se ha actualizado en las últimas décadas, según se detalla a continuación:<sup>59</sup>

- Luminal A: hormonoterapia
- Luminal B (HER2-): hormonoterapia/quimioterapia
- Luminal B (HER2+): hormonoterapia/quimioterapia/terapia dirigida
- HER2+: terapia dirigida/quimioterapia
- TNBC: quimioterapia / inhibidores PARP

Se ha descrito una buena respuesta frente a la terapia neoadyuvante en tumores HER2+, TNBC y luminales, demostrando potenciales ventajas en lo que se refiere a:<sup>70</sup>

- Mejora el «downstaging» tumoral: reduce el tamaño tumoral primario para hacerlo resecable y posibilita la cirugía conservadora frente a la mastectomía, minimizando así la extirpación de tejido mamario para reducir la morbilidad de la cirugía.
- Permite mejorar la estimación pronóstica, definiendo la sensibilidad del tumor ante quimio u hormonoterapia.
- Resulta útil para un abordaje precoz de la metástasis.
- Permite evaluar marcadores pronósticos subrogantes de respuesta al tratamiento y ayuda a la toma de decisiones de cara a la terapia adyuvante.

No obstante, no todos los tumores son candidatos al tratamiento neoadyuvante. Las principales indicaciones de la QTNA son:<sup>71</sup>

- Tumores localmente avanzados en grado 3, tumores primarios en estadio precoz de gran tamaño (>5 cm) o tumores no resecables por mastectomía.
- Tumores localizados pero en los que, ya sea por el tamaño tumoral o por su localización, no permiten una cirugía conservadora y requieren mastectomía.

- Pacientes con cáncer de mama en estadio temprano que presente afectación ganglionar, independientemente del tamaño del tumor primario, con el objetivo de reducir el estadio de los ganglios y evitar morbilidades asociadas.
- Pacientes con contraindicaciones temporales para la cirugía, que, a pesar de tener tumores resecables, no son operables durante el diagnóstico por presentar comorbilidades y prevean solucionarse para ser intervenidas quirúrgicamente más adelante.
- Tumores con clasificación molecular con buena respuesta a alguno de los tratamientos sistémicos neoadyuvantes y que puedan mejorar su pronóstico (p.ej. TNBC o HER2+).

### **1.1.7.2. Cirugía de la mama**

La cirugía para el tratamiento en cáncer de mama ha evolucionado drásticamente desde las técnicas mutilantes originales de finales del siglo XIX. En la actualidad, el manejo quirúrgico del cáncer de mama es dependiente del estadio en el que se encuentre el tumor, del fenotipo que presente y de características fisiológicas de la paciente afectada, pudiendo clasificar las técnicas en tres grandes grupos: cirugía conservadora, cirugía radical y cirugía oncoplástica.

**Cirugía conservadora.** La cirugía conservadora consiste en la extirpación selectiva del tumor con un margen de tejido sano. Clásicamente existían tres variedades: la tumorectomía, en caso de la extirpación del tumor con márgenes quirúrgicos de pocos milímetros; la segmentectomía, cuando la extirpación del tumor incluye márgenes quirúrgicos más amplios; y la cuadrantectomía cuando también se extirpe la piel y la aponeurosis del cuadrante correspondiente, aunque en la actualidad se agrupan en la resección localizada con suficiente margen. Habitualmente, la cirugía conservadora es el abordaje estándar en tumores en estadios iniciales (I o II), además está indicado en tumores palpables o radiológicamente localizables que presenten una exéresis del tumor y sus márgenes no superior a una quinta parte del volumen de la mama.<sup>72</sup> Algunos estudios clínicos sugieren que un tratamiento basado en cirugía conservadora y tratamiento radioterápico local adyuvante es equiparable a una mastectomía radical de la mama, en términos de supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad y recurrencia local.<sup>75-76</sup> No obstante, existe una serie de contraindicaciones que se inclinan hacia una opción quirúrgica menos conservadora, incluyendo los tumores multicéntricos o diseminados a nivel local, con microcalcificaciones difusas o con mutaciones en *BRCA1/2*.<sup>76,77</sup>

**Cirugía radical.** La cirugía radical o mastectomía debe reservarse para casos de lesiones multicéntricas y multifocales que no permitan la extirpación oncológica con conservación de seno,<sup>72</sup> en tumores acompañados de lesiones de riesgo (p.ej. displasias difusas de alto riesgo o hiperplasias atípicas o tumores de alto grado histológico).<sup>72,78</sup> Existen indicaciones firmes para la elección de la mastectomía en pacientes de cáncer de mama, como la presencia de tumores de más de 5 cm, pacientes embarazadas, tumores ipsilaterales en cuadrantes distintos, carcinomas intracanaliculares extensos, calcificaciones mamográficas difusas o recidiva tras cirugía conservadora.<sup>72,78</sup> En la actualidad, las técnicas más utilizadas son la mastectomía radical modificada (incluyendo la variante de Patey y la variante de Madden), la mastectomía simple, la mastectomía ahorradora de piel y la mastectomía ahorradora de piel y pezón (**Tabla 1.7**). Otras técnicas como la mastectomía superradical o la mastectomía superradical de Prudente han sido abandonadas por completo.<sup>78</sup>

**Cirugía oncoplástica.** La cirugía oncoplástica se practica para mejorar el resultado estético. Las técnicas oncoplásticas se fundamentan en tres principios básicos: debe mantener los márgenes de resección necesarios (oncológicamente no debe diferir de la cirugía convencional), se realiza reconstrucción inmediata y se ajusta para asegurar la simetría de la mama contralateral si la paciente lo solicita. Estos procedimientos quirúrgicos incluyen a menudo procedimientos a través de patrones quirúrgicos específicos, remodelación mamaria o colgajos.<sup>79</sup>

**Tabla 1.7.** Tipos de mastectomía y la extirpación que conllevan. Adaptado de Del Val et al.<sup>78</sup>

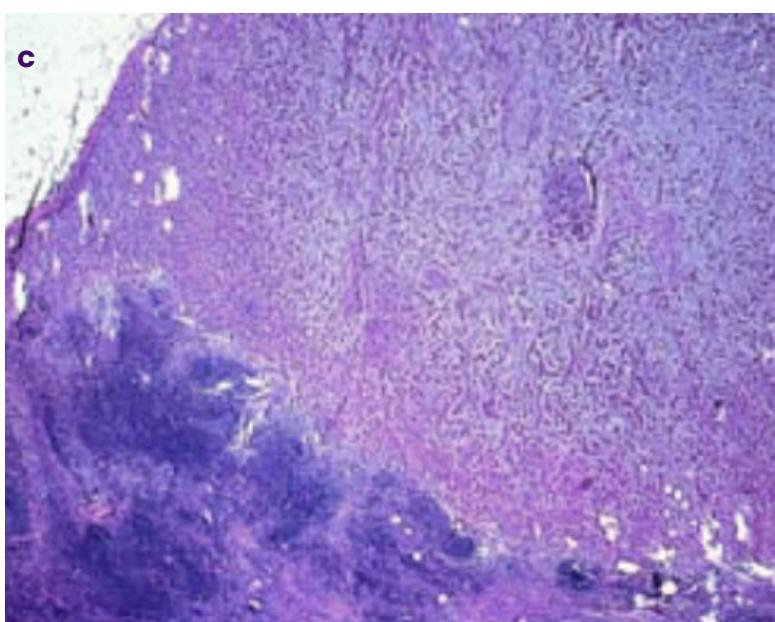
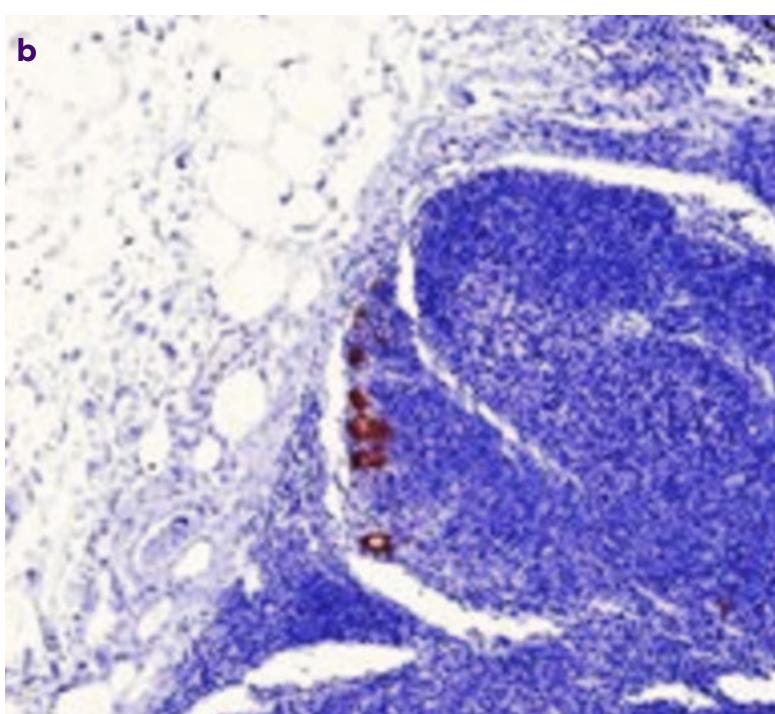
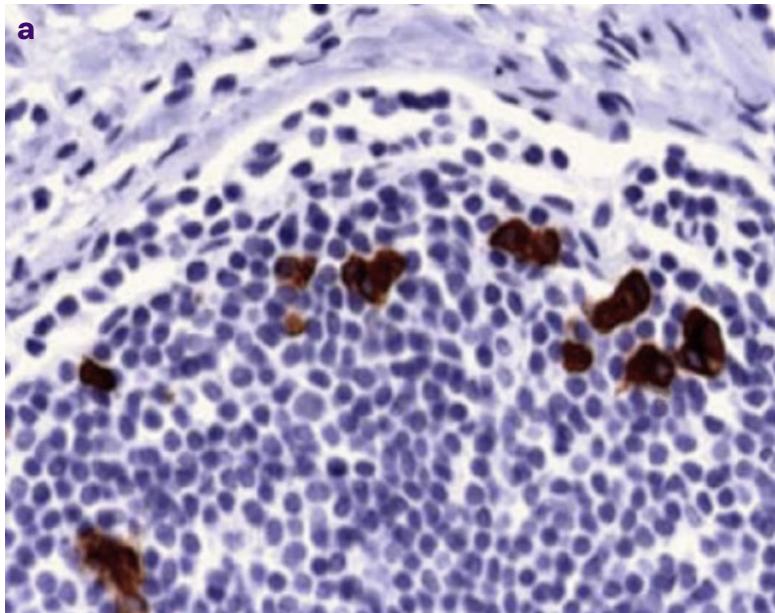
	Radical	Radical ampliada	Superradical	Superradical de Prudente	R.M.P.	R.M.M.	Simple	Subcutánea
Extirpación de la glándula mamaria con piel	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Pectoral menor	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	No
Pectoral mayor	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	No
Vaciamiento axilar nivel I	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No
Vaciamiento axilar nivel II	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No
Vaciamiento axilar nivel III	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	No
Ganglios mamarios internos	No	Sí	Sí	Sí	No	No	No	No
Ganglios supraclaviculares	No	No	No	Sí	No	No	No	No

## 1.1.8. Metástasis en cáncer de mama y estadiaje ganglionar

### 1.1.8.1. Metástasis ganglionar

La metástasis es una característica distintiva del cáncer avanzado y es responsable de la mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer. La metástasis constituye un proceso complejo donde las células cancerosas se diseminan desde el tumor primario a otras partes del organismo, formando tumores secundarios en órganos o tejidos distantes.<sup>80</sup> Según la American Cancer Society, se estima que en el momento del diagnóstico el 63 % de los pacientes tienen cáncer de mama en estadio local, mientras que el 28 % tiene invasión regional y el 6 % presenta metástasis distante (el 3 % restante está sin clasificar o en una etapa desconocida).<sup>81</sup> De entre los subtipos de cáncer de mama, los TNBC son el subtipo más invasivo, con altas probabilidades de metástasis distante que ocurren en el 46 % de los casos.<sup>82</sup> Los lugares habituales de diseminación en cáncer de mama son los ganglios linfáticos regionales, los pulmones, los huesos (columna vertebral, caderas y pelvis), el hígado, el cerebro y las glándulas suprarrenales, aunque el TNBC frecuentemente tiende a metastatizar en el cerebro. No obstante, la metástasis puede aparecer en múltiples órganos de forma simultánea o secuencial.<sup>83</sup>

Los ganglios linfáticos axilares homolaterales son los sitios donde más frecuentemente ocurre la metástasis en cáncer de mama. Según la teoría de los niveles de Berg (teoría «meccanista» o «Halstediana»),<sup>84</sup> la diseminación metastásica transcurrió de manera progresiva y escalonada, donde las células tumorales afectan primeramente a los ganglios del nivel I para, posteriormente, avanzar hacia los de nivel II y III.<sup>72</sup> De esta manera, el drenaje linfático del tumor está asociado a la ubicación anatómica de la neoplasia, es decir, con su región linfática de referencia. Esta teoría puede comprobarse para tumores de bajo grado en estadios iniciales, aunque otras teorías (Fisher) preconizan que los tumores pueden metastatizar desde estadios iniciales, cuando todavía no se han hecho clínicamente relevantes. Probablemente las dos teorías puedan coexistir incluso para el mismo tumor solo que inicialmente pueden comportarse de una forma más «Halstediana». En casos esporádicos (~1 %), las células tumorales alcanzan los niveles superiores de la región axilar y no se identifica afectación proximal, por lo que fue necesario definir el concepto «skip metastases», que re-



presenta esta casuística.<sup>84</sup> Por su parte, la cadena mamaria interna constituye la vía de drenaje linfático más frecuentemente afectada en tumores localizados en la porción medial de la mama.<sup>72</sup> No obstante, la afectación de ganglios de la cadena mamaria interna suele ser secundaria a diseminación metastásica axilar previa.

Las metástasis ganglionares pueden ser clasificadas en tres subtipos dependiendo de la extensión de la tumoreación en: células tumorales aisladas (ITC, por sus siglas en inglés *Isolated Tumour Cells*) (**Figura 1.1 a**), micrometástasis (**Figura 1.1b**) y macrometástasis (**Figura 1.1c**). Las ITC (NO[i+]) refieren a aquellos procesos metastásicos donde las células tumorales se presentan de manera aislada, en poblaciones de un tamaño <0.2 mm o se identifican <200 células afectadas en una sola sección transversal del ganglio. Las micrometástasis (N1mi) presentan un tamaño >0.2 mm, pero i<2.0 mm y/o comprenden >200 células afectadas en la sección transversal. La consideración de macrometástasis (N1) supone la detección de agrupaciones celulares tumorales >2.0 mm.<sup>63,85</sup>

**Figura 1.1.** Metástasis ganglionar de células tumorales. a) Células tumorales aisladas detectada por immunohistoquímica de citoqueratina (CK) AE1/3 (adaptada de Lezid et al.<sup>86</sup>). b) Micrometástasis (adaptada de Lee et al.<sup>87</sup>). c) Macrometástasis (adaptado de Lezid et al.<sup>86</sup>).

## 1.1.9. Técnicas quirúrgicas de estadioje ganglionar

El estadioje axilar puede abordarse utilizando diferentes técnicas, desde la disección completa de ganglios linfáticos axilares o linfadenectomía axilar (LA), la biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) y la disección axilar dirigida (DAD).<sup>88</sup>

### 1.1.9.1. Linfadenectomía axilar

La disección de ganglios linfáticos axilares o linfadenectomía axilar (LA) consiste en la extirpación sistemática de los ganglios linfáticos regionales axilares. Históricamente, la LA constituía el procedimiento estándar para el estadioje axilar.<sup>89</sup> No obstante, desde la década de los 90's, la tendencia se inclina hacia linfadenectomías selectivas y más conservadoras.<sup>90</sup> En la actualidad, la indicación del vaciamiento axilar (un mínimo de 10 ganglios, al menos los ganglios de nivel I y II de Berg y III en caso de sospecha o afectación macroscópica del nivel II) es generalmente recomendada en pacientes con ganglios axilares en los que se ha detectado afectación metastásica, dadas las secuelas asociadas a la LA. Se ha demostrado un aumento de la tasa de recidiva local en pacientes con axila clínicamente positiva cuando se trataron con radioterapia respecto a las sometidas a disección de ganglios linfáticos, lo cual sugiere una indicación firme de la resección quirúrgica en estos casos.<sup>91</sup> Sin embargo, en axilas clínicamente negativas, las desventajas resultan superiores a los beneficios. Por su abordaje y localización anatómica, las complicaciones más frecuentes son la aparición de linfedema crónico, los seromas, la infección de la herida quirúrgica, la disminución de la movilidad del brazo, el síndrome del hombro doloroso crónico y la obstrucción linfática, así como otras complicaciones menores, como la tromboflebitis de la vena axilar, la flebitis superficial y el denominado *Axillary Web* o síndrome de la red axilar.<sup>89,90</sup>

### 1.1.9.2. Biopsia selectiva del ganglio centinela

La BSGC consiste en la identificación y extirpación del ganglio linfático centinela (GC). El GC se define como aquel ganglio linfático que recibe de forma directa y en primer lugar el drenaje linfático de una determinada región anatómica que incluye la lesión tumoral. Este concepto de ganglio se fundamenta en la teoría de la progresión escalonada y predecible de la migración metastásica por la vía linfática, como se ha mencionado anteriormente. De esta manera, el primer reservorio metastásico aparecería en el GC, y luego podría extenderse hacia el resto de la cadena ganglionar. La disección selectiva del GC aporta información de la diseminación metastásica global y su valor clínico reside en su capacidad predictiva sobre el estado ganglionar axilar ya que, según la teoría actual, se asume que, si el GC es negativo, el resto de los ganglios axilares tampoco presentarán metástasis. Esta teoría fue validada por Tuner *et al.*<sup>92</sup> a partir de la muestra de pacientes intervenidas por Giuliano *et al.*<sup>93</sup>, determinando una probabilidad de diseminación preferente en ganglios no centinela inferior al 0.1 %. El concepto de GC fue descrito por primera vez en 1960 por Gould *et al.*<sup>94</sup> en una disección radical durante una parotidectomía. En 1966, Chiappa *et al.*<sup>95</sup> reportaron la existencia de «centros linfáticos testiculares primarios». En oncología mamaria, Kett<sup>96</sup> (1970) fue pionero en inyectar colorante azul en la areola y detectar la existencia de flujo desde el ganglio aislado, al que denominó «ganglio de Sorgius» hacia las cadenas axilares. Años más tarde, en 1977, Cabañas<sup>97</sup> dirigió un estudio sobre cáncer de pene donde formuló la primera hipótesis del GC, que constituía la primera explicación fisiológica de este fenómeno de drenaje neoplásico. Sin embargo, no fue hasta 1992 cuando Morton *et al.*<sup>98</sup> propusieron la primera técnica intraoperatoria para la detección del ganglio en pacientes de melanoma donde, a través del uso de azul de metileno (Lymphazurin®), definieron el GC como el primer ganglio de comunicación linfática con el tumor primario. Osborne *et al.*<sup>99</sup> describieron las ventajas de la técnica BSGC para el estadioje axilar. Krag *et al.*<sup>100</sup> (1993) introdujeron una sonda gamma para la localización de radiotrazadores en cirugía de mama con resultados excelentes. En 1994, Giuliano *et al.*<sup>93</sup> publicaron las ventajas del uso de colorantes para la mejora de la técnica BSGC en pacientes de cáncer de mama, lo cual supuso un antes y un después en el manejo quirúrgico de la axila. En 1998, Miner *et al.*<sup>101</sup> utilizaron un radiofármaco guiado por ultrasonidos peritumoralmente, obteniendo una elevada tasa de positividad predictiva. En la actualidad, la técnica estándar para la BSGC, tal y como se recoge en el consenso, consiste en el uso de radiotrazadores (nanocoloide de albúmina, coloide de estaño o sulfuro de renio)

para el mapeo linfático preoperatorio y, opcionalmente, conjunta a la técnica del colorante o de sondas o técnicas de imagen intraoperatorias, especialmente si existe dificultad en la visualización de la linfogammagrafía. Los radiotrazadores son, preferiblemente, inyectados vía intra o peritumoral, especialmente en lesiones no palpables, aunque también se acepta la inoculación periareolar o subdérmica. La linfogammagrafía se realiza varias horas o el día anterior al procedimiento quirúrgico y, en caso de no detectar migración axilar, es recomendable reinyectar el trazador el mismo día. Durante la cirugía, cuando se utilizan colorantes se prioriza el uso de azul de isosulfán, azul patente V, azul de metileno o verde de indiocianina, aunque este último requiere de cámaras con detectores especiales para visualizarlo. Se inoculan dosis recomendadas de 2 ml que son inyectadas de 10 a 15 minutos antes de la intervención practicando un masaje sobre la zona para facilitar el drenaje linfático.<sup>102</sup> De esta manera, el colorante migra hasta el GC y este queda marcado con un azul intenso que permite su diferenciación del resto de tejidos, facilitando su identificación.

Se ha demostrado que la mayoría de pacientes con GC positivo no presentan enfermedad residual en el resto de los ganglios de la axila, lo que sugiere que la LA no supondría ningún beneficio respecto a la BSGC, e incluso en casos donde se encuentran afectados más ganglios axilares por metástasis, éstos eran tratados mediante la radioterapia que habitualmente se realiza sobre la mama tras la cirugía conservadora.<sup>103-107</sup> Es por esto que la BSGC se ha establecido como estándar quirúrgico para la estadificación axilar en pacientes con carcinoma de mama invasivo y ganglios linfáticos clínicamente negativos (NO), ya que se ha demostrado que resulta un procedimiento equiparable a la LA en estos subtipos tumorales.<sup>108</sup> Las indicaciones para la BSGC son todos los casos de cáncer de mama, a excepción de:<sup>102</sup>

- Afectación axilar histológicamente probada.
- Carcinomas inflamatorios.
- Neoplasias de mama con axila previamente positiva que han recibido QTNA y no han presentado respuesta radiológica.
- Tumores con afectación cutánea.

Otros criterios de exclusión para la realización de la BSGC son:<sup>102</sup>

- Verificación preoperatoria de afectación ganglionar con pruebas de imagen y citología de las adenopatías sospechosas con diagnóstico compatible con metástasis.
- Carcinomas inflamatorios.
- Radioterapia axilar.
- Carcinomas localmente avanzados con afectación ganglionar sin terapia neoadyuvante.

Si la localización del GC ha sido marcada dérmicamente en la axila por el Servicio de Medicina Nuclear, se realiza la incisión en la ubicación elegida. Si solo se dispone de colorante, la incisión en la axila se practicada en su base, 2 cm por debajo de la línea del comienzo del vello. Se diseña el tejido hasta localizar el o los GC, pudiendo diferenciar el tejido en caso de utilizar colorantes y una tendencia a azul verdoso en el linfático aferente al ganglio. Los GC seleccionados se disecan y extirpan comprobando, si es posible, la medición con la gammasonda, en el caso de que se haya utilizado el doble marcaje con radionúclidos y colorantes. Una vez extirpado el GC, debe comprobarse con palpación la presencia de ganglios anexos que puedan ser potencialmente centinelas.<sup>102</sup> Tras la resección del GC, éste es sometido a una evaluación patológica habitualmente extemporánea, por lo que la afectación del GC no indica automáticamente completar la LA. Los ganglios disecados durante la cirugía se someten a un estudio anatomico-pathológico para detectar células tumorales. El estudio anatomico-pathológico se realiza a través del estudio histológico convencional o a partir de técnicas inmunohistoquímicas para caracterizar a la citoqueratina 19 (CK19) o de la amplificación de mRNA de CK19 utilizando la técnica de amplificación de ácido ribonucleico (RNA, del inglés *Ribonucleic Acid*) conocida como OSNA (*One-Step Nucleid Acid Amplification*).<sup>102</sup>

### 1.1.9.3. Disección axilar dirigida

Como se ha mencionado anteriormente, la QTNA resulta útil para reducir la afectación ganglionar en pacientes de cáncer de mama de N+ a NO y evitar la LA, además de valorar la quimiosensibilidad del tumor y reducir la micrometástasis y la masa tumoral para optar a cirugías más conservadoras.<sup>109,110</sup> La estadificación axilar previa QTNA ha sido utilizada para

plantear la LA en la cirugía. Sin embargo, esta estrategia impide valorar la remisión de los ganglios tras QTNA, por lo que las pacientes N+ en el momento diagnóstico son tratadas con LA. Este método se encuentra en la actualidad en desuso. Se estima que cerca del 40-50 % de las pacientes N+ logran una respuesta patológica ganglionar completa tras QTNA; pudiendo beneficiarse de la BSGC y eludir las complicaciones relacionadas con la LA.<sup>104,111,112</sup> Especialmente, se ha sugerido una mejor respuesta al tratamiento con BSGC después de QTNA en subtipos TN y HER2+.<sup>113</sup> Sin embargo, la BSGC con ganglios clínicamente positivos todavía genera controversia.<sup>114,115</sup> En un metaanálisis reciente donde se incluyeron 3,578 pacientes de 27 ensayos clínicos destacaron una tasa de detección del 91 % con una tasa de falsos negativos del 15 %.<sup>107</sup>

En el ensayo clínico ACOSOG se reclutaron 663 pacientes con ganglios afectados (N1); 649 fueron sometidas a QTNA seguida de BSGC y LA. El GC no fue detectado en 46 pacientes y solo se diseccionó en 78 casos. De las 525 pacientes donde se extirparon los GC, no se detectó afectación en 215 pacientes; lo que sugiere una respuesta patológica completa en el 41 % de los ganglios afectados.<sup>104</sup> En otro estudio de cohorte multicéntrico (SENTINA) se valoró la detección del GC en 1,022 pacientes antes de QTNA con una tasa de detección del 99.1 %. En otras 592 pacientes que convirtieron de N+ a NO tras QTNA o no remitió la afectación ganglionar, solo fue posible detectar el 80.1 % de GC con una tasa de falsos negativos del 14.2 %. Además, en pacientes sometidas a una segunda biopsia tras QTNA la tasa de detección fue del 60.8 %, lo que sugiere que la BSGC es más fiable antes de QTNA.<sup>105</sup> En el ensayo FNAC, donde se incluyeron 153 pacientes, detectaron el GC tras QTNA en 127 pacientes con una tasa de falsos negativos del 8.4 %.<sup>106</sup> La tasa de falsos negativos tras QTNA está asociada a la modificación de las vías de drenaje linfático de la paciente, donde es posible que aparezcan émbolos metastásicos y que ocurran cambios fibróticos regionales, lo que conlleva a un aumento de la tasa de falsos negativos, reportada en el 12.6-14.2 % de casos.<sup>104-106</sup> Es decir, casos en los que el GC no presenta células tumorales, pero otros ganglios secundarios sí. Esta casuística presenta gran repercusión, ya que podrían mantenerse tumores quimiorresistentes en la región axilar y la lesión resultaría infraestadiada. Además, como resultado de la QTNA, los ganglios metastatizados pueden reducir su tamaño hasta aparecer irreconocibles, pudiendo pasar desapercibidos con técnicas de imagen. Para salvar esta dificultad, se ha propuesto el marcaje de GC previa QTNA para la BSGC durante la cirugía en un enfoque conocido como DAD. Esta técnica, también conocida como Biopsia Dirigida del Ganglio Centinela (BDGC), permite la localización selectiva del GC y para su exéresis individual.<sup>88</sup> Las diferentes técnicas de marcaje del GC previa QTNA se detallan en el Apartado 1.3.

## 1.2. Histología y fisiología de los ganglios linfáticos

### 1.2.1. Función y estructura del sistema linfático

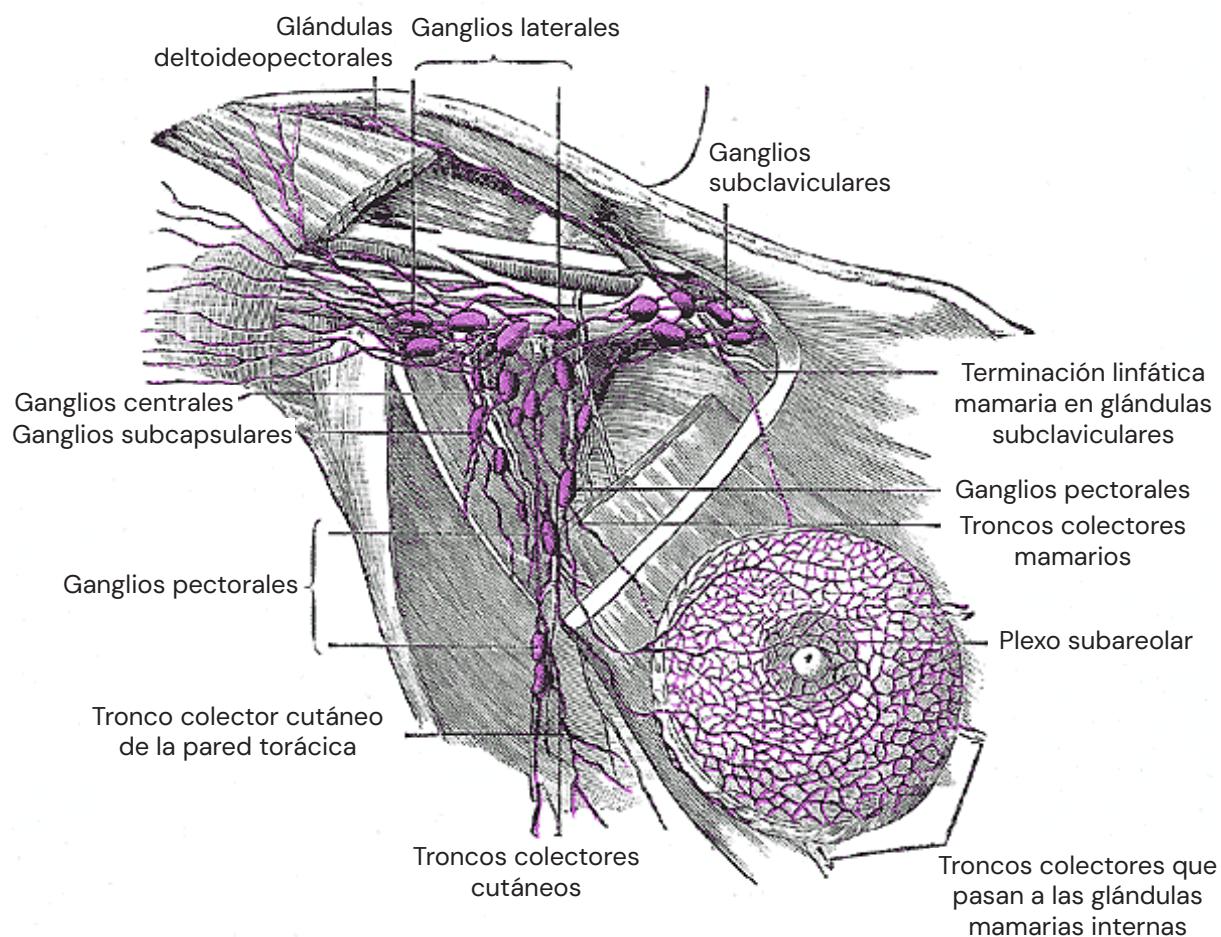
El sistema linfático es un circuito unidireccional formado por una red de ganglios y vasos linfáticos que se origina en los capilares linfáticos ubicados en los espacios intersticiales, punto en el que convergen los capilares sanguíneos y forman vénulas.<sup>116</sup> Este sistema de drenaje es paralelo al sistema venoso y cumple tres funciones básicas: drenar el líquido intersticial, transportar lípidos, macromoléculas y proteínas, y facilitar la respuesta inmunitaria.<sup>116,117</sup>

Estructuralmente, los capilares linfáticos se organizan formando vasos linfáticos que emergen de la unión de capilares linfáticos y muestran una estructura tritúrica y válvulas unidireccionales. Los vasos linfáticos superficiales y profundos se fusionan formando vasos más grandes, los troncos linfáticos. El transporte de la linfa desde los capilares hasta los ganglios linfáticos está mediado por los colectores linfáticos prenodosales. Los colectores linfáticos son permeables al agua y pequeñas moléculas; y su pared está conformada por tres capas diferenciadas: la íntima (formada por endotelio, una membrana basal y una capa de tejido subendotelial), la muscular media (con células musculares) y la adventicia (con fibras colágenas, incluyendo vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas).<sup>118</sup> El trayecto de los vasos linfáticos es frecuentemente interrumpido por los ganglios linfáticos, cuya anatomía y organización celular se detalla a continuación.

## 1.2.2. Anatomía de las cadenas ganglionares mamarias

La mama presenta una amplia arborización linfática multidireccional a través de la piel y del tejido parenquimatoso. Las vías linfáticas mamarias constituyen una red alrededor de los acinos y los lóbulos mamarios cuyos vasos colectores discurren siguiendo la trayectoria de los conductos galactóforos hasta desembocar en el plexo subareolar. El concepto de plexo fue descrito por Sappey en 1885 como «un casquete situado encima de la glándula mamaria» cuyos límites coinciden con los de la areola y, conforme el entramado se extiende de manera periareolar, pierde progresivamente densidad hasta terminar comunicándose periféricamente con los vasos de la piel, en su cara superficial con los vasos de la areola y el pezón y en su cara profunda con los vasos yuxtagalactofóricos. Este mismo autor sugirió que toda la linfa mamaria confluía en el plexo subareolar y desde allí drenaba preferentemente a los grupos ganglionares axilares.<sup>119</sup> No obstante, a nivel anatómico se han descrito otros vasos linfáticos independientes al plexo subareolar que discurren desde los linfáticos perilobulillares, lo cual sugiere la existencia de una vía principal que drena hacia las cadenas axilares y otras vías accesorias que dirigen la linfa en menor proporción hacia otros grupos ganglionares, como los ganglios mamarios internos o los intercostales posteriores.<sup>84,120,121</sup>

Anatómicamente, es posible diferenciar dos grandes cadenas ganglionares mamarias: axilar y mamaria interna (**Figura 1.2**). aunque existen otras cadenas de drenaje linfático.<sup>84,120,121</sup>



**Figura 1.2.** Anatomía de los ganglios linfáticos mamarios. Adaptada de Standring et al.<sup>122</sup>

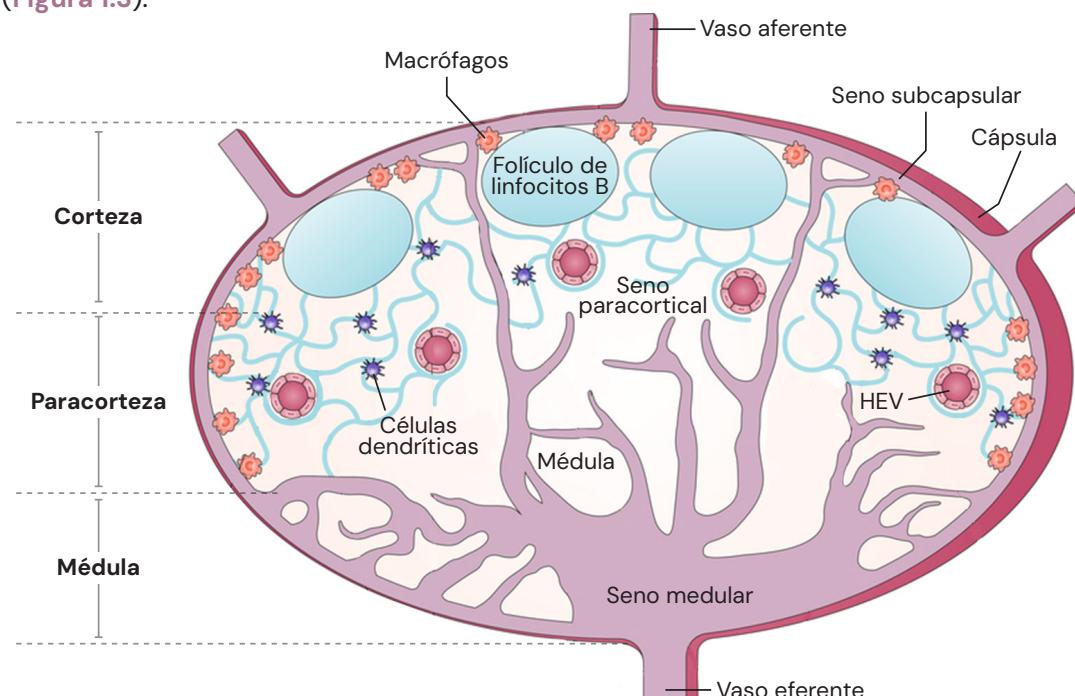
De esta manera, los ganglios linfáticos regionales de la mama se clasifican como:<sup>84,120,121</sup>

1. Ganglios linfáticos axilares (ipsolaterales): esta vía linfática drena en una red subareolar a través de la cual fluye el 75% de la linfa mamaria y se dirige hacia la axila. En función de su localización respecto al músculo pectoral menor, es posible diferenciar los ganglios de este subgrupo en tres niveles anatómicos, denominados grados de Berg:

- 1.1. Nivel I (pectorales). Borde lateral del músculo pectoral menor, incluyendo los grupos mamario externo, inferior de la vena axilar y escapular.
- 1.2. Nivel II (interpectorales). Entre los bordes medial y lateral del músculo pectoral menor e incluye ganglios linfáticos centrales y de Rotter.
- 1.3. Nivel III (apicales o infraclaviculares). Medialmente al borde medial del músculo pectoral menor e inferior a la clavícula e incluye el grupo subclavicular.
2. Ganglios linfáticos mamarios internos (ipsolaterales), ubicados a lo largo del trayecto de la arteria y vena mamarias internas, entre la pleura y la pared torácica cerca del margen esternal y alcanzan los ganglios paraesternales.
3. Ganglios linfáticos supraclaviculares, localizados en la fosa supraclavicular, en el triángulo imaginario definido por el músculo y tendón omohioideo en su borde lateral y superior, por la vena yugular interna en su borde medial y la clavícula y vena subclavia en su borde inferior.
4. Ganglios linfáticos interpectorales (de Rotter). Grossman y Rotter describieron un cuarto subgrupo de ganglios ubicados entre el músculo pectoral mayor y menor, conocidos como ganglios linfáticos interpectorales o de Rotter.

### 1.2.3. Estructura y función del ganglio linfático

Los ganglios son nódulos de tejido linfoide de forma redondeada que se intercalan en el recorrido de los vasos linfáticos, con una dimensión variable, entre ~0.3 y 3 cm. Actúan como filtros inespecíficos para materia particulada gracias a la función de las células fagocíticas, evitando que alcancen la circulación general. Además, permiten la interacción de los linfocitos con nuevos antígenos y con células presentadoras de antígenos en la interfase linfa-sangre actuando en la respuesta inmunitaria temprana. La linfa accede al ganglio linfático a través de los conductos aferentes, y sale de él por los vasos eferentes y el hilio. Los colectores postnodales salen por el hilio y se dirigen a otro grupo de ganglios o a grandes troncos linfáticos.<sup>116-118</sup> Estructuralmente, los ganglios linfáticos están conformados por dos partes diferenciadas: la cápsula y el parénquima, que a su vez incluye la corteza, la paracorteza y la médula (**Figura 1.3**).



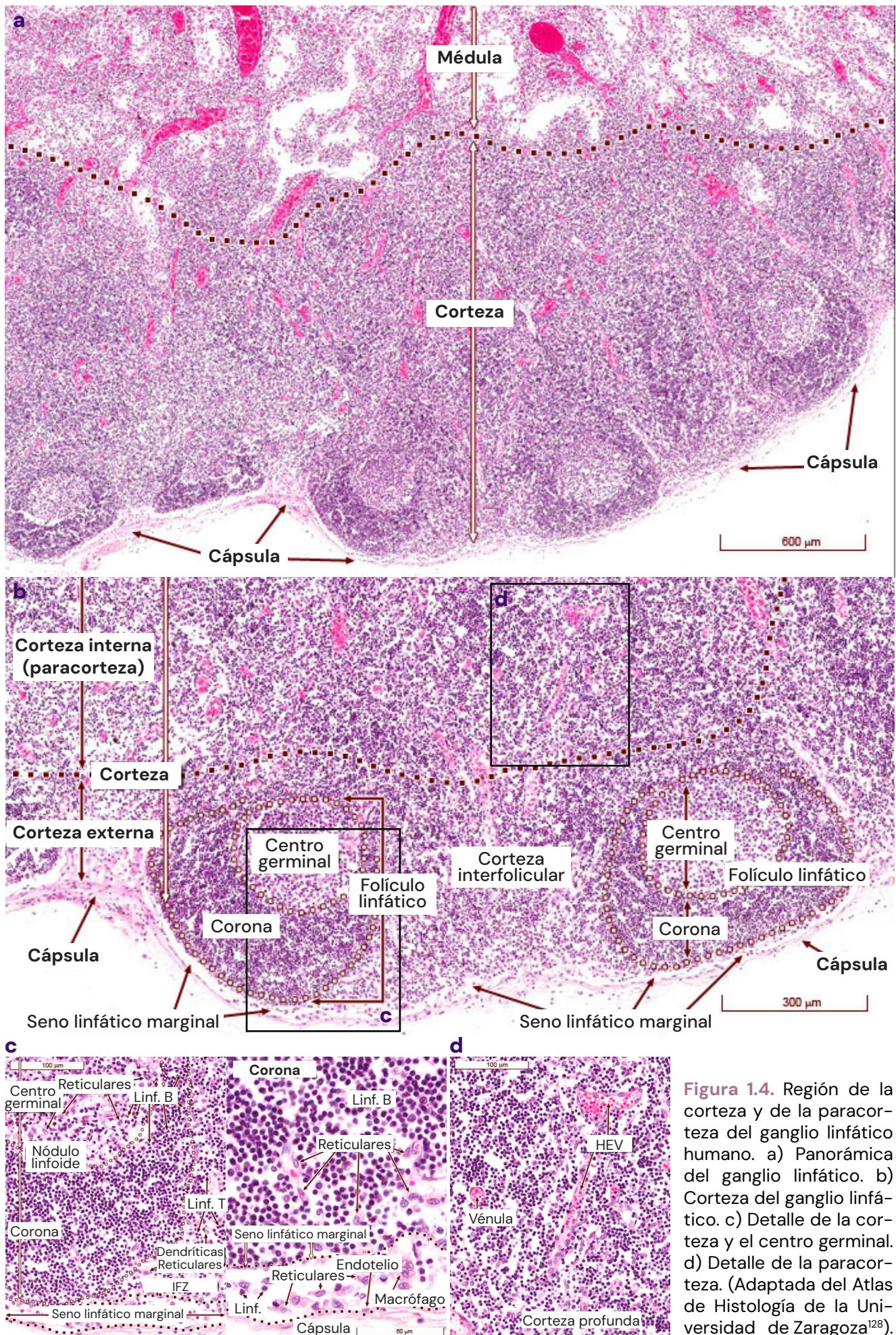
**Figura 1.3.** Estructura del ganglio linfático humano (sección medial sagital) (adaptada de Schudel et al.<sup>123</sup>).

**Cápsula.** La cápsula está formada por tejido conjuntivo denso irregular relativamente grueso, compuesto por elastina, colágeno y fibroblastos y rodeado por tejido adiposo.<sup>124</sup> Esta estructura proyecta trabéculas hacia el interior dividiendo el ganglio en lóbulos. Anexa a la cápsula existe una capa de tejido adiposo pericapsular que contiene arterias y venas que irrigan el ganglio linfático (**Figura 1.4 a**).<sup>122,125,126</sup>

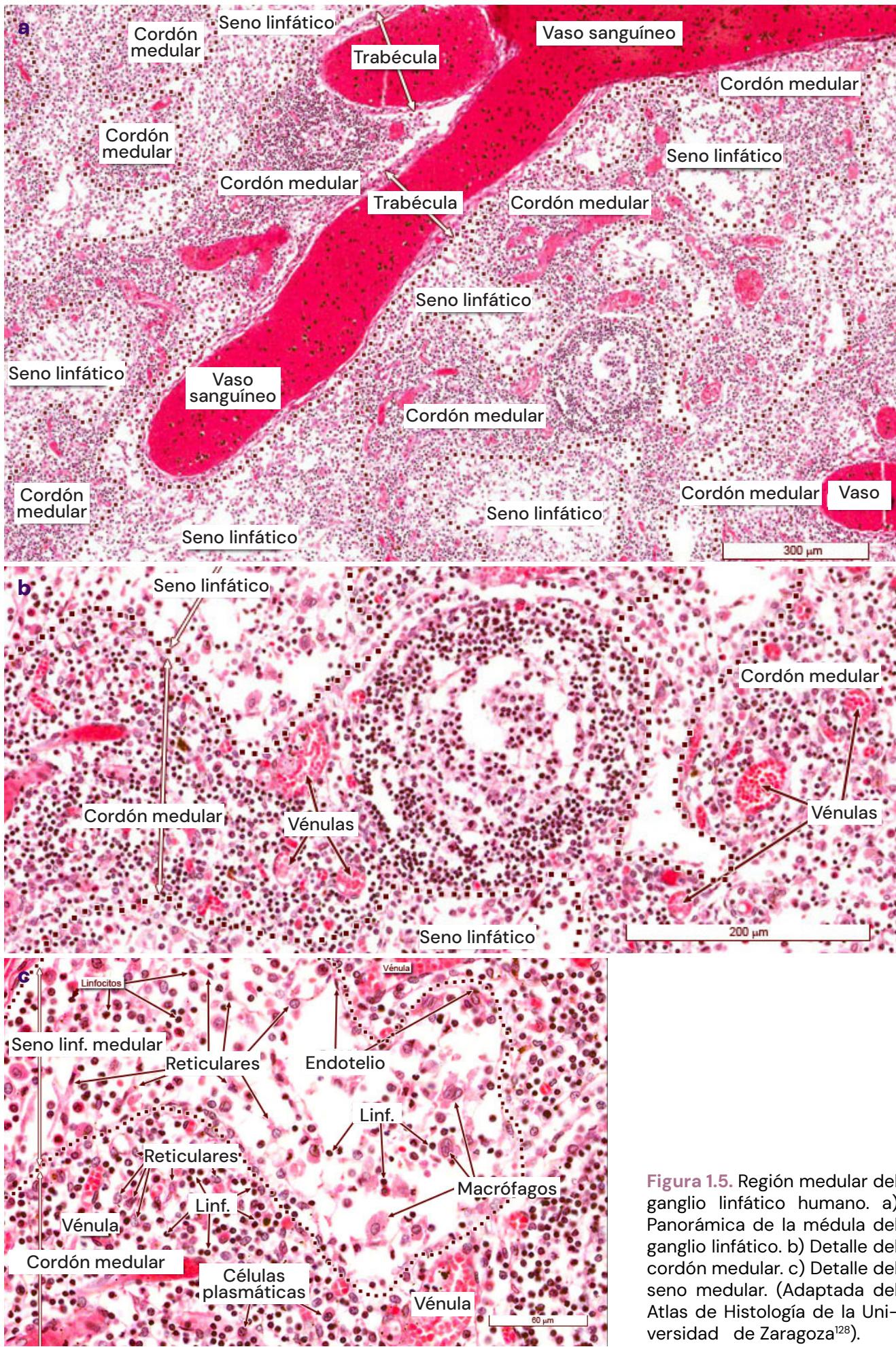
**Corteza.** La corteza externa está formada por el seno subcapsular, el seno cortical y los nódulos linfáticos (**Figura 1.4 b,c**). Principalmente, en la corteza se encuentran agregados de linfocitos y células dendríticas especializadas que forman los nódulos linfáticos. En la corteza hay nichos que contienen principalmente linfocitos B y células dendríticas foliculares (FDC, del inglés *Follicular Dendritic Cell*), conocidas como folículos linfáticos de células B, así como zonas interfolículares (IFZ, del inglés *Interfollicular Zone*), que separan los distintos folículos de linfocitos B.<sup>122,125-127</sup> En el seno subcapsular se libera el líquido linfático que accede al ganglio por los canales aferentes, y desde allí se desplaza a los senos corticales que discurren paralelos a la trabeculación capsular en dirección al seno medular. Los procesos dendríticos y las fibras perforan el endotelio de los senos trabeculares. A través de estos orificios, las células presentadoras de antígeno, el antígeno circulante o los linfocitos libres pueden introducirse en el ganglio linfático. En esta capa cortical también coexisten linfocitos T auxiliares y linfocitos B, siendo estos más abundantes. Los folículos (o nódulos) linfáticos se ubican en las extensiones de las FDC y consisten en colecciones esféricas de linfocitos altamente empaquetados. Éstos pueden tener un centro germinal si son folículos primarios, que no aparece en los folículos secundarios. Los folículos primarios típicamente presentan linfocitos inactivos, mientras que los folículos secundarios muestran una colección heterogénea de linfocitos B activados. En el centro germinal se encuentran tres zonas diferenciadas: la zona oscura, la zona clara y la zona de manto que facilitan la activación de los linfocitos B, siendo la zona del manto donde residen inactivados y coexisten con células dendríticas foliculares, macrófagos, linfocitos T y células reticulares de sostén. La zona clara se caracteriza por la presencia de linfocitos B en proceso de diferenciación hacia una célula B de memoria o una célula plasmática (centrocitos); que en caso de mostrar alta afinidad con los antígenos de las células dendríticas foliculares, estos se mantendrán. Sin embargo, los que no presenten esta afinidad entrarán en apoptosis. En esta misma zona, los macrófagos colaboran en la eliminación de los linfocitos B apoptóticos, mientras que los linfocitos T apoyan a las células B en su desarrollo y maduración. Finalmente, la zona oscura del centro germinal muestra linfocitos B inmaduros (centroblastos) con altas tasas de proliferación.<sup>122,125-127</sup>

**Paracorteza.** La paracorteza es la zona cortical profunda, caracterizada por la ausencia de nódulos linfoides y un número de linfocitos T aumentado, especialmente de tipo CD4+ y CD8+ (**Figura 1.4 d**). Esta región es también conocida como zona de células T (TCZ, del inglés *T Cell Zone*) y contiene numerosas FRC, actuando como un componente integral del sistema de conductos que se ramifica en toda la extensión de la paracorteza.<sup>127</sup> Además, esta región es rica en venas de endotelio alto (HEV, por sus siglas en inglés *High Endothelial Venules*), a través de las cuales los leucocitos acceden al parénquima del ganglio a través de la migración transendotelial.<sup>122,125,126</sup>

**Médula.** La médula está formada por linfocitos menos organizados en forma de cordones medulares irregulares (**Figura 1.5 a**). Esta región se caracteriza por la presencia de extensiones de tejido linfático denso que se dirigen al centro del ganglio; los cordones medulares. Además, están formados por otro tipo de estructuras, los senos linfáticos medulares. Estos últimos están integrados por células endoteliales y reticulares aplanadas, que emiten finas prolongaciones capaces de atravesar la luz de los senos, generando una superficie irregular. Estas estructuras permiten la circulación de linfa y linfocitos, ya que las paredes de los senos son fácilmente atravesadas por linfa, moléculas proteínicas y diversas líneas celulares (**Figura 1.5 b**). Los cordones medulares se encargan de la formación de células plasmáticas, y además contienen principalmente linfocitos y macrófagos (**Figura 1.5 c**). Es a través de los senos medulares donde la linfa se drena desde los senos corticales al conducto linfático eferente a través del hilio.<sup>122,125,126</sup>



**Figura 1.4.** Región de la corteza y de la paracorteza del ganglio linfático humano. a) Panorámica del ganglio linfático. b) Corteza del ganglio linfático. c) Detalle de la corteza y el centro germinal. d) Detalle de la paracorteza. (Adaptada del Atlas de Histología de la Universidad de Zaragoza<sup>128</sup>).



**Figura 1.5.** Región medular del ganglio linfático humano. a) Panorámica de la médula del ganglio linfático. b) Detalle del cordón medular. c) Detalle del seno medular. (Adaptada del Atlas de Histología de la Universidad de Zaragoza<sup>128</sup>).

## 1.2.4. Tipos celulares en el ganglio linfático

El tejido linfático está formado por una componente fibrilar y tres grandes poblaciones celulares diferenciadas en el parénquima ganglionar que provienen de células madre hematopoyéticas (**Figura 1.6**): las células linfoideas, las células del estroma y las células accesorias.<sup>129</sup>

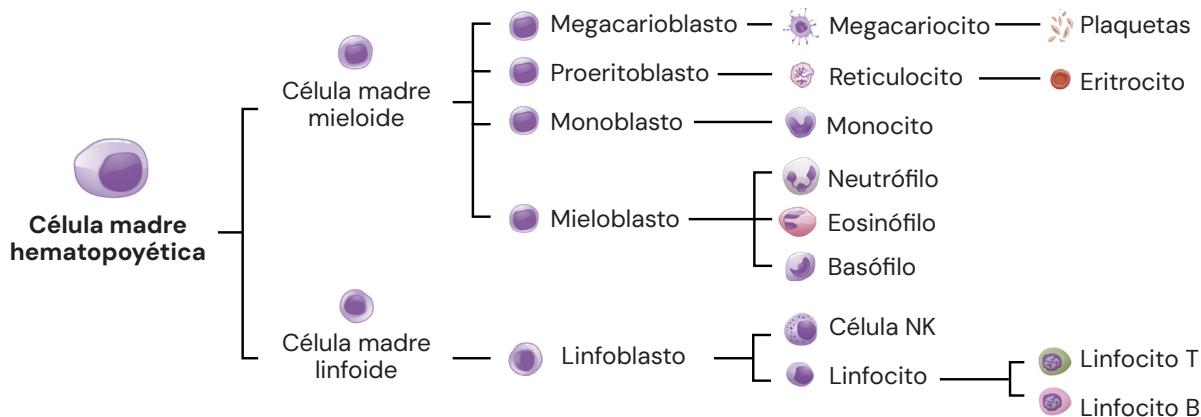


Figura 1.6. Origen de las líneas hematopoyéticas de la estirpe mieloide y linfoide.

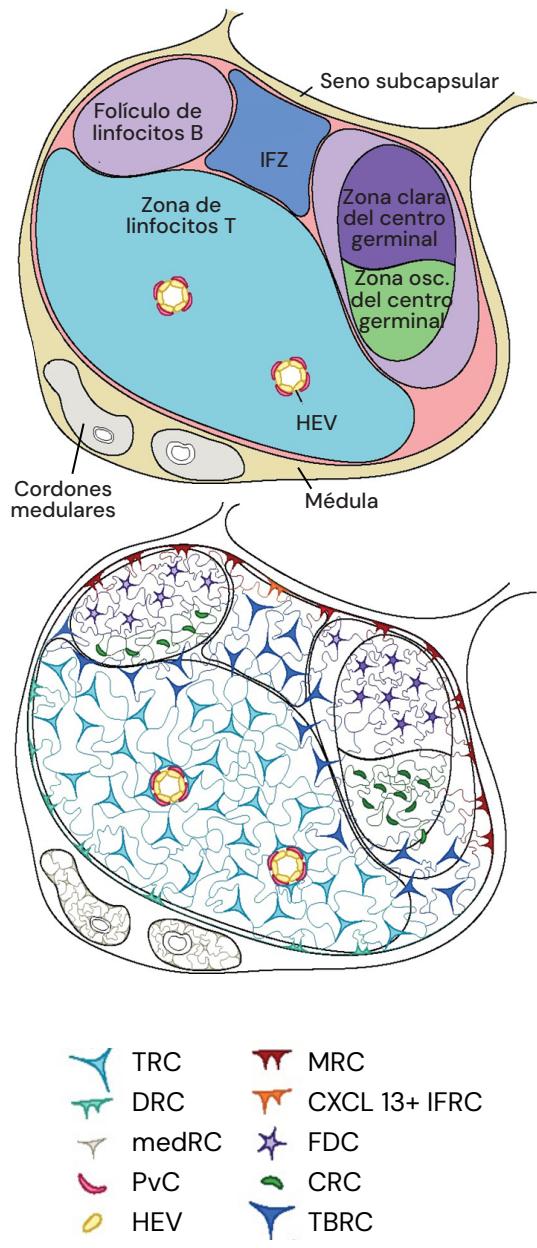
### 1.2.4.1. Linfocitos y células plasmáticas

Los linfocitos comprenden dos grupos celulares: los linfocitos B, que actúan frente a antígenos libres o ligados a células; y los linfocitos T, que pueden ser reguladores, supresores o efectores. Los linfocitos T reguladores, donde se incluyen los linfocitos T colaboradores, cooperan con los de tipo B para estimular su proliferación y diferenciación a células plasmáticas. Los linfocitos T supresores actúan sobre los linfocitos T colaboradores para regular su actividad y modular la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas. Por último, los linfocitos T efectores, donde se incluyen los linfocitos T citotóxicos y las células *Natural Killer* (NK), son capaces de lisar células diana que presenten antígenos específicos a través del mecanismo de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos.<sup>124</sup> Los linfocitos B y T son indistinguibles bajo microscopía electrónica. Ambos presentan formas redondeadas, con cromatina más densa y menos marginal que otras líneas celulares. En función de su madurez, pueden variar en tamaño y apariencia. El linfocito se diferencia del linfoblasto en que la célula es de menor tamaño, el núcleo tiene una forma más irregular y los orgánulos citoplasmáticos están agrupados a un lado de la célula. En tejido linfático, estas células suelen medir entre 8 y 10 µm.<sup>129-132</sup>

Las células plasmáticas provienen de linfocitos B activados y, principalmente, se encargan de la producción de anticuerpos. Las células plasmáticas alcanzan de 10 a 20 µm y aparecen en menor cantidad. A nivel ultraestructural, se identifican fácilmente por la gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso (RER, del inglés *Rough Endoplasmic Reticulum*) que, habitualmente, se muestra en disposición concéntrica en el citoplasma. Las cisternas internas del RER están frecuentemente dilatadas y llenas de material gris homogéneo. Otro rasgo distintivo es la presencia de aparatos de Golgi perinucleares bien desarrollados. En estas células, se observan abundantes mitocondrias en la región periférica del citoplasma, junto a gránulos redondos y electrondensos de tamaño variable. Su núcleo también presenta algunas características distintivas, como la presencia de bandas anchas e irregulares de cromatina perinuclear.<sup>132-134</sup>

### 1.2.4.2. Células del estroma

Las células del estroma ganglionar actúan como un andamio, forman una red para la migración de las células inmunitarias y tienen un papel clave en la respuesta inmunitaria. El estroma dendrítico-reticular engloba tanto a las células anteriormente descritas como las reticulares como las dendríticas, dado que colaboran en la organización y regulación del tejido linfático y desempeñan funciones complementarias.<sup>135</sup> Se ha propuesto que estas células se diferencian a partir de células madre mesenquimales (MSC, del inglés *Mesenchymal Stem Cell*) presentes en el ganglio linfático.<sup>136</sup> Las células del estroma comprenden numerosos subconjuntos celulares dependiendo de su función, fenotipo y ubicación en el ganglio linfático (**Figura 1.7**).



De entre ellas, las células retículas fibroblásticas (FRC, del inglés *Fibroblastic Reticular Cell*) conforman el subconjunto principal.<sup>135</sup> El grupo de células FRC se encuentra principalmente en la corteza del ganglio y se encargan de la producción de fibras reticulares ricas en colágeno I y III que forman una red tridimensional, proveyendo al ganglio no solo de un tamiz poroso sino también de un entramado para el sostén y guía del movimiento de las células dendríticas y linfocitos T y B.<sup>137,138</sup> Además, las FRC producen componentes de la matriz extracelular (ECM, del inglés *Extracellular Matrix*), incluyendo ER-TR7, fibrilina, lamina, fibronectina.<sup>139</sup> Además, las FRC producen quimiocinas homeostáticas, CCL19 y CCL21, permitiendo la migración y localización de células inmunitarias, así como de interleuquina (IL) IL7, importante en la señalización de supervivencia para las linfocitos T y B, y del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*) contribuyendo al mantenimiento de la tolerancia de los linfocitos T.<sup>135</sup> Dentro de las FRC, se encuentran las células reticulares de la zona de células T (TRC, del inglés *T Cell zone Reticular Cell*), las células reticulares dendríticas (DRC, del inglés *Dendritic Reticular Cell*), las células reticulares medulares (medRC, del inglés *Medullar Reticular Cell*) y las células reticulares de la corteza (TBRC, del inglés *T-B Reticular Cell*) (**Tabla 1.8**). En general, las FRC son fusiformes o estrelladas, con numerosos procesos citoplasmáticos y un citoplasma rico en RER, aparatos de Golgi y mitocondrias. El abundante RER de las FRC permite la síntesis y secreción de componentes de la ECM.<sup>129,132,140</sup>

**Figura 1.7.** Distribución de las células estromales del ganglio linfático (MRC: células reticulares marginales, IFRC: células reticulares interfolículares, FDC: células dendríticas foliculares, CRC: células reticulares Cxcl12+, TBRC: células dendríticas reticulares de la corteza, TRC: células reticulares de zonas de linfocitos T, DRC: células dendrítico-reticulares, medRC: células reticulares de la corteza, PvC: células perivasculares, HEV: vénula del endotelio alto). Adaptada de Cinti et al.<sup>135</sup>

**Tabla 1.8.** Localización, marcadores, factores secretados y función del subconjunto de células estromales FRC. Adaptada de Cinti et al.<sup>135</sup>

	Localización	Marcadores	Factores secretados	Función
TRC	Zona de linfocitos T	Pdpn, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , Vimentina, desmina, ER-TR7, BP3 (CD157)	CCL19, CCL21, IL-7, VEGF	Soporte estructural, formación de conductos, migración y localización de células T y DC.
DRC	Frontera entre la corteza profunda y la médula	Pdpn, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , desmina, ER-TR7	CXCL12, CCL21	Sostén y organización de linfocitos B.
medRC	Cordones medulares	Pdpn, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , desmina, ER-TR7	BAFF, IL-6, ABRIL CXCL12	Migración y supervivencia de células plasmáticas, salida de linfocitos.
TBRC	Frontera entre zonas de linfocitos T y B e IFZ	Pdpn, PDGFR $\alpha$ , desmina, ER-TR7	CCL19, CCL21, CXCL13, BAFF, CXCL12	Organización y supervivencia de linfocitos T y B.

En la clasificación anterior propuesta por Cinti *et al.*<sup>135</sup>, las células CXCL13+ se agrupan dentro de otro subconjunto de células denominadas como células reticulares de la zona B (BRC, del inglés *B zone Reticular Cell*), donde se incluyen: las células dendríticas foliculares (FDC, del inglés *Follicular Dentritic Cell*), células reticulares CXCL12+ (CRC), células interfoliculares (IFRC, del inglés *Interfollicular Reticular Cell*) CXCL13+ y las células reticulares marginales (MRC, del inglés *Marginal Reticular Cell*) (**Tabla 1.9**).

**Tabla 1.9.** Localización, marcadores, factores secretados y función del subconjunto de células estromales BRC. Adaptada de Cinti *et al.*<sup>135</sup>

	Localización	Marcadores	Factores secretados	Función
FDC	Folículos de linfocitos B y zona clara de los folículos	Pdpn, desmina, CR1/2, (CD21/35), FC $\gamma$ RII (CD32), Fc $\epsilon$ RII (CD23)	CXCL13, BAFF	Captura y visualización de antígenos, migración y supervivencia de células B, soporte de la zona clara.
CRC	Folículo de linfocitos B y zona oscura de los folículos	Pdpn, PDGFR $\alpha$ , desmina,	CXCL12	Migración de células B del centro germinal, soporte de zona oscura.
MRC	Senos subcapsulares y folículos	Pdpn, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , desmina, MAdCAM-1, RANKL, ER-TR7	CXCL13, IL-7	Precursor de FDC, soporte estructural, localización de células inmunitarias.
IFRC	Senos subcapsulares y regiones IFZ	Pdpn, PDGFR $\alpha$ , desmina, PDGFR $\beta$ , RANKL, ER-TR7	BAFF, IL-7, CXCL13	Localización y supervivencia de células linfoides innatas, linfocitos T y B.

Dentro de esta clasificación, las últimas células estromales que se consideran en el ganglio linfático son las células perivasculares (PvC, del inglés *Perivascular Cell*), que actúan como sostén de las estructuras vasculares y se cree que son células progenitoras de TRC y BRC (**Tabla 1.10**).<sup>135</sup>

**Tabla 1.10.** Localización, marcadores, factores secretados y función del subconjunto de células estromales perivasculares. Adaptada de Cinti *et al.*<sup>135</sup>

	Localización	Marcadores	Factores secretados	Función
PvC	Capilares, vénulas del endotelio alto	PDGFR $\beta$ , $\alpha$ SMA, ITGA7	CCL19, CCL21	Soporte HEV, progenitor de células TRC y BRC.

De entre las PvC, destacan los pericitos (PC), que se encuentran en la zona abluminal de las células endoteliales vasculares, con las que comparten una membrana basal común. Estas células desempeñan un papel fundamental en la regulación de diversas funciones vasculares, como la homeostasis microvascular, la angiogénesis, la remodelación vascular, la regresión y la estabilización vasculares.<sup>141,142</sup> Aunque se han atribuido múltiples funciones a los PC, todavía se desconoce en profundidad este tipo celular, aunque se sabe que constituyen una población celular heterogénea.<sup>143</sup> Un estudio en el que se aislaron PC de distintos tejidos mostró diferentes expresiones génicas y capacidad de diferenciación.<sup>144</sup> Incluso se han demostrado diferencias entre pericitos de un mismo tejido y vaso.<sup>145</sup> Anteriormente se ha mencionado que las células estromales del ganglio derivan de MSC.<sup>136</sup> Algunos estudios sugieren que los PC dan lugar a las MSC, aunque tampoco se ha descartado que sean MSC en sí mismas, o que poblaciones específicas de PC puedan diferenciarse a otros tipos celulares estromales.<sup>143</sup>

### 1.2.4.3. Células accesorias

Entre las células accesorias (o no linfáticas) es posible encontrar, aunque no exclusivamente; macrófagos y monocitos, mastocitos y granulocitos, incluyendo neutrófilos, eosinófilos y basófilos.<sup>129</sup>

Los macrófagos son responsables de multitud de funciones esenciales para el cuerpo, incluyendo la inmunidad innata, la función metabólica, la eliminación de desechos celulares y la reparación y remodelación de tejidos.<sup>146</sup> Los monocitos pueden diferenciarse a diferentes fenotipos de macrófago dependiendo de las señales del microentorno. En concreto, pueden adoptar un fenotipo proinflamatorio (M1) caracterizado por la alta tasa de liberación de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*); o un fenotipo M2 que reduce la inflamación y promueve la reparación de los tejidos. Se trata de grandes células, de entre 10 y 30 µm, de forma irregular con núcleos grandes y, a menudo, dentados. Uno de los aspectos distintivos de los macrófagos es que presentan proyecciones citoplasmáticas en forma de pseudópodos o lamelipodios en su estado activo. Además, en su citoplasma suelen observarse numerosas vesículas endocíticas/fagosomas, lisosomas primarios y fagolisosomas.<sup>147,148</sup> Sus precursores, los monocitos, a diferencia de los macrófagos son más redondeados, con cromatina más densa y menos marginal y con escasos orgánulos citoplasmáticos, al tratarse de células menos diferenciadas.<sup>132,149</sup>

Los granulocitos son un tipo de leucocitos con un papel activo en la inmunidad innata y adaptativa. Los granulocitos se clasifican en neutrófilos, eosinófilos, basófilos (que son granulocitos circulantes) y mastocitos (células residentes); y no siempre son bien distinguidas en microscopía electrónica. Los neutrófilos pueden fagocitar y eliminar patógenos intracelulares a través de sus proteínas antimicrobianas granulares, y patógenos extracelulares mediante la liberación de proteínas antimicrobianas en un proceso de desgranulación o mediante la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, del inglés *Neutrophil Extracellular Traps*).<sup>150</sup> Si bien cumplen con esta primera línea de defensa innata, los neutrófilos activados también liberan factores quimiotácticos que promueven la migración de otras células inmunitarias innatas y adaptativas, incluidas las células dendríticas, a los sitios de infección y a los ganglios linfáticos cercanos.<sup>150</sup> Los neutrófilos son mayoritarios (45–75 % de los leucocitos) y presentan gránulos específicos de 0.2–0.5 µm mayoritariamente compuestos de mieloperoxidasa, elastinas, colagenasas, defensinas, lisozimas, catelicidinas y lactoferrinas. Presentan un núcleo multilobulado, normalmente en 3 ó 4 segmentos interconectados por puentes nucleares. Muestran tendencia a ser esféricos en la sangre, pero en tejido conectivo son largos y ovoideos.<sup>132,140,151</sup> Los eosinófilos activados actúan como reguladores en los procesos de inmunidad adaptativa.<sup>152</sup> De nuevo, sus gránulos son ricos en proteínas antimicrobianas, que pueden liberarse en respuesta a patógenos.<sup>150</sup> Los eosinófilos son menos frecuentes (2–5 % de los leucocitos) y suelen mostrar el núcleo bilobulado. En su citoplasma contienen gránulos compuestos de proteínas (principalmente eosinofil peroxidasa y proteína catiónica de eosinófilo), enzimas lisosomales, histamina y leucotrienos, citoquinas y factores de crecimiento. Los gránulos presentan un tamaño de entre 0.5 y 1 µm con núcleo cristalino interno a menudo electronenso en su fase madura.<sup>132,140,151</sup> Los basófilos son los menos numerosos (0.5 % de los leucocitos) y participan en la respuesta inflamatoria, aunque sus funciones efectoras e inmunomoduladoras todavía no se conocen completamente.<sup>150</sup> Típicamente muestran núcleos poco lobulados y citoplasmas ricos en grandes gránulos (de 0.5 a 1.5 µm), que son lisosomas primarios con histamina, heparina, leucotrienos y citoquinas empaquetadas.<sup>132,140,151</sup>

Los mastocitos (o células cebadas) residen repartidos por la mucosa y el epitelio de los tejidos vascularizados y se encargan de sintetizar y almacenar en grandes gránulos diversos mediadores inflamatorios, incluyendo histamina, serotonina, citoquinas o proteoglucanos, entre otros.<sup>153</sup> Se caracterizan por presentar estos gránulos redondos delimitados por membrana y con densidad variable, que suelen medir entre 0.5 y 1 µm y ocupan gran parte del citoplasma. Los mastocitos muestran pocas mitocondrias y poco RER. Estas células miden de 20 a 30 µm, muestran núcleos redondos ubicados en el centro con grandes aglomeraciones de cromatina y es típico encontrarlas cerca de vasos sanguíneos.<sup>132,140,154,155</sup>

# 1.3. Técnicas de marcaje del ganglio centinela

## 1.3.1. Técnicas de marcaje ganglionar para la BSGC

El objetivo de la BSGC es la localización y disección del ganglio o ganglios linfáticos primariamente comunicados con el tumor primario. Para ello, es común utilizar técnicas de marcaje del ganglio centinela pre e intraoperatorias. Sin embargo, la identificación intraoperatoria del GC no resulta evidente, especialmente en mujeres con alto índice de masa corporal (IMC).<sup>156</sup> Para esquivar esta limitación, se han desarrollado sistemas de marcaje basados en colorantes y radiotrazadores, que además pueden ser utilizados en combinación. Normalmente, la técnica exclusiva de colorante está desaconsejada, aunque el marcaje con radiotrazadores requiere equipos especializados para la detección de radiación gamma no siempre disponibles.<sup>102</sup>

### 1.3.1.1. Radiocoloides

El marcaje basado en radiocoloides típicamente consiste en la inyección de partículas marcadas con  $^{99m}\text{Tc}$ . El coloide es transportado por la linfa y fagocitado por macrófagos en los ganglios linfáticos, de manera que una cantidad mayoritaria del coloide residirá en el GC durante la intervención quirúrgica. La retención de las partículas del coloide en los ganglios linfáticos dependerá de la internalización en macrófagos, por lo que dos requisitos indispensables en los radiotrazadores son una carga superficial neta negativa y que los compuestos sean opsonizados.<sup>157</sup> La dosis de radiocoloides establecida depende de las recomendaciones del fabricante, aunque se recomienda inocular entre 0.5 y 3 mCi de 2 a 24 horas antes de la cirugía, aunque puede variar según la vía de administración utilizada.<sup>148,159</sup> La vía de administración del radiotrazador es variable. Pueden realizarse inyecciones profundas (parenquimatosas: peritumorales, subtumorales e intratumorales) o superficiales (epidérmicas: intradérmicas, subdérmicas, periareolares y subareolares). La técnica más practicada es la inyección peritumoral, aunque también son frecuentes la inyección periareolar y la subdérmica.<sup>102,158</sup>

La velocidad de diseminación hasta los nódulos linfáticos es variable y está asociada inversamente al tamaño de partículas del coloide.<sup>159</sup> En función del tamaño de la partícula, es posible diferenciar entre tres coloides diferentes:<sup>160</sup>

1. Nanocoloides, con un diámetro entre 2 y 20 nm. Algunos ejemplos de nanocoloides son los compuestos tecneciados de seroalbúmina humana, dextrano o trisulfuro de antimonio.
2. Coloides de tamaño intermedio, con tamaños comprendidos entre 20 y 100 nm. En este grupo se incluye la albúmina nanocoloidal, el sulfuro coloidal de tecnecio filtrado, el sulfuro de renio y el sulfuro de tecnecio estabilizado con gelatina.
3. Coloides de tamaño grande, con diámetros superiores a 100 nm, como el sulfuro coloidal no filtrado (100–400 nm) o la albúmina microcoloidal de tecnecio ( $>1\ \mu\text{m}$ ).

Los radiotrazadores preferidos en la práctica clínica para linfogammagrafía son el  $^{99m}\text{Tc}$ -sulfuro coloidal sin filtrar (15 nm–5  $\mu\text{m}$ ) o filtrado a 0.22  $\mu\text{m}$ , especialmente en EEUU. En Europa, es más común el radiocoloide  $^{99m}\text{Tc-HSA}$  (4–100 nm) y en Australia y Canadá el radiocoloide favorito es el trisulfuro de  $^{99m}\text{Tc}$ -antimonio (3–30 nm).<sup>159</sup> Además de los radiocoloides convencionales, existe una creciente tendencia a la inoculación de radiofármacos, como el Lymphoseek® ( $^{99m}\text{Tc}$ -tilmanocept), que presentan especificidad frente a receptores de membrana de los macrófagos y, por tanto, su infiltración ganglionar ya no es dependiente del tamaño de la partícula, pudiendo además ser eliminado rápidamente del lugar de la inyección por su reducido peso molecular.<sup>161</sup>

La realización de una linfogammagrafía preoperatoria tras la inyección del radiotrazador isotópico es fundamental para la planificación de la BSGC. Esta imagen radiológica se adquiere con los objetivos de asegurar la migración del coloide, de mapear el patrón de dise-

minación linfático y de ubicar la localización del GC. La linfogammagrafía de GC altamente metastatizados está contraindicada, ya que pueden pasar desapercibidos por el comportamiento biológico de las células tumorales, que pierden su capacidad de «retención» de los radiotrazadores. Si la detección del GC entraña dificultad, es posible combinar la linfogammagrafía con otras técnicas de imagen, como la tomografía por emisión de fotón único (SPECT, del inglés *Single Photon Emission Computed Tomography*) combinada con tomografía computarizada (CT, del inglés *Computerized Tomography*).<sup>162</sup> Se ha sugerido una mejora en la precisión de la linfogammagrafía combinando el método con la inoculación de verde de indocianina.<sup>163</sup> En el momento intraoperatorio, los trazadores isotópicos pueden ser detectados con sondas o con gammacámaras portátiles. Las sondas utilizan un detector basado en teluro de cadmio (CdTe) para la localización de los isótopos, y la precisión quirúrgica dependerá del manejo del cirujano cuando atraviese próximamente tejidos con mayor emisión de radiación. Por su parte, las gammacámaras también están basadas en detectores de CdTe y ofrecen un campo de visión suficiente para la detección del ganglio. Esta opción resulta más ventajosa frente a las sondas, ya que permiten ver en tiempo real el lecho quirúrgico y facilitan el rastreo del GC en la axila de la paciente. Sin embargo, los radiocoloides presentan como limitación que los GC no pueden ser detectados macroscópicamente, ya que no modifican el color del tejido linfático.

### 1.3.1.2. Colorantes

Existen multitud de colorantes, como el azul de metileno, el verde indocianina o el carmín índigo. La inyección del colorante suele realizarse desde las vías linfáticas periareolares, y es necesario masajear la zona afectada durante 10–15 minutos para permitir la diseminación del colorante. Si bien el azul de metileno se considera el estándar intraoperatorio para el mapeo linfático del GC en cáncer de mama en una dosis de 2 ml,<sup>102</sup> Morton *et al.*<sup>98</sup> sugieren que presenta escasa eficiencia de difusión linfática, y abogan por colorantes apolares y poco hidrosolubles (como el azul de isosulfán, como Linfazurín® o el azul vital, como azul patent V®). Las tasas de identificación del GC utilizando linfogammagrafía son notablemente superiores (97 %) respecto a las de la técnica de azul de metileno (75–80 %), aunque un método mixto puede alcanzar el éxito en el 98–99 % de los casos, especialmente cuando el ganglio presenta metástasis difusa y su capacidad de retener el radiocoloide resulta insuficiente.<sup>159,164</sup>

Mientras que el colorante azul es visible con luz blanca, el verde de indocianina presenta propiedades fluorescentes que requieren de exposición a infrarrojo cercano (NIR, del inglés *Near InfraRed*) para ser observadas. El uso del verde de indocianina aumenta la mayor tasa de detección intraoperatoria respecto a los colorantes azules,<sup>165</sup> además de permitir realizar un mapeo tumoral.<sup>166</sup> Las suspensiones basadas en carbono también han sido utilizadas en el momento preoperatorio con una precisión diagnóstica de hasta el 99.8 %, reduciendo la tasa de falsos negativos en comparación con la técnica de colorante azul.<sup>167,168</sup> Sin embargo, todavía se requieren más estudios para utilizar las suspensiones de carbono para tatuajes ganglionares a largo plazo.<sup>168</sup>

### 1.3.1.3. Trazadores superparamagnéticos

Los trazadores superparamagnéticos se han desarrollado como método alternativo a la combinación del radioisótopo y del colorante azul. Habitualmente, estos coloides consisten en nanopartículas de óxido de hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) superparamagnético (SPIO) que son fácilmente detectables con el uso de un magnetómetro. Tras la inyección, estos trazadores requieren de 15 minutos para su acumulación en el GC. Además, esta nueva tecnología de marcaje

permite una visualización limitada a nivel macroscópico del ganglio, ya que modifica el color del tejido linfático hacia un marrón más oscuro. Estudios preliminares han demostrado tasas de detección intraoperatoria comparables a la técnica estándar de radiotrazadores, alcanzando ratios del 94.4–98.3 % (SPIO) y 95.0–97.8 % (radiación gamma).<sup>169–171</sup> No obstante, se han descrito limitaciones en la técnica, como la alteración magnética secundaria ante la proximidad de equipos de quirófano (p.ej. es necesario utilizar retractores de plástico, en lugar de metálicos) o la escasa sensibilidad ante acúmulos magnéticos ganglionares de pequeño tamaño. Aunque existen trabajos recientes que tratan de salvar estas inconveniencias, esta tecnología está todavía en desarrollo.<sup>172</sup>

#### **1.3.1.4. Contraste con microburbujas**

La técnica de contraste con microburbujas para la mejora de la definición en técnicas de imagen ha sido previamente utilizada predominantemente en imágenes cardíacas, hepáticas y gammagrafías en traumatismos abdominales. En 2004, Goldberg *et al.*<sup>173</sup> introdujeron esta técnica para la biopsia del GC, e informaron de que las microburbujas inyectadas peritumoralmente en un modelo de melanoma porcino drenaban por los canales linfáticos hasta establecerse en los GC mejorando significativamente la detección ecográfica. Esta técnica consiste en la inyección periareolar de un agente de contraste para imagen por ultrasonido basado en microburbujas de gas (~2.5–10 µm) de hexafluoruro de azufre estabilizadas con fosfolípidos que actúan como reflectores del haz de ultrasonido. Habitualmente, se utilizan entre 0.2 y 0.5 ml y el drenaje linfático hasta el GC suele ocurrir a los 15–20 minutos tras la inyección.<sup>174</sup>

#### **1.3.1.5. Quantum dots**

Los «quantum dots» (Qdots) son cristales semiconductores con un diámetro comprendido entre 2 y 20 nm que exhiben fluorescencia asociada a su alto rendimiento cuántico. Por sus propiedades ópticas únicas, su aplicación en biomedicina es amplia, abarcando desde el diagnóstico molecular hasta el estudio de la dinámica tumoral o terapias fotodinámicas de lesiones malignas.<sup>175</sup> En 2023, galardonaron con el Nobel de Química a Moungi Bawendi, Louis Brus y Alexei Ekimov por el descubrimiento y síntesis de estas nanoestructuras. En aplicaciones médicas, los Qdots más utilizados se basan en seleniuro de cadmio ( $\text{CdSeS1-x}$ ) o telururo de cadmio ( $\text{CdTexSe1-x}$ ) dado que su región de confinamiento cuántico abarca todo el espectro óptico.<sup>176</sup> También pueden ser preparados a partir de otros materiales, como metales, cerámicas o polímeros,<sup>177</sup> y pueden ser conjugados para hacerlos selectivos en aplicaciones dirigidas o no mostrar especificidad.<sup>175</sup> La longitud de onda emitida por los Qdots puede ser fácilmente controlada modificando sus tamaños y morfología, pudiendo emitir luz en el espectro ultravioleta (UV) y en el NIR, aunque su aplicación clínica práctica resulta limitada por la citotoxicidad que presentan.<sup>176</sup>

Los Qdots se distribuyen dentro del ganglio partiendo de una dispersión en el líquido linfático de los vasos linfáticos aferentes y se extienden hacia el seno subcapsular para terminar derivando en los senos transverso lateral y medular. A nivel celular, estas nanopartículas se acumulan preferentemente en el citoplasma de macrófagos y células dendríticas.<sup>178</sup> Robé *et al.*<sup>179</sup> inyectaron un coloide basado en Qdots de CdSe/ZnS por vía subcutánea en ratones para la detección del ganglio axilar, logrando identificar las estructuras linfáticas con una emisión de 655 nm a los 5 minutos de la inyección hasta las 24 horas posteriores. Kosaka *et al.*<sup>178</sup> inocularon por vía subdérmica cinco subtipos de Qdots comerciales basados en CdSe (Qdots con emisión a 545, 565, 585, 605 y 655 nm) para el mapeo linfático de un ratón, apreciando actividad óptica hasta 7 días después de las inyecciones a diferentes longitudes de onda. Frangioni *et al.*<sup>180</sup> prepararon inyecciones subdérmicas de Qdots CdTe/CdSe recubiertos con fosfina oligomérica altamente aniónica para el mapeo linfático en ratas y cerdos con excelentes resultados. Ballou *et al.*<sup>181</sup> inyectaron peritumoralmente Qdots recubiertos con polietilenglicol (PEG), demostrando la migración de los Qdots a los ganglios regionales en animales.

### **1.3.1.6. Dendrímeros de Gd**

Los dendrímeros son polímeros orgánicos que pueden encontrarse comercialmente como poliamidoamina amino-terminal (PAMAM) y como polipropilimina de núcleo diaminobutano. En medicina, es común encontrarlos conjugados con quelatos de Gd y de In radioactivos para la obtención de contrastes para resonancia magnética (RM) y SPECT. Kojima *et al.*<sup>182</sup> prepararon inyecciones intradérmicas de 12 tipos de dendrímeros radiomarcados con diferentes tamaños y grupos terminales (amino, carboxilo y acetilo) para la obtención de imágenes SPECT de GC en ratas, obteniendo mejores resultados en la distribución de los dendrímeros terminados en carboxi con tamaños superiores a 6 nm. Shi *et al.*<sup>183</sup> incorporaron nanopartículas de oro en dendrímeros con el objetivo de localizar el GC en 12 conejos mediante linfografía por CT indirecta. Entre sus resultados, observaron una mejora notable en la obtención de imágenes radiológicas preoperatorias, además de un marcaje macroscópico oscuro secundario a la acumulación de nanopartículas en los nódulos linfáticos. Yang *et al.*<sup>184</sup> sintetizaron dendrímeros de PAMAM conjugados con azul alcalino y reportaron mejor distribución linfática en ratones en relación a los colorantes disponibles comercialmente.

### **1.3.1.7. Marcajes duales**

Actualmente, los estudios experimentales donde se inoculan marcajes duales del GC tienen tres objetivos bien diferenciados. Primero, combinar técnicas de imagen preoperatorias para el mapeo linfático con un marcaje intraoperatorio para la localización y exéresis del GC. Segundo, aumentar la sensibilidad ante terapias neoadyuvantes y mejorar el contraste en técnicas de imagen preoperatorias. Tercero, obtener marcajes que permitan el mapeo linfático preoperatorio y, además, permitan detectar el estado metastásico de los GC en la cirugía.

Liu *et al.*<sup>185</sup> desarrollaron y validaron en pequeños animales un sistema de contraste para técnicas de imagen basado en nanopartículas de sílice mesoporosas cargadas con colorante fluorescente con modalidades de imágenes fluorescentes y fotoacústicas en el NIR para un mapeo linfático eficaz. Zhou *et al.*<sup>186</sup> conjugaron nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (10 nm) con una molécula con emisión a 830 nm (NIR), consiguiendo una ponderación en T2 útil en resonancia magnética y un contraste para el seguimiento óptico de los ganglios linfáticos por fluorescencia en modelos de ratón. Mihara *et al.*<sup>187</sup> reportaron un trazador dual compuesto por verde de indocianina y partículas de óxido de hierro superparamagnético para la detección de GC de la vesícula biliar en modelos porcinos. Como resultado, obtuvieron un nuevo método más eficiente para el manejo laparoscópico. Tsuchimochi *et al.*<sup>188</sup> desarrollaron un vector basado en PAMAM cargadas con <sup>99m</sup>Tc y verde de indocianina para una mejor resolución anatómica del sistema linfático en técnicas de imagen. Yang *et al.*<sup>189</sup> propusieron un marcaje basado en nanopartículas de carbono en forma de nanogotas que frente a estimulación NIR presentan un cambio de fase líquida-gaseosa para un contraste dual en técnicas fotoacústicas y ultrasónicas, además de presentar sensibilidad frente a terapia fototérmica. Dai *et al.*<sup>190</sup> sintetizaron nanopartículas de ácido hialurónico (10–50 nm) conjugadas con receptores específicos (doble diana: CD44 y SR-B1) para células tumorales mamarias y colorantes fluorescentes. En ratones, este marcaje resultó muy útil para la obtención de imágenes de fluorescencia en el NIR en el monitoreo a largo plazo de la acumulación y retención de las partículas en sistema linfático y microscopía fotoacústica para la determinación del estado metastásico de los GC.

## 1.3.2. Técnicas de marcaje ganglionar para la DAD

Como se ha descrito en el apartado anterior, la QTNA representa un factor desfavorable para la localización del GLC, especialmente en ganglios metastásicos, ya que modifica las estructuras ganglionares pudiendo reducir el tamaño del GC hasta hacerlo irreconocible. Además, también puede bloquear vías linfáticas y perjudicar la diseminación del trazador. Existen técnicas establecidas para el marcaje del GC previa QTNA; donde destacan: los clips quirúrgicos, las semillas magnéticas, las semillas radioactivas o los radares reflectores.

### 1.3.2.1. Alambres y clips quirúrgicos

La técnica del clipaje ha sido ampliamente utilizada para el seguimiento de lesiones mamarias sospechosas no palpables. A pesar de no haber sido especialmente popularizado en cirugía axilar por las limitaciones que conlleva, constituye un procedimiento sencillo que permite una detección radiológica eficiente del ganglio afectado. Normalmente, se utiliza una aguja con un clip precargado que es guiada por ecografía hasta alcanzar la corteza ganglionar. Una vez localizada, el clip se desprende y resulta fuertemente agarrado en el tejido linfático. Se han descrito altas tasas de detección preoperatoria del GC con técnicas de imagen.<sup>191</sup> Sin embargo, esta técnica no considera su identificación visual intraoperatoria.

Entre los clips quirúrgicos más utilizados, destaca el hidrogel polimérico HydroMark®, el clip de nitinol Tumark® y el clip quirúrgico LigaClip®. Los GC marcados con HydroMark® presentan una tasa de detección radiológica de entre el 60 y el 100 %, posiblemente por errores asociados a la implantación del clip.<sup>192</sup> Existen varios ensayos clínicos donde se ha aplicado este sistema en la disección axilar dirigida. Sin embargo, por su tamaño muestral y su naturaleza multicéntrica, el estudio SENTA es el más representativo. En este estudio prospectivo se agrupó a 473 pacientes candidatas a QTNA de 50 centros diferentes que fueron sometidas a la implantación de un clip en los ganglios linfáticos sospechosos. En el momento quirúrgico, el ganglio marcado con clip fue detectado en el 77.8 % de las pacientes, aunque el ganglio centinela y el ganglio clipado solo coincidieron en el 64.8 % de los casos.<sup>193</sup>

### 1.3.2.2. Semillas radioactivas

La localización con semilla radioactiva consiste en la introducción de una cápsula de titanio encapsulando <sup>125</sup>I dentro de la región medular del GC a través de ecografía. Esta técnica es fácilmente detectable con cualquier método de imagen, pero requiere de procedimientos complejos para su manipulación y el uso de radioactividad limita su aplicación en muchos países.<sup>194</sup> El procedimiento marcado de la axila con semillas de yodo radiactivo (MARI, del inglés *Marking the Axillary lymph node with Radioactive Iodine seeds*) fue propuesto por primera vez por Straver *et al.*<sup>195</sup> en 2010. Desde entonces, este método ha sido ampliamente utilizado, reportando altas tasas de identificación (97–100 %) y baja tasa de falsos negativos (1.4–7 %).<sup>196,197</sup>

### 1.3.2.3. Semillas magnéticas

Las semillas magnéticas son una alternativa que evade algunas de las limitaciones impuestas por las semillas radioactivas. Habitualmente, se trata de materiales ferromagnéticos basados en óxido de hierro y níquel (p.ej. Magseed®), que son posteriormente localizados utilizando una sonda que genera un campo magnético alterante que lo magnetiza para su detección. Aunque todavía no ha sido popularizada, esta técnica ha sido recientemente probada con éxito en procedimientos quirúrgicos de disección axilar dirigida en pacientes con cáncer de mama.<sup>198,199</sup> En el estudio AXSANA marcaron el GC de 187 pacientes, alcanzando una tasa de identificación del 96 %.<sup>200</sup>

### 1.3.2.4. Radar reflector

Esta técnica consiste en un reflector de ondas electromagnéticas dependiente de infrarrojo no radioactivo. El sistema SAVI SCOUT (Merit Medical Inc, South Jordan, EE. UU.) es el más conocido y recibió la aprobación de la FDA (*Food and Drug Administration*) para su colocación en lesiones mamarias y en tejidos blandos y axila. Las tasas de localización intraope-

ratoria son altas, variando del 97 al 100 %.<sup>201,202</sup> A pesar de ser altamente preciso, su mayor limitación es que el tamaño del reflector es de 12 mm, y en ocasiones puede ser más grande que el propio ganglio.<sup>203</sup>

### 1.3.2.5. Tatuaje de carbono

El tatuaje ganglionar previa QTNA ha sido explorado como método para la detección intraoperatoria del GLC. Por su uso frecuente en cirugía endoscópica al no presentar actividad biológica ni inmunogenicidad, el producto Spot® (GI Supply, Mechanicsburg, EE. UU.) ha sido aprobado por la FDA como el primer producto para tatuarse tejidos. Esta inyección consiste en una suspensión de carbón de alta pureza en agua, glicerol, polisorbato 80, alcohol bencílico y simeticona. Su aplicación en cirugía ha tenido diversos objetivos de marcaje para el «tracking» tumoral, especialmente en procedimientos quirúrgicos tiroideos y colorrectales.<sup>204-205</sup> Para el marcaje de GLC, la dosis varía entre 0.1 y 3 ml. Su adherencia al tejido receptor resulta comprometida por la baja viscosidad de la propia sustancia, distribuyéndose predominantemente por la corteza del ganglio y por el tejido graso circundante, de lo cual resulta una tinción no homogénea, además de una diseminación indeseada por la vía linfática que aparece en torno al 18 % de los casos.<sup>207,208</sup> Se ha descrito que el carbono no afecta a la evaluación patológica del tejido ganglionar y que el tiempo intraoperatorio se reduce significativamente.<sup>209,210</sup> En la **Tabla 1.11** se resumen las condiciones y resultados de los principales estudios clínicos realizados hasta el momento.

**Choy et al.**<sup>211</sup> inyectaron 0.1-0.5 ml de Spot® en la corteza de los GLC axilares y tejido blando circundante de 28 pacientes con cáncer de mama recién diagnosticado. Las pacientes se incluyeron en dos grupos: en el primer grupo se agruparon 16 pacientes sometidas a cirugía, mientras que en el segundo grupo 12 pacientes fueron sometidas a QTNA previa cirugía. Encontraron evidencia citológica o histopatológica de metástasis ganglionar antes de la operación en el 50 % de pacientes del primer grupo y el 75 % de casos en el segundo grupo. El tiempo promedio transcurrido entre el tatuaje y la intervención fue de 22.9 días en el primer grupo y de 130 días en el segundo. El marcaje del tatuaje se visualizó intraoperatoriamente en todos los casos, excepto en un caso del primer grupo donde solo pudo ser observado por microscopía. En este estudio, describieron migración ocasional a través canales linfáticos proximales al ganglio inyectado. Los estudios histológicos revelaron presencia de carbono principalmente en la superficie cortical de los ganglios linfáticos o en el tejido blando circundante. Además, los GLC correlacionaron con todos ganglios linfáticos tatuados (GLT) (100 %). **Natsiopoulos et al.**<sup>207</sup> tatuaron con 0.3-0.7 ml de Spot® los ganglios metastatizados de 75 pacientes que cumplían criterios clínicos de afectación (64 pacientes confirmados, 11 sospecha clínica-ecográfica) antes de iniciar la QTNA. El tiempo entre la inyección y la cirugía varió entre los 90 y los 231 días; mientras que desde la QTNA y la cirugía transcurrieron de 3 a 5 semanas. Previa cirugía se inyectó un radiotrazador <sup>99m</sup>Tc por vía subareolar con azul de metileno para la detección rutinaria. La colocalización de azul de metileno y carbono se detectó por inspección visual. Se identificaron exitosamente los GLT del 93.3 % de las pacientes, y el 75.3 % de ellos correspondieron a los GLC. La valoración anatopatológica de los ganglios afectados reveló la presencia mayoritaria de carbono en la corteza de los ganglios y en el tejido adiposo adyacente. En el 45.3 % de los casos los estudios histológicos relevan mayor número de ganglios linfáticos con pigmento que el número original de ganglios tatuados, lo que implica migración local. **Park et al.**<sup>212</sup> inyectaron 0.5 ml (0.2-0.8 ml) de Charcotrace® (Phebra, Sydney, Australia) en la corteza ganglionar de 20 pacientes con metástasis ganglionares comprobadas por citología previa QTNA. En la cirugía axilar, la tasa de detección de ganglios tatuados fue del 100 %, aunque solo el 75 % de los GLT correspondieron a los GLC, de los cuales el 40 % presentaron metástasis. El rendimiento diagnóstico de la DAD utilizando marcaje ganglionar con tatuaje de carbono redujo del 20 al 0 % la tasa de falsos negativos. Además, en este estudio se presentó un riesgo clínicamente insignificante de migración de las partículas, resultando inocuo para el organismo humano. **Allweis et al.**<sup>209</sup> inyectaron dosis de 0.2-0.5 ml de Spot® en GLC axilares

positivos previa QTNA y evaluaron clínicamente la técnica en 63 pacientes. En la cirugía de pacientes con ganglios tatuados, pudieron identificar fácilmente el ganglio marcado en el 95 % de los casos. Adicionalmente, realizaron una técnica combinada de radiotrazadores y tatuaje para validar el método, encontrando colocalización de radiación gamma y carbono en el 80 % de los ganglios. El 20 % restante correspondía a ganglios tatuados sin radioactividad, lo que sugiere una mayor precisión diagnóstica utilizando el método de tatuaje. **Patel et al.**<sup>213</sup> inyectaron 0.1-1 ml de Spot® en la corteza de los ganglios y el tejido blando periganglionar de 66 pacientes con afectación ganglionar confirmada por biopsia. Las pacientes incluidas en el estudio fueron agrupadas en el dos subgrupos. En el primero, 19 pacientes se sometieron a cirugía primero mientras que, en el segundo, 47 pacientes recibieron QTNA antes de la cirugía. Encontraron afectación ganglionar metastásica en 11 (57.9 %) pacientes del primer grupo y 37 (78.7 %) del segundo grupo. El tiempo promedio transcurrido entre la inyección del marcaje y la cirugía fue de 21 días en el primer grupo y de 148 días en el segundo grupo. Fue posible detectar visualmente durante la cirugía el marcaje en el interior del ganglio y en el tejido graso periganglionar de todas las pacientes del segundo grupo y de todas las pacientes a excepción de una en el primer grupo, aunque esta excepción mostró evidencia microscópica de carbono en el interior del ganglio metastatizado. A pesar de la intención de marcar únicamente el ganglio centinela, en el 52.6 % de las mujeres del primer grupo y el 55.3 % de las pacientes del segundo grupo se encontraron más ganglios marcados, probablemente vinculados a una migración local del pigmento. El GLT correlacionó con el GLC en el 98.5 % de las pacientes del primer grupo, y en el 100 % del segundo grupo. En el **ensayo clínico multicéntrico TATTOO** se evaluó el marcaje del GLC con 3 ml de Spot® o 0.6 ml de CARBO-REP® (Sterylab, Rho/Milan, Italia) en 110 pacientes de cáncer de mama avanzado (de entre ellas, 108 pacientes se sometieron a biopsia ganglionar y el 96.3% presentó metástasis). Los ganglios de las pacientes incluidas fueron marcados de manera ecoguiada con carbono y luego fueron sometidas a QTNA como parte de su tratamiento. La tasa de detección de los ganglios marcados fue del 93.6 %, con una correlación entre GLC y GLT del 59.6 % y una tasa de falsos negativos del 9.1 % cuando se aplicó de manera conjunta la técnica BSCG y el marcaje con carbono. Se observó migración del tatuaje en 5 pacientes.<sup>214</sup> Posteriormente, de **Boniface et al.**<sup>215</sup> publicaron datos extendidos del ensayo TATTOO utilizando 0.5 ml de Spot® o CARBO-REP®. De las 172 pacientes incluidas, a 149 se les había realizado una LA completa, con una tasa de detección del ganglio tatuado fue del 94.6 %, mientras que en 149 se realizó DAD con una tasa de detección del 98.7 %. Además, reportaron una tasa de falsos negativos del 6.2 %. En otro ensayo clínico reciente (**NEOTARGET**), identificaron los GLC para DAD tras QTNA a través de la colocalización de ganglios tatuados con carbono (Sterimark®) y marcados con un clip quirúrgico. En su estudio reclutaron 31 pacientes pN1 programadas para QTNA en dos cohortes. En la primera cohorte se incluyeron 13 pacientes que fueron sometidas a tatuaje de carbono en el momento diagnóstico. En la segunda cohorte, a 13 pacientes se les colocó clip visible por ultrasonidos y tras QTNA se les tatuó el ganglio linfático. En el momento quirúrgico, solo identificaron el ganglio del 69 % de las pacientes de la cohorte 1, mientras que en la cohorte 2, el 94.4 % de los ganglios doblemente marcados pudieron ser identificados. El tatuaje pasó desapercibido en el momento quirúrgico en el 38 % de las pacientes de la cohorte 1 y el 17 % de la cohorte 2. En este último subgrupo, la tasa de falsos negativos fue del 11 %.<sup>216</sup> **Goyal et al.**<sup>217</sup> realizaron un estudio prospectivo multicéntrico. Realizaron las inyecciones previa QTNA de 2.0 ml (0.2-4.2 ml) Spot® en un total de 110 pacientes. El GLT fue exitosamente identificado intraoperatoriamente en el 82 % de las pacientes. No obstante, la tasa de identificación fue superior en el grupo de cirugía (88.9 %, 88 pacientes) respecto al grupo de QTNA (64 %, 22 pacientes). El GLT fue el GLC en el 78 % de las pacientes del primer grupo (n=36) y en el 100 % del segundo grupo (n=3). **Dostalek et al.**<sup>218</sup> analizaron retrospectivamente a 62 pacientes tratadas en un único centro entre el 2018 y 2020. Todas las pacientes incluidas presentaron infiltración ganglionar axilar y fueron remitidas para QTNA. Los ganglios positivos se marcaron con 0.1-0.5 ml de una solución al 4 % de Carbo activatus (Carbosorb, IMUNA PHARM, Eslovaquia) en todas las pacientes previa QTNA. La tasa de detección de ganglios tatuados intraoperatoria tras QTNA fue del 81 %, de entre los cuales, el 55 % mostraron correlación entre GLT y GLC. **Li et al.**<sup>222</sup> inyectaron 0.3 ml de suspensión de carbón en 110 pacientes con cáncer de mama avanzado local antes de aplicar de 2 a 6 ciclos de quimioterapia neoadyuvante. Su objetivo

fue investigar la relación entre la distribución y la invasión linfovascular por respuesta a QTNA. Las pacientes fueron clasificadas por respuesta a QTNA (de sensibles a resistentes). El número de ganglios positivos y la proporción de invasión linfovascular aumentaron, mientras que el número de ganglios teñidos de negro disminuyó. Encontraron una relación negativa entre el número de ganglios positivos y el número de ganglios teñidos de negro. **Gatek et al.**<sup>219</sup> utilizaron 0.1–0.5 ml de suspensiones de carbono en medio salino en 27 pacientes con CDI. De entre ellas, 20 pacientes se sometieron a QTNA. La tasa de identificación de los ganglios fue del 100 % y no se identificaron falsos negativos tras un promedio de 164 días. Observaron diseminación del tatuaje de carbono en el 17.4 % de los casos. Recientemente, **Porpiglia et al.**<sup>220</sup> tatuaron los GLC de 49 pacientes, alcanzando una tasa de identificación del 84.4 % tras QTNA. Sin embargo, solo el 71.8 % (23/32) de los GLC tatuados correspondieron con los ganglios tatuados. Recientemente, **Pajcini et al.**<sup>221</sup> marcaron con 0.3 ml de tinta de carbono en GLC de 30 pacientes. El 33.3 % se realizó antes de la cirugía y el 66.67 % se realizó previa QTNA. Durante la BSCG se identificaron los 32 (100 %) ganglios tatuados, todos correlacionados con el GLC y en 10 (31.3%) de ellos se encontró metástasis.

**Tabla 1.11.** Resumen de los ensayos clínicos donde se ha utilizado el tatuaje del GLC en DAD.

	Supensión de carbono (dosis)	Número de pacientes	Metástasis confirmada biopsia inicial	Tiempo del tatuaje a la cirugía	Tasa de identificación del GLT	Correlación del GLT y el GLC
<b>Choy et al.</b> <sup>211</sup>	Spot® (0.1–0.5 ml)	16 (cirugía primaria)	50 %	22.9 días (1–62 días)	93.8 %	100 %
<b>Choy et al.</b> <sup>211</sup>	Spot® (0.1–0.5 ml)	12 (QTNA)	75 %	130 días (74–211 días)	100 %	100 %
<b>Natsiopoulos et al.</b> <sup>207</sup>	Spot® (0.3–0.7 ml)	75	85.3 %	141 días (90–231 días)	93.3 %	75.3 %
<b>Park et al.</b> <sup>212</sup>	Charcotrace® (0.5 ml)	20	85.3 %	181 días (165–197 días)	100 %	75 %
<b>Patel et al.</b> <sup>213</sup>	Spot® (0.1–1 ml)	19 (cirugía primaria)	57.9 %	21 días (1–62 días)	94.7 %	98.5 %
<b>Patel et al.</b> <sup>213</sup>	Spot® (0.1–1 ml)	47 (QTNA)	78.7 %	148 días (71–257 días)	100 %	100 %
<b>TATTOO</b> <sup>214</sup>	CARBO-REP® (0.6 ml) Spot® (3 ml)	110	96.3 % (n=108)	–	96.3 %	59.6 %
<b>TATTOO (ext.)</b> <sup>215</sup>	Spot®/CARBO-REP® (0.5 ml)	172	100 %	–	98.7 %	47.9 %
<b>NEOTAR-GET</b> <sup>216</sup>	Sterimark® (0.5–1 ml)	13	–	–	69 %	–
<b>Goyal et al.</b> <sup>217</sup>	Spot® (2 ml)	88 (cirugía primaria)	49 %	18 días (19–34 días)	88.9 %	78 % (n=36)
<b>Goyal et al.</b> <sup>217</sup>	Spot® (2 ml)	22 (QTNA)	82 %	199 días (167–225 días)	64 %	100 % (n=3)
<b>Dostalek et al.</b> <sup>218</sup>	Carbosorb (0.1–0.5 ml)	62	100 %	–	81 % (n=27)	55 %
<b>Gatek et al.</b> <sup>219</sup>	Solución Carbon Ink 4 % (0.1–0.5 ml)	27	85.7 % (n=7)	164 días (8–240 días)	100 %	85.2 %
<b>Porpiglia et al.</b> <sup>220</sup>	Supensión de Carbono	49	–	–	84.4 %	71.8 %
<b>Pajcini et al.</b> <sup>221</sup>	Suspensión de Carbono (0.3 ml)	10 (cirugía primaria)	–	–	100 %	100 %
<b>Pajcini et al.</b> <sup>221</sup>	Suspensión de Carbono (0.3 ml)	20 (QTNA)	–	–	100 %	100 %

En la **Tabla 1.12** se resumen las condiciones y resultados de los principales estudios clínicos realizados hasta el momento.

**Tabla 1.12.** Principales sistemas de marcaje y localización del ganglio linfático centinela axilar en cáncer de mama. Adaptada de Murthy *et al.*<sup>203</sup>

	Coste aproximado	Ventajas	Desventajas
Clip quirúrgico	60 €/clip	Visible durante más de 1 año por ecografía.	Se requiere manejo ecográfico, es higroscópico y está sujeto a migración.
Semillas magnéticas	500 €/semilla 55,000 €/equipamiento	Duración hasta 1 mes antes de la cirugía.	Limitación de profundidad hasta 4 cm, coste elevado, requiere calibración y es susceptible a campos magnéticos.
Semillas radioactivas	60 €/semilla 45,000 €/equipamiento	Detectable hasta 4 meses tras QTNA.	Regulación estricta en manejo y logística.
Radar reflector	400 €/radar 40,000 €/equipamiento	Detectable a profundidades de 8 cm, eficiente, colocación hasta 1 mes antes de la cirugía.	Se ha descrito migración fuera del GC.
Tatuaje de carbono	20 €/ml	Altas tasas de detección, duración de hasta 8 meses, sin efectos secundarios.	Identificación errónea, posibilidad de migración, granulomas de cuerpo extraño.

## 1.4. Nanopartículas dirigidas al ganglio linfático

### 1.4.1. Nanopartículas en biomedicina

El concepto de «nanotecnología» fue introducido por Feynman en 1959 al considerar la posibilidad de manipular la materia a escala atómica.<sup>223</sup> Desde entonces y hasta el momento actual, las aplicaciones de los nanomateriales en biomedicina han mostrado un auge creciente.<sup>224</sup> Los nanomateriales se describen como estructuras mono o polidispersas de pequeño tamaño, típicamente en el rango de 1 a 100 nm, que presentan características fisicoquímicas excepcionales derivadas de sus reducidas dimensiones y de su alta relación superficie/volumen, convirtiéndolas en herramientas útiles en diferentes aplicaciones biomédicas.<sup>225,226</sup> Las nanopartículas (NPs) típicamente se clasifican dependiendo de su composición química en nanopartículas orgánicas e inorgánicas. Mientras que en las NPs orgánicas es posible destacar los polímeros, los exosomas y los liposomas, entre las inorgánicas se encuentran las NPs de sílice, las NPs metálicas, los nanotubos de carbono o los Qdots; aunque en ocasiones se requiere de sistemas combinados para cubrir las propiedades fisicoquímicas y biológicas deseadas.<sup>227</sup>

La aplicación de nanomateriales en el campo de la biología y la biomedicina es conocida como «nanobiociencia», y puede ser definida como la ciencia que permite crear, manipular y caracterizar componentes y sistemas biológicos en la escala nanométrica; incluyendo aplicaciones diagnósticas, terapéuticas (como la transfección, liberación de fármacos o la hipertermia), las técnicas de imagen o regeneración celular, entre otras.<sup>226</sup> Especialmente, las NPs mejoran sustancialmente el perfil farmacocinético y la estabilidad química, lo que las convierte en candidatas interesantes para estrategias terapéuticas.<sup>228</sup>

## 1.4.2. Sistemas nanoestructurados dirigidos al ganglio

La administración de sistemas nanoestructurados dirigida a los ganglios linfáticos es crucial en el tratamiento de enfermedades inmunitarias y cáncer, dado que la mayoría de los tumores sólidos metastatizan por vía linfática.<sup>229</sup> Se han diseñado diferentes sistemas de liberación de fármacos dirigidos al ganglio linfático con diferentes ventajas y limitaciones (**Tabla 1.13**).<sup>230</sup>

**Tabla 1.13.** Ventajas y limitaciones de diferentes sistemas de liberación de fármacos en el ganglio linfático. Adaptada de Cheng et al.<sup>230</sup>

	Ventajas	Desventajas
Liposomas	Buena capacidad de control de la distribución. Efecto a largo plazo. Baja toxicidad. Liberación lenta del fármaco.	Baja eficiencia de encapsulación de fármacos solubles en agua. Baja estabilidad, fácil de hidrolizar y de oxidar.
Micelas	Mejora la solubilidad en agua de la sustancia encapsulada. Estructura altamente estable. Baja toxicidad.	Inestabilidad en el sistema circulatorio sanguíneo.
NPs inorgánicas	Estructura altamente modificable. Buena biocompatibilidad y estabilidad.	Baja solubilidad y baja tasa de aclaramiento <i>in vivo</i> . Posible toxicidad potencial a largo plazo y alta citotoxicidad.
Hidrogel	Previenen la desnaturalización de proteínas. Baja toxicidad. Efecto a largo plazo.	Tasa de respuesta lenta. Reducida resistencia mecánica.
NPs poliméricas	Mejor biodistribución. Mejor biodisponibilidad. Protección frente a la degradación.	Baja eficiencia de encapsulación. Baja carga de fármaco.

## 1.4.3. Biodistribución y captación linfática de las nanopartículas

El comportamiento de las NPs en el tejido linfático depende de un equilibrio entre la tasa de eliminación, la biodistribución, la tolerancia y la nanotoxicidad, y está regulado por factores como la vía de administración y las propiedades físico-químicas de las partículas, especialmente su tamaño, bioactividad y características superficiales.<sup>230</sup>

### 1.4.3.1. Tamaño

El efecto del tamaño de las NPs en la distribución linfática a partir de diferentes vías de administración ha sido estudiado utilizando partículas con propiedades fluorescentes. En administración subcutánea, se estima un diámetro idóneo de entre 10 y 50 nm, mientras que si las NPs van a ser inyectadas de manera directa en el ganglio, se recomienda un tamaño superior a 100 nm para maximizar su estabilidad y persistencia dentro del ganglio.<sup>231,232</sup> La dinámica de las NPs entre 2 y 20 nm muestra facilidad de difusión asociado a un régimen con tendencia a la difusión browniana, mientras que los tamaños más grandes pueden no mostrar una migración efectiva y, en las partículas de mayor tamaño, es posible que no se produzca la diseminación linfática.<sup>160</sup> Existen autores que abogan por el uso de NPs entre 100 y 200 nm, dado que muestran el mejor equilibrio entre un drenaje rápido y una distribución eficiente de las partículas en los nodos linfáticos.<sup>159</sup>

### **1.4.3.2. Concentración**

El aumento de la concentración de NPs inyectadas disminuye su velocidad de drenaje desde el sitio de inyección al obstaculizar su difusión por el espacio intersticial,<sup>233</sup> aunque su efecto en inyecciones directas en el ganglio no está claro.<sup>234</sup>

### **1.4.3.3. Características superficiales**

Existen tres características superficiales capaces de regular el comportamiento biológico tras su administración. (1) La estructura química superficial juega un rol clave en el acondicionamiento de los nanomateriales y su relación con el sistema inmunitario. (2) La funcionalización superficial de las NPs puede jugar un papel esencial para la distribución selectiva del vector en el tejido linfático, pudiendo dirigirse selectivamente hacia una diana específica.<sup>230</sup> (3) La carga superficial afecta a su captación linfática, siendo la degradación de los sistemas aniónicos más rápida. Las NPs aniónicas tienden a interactuar más fuertemente con las proteínas, lo que lleva a un mayor reconocimiento y captación por las células inmunitarias.<sup>157</sup>

### **1.4.3.4. Peso molecular**

Conforme aumenta el peso molecular de las NPs, disminuye su capacidad de intercambio a través de los capilares sanguíneos y el drenaje linfático. Los ganglios linfáticos también actúan como barrera para partículas de mayor peso molecular (típicamente >70 kDa), evitando su ingreso en el torrente sanguíneo.<sup>235</sup>

### **1.4.3.5. Hidrofobicidad**

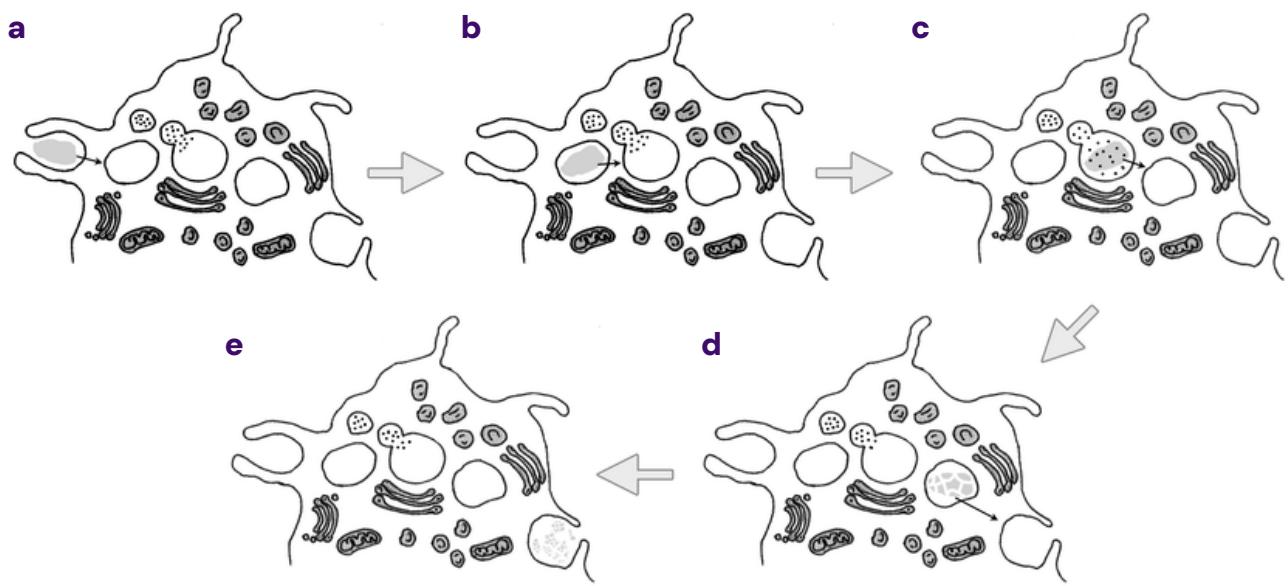
La hidrofobicidad de un coloide es determinante en la respuesta fagocítica y, en consecuencia, en la captación linfática. Las opsoninas se adsorben en la superficie de las nanopartículas sirviendo de reconocimiento para las células del sistema fagocítico mononuclear. Las opsoninas se asocian más fácilmente con compuestos hidrófobos, por lo que compuestos con escasa hidrofobicidad son fagocitados en menor medida.<sup>157</sup>

## **1.4.4. Interacción entre el sistema inmunitario y las nanopartículas**

El sistema inmunitario se encarga de reconocer y neutralizar o eliminar los cuerpos extraños.<sup>236</sup> La administración de NPs en la vía linfática puede desencadenar diferentes escenarios.<sup>227</sup>

### **1.4.4.1. Captación y eliminación de nanopartículas por fagocitosis**

Una vez administradas las NPs, éstas interactúan con gran variedad de biomoléculas presentes en el microentorno tisular, especialmente proteínas, que cubrirán su superficie en un proceso conocido como opsonización.<sup>237</sup> La opsonización es un marcaje para fagocitosis de opsoninas mediado por los fagocitos.<sup>236</sup> La fagocitosis es una forma especial de endocitosis y constituye uno de los principales mecanismos de la defensa inmunitaria innata mediada por las células fagocíticas profesionales, como los macrófagos. El proceso fagocítico está mediado por la reorganización de la actina cortical y la formación de pseudópodos y lamelipodios para la captura del material extraño. Una vez reconocidas, las partículas son internalizadas en fagosomas, que se fusionan con lisosomas cargados de hidrolasas formando fagolisosomas, que descomponen enzimáticamente el material para su eliminación. El material no digerible permanece en los fagolisosomas en forma de cuerpo residual, que pueden ser secretados por exocitosis (*Figura 1.8*).<sup>239</sup> La eliminación de receptores específicos de macrófagos ha demostrado menor captación de NPs y menor liberación de señales proinflamatorias, lo que sugiere que los macrófagos actúan como los fagocitos principales.<sup>240</sup> Por tanto, comprender los mecanismos de reconocimiento de los macrófagos frente a materiales extraños circulantes puede facilitar la comprensión de la eliminación de los nanomateriales. Los mecanismos de fagocitosis pueden ser específicos o inespecíficos. Estos primeros están regulados por los receptores fagocíticos primarios que median la captación de las nanopartículas como son los receptores tipo toll, los receptores depuradores, los receptores de manosa y los receptores Fc, aunque estos dos últimos parecen desempeñar funciones más importantes en la internalización de las NPs.<sup>241</sup>



**Figura 1.8.** Diagrama esquemático de los pasos de la fagocitosis mediada por el receptor Fc. (a) La fagocitosis comienza cuando un objetivo opsonizado (gris claro) interactúa con receptores específicos expresados en la superficie de los macrófagos. (b) Tras la internalización, el fagosoma se fusiona con los lisosomas. (c) Se genera así un fagolisosoma. (d) Se digiere completa o parcialmente el material internalizado. (e) Los productos de degradación y los no degradados se liberan al espacio extracelular. Recuperado de Sechi *et al.*<sup>242</sup>

#### 1.4.4.2. Efectos citotóxicos tras la internalización de las nanopartículas

La interacción de las NPs con los macrófagos puede desencadenar procesos de toxicidad global, incluyendo procesos como la activación del complemento y eventos trombolíticos. Ambos eventos inducen a la liberación de citoquinas y quimiocinas que estimulan el reclutamiento, diferenciación y activación de células inmunitarias, por lo que su activación descontrolada puede desencadenar anafilaxia, trombosis y coagulopatías, además de efectos inflamatorios sistémicos, incluyendo la fibrosis y la inflamación.<sup>241</sup>

#### 1.4.4.3. Efectos de residencia a largo plazo de materiales no degradables

La residencia a largo plazo de las NPs en el tejido inicia lesiones a través de la infiltración y la microgranulación de los hepatocitos y respuestas inflamatorias crónicas. El destino final de la mayoría de los sistemas de NPs parece ser principalmente la acumulación en grandes extensiones en órganos de eliminación, principalmente el bazo, el hígado y los riñones.<sup>241</sup>

Por tanto, el uso de materiales nanoestructurados en medicina requiere controlar la tasa de eliminación en los tejidos y mejorar la selectividad en las células diana para mejorar los perfiles de bioseguridad y de citotoxicidad.



## Capítulo 2.

# Justificación y objetivos

2.1. Justificación y enfoque del trabajo	65
2.2. Objetivos generales y específicos	65

## 2.1. Justificación y enfoque del trabajo

En cirugía del cáncer de mama, la BSGC ha sustituido la LA para el estadiaje axilar, reduciendo la morbilidad de la intervención. La BSGC se ha convertido en el gold standard del manejo de la axila en la mayoría de los tumores de mama. A pesar de ser una técnica en constante evolución, actualmente el manejo habitual consiste en el mapeo preoperatorio del GC con radiotrazadores y, opcionalmente, en algunos casos, prácticado de manera dual con la inyección intraoperatoria de colorantes. La BSGC en pacientes que han recibido QTNA presenta limitaciones, con tasas de detección significativamente más bajas y tasas de falsos positivos igualmente elevadas. En pacientes con axila afectada que han sido sometidas a QTNA, existen tres aspectos que limitan la técnica convencional:

1. Las vías de drenaje linfático de la paciente pueden resultar modificadas o bloqueadas por la QTNA perjudicando la diseminación de los trazadores.
2. La modificación en la vía de drenaje linfático puede suponer el marcaje de ganglios no centinela, de manera que el ganglio marcado no coincide con el GC.
3. Los GC metastatizados pueden reducir su tamaño hasta presentarse irreconocibles, de manera que su identificación intraoperatoria entraña mayor dificultad.

Para salvar estas limitaciones, se estableció en la clínica la técnica DAD, que consiste en el marcaje guiado por imagen del GC previa QTNA. Aunque la DAD es un concepto prometedor, los métodos de marcaje actuales conllevan limitaciones, como el elevado coste, la reducida visibilidad macroscópica o la necesidad de equipos especializados. Entre las técnicas más extendidas destacan:

1. La colocación de un clips quirúrgicos, aunque entraña gran dificultad y se han descrito altas tasas de desplazamiento.
2. El marcaje con semillas radioactivas que, a pesar de ser considerada una técnica fácilmente reproducible, se trata de material radiactivo y requiere de procedimientos complejos de manipulación y equipos especializados. Por tanto, no es accesible en gran parte de centros sanitarios y hospitalares.
3. La colocación de semillas magnéticas en el ganglio, que resulta fácilmente reproducible, pero conlleva un alto coste económico y precisa de equipos especializados.

Recientemente se ha incorporado una cuarta técnica basada en el tatuaje del GC previa QTNA con suspensiones de carbono disponibles en la clínica (p.ej. Spot®). Las inyecciones para el tatuaje varían entre 0.1 y 3 ml y su adherencia al tejido receptor resulta comprometida por la viscosidad de la propia sustancia, distribuyéndose por la corteza del ganglio y por el tejido graso circundante, de lo cual resulta un marcaje superficial poco homogéneo. No obstante, el tatuaje de carbono no afecta a la evaluación patológica del tejido ganglionar, conlleva bajo coste económico, no requiere de equipos especializados y el tiempo intraoperatorio se reduce significativamente, por lo que resulta una estrategia prometedora para la DAD.

## 2.2. Objetivos generales y específicos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es desarrollar y validar experimentalmente un nuevo método de marcaje de GC metastatizados en pacientes con cáncer de mama previa QTNA para facilitar su identificación y exéresis selectiva durante la cirugía de resección tumoral utilizando la técnica DAD.

La base del diseño del nuevo vector de marcaje es obtener un sistema de marcaje que sea biológicamente inerte, no induzca reacciones adversas a nivel celular y permanezca en el ganglio marcado sin migrar a otros ganglios, manteniendo una concentración que lo haga fácilmente detectable a simple vista.

El vector de tatuaje debe ser desarrollado a partir de nanocompuestos inyectables, utilizando diversos métodos de síntesis para encapsular melanina (seleccionada por ser un pigmento oscuro endógeno) y NPs carbono (C-NPs) en nano (NPs) y micropartículas (MPs) poliméricas. La encapsulación del carbono en partículas poliméricas biodegradables se plantea como estrategia para conseguir que el marcaje sea menos citotóxico, perdure en el tiempo y se reduzca su diseminación. Se obtendrán nanocompuestos con diversas propiedades fisicoquímicas para explorar su comportamiento biológico en animal de experimentación.

El vector de marcaje para el ganglio centinela debe ser de administración mínimamente invasiva y ejecutable en el momento de la biopsia diagnóstica (para reducir las intervenciones en la paciente), perdurable en los ganglios axilares durante el QTNA (en un periodo de al menos 4 meses), accesible para cualquier centro sanitario (a bajo coste y sin requerir de equipos especializados) y sin generar reacciones adversas.

Con base a lo anterior, en esta Tesis Doctoral se persiguen los siguientes objetivos:

**Primer objetivo: Sintetizar y caracterizar *in vitro* vectores nano y microparticulados para el marcaje de ganglios linfáticos.**

1.1. Optimizar la síntesis de nano y micropartículas de ácido polí(láctico-co-glicólico) (PLGA) encapsulando sustancias colorantes (carbono y melanina) con diferentes técnicas para obtener materiales con diferentes propiedades fisicoquímicas.

1.1.1. Optimizar la síntesis de partículas encapsulando diferentes elementos "colorantes" (melanina o nanopartículas de carbono, C-NPs).

1.1.2. Sintetizar nanopartículas con un tamaño aproximado de 100 nm (utilizando métodos de emulsión) y micropartículas con un tamaño de 1 µm (utilizando *electrosprayado*) para estudiar el efecto biológico del tamaño.

1.1.3. Producir nano y micropartículas con dos polímeros (PLGA) con diferente proporción de monómeros (láctico/glicólico) para evaluar el perfil de liberación, dadas sus distintas velocidades de degradación.

1.1.4. Coencapsular cloroquina en las nano y micropartículas para valorar su efecto en la actividad macrofágica y en la perdurabilidad del marcaje en el ganglio.

1.2. Caracterizar fisicoquímicamente las partículas obtenidas.

1.3. Formular el vector inyectable, valorando la mínima dosis inyectable (*in vitro*) y la concentración mínima requerida de partículas en el coloide (*in vivo*).

1.4. Caracterizar *in vitro* la cinética de liberación de C-NPs y melanina encapsulada.

1.5. Valorar la citotoxicidad *in vitro* de las partículas sintetizadas para determinar la dosis subcitotóxica y su potencial influencia en el ciclo celular.

**Segundo objetivo: Estudiar el comportamiento biológico de los vectores en animal de experimentación.**

2.1. Diseñar y realizar experimentación en ganglios linfáticos *in vivo* para analizar el comportamiento y eficiencia del marcaje en diferentes tiempos.

2.1.1. Caracterizar variables macroscópicas asociadas al marcaje, incluyendo la estimación del área marcada y la facilidad de identificación.

2.2. Realizar estudios histopatológicos de los ganglios marcados.

2.2.1. Caracterizar variables microscópicas asociadas al marcaje, incluyendo la distribución de las partículas en el tejido ganglionar, la extensión de la reacción inflamatoria y la morfometría de los cúmulos asociados a las partículas inoculadas.

2.3. Analizar estadísticamente las variables macroscópicas y microscópicas.

2.4. Realizar estudios ultraestructurales de los ganglios marcados para analizar la interacción de las partículas a nivel celular, así como los eventos y mecanismos celulares asociados a la reacción inflamatoria.



# Capítulo 3.

# Materiales y métodos

<b>3.1. Materiales y métodos para la síntesis de nano y micro-partículas</b>	<b>69</b>
3.1.1. Materiales	69
3.1.2. Métodos	71
<b>3.2. Materiales y métodos para la preparación de los vectores particulados</b>	<b>75</b>
3.2.1. Materiales	75
3.2.2. Métodos	75
3.2.3. Nomenclatura y justificación de los vectores desarrollados	76
<b>3.3. Estudios experimentales <i>in vivo</i></b>	<b>77</b>
3.3.1. Animales	77
3.3.2. Metodología	77
3.3.3. Variables macroscópicas	78
<b>3.4. Métodos de estudios histopatológicos y de microscopía electrónica</b>	<b>77</b>
3.4.1. Procesamiento y observación de las muestras para microscopía óptica	79
3.4.2. Procesamiento y observación de las muestras para microscopía electrónica	80
3.4.3. Variables microscópicas	80
<b>3.5. Estudio estadístico</b>	<b>81</b>

# 3.1. Materiales y métodos para la síntesis de nano y micropartículas

## 3.1.1. Materiales

### 3.1.1.1. Ácido polí(láctico-co-glicólico)

El ácido polí(láctico-co-glicólico) (PLGA) es un miembro biocompatible de la familia de polímeros biodegradables de poliéster alifático. Una de sus principales aplicaciones es la administración controlada de fármacos, dado que su uso en humanos está aprobado por la FDA en diversos fármacos y dispositivos médicos.<sup>243</sup> La popularidad del PLGA para la liberación sostenida de fármacos es creciente por su biocompatibilidad, su biodegradabilidad y su cinética de biodegradación ajustable dependiendo de su composición monométrica y de su peso molecular.<sup>244</sup> En el organismo, este polímero se hidroliza en ácido láctico (LA) y ácido glicólico (GA), los cuales son metabolizados en agua y dióxido de carbono a través del ciclo del ácido tricarboxílico y finalmente se excreta por los pulmones.<sup>245</sup>

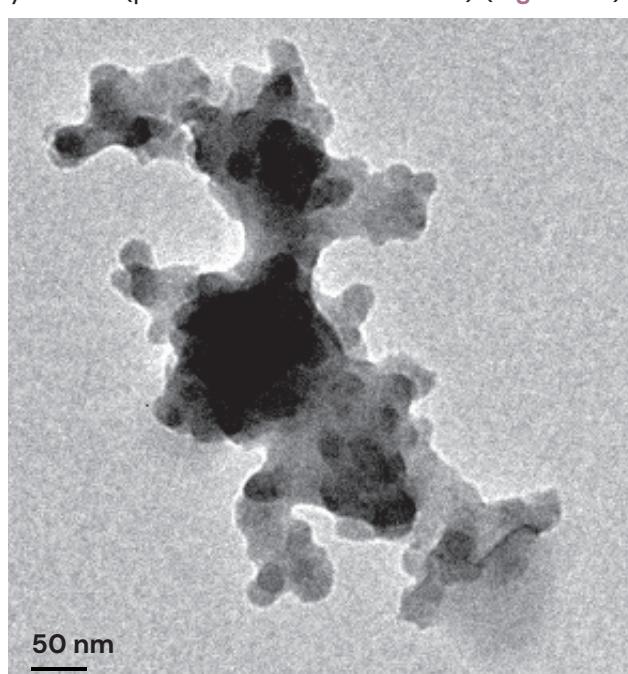
Las propiedades de PLGA varían según su proporción de monómeros (LA:GA), el peso molecular, la concentración y el grupo terminal, lo que a su vez afecta a la eficiencia de encapsulación y la cinética de liberación del agente encapsulado.<sup>246</sup> Dado que uno de los objetivos de esta Tesis es preservar el marcaje en el ganglio durante un periodo de 4 meses, se eligieron dos variedades de PLGA con diferente cinética de liberación, cuyas características principales se recogen en la **Tabla 3.1**.<sup>247</sup> La degradación del PLGA 85:15 es alrededor de un 40 % más lenta que la del PLGA LA:GA 50:50.<sup>248</sup> No obstante, presenta un patrón de liberación cinética diferente. En caso del PLGA LA:GA 50:50 la curva es próxima a una exponencial, mientras que en el caso del PLGA LA:GA 85:15 es más suave. Mientras que la mayor tasa de degradación del PLGA LA:GA 50:50 ocurre a las 3-5 semanas, en su análogo ocurre a las 6-8 semanas.<sup>249</sup> Ambos polímeros fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania) y conservados a 4-6 °C hasta su uso.

**Tabla 3.1.** Propiedades de las variantes de PLGA.

	LA:GA	Peso molecular	Viscosidad
RG504H	50:50	38-54 kDa	0.45-0.60 dL/g
RG858S	85:15	190-240 kDa	1.3-1.7 dL/g

### 3.1.1.2. Nanopartículas de carbono

El carbono es un elemento ampliamente utilizado para diversas aplicaciones. Una de las aplicaciones de interés para esta Tesis es su uso como tatuajes en la piel. Los tatuajes de la piel se basan en la inoculación de coloides de pigmentos en la capa dérmica, a menudo basados en NPs o MPs. El color negro se consigue con un pigmento inorgánico basado en productos de carbono, especialmente de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Estos compuestos son de carácter inmunotóxico y han demostrado alterar la activación funcional de linfocitos y la inhibición de la diferenciación de macrófagos.<sup>250,252</sup> El carbono utilizado en esta Tesis (en forma de nanopartículas de carbono, C-NPs) fue cedido por la Dra. Gema Martínez y fue obtenido por pirólisis láser. El sistema de reactor de flujo continuo de gas y el protocolo experimental se describen en Martínez *et al.*<sup>252</sup> Las C-NPs fueron caracterizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés *Transmission Electron Microscopy*) una vez dispersas en acetato de etilo (AcEt). Se determinó un tamaño variable entre 12 y 20 nm (promedio de 12.4 ±3.4 nm) (**Figura 3.1**).



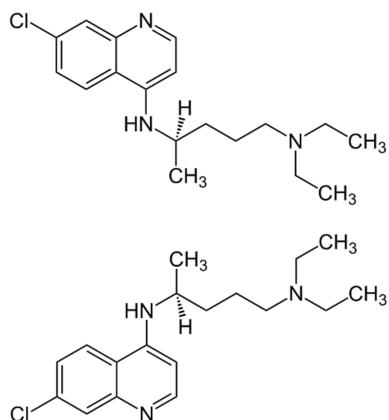
**Figura 3.1.** Micrografías electrónicas de las C-NPs dispersas en acetato de etilo.

### 3.1.1.3. Melanina

La melanina es un pigmento endógeno que deriva del aminoácido tirosina. Su forma más común es en forma de un polímero oscuro de ácidos carboxílicos de dihidroxiindol y sus formas reducidas, conocido como eumelanina.<sup>253</sup> La melanina utilizada en esta Tesis fue adquirida de Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania), preparada en polvo por oxidación de tirosina con peróxido de hidrógeno. Se almacenó a -20 °C hasta su uso, siguiendo las instrucciones del proveedor. Para su observación al microscopio electrónico de barrido (SEM, del inglés *Scanning Electron Microscopy*), la melanina fue disuelta en agua Milli-Q a pH8 ajustado utilizando NaOH (**Figura 3.2**).

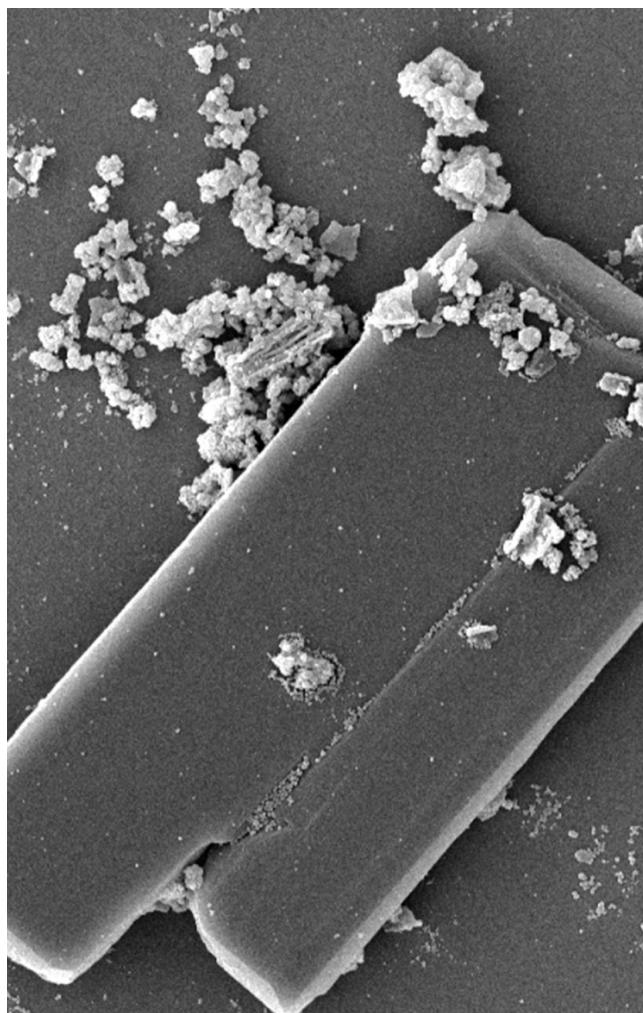
### 3.1.1.4. Cloroquina

La cloroquina (CQ) es un fármaco antipaludico del grupo de las 4-aminoquinolinas aprobado por la FDA (**Figura 3.3**). En la actualidad, este fármaco es utilizado solo o en combinación para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, especialmente el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, el síndrome de Sjögren o el síndrome de anticuerpos autofsfolípidos.<sup>254</sup>

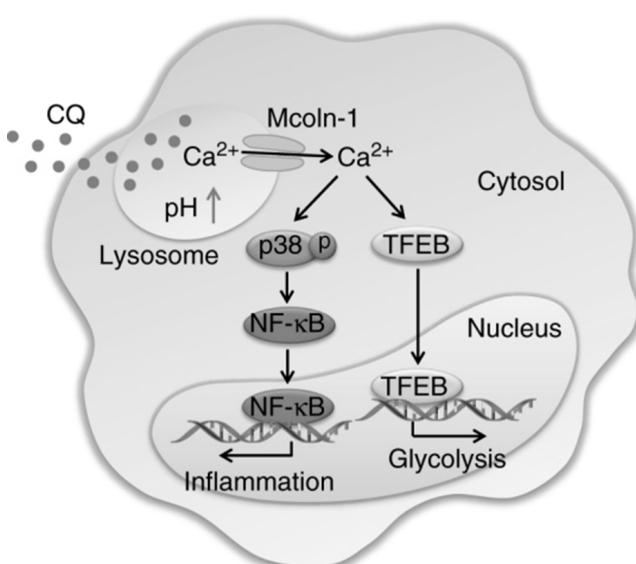


**Figura 3.3.** Estructura química de la CQ.

Otra función atribuida a la CQ es la restricción del microambiente tumoral polarizando los macrófagos asociados a tumores de fenotipo M2 (promotor del tumor) a M1 (inhibidor), pudiendo actuar como "asesinos" de células tumorales.<sup>255</sup> La CQ afecta a nivel vesicular provocando la disfunción enzimática. Esta molécula se concentra en el interior de orgánulos ácidos, como el endosoma o los lisosomas, dado su bajo pH y la carga positiva de la CQ.<sup>256</sup> La presencia de CQ aumenta el pH lisosomal en los macrófagos, lo que desemboca en la liberación de Ca<sup>2+</sup> a través del canal lisosomal Ca<sup>2+</sup> mucolipina 1 (Mcoln1), que estimula la activación de p38 y la molécula de señal del factor nuclear-κB (NF-κB) polarizando los macrófagos hacia M1 para producir citocinas inflamatorias (**Figura 3.4**).<sup>255,256</sup>



**Figura 3.2.** Micrografías electrónicas de barrido de la melanina cristalizada.



**Figura 3.4.** Breve esquema del efecto de la cloroquina en la polarización de macrófagos. Obtenida de Chen et al.<sup>255</sup>

Adicionalmente, otros autores han descrito efectos antimetastásicos y anticancerígenos en cáncer de mama y otros tumores sólidos. En cáncer de mama, Anand *et al.*<sup>257</sup> describieron que la CQ se presentaba como un agente potencial para combatir las células madre cancerosas. En su ensayo clínico en fase 2 han demostrado la eficiencia de la CQ combinada con taxano o quimioterapia similar al taxano en pacientes con tumores localmente avanzados o metastásicos. En otros tumores, Cheng *et al.*<sup>258</sup> demostraron que una combinación de pterostilbene y CQ conducía a la autofagia para inhibir el crecimiento de células cancerosas e inducir la apoptosis en células de adenocarcinoma ductal pancreático. Thongchot *et al.*<sup>259</sup> describieron el efecto antimetastásico de la CQ asociada a la inhibición en la migración de células de colangiocarcinoma al reducir el factor inducible de la hipoxia (HIF, del inglés *Hypoxic-Induced Factor*) HIF-1 $\alpha$ , el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*), entre otras. Yu *et al.*<sup>260</sup> aprovecharon los efectos inhibitorios sobre el receptor de quimiocinas CXCR4, la autofagia y el metabolismo del colesterol de la CQ y la utilizaron como fármaco antimetastásico en un modelo de cáncer de pulmón. Truong *et al.*<sup>261</sup> probaron la eficacia de la CQ en combinación con la inhibición de la vía MAPK en células mutadas en GNAQ/11 e identificaron mecanismos del inhibidor de MEK1/2. La inhibición de la activación de la señalización de MAPK mediada por GNAQ/11 resultó en la inducción de la autofagia y de apoptosis. Peng *et al.*<sup>262</sup> prepararon nanopartículas lipídicas con fosfato de CQ e dihidroartemisinina para reducir la proliferación y metástasis hepática de cáncer colonrectal. Jia *et al.*<sup>263</sup> describieron el uso de CQ como anticancerígeno eficiente frente a células escamosas de carcinoma oral. Por tanto, podría ser potencialmente utilizado en estrategias de preparación microambiental para la modulación de la inmunidad.<sup>264</sup>

El interés de la CQ en esta Tesis es que potencialmente reduce la fagocitosis, por lo que podría inhibir en cierta medida la captación de las NPs tras su administración en el ganglio, lo que podría evitar que los macrófagos transporten las NPs localmente y a distancia.

### 3.1.1.5. Surfactantes y disolventes

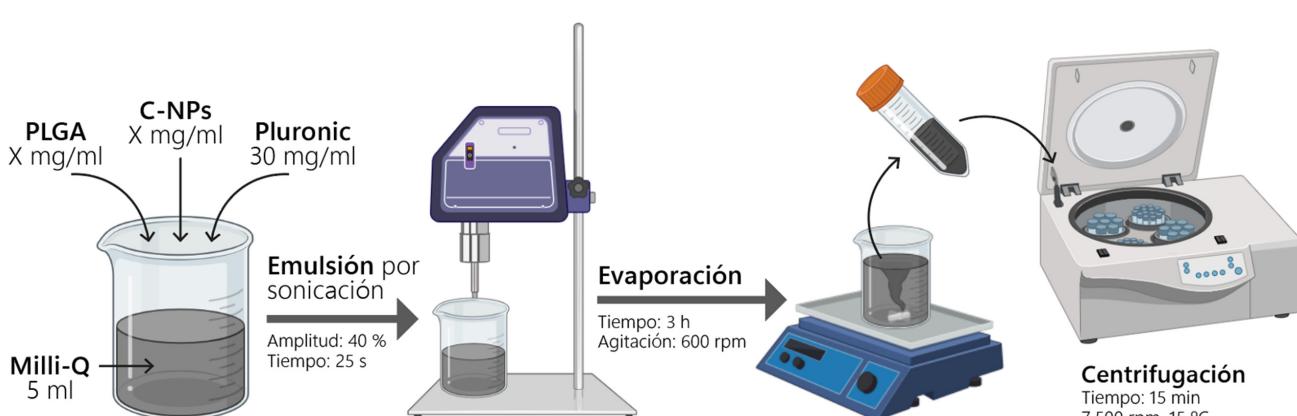
En la **técnica de emulsión**, se utilizaron Pluronic F-68®, diclorometano, colato sódico, AcEt y etanol, que fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania) y utilizados tal y como fueron recibidos.

En la **técnica de electrosprayado**, el diclorometano (DCM), la dimetilformamida (DMF), el cloroformo y el AcEt, así como el estabilizador Tween 80® fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania) y utilizados tal y como fueron recibidos.

## 3.1.2. Métodos

### 3.1.2.1. Encapsulación de C-NPs por emulsión simple

La técnica de emulsión simple suele ser adecuada para encapsular agentes hidrofóbicos.<sup>264</sup> El método de síntesis por emulsión o/w fue utilizado para la encapsulación de C-NPs en NPs de PLGA. El resumen del proceso de síntesis se esquematiza en la **Figura 3.5**. En primer lugar, el sistema polimérico y las C-NPs se disuelven en disolventes orgánicos. En esta síntesis, la fase orgánica está compuesta por 50 mg de PLGA y 150 mg de surfactante (Pluronic F-68) disueltos en 5 ml de AcEt con una concentración variable de C-NPs (0.5, 1.0, 2.5 y 5.0 mg/ml). A la fase orgánica se añadieron 10 ml de agua Milli-Q como fase acuosa. La emulsión se realizó por sonicación (Soni-



**Figura 3.5.** Representación esquemática del proceso de síntesis por emulsión simple de las nanopartículas de PLGA con C-NPs encapsuladas.

cador Branson Digital 450) bajo una amplitud del 40 % y durante 25 s. Posteriormente, la emulsión se dejó evaporando en una placa de agitación a 600 rpm durante 3 h para volatilizar el solvente orgánico y precipitar las NPs. Finalmente, se centrifugó durante 15 min a 15 °C y 7500 rpm, se retiró el sobrenadante y resuspendió en agua Milli-Q a la concentración deseada.

### 3.1.2.2. Encapsulación de melanina por emulsión doble

La técnica de emulsión doble es utilizada para encapsular moléculas hidrofílicas.<sup>265</sup> Esta alternativa se utilizó para encapsular melanina en nanopartículas poliméricas. La encapsulación de melanina se llevó a cabo por el método de emulsión doble (w/o/w), como se ilustra en la Figura 3.6. En el primer paso la melanina se disuelve en la fase acuosa; para ello, se ajustó a pH8 una solución de agua Milli-Q utilizando NaOH y se añadió melanina a concentración variable (0.5, 1.0, 2.5 y 5.0 mg/ml). Paralelamente, se utilizaron 50 mg de PLGA y 3 ml de AcEt para la preparación de la fase orgánica. Se disolvió 1 ml de NaOH-melanina en la disolución anterior, y de nuevo se añadió 1 ml de agua Milli-Q. La mezcla se sonicó con una amplitud del 40 % durante 20 s, se añadieron 8 ml de colato de sodio al 1 % como surfactante y se sonó de nuevo al 40 % durante 40 s. Finalmente, se añadieron 12 ml de colato de sodio al 0.3 %. La disolución se dejó evaporando durante 3 h a 600 rpm en la placa de agitación, se centrifugaron las muestras a 7500 rpm y 15 °C durante 15 minutos. Finalmente, las partículas fueron resuspendidas en agua Milli-Q a la concentración deseada.

### 3.1.2.3. Coencapsulación de C-NPs y CQ por emulsión simple

Para coencapsular CQ y C-NPs en NPs de PLGA se realizó el mismo método de síntesis descrito en el Apartado 3.1.2.1, pero añadiendo CQ a una concentración de 100 mg/ml (marcado por el límite de solubilidad) en la fase acuosa.

### 3.1.2.4. Encapsulación de C-NPs por electrosprayado

El *electrospraying* es una técnica de producción electrostática de fibras a escala micro y nanométrica a partir de soluciones poliméricas solubles. Las micro y nanofibras electrohiladas ofrecen numerosas ventajas, como una proporción superficie-volumen muy alta, porosidad controlable, posibilidad de controlar la composición química de las fibras y sus características físicas y un rendimiento mecánico mejorado respecto a otras formas del material.<sup>266-268</sup> Esencialmente, un *electrospinner* (Figura 3.7) está compuesto por una jeringa –donde se almacena la solución polimérica– conectada a una aguja –por donde sale–, una bomba de infusión –para impulsar la solución polimérica de la jeringa–, un colector plano o rotatorio –donde se depositan las fibras o partículas obtenidas– y una fuente de alimentación de alto voltaje. Bajo esta configuración, la bomba ejerce una presión controlada sobre la jeringuilla, regulando el caudal de salida deseado y propulsando la disolución excedente hasta el extremo distal de la aguja. La aguja, conectada a alto voltaje, transmite la carga eléctrica a la gota de disolución situada en el extremo de la aguja media en agua Milli-Q a la concentración deseada.

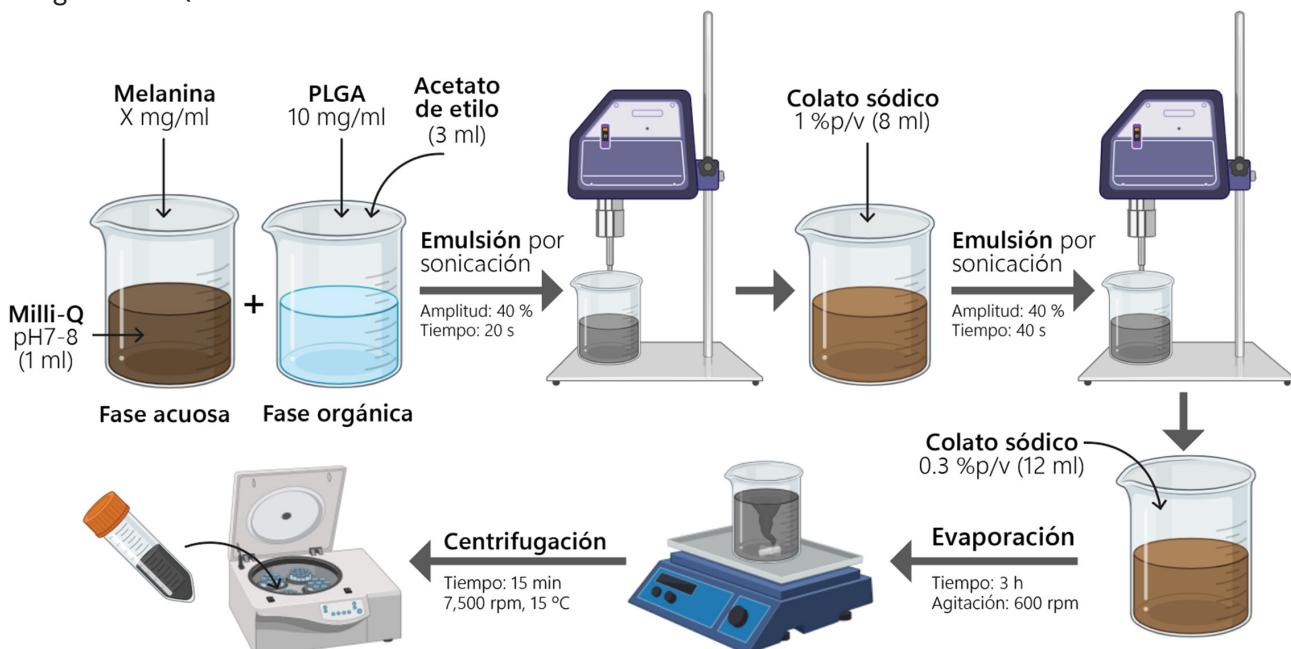
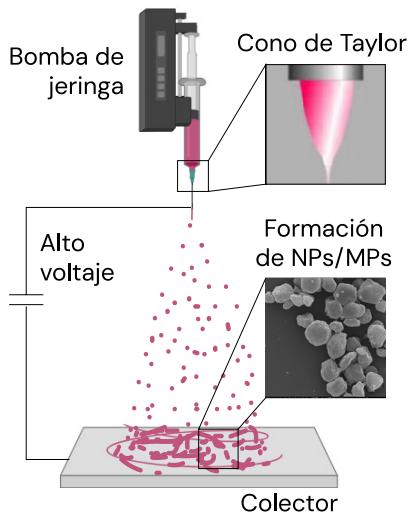


Figura 3.6. Representación esquemática del proceso de síntesis por emulsión doble de las nanopartículas de PLGA con melanina encapsulada.

diente interacciones electrostáticas. La repulsión electrostática de la gota contrarresta la tensión superficial del fluido, ocasionando una geometría característica en la gota conocida como 'cono de Taylor'. La deformación de la gota continúa hasta alcanzar un punto crítico, donde el efecto de la repulsión electrostática sobrepasa el de tensión superficial y, a consecuencia, se genera un flujo continuo de fluido que solidifica en forma de partículas o fibras conocido como «jet». El jet es atraído por el colector por el gradiente eléctrico generado y las fibras generadas se depositan en el colector, siguiendo una trayectoria inestable que se asocia a un mayor estiramiento y a la evaporación del solvente.<sup>269-272</sup>



**Figura 3.7.** Esquema simplificado de un electrospinner. Adaptado de Chen et al.<sup>272</sup>

En esta Tesis, la técnica de *electrosprayado* se utilizó para la encapsulación de C-NPs en MPs de PGLA utilizando un electrospinner (Yflow Electrospinner 2.2.D-500). Durante la síntesis se utilizaron diferentes parámetros para optimizar la producción: la altura de la aguja, el flujo de salida de las disoluciones, la diferencia de voltaje, los disolventes utilizados, la adición de estabilizantes y la concentración de los polímeros. Para la encapsulación de carbono, se utilizó una técnica uniaxial; mientras que para coencapsular C-NPs y CQ se utilizó una técnica coaxial. La necesidad de la técnica coaxial vino dada por la insolubilidad de la CQ en los disolventes disponibles para el *electrosprayado*. En esta técnica, las disoluciones se inyectan simultáneamente a través dos agujas diferentes, una de mayor diámetro que otra y colocadas de manera concéntrica. La disolución polimérica con C-NPs se inyectó a través de la aguja central, mientras que la disolución acuosa con CQ se inyectó a través de la aguja externa. Los materiales sintetizados fueron recogidos en papel de aluminio, situado en un colector plano. Posteriormente, fueron rascados del papel de aluminio y almacenados en seco a 4 °C.

### 3.1.2.5. Caracterización morfológica por microscopía electrónica de barrido

La caracterización morfológica y la distribución de tamaños de las nanopartículas se ha realizado mediante SEM (SEM Inspect F50) funcionando a 5-10 kV en el Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA) de la Universidad de Zaragoza. Las suspensiones se prepararon sobre cinta de carbono en un portaobjetos de aluminio. Las muestras se recubrieron con una capa de Au/Pd utilizando un recubridor de alto vacío (Leica EM ACE200, Wetzlar, Alemania). La distribución de diámetros se obtuvo a partir de mediciones manuales con el software libre Image-J (v1.52; National Institutes of Health, 2019)<sup>276</sup> para una muestra de  $n=100$ .

### 3.1.2.6. Caracterización morfológica por microscopio electrónico de transmisión

La morfología y las dimensiones de las partículas fueron también caracterizadas utilizando un microscopio TEM T20-FEI (Fei Company, Hillsboro, OR, USA) funcionando a 200 kV en el Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA) de la Universidad de Zaragoza. Las muestras de TEM se prepararon depositando 50  $\mu\text{l}$  de coloide dispersado en agua Milli-Q sobre una rejilla de cobre recubierta de formvar y se secaron durante al menos 2 h.

### 3.1.2.7. Determinación del diámetro hidrodinámico por dispersión de luz dinámica

El diámetro hidrodinámico de las partículas fue analizado utilizando la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS, del inglés *Dynamic Light Scattering*) (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY, USA) realizando 5 análisis de 3 min cada uno. El DLS mide las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada en el tiempo para obtener el diámetro hidrodinámico (DH) de las partículas según la ecuación de Stockes-Einstein (**Ecuación 3.1**):

$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta D_t} \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

Donde,  $D_t$  es el diámetro traslacional,  $k$  la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura y  $\eta$  la viscosidad.

### 3.1.2.8. Cuantificación del carbono encapsulado mediante análisis termogravimétricos

Para la cuantificación de la cantidad de C-NPs encapsuladas en las partículas poliméricas se utilizó el análisis termogravimétrico (Mettler Toledo TGA/STDA 851e, Mettler Toledo; Columbus, OH, US) utilizando las temperaturas de degradación de los materiales utilizados durante la emulsión en un rango de 30 a 800 °C con un flujo de N<sub>2</sub> de 50 ml/min.

### **3.1.2.9. Cuantificación indirecta de la melanina encapsulada por espectrofotometría UV-Vis**

Para cuantificar de manera indirecta la cantidad de melanina encapsulada se utilizó espectrofotometría UV-Vis (Ultravioleta-Visible). Se tomaron alícuotas del sobrenadante tras la encapsulación y la cantidad melanina se cuantificó indirectamente mediante espectroscopía UV-Vis (Jasco V670), siendo su máximo de absorbancia 193 nm, tras previamente realizar un ajuste dependiendo la absorbancia obtenida en concentraciones de melanina conocidas.

### **3.1.2.10. Determinación de la concentración coloidal final**

En los coloides obtenidos por emulsión, la concentración final de NPs fue medida por diferencia de pesada, introduciendo 50 µl del coloide en crisoles, dejando la muestra secar a 80 °C durante 24 horas y pesando el pocillo con muestra seca en una microbalanza de precisión. Se determinó según la **Ecuación 3.2**.

$$C(\text{mg/ml}) = \frac{(\text{mg pocillo con partículas} - \text{mg pocillo tarado})}{50 \mu\text{l} \times 1000 \mu\text{l} / 1 \text{ ml}}$$

(Ecuación 3.2)

En los coloides obtenidos por *electrosprayado*, la concentración final fue ajustada directamente a través del peso de las micropartículas previa dispersión en el medio correspondiente.

### **3.1.2.11. Determinación del índice de polidispersión de los coloides**

El índice polidispersión (PDI) se determinó según la **Ecuación 3.3**, donde  $\bar{x}$  representa el valor medio del tamaño y  $\sigma$  es la desviación estándar. El valor PDI indica el grado de dispersión de tamaños de las partículas, considerando un valor PDI = 0.1 como límite superior para considerar la distribución de tamaños de una muestra homogénea.<sup>273</sup>

$$PDI = \left( \frac{\sigma}{\bar{x}} \right)^2 \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

### **3.1.2.12. Ensayos de liberación *in vitro* del carbono, de la melanina y de la clo-roquina**

Para obtener el perfil de liberación de las NPs/MPs cargadas con C-NPs, melanina y CQ, se dispersaron en un medio acuoso y se mantuvieron durante 28 días a 37 °C en agitación continua. Se tomaron alícuotas del sobrenadante todos los días durante

la primera semana, y una vez a la semana durante el resto del mes; es decir, en los días: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21 y 28. La cantidad de C-NPs, melanina o CQ liberada se cuantificaron mediante espectroscopía UV-Vis (Jasco V670), siendo sus máximos de absorbancia 218, 193 y 336 nm en el caso de las C-NPs, de la melanina y la CQ, respectivamente.

### **3.1.2.13. Ensayos de viabilidad celular**

Para determinar la dosis subcitotóxica de los vectores de marcaje se utilizaron líneas celulares de fibroblastos dérmicos humanos, de adenocarcinoma mamario y de macrófagos. Este ensayo se realizó con la colaboración de la Dra. Cristina Yus. Los fibroblastos dérmicos humanos (NHDF-Ad) se obtuvieron de Lonza (Basilea, Suiza), los monocitos-macrófagos de ratón J774A.1 ATCC-TIB-67™ se obtuvieron de LGC Standards (Barcelona, España) y la línea celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 fue cedida por el Dr. Alberto Jiménez Schumacher (IIS Aragón).

Los fibroblastos humanos, las células J774 y MDA-MB-231 se cultivaron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con alto contenido en glucosa (Biowest, Nuaillé, Francia) suplementado con un 10% (v/v) de FBS (Fetal Bovine Serum) inactivado por calor (Gibco, Waltham, EE.UU.) y 1% (v/v) de antibiótico antimicótico (penicilina-estreptomicina-anfotericina B, Biowest, Nuaillé, Francia) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

La citotoxicidad de las nanopartículas sintetizadas se analizó mediante el ensayo Blue Cell Viability (Assay Abnova, Taiwan) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se sembraron a una concentración de 6,000 células/pocillo para fibroblastos y células J774 y 18,000 células/pocillo en la línea celular MBA-MD-323. Después se incubaron durante 24 h. A continuación, se añadieron a las células las partículas sintetizadas. Transcurridas 24 h, se añadió el reactivo (10 % (v/v)), se incubaron las células durante 4 h a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> y se determinó la fluorescencia a 530/590 ex/ém en un lector de microplacas Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.). La citotoxicidad se evaluó comparando los valores obtenidos para las células tratadas y las no tratadas, considerando estos controles como un 100 % de viabilidad. Se realizaron cuatro réplicas de cada experimento por triplicado. Todos los resultados se presentan como media ± desviación estándar. Los datos se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías utilizando el software GraphPad Prism 8 (San Diego, EE.UU.). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando p ≤ 0.05

## 3.2. Materiales y métodos para la preparación de los vectores particulados

### 3.2.1. Materiales

#### 3.2.1.1. Metilcelulosa

La metilcelulosa (MC) es un compuesto derivado de la celulosa utilizado como espesante en diferentes industrias incluyendo la alimentaria y la cosmética (**Figura 3.8**). En medicina, se utiliza ampliamente como agente espesante y gelificante en formulaciones farmacéuticas, incluyendo el desarrollo de gotas oculares lubricantes, suplementos dietéticos y productos de uso tópico para el tratamiento de heridas y quemaduras. En este apartado de la tesis, la MC ha sido utilizado como matriz biocompatible para aumentar la viscosidad del vector, facilitando su inyección en el tejido y reduciendo su diseminación por el canal de la inyección.

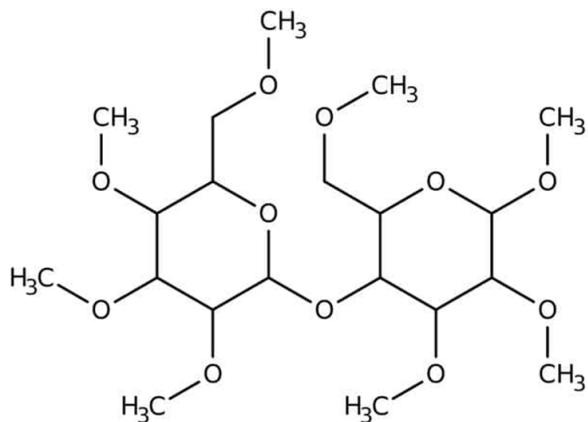


Figura 3.8. Estructura química de la metilcelulosa.

#### 3.2.1.2. Polietilenglicol

El PEG es un poliéster soluble en agua ampliamente utilizado en medicina por su capacidad para mejorar la solubilidad de compuestos farmacéuticos y su baja toxicidad. Se emplea en formulaciones farmacéuticas para administración oral, tópica e intravenosa, así como en productos para el cuidado de la piel y lubricantes oftálmicos (**Figura 3.9**).<sup>274</sup> En esta Tesis, el PEG ha sido utilizado con el mismo objetivo que la MC.

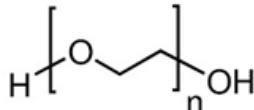


Figura 3.9. Estructura química del polietilenglicol.

### 3.2.2. Métodos

#### 3.2.2.1. Preparación del medio de MC

La MC fue disuelta en agua Milli-Q realizando cambios de temperatura de 80 a 0°C alternativamente mientras la muestra estaba sometida a agitación magnética a 600 rpm. De la misma manera, se utilizaron diferentes concentraciones de MC: 0.5, 1.0 y 2.0 %(p/v).

#### 3.2.2.2. Preparación del medio de PEG

La preparación del medio basado en PEG consistió en la disolución directa del PEG en agua Milli-Q centrifugando el polímero a 10,000 rpm durante 5 min a diversas concentraciones: 0.5, 1.0 y 2.0 %(p/v).

#### 3.2.2.3. Preparación y esterilización de los vectores particulados

Las NPs obtenidas por emulsión fueron centrifugadas para concentrar las partículas y retirar el sobrenadante. Una vez centrifugadas, fueron redispersadas en el medio viscoso correspondiente y

homogeneizadas utilizando ultrasonidos durante 15 min. Las MPs producidas por *electrosprayado* fueron rascadas del colector de aluminio y pesadas en microbalanza hasta separar la cantidad necesaria para conseguir la concentración establecida. Posteriormente, las partículas fueron lavadas con agua utilizando una centrífuga a 13,000 rpm durante 5 min. Una vez retirado el sobrenadante, se procedió a incorporar el medio viscoso y a homogeneizarlo con ultrasonidos durante 15 min. Para la esterilización de los vectores, las alícuotas correspondientes fueron expuestas a radiación UV y balanceadas en rotores durante al menos 5 h.

#### 3.2.2.4. Evaluación *in vitro* de la estabilidad de los vectores

Se realizaron pruebas *in vitro* para recrear el momento de la inyección del marcaje y valorar experimentalmente la dificultad durante la inyección y su preservación en el tejido ganglionar. Para ello, se utilizaron agujas 21G y utilizando jeringuillas de anestesia se inocularon entre 0.1 y 0.2 ml de vector en tejido adiposo porcino, en tejido adiposo de pollo, en tejido muscular de pollo y en riñones de conejo. El tejido adiposo porcino fue obtenido de la careta de

un cerdo con el objetivo de valorar la tinción del marcaje en tejido blanquecino. Los tejidos adiposos y musculares de pollo fueron seleccionados por presentar una densidad y textura semejante a la humana y para valorar si la viscosidad de los vectores era adecuada. Finalmente, los riñones de conejo fueron elegidos por ser vísceras con tejido blando y poseer membranas externas. Se ha valorado si la tinción de la estructura se dispersaba de manera homogénea y si se perdía fluido por el canal de la punción en el momento de la inyección. Para valorar la perdurabilidad del marcaje en el tiempo se utilizaron cortes de tejido adiposo porcino. Las muestras de tejido se introdujeron en un tubo Falcon con 40 ml de buffer salino fosfatado (PBS) a pH 7.4 y se mantuvieron en agitación a 37 °C hasta 3 semanas.

### 3.2.3. Nomenclatura y justificación de los vectores desarrollados

En capítulos a continuación, para facilitar la lectura de esta tesis, se utilizará la siguiente nomenclatura:

- **CE**: vectores de MPs cargadas de C-NPs obtenidas por *electrosprayado*.
- **CS**: vectores de NPs cargadas de C-NPs obtenidas por emulsión.
- **M**: vectores de NPs cargadas de melanina obtenidas por emulsión.

Tras este primer identificador, se añadirá un número en referencia a la concentración de partículas en el vector inyectable. Por ejemplo 'CE10' corresponderá al vector de MPs cargadas de C-NPs obtenidas por *electrosprayado* a una concentración final de 10 mg/ml.

Por defecto, el polímero base de las NPs y MPs será PLGA Resomer® RG 504H, mientras que cuando se utilice el segundo polímero (PLGA Resomer® RG 858S) será definido como 'P858'. De esta manera, CS20 se referirá al vector de C-NPs obtenidas por emulsión a una concentración de 20 mg/ml obtenidas con el polímero base PLGA Resomer® RG 504H, mientras que CS20-P858 será el vector de C-NPs a una concentración de 20 mg/ml obtenidas con el polímero base PLGA Resomer® RG 858S. Las únicas partículas que han

sido evaluadas *in vivo* con este polímero son las C-NPs, por lo que en los vectores de NPs cargadas de melanina y MPs cargadas de C-NPs no se especificará el polímero, dado que siempre será PLGA Resomer® RG 504H.

Por último, las partículas C-NPs pueden también incorporar el fármaco (CQ); no así las Mel-NPs ni las CMPs. En estos casos, además, se colocará el indicador CQ. Por tanto, CS10-P858-CQ se referirá a un vector de C-NPs cargadas con cloroquina a concentración de 10 mg/ml que ha sido sintetizado con PLGA Resomer® RG 858S.

Todos los vectores utilizados en la experimentación animal se realizaron con MC 1.5%(p/v). Considerando la terminología indicada en el apartado anterior, se desarrollaron los siguientes vectores de marcaje para su valoración en animal de experimentación.

1. **CS10**: 10 mg/ml de NPs de PLGA RG 504H encapsulando C-NPs.
2. **CS20**: 20 mg/ml de NPs de PLGA RG 504H encapsulando C-NPs.
3. **CS40**: 40 mg/ml de nanopartículas de PLGA Resomer® RG 504H encapsulando C-NPs.
4. **M10**: 10 mg/ml de NPs de PLGA RG 504H encapsulando melanina.
5. **M20**: 20 mg/ml de NPs de PLGA RG 504H encapsulando melanina.
6. **M40**: 20 mg/ml de NPs de PLGA RG 504H encapsulando melanina.
7. **CE10**: 10 mg/ml de MPs de PLGA RG 504H encapsulando C-NPs.
8. **CE20**: 20 mg/ml de MPs de PLGA RG 504H encapsulando C-NPs.
9. **CE40**: 40 mg/ml de MPs de PLGA RG 504H encapsulando C-NPs.
10. **CS10-CQ**: 10 mg/ml de NPs de PLGA RG 504H coencapsulando C-NPs y CQ.
11. **CS10-P858**: 10 mg/ml de NPs de PLGA RG 858S encapsulando C-NPs.
12. **CS10-P858-CQ**: 10 mg/ml de NPs de PLGA RG 858S coencapsulando C-NPs y CQ.
13. **CS20-CQ**: 20 mg/ml de NPs de PLGA RG 504H coencapsulando C-NPs y CQ.
14. **CS20-P858**: 20 mg/ml de NPs de PLGA RG 858S encapsulando C-NPs.
15. **CS20-P858-CQ**: 20 mg/ml de NPs de PLGA RG 858S coencapsulando C-NPs y CQ.
16. **Control**: como control se utilizó una suspensión de 20 mg/ml de C-NPs.

# 3.3. Estudios experimentales *in vivo*

## 3.3.1. Animales

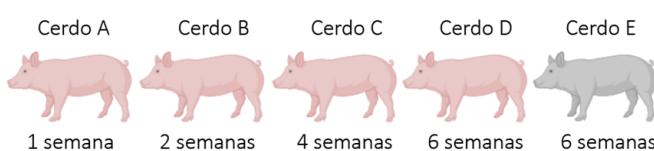
Se utilizaron 10 cerdos de raza White Landrace con un peso medio de 25 kg y dos meses de edad por la similitud morfológica (aunque no histológica) de los ganglios linfáticos en el modelo humano.<sup>275</sup> Se utilizaron animales hembras por su anatomía más adecuada y su fácil manejo quirúrgico.

## 3.3.2. Metodología

### 3.3.2.1. Diseño experimental

Los animales de experimentación fueron divididos en 2 grupos de estudio: a corto plazo ( $n=5$ ) y a largo plazo ( $n=5$ ) (Figura 3.10). El grupo de experimentación a corto plazo estuvo constituido por 5 animales estabulados durante 1 semana ( $n=1$ ), 2 semanas ( $n=1$ ), 4 semanas ( $n=1$ ) y 6 semanas ( $n=2$ ) con el objetivo de realizar una prueba de concepto y valorar la estabilidad del marcaje a corto plazo. Sin embargo, 1 cerdo del primer grupo falleció antes de los estudios experimentales. El grupo a largo plazo estuvo formado por 5 animales, que fueron estabulados durante 16 semanas para su estudio a largo plazo. A su vez, este grupo se subdividió en dos subgrupos. En un subgrupo se incluyeron 3 animales para continuar con el estudio de los marcajes administrados. En el otro subgrupo se utilizaron 2 animales con el objetivo de realizar una optimización de los vectores administrados.

#### Grupo 1: Estudios a corto plazo



#### Grupo 2: Estudios a largo plazo



Figura 3.10. Esquema de los grupos de animales de experimentación utilizados.

En los animales del grupo a corto plazo ( $n=5$ ) se administraron los siguientes vectores: CS10, CS20, CE10, CE20, M10, M20 y control. Aunque inicialmente se planteó el uso de las partículas a concentración 40 mg/ml (CS40, CE40 y M40), se descarta-

ron tras el primer animal de experimentación por la dificultad que supuso su administración en el ganglio linfático. En el subgrupo de 3 animales a largo plazo se inocularon CS10, CS20, CE10, CE20, M10, M20 y control. En el subgrupo de 2 animales a largo plazo se inocularon CS20, CS10-P858, CS20-P858, CS10-CQ, CS20-CQ, CS10-P858-CQ y CS20-P858-CQ.

### 3.3.2.2. Aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal

El procedimiento experimental fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Animal (CEICA) de la Universidad de Zaragoza en febrero de 2020, bajo la referencia PI09/20.

### 3.3.2.3. Procedimientos de estabulación de los animales

Los animales fueron estabulados en las instalaciones adecuadas del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA) al menos 7 días tras el transporte y antes del comienzo del experimento para su aclimatación a las nuevas condiciones. Tanto la comida como el agua fueron suministradas ad libitum. Durante el procedimiento experimental, los animales permanecieron anestesiados (anestesia general con respiración controlada, intubación orotraqueal, perfusión continua de analgésicos y gases anestésicos) y analgesiados, hasta su sacrificio.

### 3.3.2.4. Procedimientos anestésicos

El protocolo realizado fue el siguiente:

- Preanestesia: Zoletil® + Dexmedetomidina intramuscular (5mg/kg+0,0075mg/Kg vía intramuscular)
- Inducción: Propofol a efecto (si es necesario), vía intravenosa, máximo 6 mg/kg.
- Mantenimiento: Anestesia inhalatoria: Sevofluorano, Et: 1,9 %.
- Analgesia intraoperatoria: Fentanilo intravenoso en infusión continua 10 µg/kg/h.
- Fluidoterapia: Durante toda la intervención se administrará solución de Ringer lactato a un ritmo de 8/ml/kg/h.
- Protección ocular: Lubricante oftálmico.

Las constantes hemodinámicas y el electrocardiograma (EKG) del animal fueron monitorizadas durante todas las intervenciones.

### 3.3.2.5. Procedimientos quirúrgicos

Las cirugías de administración del marcaje y de exéresis ganglionar se detallan en mayor profundidad en el Apartado 4.3.1 de la sección de Resultados. Brevemente, una vez anestesiados los animales y administrada la profilaxis antibiótica se procedió a una laparotomía media, tras separar las asas intestinales se localizaron los ganglios mesentéricos de las regiones ileales y de la raíz del mesenterio. Se seleccionaron los ganglios de ambas regiones por su localización constante en el mesenterio del animal de experimentación. Inmediatamente se procedió a la inyección del vector de marcaje seleccionando en el seno del ganglio y al marcaje mediante puntos de referencia en las cercanías del ganglio, pero sin afectar a este. Se cerró la laparotomía con doble sutura continua de material irreabsorbible. Todo el procedimiento tuvo una duración inferior a 60 min.

Los animales fueron establecidos en jaulas individuales durante todo el proceso hasta su sacrificio. Se tuvieron en consideración las normas de bienestar animal y como criterios de punto final se utilizaron los habituales de las guías de la práctica experimental:

- Mal aspecto general del animal antes del inicio de la experimentación.
- Imposibilidad de canalización de vía intravenosa.
- Imposibilidad de intubación orotraqueal.
- Hemorragia incoercible.
- Imposibilidad de controlar la relajación muscular.
- Hipertermia maligna.

### 3.3.2.6. Sacrificio de los animales

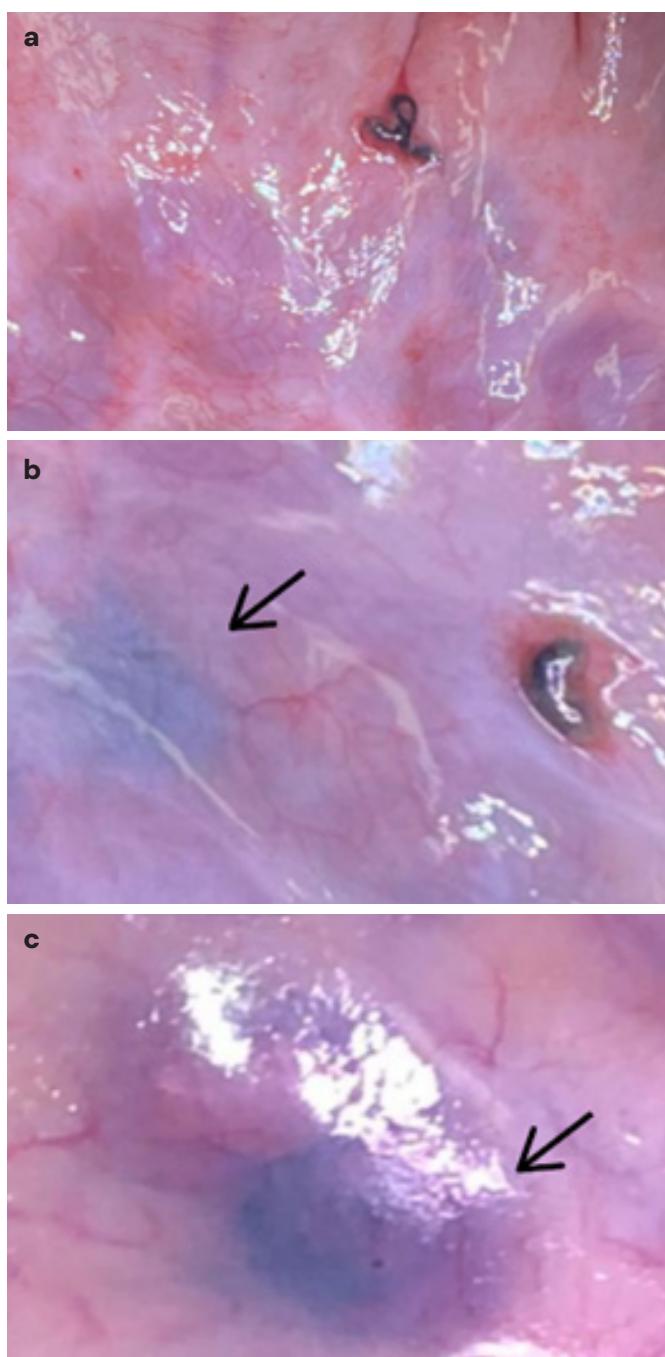
El sacrificio fue realizado por el anestesista cualificado del Servicio de Cirugía Experimental del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS). Dicho protocolo implica que, con el animal anestesiado y analgesiado, en coma profundo, y bloqueo muscular, se procede a la administración de una dosis única de cloruro potásico (150 mM) por vía intravenosa, impidiendo la despolarización del músculo cardíaco y provocando su parada.

## 3.3.3. Variables macroscópicas

A nivel macroscópico se analizaron dos variables: la facilidad en la identificación intraoperatoria (durante la cirugía) y la estimación del área marcada (tras la exéresis y fijación de los ganglios, pero sin realizar cortes).

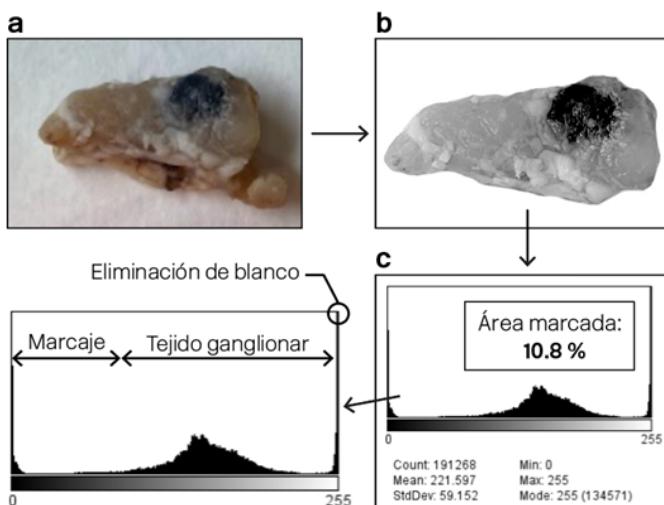
### 3.3.3.1. Facilidad de identificación

Durante de la cirugía de disección, los ganglios linfáticos etiquetados se fotografiaron *in situ* y la facilidad de su identificación visual se puntuó subjetivamente en una escala de 1 a 3, siendo 1 "indistinguible" y 3 "muy fácil" (**Figura 3.10**). Dado que los ganglios fueron doblemente marcados utilizando diferentes puntos de sutura con seda, se consideró que los ganglios valorados con una puntuación 2 y 3 serían "identificables", mientras que los ganglios puntuados con 1 no lo serían. Por tanto, la tasa de identificación intraoperatoria se cuantificó de esta manera.

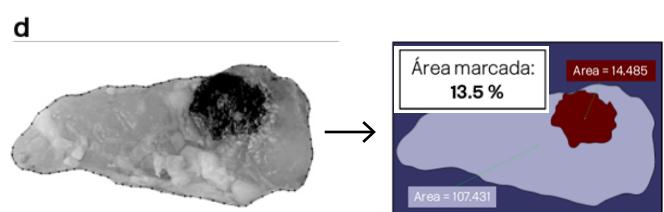


**Figura 3.10.** Escala de facilidad en la identificación intraoperatoria de los ganglios linfáticos.

### Método propuesto



### Validación del método



**Figura 3.11.** Esquema del método de cuantificación de tejido ganglionar marcado.

### 3.3.3.2. Área marcada

La cuantificación del porcentaje de área marcada se basó en el análisis del histograma. Se procesaron las fotografías de ganglios linfáticos recién disecados colocándolos en su orientación con mayor área de marcaje (**Figura 3.12 a**). El fondo de la imagen fue coloreado de blanco para, posteriormente, eliminar estos píxeles y delimitar la extensión del ganglio. La imagen fue convertida a escala de grises y manualmente se ajustaron parámetros de corrección de la imagen para alcanzar un contraste aceptable entre el tejido ganglionar no marcado y el área marcada (**Figura 3.11 b**). Utilizando Image-J (v1.52; National Institutes of Health, 2019),<sup>276</sup> se extrajo el histograma de la imagen (**Figura 3.11 c**) y se calculó el porcentaje del área marcada cuantificando el número de píxeles con el 30 % de los grises más oscuros, teniendo en cuenta todo el área no blanca pura. Este sistema fue validado calculando el área manualmente de 3 ganglios, tal y como se muestra en la **Figura 3.11 d**. Se estimó un error de  $\pm 3\%$  en el área marcada.

## 3.4. Estudios histopatológicos y de microscopía electrónica

### 3.4.1. Microscopía óptica

Los ganglios linfáticos se fijaron durante 3 días con formaldehído al 4 % y se realizaron cortes de aproximadamente 3 mm de grosor. Se seleccionó el corte con más marcaje para el procesamiento histológico. Las muestras se procesaron de acuerdo con los procedimientos estándar y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para su examen microscópico (microscopio Olympus BX51, Olympus Imaging Corporation; Tokio, Japón). El procesamiento histológico y la tinción se realizaron en los Servicios Técnicos Científicos - Microscopía y Anatomía Patológica del IACS.

### 3.4.2. Microscopía electrónica de transmisión

Tras la disección ganglionar, se recogieron muestras de 1-2 mm<sup>2</sup> se fijaron en glutaraldehído al 2 % en tampon fosfato (PB, del inglés *Phosphate-Buffered*) durante 3 días y posteriormente se lavaron con PB. Las muestras se posfijaron con osmio al 2%, se aclararon,

se deshidrataron en acetona graduada (30, 50, 70% con acetato de uranilo al 2%, 90 y 100%), se aclararon en óxido de propileno y se incrustaron en araldita (Durcupan, Fluka AG; Buchs SG, Suiza). Para los cortes semifinos y ultrafinos se utilizó un ultramicrótomo RMC MT-XL. Se cortaron secciones semifinas (1.5 μm) y ultrafinas (0.05 μm) con un cuchillo de diamante. Los semifinos se tiñeron con azul de toluidina al 1 % y se examinaron mediante microscopía óptica (microscopio Olympus BX51, Olympus Imaging Corporation; Tokio, Japón). Las secciones ultrafinas se recogieron en rejillas de una sola ranura recubiertas de Formvar y teñidas con acetato de uranilo al 1 % y citrato de plomo de Reynold. Las muestras se observaron en el Servicio de Microscopía Electrónica de Sistemas Biológicos de la Universidad de Zaragoza con un microscopio de transmisión JEOL JEM 1010 funcionando a 80 kV y en el Servicio de Microscopía del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF, Valencia, España) con un microscopio TECNAL F20 funcionando a 80 kV.

Las reconstrucciones tridimensionales (3D) se realizaron a través de la segmentación manual de ultrafinos seriados ( $0.05\text{ }\mu\text{m}$ ) utilizando el software Fiji de Image-J (v1.52; National Institutes of Health, 2019).<sup>276</sup>

### 3.4.3. Variables microscópicas

Mediante microscopía óptica se evaluaron los siguientes parámetros: la localización de las partículas, el tamaño de los cúmulos formados por los aglomerados de partículas y la presencia de reacción inflamatoria.

#### 3.4.3.1. Localización de las partículas

La determinación de la localización de las partículas se realizó de manera subjetiva según la ubicación predominante del marcaje. Como se observa en la Figura 3.12, la localización del marcaje fue clasificada en: zona interna, región pericapsular, tejido adyacente, zona interna/región pericapsular, zona interna/tejido adyacente, región pericapsular/tejido adyacente o todas las localizaciones.

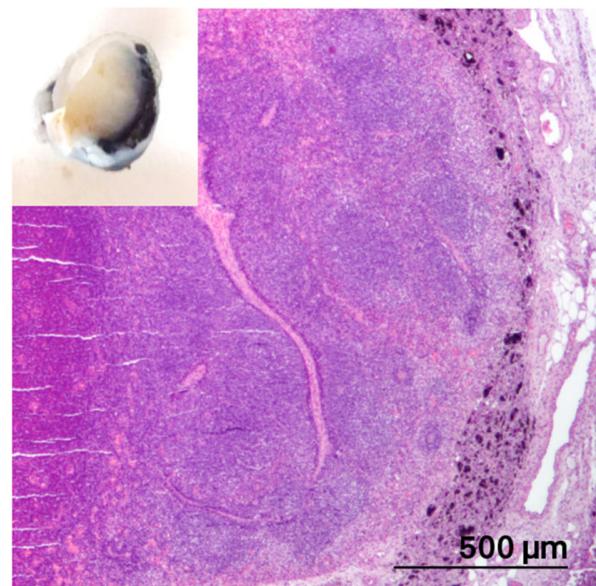
#### 3.4.3.2. Tamaño de los cúmulos

El tamaño de los cúmulos formados por las partículas inoculadas se midió manualmente y de manera aleatoria utilizando el software Image-J (v1.52; National Institutes of Health, 2019)<sup>276</sup> para  $n=50$  cúmulos en cada sección de ganglio.

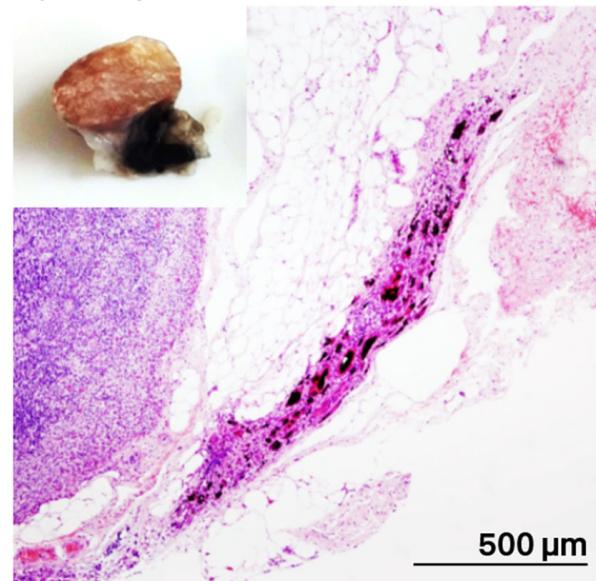
#### 3.4.3.3. Intensidad de la reacción inflamatoria

Se evaluó la presencia de reacción inflamatoria y la intensidad de la misma, siendo esta cuantificada a través de la medición de la extensión del tejido inflamado en las secciones del ganglio. Se midió la sección más extensa de tejido inflamatorio manualmente con el software Image-J (v1.52; National Institutes of Health, 2019).<sup>276</sup>

Pericapsular



Tejido adyacente



Región interna

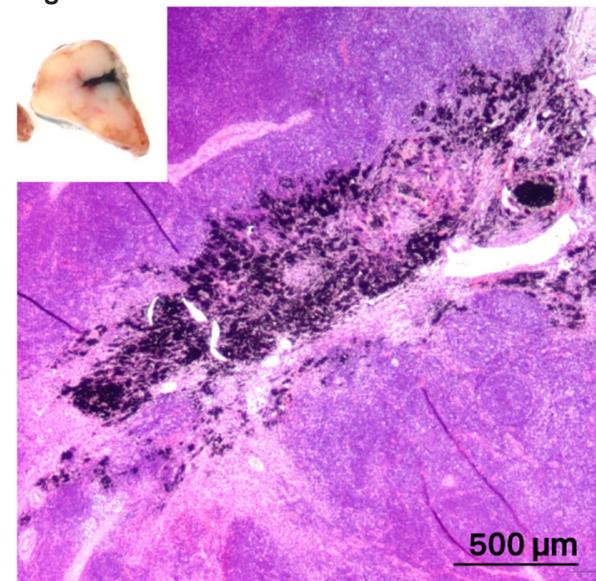


Figura 3.12. Clasificación de la localización predominante de las partículas en el ganglio linfático.

## 3.5. Estudio estadístico

El estudio estadístico se realizó con las variables previamente recogidas. Los análisis se realizaron con IBM SPSS Statistics (SPSS Inc.; Illinois, EE.UU.). Los ganglios linfáticos tatuados con controles (C-NPs) sólo se utilizaron como control y no se incluyeron en los estudios estadísticos. Se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para estudiar la normalidad de las muestras, obteniendo como conclusión que ninguna de las distribuciones de las muestras sigue una distribución normal (**Tabla 3.5**). Por tanto, se utilizaron pruebas no paramétricas.

**Tabla 3.2.** Prueba de Shapiro-Wilk de las variables.

Variable	Estadístico	Significación
Facilidad en la identificación	0.731	< 0.001
Área marcada	0.839	< 0.001
Tamaño de los cúmulos	0.378	< 0.001
Extensión de la inflamación	0.864	< 0.001

Las variables "facilidad en la identificación", "área marcada", "tamaño de los cúmulos" y "extensión de la inflamación" se estudiaron dentro de los grupos definidos en función

- Del **tiempo**:

Grupo 1: ganglios marcados en los "estudios a corto plazo" (1-6 semanas).  
Grupo 2: ganglios marcados en los "estudios a largo plazo" (16 semanas).

- Del **tipo de marcaje utilizado** (considerando solo los datos del grupo a "largo plazo" de 16 semanas):

Grupo 1: ganglios marcados con CS (nanopartículas cargadas de C-NPs).  
Grupo 2: ganglios marcados con CE (micropartículas cargadas de C-NPs).  
Grupo 3: ganglios marcados con M (nanopartículas cargadas de melanina).

\* El resto de vectores no se consideraron dado que el tamaño muestral es inferior a éstos.

- De la **concentración** (considerando solo los datos del grupo a "largo plazo" de 16 semanas):

Grupo 1: ganglios marcados con CS10, CE10, M10, CS10-CQ, CS10-P858 y CS10-P858-CQ (concentración de 10 mg/ml).  
Grupo 2: ganglios marcados con CS20, CE20, CS20-CQ, CS20-P858 y CS20-P858-CQ (concentración de 20 mg/ml).

- Del **tamaño de las partículas**:

Grupo 1: ganglios marcados con CS10 y CS20 (nanopartículas).  
Grupo 2: ganglios marcados con CE10 y CE20 (micropartículas).

- Del **polímero utilizado**:

Grupo 1: ganglios marcados con CS10 y CS20 (nanopartículas de PLGA RG504H).  
Grupo 2: ganglios marcados con CS10-P858 y CS20-P858 (nanopartículas de PLGA RG858H).

- De la **incorporación de cloroquina**:

Grupo 1: ganglios marcados con CS10 y CS20 (nanopartículas cargadas de C-NPs).  
Grupo 2: ganglios marcados con CS10-CQ y CS20-CQ (nanopartículas cargadas de C-NPs y CQ).

- Del **polímero utilizado y de la incorporación de cloroquina**:

Grupo 1: ganglios marcados con CS10, CS20 (nanopartículas de PLGA RG504H con C-NPs).  
Grupo 2: ganglios marcados con CS10-P858-CQ, CS20-P858-CQ (nanopartículas de PLGA RG858H cargadas de C-NPs y CQ).

En estos grupos, el análisis de los datos se realizó mediante las pruebas de Kruskal-Wallis (cuando se compararon más de dos grupos) y la U de Mann-Whitman (cuando se compararon dos grupos).

En los estudios de correlación entre variables se utilizó el coeficiente de correlación de rangos de Kendall. En ambos se consideraron correlaciones estadísticamente significativas cuando  $p \leq 0.05$ .



# Capítulo 4.

# Resultados

<b>4.1. Síntesis y caracterización de los vectores de marcaje</b>	<b>84</b>
4.1.1. Encapsulación de C-NPs en NPs por emulsión simple	84
4.1.2. Coencapsulación de C-NPs y CQ en NPs por emulsión simple	90
4.1.3. Encapsulación de melanina en NPs por emulsión doble	93
4.1.4. Encapsulación de C-NPs en MPs por <i>electrosprayado</i>	96
4.1.5. Preparación de los vectores nano y micro-particulados	106
<b>4.2. Estudio histológico y ultraestructural del ganglio linfático porcino</b>	<b>107</b>
<b>4.3. Evaluación de los vectores de marcaje en animal de experimentación</b>	<b>117</b>
4.3.1. Desarrollo de los estudios experimentales <i>in vivo</i>	117
4.3.2. Relación de vectores y ganglios linfáticos administrados	119
4.3.3. Tasa de identificación y facilidad de identificación intraoperatoria	121
4.3.4. Determinación del área marcada	125
<b>4.4. Valoración histopatológica</b>	<b>127</b>
4.4.1. Hallazgos histopatológicos	127
4.4.2. Localización de las partículas	128
4.4.3. Morfometría de los cúmulos de partículas	133
4.4.4. Reacción inflamatoria	136
<b>4.5. Estudio ultraestructural</b>	<b>139</b>
4.5.1. Fagocitosis de las partículas y efectos en los macrófagos	139
4.5.2. Reclutamiento de células inmunitarias circulantes para enfrentar la inflamación	148

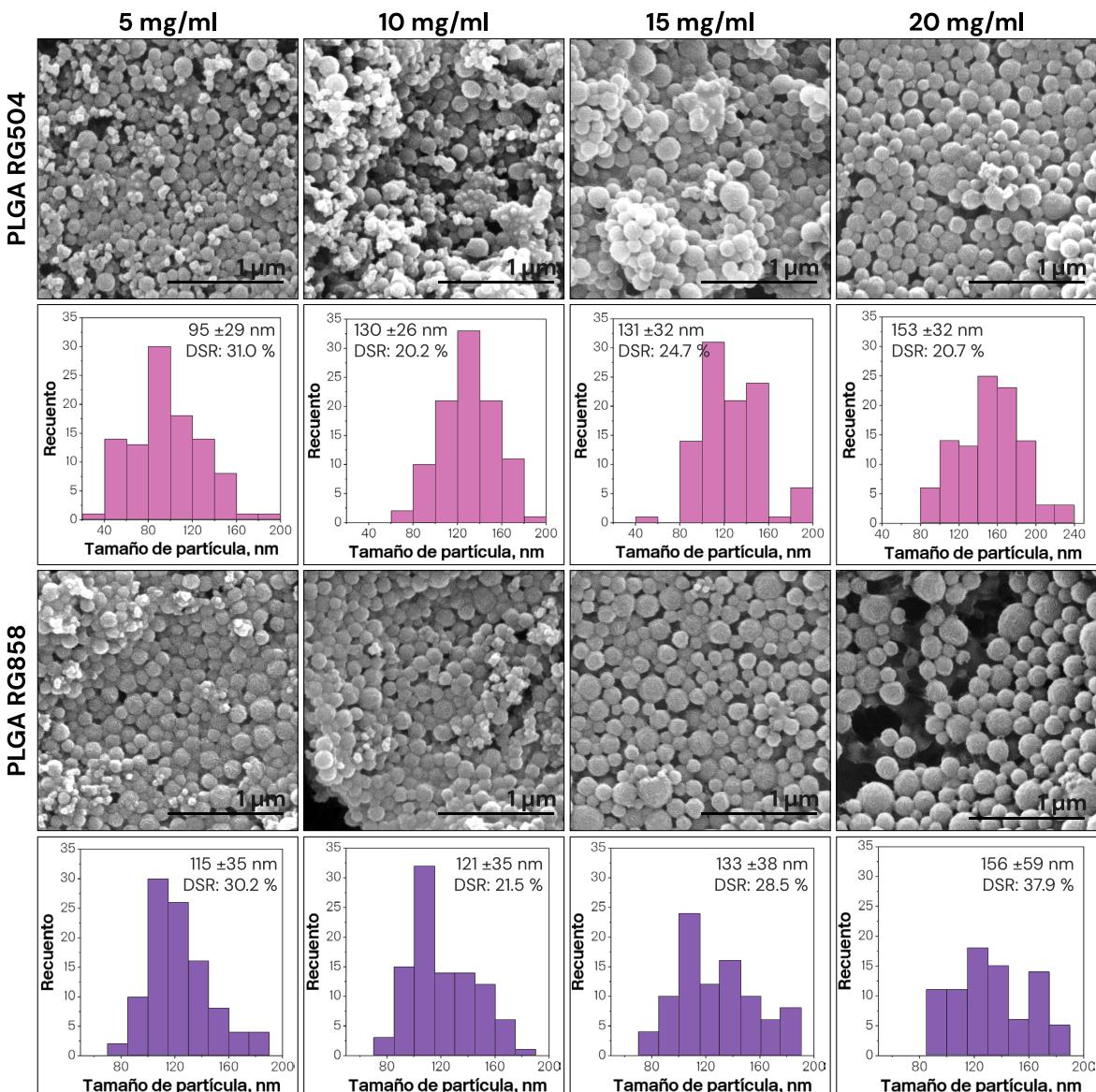
# 4.1. Síntesis y caracterización de los vectores de marcaje

Este apartado de la Tesis tuvo por objetivo la síntesis, optimización y caracterización de los vectores de marcaje. La sección ha sido organizada según el método de síntesis utilizado.

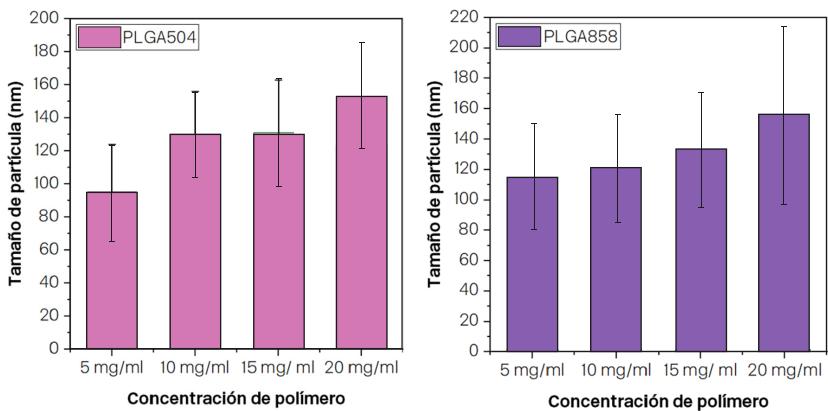
## 4.1.1. Encapsulación de C-NPs en nanopartículas por emulsión simple

### 4.1.1.1. Optimización de la concentración de PLGA en la síntesis de NPs

Con el objetivo de analizar el efecto de la concentración del polímero en el tamaño de la partícula, se realizaron diversas síntesis variando la cantidad de PLGA (sin encapsular C-NPs ni melanina). Se utilizaron los polímeros PLGA Resomer® RG504H y RG858S en diferentes concentraciones: 5, 10, 15 y 20 mg/ml. Como se ilustra en las **Figuras 4.1 y 4.2**, el tamaño no varió sustancialmente entre una síntesis y otra, aunque sí fue aumentando conforme se incrementó la concentración de PLGA.



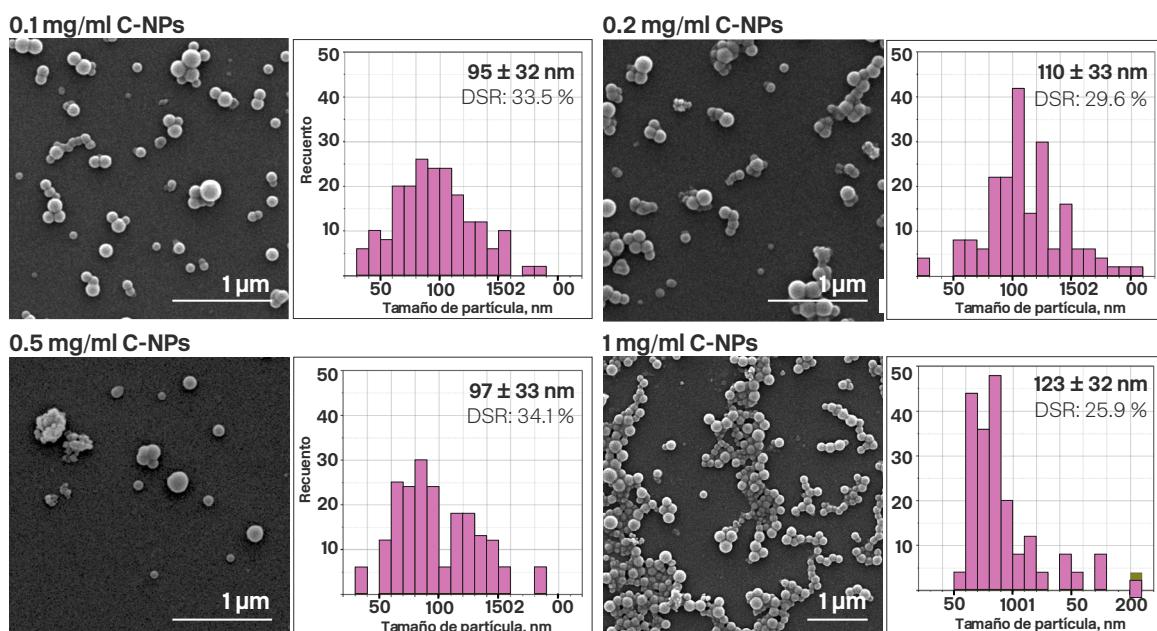
**Figura 4.1.** Micrografías SEM de las nanopartículas de PLGA obtenidas durante la optimización de la concentración de polímero. Las imágenes se acompañan de sus respectivos histogramas de diámetros.



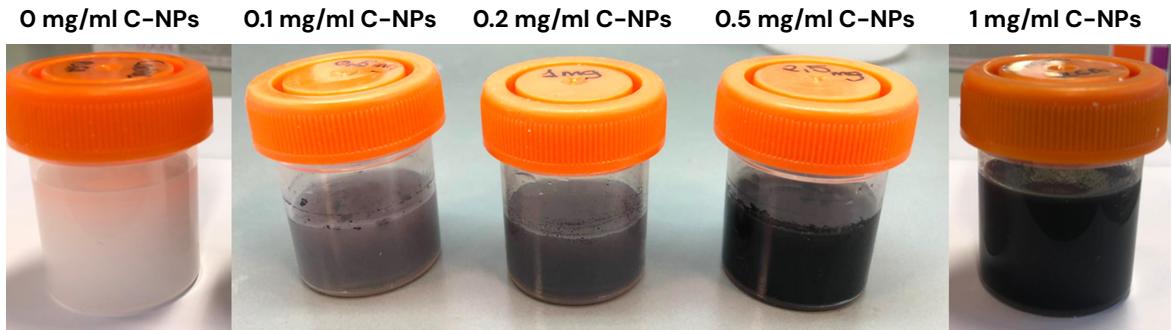
Las diferencias entre las medidas mediante DLS y mediante SEM se deben a que en el primer caso las partículas se encuentran en dispersión coloidal, y en el segundo caso están fijadas, deshidratadas y sometidas a alto vacío. Todos los coloides fueron homogéneos en la distribución de tamaños de partícula ( $PDI < 0.01$ ). Se decidió continuar el proceso de optimización utilizando PLGA a una concentración de 10 mg/ml, dado que minimiza el uso de polímero y no se ha encontrado una diferencia significativa en el tamaño de NPs resultante.

#### 4.1.1.2. Optimización de la concentración de C-NPs durante la encapsulación en NPs

El objetivo de esta sección fue determinar la concentración de C-NPs óptima para favorecer la coloración macroscópica de las NPs. Para tratar de obtener coloides con NPs de PLGA altamente cargadas de C-NPs, se realizaron 4 emulsiones diferentes variando la concentración de carbono (0.1, 0.2, 0.5 y 1.0 mg/ml). La disolución de carbono de 1 mg/ml se estableció como límite superior por alcanzar el límite de saturación. La morfología de las NPs obtenidas y su histograma de distribución de tamaños fueron caracterizados utilizando SEM (Figura 4.3). Frente a escasas diferencias, tanto en el promedio de diámetros de partícula ( $95 \pm 32$ ,  $110 \pm 33$ ,  $97 \pm 33$  y  $123 \pm 32$  nm, para 0.1, 0.2, 0.5 y 1.0 mg/ml, respectivamente) como en la homogeneidad en las distribuciones de tamaños ( $PDI < 0.01$  en todos los casos, y DSR del 33.5, 29.6, 34.1 y 25.9 %, para 0.1, 0.2, 0.5 y 1.0 mg/ml, respectivamente), se decidió elegir la emulsión con mayor concentración de C-NPs (1.0 mg/ml) y, por tanto, la que producía una mayor encapsulación de C-NPs en la síntesis y mayor coloración a nivel macroscópico (Figura 4.4).



**Figura 4.3.** Morfología de las nanopartículas de PLGA con carbono encapsulado durante la optimización de la síntesis al SEM con sus respectivos histogramas de distribución de diámetros, donde se aprecia la emulsión utilizando 0.1, 0.2, 0.5 y 1.0 mg/l de C-NPs.



**Figura 4.4.** Síntesis de nanopartículas con C-NPs encapsuladas a diferentes concentraciones (0, 0.1, 0.2, 0.5 y 1 mg/ml).

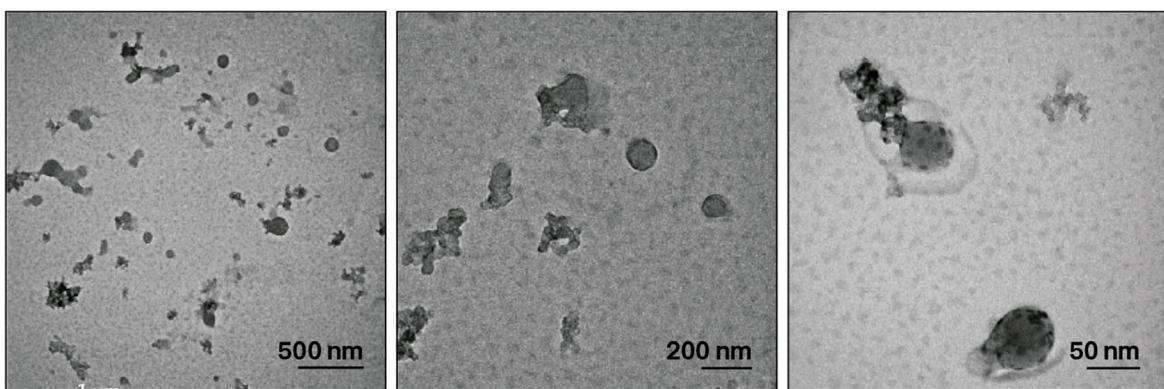
El diámetro hidrodinámico de los coloides fue obtenido utilizando la técnica DLS. De las 5 mediciones realizadas, se tuvieron en cuenta aquellas 3 con un *baseline index* más alto, lo que supone una mayor precisión en las mediciones. El promedio del tamaño en las NPs obtenidas en la emulsión con 0.1 mg/ml de C-NPs fue de 179.7 nm, mientras que las de 0.2 mg/ml fue de 176.6 nm, las de 0.5 mg/ml de 186.9 nm y las de 1 mg/ml de 211.1 nm (**Tabla 4.1**). Como ocurre en la anterior medición en seco, los resultados fueron muy similares en todas las síntesis.

**Tabla 4.1.** Diámetros hidrodinámicos medidos por DLS de C-NPs durante la optimización.

Concentración	Tamaño (nm)	Promedio (nm)
0.1 mg/ml	181.1 (8.3)	179.7 (8.6)
0.2 mg/ml	174.7 (9.3)	176.6 (10.0)
0.5 mg/ml	185.4 (9.6)	186.9 (9.3)
1.0 mg/ml	210.7 (9.9)	211.1 (9.7)

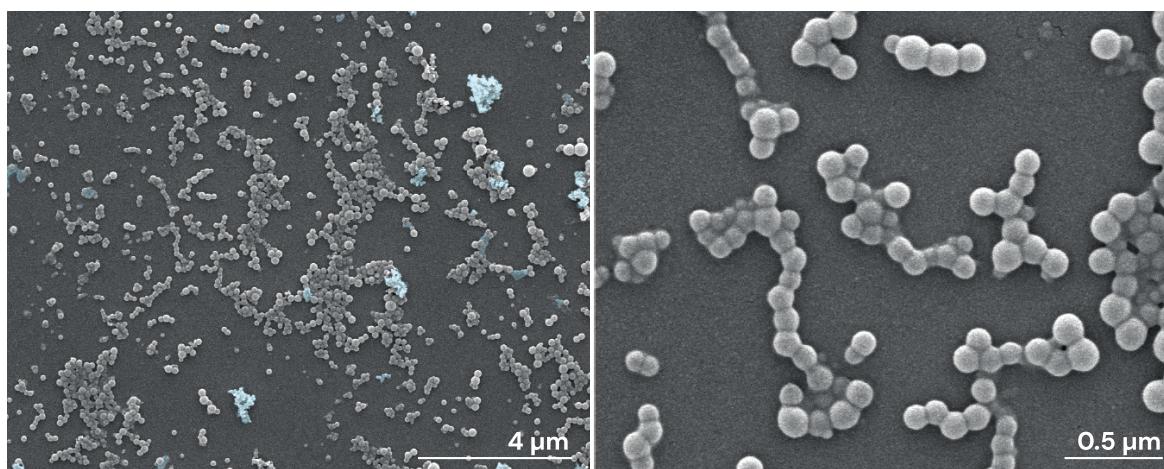
#### 4.1.1.3. Caracterización morfológica de las NPs cargadas de C-NPs

Para analizar la morfología de las NPs sintetizadas con una concentración de PLGA de 10 mg/ml PLGA y 1 mg/ml de C-NPs, las muestras fueron observadas por TEM. En la **Figura 4.5** se muestra la presencia de C-NPs en una matriz esférica de polímero PLGA RG504H.



**Figura 4.5.** Micrografías TEM de la encapsulación de C-NPs en PLGA RG504H.

No obstante, a pesar de que se observa encapsulación de las C-NPs en las NPs de PLGA RG504H, las imágenes SEM revelan que las C-NPs no han sido encapsuladas en su totalidad y aparecen agregados fuera del polímero (**Figura 4.6**).

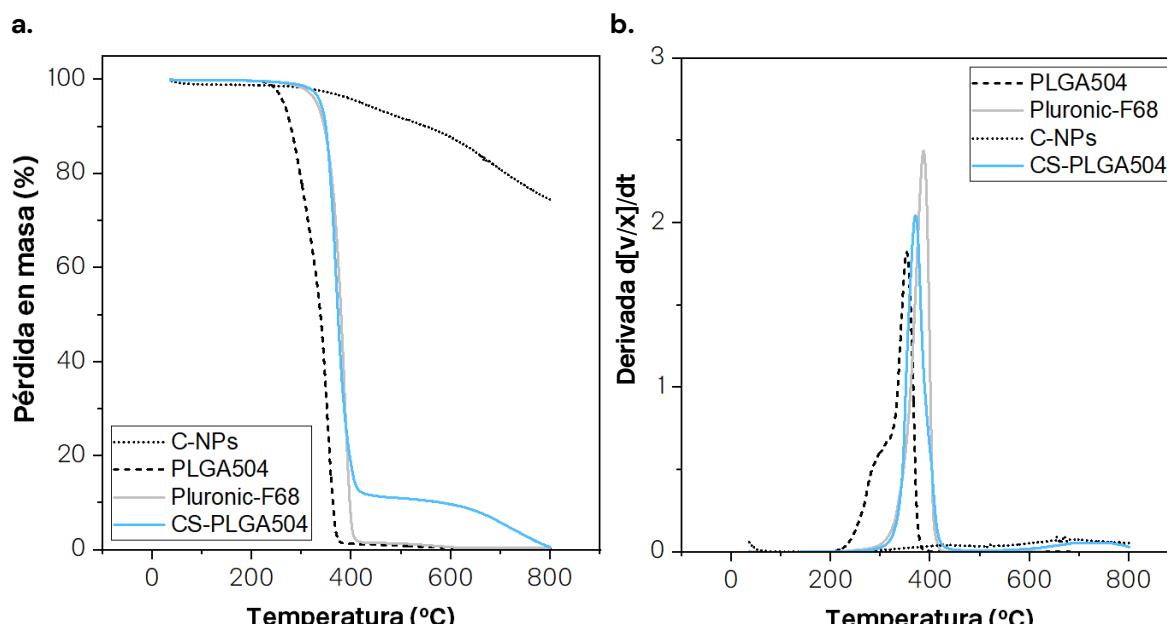


**Figura 4.6.** Micrografías SEM de las NPs cargadas de C-NPs tras la optimización, donde se aprecian residuos de carbono no encapsulado (azul).

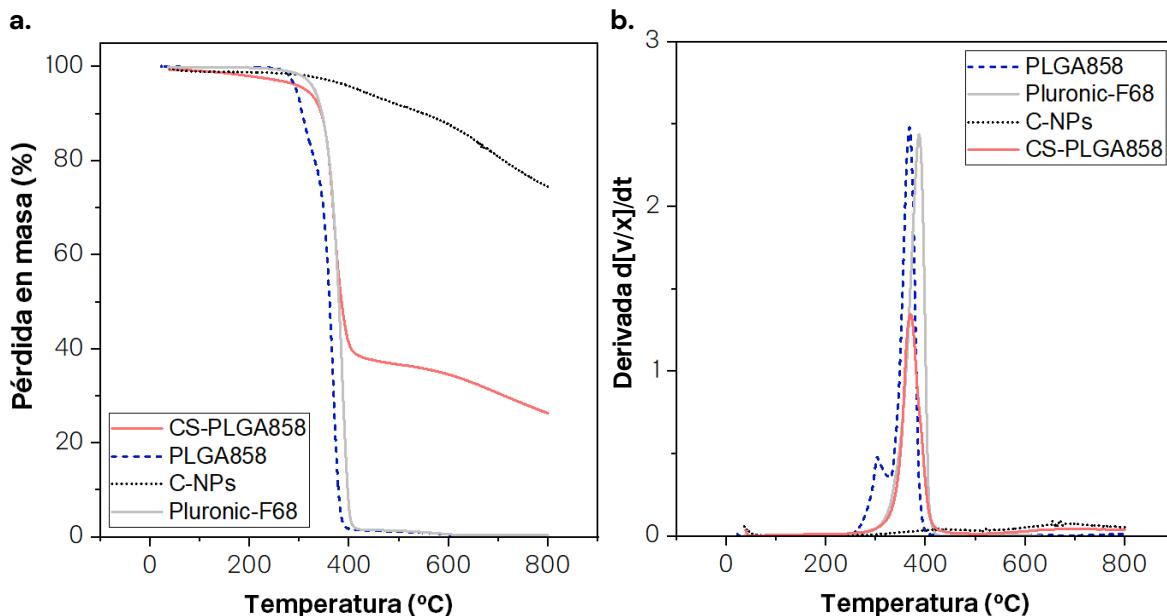
#### 4.1.1.4. Determinación de la eficiencia de encapsulación de C-NPs

Para cuantificar la eficiencia de encapsulación se caracterizó la composición de las NPs a través del análisis termogravimétrico (TGA). Para la determinación de las curvas termogravimétricas (TG) y de la primera derivada de la curva (DTG), las muestras fueron previamente liofilizadas (LyoQuest, Telstar, 0.1 mbar, -50 °C, 24h). El estudio de los elementos por separado permitió discernir entre cada uno de los reactivos componentes de las NPs una vez obtenidas estas.

Como se observa en la **Figura 4.7 (b)** y **4.8 (b)** la degradación de las C-NPs muestra su máxima pendiente a la temperatura de 650-700°C, mientras que el PLGA y el Pluronic-F68 se degradan a la temperatura de 300-400 °C. De esta manera, valorando la pérdida de masa del PLGA y el Pluronic-F68 de las partículas a una temperatura de 450 °C, se estima que un ~12.5 % en peso de las NPs es C-NPs en el caso del PLGA RG504H (**Figura 4.7 a**) y del ~37.5 % en las NPs de PLGA RG858S (**Figura 4.8 a**). Es importante destacar que las medidas se hicieron en atmósfera de N<sub>2</sub> para pirolizar y no quemar a CO<sub>2</sub> los componentes.



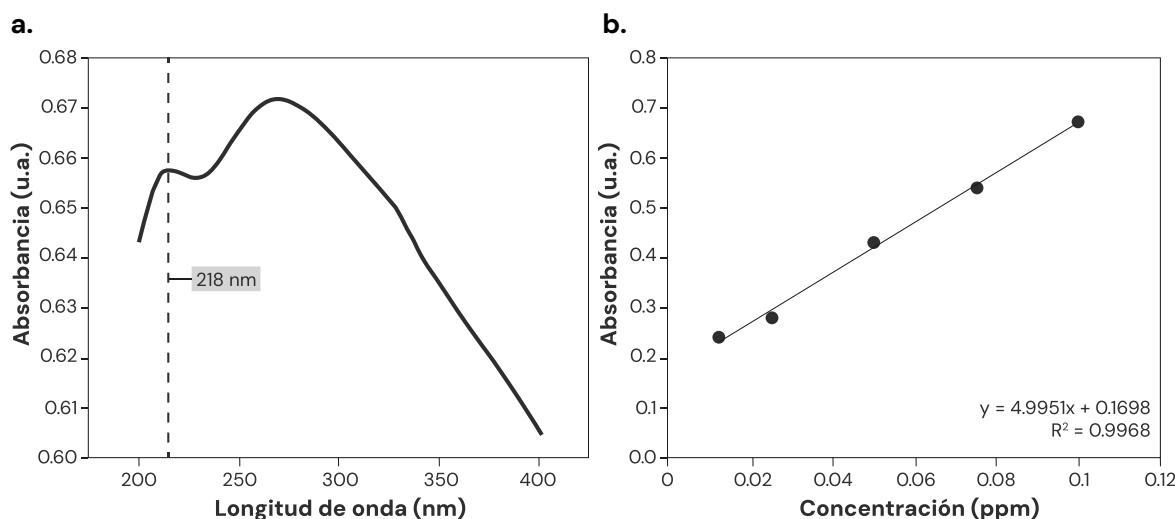
**Figura 4.7.** Curvas TG y DTG de las NPs con C-NPs encapsuladas en PLGA RG504H. a) Curvas TG de las NPs, así como de los materiales por separado. b) Curvas DTG de las NPs, así como de los materiales por separado.



**Figura 4.8.** Curvas TG y DTG de las NPs con C-NPs encapsuladas PLGA RG858S. a) Curvas TG de las NPs, así como de los materiales por separado. b) Curvas DTG de las NPs, así como de los materiales por separado.

#### 4.1.1.5. Perfil de liberación *in vitro* de C-NPs de las NPs

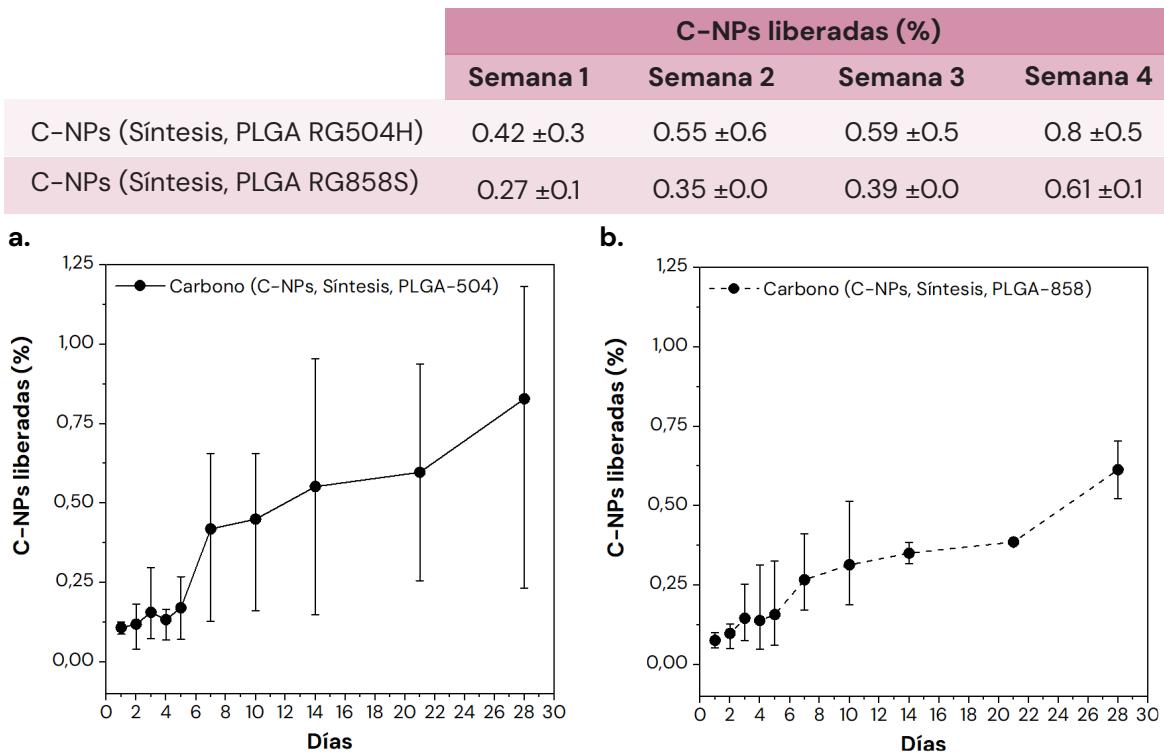
El proceso de liberación *in vitro* de C-NPs de las NPs poliméricas se estudió mediante el espectro UV-Vis del sobrenadante. Para cuantificar la concentración de C-NPs en función de la absorbancia, se tomó el máximo a 218 nm (**Figura 4.9 a**), dado que no interfiere con la señal del PLGA. Sin embargo, el pico máximo en torno a 260 nm sí interfiere con el PLGA. Con el valor de la absorbancia, los registros se ajustaron a una recta de regresión establecida como patrón (**Figura 4.9 b**) para determinar la concentración de C-NPs liberadas durante el experimento.



**Figura 4.9.** Curva UV-Vis y recta de calibrado de las C-NPs.

Para obtener el perfil de liberación de las NPs cargadas con C-NPs, se dispersaron en un medio acuoso y se mantuvieron durante 28 días a 37 °C en agitación continua. El perfil de liberación de carbono se encuentra representado en la **Figura 4.10**. Como se describe en la **Tabla 4.2**, tras 4 semanas se libera el ~0.8 % de C-NPs cuando se encapsulan en PLGA RG504H y el ~0.6 % cuando es encapsulado en PLGA RG858S. Este porcentaje de liberación tan reducido puede ser debido a la naturaleza hidrofóbica de las C-NPs, lo que supone una ventaja potencial para preservar el marcaje en el área marcada. Además, como cabía esperar, el PLGA RG858S muestra una degradación más lenta que el PLGA RG504H.

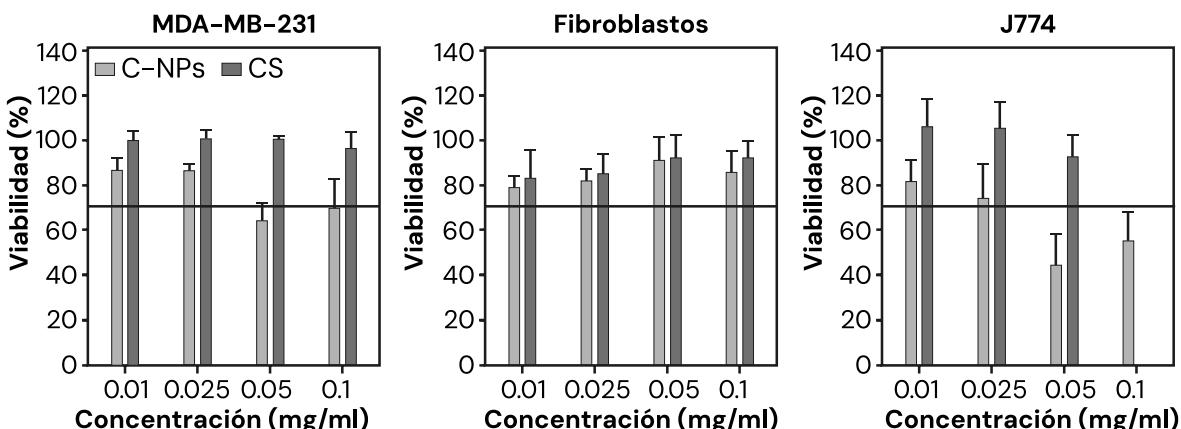
**Tabla 4.2.** Porcentaje de C-NPs liberadas *in vitro* de las NPs de PLGA RG504H y PLGA RG858S.



**Figura 4.10.** Curvas de la liberación de C-NPs de las NPs de PLGA RG504H y PLGA RG858S.

#### 4.1.1.6. Ensayos de viabilidad celular de NPs cargadas con C-NPs

Como se ha mencionado anteriormente, los efectos citotóxicos de las NPs se estudiaron *in vitro* en tres líneas celulares: fibroblastos dérmicos humanos, macrófagos (J774) y adenocarcinoma de mama MDA-MB-231. La viabilidad celular se determinó 24 horas tras la incubación con el vector de marcaje. Solo se incluyeron en este experimento las NPs sintetizadas con PLGA RG504H, asumiendo que la ligera diferencia en la proporción de copolímeros LA:GA no afecta sustancialmente a la toxicidad global de las partículas. También se valoró la citotoxicidad de las C-NPs libres. Siguiendo las recomendaciones de la norma ISO 10993-5, una viabilidad inferior al 70 % se considera citotóxica. Como se ilustra en la **Figura 4.11**, no se observa ningún efecto citotóxico en las líneas celulares de fibroblastos y MDA-MB-231 tras el tratamiento con las NPs cargadas de C-NPs en ninguna de las concentraciones ensayadas, obteniéndose valores de viabilidad superiores al 95 %. En el caso de la línea celular de macrófagos, se observa un aumento de la toxicidad a dosis más altas. En el caso de las partículas de C-NPs, las dosis a 0.05 y 0.1 mg/ml fueron citotóxicas (46-70 %) tanto en las células MDA-MB-231 como en macrófagos, aunque no en fibroblastos.

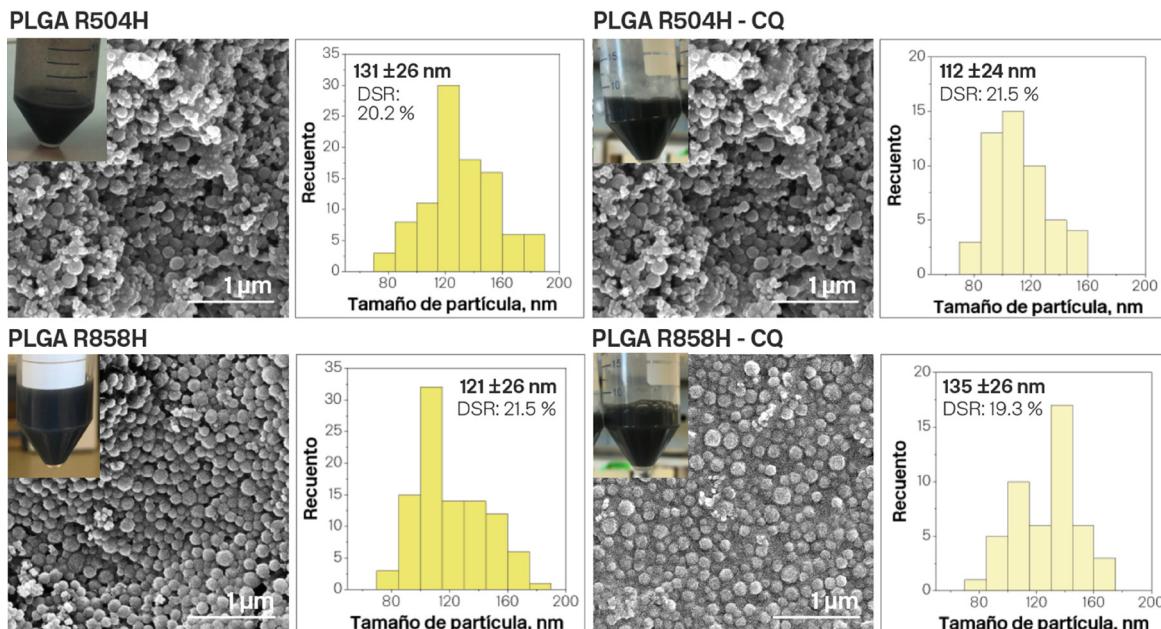


**Figura 4.11.** Viabilidad celular en las líneas MDA-MB-231, fibroblastos y macrófagos (J774) tras 24 h de incubación con NPs cargadas de C-NPs (gris oscuro) y C-NPs libres sin encapsular en PLGA (gris claro). En las concentraciones de NPs, la cantidad de C-NPs es de 12.5, 6.3, 3.1 y 1.3 µg/ml, respectivamente.

## 4.1.2. Coencapsulación de C-NPs y CQ en NPs por emulsión simple

### 4.1.2.1. Coencapsulación de C-NPs y CQ en NPs por emulsión simple

Para coencapsular CQ en las NPs cargadas de C-NPs se utilizó CQ en la fase acuosa de la emulsión simple a una concentración de 100 mg/ml utilizando las condiciones de la síntesis optimizada de NPs (1 mg/ml C-NPs) utilizando ambos polímeros (PLGA Resomer® RG504H y RG858S) a una concentración de 10 mg/ml. La coloración macroscópica de los coloides no varió y la polidispersión de tamaños se mantuvo similar en todas las síntesis (PDI <0.01) (**Figura 4.12**).

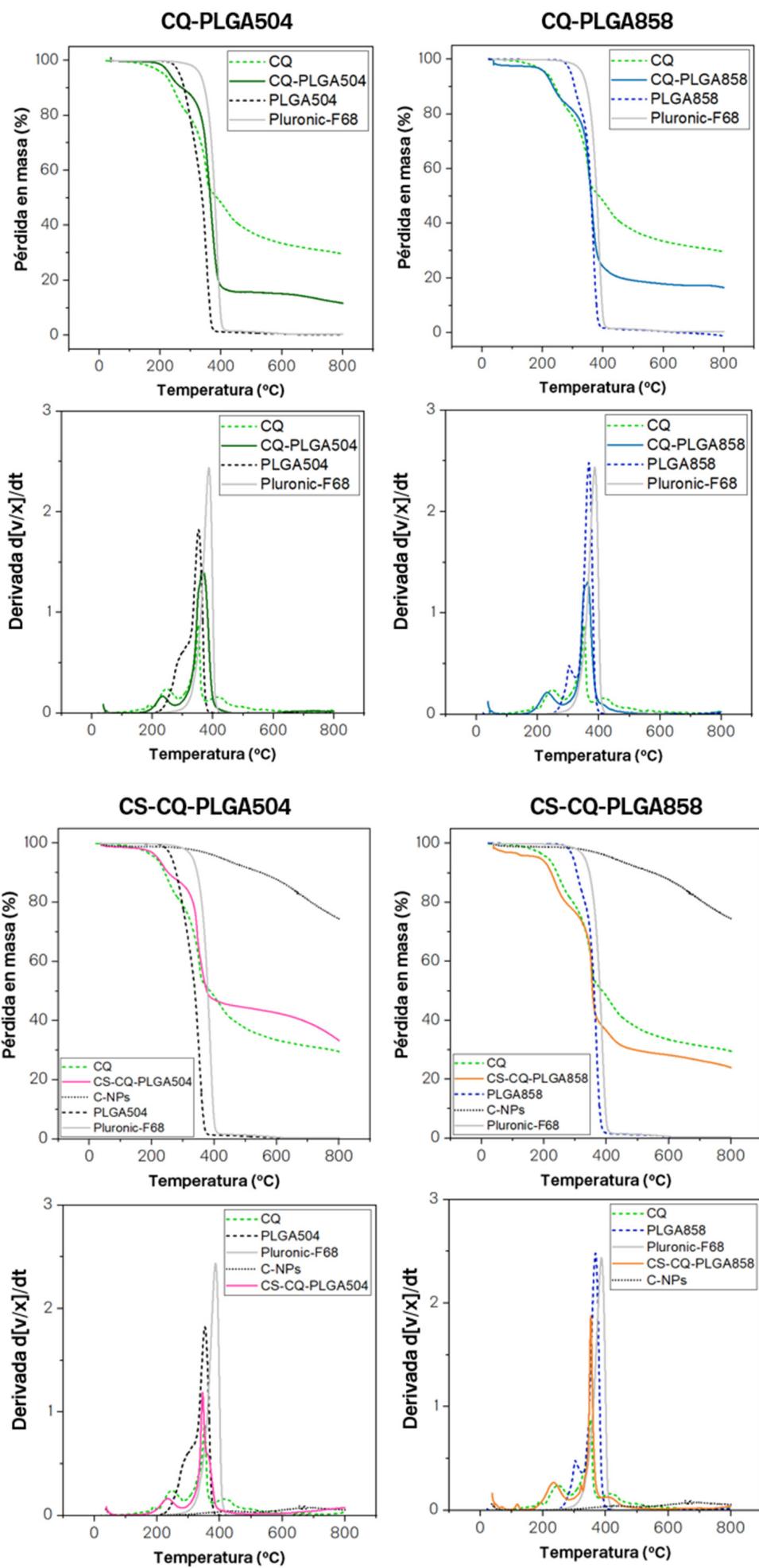


**Figura 4.12.** Morfología de las NPs que coencapsulan con C-NPs y CQ vistas al SEM con sus respectivos histogramas de distribución de diámetros.

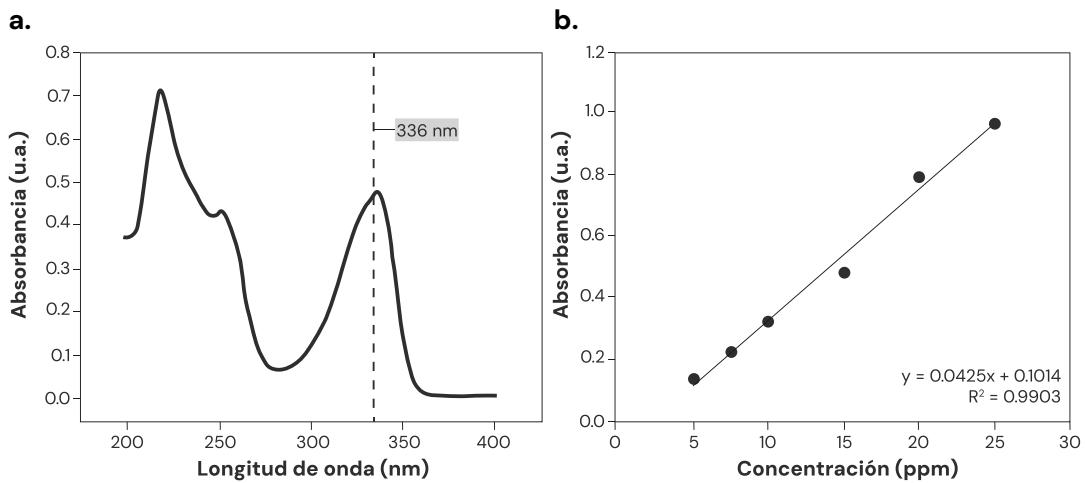
### 4.1.2.2. Determinación de la eficiencia en la encapsulación de CQ en NPs

La cuantificación de la concentración de CQ en las NPs fue difícilmente cuantificable a través del análisis TGA, dado que la degradación de la CQ muestra su máxima pendiente a temperaturas similares a las del PLGA y del Pluronic-F68 (300–400 °C). No obstante, dado que la curva TG de las partículas con CQ (CQ-PLGA RG504H y CQ-PLGA RG858S) no decae completamente, se puede determinar que la cantidad mínima de CQ en estas NPs es del 20.5 y 37.5 %, respectivamente. Tampoco se pudo determinar la concentración de C-NPs resultante en las partículas donde se coencapsulan C-NPs y CQ, dado que no es posible conocer qué remanente en peso corresponde a C-NPs y a la CQ (**Figura 4.13**).

Por tanto, para cuantificar la concentración de CQ encapsulada en las NPs se estudió el espectro UV-Vis del sobrenadante tras la síntesis por triplicado asumiendo que, respecto de la cantidad inicial añadida durante la síntesis, el resto que no aparece en el sobrenadante debe estar encapsulado en las NPs. Para cuantificar la concentración de CQ se tomó el máximo de absorbancia característico a 336 nm (**Figura 4.14 a**). La recta de regresión de la CQ obtenida se muestra en la **Figura 4.14 b**. Se cuantificó un rendimiento de encapsulación de CQ del 49.7 ±12.8 y 52.0 ±4.6 % en las NPs de PLGA RG504H y PLGA RG858S respectivamente. Por tanto, considerando la masa de partículas obtenidas tras la síntesis, se estima la cloroquina representa el 35.2 y el 42.3 % en peso en las NPs de PLGA RG504H y PLGA RG858S, respectivamente.



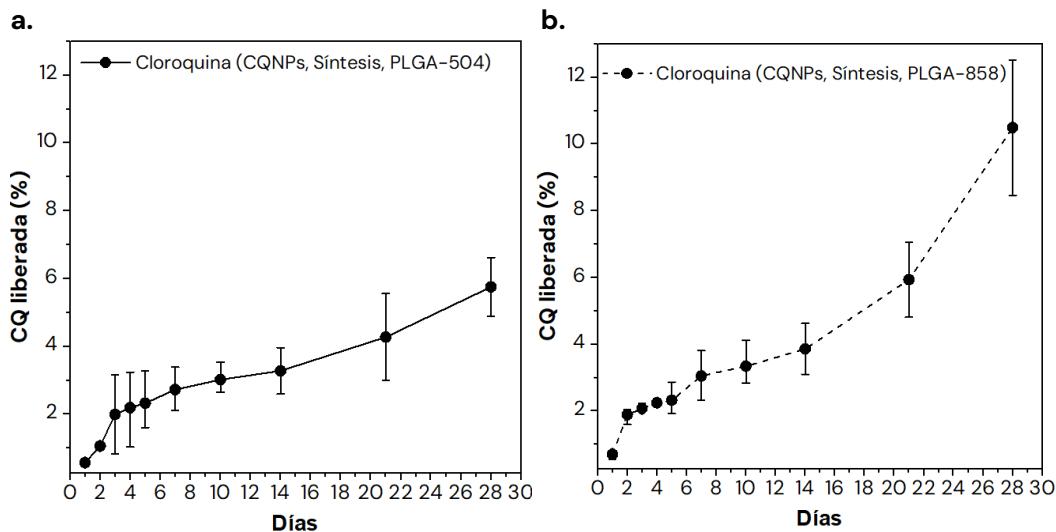
**Figura 4.13.** Curvas TG y DTG de las NPs con CQ o CQ y C-NPs encapsuladas en PLGA RG504H y PLGA RG858S (CQ-PLGA RG504H/CQ-PLGA RG858S y CS-CQ-PLGA RG504H/CS-CQ-PLGA RG858S, respectivamente), incluyendo las curvas de los materiales utilizados en la síntesis por separado.



**Figura 4.14.** (a) Curva UV-Vis y (b) recta de calibrado de la CQ.

#### 4.1.2.3. Perfil de liberación *in vitro* de CQ de las NPs

Para obtener el perfil de liberación de las NPs cargadas con CQ, se dispersaron en un medio acuoso y se mantuvieron durante 28 días a 37 °C en agitación continua. La cinética de liberación *in vitro* de la CQ de las NPs también se determinó a través del espectro UV-Vis del sobrenadante. Como se muestra en la [Figura 4.15](#) y [Tabla 4.3](#), tras 4 semanas se libera el ~5.8 % de la CQ cuando es encapsulada en PLGA RG504H y el ~10.5 % cuando es encapsulada en PLGA RG858S.



**Figura 4.15.** Curvas de la liberación de CQ de las NPs de (a) PLGA RG504H y (b) PLGA RG858S.

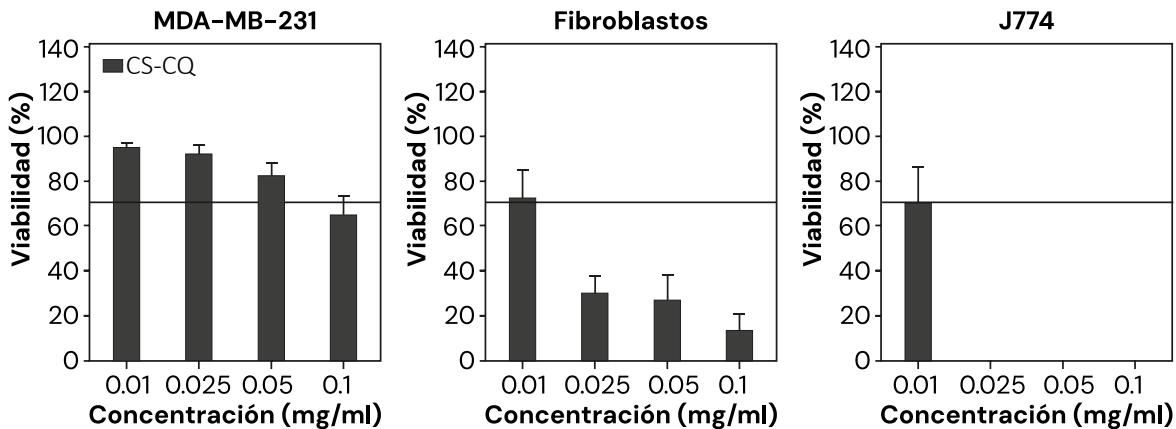
**Tabla 4.3.** Porcentaje de CQ liberada *in vitro* de las NPs de PLGA RG504H y PLGA RG858S.

	CQ liberada (%)			
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
CQ (Síntesis, PLGA RG504H)	2.73 ± 0.6	3.28 ± 1.0	4.27 ± 1.8	5.76 ± 1.2
CQ (Síntesis, PLGA RG858S)	3.05 ± 0.7	3.86 ± 0.7	5.94 ± 1.1	10.49 ± 2.9

#### 4.1.2.4. Ensayos de viabilidad celular de NPs cargadas con CQ

Los efectos citotóxicos de las NPs cargadas de C-NPs y CQ se estudiaron *in vitro* en tres líneas celulares: fibroblastos dérmicos humanos, macrófagos (J774) y adenocarcinoma de mama MDA-MB-231, 24 horas después de la incubación. Como en los estudios anteriores, se utilizaron solo partículas sintetizadas con PLGA RG504H asumiendo que son también

representativas de las PLGA RG858S. Como se representa en la **Figura 4.16**, las NPs cargadas de CQ y C-NPs mostraron citotoxicidad en todas las líneas celulares. La línea que mostró mayor tolerancia fue la MDA-MB-231 (>65 %). Sin embargo, en las líneas de macrófagos y fibroblastos la viabilidad celular se redujo a valores entre el 0-30 % para dosis entre 0.01 y 0.05 mg/ml. La única dosis de CQ que no resultó citotóxica en ninguna línea celular fue la de 0.01 mg/ml.

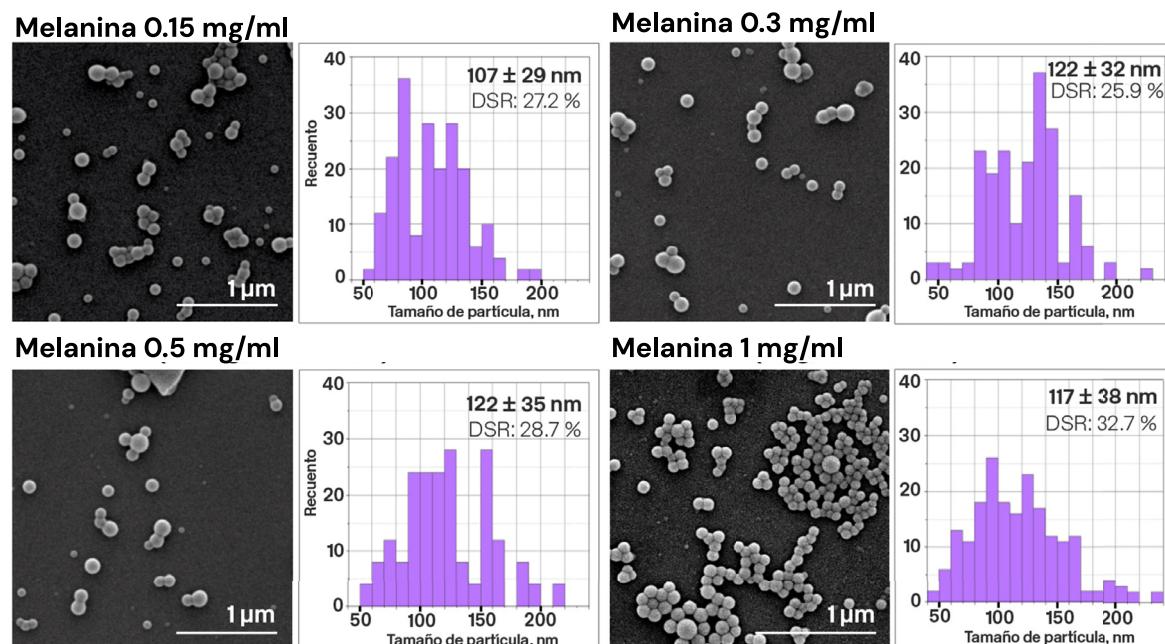


**Figura 4.16.** Viabilidad celular en las líneas MDA-MB-231, fibroblastos y macrófagos (J774) tras 24 h de incubación con NPs cargadas de CQ y PLGA. Las concentraciones de NPs corresponden a 20.5, 10.3, 5.1 y 2.1 µg/ml de CQ, respectivamente.

## 4.1.3. Encapsulación de melanina en nanopartículas por emulsión doble

### 4.1.3.1. Optimización de la concentración de melanina encapsulada en NPs

Con el mismo objetivo que en el apartado anterior, se trató de obtener coloides con nanopartículas poliméricas altamente cargadas de melanina (Mel-NPs) realizando 4 emulsiones diferentes variando la concentración (0.15, 0.3, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/ml) (**Figura 4.17**). La cantidad máxima de melanina fue establecida como el límite de solubilidad para su total disolución en el agua Milli-Q (pH 7-8). La concentración de polímero se mantuvo fija en 10 mg/ml. En todas las síntesis, los coloides fueron homogéneos en la distribución de tamaños de partículas (PDI <0.01).



**Figura 4.17.** Morfología de las nanopartículas de PLGA con melanina encapsulada durante la optimización de la síntesis al SEM con sus respectivos histogramas de distribución de diámetros, donde se aprecia la emulsión utilizando 0.15, 0.3, 0.5 y 1.0 mg/l de melanina.

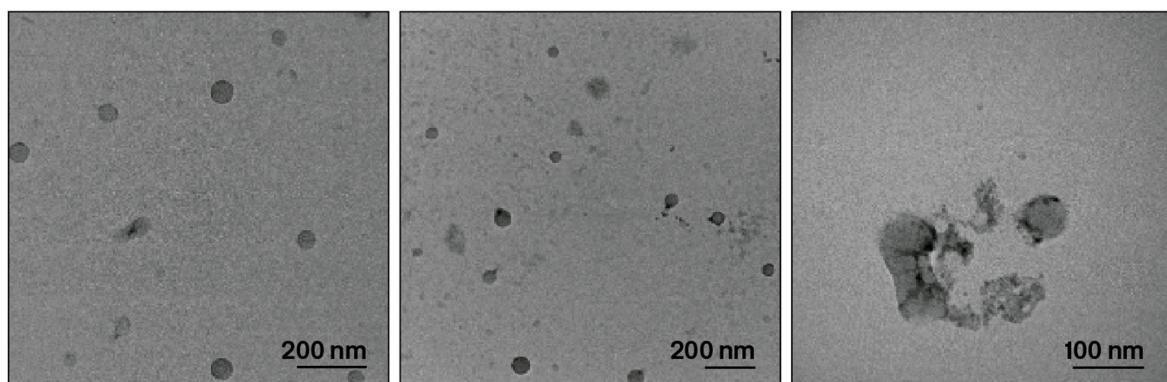
El diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de los diferentes coloides fue medido utilizando DLS. El promedio de las Mel-NPs obtenidas en la emulsión con 0.15 mg/ml de melanina fue de 181.9 nm, mientras que las de 0.3 mg/ml fue de 253.4, las de 0.5 mg/ml de 277.7 nm y las de 1.0 mg/ml de 261.7 nm (**Tabla 4.4**). De la misma manera que en el caso de la encapsulación de C-NPs, se escogió la emulsión de mayor concentración de melanina (1.0 mg/ml) para obtener una mayor coloración macroscópica.

**Tabla 4.4.** Diámetros hidrodinámicos medidos por DLS de Mel-NPs durante la optimización de la emulsión.

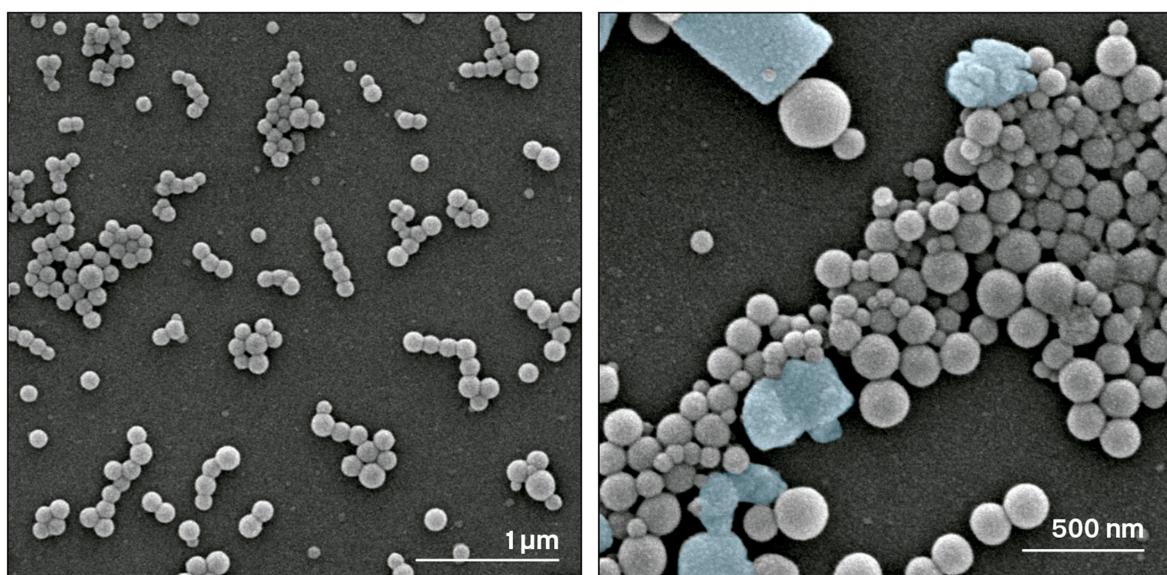
Concentración	Tamaño (nm)	Promedio (nm)
0.15 mg/ml	182.6 (9.6)	181.6 (9.0)
0.3 mg/ml	234.7 (7.8)	253.4 (8.9)
0.5 mg/ml	279.5 (8.6)	277.7 (9.1)
1.0 mg/ml	255.0 (9.5)	261.7 (7.6)

#### 4.1.3.2. Caracterización morfológica de las NPs cargadas de melanina

La morfología de las Mel-NPs resultantes se analizó por TEM. Como se observa en la **Figura 4.18**, la melanina puede observarse en forma de pigmentación oscura en la matriz de PLGA. En el análisis SEM, se observaron estructuras de melanina cristalizada fuera del polímero, indicativo de un exceso de melanina usada durante la síntesis (**Figura 4.19**).



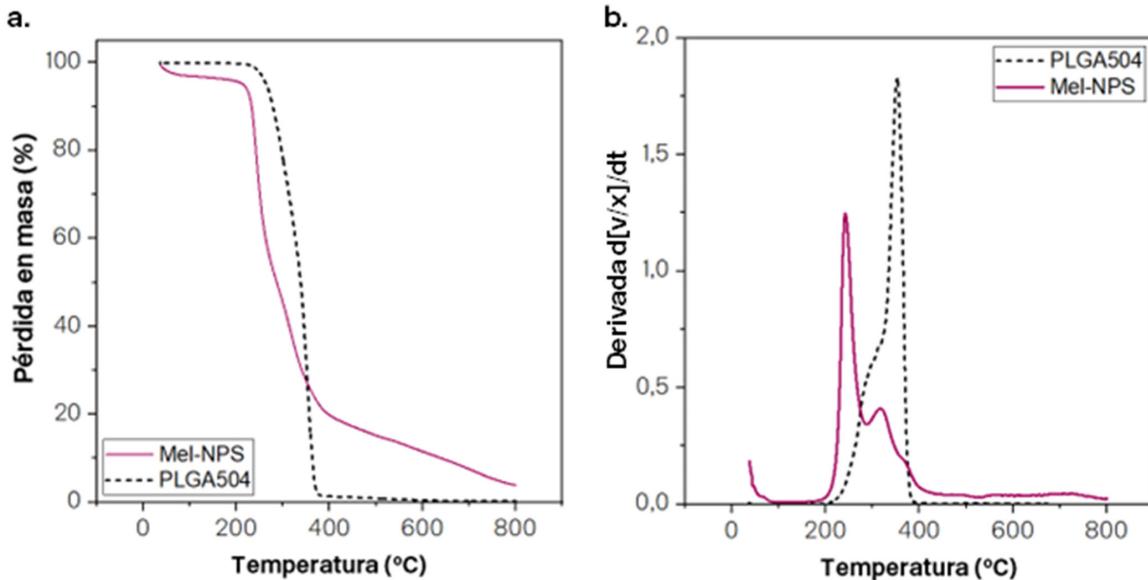
**Figura 4.18.** Micrografías TEM de la encapsulación de melanina en NPs de PLGA RG504H.



**Figura 4.19.** Micrografías SEM de las Mel-NPs optimizadas, donde se aprecian residuos de melanina no encapsulados y a menudo cristalizados (azul).

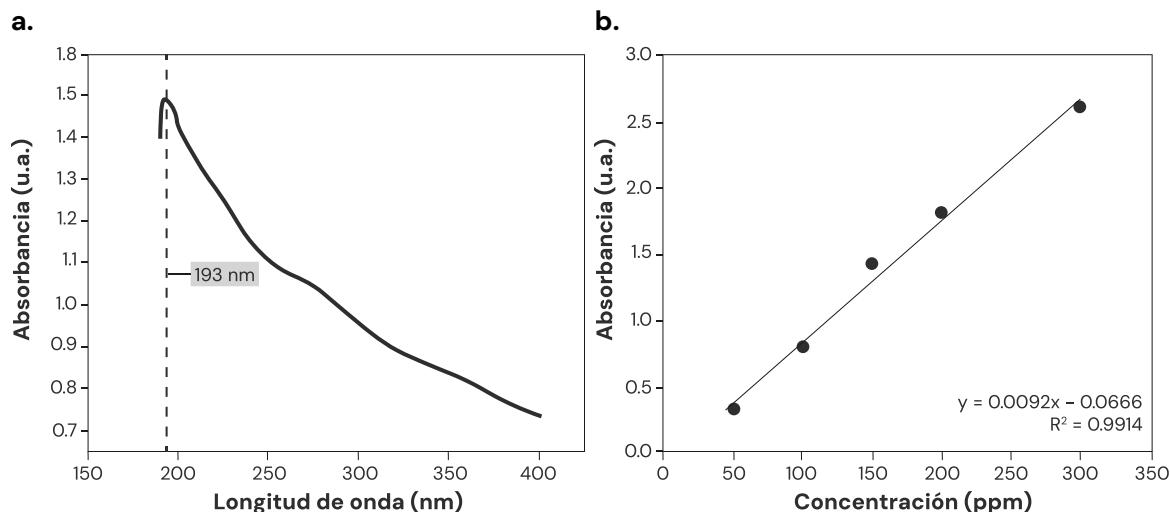
#### 4.1.3.3. Determinación de la eficiencia en la encapsulación de melanina

Se trató de cuantificar la eficiencia de encapsulación por TGA, pero las Mel-NPs fueron difícilmente diferenciables del PLGA dado que la melanina comienza a degradarse a bajas temperaturas y se superpone con la curva de degradación del polímero. Sin embargo, dado que la curva TG de las Mel-NPs no se piroliza completamente a 450 °C, es posible establecer una concentración mínima de melanina del 17.8 % ([Figura 4.20](#)).



**Figura 4.20.** Curvas (a) TG y (b) DTG de las NPs de PLGA RG504H con melanina encapsulada.

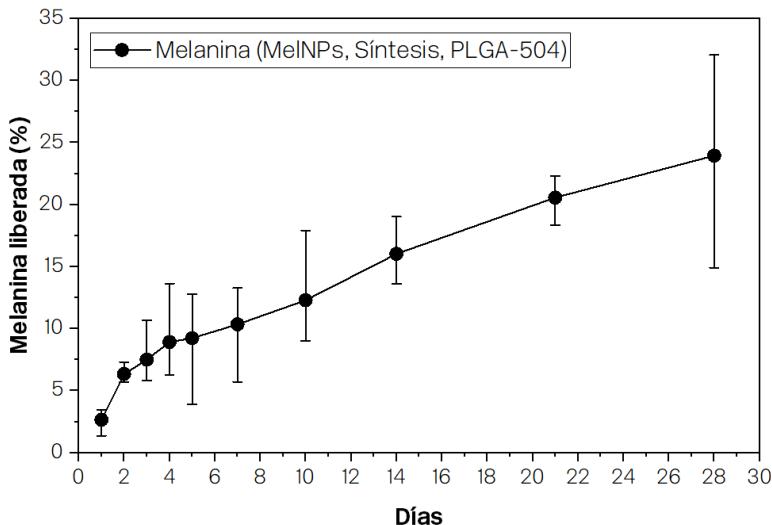
La concentración de melanina encapsulada se cuantificó de manera indirecta a través del espectro UV-Vis del sobrenadante conociendo el máximo de absorbancia de la melanina a 193 nm ([Figura 4.21](#)). Con este método, se estimó un rendimiento de encapsulación de la melanina del  $65.8 \pm 9.1\%$ , que representa el 23.5 % en peso de las partículas.



**Figura 4.21.** (a) Curva UV-Vis y (b) recta de calibrado de la melanina.

#### 4.1.3.4. Perfil de liberación *in vitro* de melanina de las NPs

La liberación *in vitro* de la melanina se determinó a través del espectro UV-Vis del sobrenadante. Para el experimento, las Mel-NPs se dispersaron en un medio acuoso y se mantuvieron durante 28 días a 37 °C en agitación continua. Como se muestra en la [Figura 4.22](#) y [Tabla 4.5](#), tras 4 semanas se libera el ~24 % de melanina de las NPs sintetizadas con PLGA RG504H.



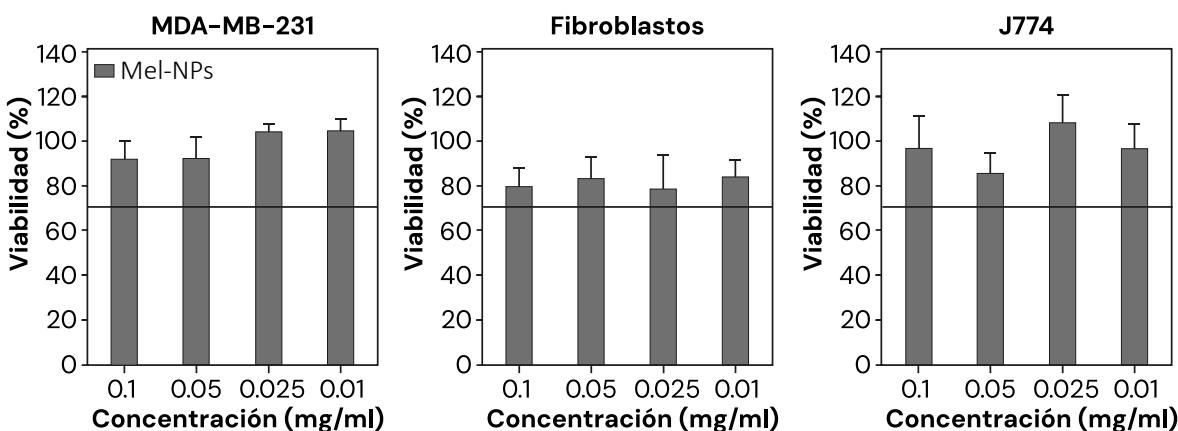
**Figura 4.22.** Curva de la cinética de liberación de la melanina de las NPs de PLGA RG504H.

**Tabla 4.5.** Porcentaje de melanina liberada *in vitro* de las NPs de PLGA RG504H.

	Melanina liberada (%)			
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Melanina (Síntesis, PLGA RG504H)	10.35 ±4.0	16.03 ±2.7	20.57 ±2.0	23.96 ±8.6

#### 4.1.3.5. Ensayos de viabilidad celular

La citotoxicidad de las Mel-NPs se determinó en las tres líneas celulares: fibroblastos dérmicos humanos, J774 y MDA-MB-231, 24 horas después de la incubación. Como se observa en la **Figura 4.23**, las Mel-NPs no fueron citotóxicas a ninguna concentración en ninguna de las líneas celulares estudiadas (79–100 %).



**Figura 4.23.** Viabilidad celular en las líneas MDA-MB-231, fibroblastos y macrófagos (J774) tras 24 h de incubación con Mel-NPs. Las concentraciones de Mel-NPs corresponden a 23.5, 11.8, 5.9 y 2.4 µg/ml de melanina, respectivamente.

### 4.1.4. Encapsulación de C-NPs en micropartículas por electrosprayado

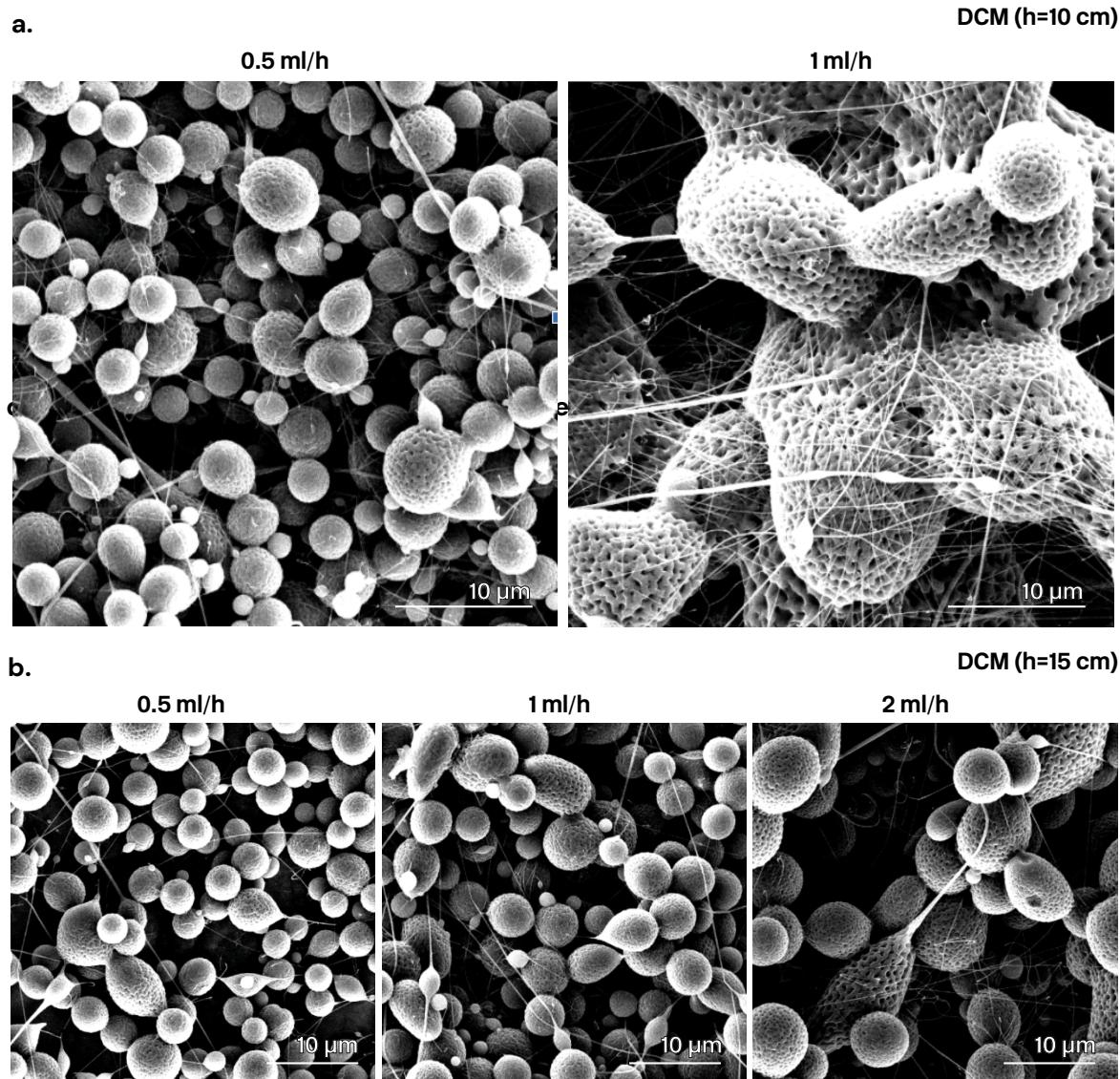
#### 4.1.4.1. Optimización de los polímeros y reactivos utilizados

Se realizaron un total de 40 síntesis para tratar de optimizar los parámetros de la técnica por electrosprayado utilizando el polímero PLGA RG504H. Entre ellos, se varió la concentración de polímero, la concentración de C-NPs, la incorporación de CQ, los disolventes utilizados, caudal volumétrico de salida del disolvente y la distancia de la aguja al colector.

#### 4.1.4.2. Optimización de la síntesis de MPs con DCM y DMF

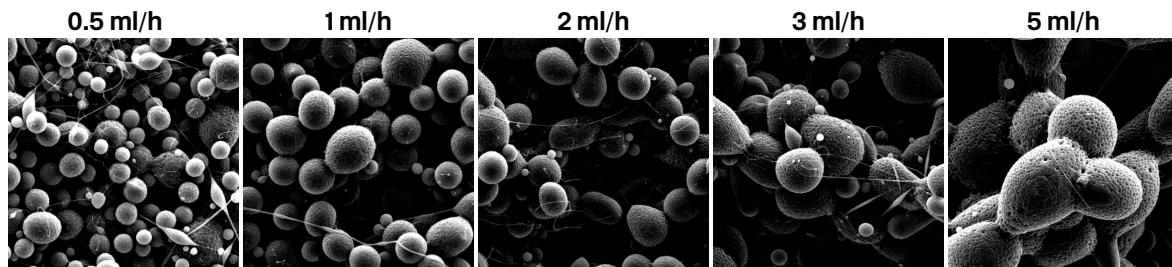
Inicialmente, se evaluó la formación de micropartículas de PLGA RG504H sin C-NPs en la disolución para optimizar el método. Por sus propiedades y su rendimiento en procesos electrohidrodinámicos, se comenzó disolviendo PLGA a 10 %p/v en DCM por experiencias previas en el grupo de investigación.

Durante el primer proceso de optimización, se mantuvo la aguja a una distancia de 10 cm y se varió el flujo de la disolución de 0.5 y a 1.0 ml/h (**Figura 4.24 a**). Valores por encima de 1.0 ml/h desestabilizaron el cono de Taylor, por lo que fueron desestimados. Para lograr estabilizar el cono de Taylor y aumentar el flujo de salida de la disolución, se optó por aumentar la distancia entre la aguja y el colector hasta 15 cm. Bajo estas nuevas condiciones, se logró trabajar a flujos de 0.5, 1.0 y 2.0 ml/h (**Figura 4.24 b**). Sin embargo, frente a flujos mayores se produjo un secado del polímero en la aguja y una desestabilización del cono, por lo que se decidió preparar una nueva disolución incorporando DMF para aumentar la tensión superficial del disolvente.



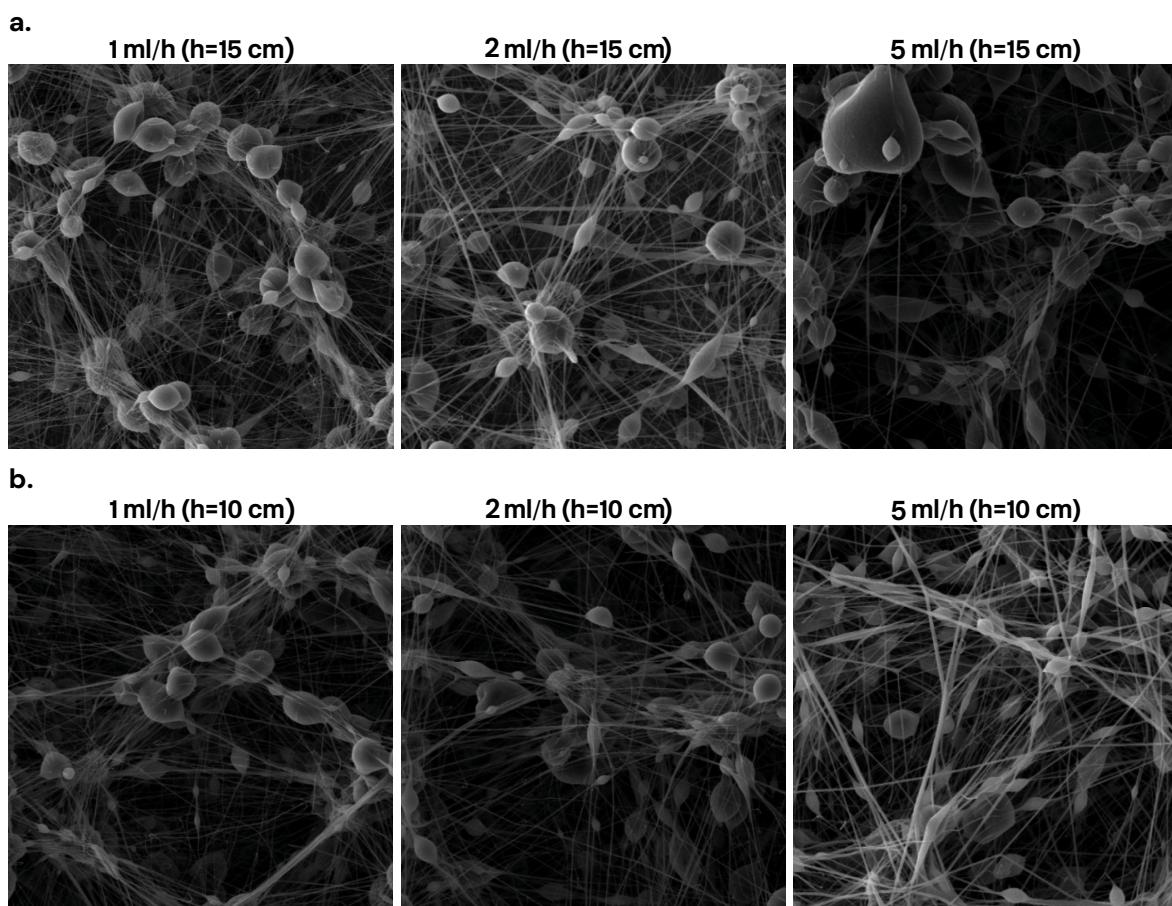
**Figura 4.24.** Micrografías SEM de las MPs de PLGA obtenidas por electrosprayado utilizando DCM y DMF como disolventes. a) MPs obtenidas a partir de 10 %(p/v) PLGA en DCM, h=10 cm y variando el flujo a 0.5 ml/h y a 1.0 ml/h. b) MPs obtenidas a partir de 10%(p/v) PLGA en DCM, manteniendo fija la distancia de la aguja a 15 cm y variando el flujo a 0.5, 1.0 y 2.0 ml/h.

En primer lugar, manteniendo la proporción de polímero y la distancia de la aguja, se introdujo DMF en una proporción DCM:DMF (9:1). Utilizando esta combinación de disolventes se varió el caudal de salida a 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 5.0 ml/h (**Figura 4.25**). En estas síntesis se observa una morfología esférica de las partículas, con escasa formación de beads (p.ej. aglomerados esféricos) en la mayor parte de las muestras, aunque una porosidad elevada.



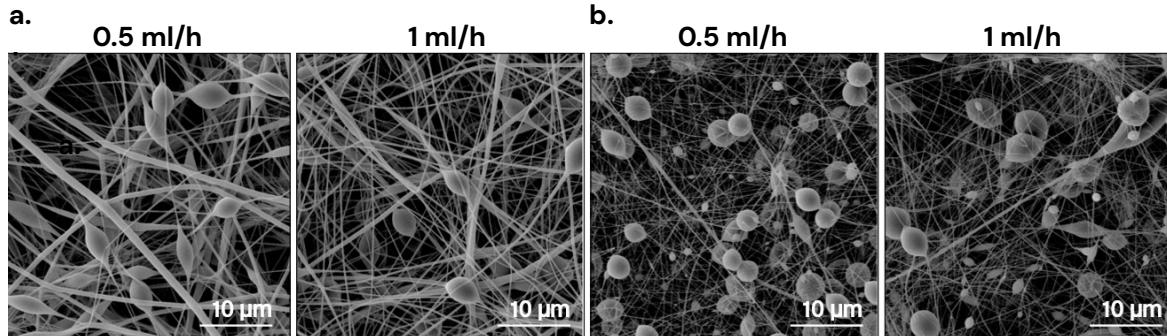
**Figura 4.25.** Micrografías SEM de las MPs de PLGA obtenidas por electrosprayado utilizando DCM y DMF (9:1). MPs obtenidas a partir de 10%(p/v) PLGA en DCM:DMF (9:1), h=15 cm y variando el flujo a 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 5.0 ml/h.

Con el objetivo de reducir el diámetro de las partículas se optó por aumentar la proporción de DMF hasta DMC:DMF (4:1). Se mantuvo la concentración de polímero a 10 % (p/v) y se estableció la distancia colector-aguja de 10 cm y el caudal de 1.0, 2.0 y 5.0 ml/h (**Figura 4.26a**). Frente a la obtención de una gran proporción de fibras en la muestra, se optó por reducir la distancia de colector-aguja a 10 cm y se modificó el flujo de 1.0, 2.0 y 5.0 ml/h (**Figura 4.26b**), consiguiendo una formación de partículas más estable. Sin embargo, no se logró eliminar por completo la formación de fibras.



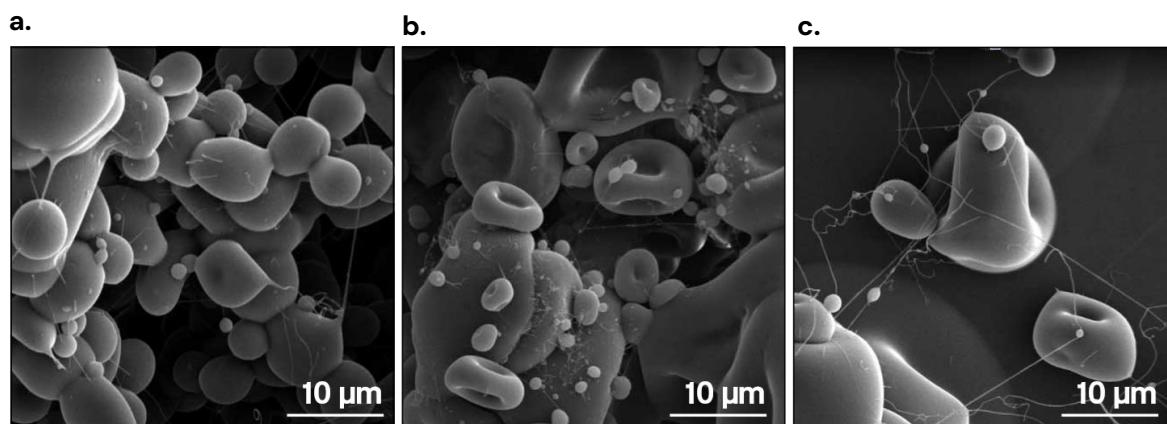
**Figura 4.26.** Micrografías SEM de las MPs de PLGA obtenidas por electrosprayado utilizando DCM y DMF (4:1). (a) MPs obtenidas a partir de 10%(p/v) PLGA en DCM:DMF (4:1), manteniendo h=15 cm y variando el flujo a 1.0, 2.0, y 5.0 ml/h. b) Con las mismas condiciones de polímero y disolventes, para h=10 cm y variando el flujo a 1.0, 2.0 y 5.0 ml/h.

Posteriormente, se aumentó la concentración de PLGA al 15 %(*p/v*), manteniendo la distancia colector-aguja a 15 cm y la proporción DMC:DMF (4:1) y variando el flujo a 0.5 y a 1.0 ml/h (**Figura 4.27 a**) para garantizar la estabilidad del cono de Taylor. El aumento de la proporción de disolventes DMC:DMF (1:1) resultó beneficiosa para la reducción de la formación de las fibras, a flujos de 0.5 y 1.0 ml/h (**Figura 4.27 b**). A pesar de presentar pequeñas fibras, la mayor parte de las muestras fueron fácilmente extraídas del colector de aluminio en forma de polvo.



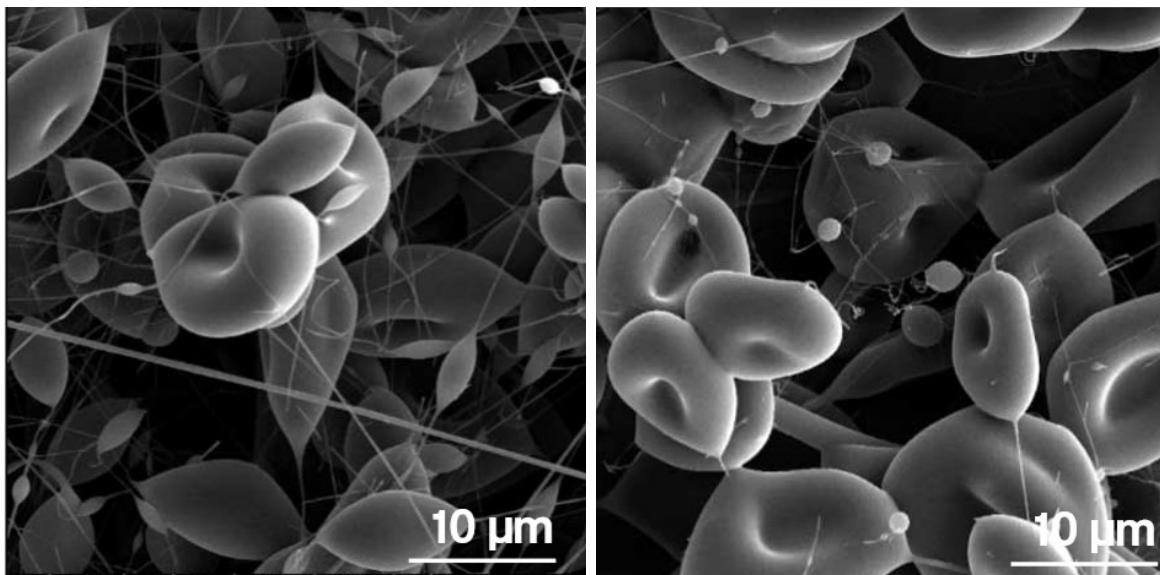
**Figura 4.27.** Micrografías SEM de las MP s de PLGA obtenidas por *electrosprayado* utilizando DCM y DMF (4:1) y (1:1) aumentando la concentración de PLGA a 15%(*p/v*). (a) MP s obtenidas aumentando la concentración de PLGA a 15%(*p/v*) y manteniendo la proporción DMC:DMF (4:1), a un flujo de 0.5 y 1.0 ml/h. b) Aumentando la proporción de disolventes DMC:DMF a (1:1) utilizando 0.5 y 1.0 ml/h.

Una vez analizado el efecto de las condiciones del *electrosprayado* en la formación de partículas, se incluyó el agente a encapsular para la producción de MP s cargadas de C-NPs. Para ello, inicialmente se trataron de dispersar C-NPs a concentración 2.0 mg/ml en DMC:DMF (9:1) con una proporción de PLGA a 10 %(*p/v*). Las C-NPs no se dispersaron de manera homogénea por llegar al límite de saturación, mostrando grandes agregaciones, de manera que se optó por reducir la concentración de C-NPs a 1 mg/ml, aunque no se observó mejoría. Se optó por dispersar las C-NPs previamente en AcEt a concentración 1.0 mg/ml y, posteriormente, añadirlas a la disolución anterior de DMC:DMF (9:1) con una concentración de PLGA del 10 %(*p/v*). La disolución anterior se utilizó manteniendo la aguja a 15 cm del colector a 1.0 ml/h (**Figura 4.28 a**). Sin embargo, la muestra no mostró una tinción adecuada a nivel macroscópico, por lo que se optó por disolver PLGA a 10%(*p/v*) en acetato de etilo incluyendo 1 mg/ml de C-NPs (**Figura 4.28 b**). La concentración de PLGA fue aumentada al 15%(*p/v*) para mejorar el rendimiento de la síntesis y se mantuvo el flujo a 1.0 ml/h (**Figura 4.28 c**). En ambas disoluciones preparadas con acetato de etilo aumentó la intensidad del negro en las partículas.



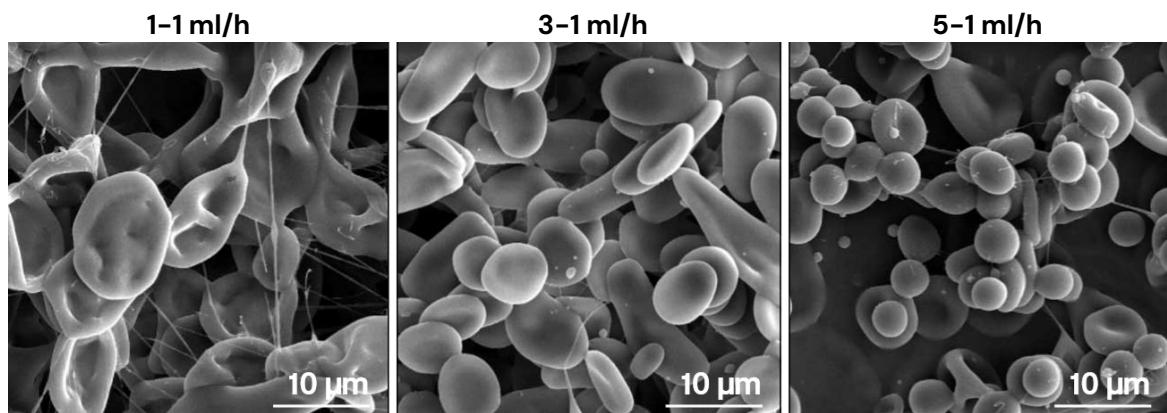
**Figura 4.28.** Micrografías SEM de las MP s cargadas de C-NPs utilizadas en el DCM y DMF. a) MP s obtenidas partir de 10%(*p/v*) PLGA en DCM:DMF (9:1) y 1 mg/ml de C-NPs, para h=15 cm y un flujo de 1.0 ml/h. b) Acetato de etilo con 1 mg/ml de C-NPs y 10%(*p/v*) PLGA y c) 15%(*p/v*) PLGA.

Sin embargo, las MPs anteriores mostraron morfología heterogénea e irregular, de manera que se optó por aumentar la proporción de C-NPs en AcEt en la disolución de DCM-DMF (9:1) con una concentración de PLGA del 15%(p/v) a 1:1 y 4:2 (**Figura 4.29**).



**Figura 4.29.** Micrografías SEM de las MPs cargadas de C-NPs añadiendo DCM:DMF (9:1) en proporción (a) 1:1 y (b) 4:2.

Como no se logró homogeneizar la morfología de las MPs, se realizaron síntesis con el método coaxial. De esta manera, las dos disoluciones fluyen de manera simultánea en agujas coaxiales. Por un lado, se preparó una disolución de AcEt con 1mg/ml de C-NPs (aguja interna) y otra de DCM:DMF (9:1) con 15%(p/v) de PLGA (aguja externa). Se utilizaron en paralelo variando los ratios de los flujos de salida a 1-1, 1-3 y 1- 5 ml/h (**Figura 4.30**). Sin embargo, las partículas obtenidas mostraron una morfología irregular y, de nuevo, poco homogénea.

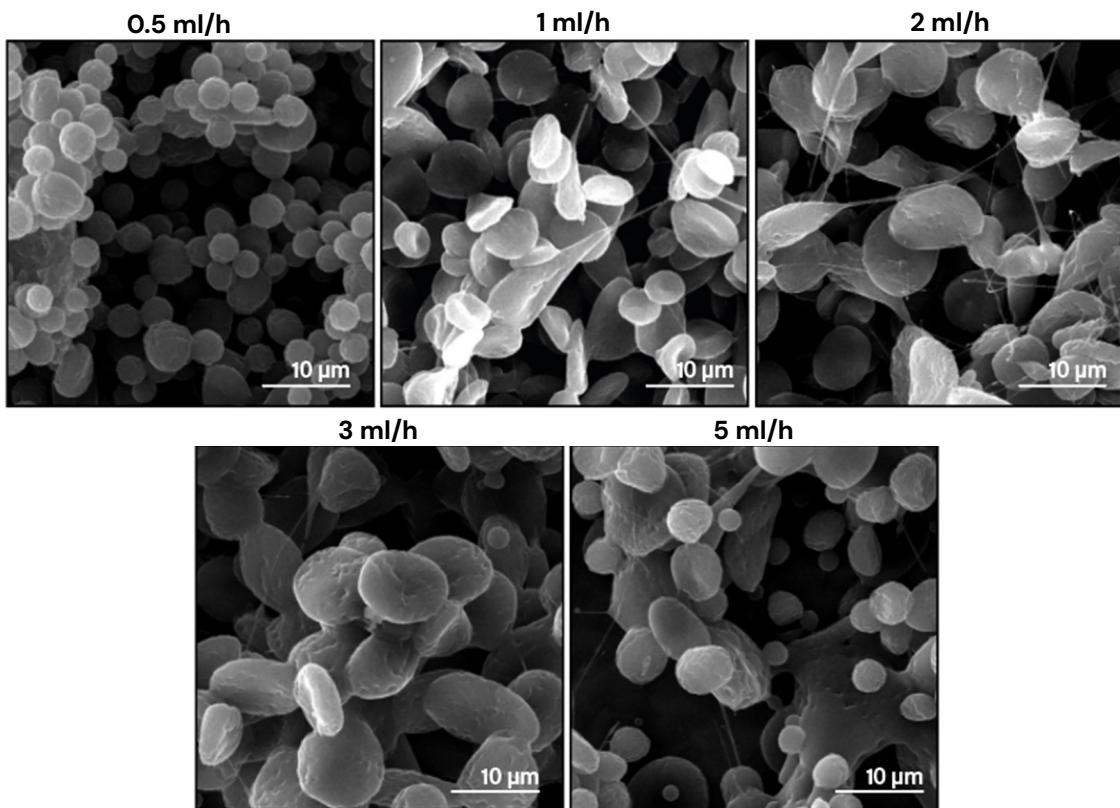


**Figura 4.30.** Micrografías SEM de las MPs cargadas de C-NPs añadiendo con la técnica coaxial para separar la fase de disolución de C-NPs en AcEt a 1 mg/ml y la fase de DCM:DMF (9:1) con 15%(p/v) PLGA a unos flujos de 1-1 ml/h, 3-1 ml/h y 5-1 ml/h.

#### 4.1.4.3. Optimización de la síntesis de MPs con $\text{CHCl}_3$

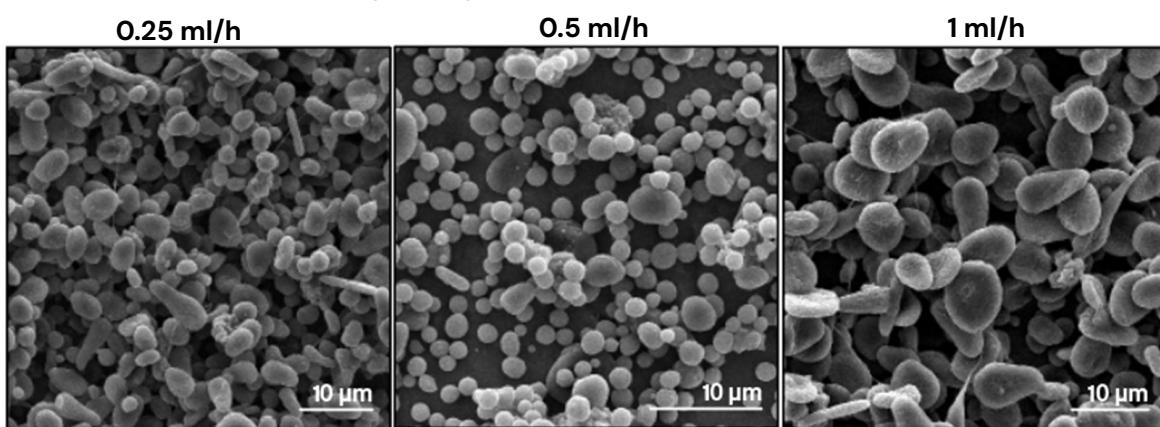
Con el objetivo de aumentar el rendimiento de la síntesis, se optó por utilizar cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) para dispersar las C-NPs y reducir la cantidad de PLGA para incrementar la proporción de C-NPs y polímero en las partículas.

Primeramente, se encapsularon C-NPs en MPs utilizando 5 %(p/v) de PLGA y 2 mg/ml de C-NPs en una disolución  $\text{CHCl}_3$ , manteniendo la altura de la aguja a 15 cm de distancia y variando el flujo a 0.5, 1, 2, 3 y 5 ml/h (**Figura 4.31**). Sin embargo, el tamaño de MPs obtenido fue de nuevo muy superior al deseado.



**Figura 4.31.** Micrografías SEM de las MPs cargadas de C-NPs utilizando disoluciones de DCM y CHCl<sub>3</sub>. a) MPs obtenidas partir de 5%(p/v) PLGA en CHCl<sub>3</sub> y 2 mg/ml de C-NPs, para h=15 cm y un flujo de 0.5, 1, 2, 3 y 5 ml/h.

Para tratar de reducir el tamaño de las MPS, se sintetizaron utilizando 5 %(p/v) de PLGA y 5 mg/ml de C-NPs en una disolución de DMC:CHCl<sub>3</sub> (4:1) con 10 mg/ml de Tween para estabilizarlo. La altura de la aguja se mantuvo a 15 cm y el flujo de la disolución se varió a 0.25, 0.5 y 1 ml/h (**Figura 4.32**). La introducción de CHCl<sub>3</sub> en la síntesis permitió reducir notablemente el diámetro y mejorar la morfología de las MPS. La proporción DCM:CHCl<sub>3</sub> (3:1) resultó en una producción de MPs ineficiente por la dificultad en la estabilización del cono de Taylor. En la síntesis DCM:CHCl<sub>3</sub> (4:1) se observó menor tamaño de MPs y mayor homogeneidad de la muestra conforme se redujo el flujo de salida de la disolución.

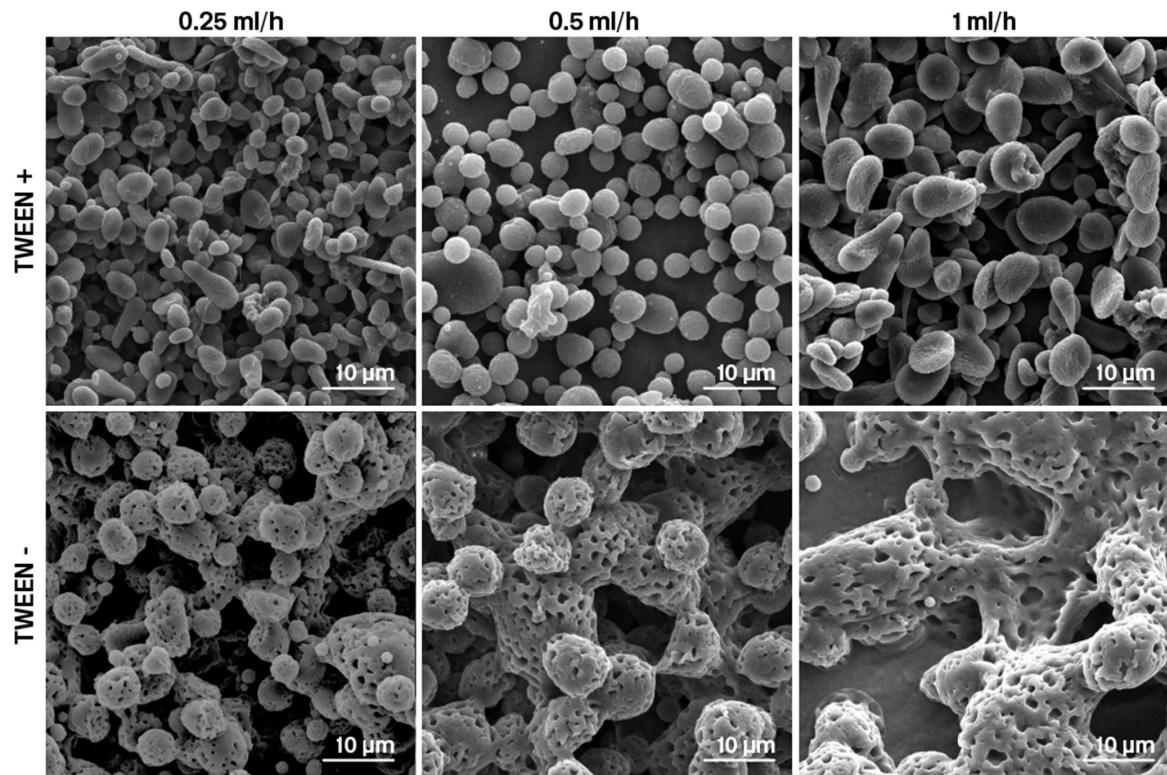


**Figura 4.32.** Micrografías SEM de las MPs cargadas de C-NPs utilizando 5%(p/v) de PLGA y 5 mg/ml de C-NPs en una disolución de DMC:CHCl<sub>3</sub> (4:1) con 10 mg/ml de Tween, h=15 cm y el flujo modificado a 0.25, 0.5 y 1.0 ml/h.

Por tanto, se decidió seleccionar la muestra obtenida bajo las condiciones: DCM:CHCl<sub>3</sub> (4:1), 5 %(p/v) PLGA y 5 mg/ml de C-NPs, estabilizada con 10 mg/ml de Tween, utilizando una distancia de 15 cm entre colector y aguja, un flujo de disolución de 0.5 ml/h y una diferencia de voltaje de +13 kV y -3.9 kV.

#### 4.1.4.4. Efecto del Tween como estabilizante en la síntesis de MPs

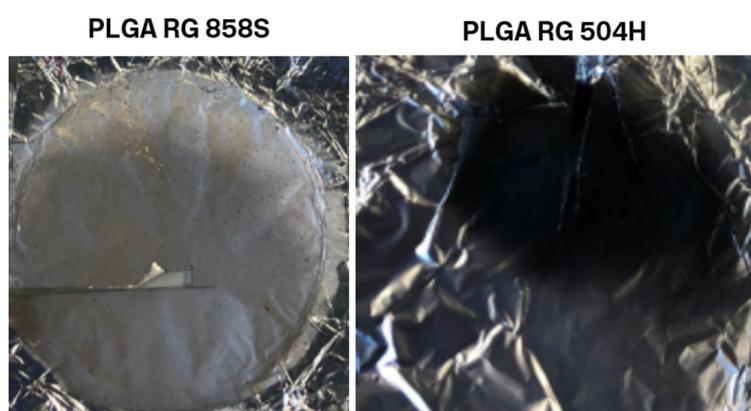
En este apartado se valoró el efecto del Tween en la encapsulación de C-NPs en MPs por electrosprayado utilizando el polímero PLGA RG504H con las condiciones optimizadas descritas anteriormente. En la [Figura 4.33](#) se ilustra el efecto de la adición de Tween a la disolución utilizada para la obtención de MPs. Cuando el surfactante no está presente, no se consigue la formación de partículas, sino que el polímero aparece con aspecto amorfo.



**Figura 4.33.** Micrografías SEM comparativas entre CMPs de PLGA RG504H producidas con y sin surfactante Tween 80 en la disolución.

#### 4.1.4.5. Efecto del cambio de polímero en la síntesis de MPs

La síntesis optimizada con PLGA RG504H fue reproducida con la variante PLGA RG858S para obtener MPs cargadas de C-NPs con tiempos más largos de degradación. Sin embargo, como se ilustra en la [Figura 4.34](#), con este polímero el resultado macroscópico no mostró una coloración aceptable, por lo que esta opción fue descartada. Probablemente debido a que la interacción entre el C-NPs y el polímero es mayor para el caso de RG858S y da lugar a la aparición de menos aglomerados en el interior del PLGA que cuando se usa RG504H. La aparición de dichos aglomerados facilita la inspección visual.

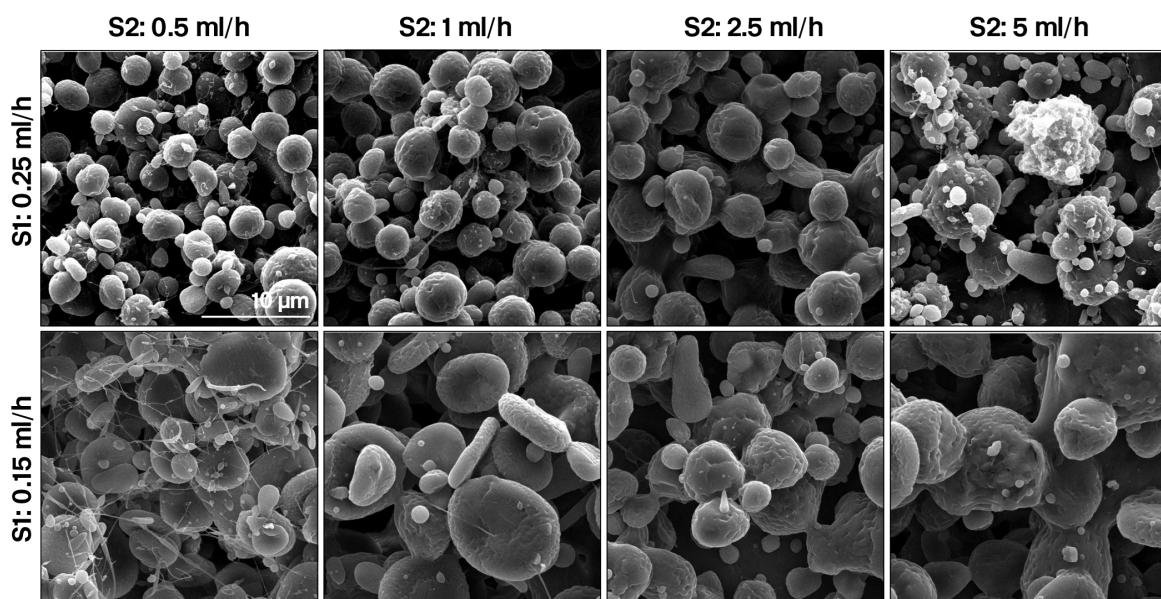


**Figura 4.34.** Muestras de CMPs obtenidas con PLGA RG858S y RG504H. Se observa que con el polímero 858S la coloración macroscópica es menos intensa que con el PLGA RG504H.

#### 4.1.4.6. Coencapsulación de C-NPs y CQ en MPs

Las últimas síntesis por electrosprayado fueron realizadas con el objetivo de coencapsular CQ con las C-NPs. Para la doble encapsulación fue necesario utilizar la técnica coaxial, tal y como se detalla en el Apartado 3.1.2.3. de la Sección de Materiales y Métodos.

En todos los casos se utilizó una primera disolución polimérica con una concentración de 5 %(*p/v*) de PLGA RG504H disuelta en DCM:CHCl<sub>3</sub> (4:1), con 10 mg/ml de Tween y 5 mg/ml de C-NPs; y un segundo fluido consistente en 100 mg/ml CQ disuelta en la fase acuosa. La concentración de CQ fue elegida por ser el valor límite de saturación de la disolución, al igual que en la encapsulación de C-NPs en NPs por emulsión. En la **Figura 4.35** se muestran los resultados de la síntesis utilizando diferentes velocidades de flujo.

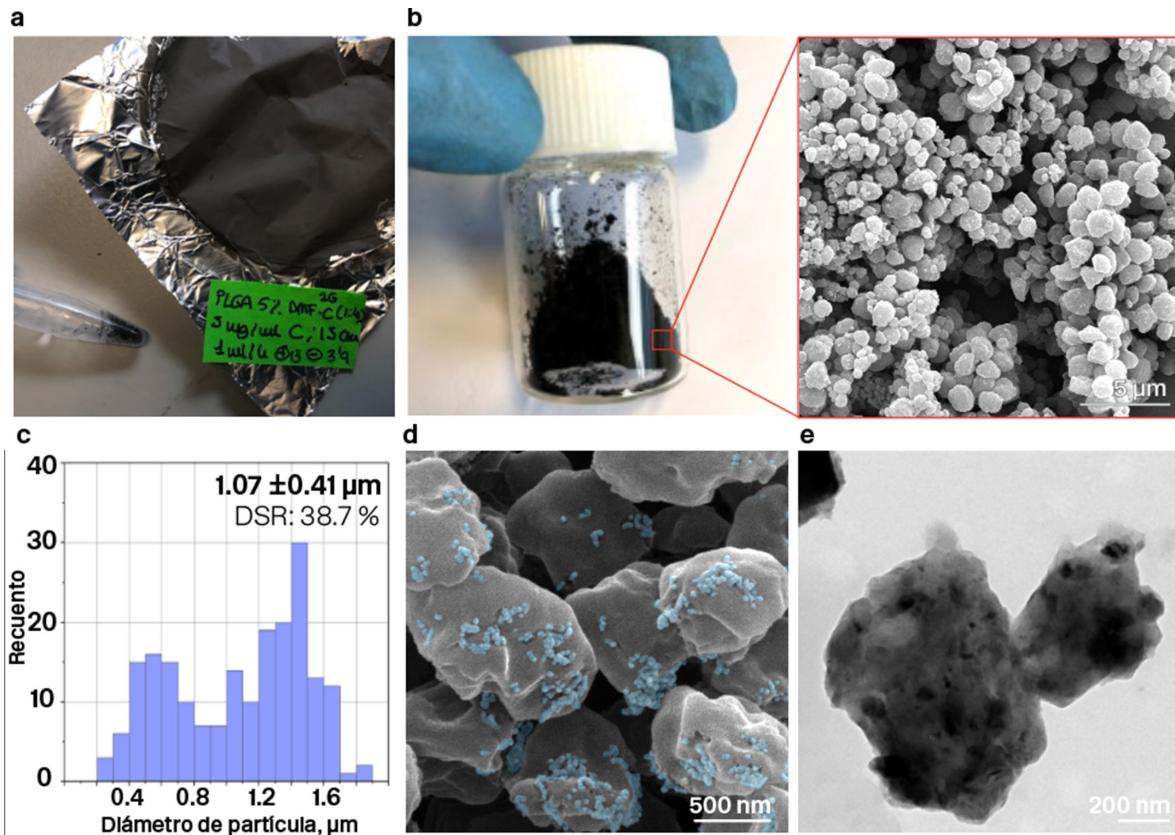


**Figura 4.35.** Micrografías SEM de la coencapsulación de CQ y C-NPs en MPs de PLGA RG 504S utilizando diferentes velocidades de flujo para la fase acuosa con cloroquina (S1) y la fase orgánica con PLGA, Tween y C-NPs (S2).

Se obtuvieron MPs con tamaño variable, aunque con morfologías homogéneas. La síntesis a velocidades de flujo S1=0.25 ml/h y S2=0.5 ml/h mejoró la morfología y tamaño de las MPs para la aplicación concreta que se busca en esta Tesis al exhibir tamaños de partícula más reducidos. Sin embargo, la incorporación de CQ redujo sustancialmente la coloración macroscópica de las MPs, por lo que su uso para el marcaje de ganglios linfáticos fue descartado. En conclusión, las únicas MPs obtenidas por electrosprayado aptas para el marcaje ganglionar fueron las obtenidas a partir del 5 %(*p/v*) de PLGA Resomer® RG 504H, 5 mg/ml de C-NPs y 10 mg/ml de Tween 80 en DCM:CHCl<sub>3</sub> (4:1). Por tanto, a continuación, se detalla la caracterización realizada para estas MPs.

#### 4.1.4.7. Caracterización morfológica de las MPs cargadas de C-NPs

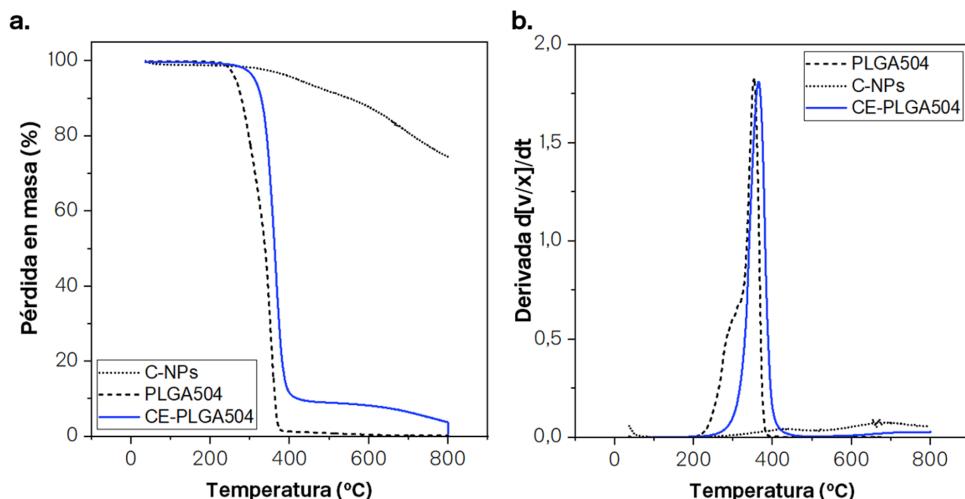
Las MPs cargadas de C-NPs mostraron una coloración negra intensa (**Figura 4.36 a,b**). El diámetro promedio fue de  $1.07 \pm 0.41 \mu\text{m}$ , con tamaños comprendidos entre 200 nm y 1.89  $\mu\text{m}$  (**Figura 4.35 c**). La DSR de la muestra fue de 38.7 % y el PDI de 0.03, lo que sugiere homogeneidad en la distribución de tamaños. La morfología de las MPs y la valoración inicial de la encapsulación de C-NPs fue analizada por microscopía SEM y TEM (**Figura 4.36 d,e**). En las imágenes se observa la presencia de C-NPs encapsulado en la matriz polimérica de las MPs, en ocasiones aglomeradas.



**Figura 4.36.** Micrografías SEM y TEM, distribución de tamaños y vista macroscópica de las MPs cargadas de C-NPs obtenidas por electrosprayado. a) MPs recogidas en papel de aluminio. b) MPs una vez rascadas del papel de aluminio en polvo. c) Distribución de tamaños de MPs. d-e) Micrografías SEM y TEM respectivamente, donde se muestra la encapsulación de C-NPs en la matriz polimérica y algunas C-NPs no encapsuladas (azul).

#### 4.1.4.8. Determinación de la eficiencia en la encapsulación de C-NPs en MPs

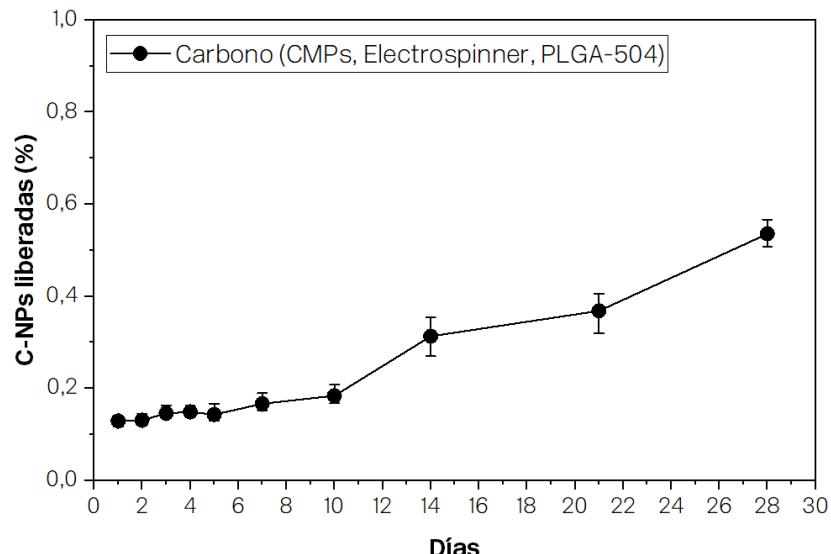
La cuantificación de la eficiencia de la encapsulación se realizó a través del análisis TGA. Dado que las C-NPs muestran temperaturas de degradación a 600–800 °C y el PLGA se piroliza a 400 °C, fue posible determinar la cantidad de C-NPs encapsuladas en las micropartículas (**Figura 4.37 b**). El análisis de las curvas TG de las micropartículas obtenidas por electrosprayado reportó un contenido de PLGA promedio del ~86.5 % y un promedio de C-NPs del ~13.5 % (**Figura 4.37 a**). Los resultados demostraron una proporción similar de PLGA y C-NPs en las NPs obtenidas por emulsión y en las MPs obtenidas por electrosprayado.



**Figura 4.37.** Curvas TG y DTG de las MPs de PLGA RG504H con C-NPs encapsuladas obtenidas por electrosprayado.

#### 4.1.4.9. Perfil de liberación *in vitro* de C-NPs de las MPs

La liberación *in vitro* de las C-NPs se determinó a través el espectro UV-Vis del sobrenadante considerando su máximo de absorbancia a 218 nm. Las MPs se dispersaron en un medio acuoso y se mantuvieron durante 28 días a 37 °C en agitación continua. Como se ilustra en la **Figura 4.38** y **Tabla 4.6**, tras 4 semanas se liberó el ~0.5 % de C-NPs, de nuevo probablemente por la naturaleza hidrofóbica del mismo.



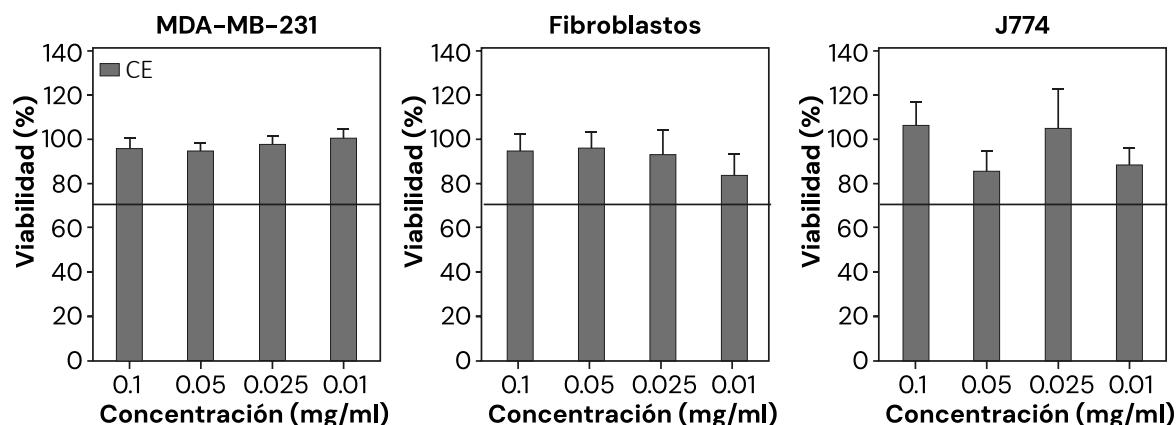
**Figura 4.38.** Curva de la cinética de liberación de las C-NPs de las MPs de PLGA RG504H.

**Tabla 4.6.** Porcentaje de C-NPs liberadas *in vitro* de las MPs de PLGA RG504H.

	C-NPs liberadas (%)			
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
MPs (Electrosprayado, RG504H)	0.17 ± 0.0	0.31 ± 0.0	0.37 ± 0.0	0.53 ± 0.0

#### 4.1.4.10. Ensayos de viabilidad celular de las MPs cargadas con C-NPs

Los estudios de citotoxicidad se realizaron en las tres líneas celulares mencionadas anteriormente: fibroblastos dérmicos humanos, J774 y adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 24 horas después la incubación. Como se ilustra en la **Figura 4.39**, las MPs con C-NPs encapsuladas no fueron citotóxicas a ninguna concentración en ninguna de las líneas celulares estudiadas (84-100 %) probablemente debido a su elevado tamaño y a su reducida internalización celular.



**Figura 4.39.** Viabilidad celular en las líneas MDA-MB-231, fibroblastos y macrófagos (J774) tras la administración de MPs cargadas con C-NPs. En las concentraciones de MPs, la cantidad de C-NPs es de 13.5, 6.8, 3.4 y 1.4 µg/ml, respectivamente.

## 4.1.5. Preparación de los vectores nano y micro-particulados

### 4.1.5.1. Optimización de los vectores basados en medios de PEG y MC

Para evaluar experimentalmente la viscosidad del vector se inyectaron dosis de 0.1 ml de MC y PEG combinados con las correspondientes NPs/MPs para el marcaje de tejidos ex vivo. Se prepararon inyecciones con 5 mg/ml de NPs cargadas de C-NPs obtenidas por emulsión. Durante la preparación de los medios, las disoluciones de PEG y MC a 0.5 % (p/v) fueron descartadas por no mostrar la suficiente viscosidad. Tras descartar los medios de MC y de PEG al 0.5% (p/v), se prepararon a una concentración de 1.0 y 2.0 % (p/v).

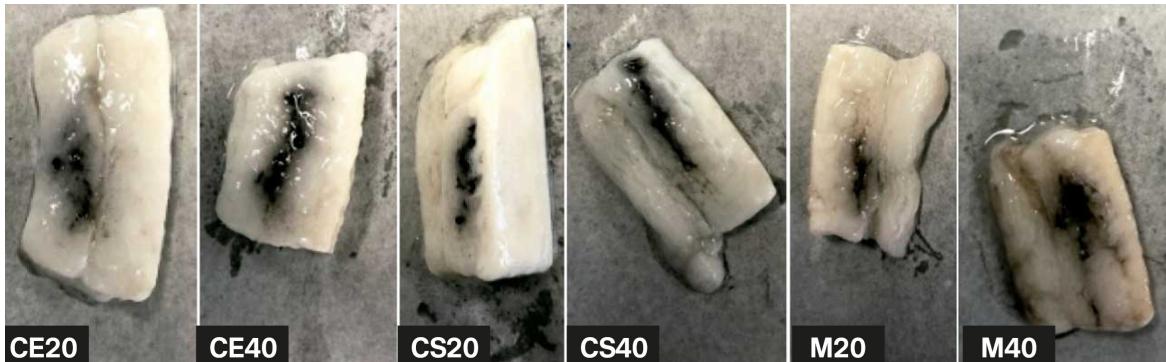
En el momento de la inyección, los medios de PEG 1.0 % (p/v) mostraron menor viscosidad respecto a los de MC 1.0 % (p/v) y diseminó en todos los tejidos. Esta valoración fue más evidente en el tejido adiposo porcino, donde la rápida distribución y extravasación por el canal de la inyección redujo la intensidad del marcaje (**Figura 4.40 a,b**). De la misma manera, en tejido adiposo de pollo se observa la diseminación del marcaje de PEG 1.0 % (p/v) respecto al de MC 1.0 % (p/v) (**Figura 4.39 c,d**). Frente a un aumento de la concentración de MC y PEG a 2% (p/v) se observan resultados similares en todos los tejidos. En los riñones de conejo, resulta más localizada la inyección de MC 1% (p/v) que la dosis de PEG 2% (p/v). Mientras que esta primera permanece en el lugar de la inyección, el marcaje de PEG extravasa por el canal de la punción (**Figura 4.40 e-f**). En la misma imagen se observa el resultado de la dosis a MC 2% (p/v), donde el aumento de la viscosidad limita el manejo de la inyección y dificulta la inoculación del marcaje.



**Figura 4.40.** Vectores de MC 1.5% (p/v) con 20 mg/ml (a) y 40 mg/ml (b) MPs cargadas de C-NPs, 20 mg/ml (c) y 40 mg/ml (d) de NPs cargadas de C-NPs, 20 mg/ml (e) y 40 mg/ml (f) de Mel-NPs inyectados en tejido adiposo de porcino.

El medio de PEG fue descartado por la escasa viscosidad que proporcionaba. Frente a mismas condiciones de biocompatibilidad y homogeneización de las partículas, se decidió continuar con medios basados en MC. Tras 48 horas a 4 °C, los marcajes preservaron su integridad, tanto los compuestos de MC 1.0% (p/v) como los de MC 2.0% (p/v), pero especialmente estos segundos. Frente a resultados de estabilidad del marcaje similares, se decidió utilizar un compuesto de MC 1.5% (p/v), que mejoraba la preservación del marcaje en el momento de la inyección y facilitaba la inoculación del vector en relación a los vectores al 2.0% (p/v).

Tras realizar inyecciones directas de los marcas en las muestras de tejido, las zonas marcadas fueron diseccionadas y suspendidas en tubos Falcon con PBS. Se mantuvieron en agitación a 37 °C durante tres semanas. El marcaje se mantuvo localizado y sin perder intensidad durante el experimento (**Figura 4.41**). Además, no se observó diferencia en la coloración obtenida a 20 y 40 mg/ml, por lo que el límite máximo en las experiencias *in vivo* posteriores se mantuvo en 20 mg/ml. Además, se decidió utilizar MC al 1.5%(p/v) para la producción de vectores de marcaje.



**Figura 4.41.** Muestras de tejido disecadas y suspendidas en PBS (g). Muestras de tejido disecadas tras 3 semanas suspendidas en PBS, agitación y a 37°C con inyecciones de MC 1.5%(p/v) con 20 (CE20) y 40 mg/ml (CE40) de MPs cargadas de C-NPs, 20 (CS20) y 40 mg/ml (CS40) de NPs cargadas de C-NPs, 20 (M20) y 40 mg/ml (M40) de Mel-NPs.

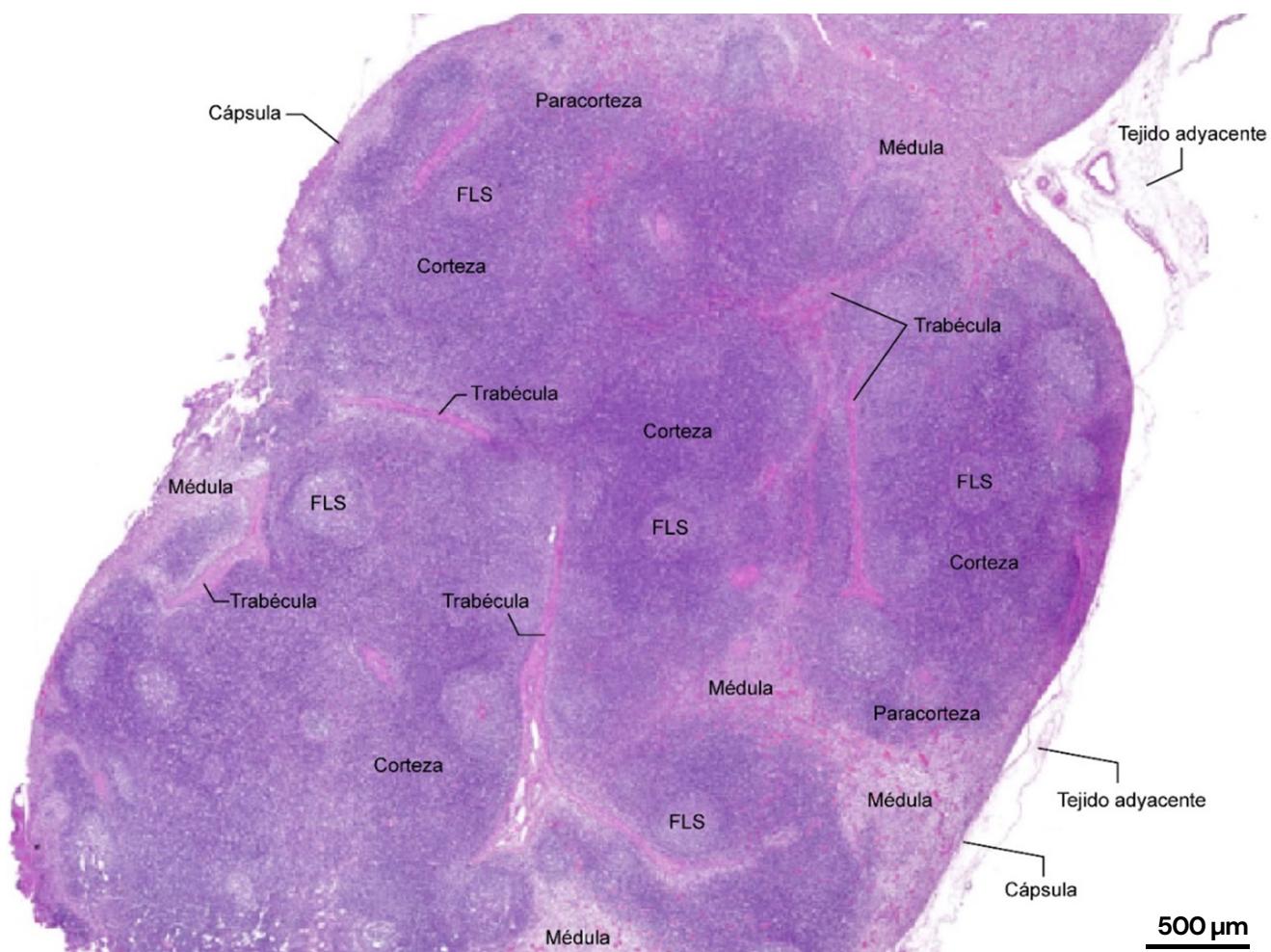
## 4.2. Estudio histológico y ultraestructural del ganglio porcino

Antes de realizar las experimentaciones *in vivo*, realizamos estudios microscópicos para caracterizar los ganglios linfáticos porcinos.

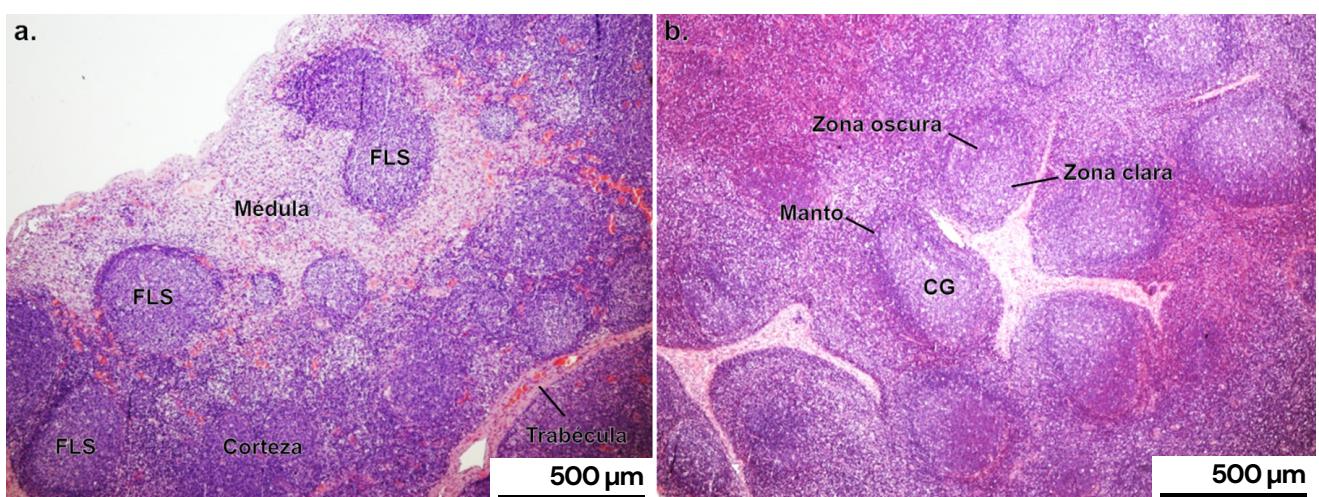
A nivel estructural, el ganglio linfático está formado por el estroma, los senos linfáticos y el parénquima. Por un lado, el estroma se compone de tejido conectivo denso que forma la cápsula, que envuelve al ganglio, y las trabéculas, que se extiende hacia el interior formando tabiques que dividen el ganglio en compartimentos conocidos como senos corticales y medulares, dependiendo de la región en la que se ubiquen. Entre la cápsula y las trabéculas hay una red tridimensional de tejido conectivo reticular. Los senos linfáticos atraviesan el parénquima y conectan los vasos linfáticos aferentes con los vasos linfáticos eferentes del ganglio linfático. Por otro lado, el parénquima ganglionar está formado por tejido linfoide, organizado en la corteza, la paracorteza y la médula.

Existen diferencias entre el ganglio linfático humano y porcino en términos de tamaño, distribución y composición celular. Histológicamente, en los ganglios linfáticos del cerdo la corteza y la médula presentan una organización invertida en comparación con los humanos.<sup>275</sup> En cerdos, la corteza se encuentra en la región interna del ganglio, mientras que la médula se encuentra en la periferia (**Figura 4.42**). Eso se traduce en que los folículos linfáticos se encuentran en regiones más internas, mientras que en los ganglios linfáticos humanos los folículos se disponen en la región más externa del parénquima ganglionar.

La corteza está compuesta principalmente por folículos linfáticos primarios y secundarios (**Figura 4.43 a**), donde residen linfocitos de morfología irregular estrechamente empaquetados (reducidos espacios intercelulares), especialmente linfocitos B. Los folículos linfáticos contienen predominantemente linfocitos B, además de linfocitos T, células dendríticas/reticulares y macrófagos, aunque en menor medida. En el centro germinal de los folículos secundarios en ocasiones se distingue una zona oscura (donde ocurre la proliferación de linfocitos B) y una zona clara (donde los linfocitos B seleccionados maduran y se diferencian) (**Figura 4.43 b**).

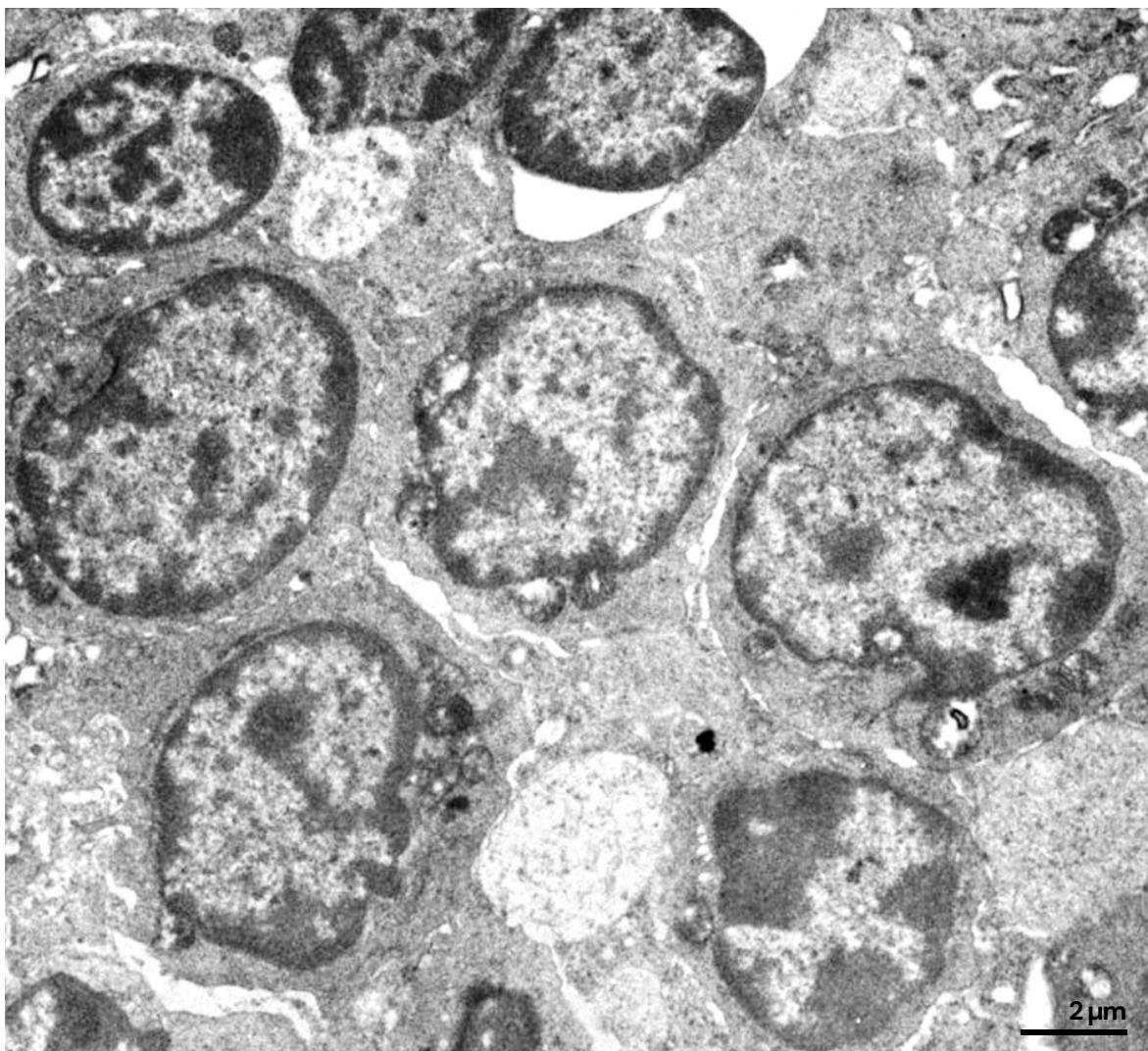


**Figura 4.42.** Panorámica de un ganglio mesentérico de cerdo (FLS: folículos linfáticos secundarios). H&E.



**Figura 4.43.** Distribución cortical y medular del ganglio linfático porcino. (a) La corteza se compone de linfocitos densamente empaquetados y organizados en folículos linfáticos secundarios (FLS), mientras que la médula los linfocitos aparecen dispuestos de manera más laxa. (b) Los FLS se componen de un centro germinal (CG) rodeado de un manto. H&E.

Ultraestructuralmente, los linfocitos se identifican fácilmente por su núcleo voluminoso y su citoplasma reducido con escasos orgánulos. Sin embargo, no es posible identificar los subtipos B y T bajo el microscopio electrónico (**Figura 4.44**).

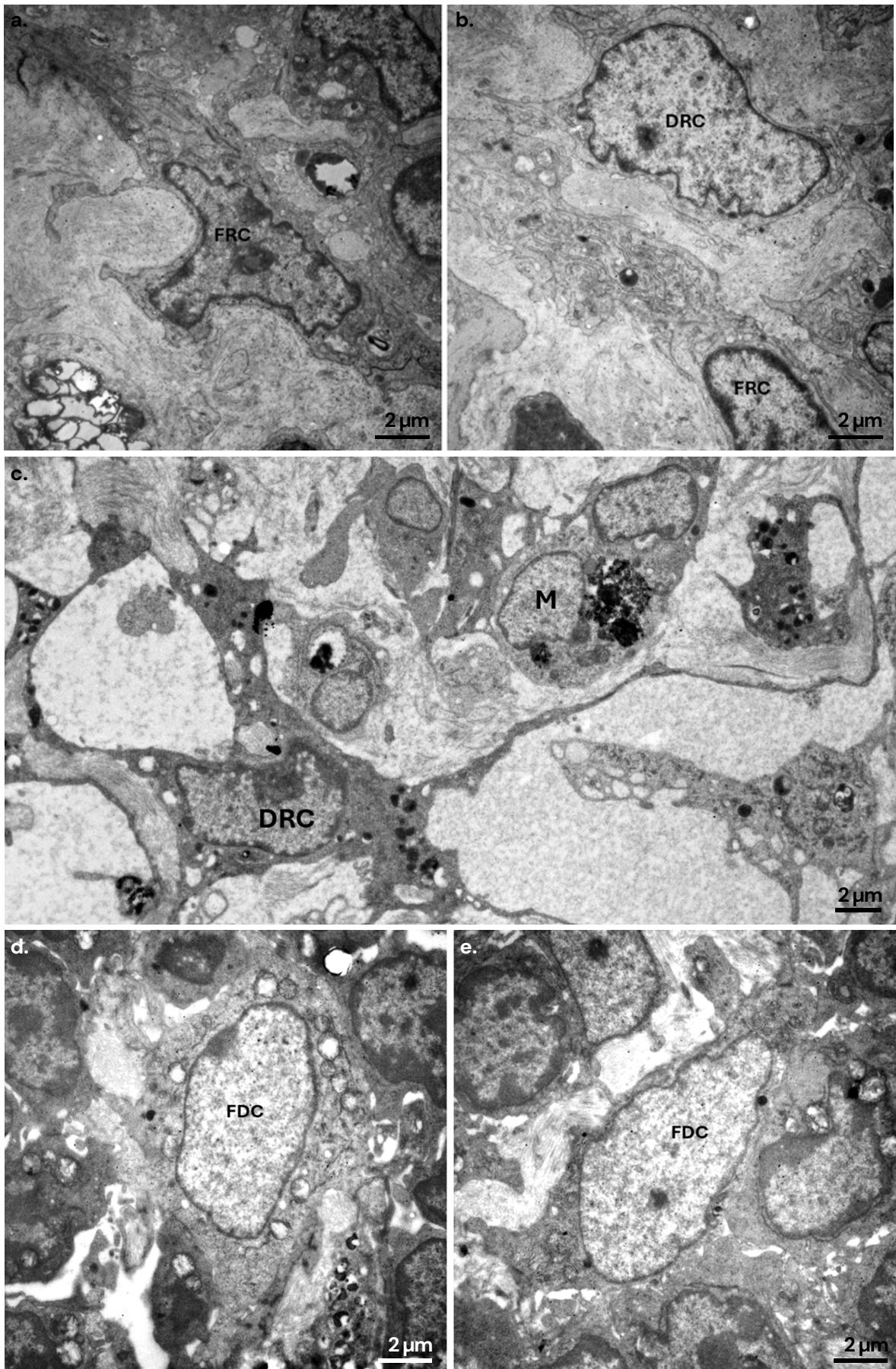


**Figura 4.44.** Linfocitos densamente empaquetados en la región de la corteza ganglionar.

Dada la escasez de estudios inmunoelectrónicos, las células del estroma ganglionar todavía no pueden distinguirse inequívocamente a nivel ultraestructural. En esta Tesis, se identificaron FRC con morfologías fusiformes y alargadas, con un citoplasma rico en RER para la síntesis de colágeno, fibronectina y laminina y componentes de la MEC. Como se observa en la **Figura 4.45 a-b**, las FRC contactan unas con otras a través de prolongaciones del citoplasma.

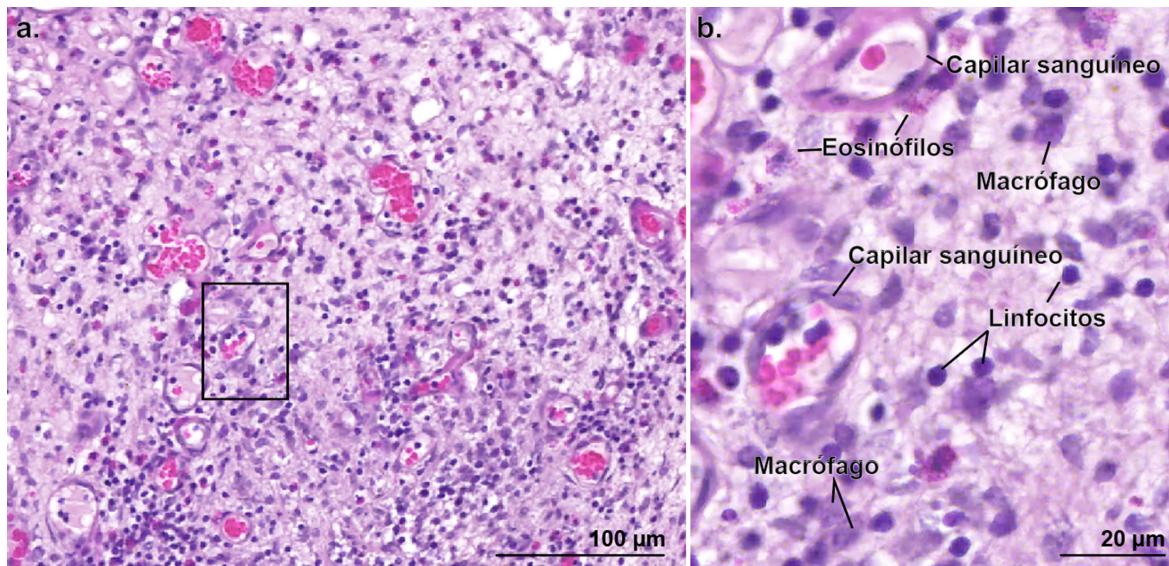
Se observan otras células estromales caracterizadas por presentar proyecciones citoplasmáticas finas y alargadas en su etapa madura que, al conectar unas con otras, forman redes celulares (**Figura 4.45 c**). Se trata de células con procesos dendríticos filiformes más largos y finos que los de FRC, numerosas mitocondrias en el citoplasma y escaso RER. Por sus características y localización, en la región cercana a la médula se identifican tentativamente como DRC.

También aparecen con frecuencia otro subtipo de células estromales, que consisten en células de mayor tamaño, con núcleos voluminosos, con morfología ovalada y eucromáticos y con citoplasmas ricos en mitocondrias y sáculos de RER (**Figura 4.44 d-e**). Dada su localización en el interior de folículos linfáticos, caracterizados por la densa disposición de los linfocitos y la ausencia de otros tipos celulares, se identifican como FDC. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la identificación inequívoca de estos subtipos de células estromales requiere de estudios inmunohistoquímicos adicionales, alejados del objetivo de esta Tesis Doctoral.

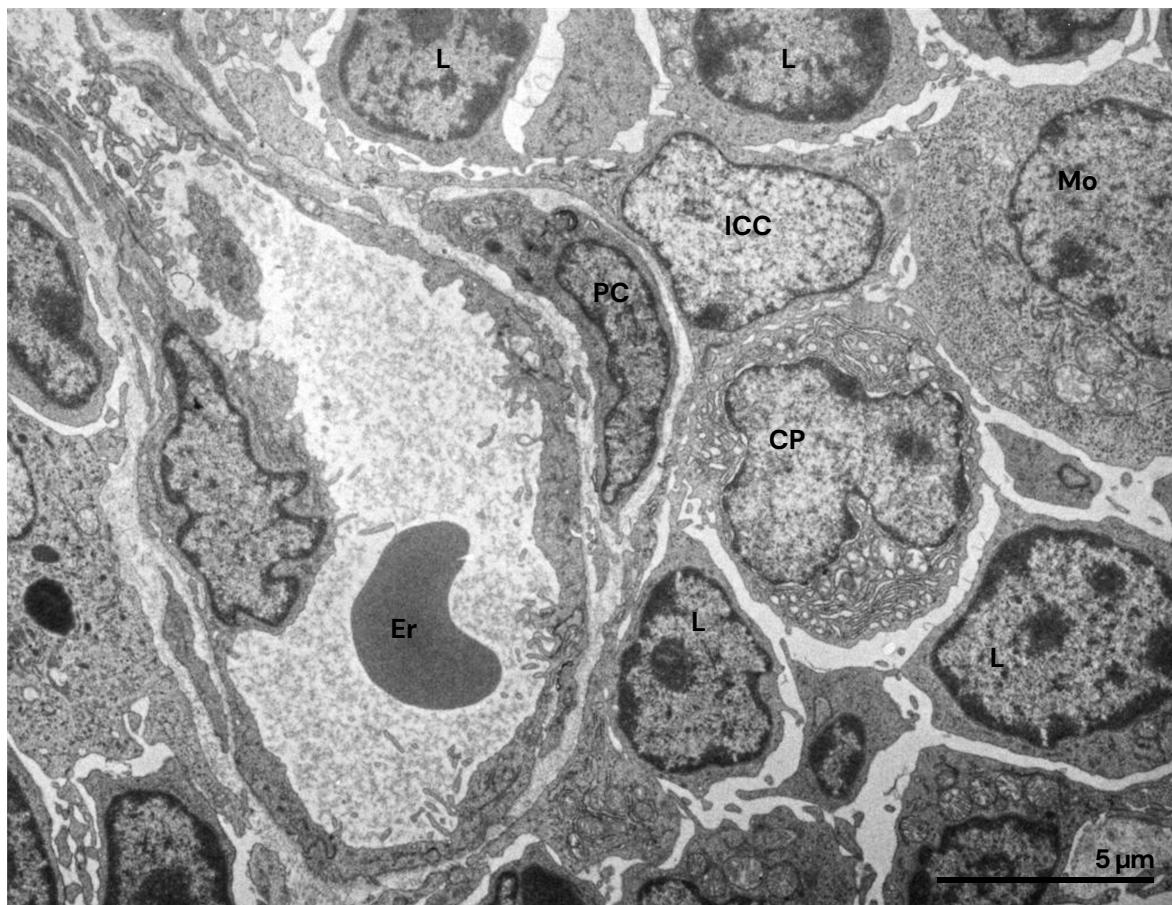


**Figura 4.45.** Células estromales del ganglio linfático. (a-b) FRC, con morfologías alargadas con numerosas prolongaciones, grandes núcleos y abundante RER. (c) DCR, con núcleos voluminosos y largas y finas proyecciones citoplasmáticas que contactan con otras células. (d-e) FDC en el folículo linfático, con un núcleo voluminoso y pequeñas y gruesas prolongaciones citoplasmáticas que contactan con células inmunitarias cercanas.

La médula se encuentra en la periferia del ganglio linfático en los cerdos y está compuesta por linfocitos T, células plasmáticas, macrófagos, y cordones de células reticulares. Aunque los linfocitos T también están presentes en la corteza, en la médula tienden a estar menos densamente empaquetados en comparación con los linfocitos B y se distribuyen más uniformemente a lo largo de las zonas paracorticales y medulares (**Figura 4.46–47**).

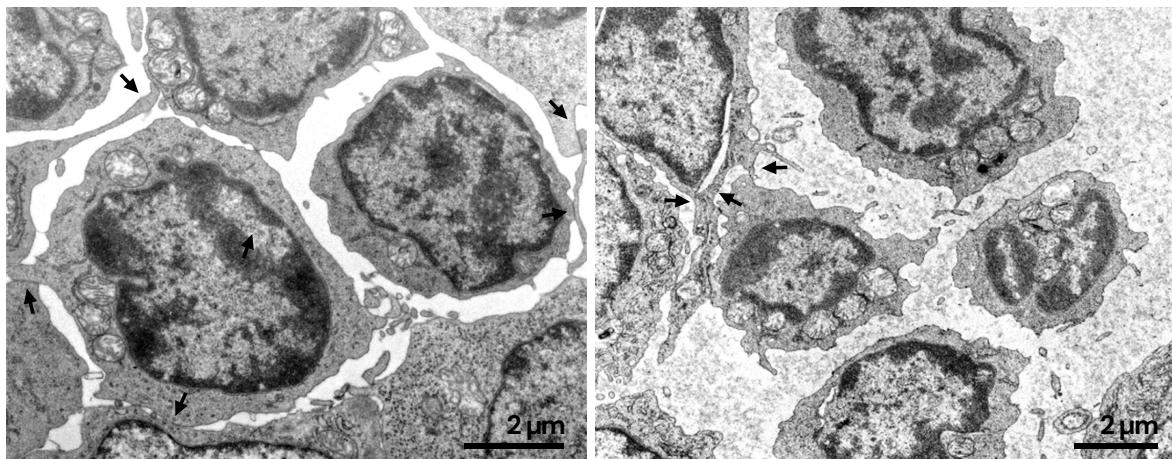


**Figura 4.46.** Región medular del ganglio linfático. (a) Vista panorámica, donde se observan linfocitos organizados de manera más laxa que en la región cortical y numerosos vasos sanguíneos. (b) Detalle de la imagen panorámica donde se aprecian diferentes tipos celulares en la región medular del ganglio.



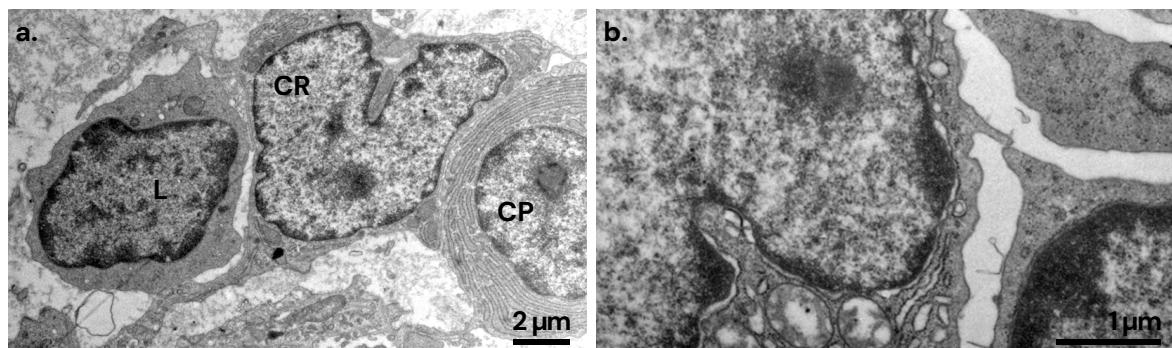
**Figura 4.47.** Región medular del ganglio linfático. Se observan linfocitos (L) separados, una célula plasmática inmadura (CP), un capilar sanguíneo con un eritrocito (Er) en su interior y un pericito adyacente (PC), un monocito (Mo) y una célula intersticial de Cajal (ICC) con finas y alargadas prolongaciones.

Por su función los linfocitos son considerados como células libres, es notable el gran número de pequeñas conexiones que establecen con las membranas de las células vecinas (**Figura 4.48**).



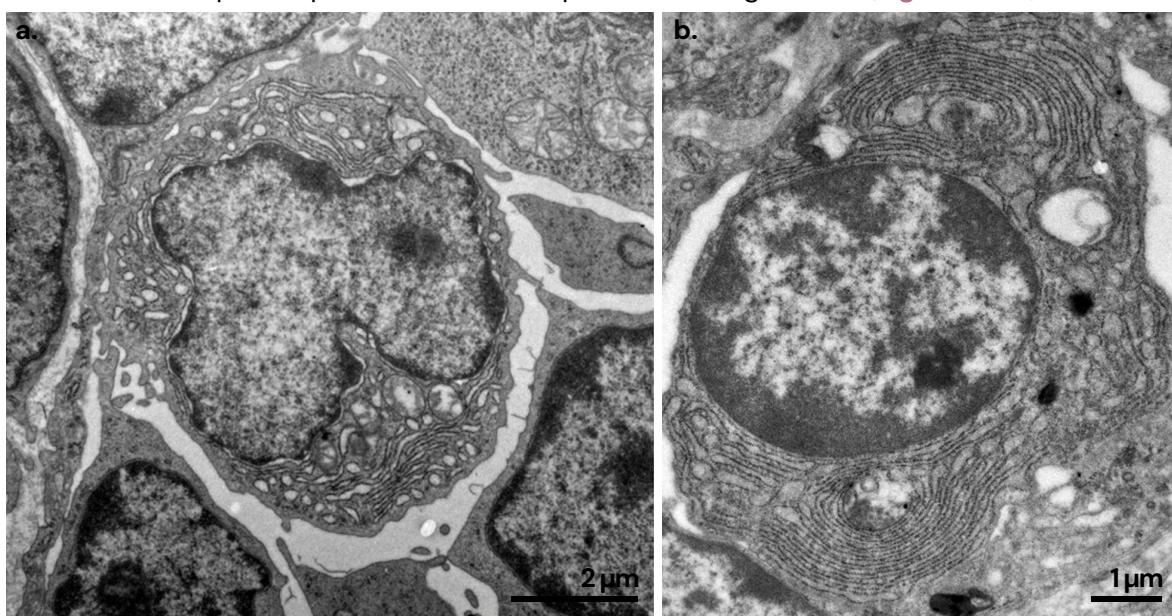
**Figura 4.48.** Linfocitos en parénquima ganglionar. Gran relación núcleo–citoplasma y un citoplasma con escasos orgánulos. Se observan numerosos contactos entre ellas (flechas).

No solo los linfocitos establecen contacto con las células de su entorno, sino que existe contacto en numerosos tipos celulares, lo que indica que existe cooperación entre células (**Figura 4.49**).



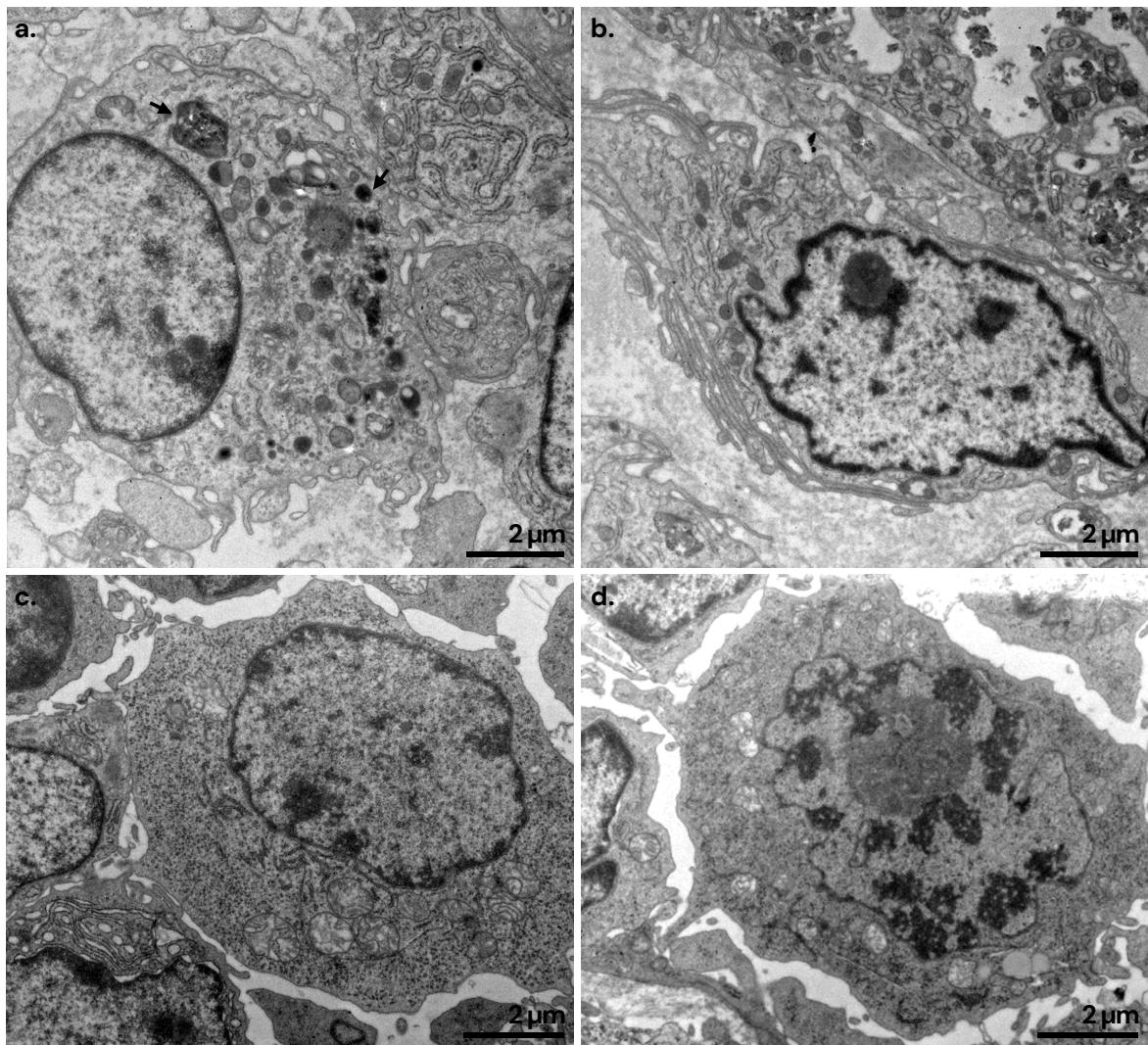
**Figura 4.49.** Contactos entre diferentes tipos celulares en la región medular. (a) Contacto de una célula reticular (CR) con una célula plasmática (CP) y un linfocito (L). (b) Contacto entre una célula plasmática y un linfocito. La micrografía (b) es un detalle de la Figura 4.47 y 4.48 a.

Las células plasmáticas provienen de la activación de los linfocitos B y se caracterizan por un gran desarrollo de RER para responder a la síntesis rápida de inmunoglobulinas (**Figura 4.50**).



**Figura 4.50.** Células plasmáticas del ganglio linfático. (a) Célula plasmática inmadura (detalle de la Figura 4.47). (b) Célula plasmática madura. Su citoplasma muestra una característica presencia de abundante retículo endoplasmático rugoso.

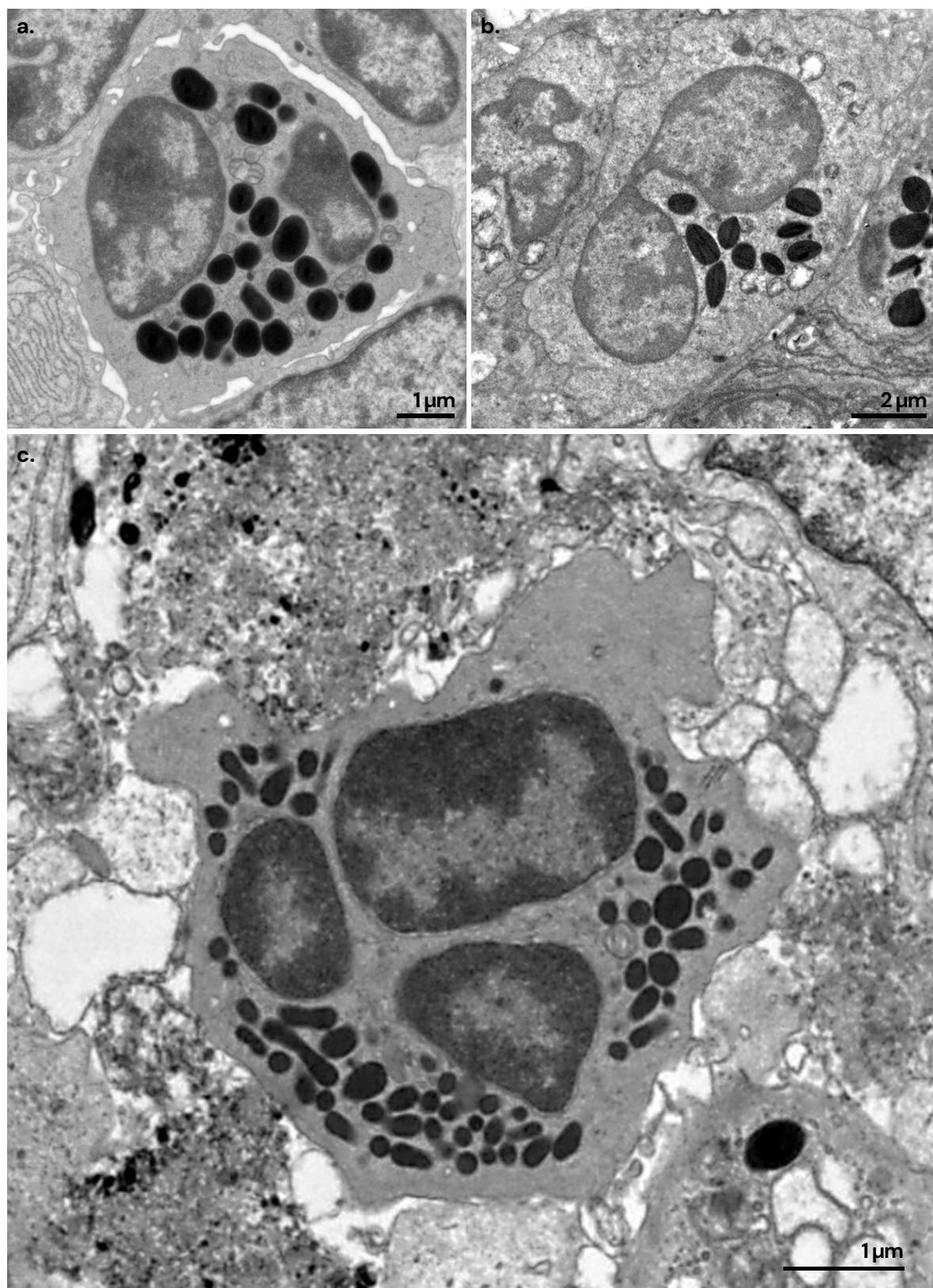
Los macrófagos muestran morfología irregular con núcleos grandes y a menudo dentados. De su citoplasma emergen proyecciones citoplasmáticas alargadas y suelen observarse numerosos lisosomas (**Figura 4.50 a-b**). Los monocitos, sus precursores, son células que tienen un núcleo voluminoso con una fina capa de heterocromatina marginal y un citoplasma con escasos y pequeños sáculos de RER pero con gran abundancia de polirribosomas libres (**Figura 4.51 c-d**).



**Figura 4.51.** Macrófagos y monocitos del ganglio linfático. (a) Macrófago con núcleo voluminoso y redondeado y numerosos lisosomas electrondensos en su citoplasma (flecha). (b) Macrófago con un núcleo irregular, citoplasma rico en RER y mitocondrias. (c) Monocito de gran tamaño y núcleo voluminoso. Sus citoplasmas son ricos en polirribosomas libres, RER y con escasos orgánulos celulares. (d) Monocito en mitosis. La cromatina aparece agregada para la formación de los cromosomas, por lo que se encuentra en estado de mitosis.

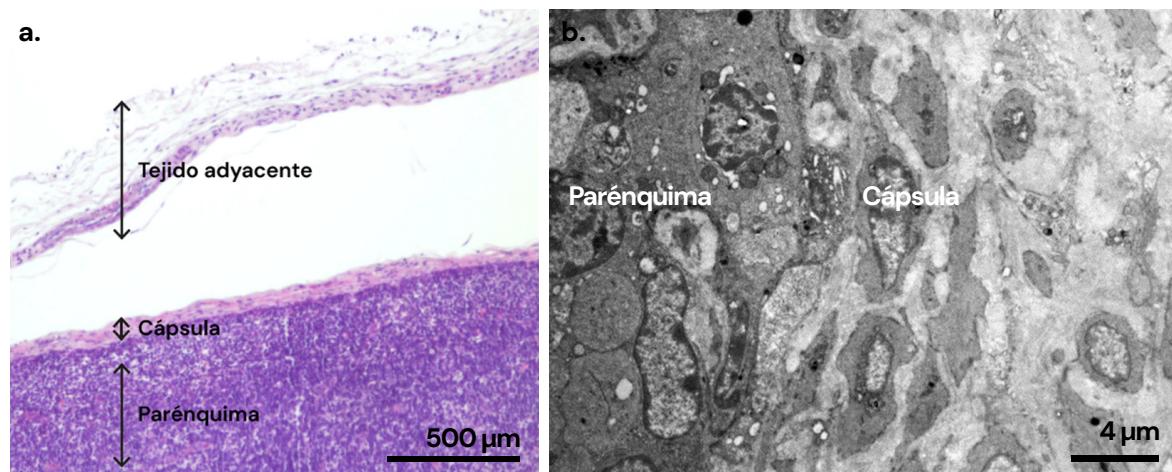
Los granulocitos más observados en el ganglio linfático fueron los eosinófilos. Éstos se caracterizan por mostrar núcleos bilobulados y gránulos electrondensos de 0.5–1 µm. Dependiendo de su madurez, estos gránulos pueden mostrar un núcleo cristalino interno, aunque no es una característica distintiva de todos los eosinófilos (**Figura 4.52 a-b**).

También se observan con frecuencia neutrófilos, caracterizados por la presencia de gránulos más pequeños en su citoplasma (0.2–0.5 µm) y núcleos multilobulados en 3 ó 4 segmentos interconectados por puentes nucleares (**Figura 4.52 c**). No se observaron basófilos y mastocitos, por lo que están presentes en menor medida en el ganglio linfático porcino.

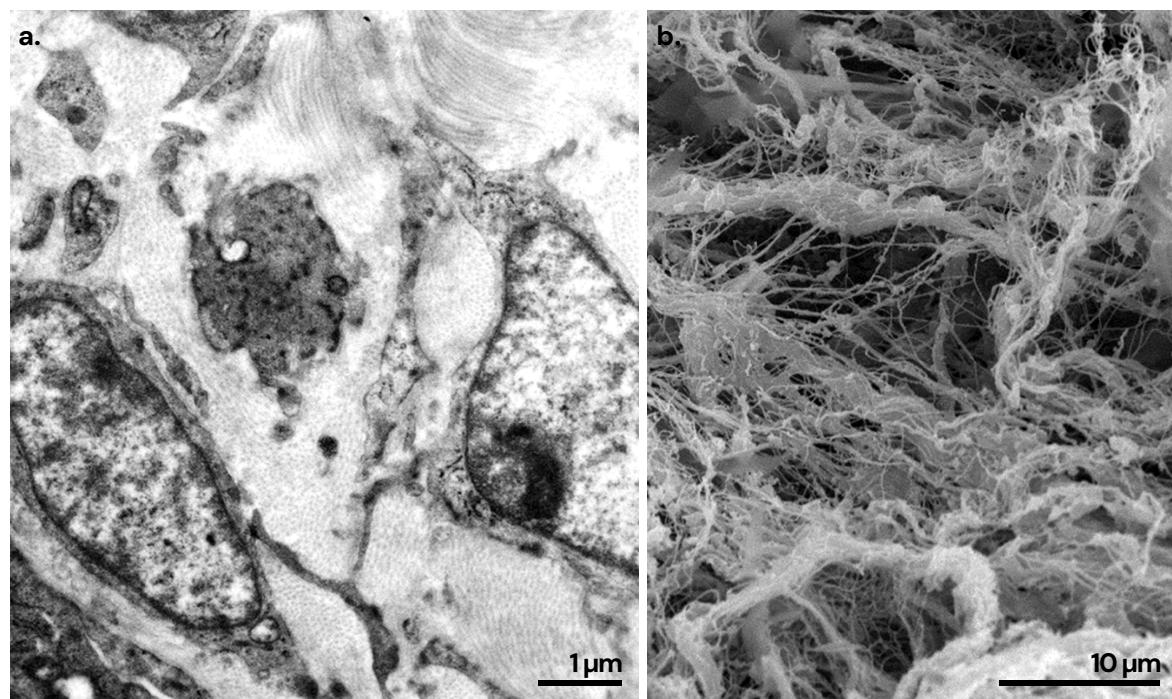


**Figura 4.52.** Eosinófilos y neutrófilos del ganglio linfático. (a) Eosinófilo con núcleo bilobulado y grandes gránulos inmaduros en su citoplasma. (b) Eosinófilo en telofase, con gránulos maduros que muestran una estructura paracristalina típica en su interior. (c) Neutrófilo, con el núcleo multilobulado y gránulos electrondensos en su citoplasma.

El parénquima ganglionar se encuentra rodeado por la cápsula (**Figura 4.53**). En la cápsula del ganglio, compuesta por tejido conjuntivo, se encuentran numerosos fibroblastos y capilares rodeados de fibras de colágeno (**Figura 4.54**).

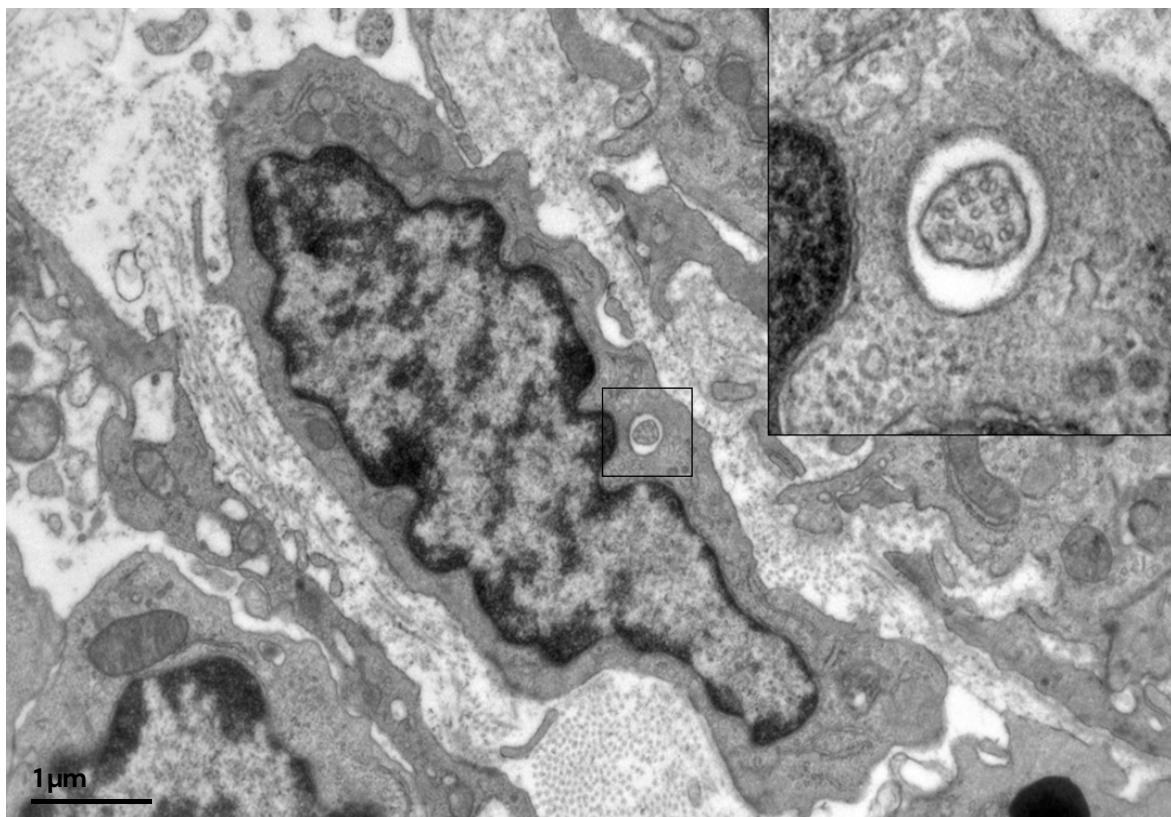


**Figura 4.53.** Cápsula del ganglio linfático porcino (tejido conjuntivo denso), ubicada entre la región medular y el tejido adyacente al ganglio. (a) Imagen panorámica H&E. (b) Interfase entre el parénquima (margen izquierda) y cápsula (margen derecha) del ganglio linfático, donde se observa alta densidad celular en el parénquima y tejido conjuntivo denso en la región capsular.



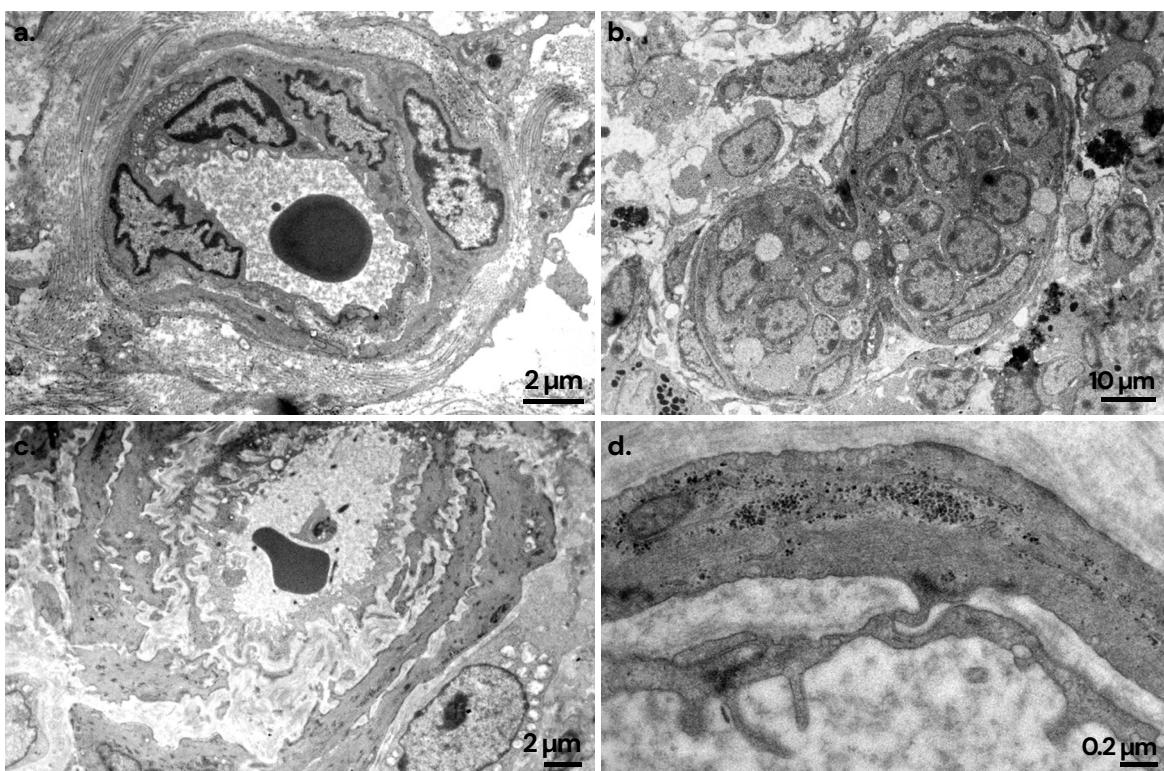
**Figura 4.54.** Fibroblastos y haces de colágeno en la cápsula del ganglio linfático. (a) Micrografía TEM donde se observan haces de colágeno y fibroblastos. (b) Micrografía SEM donde se observan haces de colágeno.

Entre el tejido conectivo observamos células mesenquimales, que pueden corresponder a diferentes categorías celulares en proceso de diferenciación. Estas células las identificamos por la presencia de cilio primario, que mantiene su estructura con una organización característica de sus microtúbulos 9+0, y presentan núcleo voluminoso, escasos orgánulos y abundantes polirribosomas (**Figura 4.55**).



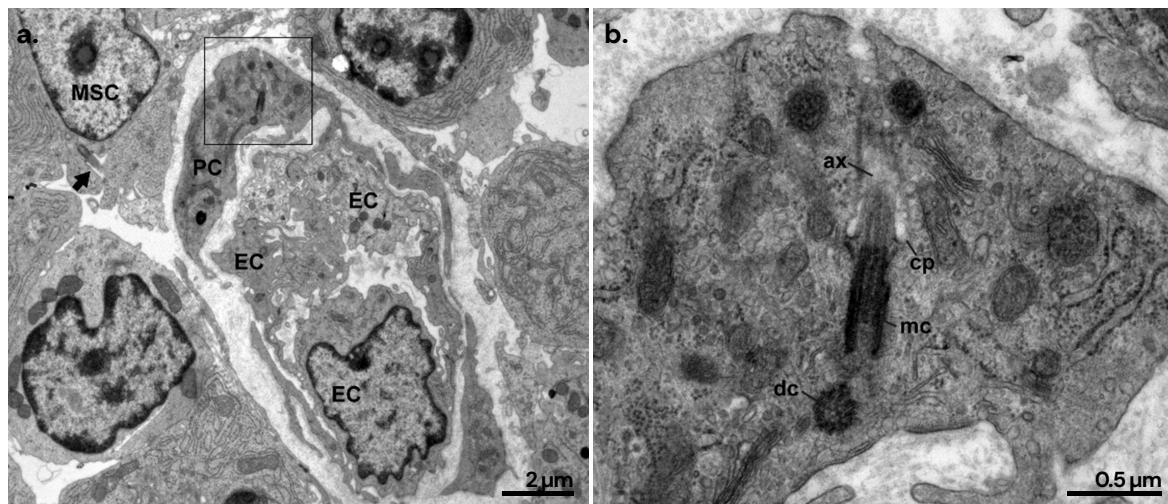
**Figura 4.55.** Detalle de una célula mesenquimal en la región capsular rodeada de haces de colágeno. En su citoplasma se observa el cilio primario cortado transversalmente.

Tanto en el tejido ganglionar como en el tejido conectivo adyacente se encuentran numerosos vasos sanguíneos y linfáticos. La pared endotelial de los vasos linfáticos es más estrecha en comparación con las vérulas (**Figura 4.56 a-b**). Las arteriolas aparecen rodeadas de células musculares lisas (**Figura 4.56 c**) que, a menudo, muestran pequeños contactos celulares con las células del endotelio vascular (**Figura 4.56 d**).



**Figura 4.56.** Vasos sanguíneos y linfáticos. (a) Capilar sanguíneo entre haces de colágeno en la cápsula. (b) Vaso linfático. (c) Arteriola en el parénquima ganglionar. (d) Detalle del contacto entre una célula muscular lisa y una célula del endotelio vascular de una arteriola.

Anexos a las células endoteliales a través de uniones adherentes y de tipo peg-and-socket se encuentran los PCs, un subtipo de células perivasculares. De estas células perivasculares emergen prolongaciones para entrar en contacto con las células endoteliales (**Figura 4.56 a**) y se observa como característica principal la presencia de cilio primario (**Figura 4.56 b**). Su citoplasma es más electronenso que el de las células endoteliales y contiene abundante RER y numerosas mitocondrias. En las regiones cercanas a los PC, encontramos células mesenquimales con cilio primario, pero sin contacto con las células endoteliales (**Figura 4.57 a**).



**Figura 4.57.** Pericitos en un capilar del ganglio linfático. (a) Vista general de un capilar con un PC. En la esquina superior izquierda hay una célula mesenquimal con un cilio primario (flecha) (PC: célula plasmática, EC: célula endotelial, MSC: célula mesenquimal). (b) Sección longitudinal de un cilio primario del pericitos (ax: axonema, cp: bolsillo ciliar, mc: centríolo madre, dc: centríolo hijo).

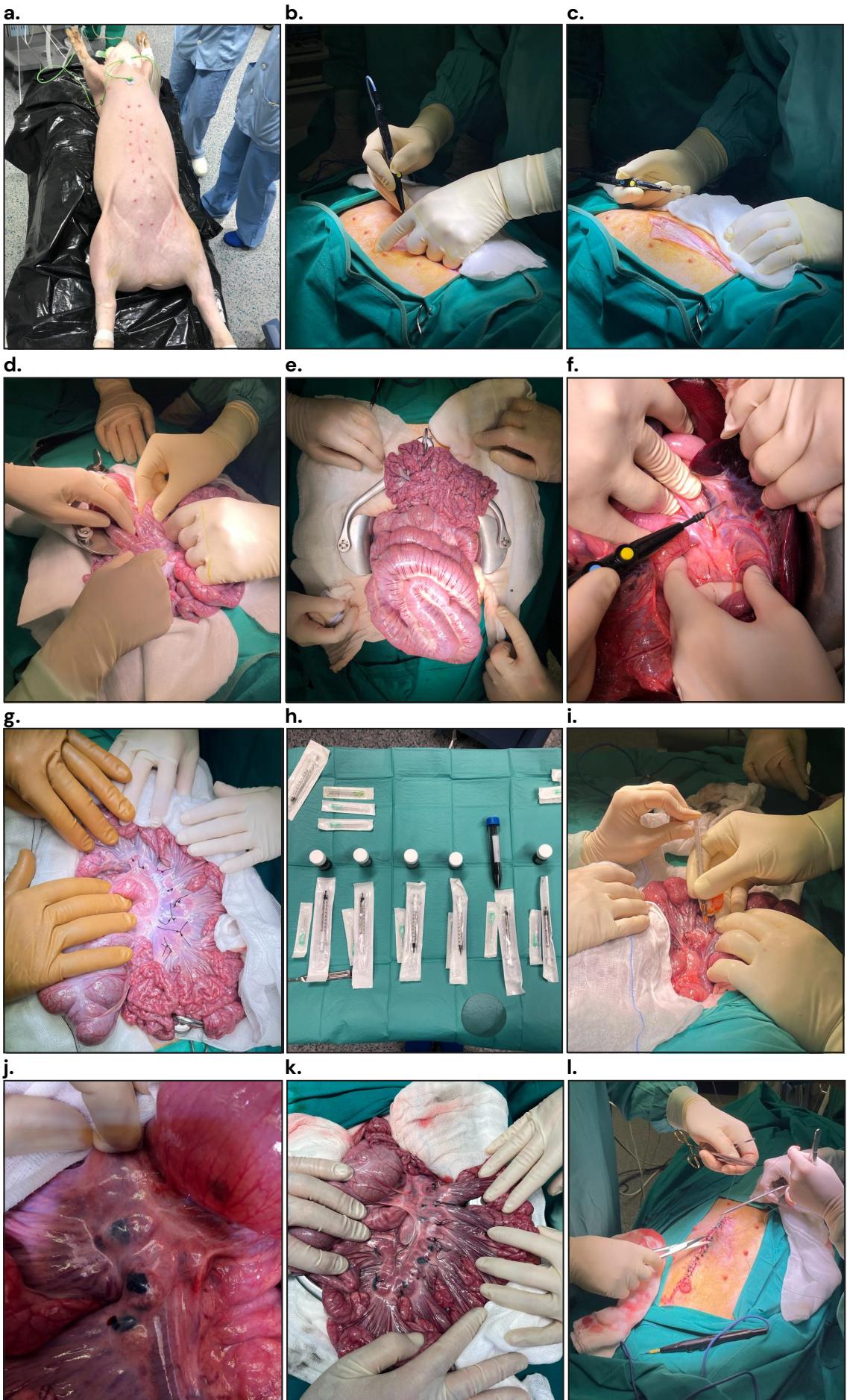
## 4.3. Evaluación de los vectores de marcaje en animal de experimentación

### 4.3.1. Desarrollo de los estudios experimentales *in vivo*

Una vez descrito el modelo de investigación utilizado en esta Tesis, en este apartado se describen los resultados obtenidos de las experiencias *in vivo*.

#### 4.3.1.1. Procedimiento quirúrgico para la administración de los vectores

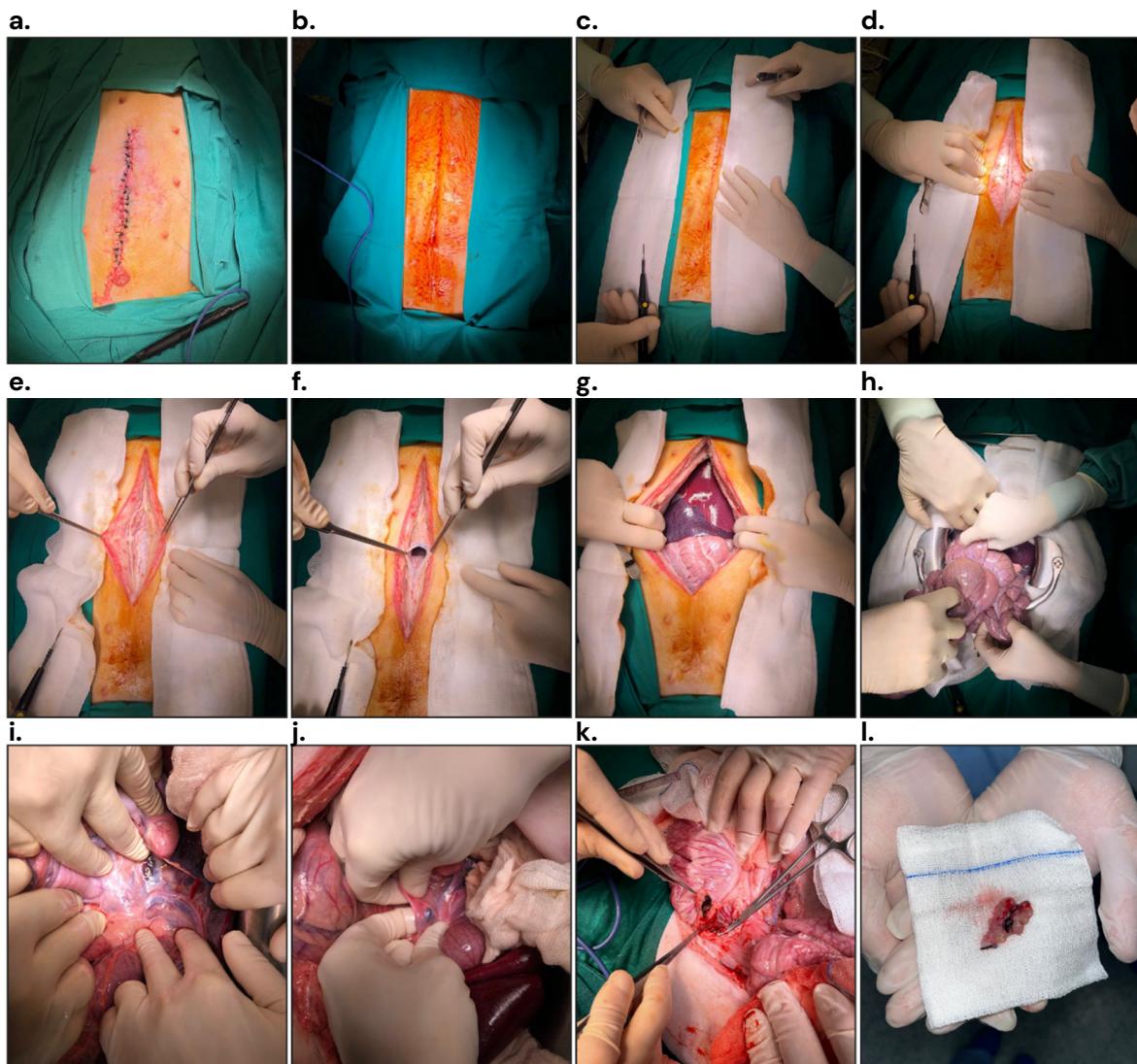
Los animales fueron colocados en posición decúbito supino (**Figura 4.58 a**). Se practicó una laparotomía media amplia (**Figuras 4.58 b-c**) para exponer las vísceras abdominales se aislaron los ganglios mesentéricos de interés (**Figuras 4.58 d-f**). Una vez expuestos, los ganglios fueron etiquetados para su identificación posterior utilizando diferentes patrones de puntos de seda (**Figura 4.58 g**). Los vectores fueron cargados en dosis de 0.2 ml en jeringas de 1 ml y se colocaron agujas 21G (**Figura 4.58 h**). Se realizó punción directa en los ganglios de la raíz de la arteria esplénica, de la raíz de la vena porta y de los ganglios del ileón distal (**Figura 4.58 i**). Una vez se administraron los marcas en los ganglios establecidos (**Figuras 4.58j-k**), se cerró la pared abdominal del animal (**Figura 4.58 l**) y se procedió a su estabulación durante el periodo predefinido (de 1 a 16 semanas).



**Figura 4.58.** Procedimiento quirúrgico paso a paso para la administración de los vectores de marcaje en los animales de experimentación.

#### 4.3.1.2. Procedimiento quirúrgico para la disección ganglionar

Para las cirugías de disección ganglionar de nuevo se practicó una laparotomía media amplia (**Figuras 4.59 a-f**) para exponer el íleon distal (**Figuras 4.59 g-h**). Los ganglios marcados fueron identificados macroscópicamente al mostrar una pigmentación oscura característica del vector administrado (**Figuras 4.59 i-j**). Los ganglios marcados fueron resecados junto a los puntos de identificación (**Figuras 4.59 k**) y separados para su posterior procesamiento (**Figuras 4.59 l**).

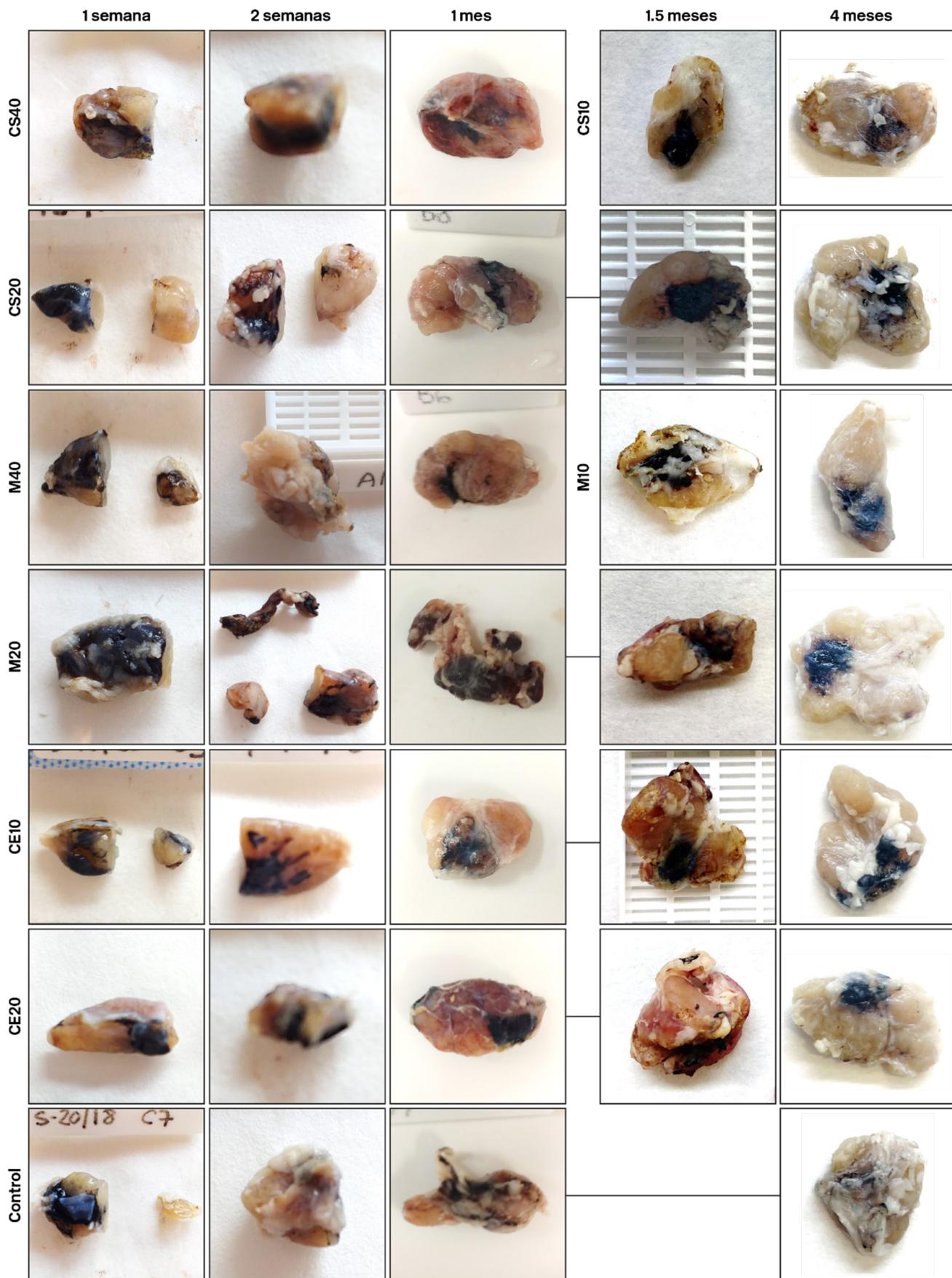


**Figura 4.59.** Procedimiento quirúrgico paso a paso para la disección ganglionar en los animales de experimentación.

#### 4.3.2. Relación de vectores y ganglios linfáticos administrados

En total, se marcaron 112 ganglios linfáticos en los animales de experimentación. En los cerdos A, B y C se marcaron  $n=7$  ganglios, en el cerdo D se marcaron  $n=15$  ganglios, en los cerdos F y G se marcaron  $n=17$  ganglios y  $n=14$  ganglios en los cerdos H, I y J (**Tabla 4.7, Figuras 4.60 y 4.61**).

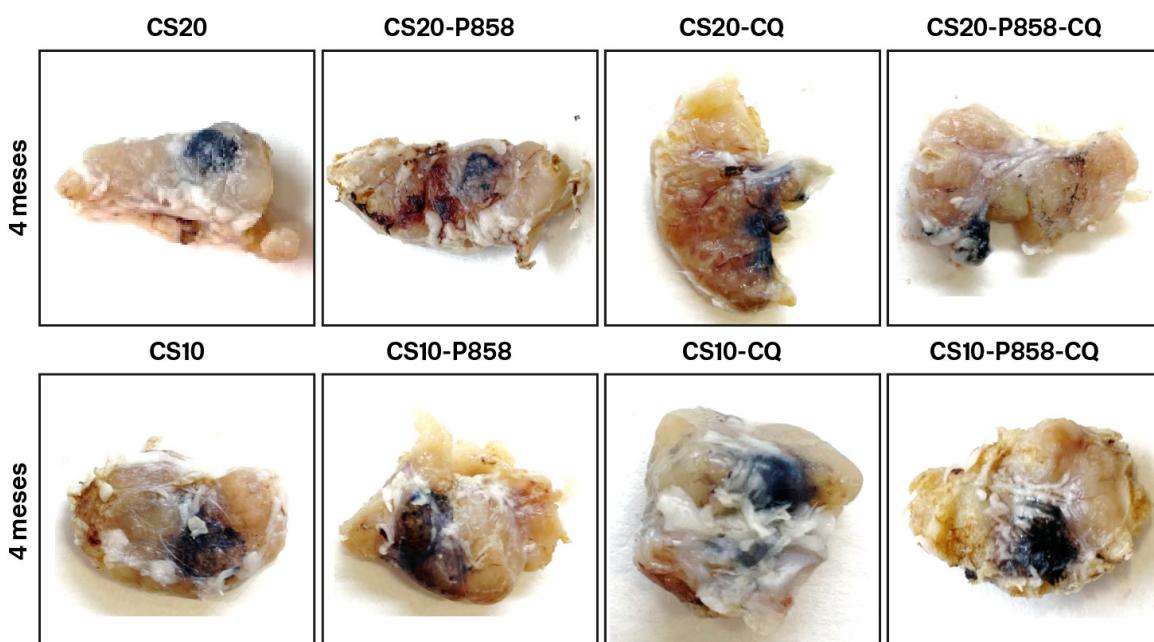
Una muestra de  $n=23$  ganglios fueron marcados con CS20 ( $n=10$  en estudios a corto plazo y  $n=13$  en estudios a largo plazo),  $n=16$  con CE20 ( $n=10$  en estudios a corto plazo y  $n=6$  en estudios a largo plazo),  $n=16$  con M20 ( $n=10$  en estudios a corto plazo y  $n=6$  en estudios a largo plazo) y  $n=6$  con marcaje de control (C-NPs,  $n=4$  en estudios a corto plazo y  $n=2$  en estudios a largo plazo). En los estudios a largo plazo, se marcaron  $n=9$  ganglios con CE10 en los estudios a largo plazo,  $n=5$  ganglios con CS10 en los estudios a largo plazo y  $n=9$  con M10,  $n=4$  con CS20-CQ,  $n=4$  con CS10-CQ,  $n=6$  con CS20-P858,  $n=4$  con CS10-P858,  $n=4$  con CS20-P858-CQ y  $n=4$  con C10-P858-CQ.



**Figura 4.60.** Fotografías de ganglios linfáticos marcados con vectores CS10, CS20, M10, M20, CE10, CE20 y control (C-NPs).

**Tabla 4.7.** Número de ganglios marcados por vector de marcaje en los animales de experimentación.

	Grupo a corto plazo					Grupo a largo plazo				
	A	B	C	D	F	G	H	I	J	
CS20	2	2	2	4	3	3	3	2	2	
CE20	2	2	2	4	x	x	2	2	2	
M20	2	2	2	4	x	x	2	2	2	
CE10	x	x	x	x	x	x	3	3	3	
CS10	x	x	x	x	1	1	1	1	1	
M10	x	x	x	x	x	x	3	3	3	
CS20-CQ	x	x	x	x	2	2	x	x	x	
CS10-CQ	x	x	x	x	2	2	x	x	x	
CS20-P858	x	x	x	x	3	3	x	x	x	
CS10-P858	x	x	x	x	2	2	x	x	x	
CS20-P858-CQ	x	x	x	x	2	2	x	x	x	
CS10-P858-CQ	x	x	x	x	2	2	x	x	x	
Control (C-NPs)	1	1	1	1	x	x	x	1	1	



**Figura 4.61.** Fotografías de ganglios linfáticos marcados con vectores CS10, CS20, CS20-P858, CS10-P858, CS10-CQ, CS20-CQ, CS10-P858-CQ y CS20-P858-CQ.

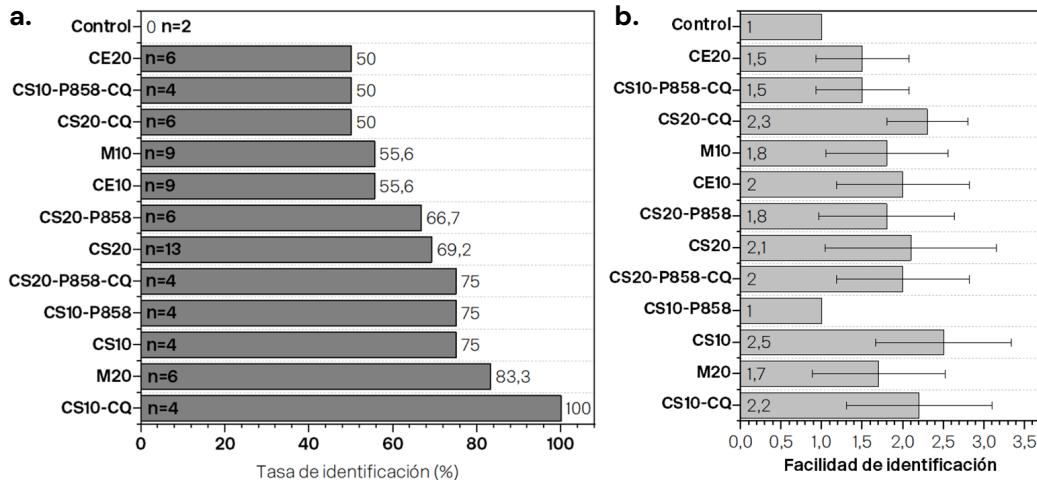
### 4.3.3. Tasa de identificación y facilidad de identificación intraoperatoria

#### 4.3.3.1. Efecto del tipo del marcaje en la facilidad de identificación

En ningún caso observamos migración del tatuaje a otros ganglios linfáticos, por lo que la correlación entre GLT y GC corresponde al 100 %. No obstante, en los marcados con C-NPs, en ocasiones no se encontró tatuado ni el ganglio inicial ni otros ganglios cercanos, lo que sugiere que existe migración hacia tejido adyacente pero no a través de la vía linfática.

La tasa de identificación fue determinada a largo plazo (16 semanas), dado que es el tiempo establecido como objetivo. Como se ilustra en la **Figura 4.62 a**, todos los ganglios marcados con CS10-CQ (100 %) fueron detectados, seguido del marcaje M20 (83.3 %) y CS10, CS10-P858 y CS20-P858-CQ (75 %). Se identificaron adecuadamente el 69.2 % de los ganglios marcados con CS20 y el 66.7 % de

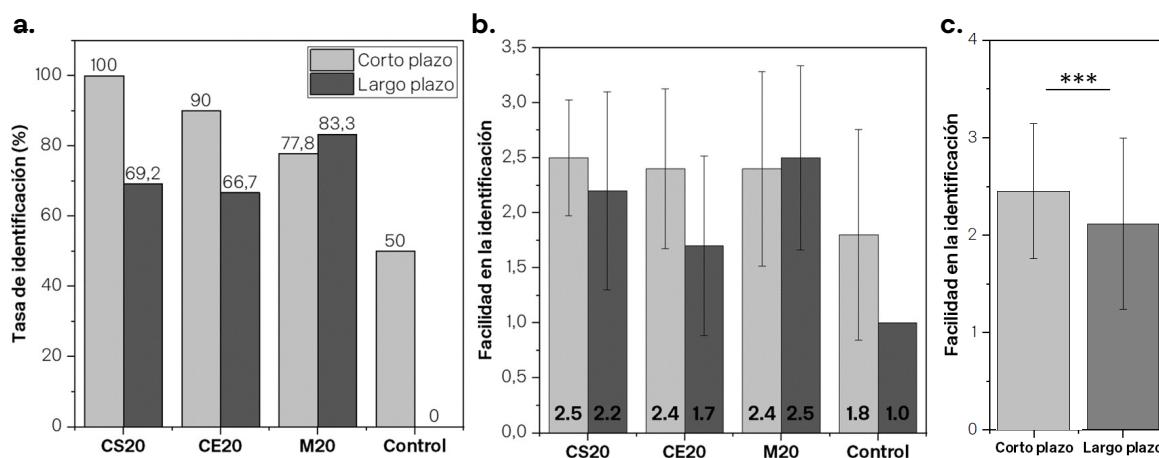
los marcados con CS20-P858. Los vectores M10 y CE10 mostraron tasas de identificación del 55.6 %, mientras que solo se detectó el 50 % de los ganglios tatuados con los vectores CS20-CQ, CS10-P858-CQ y CE20. Ningún ganglio marcado con las C-NPs de control fue identificado (0 %) tras este tiempo. Sin embargo, como se muestra en la **Figura 4.62 b**, los ganglios marcados con CS10, CS10-CQ, CS20-CQ y CS20 mostraron la mayor facilidad en la identificación. Por otro lado, los ganglios tatuados con M10, CS20-P858-CQ y M20 mostraron identificaciones moderadas. El resto de los vectores fueron identificados con menor precisión. Dado que la puntuación promedio de facilidad de identificación no se correlaciona con la tasa de identificación, los resultados en la identificación parecen estar sujetos al procedimiento o técnica del marcaje, pudiendo no ser precisa en todas las inoculaciones. Para estudiar la variable "facilidad de identificación" dentro de los grupos definidos por el tipo de marcaje (CS, CE y M) se realizó la prueba de Kruskal-Wallis y no se encontraron diferencias significativas.



**Figura 4.62.** Tasas de identificación (a) y facilidad de identificación (b) de los ganglios en función del tipo de marcaje administrado. C-NPs (control),

### 4.3.3.2. Efecto del tiempo en la facilidad de identificación

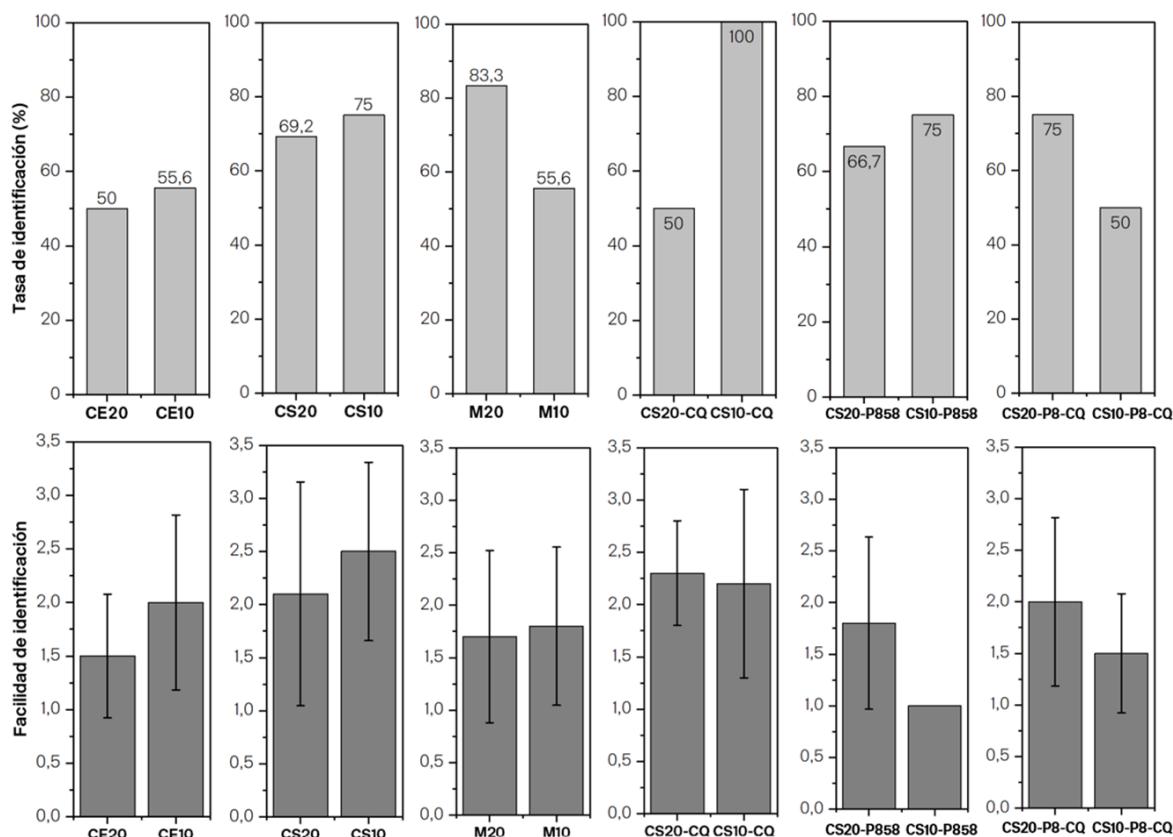
En general, la tasa en la identificación se redujo conforme mayor fue el tiempo de estabulación (**Figura 4.63 a**). En los ganglios marcados con CS20 y CE20 se redujo la tasa de identificación un 30.8 y 23.3 %, respectivamente. En el tatuaje de control la reducción fue del 50 %, hasta alcanzar una tasa del 0 %. Sin embargo, los vectores tatuados con M20 mantuvieron tasas de identificación similares en los estudios a corto y largo plazo. Así mismo, los ganglios marcados con CS20 y CE20 mostraron menor facilidad de identificación a largo plazo, siendo más evidente en el caso del vector CE20 (**Figura 4.63 b**). Se utilizó la prueba de la U de Mann-Whitman para estudiar la diferencia en los grupos a largo y corto plazo (utilizando únicamente los marcajes con datos a corto y largo plazo, es decir, CS, CE y M). Se encontró que la facilidad de identificación se reduce con el tiempo ( $p<0.001$ ) (**Figura 4.63 c**).



**Figura 4.63.** Tasas de identificación (a) y facilidad de identificación (b) de los ganglios marcados con CS20, CE20, M20 y C-NPs (control) en función del tiempo.

#### 4.3.3.3. Efecto de la concentración en la facilidad de identificación

El estudio estadístico realizando la prueba de la U de Mann-Whitman no mostró diferencias significativas en la facilidad de identificación entre los grupos de marcaje (10 mg/ml y 20 mg/ml) considerando únicamente los estudios a largo plazo, dado que a corto plazo no se marcaron los ganglios a concentración 10 mg/ml (**Figura 4.64**).



**Figura 4.64.** Tasas de identificación y facilidad de identificación de los ganglios marcados en función de la concentración de partículas del vector de marcaje.

#### 4.3.3.4. Efecto del tamaño de partícula en la facilidad de identificación

Para valorar el efecto del tamaño partícula se agruparon los marcajes CS10-CS20 (tamaño ~100 nm) y CE10-CE20 (~1 µm). Aunque los resultados fueron similares, la tasa de identificación (**Figura 4.65 a)** y la facilidad de identificación (**Figura 4.65 b)** fueron ligeramente superiores en el caso de las NPs de menor tamaño (CS). Para analizar estadísticamente si la facilidad de identificación varía entre ambos grupos (CS y CE) se utilizó la prueba de la U de Mann-Whitman y no se encontraron diferencias significativas.

#### 4.3.3.5. Efecto del cambio de polímero en la facilidad de identificación

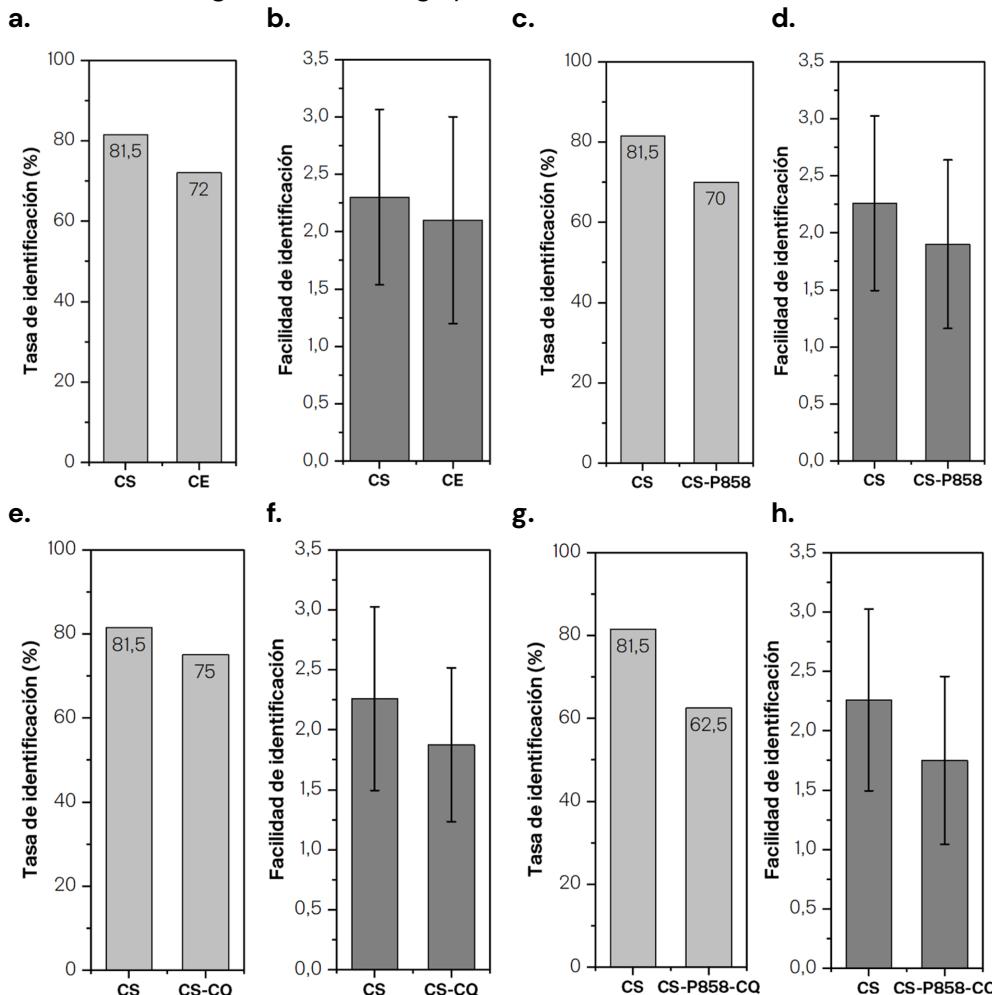
Para valorar el efecto del polímero base de la síntesis (PLGA RG504H o PLGA RG858S), se tomaron los grupos de ganglios marcados con CS10/CS20 y CS10-P858/CS20-P858. Se encontró, preliminarmente, una mayor tasa y facilidad de identificación en los vectores basados en el polímero PLGA RG504H (**Figura 4.65 c-d)**. El tipo de polímero (de PLGA RG504H a PLGA RG858S) se estudió utilizando dos grupos diferenciados: CS y CS-P858. El análisis por la U de Mann-Whitman no concluyó diferencias significativas.

#### 4.3.3.6. Efecto de la coencapsulación de CQ en la facilidad de identificación

El efecto de la incorporación de CQ en las NPs se valoró a través de la comparación de los grupos de ganglios marcados con CS10/CS20 y CS10-CQ/CS20-CQ. Preliminarmente, los resultados en la tasa de identificación y en la facilidad de identificación fueron similares y ligeramente superiores en el grupo de ganglios sin CQ, por lo que la CQ no mostró un efecto beneficioso en los estudios experimentales a largo plazo (**Figura 4.65 e-f)**. Los estudios estadísticos (U de Mann-Whitman) en los grupos con y sin CQ (CS y CS-CQ) no mostraron diferencias significativas.

#### 4.3.3.7. Efecto del cambio de polímero adición de CQ en la facilidad de identificación

Para explorar el efecto del polímero (PLGA RG504H o PLGA RG858S) y la incorporación de CQ en las NPs, se tomaron los grupos de ganglios marcados con CS10/CS20 y CS10-P858-CQ/CS20-P858-CQ. Se observaron menores tasas y facilidad de identificación en los ganglios marcados con el segundo grupo de vectores, por lo que la CQ y el polímero no mostraron mejor rendimiento en estos parámetros (**Figura 4.65 g-h**). Estadísticamente, la comparación entre el grupo CS y CS-P858-CQ no muestra diferencias significativas entre grupos utilizando la U de Mann-Whitman.



**Figura 4.65.** Tasas de identificación y facilidad de identificación de los ganglios marcados en función (a-b) del tamaño de las partículas del vector de marcaje, (c-d) del polímero utilizado en la síntesis, (e-f) de la coencapsulación de CQ y (g-h) del polímero utilizado en la síntesis y la coencapsulación de CQ.

#### 4.3.3.8. Correlación de la facilidad de identificación con otras variables

Como se observa en la **Tabla 4.8**, la facilidad de identificación correlacionó positivamente con el área marcada y la inflamación, e inversamente con el tamaño de los cúmulos. Es decir, la identificación fue mayor conforme aumentó el área marcada y la inflamación, aunque la correlación es moderada. La correlación entre la facilidad de identificación y el tamaño de los cúmulos es leve.

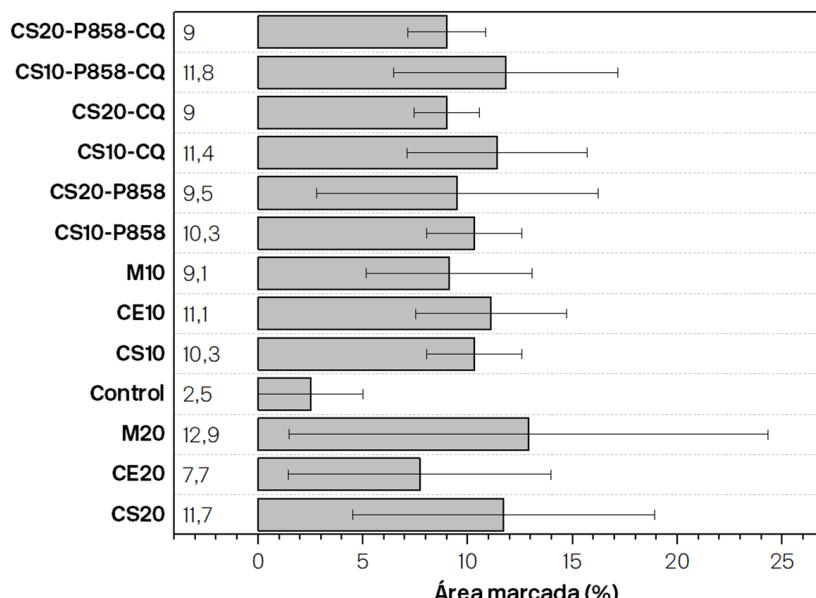
**Tabla 4.8.** Correlaciones entre la facilidad de identificación y el resto de las variables utilizando la Tau de Kendall ( $p<0.1$ (\*),  $p<0.05$ (\*\*)) y  $p<0.01$ (\*\*\*)).

		Área	Localización	Inflamación	Tamaño cúmulos
Facilidad identif.	Coeficiente de correlación	0,344***	0,065	0,435***	-0,175**
	Significación	0,000	0,498	0,000	0,044
	n	83	80	72	82

## 4.3.4. Determinación del área marcada

### 4.3.4.1. Efecto del tipo del marcaje en el área ganglionar marcada

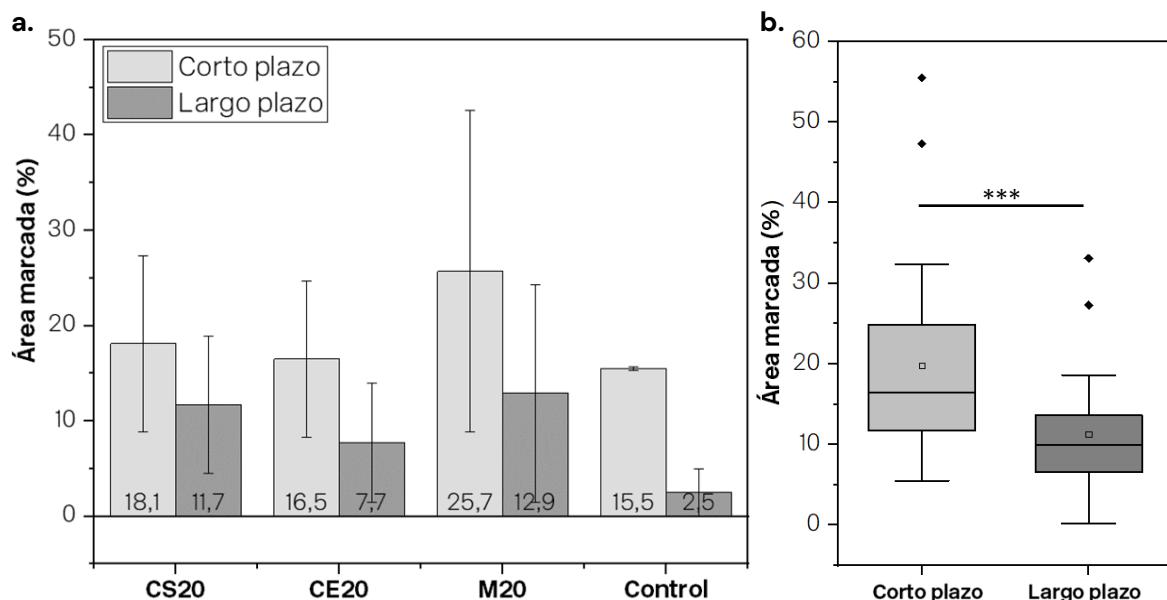
El área marcada en el estudio a largo plazo fue similar en todos los marcajes (**Figura 4.66**). Los vectores que mayor extensión ganglionar tatuaron fueron M20, CS10-P858-CQ y CS20. Sin embargo, el marcaje de control de C-NPs únicamente marcó el 2.5 % de la superficie del ganglio, seguido de CE20, CS20-P858-CQ y CS20-CQ. El efecto del tipo de marcaje fue estudiado estadísticamente utilizando tres grupos de muestras independientes (CS, CE y M) por Kruskal-Wallis, no encontrando diferencias significativas en el área marcada.



**Figura 4.66.** Área marcada promedio en los ganglios linfáticos en función del tipo de marcaje administrado. El “control” se refiere al marcaje con C-NPs.

### 4.3.4.2. Efecto del tiempo en el área ganglionar marcada

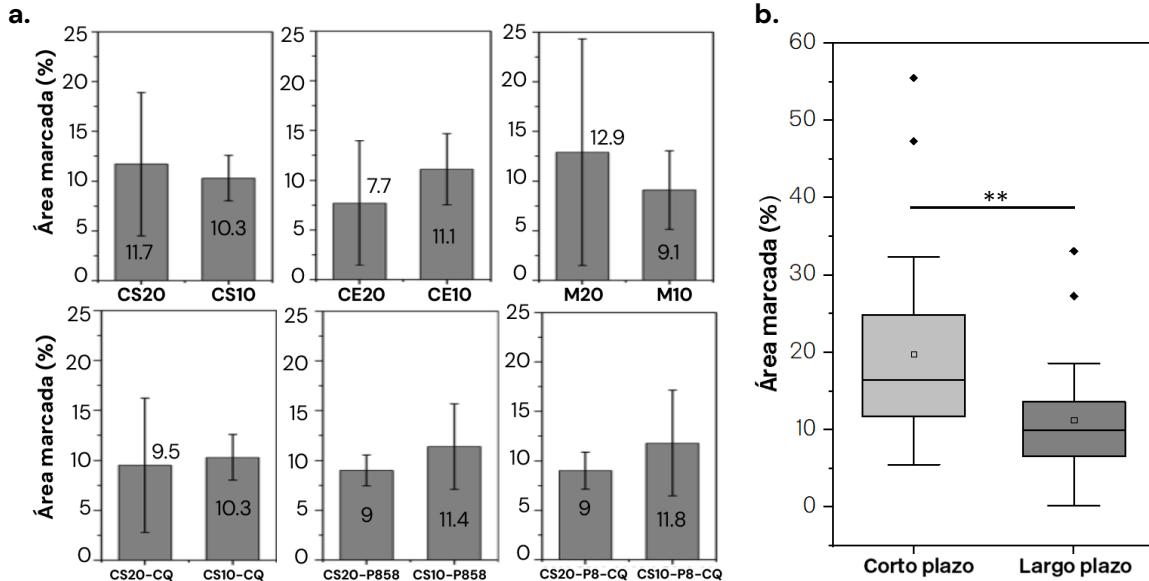
Como se representa en la **Figura 4.67 a**, el área marcada se reduce en los estudios a largo plazo respecto a los de corto plazo. En el estudio estadístico por la U de Mann-Whitman realizado con los marcajes CS, CE y M (por tener muestras en ambos plazos temporales) se encontró que el área marcada se redujo con el tiempo de manera significativa ( $p<0,001$ ) (**Figura 4.67 b**). Únicamente se realiza el estudio estadístico con los marcajes agrupados (y no por separado) dado el reducido tamaño muestral en este último caso.



**Figura 4.67.** Área marcada promedio en los ganglios linfáticos en función del tiempo. El “control” se refiere al marcaje con C-NPs.

#### 4.3.4.3. Efecto de la concentración en el área ganglionar marcada

Como se ilustra en la **Figura 4.68 a**, la concentración de partículas en el marcate no muestra un efecto claro en la extensión ganglionar marcada. En los vectores CS y M, la concentración a 20 mg/ml mostró mayor área tatuada, mientras que en el resto de los casos mostró mayor rendimiento en el marcate la concentración a 10 mg/ml. En el estudio estadístico (utilizando la U de Mann-Whitman) se encontraron diferencias significativas en las distribuciones de los grupos de 20 y 10 mg/ml. El aumento de la concentración incrementó el área marcada ( $p=0.019$ ) (**Figura 4.68 b**).



**Figura 4.68.** Área marcada promedio en los ganglios linfáticos en función del tiempo. El “control” se refiere al marcate con C-NPs.

#### 4.3.4.4. Efecto del tamaño de partícula en el área ganglionar marcada

Para valorar el efecto del tamaño de partícula se compararon los resultados de los ganglios tatuados con CS y CE. Como se representa en la **Figura 4.69 a**, el tamaño de las partículas no pareció influir en el área marcada en el ganglio. Estadísticamente, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

#### 4.3.4.5. Efecto del cambio de polímero en el área ganglionar marcada

Se observó cierto efecto en el cambio de polímero (PLGA RG504H/PLGA RG858S), mostrando mayor área marcada en el caso del polímero PLGA RG504H (**Figura 4.69 b**). Sin embargo, el análisis por la U de Mann-Whitman no reportó diferencias significativas en las distribuciones de la variable del área marcada para ambos grupos (CS y CS-P858).

#### 4.3.4.6. Efecto de la coencapsulación de CQ en el área ganglionar marcada

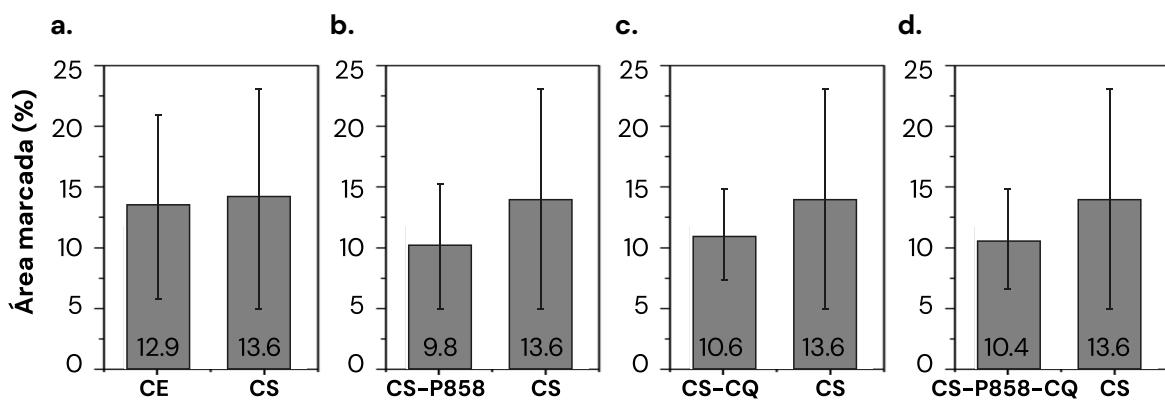
Se identificaron ligeras diferencias en los grupos de ganglios marcados con CS10/CS20 y CS10-CQ/CS20-CQ. Se observó mayor área ganglionar marcada con los marcas CS (**Figura 4.69 c**). Sin embargo, los estudios estadísticos no concluyeron diferencias significativas.

#### 4.3.4.7. Efecto del cambio de polímero adición de CQ en el área ganglionar marcada

Como se muestra en la **Figura 4.69 d**, las NPs sin CQ y con el polímero original (PLGA RG504H) mostraron preliminarmente mayores áreas de marcate en el ganglio linfático. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas en los estudios estadísticos.

#### 4.3.4.8. Correlación del área marcada con otras variables

El área marcada correlacionó positivamente con la facilidad de identificación y con la extensión de la inflamación (**Tabla 4.9**). Es decir, conforme mayor fue el área marcada, mayor fue la facilidad en la identificación y la respuesta inflamatoria. No obstante, en el caso de la extensión de la inflamación la correlación es leve, y moderada en el caso de la facilidad en la identificación.



**Figura 4.69.** Área marcada promedio en los ganglios linfáticos en función (a) del tamaño de las partículas, (b) del polímero utilizado en la síntesis, (c) de la coencapsulación de CQ y (d) de la coencapsulación de CQ y el cambio de polímero.

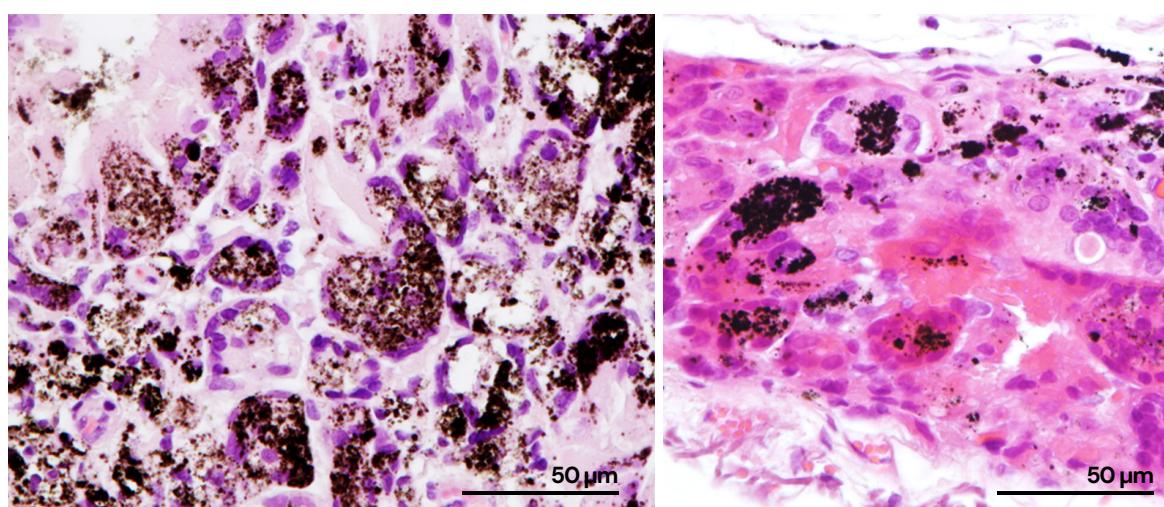
**Tabla 4.8.** Correlaciones entre el área marcada y el resto de las variables utilizando la Tau de Kendall ( $p<0.1$  (\*),  $p<0.05$  (\*\*)) y  $p<0.01$  (\*\*\*)).

		Localización	Inflamación	Identific.	Tamaño cúmulos
Área marcada	Coeficiente de correlación	-0,008	0,166**	0,344***	-0,077
	Significación	0,926	0,043	0,000	0,315
	n	78	70	83	80

## 4.4. Valoración histopatológica

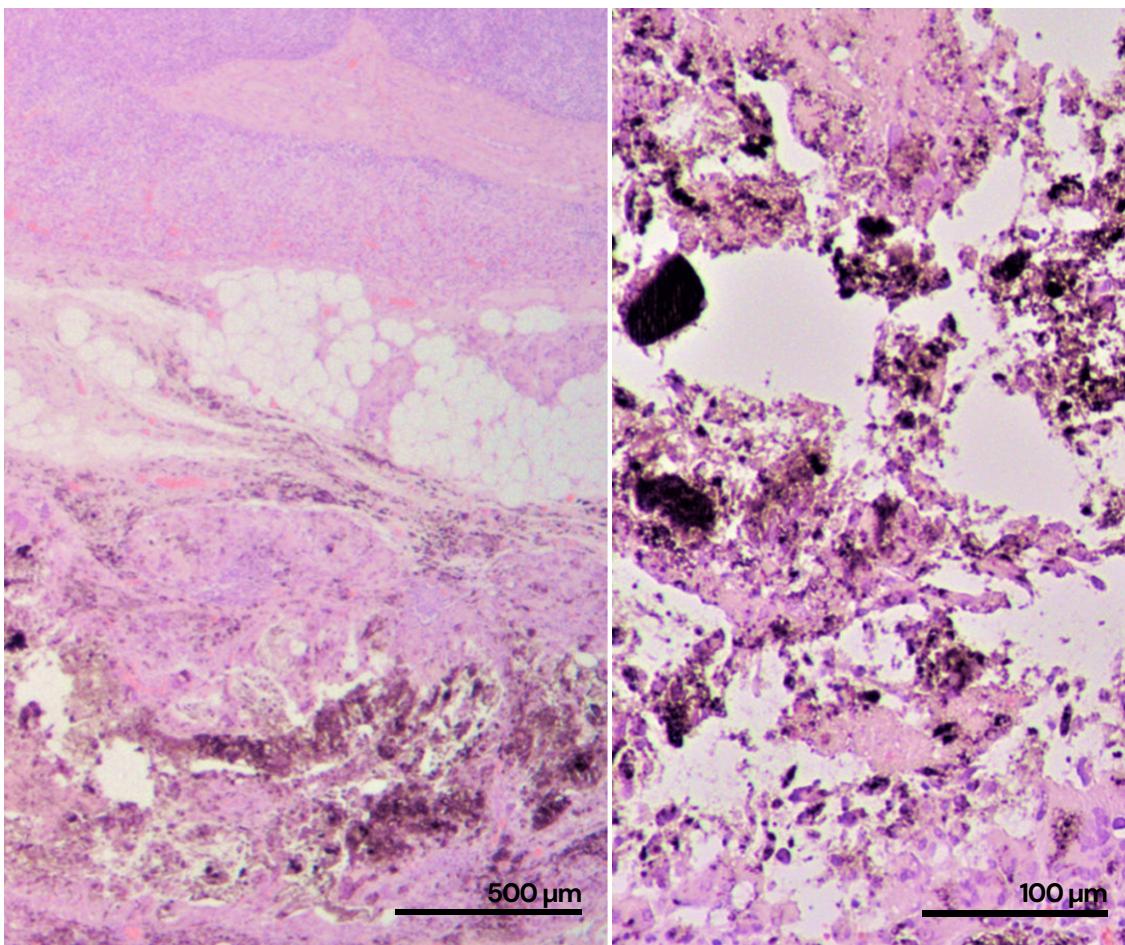
### 4.4.1. Hallazgos histopatológicos

En todas las muestras de los estudios experimentales a corto plazo se identificó una inflamación granulomatosa de tipo reacción a cuerpo extraño asociada a la presencia de las partículas. El proceso inflamatorio se caracterizó por la presencia de macrófagos y células gigantes multinucleadas (CGM) que fagocitaron y aislaron las partículas administradas desde la primera semana tras la inoculación. También se encontraron partículas extracelulares (Figura 4.70).



**Figura 4.70.** Células gigantes multinucleadas (CGM) en el del ganglio linfático aislando NPs del vector CS20.

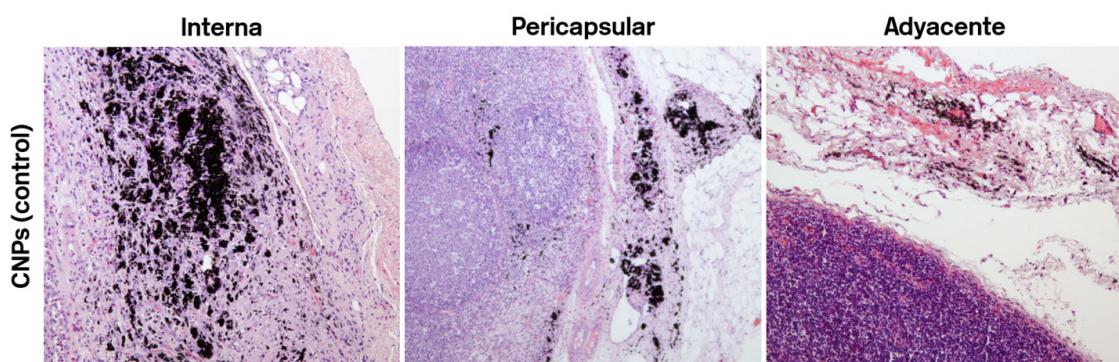
En algunos ganglios se observaron focos necróticos (Figura 4.71) asociados a la reacción inflamatoria de tipo cuerpo extraño por la administración de las partículas.



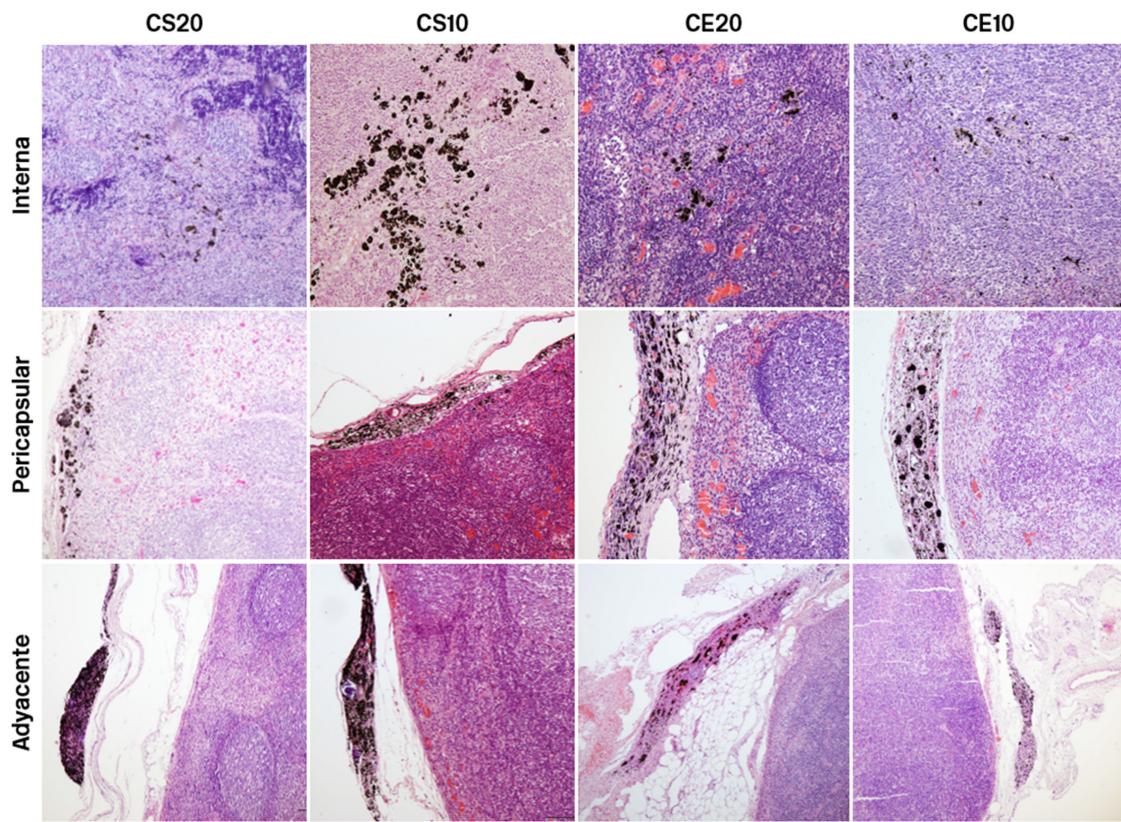
**Figura 4.71.** Focos necróticos asociados a la reacción inflamatoria de tipo cuerpo extraño en el ganglio en ganglios tatuados con el vector M20.

#### 4.4.2. Localización de las partículas

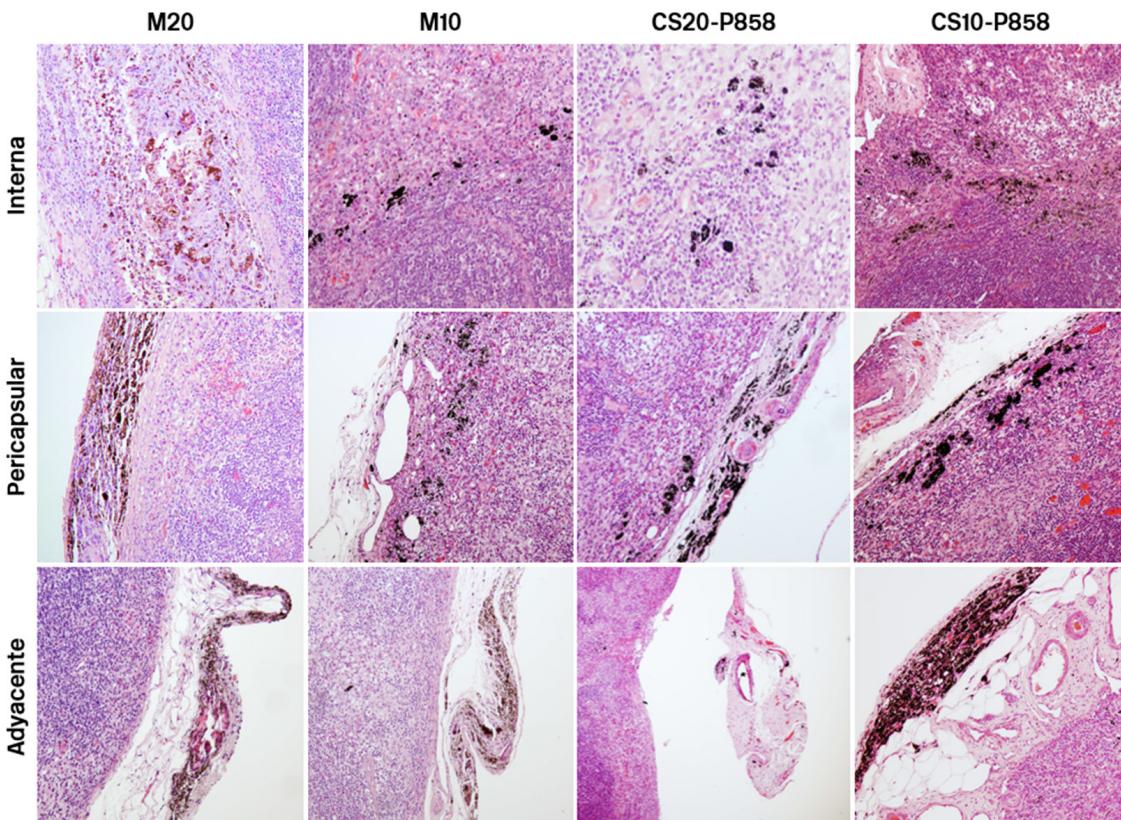
La evaluación histopatológica de los ganglios linfáticos marcados reveló que las partículas se localizan principalmente en la región interna del ganglio, en la zona pericapsular o en el tejido adyacente al ganglio, aunque en ocasiones se encontraron mixtas (**Figuras 4.72-75**).



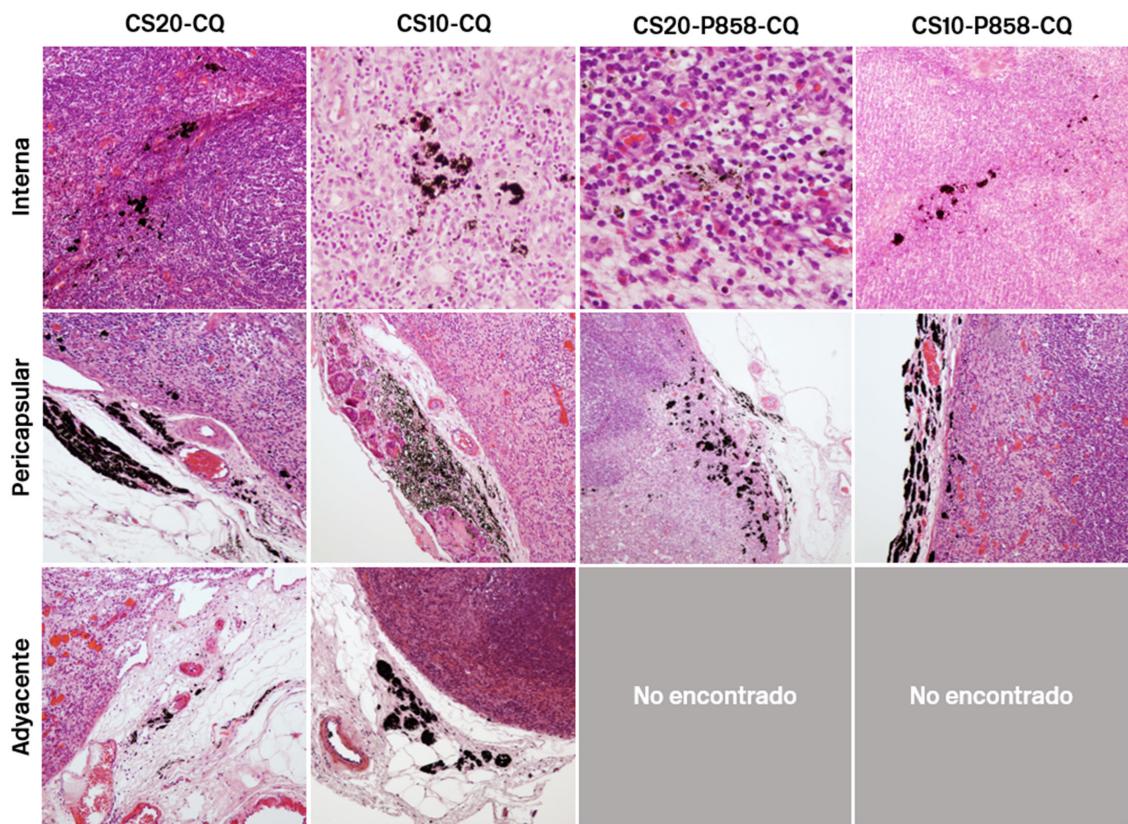
**Figura 4.72.** Localizaciones de las C-NPs en los vectores de control. En el marcaje de control la localización de las partículas fue mixta: en caso de la interna, la distribución es pericapsular e interna, mientras que en el caso de la pericapsular también se localiza en la región interna como en la adyacente.



**Figura 4.73.** Localizaciones de las partículas de los vectores CS20, CS10, CE20 y CE10 (en ocasiones mixtas).



**Figura 4.74.** Localizaciones de las partículas de los vectores M20, M10, CS20-P858 y CS10-P858 (en ocasiones mixtas).



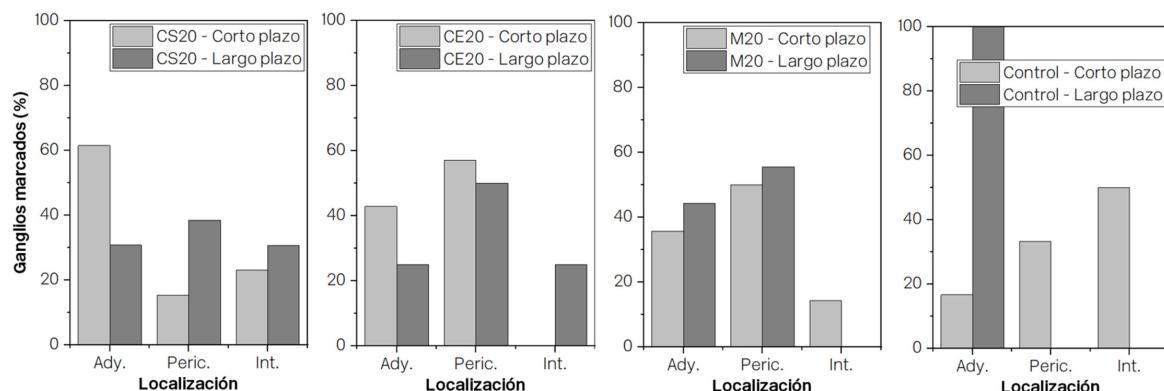
**Figura 4.75.** Localizaciones de las partículas de los vectores CS20-CQ, CS10-CQ, CS20-P858-CQ y CS10-P858-CQ (en ocasiones mixtas).

#### 4.4.2.1. Efecto del tipo del marcaje en la localización de las partículas

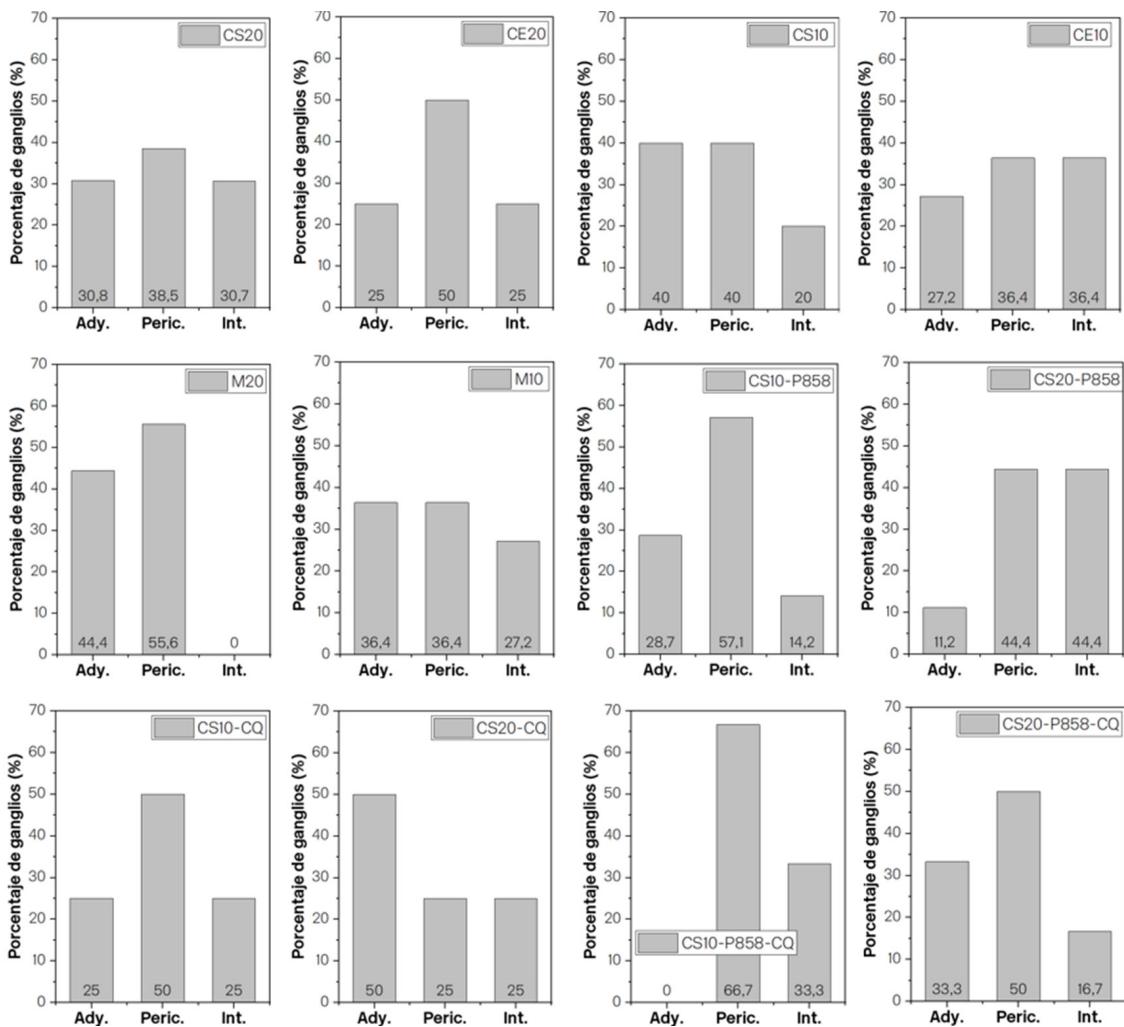
Como se representa en la **Figura 4.76**, en los estudios a largo plazo (16 semanas) predomina una presencia de partículas en la región pericapsular. Sin embargo, no se observa una tendencia clara. En todos los marcajes se encontraron las tres localizaciones de partículas, a excepción de los vectores CS-P858-CQ, que no estuvieron presentes en el tejido adyacente al ganglio linfático.

#### 4.4.2.2. Efecto del tiempo en la localización de las partículas

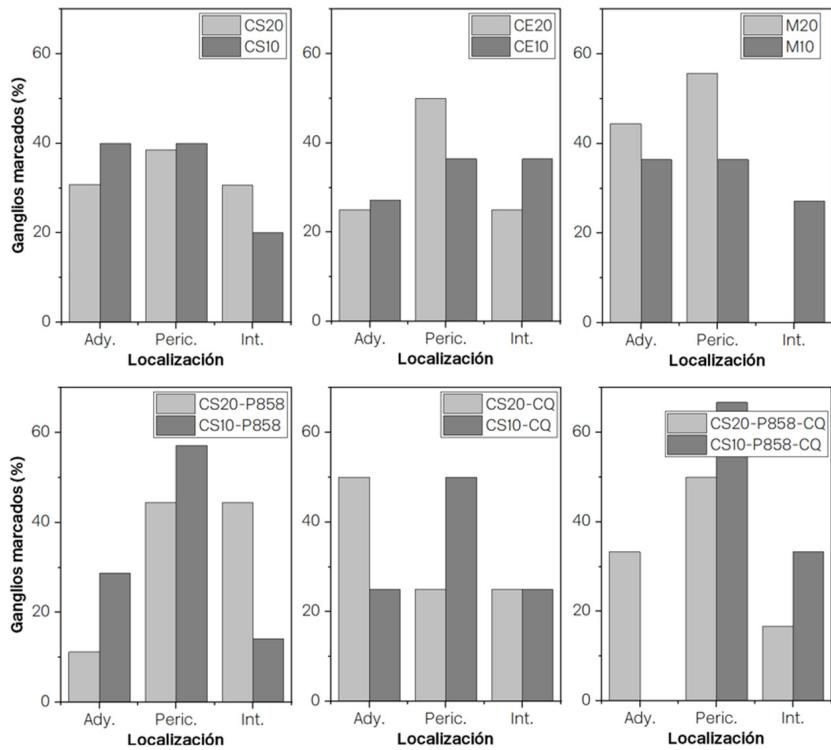
No se encontró una relación entre la localización de las partículas en el ganglio en función del tiempo tras la inoculación de los vectores (**Figura 4.77**). No obstante, en los estudios a corto plazo predomina la localización en tejido adyacente y región pericapsular, mientras que en los estudios a largo plazo es más frecuente la región pericapsular.



**Figura 4.77.** Localización de las partículas en los ganglios linfáticos en función del tiempo.



**Figura 4.76.** Porcentaje de ganglios linfáticos con diferentes localizaciones de las partículas en los vectores utilizados.



**Figura 4.78.** Localización de las partículas en los ganglios linfáticos en función de la concentración de partículas.

#### 4.4.2.3. Efecto de la concentración en la localización de las partículas

En general, de nuevo predominó la localización pericapsular de las partículas en ambas concentraciones ([Figura 4.78](#)). Sin embargo, no se encontró relación entre la concentración del vector y las localizaciones ganglionares predominantes de las partículas.

#### 4.4.2.4. Efecto del tamaño de partícula en la localización de las partículas

La localización ganglionar de las partículas de ~100 nm (CS) y de ~1  $\mu\text{m}$  (CE) fue similar ([Figura 4.79 a](#)). Por tanto, se descartó la relación entre el tamaño de partículas y su localización en los rangos de tamaño estudiados.

#### 4.4.2.5. Efecto del cambio de polímero en la localización de las partículas

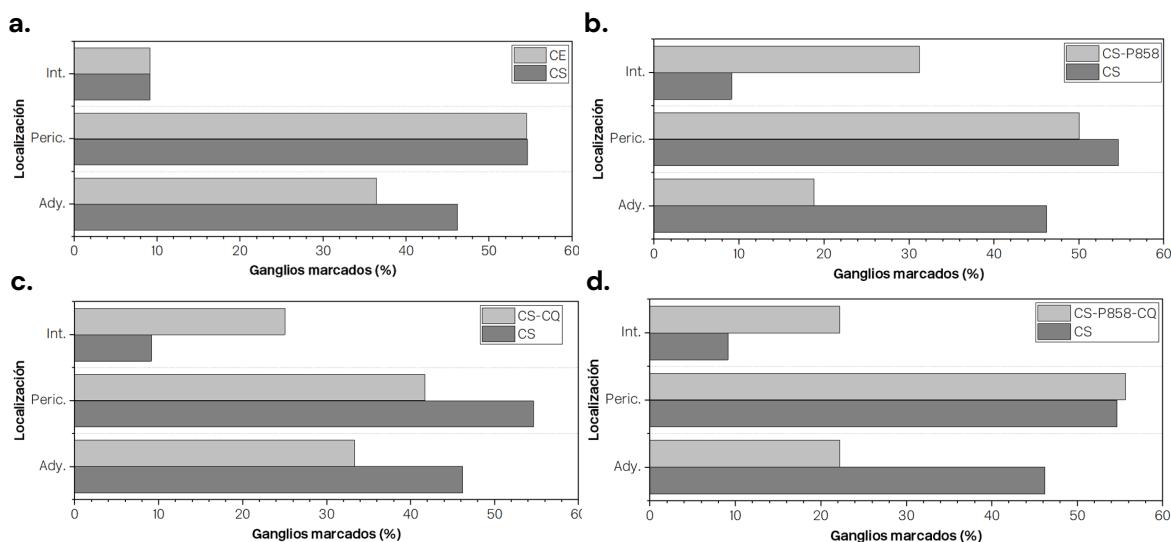
Se observó mayor localización interna en los vectores basados en PLGA RG858S, mientras que las partículas de PLGA RG504H se encontraron con mayor frecuencia en la región del tejido adyacente. En ambos vectores, las NPs permanecieron predominantemente en la región pericapsular ([Figura 4.79 b](#)).

#### 4.4.2.6. Efecto de la coencapsulación de CQ en la localización de las partículas

La incorporación de CQ no pareció mostrar efectos significativos en la localización de las partículas, aunque se observó mayor presencia en la región interna ([Figura 4.79 c](#)).

#### 4.4.2.7. Efecto del cambio de polímero y de la coencapsulación de CQ en la localización de las partículas

En línea con lo anterior, la incorporación de CQ en partículas basadas en PLGA RG858S aumentó la presencia de las partículas en la región interna y redujo la componente en tejido adyacente ([Figura 4.79 d](#)). Sin embargo, la prueba de la U de Mann-Whitman no mostró diferencias significativas.



**Figura 4.79.** Localización de las partículas en los ganglios linfáticos en función en función (a) del tamaño de las partículas, (b) del polímero utilizado en la síntesis, (c) de la coencapsulación de CQ y (d) de la coencapsulación de CQ y el cambio de polímero.

#### 4.4.2.8. Correlación de la localización y el resto de las variables

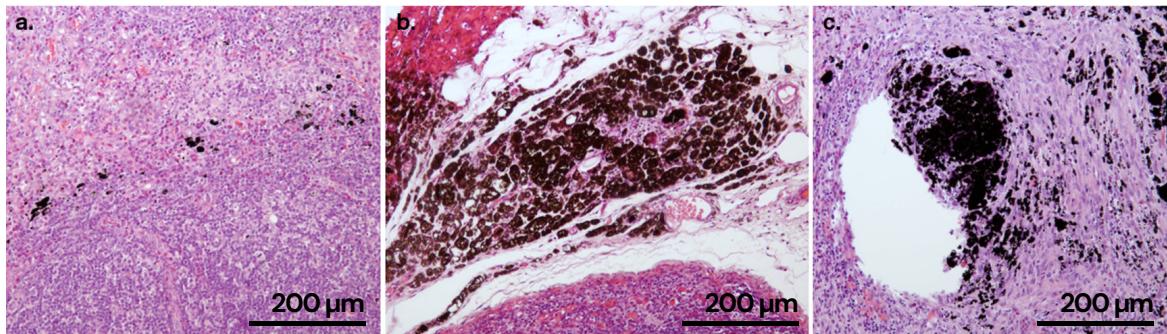
Agrupando los marcas según la localización de las partículas en el tejido ganglionar, se encontró correlación significativa entre la localización de las partículas y el tamaño de los cúmulos ( $p=0.04$ ), siendo esta leve y directa ([Tabla 4.9](#)).

**Tabla 4.9.** Correlaciones entre el área marcada y el resto de las variables utilizando la Tau de Kendall ( $p<0.1$  (\*),  $p<0.05$  (\*\*)) y  $p<0.01$  (\*\*\*)).

		Área	Inflamación	Identificación	Tamaño cúmulos
<b>Localización</b>	Coeficiente de las partíc.	-0,008	0,031	0,065	0,158*
	Significación	0,926	0,728	0,498	0,057
	<i>n</i>	78	70	80	79

### 4.4.3 Morfometría de los cúmulos de partículas

La morfometría de los cúmulos formados por las partículas fue caracterizada según su dimensión máxima para  $n=50$  en cada ganglio linfático (Figura 4.80).

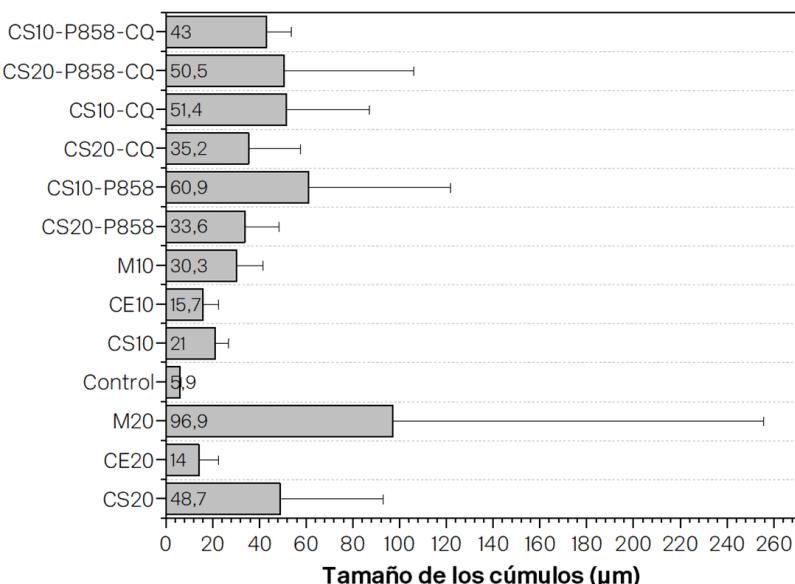


**Figura 4.80.** Morfometría de los cúmulos de partículas. (a) Ejemplo de cúmulos de 1-25  $\mu\text{m}$ , con predominancia de cúmulos de 5-10  $\mu\text{m}$ . (b) Ejemplo de cúmulos de 10-65  $\mu\text{m}$ , con predominancia de cúmulos de 25-30  $\mu\text{m}$ . (c) Ejemplo de cúmulo de >60  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4.3.1. Efecto del tipo del marcaje en el tamaño de los cúmulos

Los cúmulos de Mel-NPs de M20 formaron, con diferencia, los agregados de mayor tamaño. Por el contrario, las C-NPs (control) y las MPs de CE20 y CE10 se organizaron en estructuras de menor tamaño. En el resto de los vectores el tamaño promedio de los cúmulos varió entre 21 y 60.9  $\mu\text{m}$  (Figura 4.81). Para estudiar estadísticamente el efecto del tipo de marcaje se trabajó con tres grupos de muestras independientes (CS, CE y M) utilizando Kruskal-Wallis.

La diferencia en la distribución en la variable de tamaño de los cúmulos mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.039$ ), siendo mayores en el caso de las Mel-NPs. Sin embargo, como se observa en la gráfica los ganglios marcados con M20 mostraron una enorme variabilidad entre muestras.

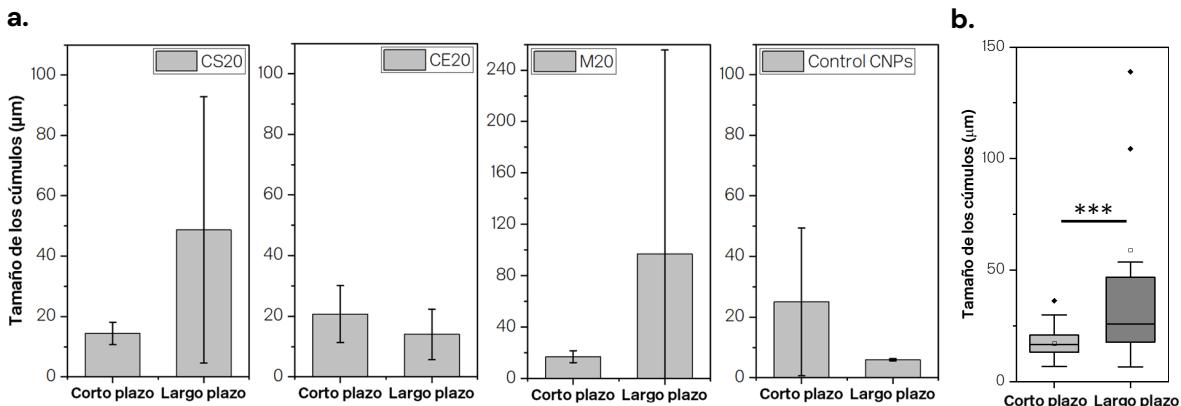


**Figura 4.81.**

Tamaño de los cúmulos de partículas en los ganglios en función del tipo de marcaje.

#### 4.4.3.2. Efecto del tiempo en el tamaño de los cúmulos

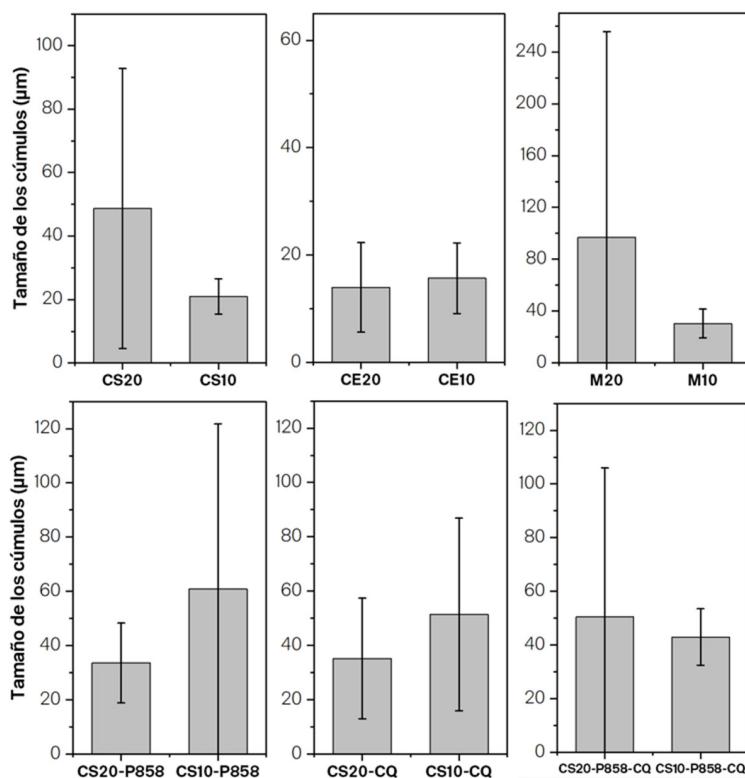
En los vectores basados en NPs (CS20 y M20), se observó una tendencia a la formación de agregados de mayor tamaño con el tiempo. En los vectores de MPs (CE20), el tamaño de los agregados se mantuvo constante. Por último, los vectores de C-NPs no encapsuladas mostraron una reducción del tamaño de cúmulo formado (**Figura 4.82 a**). Utilizando la prueba de la U de Mann-Whitman (agrupación de marcaje CS, CE y M) se determinaron diferencias significativas en la distribución de la variable en los grupos a largo y corto plazo de tamaño de los cúmulos ( $p=0.007$ ), mostrando un aumento del tamaño conforme aumentó el tiempo de estabulación de los animales (**Figura 4.81 b**). Sin embargo, el tamaño de los cúmulos fue muy variable en los marcajes CS20 y M20 en los estudios a largo plazo.



**Figura 4.82.** Tamaño de los cúmulos de partículas en los ganglios en función del tiempo.

#### 4.4.3.3. Efecto de la concentración en el tamaño de los cúmulos

En los vectores basados en NPs (CS y M), los tamaños de los cúmulos formados disminuyen con la concentración. En las MPs (CE) el tamaño de los agregados se mantiene estable independientemente de la concentración. De la misma manera, aunque menos evidente, este mismo efecto se observa tras la administración de NPs con CQ y basadas en PLGA RG858S, con amplia variabilidad (**Figura 4.83**). Estadísticamente, los grupos de 20 y 10 mg/ml no mostraron diferencias significativas en las distribuciones de la variable. Además, se observó una variabilidad sustancial en los tamaños de cúmulos observados especialmente en M20 y CS10-P858.



**Figura 4.83.** Tamaño de los cúmulos de partículas en los ganglios en función de la concentración.

#### 4.4.3.4. Efecto del tamaño de las partículas en el tamaño de los cúmulos

Como se representa en la **Figura 4.84 a**, las NPs de menor tamaño forman cúmulos de mayor tamaño que las MPs. Sin embargo, utilizando la U de Mann–Whitman para comparar los dos grupos (CS y CE) no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

#### 4.4.3.5. Efecto del cambio de polímero en el tamaño de los cúmulos

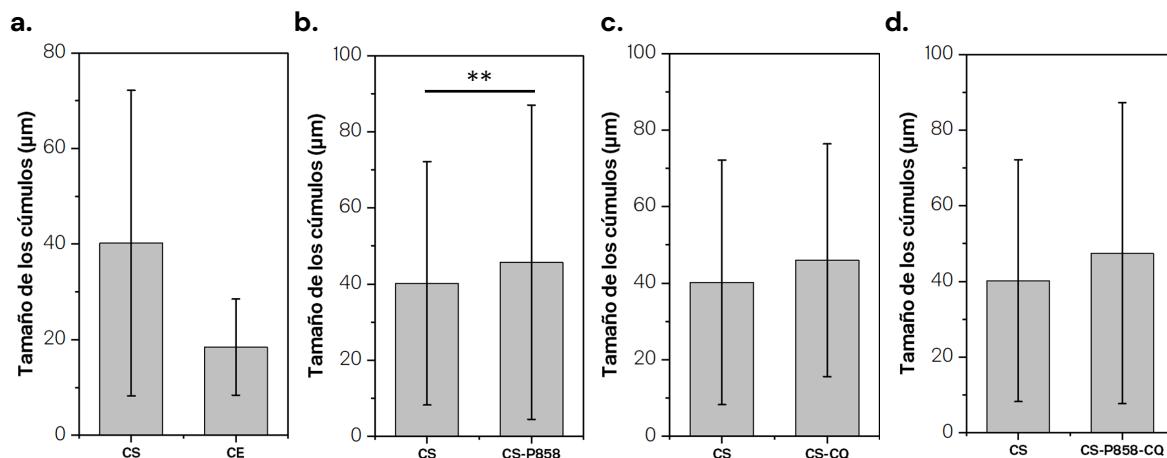
El cambio de PLGA RG504H a PLGA RG858S no pareció mostrar efecto sobre el tamaño de cúmulos formados una vez administrados los vectores (**Figura 4.84 b**). De nuevo, para analizar estadísticamente el efecto del cambio de polímero (la U de Mann–Whitman), se compararon los datos de los grupos CS y CS-P858, encontrando que las NPs con el polímero PLGA RG858S generaron cúmulos de mayor tamaño ( $p=0.046$ ).

#### 4.4.3.6. Efecto de la coencapsulación de CQ en el tamaño de los cúmulos

El tamaño de los cúmulos no resultó afectado por la coencapsulación de CQ en las NPs (**Figura 4.84 c**). Utilizando el modelo de la U de Mann–Whitman, no se encontraron diferencias significativas en la distribución de la variable entre ambos grupos.

#### 4.4.3.7. Efecto del cambio de polímero y de la coencapsulación de CQ en el tamaño de los cúmulos

Como en los dos apartados anteriores, el cambio de polímero y la coencapsulación de CQ no parecieron mostrar un efecto claro en el tamaño de cúmulos formados (**Figura 4.84 d**). De nuevo, los estudios estadísticos no demostraron diferencias significativas entre ambos grupos.



**Figura 4.84.** Tamaño de los cúmulos de partículas en los ganglios en función (a) del tamaño de las partículas, (b) del polímero utilizado en la síntesis, (c) de la coencapsulación de CQ y (d) de la coencapsulación de CQ y el cambio de polímero.

#### 4.4.3.8. Correlación del tamaño de los cúmulos y el resto de las variables

El tamaño de los cúmulos correlacionó negativamente con la facilidad de identificación (**Tabla 4.10**). Es decir, conforme mayor fue el tamaño de los cúmulos, menor fue la facilidad en la identificación, aunque es una correlación leve. Esto puede deberse a que la formación de cúmulos de mayor tamaño limita la distribución del marcaje en el ganglio, pudiendo pasar desapercibido durante la cirugía.

**Tabla 4.10.** Correlaciones entre el tamaño de los cúmulos y el resto de las variables utilizando la Tau de Kendall ( $p<0.1$  (\*),  $p<0.05$  (\*\*)) y  $p<0.01$  (\*\*\*)).

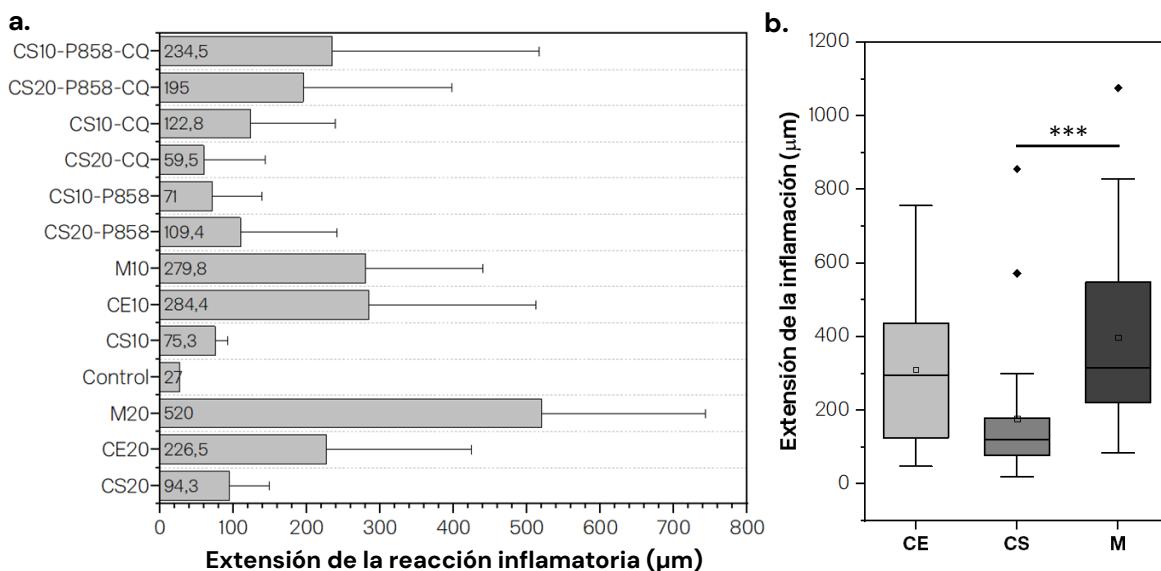
		Área	Inflamación	Identificación	Localización
Tamaño de los cúmulos	Coeficiente de correlación	-0,077	-0,007	-0,175*	0,158
	Significación	0,315	0,929	0,044	0,057
	n	80	79	82	79

## 4.4.4. Reacción inflamatoria

La intensidad de la reacción inflamatoria se cuantificó dependiendo de la extensión de tejido inflamado en el ganglio linfático.

### 4.4.4.1. Efecto del tipo de marcaje en la reacción inflamatoria

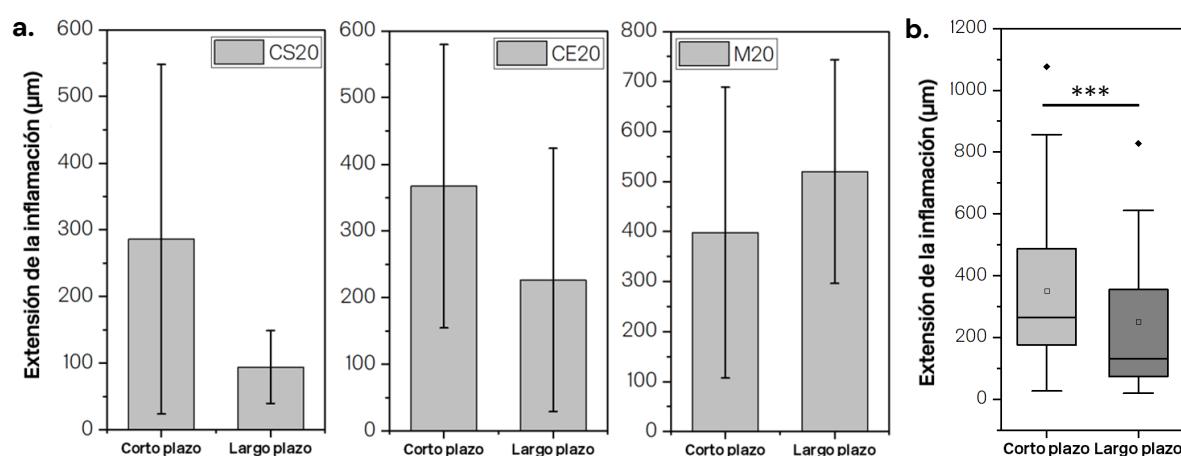
Todos los vectores administrados mostraron reacción inflamatoria granulomatosa de tipo cuerpo extraño en mayor o menor medida (**Figura 4.85 a**). A largo plazo, se observó menor inflamación en los ganglios tratados con el marcaje de control (C-NPs) y los marcajes CS20-CQ, CS10-P858 y CS10. Por el contrario, la mayor inflamación se observó en los ganglios marcados con M20, seguidos de los marcados con CE10, CE20 y M10. El estudio estadístico de los grupos de muestras (CS, CE y M) utilizando Kruskas-Wallis reportó diferencias significativas en la distribución de la variable entre grupos, siendo esta mayor en los marcajes basados en melanina ( $p=0.041$ ). Comparando CE-M y CS-M con la U de Mann-Whitman, se encontraron diferencias entre CS y M ( $p<0.001$ ) (**Figura 4.85 b**).



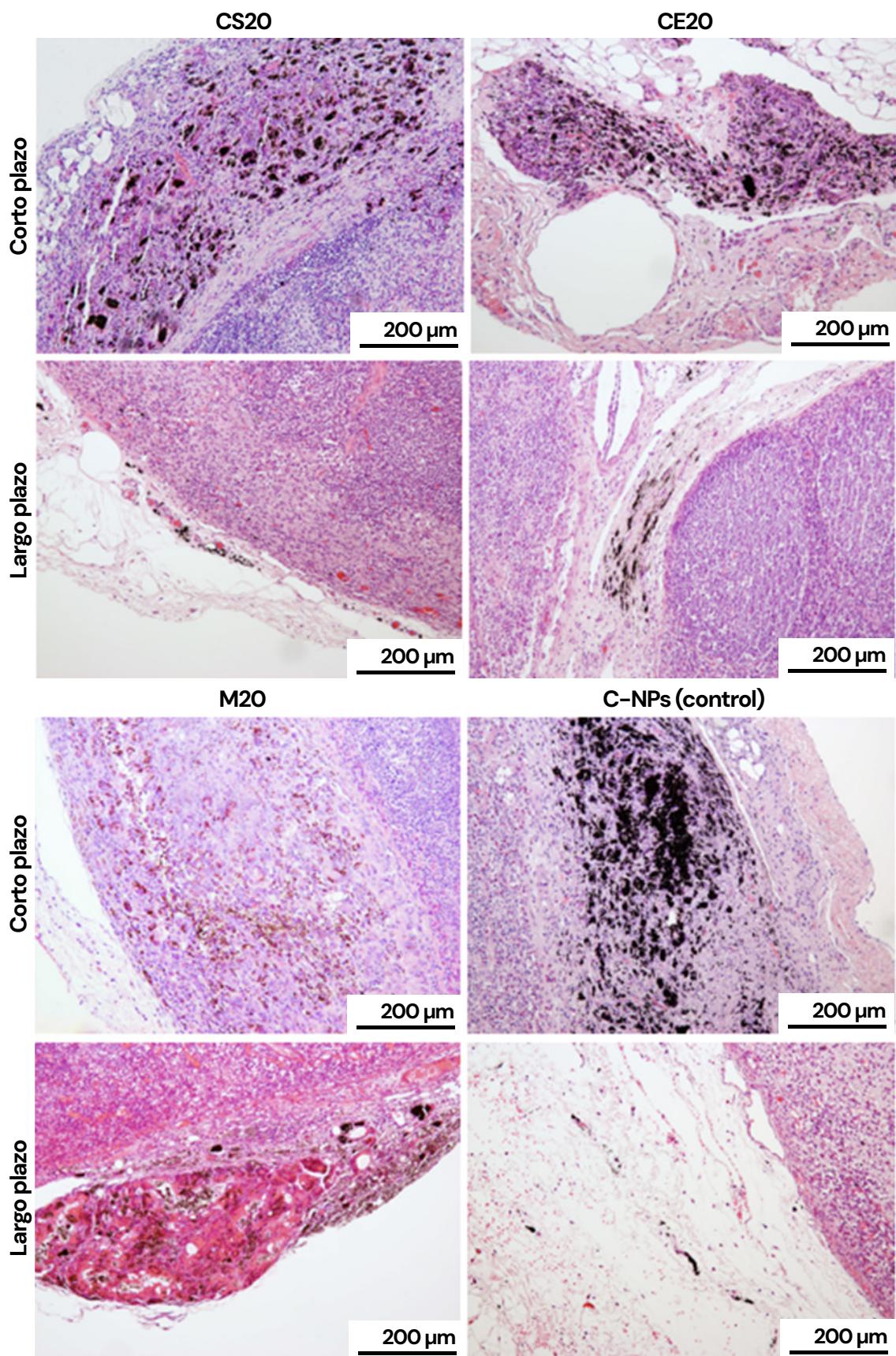
**Figura 4.85.** Extensión de la reacción inflamatoria en función del tipo de marcaje.

### 4.4.4.2. Efecto del tiempo en la extensión de la reacción inflamatoria

A excepción del marcaje basado en Mel-NPs, en el resto de los casos la extensión del tejido inflamatorio se redujo en el tiempo. En el caso del vector CS20, se cuantificó una reducción de la inflamación de ~3 veces respecto a los estudios a corto plazo, mientras que en CE20 la extensión de la inflamación se redujo ~1.6 veces y en el control (C-NPs) ~20 veces (de  $540 \pm 245 \mu\text{m}$  a  $27 \pm 0 \mu\text{m}$ ). Sin embargo, la inflamación en los ganglios tratados con M20 aumentó ~1.3 veces (**Figura 4.86 a-87**). Se determinaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de la variable de extensión de la reacción inflamatoria en los grupos a largo y corto plazo. La extensión de la inflamación se redujo conforme aumentó el tiempo tras la inoculación de los vectores ( $p=0.002$ ) (**Figura 4.86 b**).



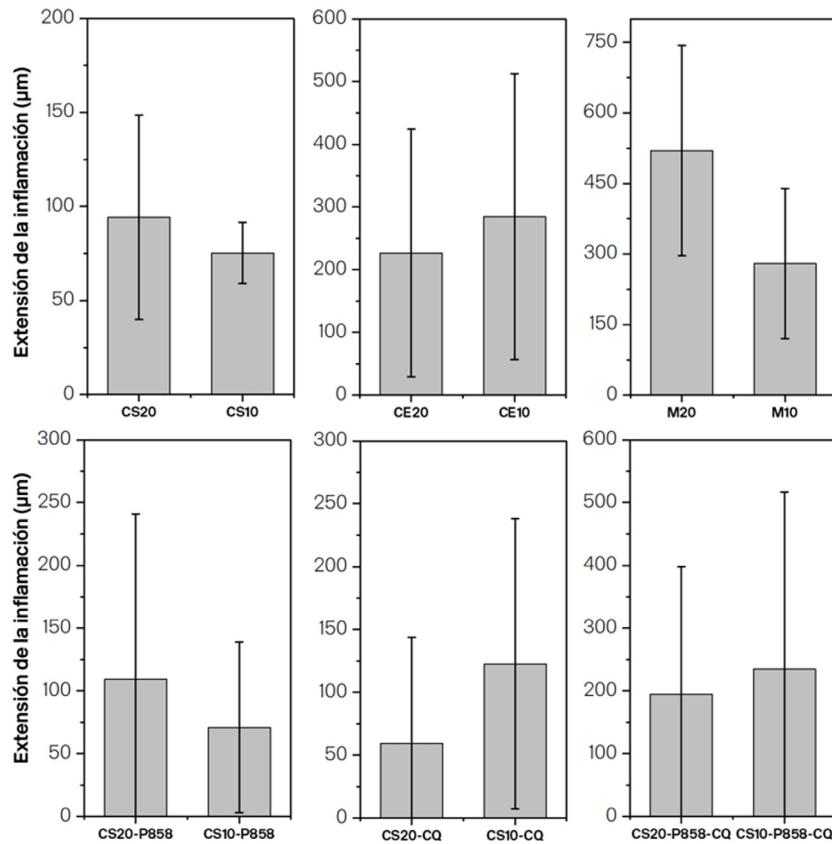
**Figura 4.86.** Extensión del tejido inflamatorio en función del tiempo en los ganglios marcados con los vectores CS20, CE20, M20 y C-NPs (control).



**Figura 4.87.** Extensión de la reacción inflamatoria en los estudios experimentales a corto y largo plazo en ganglios tratados con CS20, CE20, M20 y C-NPs (control).

#### 4.4.4.3. Efecto de la concentración en la reacción inflamatoria

Como se ilustra en la [Figura 4.88](#), los marcajes CS20, M20 y CS20-P858 mostraron mayor reacción inflamatoria que sus homólogos a baja concentración (CS10, M10 y CS10-P858). El marcaje basado en MPs (CE) mostró tasas similares con elevada variabilidad, de manera similar ocurre en los vectores CS-CQ y CS-P858-CQ. Sin embargo, la diferencia entre grupos no fue estadísticamente significativa.



[Figura 4.88.](#) Extensión del tejido inflamatorio en función de la concentración de partículas.

#### 4.4.4.4. Efecto del tamaño de partícula en la reacción inflamatoria

Las MPs (CE) produjeron mayor inflamación que las NPs (CS) en el ganglio linfático ([Figura 4.89 a](#)). Se estimó una inflamación ~3 veces mayor en CE que en CS. Esta diferencia entre grupos fue estadísticamente significativa ( $p=0.044$ ) utilizando la U de Mann-Whitman.

#### 4.4.4.5. Efecto del tamaño de partícula en la reacción inflamatoria

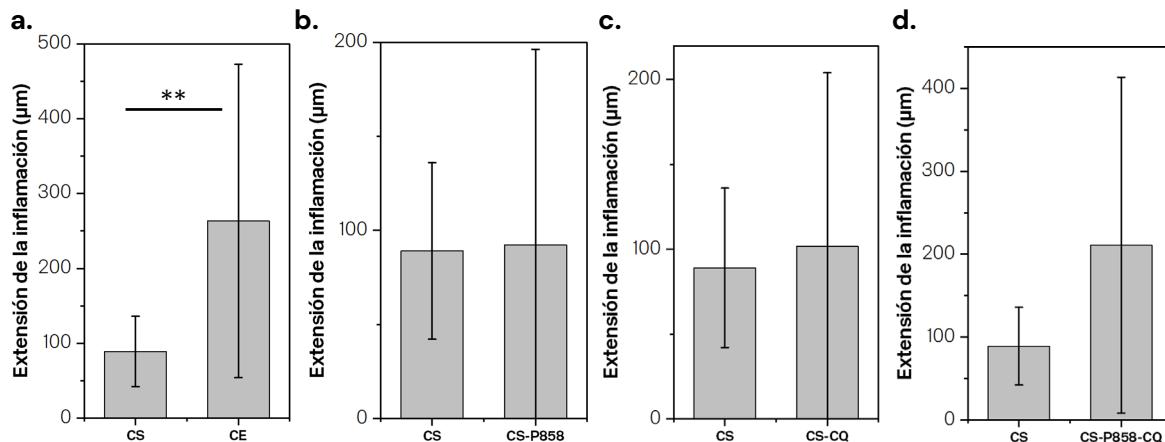
El cambio de polímero en la síntesis de NPs (PLGA RG504H o PLGA RG858S) no produjo ningún efecto en la extensión de la reacción inflamatoria, aunque se encontró mayor reacción inflamatoria en algunos ganglios marcados con PLGA RG858S ([Figura 4.89 b](#)). Como se esperaba, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

#### 4.4.4.6. Efecto del tamaño de partícula en la reacción inflamatoria

La CQ tampoco mostró un efecto claro, aunque algunos ganglios marcados con CQ coencapsulada mostraron mayor reacción inflamatoria ([Figura 4.89 c](#)). No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (CS y CS-CQ).

#### 4.4.4.7. Efecto del cambio de polímero y de la coencapsulación de CQ en la extensión de la reacción inflamatoria

La incorporación de CQ y el cambio al polímero PLGA RG858S, en conjunto, mostraron preliminarmente mayores reacciones inflamatorias que sus homólogos basados en PLGA RG504H sin clorquinina coencapsulada. Este aumento de la extensión del tejido inflamatorio fue ~2.4 veces mayor, aunque con amplia variabilidad ([Figura 4.89 d](#)). Sin embargo, de nuevo, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos.



**Figura 4.89.** Extensión del tejido inflamatorio en función (a) del tamaño de las partículas, (b) del polímero utilizado en la síntesis, (c) de la coencapsulación de CQ y (d) de la coencapsulación de CQ y el cambio de polímero.

#### 4.4.4.8. Correlación del extensión inflamatoria y el resto de las variables

Como se muestra en la **Tabla 4.11**, la variable de extensión de la inflamación correlacionó positivamente con el área marcada (mayor inflamación conforme aumenta el área marcada) y con la facilidad en la identificación. Como se ha mencionado anteriormente, la correlación entre la extensión de la inflamación y la facilidad de identificación con el área marcada son leves y directas.

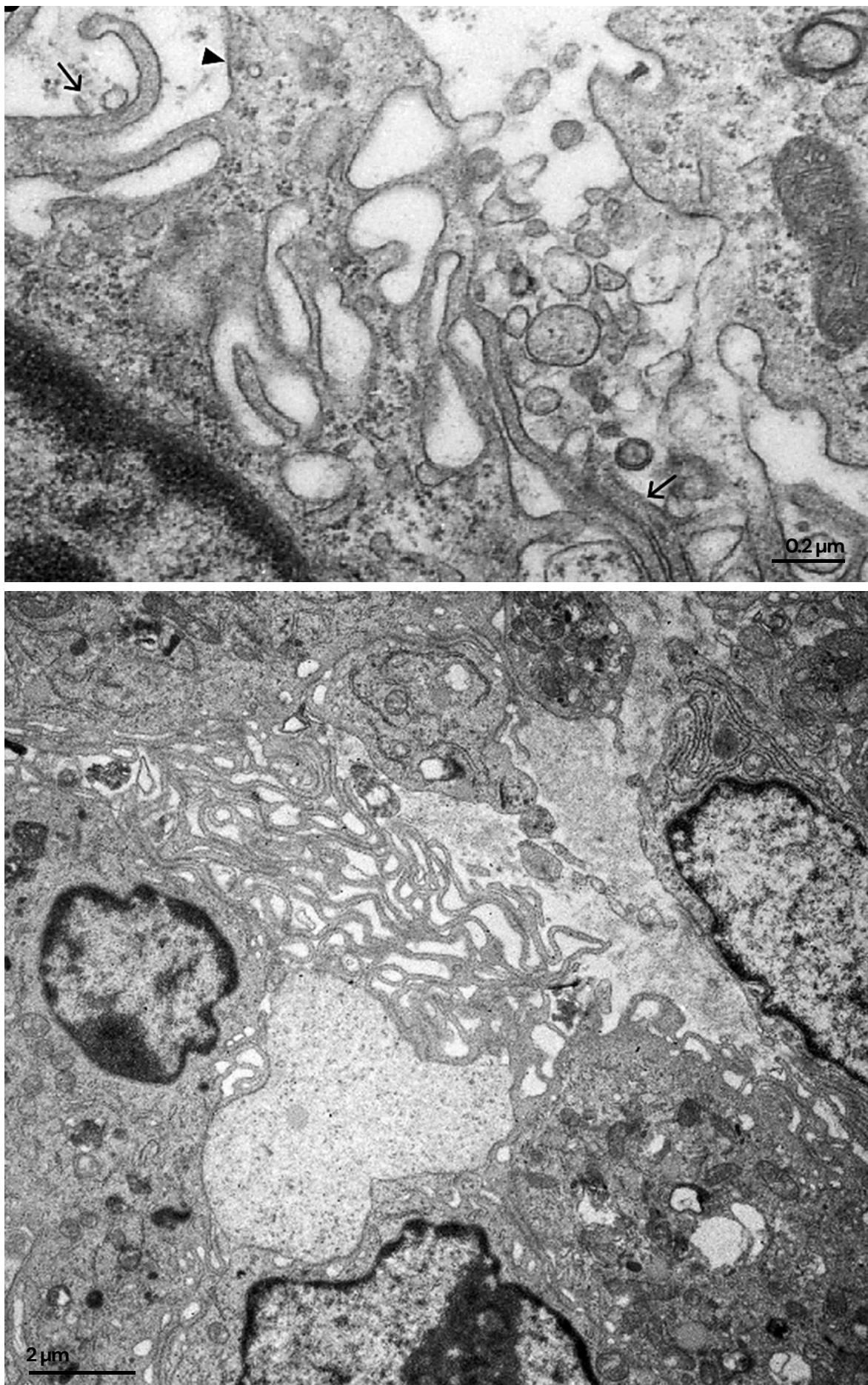
**Tabla 4.11.** Correlaciones entre la extensión de la inflamación y el resto de las variables utilizando la Tau de Kendall ( $p<0.1$  (\*),  $p<0.05$  (\*\*)) y  $p<0.01$  (\*\*\*)).

		Área	Localización	Identificación	Tamaño cúmulos
Extensión inflamación	Coeficiente de correlación	0,166**	0,031	0,435***	-0,007
	Significación	0,043	0,728	0,000	0,929
	n	70	83	72	71

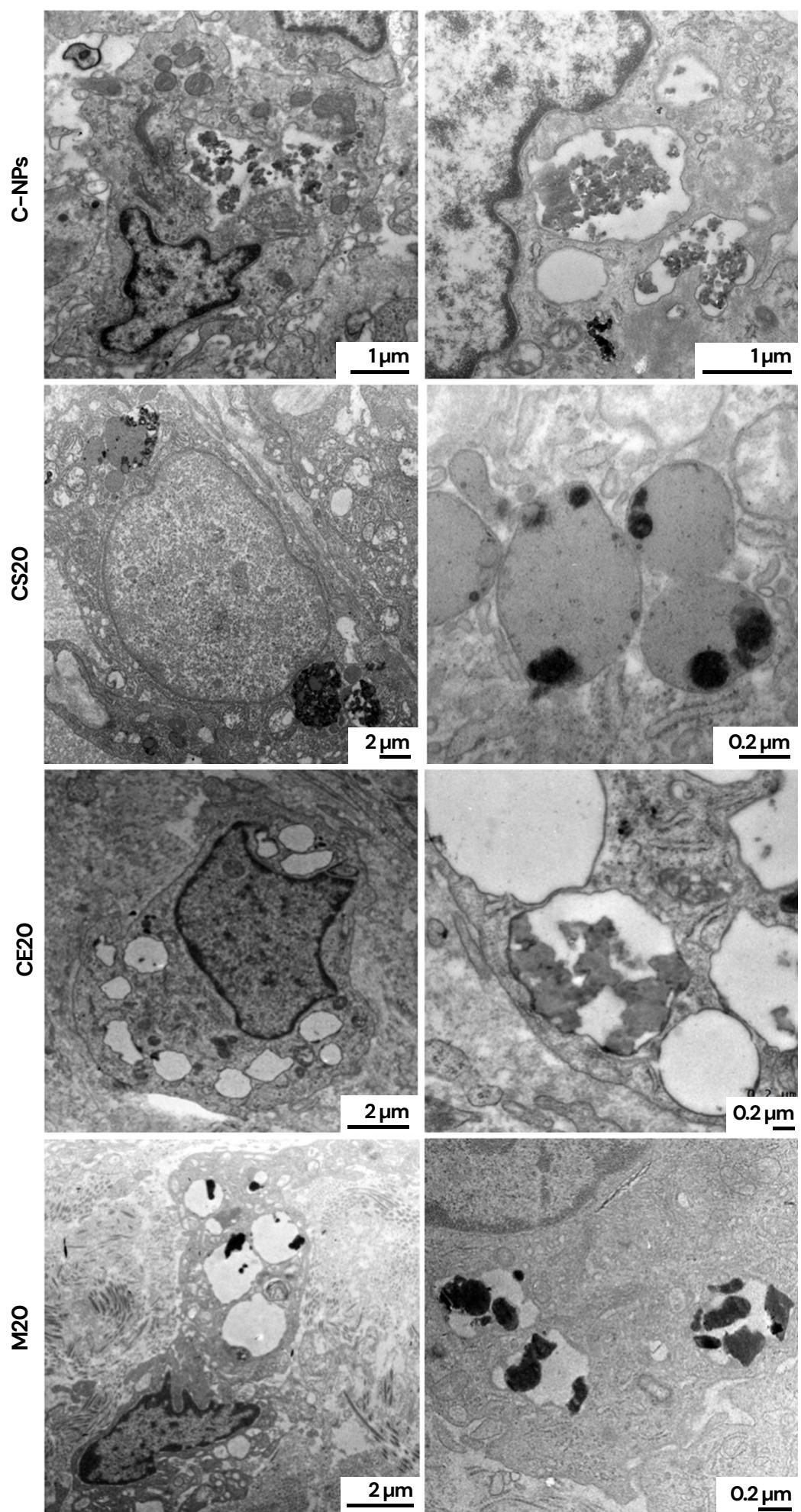
## 4.5. Estudio ultraestructural

### 4.5.1. Fagocitosis de las partículas y efectos en los macrófagos

Los macrófagos fagocitan todas las partículas inoculadas, tanto las C-NPs como las partículas sintetizadas. Los macrófagos inician la fagocitosis con la formación de filopodios y lamelipodios para capturar las partículas del medio extracelular (**Figura 4.90**). Una vez captadas, los macrófagos internalizan las partículas en su citoplasma dentro de vesículas conocidas como "fagosomes". Una semana tras la inoculación de los vectores, es posible diferenciar los diferentes tipos de partículas en el interior de los fagosomes, ya que presentan diferencias de tamaño, morfología y densidad electrónica (**Figura 4.91**). Las C-NPs libres tienden a agregarse en estructuras de  $42 \pm 17$  nm ( $n=50$ ), mientras que el tamaño medio de las partículas MPs cargadas de C-NPs (CE) en las imágenes ultraestructurales es de  $912 \pm 548$  nm ( $n=50$ ), de las NPs cargadas de C-NPs (CS) es de  $100 \pm 43$  nm ( $n=50$ ) y las Mel-NPs (M) es de  $264 \pm 97$  nm. No obstante, en todos los casos se observa agregación de partículas, generando cúmulos de mayor tamaño.



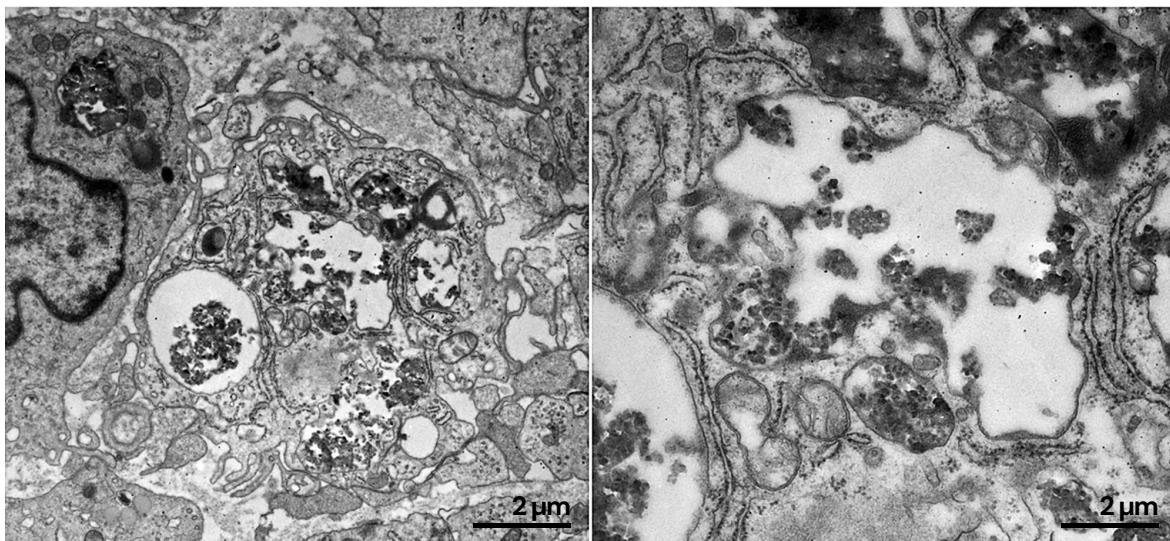
**Figura 4.90.** Macrófagos con numerosos lamelipodios y filopodios para la fagocitosis de las partículas. (a) Detalle de la formación de filopodios (flecha) y lamelipodios (cabeza de flecha) en un macrófago. (b) Tres macrófagos con numerosos filopodios englobando C-NPs.



**Figura 4.91.**

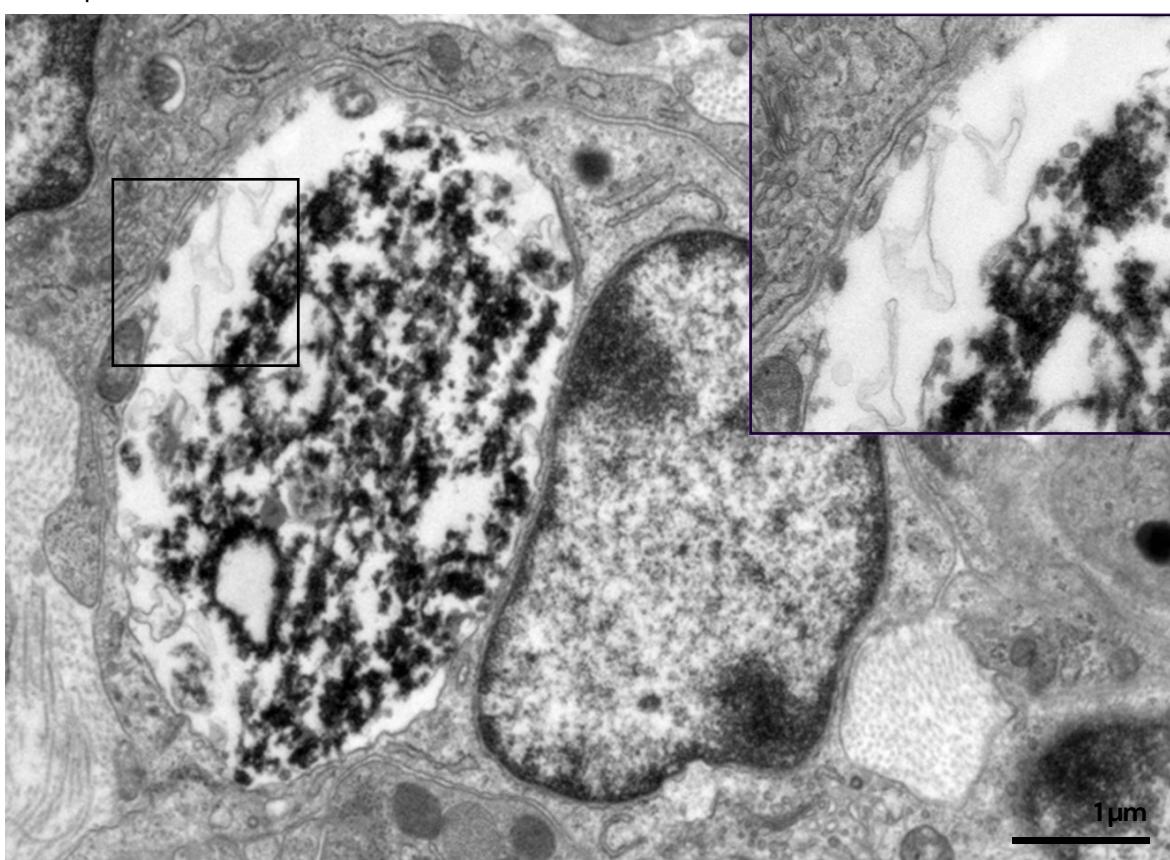
Partículas C-NPs, CS, CE y M en el interior de los fagosomas de los macrófagos en las muestras de ganglios de los estudios experimentales a corto plazo.

En ocasiones, los fagosomas/fagolisosomas se fusionan en vesículas de mayor tamaño y liberan las partículas en su interior para intentar degradar el contenido extraño (**Figura 4.92**). Las C-NPs libres tienden a agregarse en estructuras de  $42 \pm 17$  nm (n=50), mientras que el tamaño medio de las partículas MP cargadas de C-NPs (CE) en las imágenes ultraestructurales es de  $912 \pm 548$  nm (n=50), de las NPs cargadas de C-NPs (CS) es de  $100 \pm 43$  nm (n=50) y las Mel-NPs (M) es de  $264 \pm 97$  nm. No obstante, en todos los casos se observa agregación de partículas, generando cúmulos de mayor tamaño.



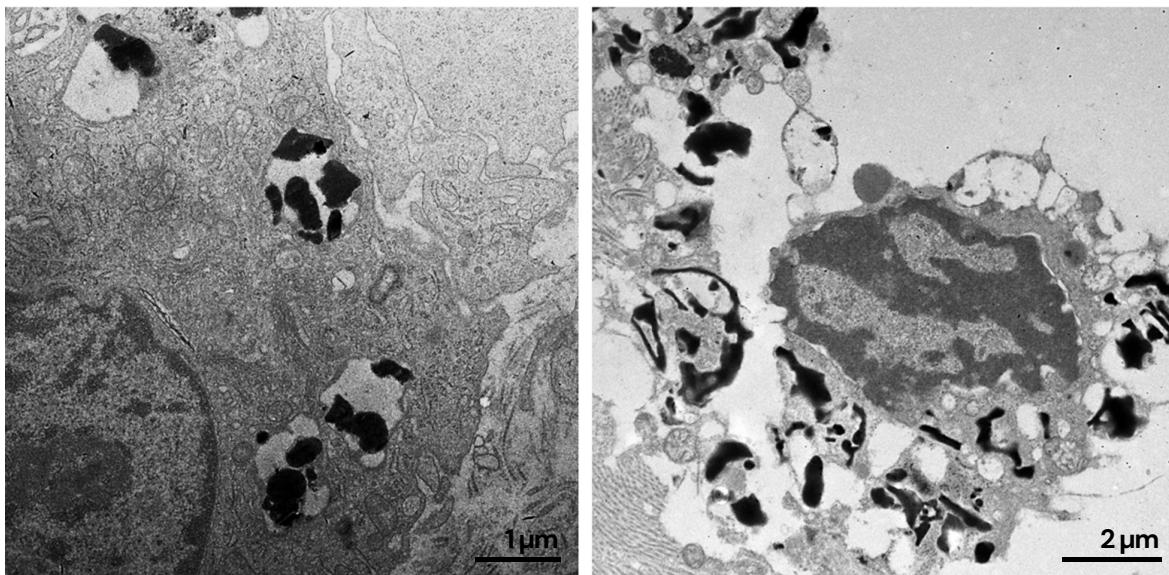
**Figura 4.92.** Dos fagosomas con partículas en su interior se fusionan con un fagosoma de mayor tamaño y liberan las partículas en su interior.

Sin embargo, las afiladas aristas de las C-NPs, tanto en forma libre como encapsuladas en NPs (CS) y MP (CE), rompen las membranas de los fagolisosomas, derramando las hidrolasas lisosomales al citoplasma del macrófago (**Figura 4.93**). Este fenómeno ocurre con más frecuencia en los ganglios marcados con el vector de C-NPs, ya que consisten en C-NPs libres que no están protegidas por matriz polimérica.



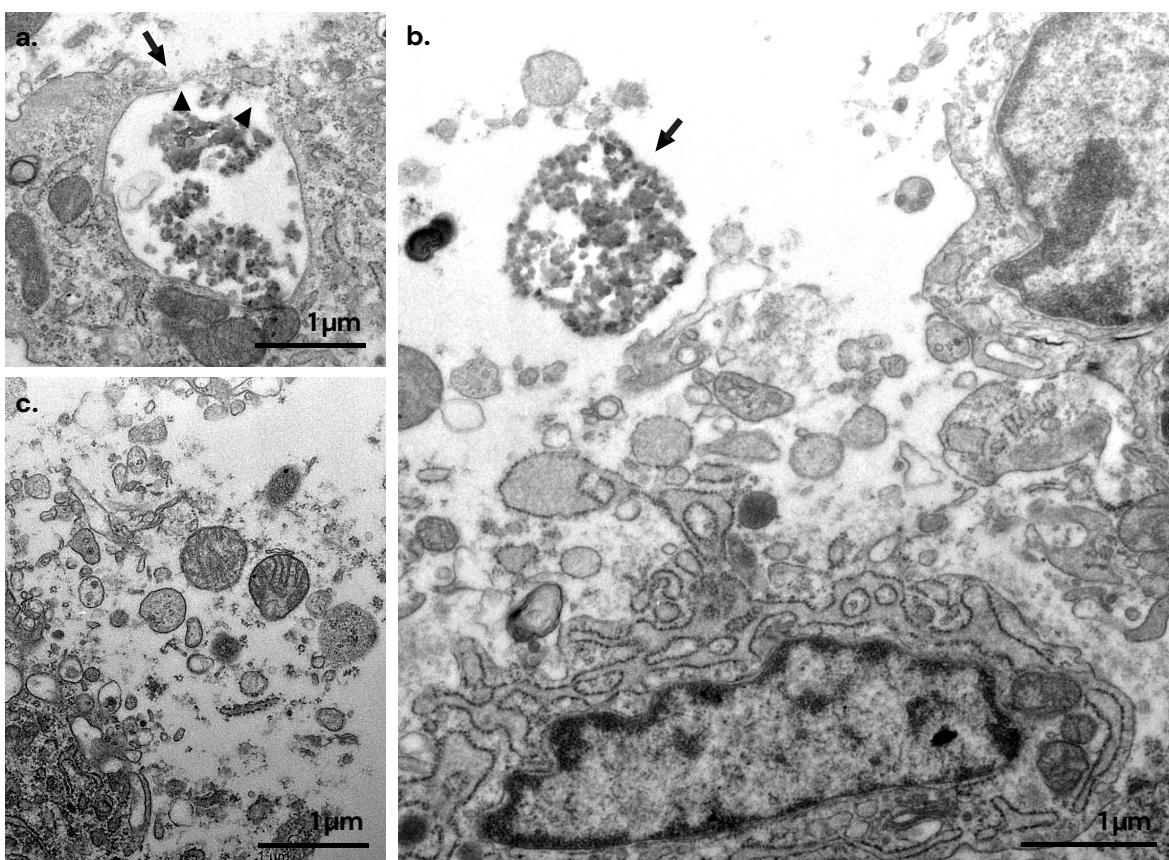
**Figura 4.93.** Detalle de la membrana de un fagolisosoma rota por el contacto con las C-NPs.

En el caso de las Mel-NPs, los residuos de melanina cristalizada tuvieron el mismo efecto, rompiendo la membrana de los fagolisosomas de los macrófagos (**Figura 4.94**).



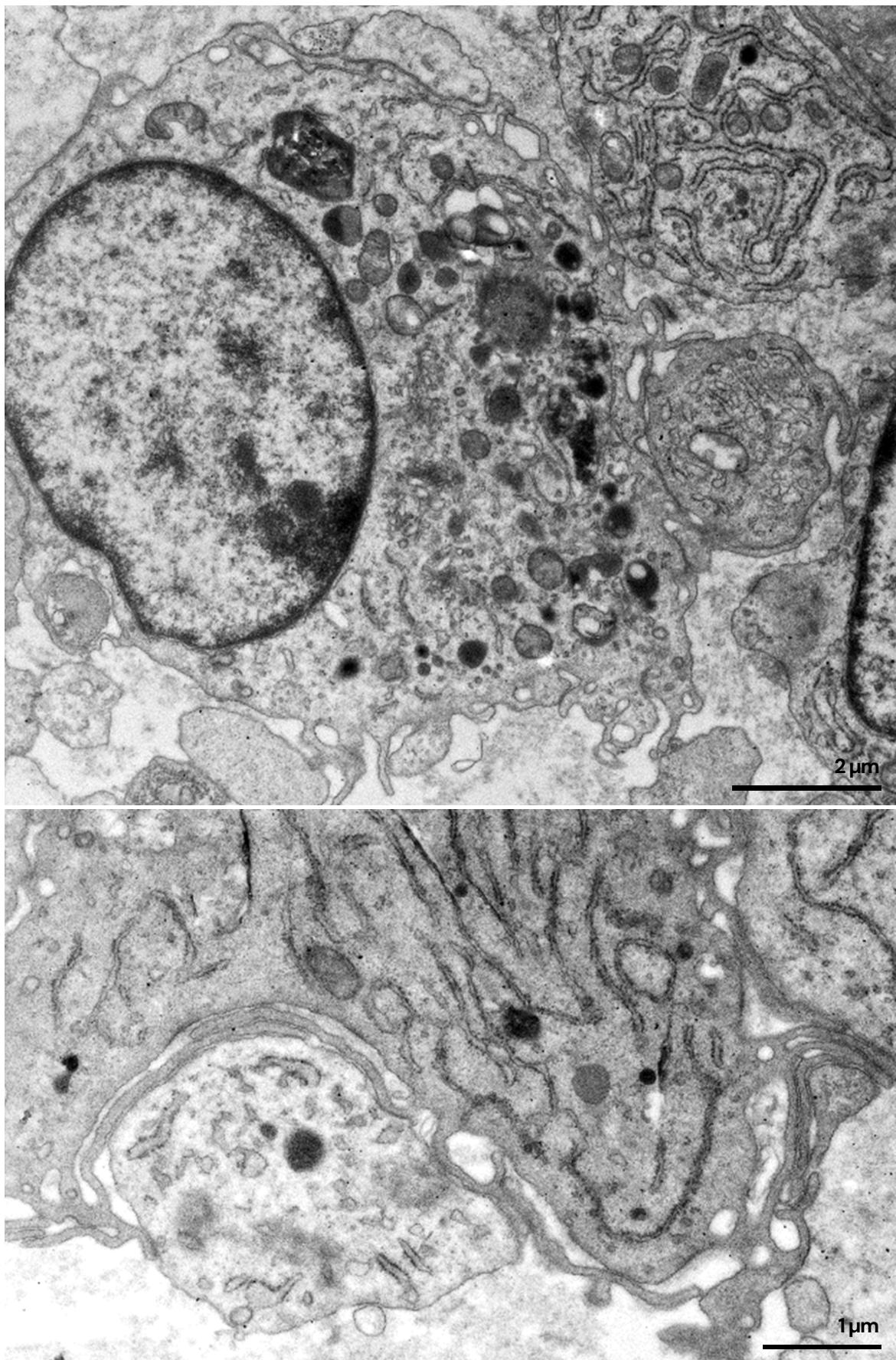
**Figura 4.94.** Detalle de fagolisosoma con melanina cristalizada en su interior y un macrófago con las membranas de los fagolisosomas rotas por el contacto con las aristas de la melanina cristalizada.

Como consecuencia de la liberación de las hidrolasas lisosomales al citosol, se produce lisis de la membrana celular con la consecuente muerte celular y liberación de orgánulos celulares al espacio extracelular (**Figura 4.95**).



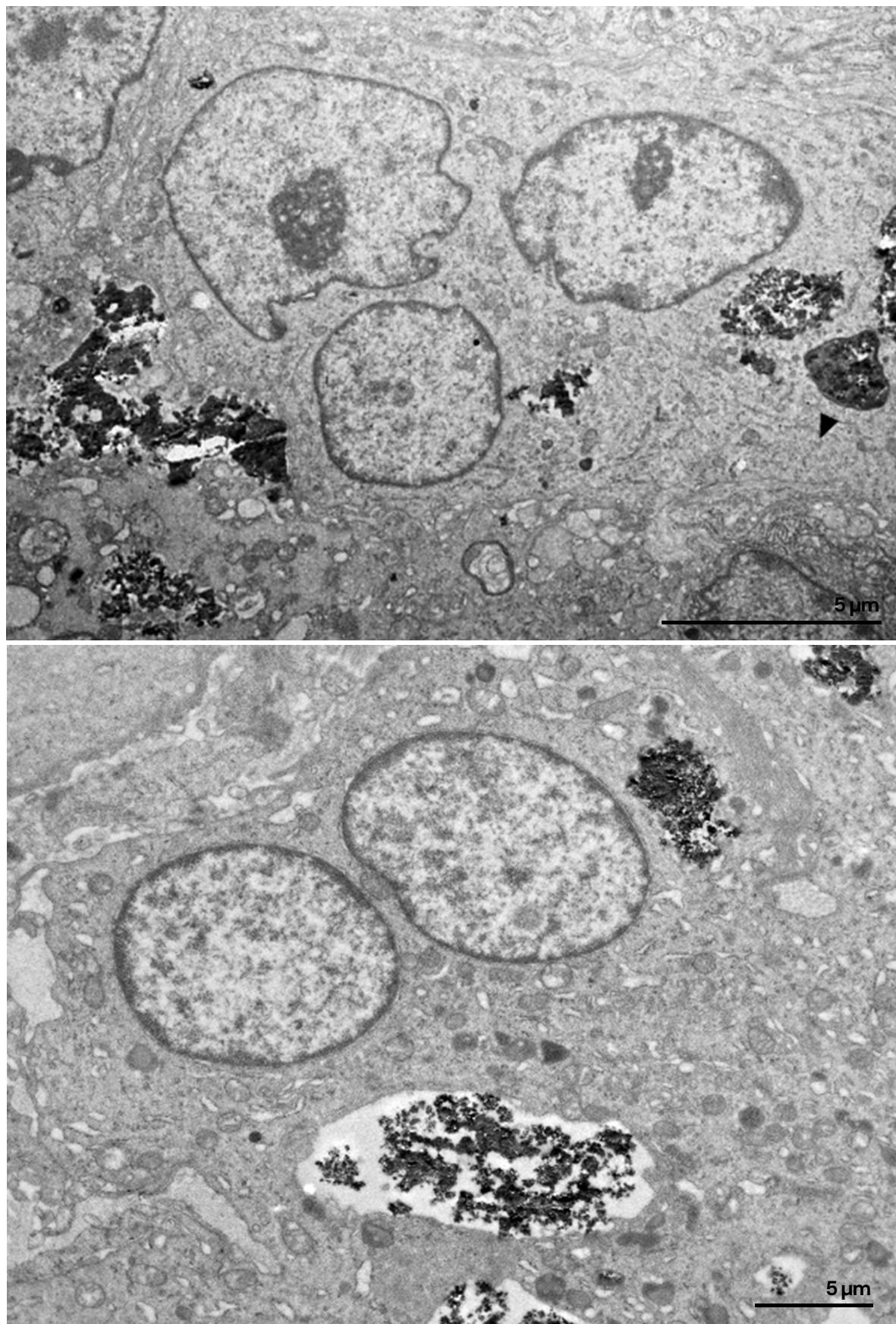
**Figura 4.95.** Lisis de la membrana plasmática y derrame de orgánulos al espacio extracelular. (a) Membrana plasmática de un macrófago lisada por hidrolasas derramadas. Se observa la ruptura de la membrana del fagosoma (puntas de flecha) y de la membrana plasmática (flechas). (b) Tras la ruptura de la membrana plasmática, las C-NPs permanecen intactas en el medio extracelular (flecha). (c) Los orgánulos derramados en el espacio extracelular conservan su estructura.

Los restos celulares de los macrófagos lisados son fagocitados por nuevos macrófagos (**Figura 4.96**), que también tratan de digerir nuevamente las partículas de carbono y melanina. Se presume que los restos celulares y las partículas liberadas por la ruptura de las membranas de los macrófagos son fagocitados por nuevos macrófagos y así sucesivamente.



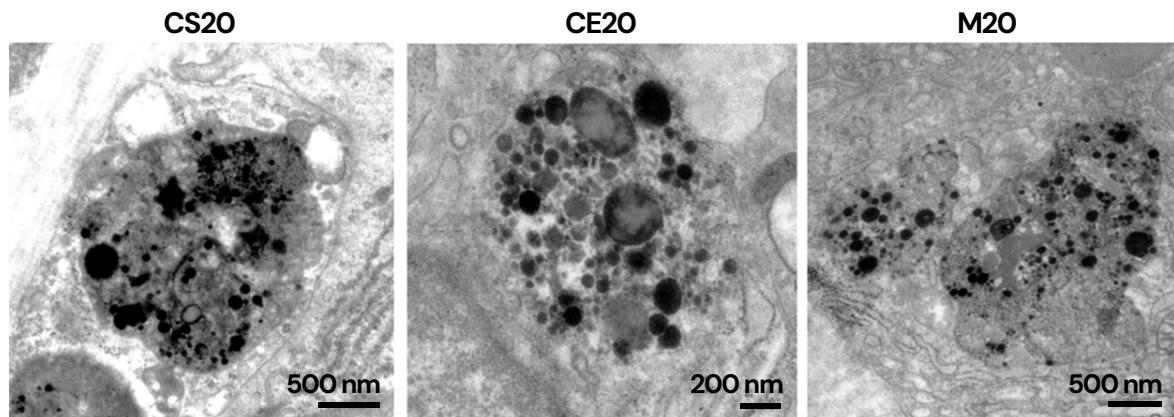
**Figura 4.96.** Macrófagos fagocitando restos celulares de macrófagos lisados.

Aunque las partículas se encuentran principalmente en los macrófagos, en ocasiones son aisladas e internalizadas en el citoplasma de CGM, formadas por la fusión de macrófagos (**Figura 4.97**).

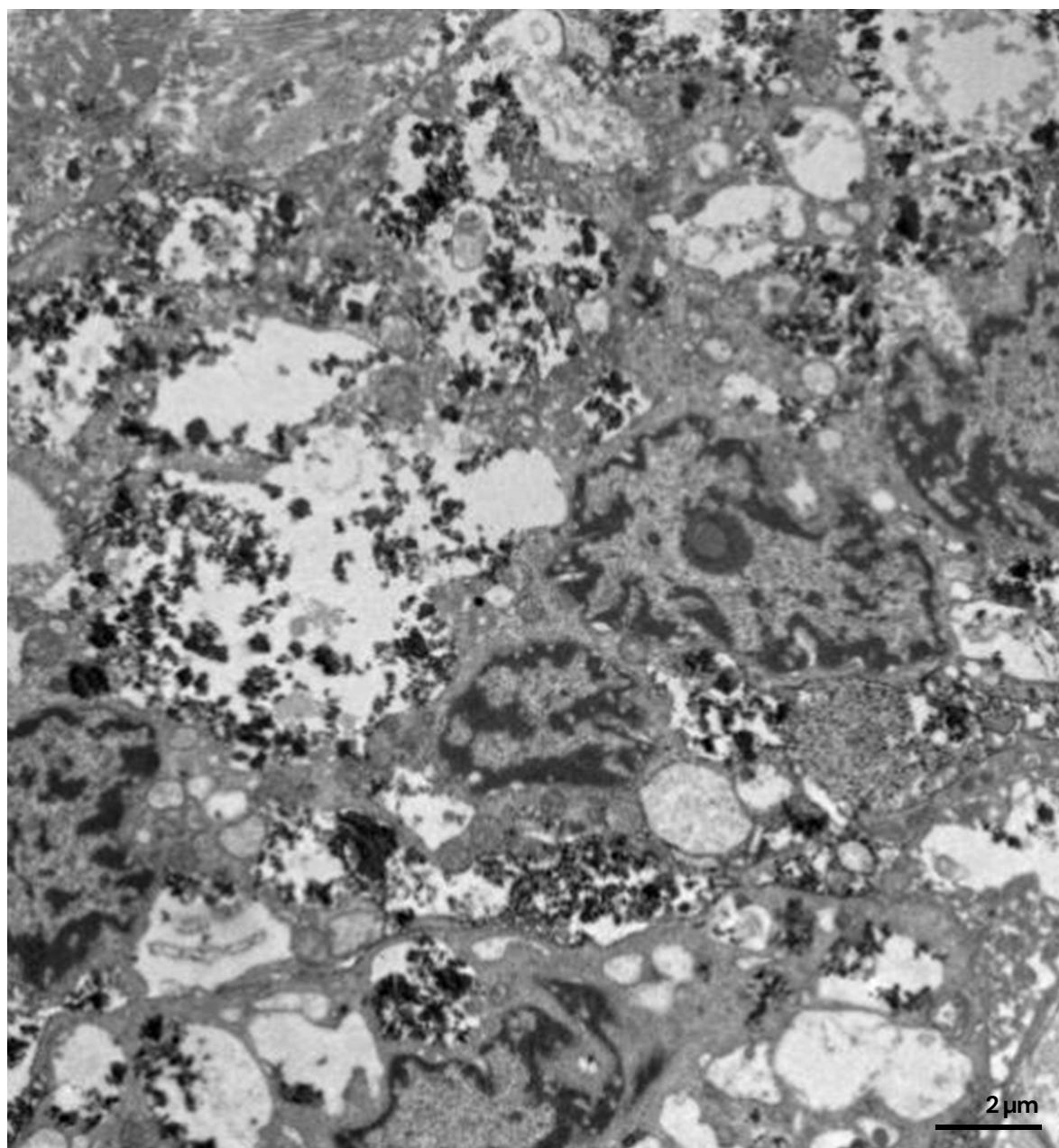


**Figura 4.97.** C-NPs aisladas en células gigantes multinucleadas.

En los estudios experimentales a largo plazo, la degradación de los polímeros base de las partículas por el efecto de las enzimas lisosomales hace indistinguibles unas partículas de otras (**Figura 4.98**). Además, a partir de las 6 semanas es posible encontrar más C-NPs y melanina libres, lo que sugiere que son liberadas (**Figura 4.99**).

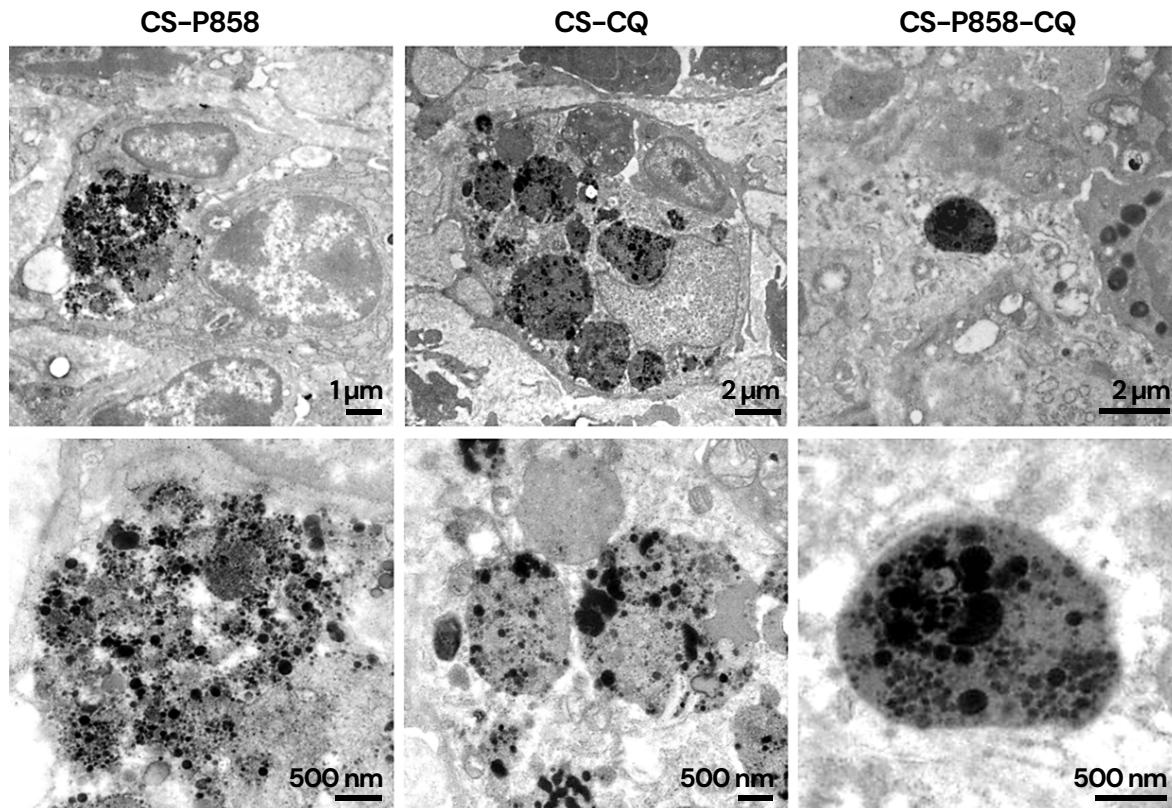


**Figura 4.98.** Partículas CS, CE y M fagocitadas en estudios experimentales a largo plazo.



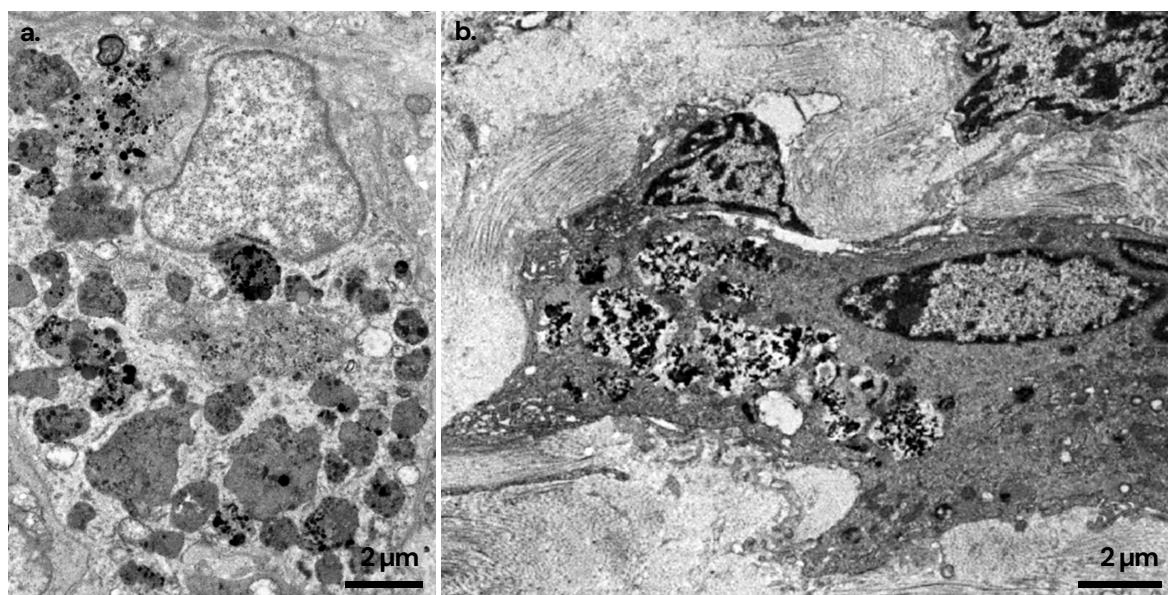
**Figura 4.99.** Partículas C-NPs liberadas de las NPs en los estudios a largo plazo.

Tras 16 semanas, el tamaño de las partículas (excluyendo agregados) para  $n=50$  fue de  $47 \pm 20$  nm en las partículas del vector CS,  $77 \pm 27$  nm en CS-P858,  $83 \pm 28$  nm en CS-CQ,  $80 \pm 29$  nm en CS-P858-CQ,  $219 \pm 216$  nm en las partículas CE y  $43 \pm 13$  nm en M (**Figura 4.100**). Por tanto, respecto a los estudios a corto plazo, el tamaño de partícula se ha reducido  $\sim 2.1$  veces en el caso de CS,  $\sim 4.2$  veces en CE y  $\sim 3.4$  veces en M. En relación con las CS, las CS-P858 mostraron un tamaño  $\sim 1.6$  veces superior, las CS-CQ un diámetro promedio  $\sim 1.8$  veces superior y las CS-P858-CQ  $\sim 1.7$  veces superior.



**Figura 4.100.** Partículas CS-P858, CS-CQ y CS-P858-CQ en fagosomas en los estudios experimentales a largo plazo

En los estudios a largo plazo se encontraron numerosos macrófagos altamente cargados de partículas y restos de éstas en la región pericapsular, aislados dentro de una matriz de fibras de colágeno en el tejido conjuntivo (**Figura 4.101**).

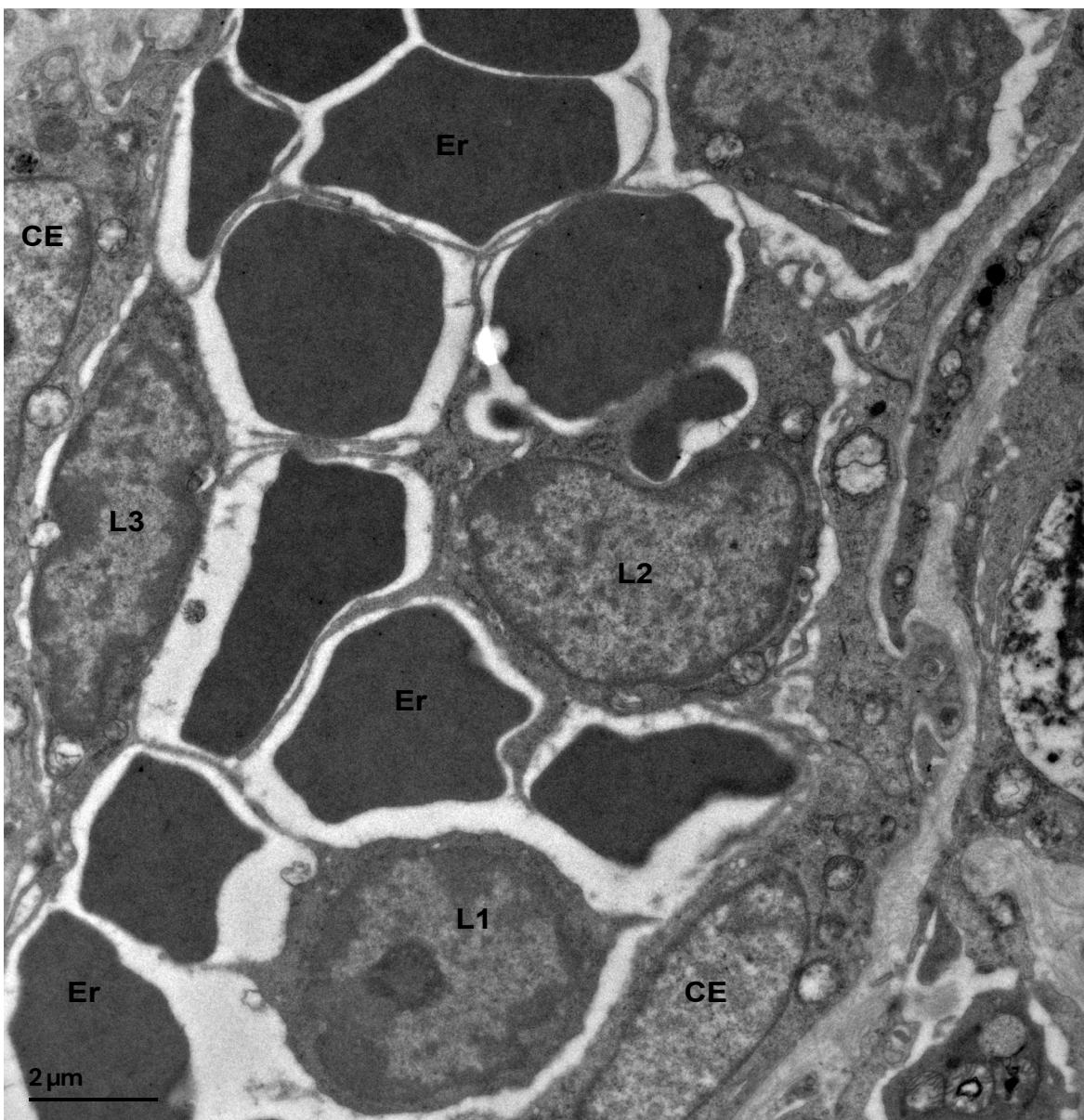


**Figura 4.101.** Macrófagos cargados de C-NPs en los estudios experimentales a largo plazo. (a) Macrófago altamente cargado de C-NPs. (b) Macrófago cargado de C-NPs aislado en fibras de colágeno en el espacio pericapsular.

## 4.5.2. Reclutamiento de células inmunitarias circulantes para enfrentar la inflamación

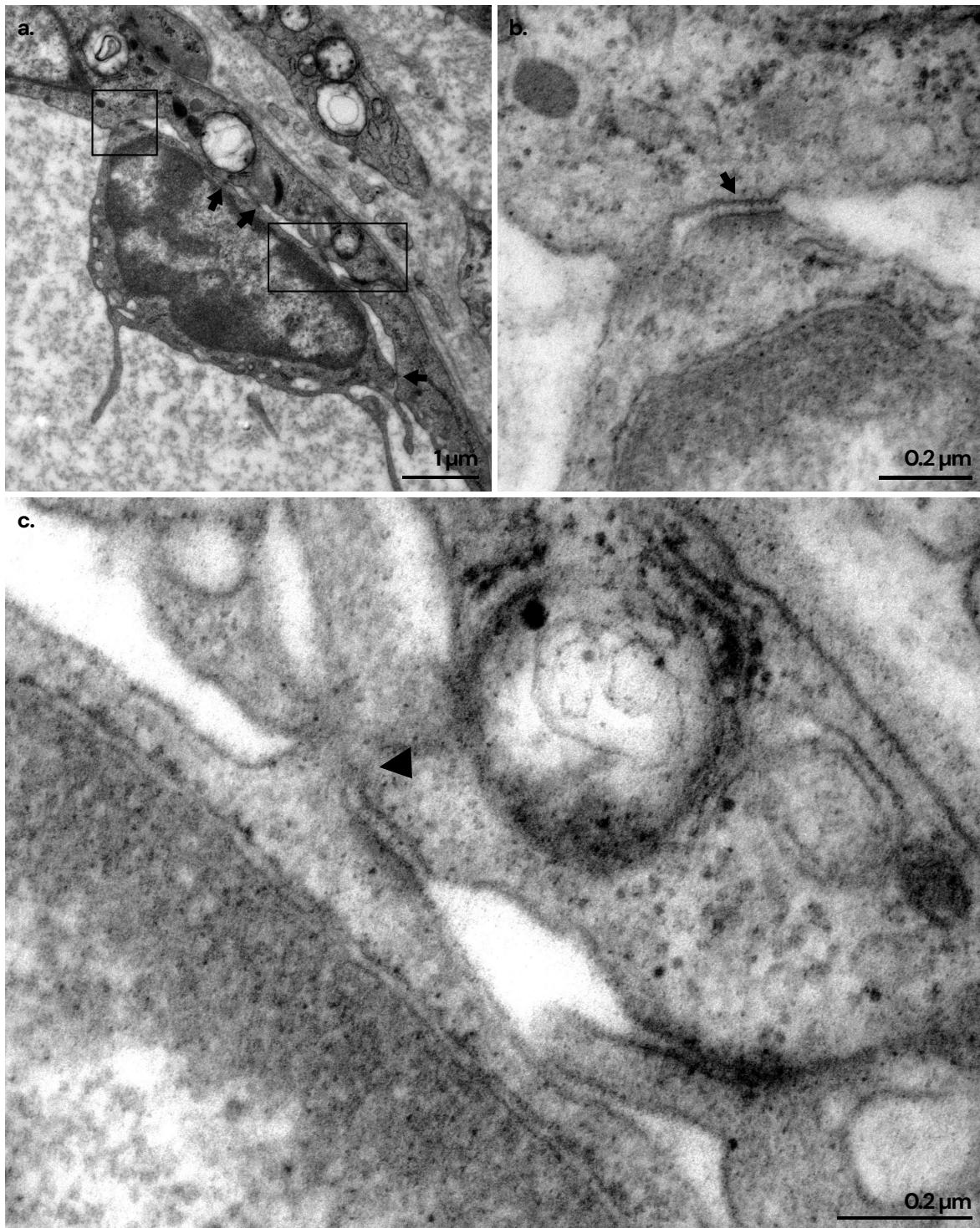
Uno de los mecanismos de extravasación de células inmunitarias circulantes es la migración transendotelial (MTE) asociada a la activación del endotelio vascular como respuesta a la inflamación. En este apartado, se ha reconstruido secuencialmente el proceso de MTE transcelular como respuesta a la inflamación crónica asociada a la inoculación de partículas en el ganglio linfático para ilustrar el proceso.

En el primer paso de la MTE, los linfocitos circulantes establecen pequeños contactos con las células endoteliales y otras células circulantes a través de pseudópodos, que además facilitan la migración y permiten sondear la superficie del endotelio vascular. La **Figura 4.102** muestra tres linfocitos en distintas fases de MTE, con distinta morfología para desempeñar distintas funciones. El linfocito L1 conserva su morfología original y muestra pequeñas prolongaciones para contactar con otras células cercanas (otros linfocitos, eritrocitos y células endoteliales vasculares). El linfocito L2 presenta una morfología más irregular, y sus prolongaciones ya contactan con más células de su entorno. El linfocito L3 establece contactos adherentes con las células endoteliales, y muestra una morfología aplanaada que aumenta los puntos de contacto.



**Figura 4.102.** Los linfocitos circulantes establecen contacto con el endotelio (L1, L2 y L3: linfocitos, Er: eritrocito, CE: célula endotelial).

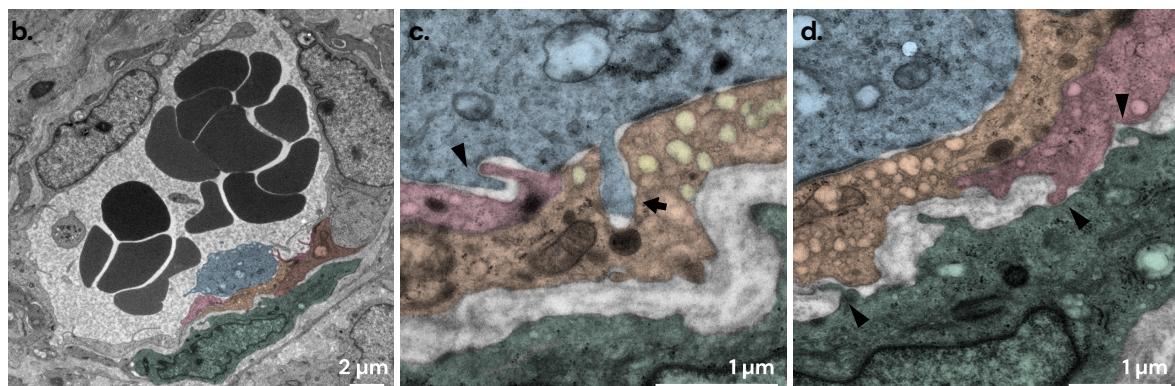
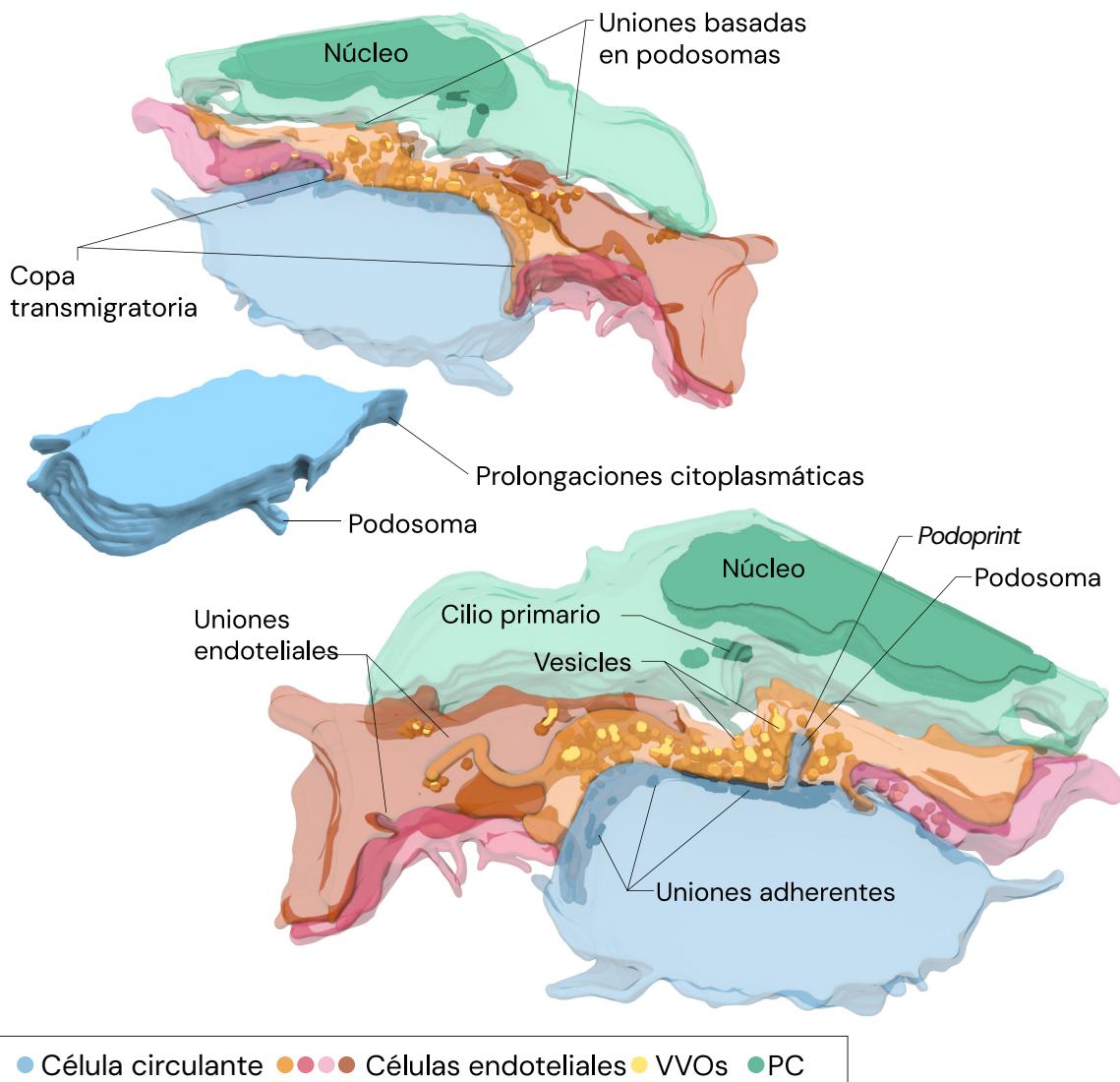
Para rastrear el endotelio y adherirse en el sitio de inicio de la MTE, los linfocitos no sólo establecen contactos a través de uniones adherentes (**Figura 4.103 a,b**), sino que también emiten multitud de pequeñas extensiones (conocidas como podosomas) para contactar entre sí. Encontramos numerosos contactos basados en podosomas entre linfocitos y células endoteliales, donde los linfocitos emiten podosomas ricos en actina que producen invaginaciones en la membrana del endotelio en estructuras conocidas como “podoprints” (**Figura 4.103 a,c**).



**Figura 4.103.** Linfocito con morfología aplanada, para aumentar los puntos de contacto con el endotelio, establece uniones con las células endoteliales. (a) Micrografía panorámica. (b) Detalle de la unión adherente (flechas). (c) Detalle de un pequeño podosoma (cabeza de flecha).

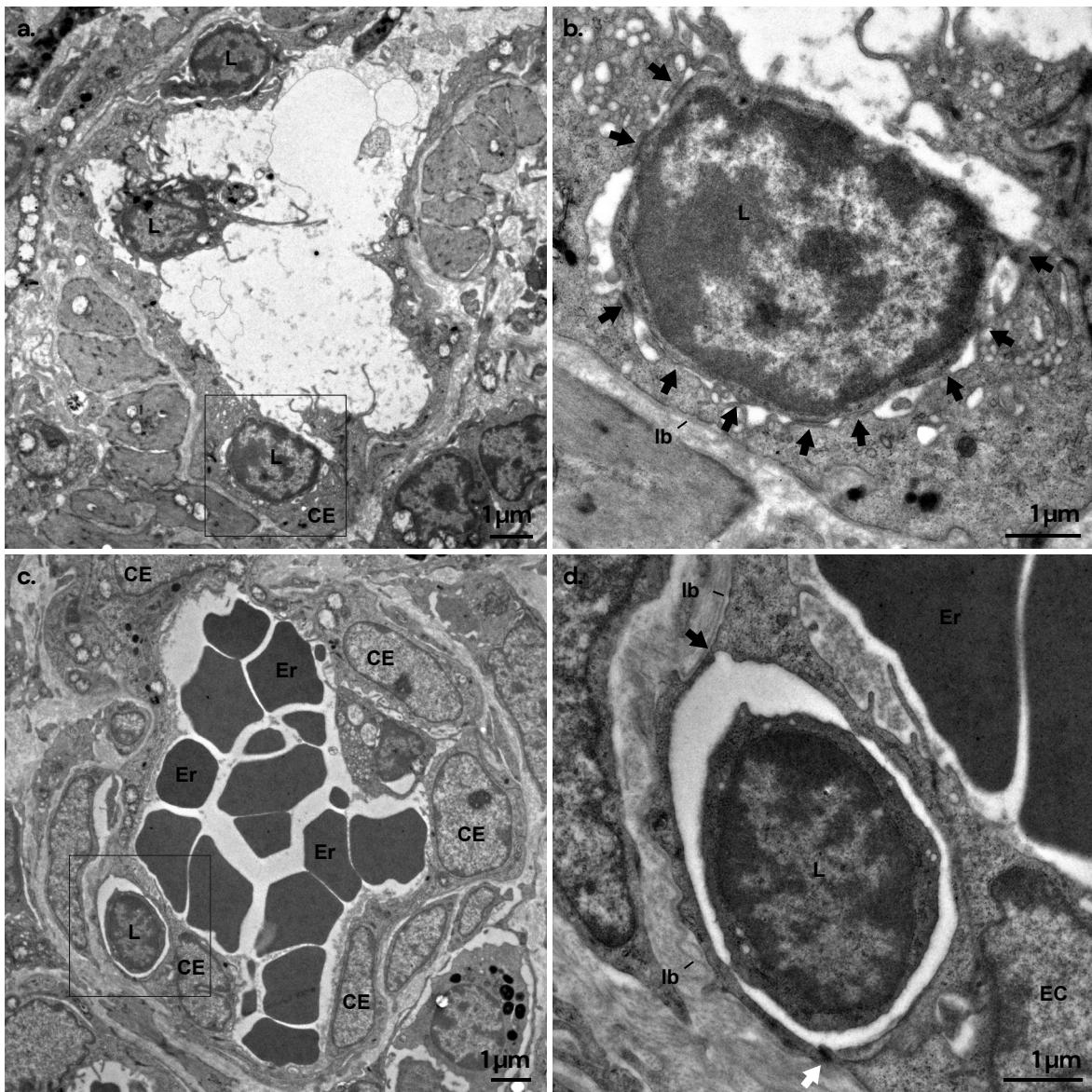
Una vez establecidas las uniones adherentes y basadas en podosomas, las células endoteliales emiten prolongaciones citoplasmáticas para formar copas transmigratorias y englobar las células circundantes. En la **Figura 4.104** se ilustra el inicio de la formación de la copa transmigratoria para engullir un linfocito. En esta reconstrucción 3D, se observa la presencia de numerosos orgánulos vesículo-vasculares (VVO, del inglés Vesiculo-Vacuolar Organelles) individuales, que se fusionan entre sí en lugares cercanos a los podosomas y las *podoprints* de las células endoteliales.

a.



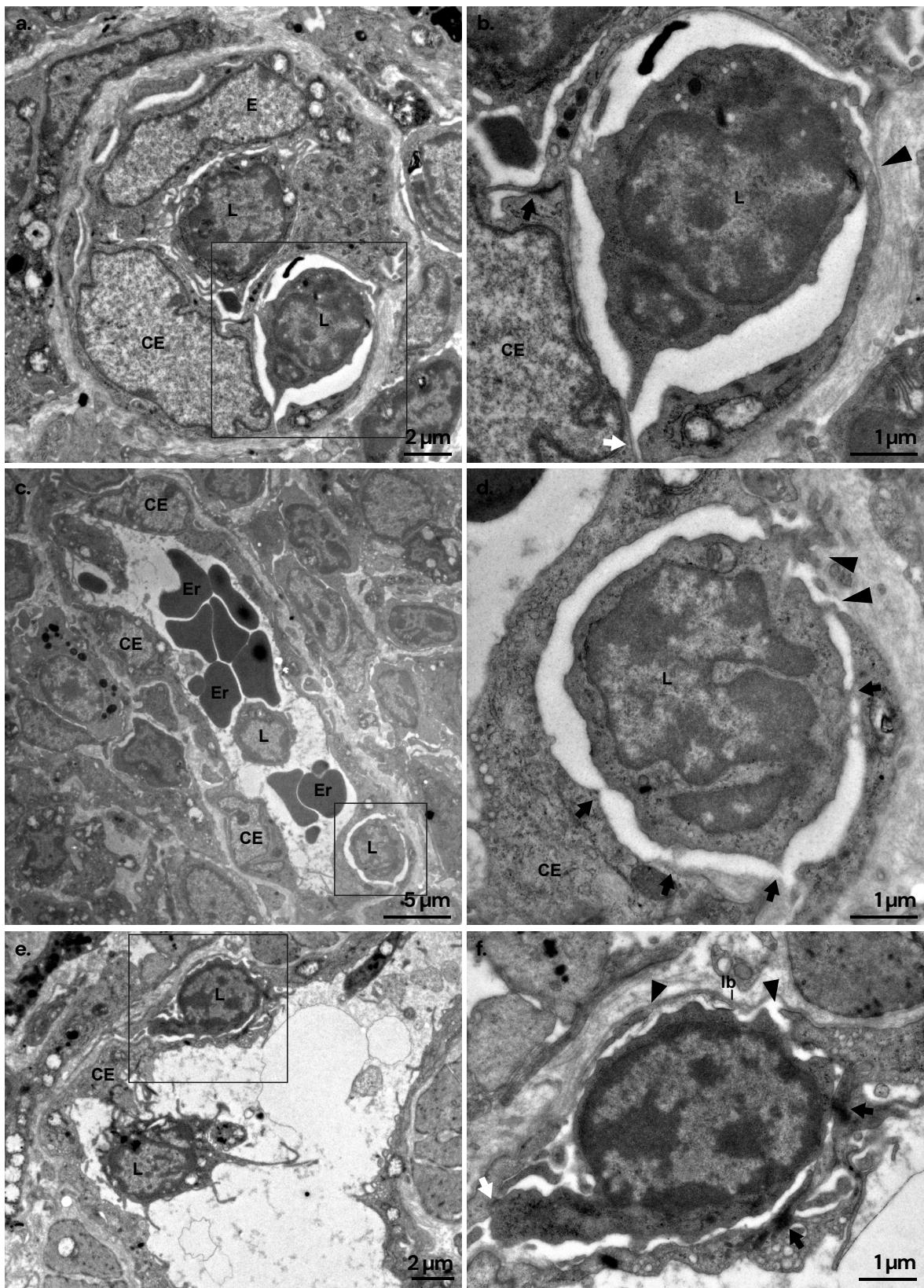
**Figura 4.104.** Las células endoteliales emiten prolongaciones citoplasmáticas para englobar una célula inmune en la copa transmigratoria. (a) Reconstrucción 3D de un capilar a partir de 12 secciones ultrafinas (0.6 μm). (b) Micrografía de referencia de la reconstrucción. (c) A través de podosomas (flecha) y pequeñas protuberancias similares a podosomas (cabezas de flecha) las células endoteliales contactan con la célula circulante. (d) El PC emite pequeñas prolongaciones para contactar con las células endoteliales.

Las copas transmigratorias (**Figura 4.105 a-b**) evolucionan a cúpulas endoteliales cuando las prolongaciones de las células endoteliales reestablecen sus uniones en la región luminal y el linfocito está completamente dentro del endotelio (**Figura 4.105 c-d**). Estos domos endoteliales forman poros endoteliales que evitan la fuga al exterior y guían a los linfocitos durante la migración a su través.



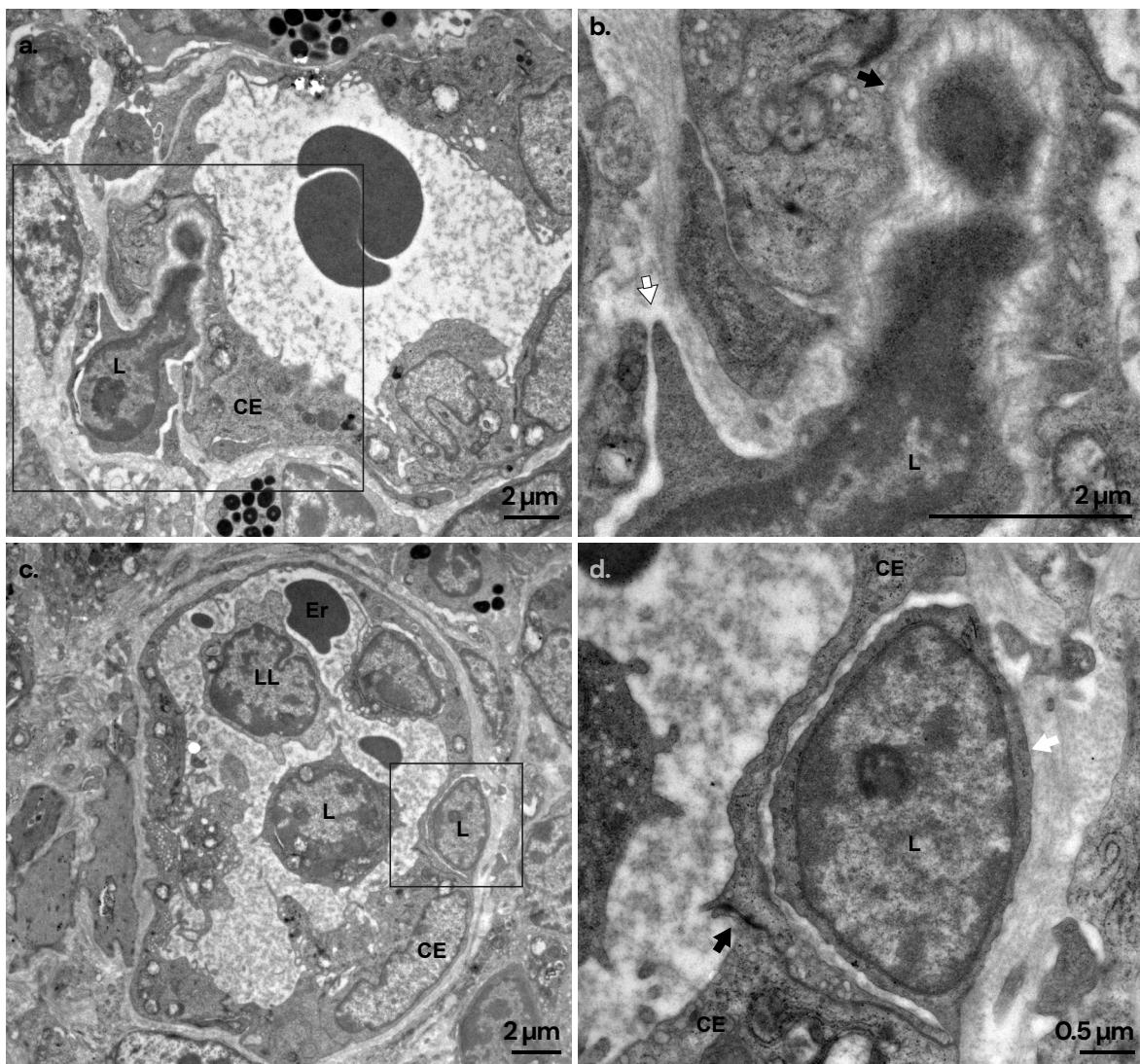
**Figura 4.105.** Formación de copas transmigratorias y domos endoteliales. (a) El linfocito empieza a ser engullido por la copa transmigratoria de la célula endotelial. (b) Detalle de los contactos adherentes en la cúpula transmigratoria (flechas). (c) El linfocito es totalmente englobado por el domo endotelial, que ya está completamente formado. (d) Detalle de las uniones de las células endoteliales (unión adherente: flecha negra, ausencia de unión: flecha blanca). Er: eritrocito, L: linfocito, EC: célula endotelial, Im: lámina basal.

Para abrir las células endoteliales en la región del parénquima linfático, de los linfocitos emergen uno o más podosomas invasivos que abren espacio en el endotelio (**Figura 4.106 a-b**). Hasta este paso de la migración, la membrana basal permanece intacta y los linfocitos mantienen las uniones adherentes con el endotelio (**Figura 4.106 c-d**). Los podosomas de mayor tamaño parecen generar aberturas más grandes en las células endoteliales (**Figura 4.106 e-f**). La salida de los linfocitos es posible gracias a la separación de las células endoteliales. Aunque las células endoteliales están separadas en la región parenquimatosa para la salida del linfocito, restablecen sus uniones en la región del lumen de los vasos (**Figura 4.106 f**).



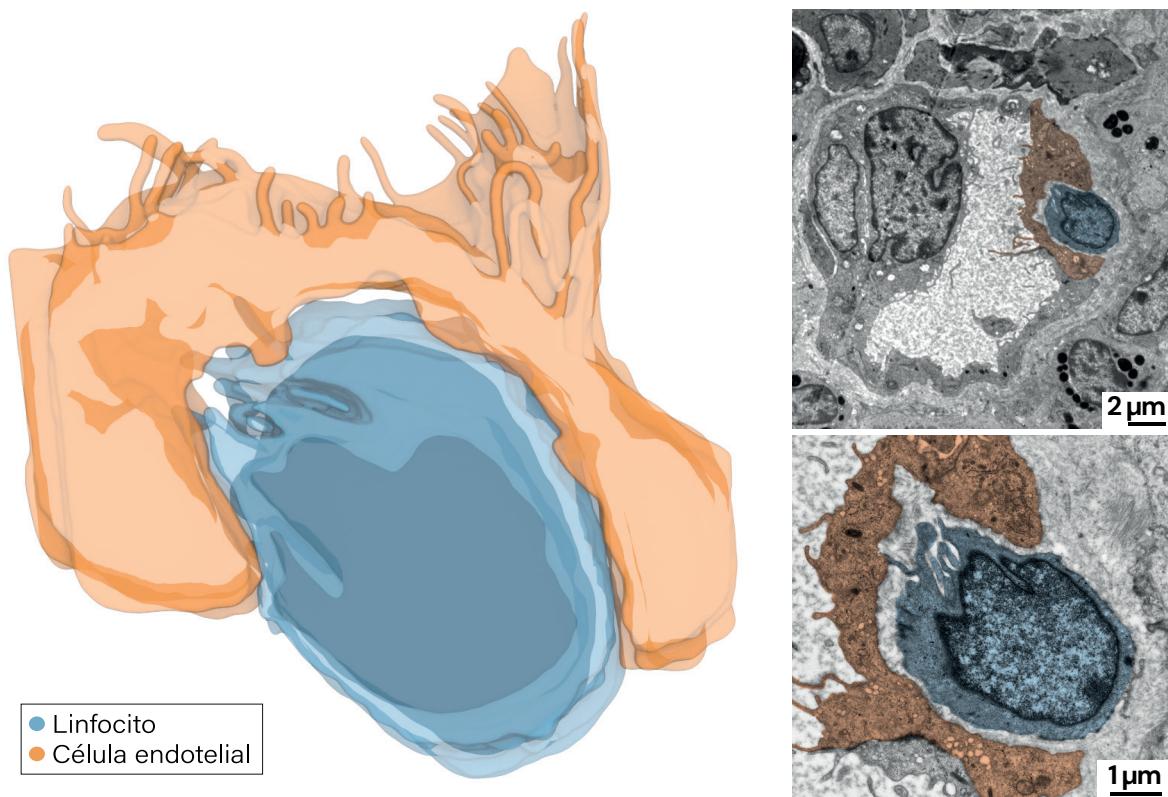
**Figura 4.106.** Formación de cúpulas endoteliales y proyección de podosomas. (a) Linfocito dentro del domo endotelial de un capilar. (b) Célula endotelial restablece sus uniones (flecha negra) y los podosomas emergen del linfocito para abrir el domo endotelial (flecha blanca) (CE: célula endotelial, L: linfocito, lb: lámina basal). La membrana basal permanece intacta (punta de flecha). (c) Un linfocito comienza a salir del domo endotelial. (d) En el domo se observan uniones celulares con refuerzo electrondenso (flechas) y podosomas que comienzan a abrir la pared endotelial (cabezas de flecha). El podosoma del linfocito (punta de flecha) separa físicamente el endotelio. (e) En el interior del domo endotelial un linfocito exhibe un gran podosoma (flecha blanca). (f) La lámina basal permanece intacta y la célula endotelial se abre (puntas de flecha). El endotelio reestablece sus uniones en el lumen (flecha negra).

El poro que crean en el endotelio a través de los podosomas sirve como vía de escape en la última fase del MTE. La cambiante morfología de los linfocitos sugiere alta plasticidad de estas células durante el MTE. Durante su salida del endotelio, los linfocitos reorganizan sus prolongaciones citoplasmáticas para facilitar el desplazamiento (**Figura 4.107 a-b**). En otras ocasiones, la pared endotelial queda completamente abierta para que el linfocito escape (**Figura 4.107 d-e**). En esta fase de la MTE, la membrana basal ya no es visible.



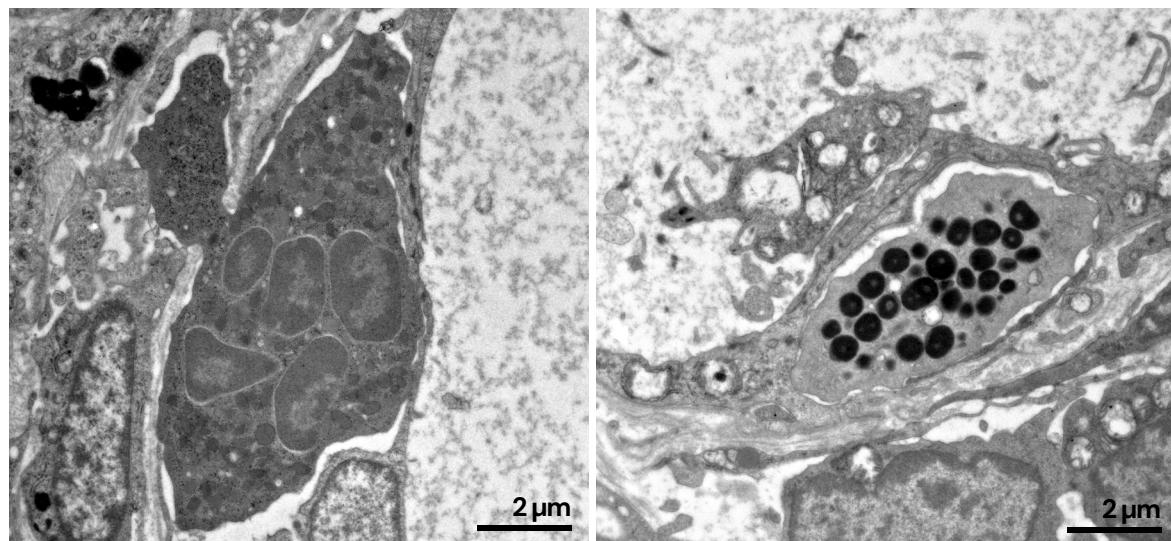
**Figura 4.107.** Apertura de las células endoteliales para la salida de los linfocitos. (a) Un linfocito comienza a salir de la célula endotelial. (b) Detalle del refuerzo electrondenso de unión entre la célula endotelial y el linfocito (flecha negra). El podosoma que emerge del linfocito (flecha blanca) le ayuda a alejarse de la célula endotelial. No se observa la membrana basal. (c) El domo endotelial está completamente abierto en el lado del parénquima del ganglio linfático, permitiendo la salida del linfocito. (d) Las uniones de las células endoteliales están completamente restablecidas (flecha negra). No se observa membrana basal.

Incluso cuando el domo endotelial está completamente abierto para la extravasación celular, algunos linfocitos producen pequeñas extensiones para facilitar la salida ([Figura 4.108](#)).



**Figura 4.108.** Los linfocitos adaptan su morfología para facilitar la extravasación. Reconstrucción 3D a partir de 8 secciones ultrafinas y micrografías de referencia de la reconstrucción.

En el proceso inflamatorio estudiado, los linfocitos son las células que más migran. No obstante, también pueden observarse otros tipos celulares, como neutrófilos y eosinófilos ([Figura 4.109](#)).



**Figura 4.109.** Migración transcelular de neutrófilos y eosinófilos. (a) Un neutrófilo con núcleo multilobulado exhibe un gran podosoma para separarse de las células endoteliales y salir de la cúpula endotelial. (b) Un eosinófilo se encuentra en el interior del domo endotelial.

Una vez que los leucocitos han atravesado el endotelio, pueden infiltrarse en los tejidos circundantes, donde participan en la respuesta inflamatoria crónica, contribuyendo a la formación de granulomas y a la respuesta frente a la inflamación.





A scanning electron micrograph (SEM) showing a dense, overlapping cluster of numerous red blood cells. The cells are biconcave discs with a slightly granular surface texture. They are set against a solid black background, creating a high-contrast image where the red color of the cells is prominent.

# Capítulo 5. Discusión

El marcaje del GC mediante el tatuaje con suspensiones de carbono es cada vez más utilizado en pacientes de cáncer de mama previa QTNA. Hasta el momento, se han tatuado más de 800 GC en diferentes ensayos clínicos,<sup>207,209,222,277,278,212–214,216–219,221</sup> lo que sugiere que, a pesar de sus aparentes ventajas frente a otros métodos, todavía no se ha extendido su uso en la gran mayoría de los centros. Esta estrategia es de bajo coste, aumenta las tasas de identificación en relación a otras técnicas,<sup>279</sup> no requiere equipos especializados y minimiza las molestias adicionales para la paciente, por lo que constituye una alternativa prometedora para el marcaje del GC en el campo de la cirugía oncológica.<sup>280</sup> Sin embargo, los materiales disponibles para el tatuaje del GC se limitan a suspensiones de carbono utilizadas en la clínica con otros propósitos. Por tanto, se requiere el desarrollo de materiales específicos para la optimización de la técnica. En esta Tesis, pretendemos aportar una nueva forma de tatar los GC, así como estudiar el efecto de diferentes vectores de marcaje en animales de experimentación para preseleccionar materiales candidatos aplicables en futuros ensayos clínicos.

Para los estudios experimentales utilizamos los ganglios linfáticos mesentéricos de cerdos de raza *White Landrace* por la similitud en el tamaño de los ganglios linfáticos porcinos y humanos. En otros mamíferos de pequeño tamaño, como ratones o conejos, no hubiera sido posible evaluar la dosis de marcaje, ni habría sido posible simular la identificación intraoperatoria. Sin embargo, la mayor limitación de este modelo animal es que en los ganglios linfáticos porcinos la corteza y la médula presentan una organización parcialmente invertida en comparación con los humanos.<sup>275</sup> En la corteza se encuentran principalmente agregados de linfocitos y células dendríticas.<sup>122,125,126</sup> Bajo el microscopio óptico y electrónico, los linfocitos son fácilmente reconocibles, y aparecen altamente empaquetados, especialmente en las regiones de los centros germinales. Los linfocitos de la corteza residen en una matriz reticular formada por las células del estroma. Las células del estroma de los ganglios linfáticos estructuran la arquitectura del ganglio, promoviendo un entorno específico de sitio que favorece y regula las interacciones y funciones de las células inmunitarias.<sup>281</sup> En nuestro estudio ultraestructural, encontramos ambos tipos celulares en el ganglio linfático. De hecho, observamos pequeños contactos entre linfocitos cercanos, así como con otros tipos celulares, lo que implica una cooperación activa. Además, observamos células reticulares con características similares a las de FRC, DRC y FDC. Sin embargo, dado que estos subtipos celulares han sido escasamente descritos a nivel ultraestructural, su identificación inequívoca solo es posible con técnicas inmunohistoquímicas.

Se ha propuesto que las células estromales derivan de las MSC presentes en el ganglio linfático, cuya presencia ha sido recientemente descrita en el ganglio linfático.<sup>136,282</sup> Además, dada la función inmunorreguladora atribuida a las MSC, actualmente se acepta que funcionan como reguladoras de las células inmunes en el ganglio linfático.<sup>282,283</sup> En nuestro estudio ultraestructural encontramos células mesenquimales caracterizadas por la presencia de cilio primario, además de núcleos voluminosos, escasos orgánulos y abundantes polirribosomas en su citoplasma. Las células similares a MSC (o ICC-like) las encontramos en todas las regiones del parénquima ganglionar y en la región de la cápsula, por lo que podría contribuir a diferentes funciones dependiendo de su localización en el ganglio.

En la región de la médula, los linfocitos se encuentran menos organizados y menos empaquetados que en la región cortical.<sup>122,125,126</sup> Sin embargo, aunque los linfocitos suelen considerarse como células libres, en nuestro estudio destacamos la presencia de numerosos contactos que establecen con células vecinas a través de pequeñas prolongaciones de su citoplasma, lo que sugiere una coordinación funcional bien establecida entre ellos. Además de linfocitos T y B, la médula es rica en células plasmáticas, macrófagos, y células dendrítico/reticulares, así como granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y mastocitos.<sup>122,125,126</sup> En nuestro estudio ultraestructural encontramos numerosas células plasmáticas, macrófagos (y monocitos, sus precursores). Sin embargo, la presencia de granulocitos se limitó a eosinófilos y neutrófilos, siendo estos primeros los más predominantes. No observamos basófilos ni mastocitos, por lo que son menos frecuentes en la médula del ganglio linfático.

La cápsula del ganglio linfático consiste en tejido conjuntivo denso irregular, compuesto por elastina, colágeno y fibroblastos.<sup>124</sup> En nuestro estudio ultraestructural, observamos numerosos fibroblastos y capilares rodeados de fibras de colágeno/elastina, aunque también encontramos otros tipos celulares menos caracterizados en el ganglio linfático, incluyendo las CMM. En todas las regiones del ganglio aparecen diferentes estructuras vasculares y linfáticas. En los vasos sanguíneos, observamos numerosas células similares a pericitos (PC-like) unidas a las células endoteliales a través de uniones adherentes y de tipo peg-and-socket. Se sabe que los PCs constituyen una población celular heterogénea,<sup>144,145</sup> aunque se ha propuesto que las MSC pueden diferenciarse a partir de PCs.<sup>143</sup> En nuestros estudios, observamos la presencia de células similares a MSC cerca de PCs ambas mostrando cilio primario, lo que es compatible con esta hipótesis.

Los estudios clínicos donde marcan el GC con tatuajes de carbono utilizan suspensiones con partículas de carbono, aprobadas por la FDA para otros propósitos quirúrgicos y principalmente distribuidas bajo las marcas comerciales Spot®, CARBO-REP® y Black Eye®.<sup>207,209,212–214,216–218,277,278</sup> Sin embargo, todavía no hay estudios que analicen el efecto biológico de las variables físico-químicas de las partículas de carbono, la dependencia de la dosis o el uso de materiales sustitutos del carbono para el marcaje del GC. Por tanto, en este trabajo, hemos sintetizado y caracterizado seis vectores de marcaje diferentes para analizar el efecto: de la encapsulación de nanopartículas de carbono en matrices poliméricas, del tamaño de partícula, de la concentración de partículas inoculadas, de la sustitución de carbono por melanina, de la cinética de degradación del polímero base y de la incorporación de cloroquina en las partículas.

La encapsulación de fármacos/partículas en matrices poliméricas reduce su potencial citotoxicidad.<sup>284</sup> Por tanto, inicialmente planteamos que la encapsulación de C-NPs, similares a las utilizadas en los estudios clínicos, en matrices poliméricas de PLGA podría reducir la citotoxicidad en el GC además de prolongar su permanencia reduciéndose su lavado. Para analizar este efecto, sintetizamos nanopartículas de PLGA con C-NPs encapsuladas para compararlas con las inoculaciones de C-NPs sin encapsular. Para la síntesis de NPs de PLGA encapsulando C-NPs (CS) se utilizó el método de emulsión simple de tipo o/w previamente utilizado en el grupo de investigación. En esta Tesis optimizamos la concentración de PLGA RG504H (5, 10, 15 y 20 mg/ml) durante la síntesis de CS para estudiar su efecto en el tamaño de partícula final. Otros autores han demostraron que el aumento de la concentración de PLGA provoca una disminución del tamaño de las partículas, atribuyendo este fenómeno a la actividad superficial del PLGA y a la elevación de la viscosidad, donde concentraciones más altas dan lugar a tamaños de partícula más pequeños.<sup>285,286</sup> Sin embargo, no observamos diferencias significativas en el diámetro de partícula. Por tanto, continuamos el proceso de optimización utilizando PLGA a una concentración de 10 mg/ml, dado que minimiza el uso de polímero y mostró coloides más homogéneos en tamaños de partícula ( $130 \pm 26$  nm, DSR: 20.2 %). Así mismo, para optimizar la síntesis y maximizar la intensidad “negruzca” de las partículas realizamos diferentes emulsiones variando la concentración de C-NPs (0.1, 0.2, 0.5 y 1 mg/ml). Dado que no se observaron diferencias significativas en la morfología y tamaño de las partículas sintetizadas, se continuó a concentración 1 mg/ml por mostrar mayor intensidad negruzca a nivel macroscópico. Bajo estas condiciones se mantuvo el tamaño ( $123 \pm 32$  nm), la morfología y la dispersión de tamaños del coloide (DSR: 25.9 %). En los estudios de citotoxicidad, observamos que las C-NPs no encapsuladas eran citotóxicas (viabilidad 46–70 %) en las líneas MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama) y J774 (macrófagos) las dosis a 0.05 y 0.1 mg/ml, mientras que las C-NPs encapsuladas en NPs de PLGA mostraron tasas de viabilidad por encima del 95 % en estas mismas concentraciones, lo que indica que la encapsulación de C-NPs en polímeros reduce su citotoxicidad *in vitro*.

La proporción de láctico:glicólico (LA:GA) del PLGA afecta a la velocidad de degradación del polímero, siendo ésta más lenta cuanto mayor sea la proporción de láctico.<sup>287–289</sup> Para valorar el efecto de la velocidad de liberación de las C-NPs, sintetizamos las NPs con dos polímeros diferentes: PLGA RG504H y RG858S, con una composición LA:GA de 50:50 y 85:15, respectivamente. Con el PLGA RG858S se realizó la misma optimización que con el RG504H, obteniendo partículas de un tamaño promedio de  $121 \pm 35$  nm (DSR: 21.5 %), similar al de las partículas basadas en PLGA RG504H. No obstante, la carga inicial de C-NPs fue mayor en las NPs de PLGA RG858S (37.5 % en peso) en relación con las de RG504H (12.5 % en peso). Para estudiar la liberación de las C-NPs sobre ambas NPs realizamos estudios de liberación *in vitro*. Como era esperable, las NPs de PLGA RG858S liberaron las C-NPs ~1.3 veces más lento que las de RG504H ( $0.6 \pm 0.1$  y  $0.8 \pm 0.5$  % tras 4 semanas, respectivamente). Estas diferencia en la velocidad de liberación fue inferior a lo descrito por otros autores, donde el PLGA 85:15 muestra una tasa de degradación un 40 % más lenta que la del PLGA 50:50.<sup>248</sup> Teóricamente, la degradación de NPs de PLGA RG504H ocurre a las 3–5 semanas, mientras que en las NPs de PLGA RG858S ocurre a las 6–8 semanas.<sup>249</sup> En esta Tesis observamos liberaciones de C-NPs más lentas, en ambos casos inferior al 1 % tras 4 semanas. La reducida tasa de liberación en relación con la de otros fármacos puede deberse al gran tamaño de C-NPs cargadas, lo que requiere de altas tasas de degradación de polímero para liberar completamente la partícula y a la naturaleza hidrófoba del C-NPs. No obstante, la ratio polímero/fármaco (o carga) afecta a la tasa de liberación del compuesto encapsulado. Dado que esta ratio es mayor en el caso de las NPs de PLGA RG858S, es posible que haya reducido el tiempo de degradación y la cinética de liberación no únicamente sea dependiente de la proporción LA:GA.<sup>290</sup>

El efecto del tamaño de partícula afecta a la biodistribución de las partículas. En el ganglio linfático, se recomienda la inoculación de partículas con un tamaño  $>100$  nm para maximizar la estabilidad y la persistencia.<sup>159,231,232</sup> No obstante, existe mayor probabilidad de diseminación linfática de partículas en el rango nanométrico en relación al micrométrico.<sup>160</sup> Por tanto, en esta Tesis sintetizamos NPs (en el rango nanométrico) y MPs (en el rango micrométrico) para analizar la influencia del tamaño. Las MPs fueron obtenidas por *electrosprayado* y mostraron un tamaño de  $1.1 \pm 0.4$   $\mu\text{m}$  ( $\sim 8\text{-}9$  veces más grandes que las NPs). Estas MPs únicamente fueron sintetizadas utilizando PLGA RG504H, dado que la síntesis con el PLGA RG858S redujo la pigmentación negruzca de las MPs y fue descartada. Este efecto pudo deberse a que la proporción LA:GA afecta la cristalinidad del polímero, pudiendo afectar a sus propiedades ópticas.<sup>291</sup> Además la potencial formación de agregados en el interior del PLGA favorecería su observación visual. El PLGA RG858S al tener mayor proporción del componente más hidrófobo (LA) puede inducir una mejor interacción y dispersión de C-NPs en su interior reduciéndose la formación de agregados y dificultándose su observación visual. A pesar de que se utilizaron diferentes técnicas de síntesis para la producción de NPs y MPs basadas en PLGA RG504H, éstas fueron comparables en los estudios experimentales dado que mostraron proporciones similares de C-NPs-PLGA (13.5–86.5 en las MPs y 12.5–87.5 % en las NPs). Además, en las MPs mostraron niveles de citotoxicidad similares a las NPs, no mostrando viabilidades por debajo del 84 % a las concentraciones analizadas en los estudios *in vitro*.

Planteamos el uso de melanina como elemento “colorante” para la sustitución de las C-NPs, dado que al tratarse de un pigmento endógeno podría potencialmente reducir la citotoxicidad.<sup>292</sup> Además, la melanina presenta propiedades biológicas antioxidantes, fotoprotectoras, antiinflamatorias y antitumorales en melanomas.<sup>293</sup> Para la síntesis de NPs de PLGA encapsulando melanina utilizamos el método de emulsión doble de tipo w/o/w y optimizamos la síntesis de NPs variando la concentración (0.15, 0.3, 0.5 y 1.0 mg/ml) de melanina. Únicamente variamos la concentración de melanina dado que el estudio del efecto de la concentración de polímero en la síntesis ya había sido estudiado en las síntesis de NPs anteriores y se mantuvo a 10 mg/ml. También utilizamos únicamente PLGA RG504H para la síntesis dado el alto coste de la melanina y la necesidad de reducir variables en etapas posteriores de la investigación. De nuevo, no observamos diferencias morfológicas significativas en las NPs sintetizadas utilizando diferente concentración de melanina, por lo que se seleccionó la síntesis de mayor concentración de melanina para maximizar la coloración macroscópica en el coloide. Bajo estas condiciones, estimamos que el  $\sim 23.5$  % en peso de las NPs es melanina, siendo ligeramente superior a la carga de C-NPs en las NPs de PLGA RG504H. En este caso, encontramos que *in vitro* se libera el  $\sim 24$  % de melanina tras 4 semanas. En otros estudios de liberación de melanina de NPs de PLGA (LA:GA 50:50) se han descrito liberaciones del 85 % tras 25 días utilizando condiciones de ensayo similares.<sup>294</sup> La tasa de degradación del polímero está sujeto a las características físico-químicas de las NPs y a las condiciones del ensayo.<sup>295</sup> Sin embargo, las NPs sintetizadas en esta Tesis liberaron bajas tasas de melanina en relación a lo publicado por otros autores. De acuerdo con lo descrito en trabajos anteriores,<sup>293</sup> las NPs cargadas de melanina no mostraron citotoxicidad en las líneas celulares MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamario), fibroblastos y J774 (macrófagos), con viabilidades de entre el 79 y el 100 %. Sin embargo, solo fueron menos citotóxicas que las NPs cargadas con C-NPs en la línea celular J774 (macrófagos), mientras que en la línea MDA-MB-231 y de fibroblastos mostraron una citotoxicidad ligeramente superior.

En paralelo, planteamos la coencapsulación de CQ y C-NPs en las NPs y MPs de PLGA con el objetivo de reducir/inhibir la internalización celular de las NPs/MPs y así reducir su degradación intracelular y potenciar su durabilidad extracelularmente para que perdurase el marcaje. Se ha descrito que la CQ produce la acidificación de los lisosomas, lo que conduce a la inhibición de varios procesos celulares, incluyendo la inhibición/reducción de la fagocitosis y de la endocitosis dependiente de clatrina.<sup>296,297</sup> En la síntesis de NPs por emulsión simple, la CQ simplemente se añadió en la fase acuosa, mientras que en las MPs la producción se optimizó configurando el electroporador para la técnica coaxial. Sin embargo, las MPs donde coencapsulamos CQ y C-NPs mostraron (de la misma manera que al cambiar el polímero base) una coloración de baja intensidad (visualmente grisácea), por lo que se descartó su uso para esta aplicación. La coencapsulación de CQ en las NPs de PLGA RG504H y PLGA RG858S no produjo diferencias en su morfología ni en su tamaño ( $112 \pm 24$  nm y  $135 \pm 26$  nm, respectivamente). Al igual que en el caso de la melanina, la CQ mostró tasas de liberación muy superiores a las C-NPs, liberando  $\sim 11\%$  (PLGA RG504H) y el  $\sim 6\%$  (PLGA RG858S). Las NPs con CQ coencapsulada mostraron citotoxicidad en todas las líneas celulares a todas las dosis, excepto a 0.01 mg/ml. Estos resultados de citotoxicidad están en línea con los reportados por otros autores.<sup>298,299</sup>

Como resultado, se produjeron 6 tipos de NPs/MPs diferentes: CS (C-NPs encapsuladas en NPs de PLGA RG504H), CS-P858 (C-NPs encapsuladas en NPs de PLGA RG858S), CS-CQ (C-NPs y CQ coencapsuladas en NPs de PLGA RG504H), CS-P858-CQ (C-NPs y CQ coencapsuladas en NPs de PLGA RG504H), CE (C-NPs encapsuladas en MPs de PLGA RG504H) y M (melanina encapsulada en NPs de PLGA RG504H). Las C-NPs no encapsuladas se utilizaron como controles. Estas C-NPs, NPs y MPs se dispersaron en un medio viscoso de MC (1.5 %p/v) a dos concentraciones diferentes (10 y 20 mg/ml) para facilitar su administración en el ganglio linfático.

Para estudiar el efecto de los vectores de marcaje en animales de experimentación, planteamos dos grupos de animales para evaluar la durabilidad de dichos marcas: a corto plazo y a largo plazo. El tiempo de permanencia de los ganglios tatuados se seleccionó para que fuera equivalente a la duración del periodo QTNA en el humano. Los estudios a corto plazo incluyeron 4 cerdos estabulados durante 1, 2, 4 y 6 semanas respectivamente. Este primer trabajo experimental se realizó como prueba de concepto para asegurar la permanencia del tatuaje en el ganglio, por lo que solo se inocularon los vectores: CS20, CE20, M20 y C-NPs (control). En los estudios a largo plazo (16 semanas) se incluyeron un total de 6 animales: 3 de ellos para continuar los estudios con los vectores CS10, CS20, CE10, CE20, M10, M20 y C-NPs (control), y otros 3 para realizar estudios de "optimización" con el objetivo de analizar el efecto del cambio de polímero y la incorporación de cloroquina a largo plazo. Por tanto, en este grupo de animales se administraron CS10, CS20, CS10-P858, CS20-P858, CS10-CQ, CS20-CQ, CS10-P858-CQ y CS20-P858-CQ.

En los estudios experimentales practicamos una laparotomía media amplia e inoculamos intraganglionarmente 0.2 ml de vector de marcaje en cada ganglio linfático mesentérico, a concentración variable (10 o 20 mg/ml). En otros estudios clínicos se han utilizado dosis promedio de  $0.7 \pm 0.8$  ml (en un rango de 0.1 a 3 ml).<sup>207,209,212-214,216-218,277,278</sup> En el estudio clínico multicéntrico TATTOO, los ganglios linfáticos se tatuaron con 3 ml de suspensión de carbón comercial Spot® o 0.6 ml de CARBO-REP®.<sup>214</sup> Goyal *et al.*<sup>217</sup> tatuaron el GC con 2 ml de Spot® o Black Eye®. Natsiopoulos *et al.*<sup>207</sup> inyectaron 0.3-0.7 ml de Spot®. Allweis *et al.*<sup>209</sup> inocularon 0.2-0.5 ml de Spot®. Patel *et al.*<sup>213</sup> utilizaron 0.1-1 ml de Spot®. Dostalek *et al.*<sup>218</sup> tatuaron con 0.1-0.5 ml de Carbosorb® Choy *et al.*<sup>278</sup> emplearon 0.1-0.5 ml de Spot® y Park *et al.*<sup>212</sup> tatuaron los ganglios con 0.5 ml de Spot®. Sin embargo, en nuestro estudio *in vitro* e *in vivo* observamos que 0.2 ml eran suficientes para tatuar la superficie ganglionar, reduciendo así el material extraño en el organismo.

Tras el tiempo de estabulación de cada grupo animales, simulamos el proceso de DAD para la exéresis selectiva de cada ganglio linfático. En los estudios a corto plazo (1-6 semanas, n=36 ganglios tatuados) la tasa de identificación intraoperatoria varió del 77.8 al 100 % dependiendo del vector utilizado (CS20, CE20 o M20), mientras que solo se identificaron el 50 % de los ganglios marcados con C-NPs de control. En los estudios a largo plazo (16 semanas, n=76 ganglios tatuados), la tasa de identificación varió del 66.7 al 83.3 % en los vectores CS20, CE20 y M20. Sin embargo, en los estudios a largo plazo ningún ganglio tatuado con C-NPs de control fue identificado. Por tanto, en nuestro estudio, la encapsulación con C-NPs mejoró sustancialmente la persistencia del tatuaje en el ganglio linfático. No obstante, se trata de estudios preliminares que deben ser confirmados con un mayor número de muestras. En los vectores de optimización (CS10, CS20, CS10-P858, CS20-P858, CS10-CQ, CS20-CQ, CS10-P858-CQ y CS20-P858-CQ) la tasa varió del 50 al 100 %. Estos resultados coinciden con los reportados en otros estudios clínicos y preclínicos, con una tasa de identificación promedio del 91.2  $\pm$  11.7 % (64-100 %).<sup>207,209,222,277,278,212-214,216-219,221</sup> Así mismo, encontramos que la facilidad de identificación de los ganglios tatuados se reduce de manera significativa con el tiempo ( $p < 0.001$ ). Sin embargo, no encontramos diferencia entre las concentraciones a 10 y 20 mg/ml, lo que sugiere que esta primera es suficiente para el marcate del ganglio. En otro estudio se observó mayor diseminación del tatuaje a medida que aumentaba el tiempo entre el tatuaje y la cirugía, mientras que el mismo estudio sugiere que la concentración de partículas no afecta a la facilidad de identificación.<sup>217</sup> Sin embargo, una mayor carga de partículas en el ganglio linfático reduce necesariamente los tiempos de tratamiento/eliminación el material extraño por parte del organismo, por lo que la mejora en la identificación visual del ganglio tatuado es razonable. En los estudios a largo plazo, el área marcada fue similar en todos los marcas (entre el 7.7 y el 12.9 %) a excepción de las C-NPs de control, que únicamente marcaron un promedio del 2.5 % de la superficie ganglionar. Encontramos que el área marcada se reduce con el tiempo de manera significativa ( $p < 0.001$ ), lo que concuerda con la reducción de la tasa de identificación anterior. Además, como era esperable, el aumento de la concentración incrementó el área marcada ( $p = 0.019$ ).

En ensayos clínicos anteriores describen una correlación entre el GLT y el GC del  $81.9 \pm 18.6\%$  ( $47.9\text{--}100\%$ ).<sup>207,209,222,277,278,212\text{--}214,216\text{--}219,221</sup> Además, describen una diseminación no deseada del tatuaje por vía linfática en hasta el 17.4 % de los casos.<sup>21,219</sup> En nuestro estudio, no encontramos diseminación a otros ganglios linfáticos en ningún caso, por lo que el 100 % de los GC hubiera correspondido al GLT. Por tanto, el tamaño mínimo de 100 nm parece adecuado para asegurar la estabilidad (y reducir la migración) de las NPs en el ganglio linfático, tal y como sugieren otros autores.<sup>231,232</sup>

En los estudios de microscopía óptica, encontramos que las partículas se localizan tanto en la región interna del ganglio, como en la zona pericapsular y en el tejido adyacente al ganglio, aunque en la mayoría de los casos las partículas aparecen simultáneamente en varias zonas. No obstante, en los estudios a largo plazo (16 semanas) predomina la presencia de partículas en la región pericapsular de los ganglios. En línea con lo anterior, anteriormente se han descrito patrones de diseminación del marcaje con el tiempo,<sup>217</sup> lo que podría explicar la menor presencia de las partículas en la región interna del ganglio. En los estudios a corto plazo, observamos con frecuencia marcaje en la región del tejido adyacente, lo que podría estar asociado a la retención de las partículas en esta zona por la difusión del vector por el canal de la inyección durante el tatuaje del ganglio. De acuerdo con lo anterior, en algunos estudios preclínicos han descrito la difusión de partículas de carbono al tejido adyacente en el 10.7–13.0 % de los casos.<sup>207,217,278</sup> Curiosamente, el tamaño de las NPs y las MPs no mostró ningún efecto sobre la localización de las partículas en el ganglio.

Los tatuajes basados en melanina generaron cúmulos de partículas de mayor tamaño en el ganglio ( $p=0.039$ ). Además, en los marcas CS20 y M20 observamos que los agregados aumentaban de tamaño con el tiempo ( $p=0.007$ ), mientras que los cúmulos formados por el marcaje CE20 mantuvieron su morfología en los estudios a corto y largo plazo. Dentro de los marcas basados en CS20, las NPs de PLGA RG858S generaron cúmulos de mayor tamaño ( $p=0.046$ ), lo que puede ser debido a una menor tasa de degradación del polímero.

En todos los ganglios disecados, en mayor o menor medida, se encontró reacción inflamatoria de tipo cuerpo extraño caracterizada por la presencia de macrófagos y CGM que fagocitaron y aislaron las partículas inoculadas en el ganglio. Este tipo de inflamaciones asociadas a las partículas inoculadas se han descrito previamente en tatuajes en la piel.<sup>300,301</sup> De hecho, aunque algunos autores sugieren que las partículas de carbono son inertes y no citotóxicas, otros autores han observado reacciones inflamatorias en diversos grados.<sup>302–305</sup> Además, en algunos casos encontramos pequeños focos necróticos asociados a la inflamación. Sin embargo, en tatuajes de la piel únicamente se han descrito necrosis extendidas principalmente asociadas a infecciones.<sup>306,307</sup> Un aspecto importante en esta aplicación es garantizar que los tatuajes de carbono no interfieran con el examen patológico del ganglio linfático. Sin embargo, en otros estudios, los patólogos no consideraron que la administración de C-NPs complicara la evaluación histológica.<sup>207,212–214</sup> En nuestro estudio, los marcas basados en melanina fueron los que mayor reacción inflamatoria provocaron ( $p=0.041$ ). De hecho, la inflamación aumentó con el tiempo, lo que puede deberse a que los agregados de melanina libre producen mayor daño a nivel celular. A excepción de estos marcas, en el resto de los casos la extensión del tejido inflamatorio se redujo en el tiempo ( $p=0.002$ ). De hecho, se redujo  $\sim 3$  y  $\sim 1.6$  veces en los marcas CS20 y CE20. Las C-NPs utilizadas como control generaron las mayores reacciones inflamatorias en estudios a largo plazo. Sin embargo, en los estudios a largo plazo desaparecieron las partículas y, por tanto, la inflamación. En este sentido, observamos mayor reacción inflamatoria conforme menor fue el tamaño de las partículas de los vectores de marcaje (NPs de  $\sim 100$  nm o MPs de  $\sim 1\text{ }\mu\text{m}$ ) ( $p=0.044$ ). Este efecto puede estar asociado a una mayor cantidad de C-NPs en estas partículas. Ya que, aunque la proporción de PLGA y C-NPs sea equivalente en ambos casos, las MPs son de mayor tamaño y albergan mayor carga de C-NPs. Como se describe posteriormente en los estudios ultraestructurales, las C-NPs no encapsuladas muestran grandes reacciones inflamatorias y mayor ruptura de los fagolisosomas de los macrófagos, lo que conduce a una mayor tasa de muerte celular. De hecho, también está en línea con los resultados de citotoxicidad *in vitro*, donde comprobamos que las C-NPs encapsuladas reducen la toxicidad de las C-NPs y las MPs son menos citotóxicas que las NPs en la línea celular de macrófagos (J774).

Todavía no se ha descrito el efecto celular del tatuaje de carbono en ganglios linfáticos. Kröger *et al.*<sup>308</sup> demostraron la presencia intracelular de partículas de carbono en células de la epidermis (queratinocitos, células dendríticas y células basales) y en la dermis (macrófagos, mastocitos y fibroblastos). Sin embargo, en nuestro estudio ultraestructural únicamente observamos la internalización de partículas en macrófagos y CGM, además de en el espacio extracelular. Se sabe que la fagocitosis de partículas exógenas por los macrófagos es uno de los principales mecanismos de defensa inmunitaria inna-

ta.<sup>240,309,310</sup> Se sabe que los macrófagos desempeñan un papel crucial en la persistencia de los tatuajes, ya que son las únicas células capaces de capturar y retener las partículas del tatuaje. Slater *et al.*<sup>311</sup> y Baranska *et al.*<sup>312</sup> publicaron micrografías electrónicas de transmisión de macrófagos con partículas del pigmento del tatuaje internalizadas. Lea *et al.*<sup>313</sup> realizaron un estudio ultraestructural donde demostraron que las partículas en tatuajes frescos de tinta negra son internalizadas por células fagocíticas, mientras que a largo plazo son captadas principalmente por fibroblastos dérmicos. En este sentido, estudios *in vitro* también han demostrado mayor captación de las partículas de tinta negra por parte de macrófagos que por queratinocitos o fibroblastos.<sup>314</sup> En nuestro estudio, observamos la fagocitosis de las partículas desde la primera semana tras la inoculación. De hecho, observamos que una vez fagocitadas, las aristas de las C-NPs y de la melanina cristalizada rompen las membranas de los fagolisosomas, derramando las hidrolasas lisosomales al citoplasma celular y conduciendo a la lisis celular. Tras la liberación de las partículas y restos celulares al medio extracelular, nuevos macrófagos se encargan de fagocitar los restos, y así sucesivamente. Por tanto, la renovación de los macrófagos, en lugar de su longevidad, es lo que sustenta la persistencia a largo plazo de los tatuajes en la piel.<sup>312</sup>

En los estudios a largo plazo, se encuentran más C-NPs y melanina no encapsuladas en fagolisosomas de nuevos macrófagos. De hecho, observamos que las partículas de los vectores CS, CE y M reducían su tamaño ~2.1, ~4.2 y ~3.4 veces en relación con los estudios a largo plazo. Aunque *in vitro* la liberación era inferior al 1% tras 4 semanas, la velocidad de degradación del polímero es dependiente del pH del medio,<sup>315</sup> por lo que la degradación del PLGA de las NPs/MPs se acelera por la presencia de las acidez de las enzimas lisosomales. De hecho, en condiciones lisosomales recreadas, la degradación del PLGA se estima cercana al ~40% tras 4 semanas, lo que concuerda con nuestras observaciones *in vivo*.<sup>316</sup>

Asociado a este proceso inflamatorio, estudiamos secuencialmente por microscopía electrónica el proceso de MTE transcelular de linfocitos en el sitio de la infección. Además, reconstruimos en 3D algunos eventos celulares del proceso utilizando cortes ultrafinos seriados para mejorar la comprensión de los mecanismos celulares subyacentes. Aunque la MTE de leucocitos se ha estudiado ampliamente, existen pocos estudios ultraestructurales que documenten todo el proceso transcelular. Los estudios publicados se han realizado en ganglios linfáticos normales o infectados bacteriológicamente de ratas y cerdos,<sup>317-319</sup> piel inducida a inflamación aguda en cobayas,<sup>320</sup> *in vitro* utilizando la línea celular HUVEC (vía paracelular),<sup>321</sup> y en placas de Peyer intestinales de cobayas.<sup>322</sup> Así mismo, algunos estudios más se han centrado en procesos concretos, especialmente en la diapédesis.<sup>323-325</sup> Sin embargo, dado que el modelo experimental utilizado en esta Tesis es adecuado y a que no existen estudios ultraestructurales recientes que unifiquen todos los conceptos "aprendidos" hasta la fecha, consideramos de interés proporcionar una reinterpretación del proceso.

En los ganglios linfáticos mesentéricos, sólo observamos la vía transcelular de acuerdo con otros estudios ultraestructurales, realizados en ganglios linfáticos inguinales y torácicos de cerdo.<sup>318,319</sup> No obstante, también se ha descrito la migración paracelular en tejidos linfoideos, aunque ocurre con menos frecuencia.<sup>317</sup> En las primeras fases de la MTE, durante el reclutamiento de las células inmunitarias, encontramos numerosos linfocitos con múltiples pseudópodos capaces de contactar a larga distancia con el endotelio y las células vecinas, como habían observado previamente Sasaki *et al.*<sup>318</sup>, Azzali *et al.*<sup>322</sup> y Kogushi *et al.*<sup>326</sup> Sin embargo, en muchos estudios ultraestructurales anteriores se ha pasado por alto por tratarse de una fase muy temprana de la MTE y desconocerse este proceso. Tras el reclutamiento, las células inmunitarias se adhieren al endotelio activado. En este proceso, las moléculas de adhesión involucradas han sido bien descritas.<sup>327-330</sup> Sin embargo, los contactos celulares basados en podosomas se han basado casi exclusivamente en estudios de microscopía. De hecho, se han denominado alternativamente como "microvellosidades", protrusiones "finger-shaped" y prolongaciones similares a pseudópodos.<sup>319,322,323,331,332</sup> Recientemente, Carman *et al.*<sup>333</sup> estandarizaron el término de "podosoma" para referirse a estas estructuras y "podoprint" para describir las invaginaciones de la membrana de las células endoteliales que recogen los podosomas durante los contactos celulares. En nuestro estudio, reconstruimos en 3D los contactos basados en podosomas durante el reclutamiento de linfocitos, observando la variabilidad morfológica que muestran estas uniones, siendo similares a las de tipo peg-and-socket y, en ocasiones, mostrando morfologías en forma de "gancho". Recientemente se ha descrito que los orgánulos vesículo-vacuolares (VVO) se han encontrado con una frecuencia 4 veces mayor en las regiones próximas a los podosomas. Esto, unido a la expresión de marcadores como caveolina-1 y las proteínas fusogénicas (incluidas las SNAREs VAMP2/3) en las células endoteliales durante la adhesión de los linfocitos y los podosomas, sugiere que poseen un papel clave durante el reclutamiento.<sup>324,333,334</sup> Así mismo, se ha propuesto que la fusión de VVO puede aumentar

la superficie de la membrana plasmática para permitir que los podosomas penetren progresivamente (o fusionarse directamente para la formación del "poro de migración") y que, además, las VVO pueden transportar receptores de adhesión y quimioquinas (en un proceso conocido como "podo-sinapsis") para comunicarse directamente con las células diana y facilitar el proceso de MTE.<sup>333-336</sup> En nuestra reconstrucción 3D, observamos numerosos VVO (y VVO fusionados entre sí) cerca de los podosomas, mientras que no los observamos en otras células endoteliales en la misma micrografía seriada ni en otras partes del endotelio en diferentes partes de la MTE, lo que refuerza estos hallazgos.

Una vez establecidos los contactos basados en podosomas y las uniones adherentes, las células endoteliales comienzan a formar la copa transmigratoria con prolongaciones citoplasmáticas para engullir las células inmunitarias. En este punto, se mantienen los contactos podosomas-podoprints. Observamos que las células acceden al citoplasma de las células endoteliales y las uniones en el lumen del vaso se restablecen rápidamente para mantener la integridad vascular. De hecho, no encontramos ninguna célula totalmente engullida en el citoplasma de la célula endotelial que no mostrara complejos de unión endotelial, por lo que este mecanismo ocurre rápidamente. De acuerdo con nuestras observaciones, los estudios realizados por Marchesi *et al.*<sup>317</sup> y Balcan *et al.*<sup>331</sup> también demostraron la encapsulación de la célula en cúpulas endoteliales. Sasaki *et al.*<sup>318</sup> no mostraron los linfocitos en las cúpulas endoteliales, pero ilustraron la formación de vasos transmigratorios y la diapedesis final como pasos posteriores de la MTE. Posteriormente, durante la diapedesis, se sabe que los podosomas aumentan de tamaño y se vuelven "invasivos" para generar "poros" endoteliales como camino de salida del endotelio vascular.<sup>333,337</sup> De acuerdo con lo anterior, en nuestro estudio observamos numerosos eventos de apertura del endotelio a través de grandes e invasivos podosomas. Además, describimos que los linfocitos modifican de manera dinámica su morfología para cumplir los requisitos de cada paso. Por ejemplo, durante la salida del endotelio, los linfocitos forman grandes protuberancias citoplasmáticas que utilizan para el "empuje" durante la extravasación, y en la reconstrucción 3D analizamos cómo los linfocitos generan pequeñas extensiones de membrana de manera estratégica en dirección opuesta a la salida para facilitar la migración.

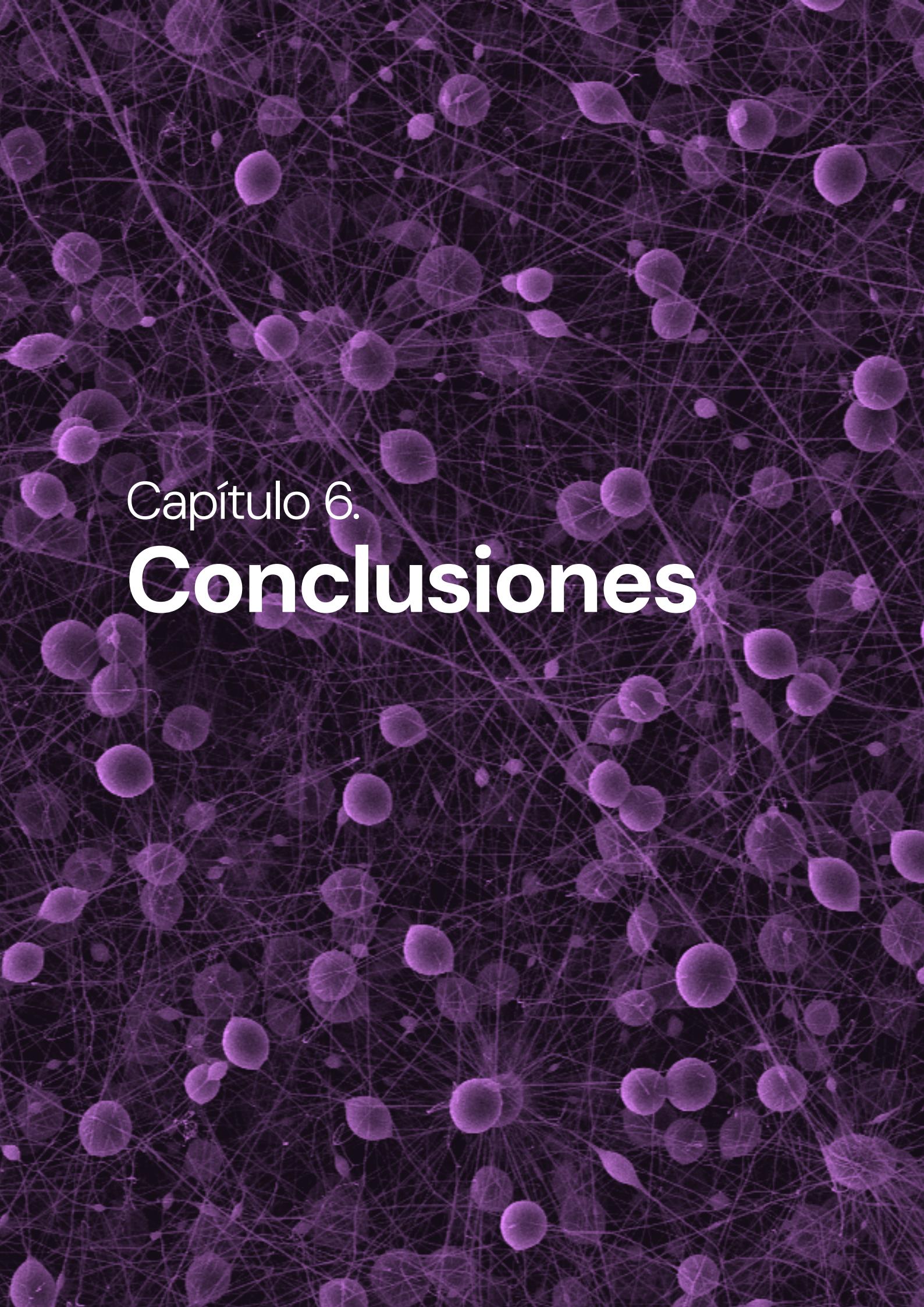
En conclusión, en este trabajo hemos desarrollamos diferentes vectores de marcaje para evaluar *in vitro* e *in vivo* el efecto biológico de diversas propiedades fisicoquímicas de las partículas, incluyendo: el tamaño de partícula, de la concentración de partículas inoculadas, el uso de diferentes elementos "colorantes" (C-NPs y melanina), de la cinética de degradación del polímero base y de la incorporación de CQ en las partículas para su liberación sostenida en el ganglio. Dado que las variables de mayor interés clínico son la tasa de identificación intraoperatoria del GC y la intensidad de la reacción inflamatoria, el uso de MPs en lugar de NPs puede ser más ventajoso ya que (1) las MPs han mostrado una tasa de identificación ligeramente superior y (2) las NPs se han asociado a mayor reacción inflamatoria. La encapsulación de C-NPs en lugar de melanina para proveer de contraste en el marcaje resulta más adecuado por presentar menor reacción inflamatoria. Así mismo, los vectores con partículas concentradas a 20 mg/ml en lugar de 10 mg/ml aumentan las tasas de identificación y no suponen un aumento significativo de la reacción inflamatoria. Finalmente, debería considerarse el uso de partículas con PLGA con degradaciones más lentas para reducir la liberación de C-NPs, ya que en esta aplicación no se busca la liberación sostenida sino mantener retenidas las C-NPs en la matriz polimérica para reducir la citotoxicidad local en el ganglio linfático. Además, en esta Tesis proporcionamos un estudio ultraestructural detallado de los eventos celulares que se desencadenan como respuesta a la inoculación del vector de marcaje, lo que puede resultar de utilidad para el diseño de nuevas estrategias de marcaje ganglionar.

Las principales limitaciones de este estudio han sido:

- El reducido tamaño muestral, tanto de los animales utilizados como de las inoculaciones en cada animal. Se ha utilizado solo el mínimo posible de animales de experimentación con arreglo a las normas europeas de experimentación animal.
- La localización de los ganglios seleccionados para el marcaje (ganglios mesentéricos vs. ganglios axilares) podría enmascarar algún efecto sobre la axila, aunque por el número de ganglios necesarios y la cercanía de los ganglios axilares, resultó imposible utilizar la axila como zona de punción.

El presente estudio ha permitido cribar entre los marcas propuestos y seleccionar vectores candidatos. Por tanto, antes de plantear un ensayo clínico resultaría necesario replicar los estudios realizados utilizando los vectores de marcaje que mejores resultados han demostrado en este proyecto (especialmente, CE20). No obstante, los hallazgos recogidos en esta Tesis sugieren que el uso de suspensiones de carbono convencionales, candidatos en los ensayos clínicos actualmente, son menos eficientes para la identificación del GC y generan mayores reacciones inflamatorias en el ganglio linfático.





## Capítulo 6.

# Conclusiones

- 1.** Los tatuajes realizados en el ganglio linfático con los vectores utilizados en este trabajo demuestran ser una técnica eficaz y sencilla para el marcaje del ganglio linfático durante al menos 4 meses desde la inoculación, mejorando las propiedades de los sistemas utilizados actualmente.
- 2.** La encapsulación de las nanopartículas de carbono (C-NPs) en sistemas poliméricos reduce la citotoxicidad local, aumenta la perdurabilidad del tatuaje y facilita la identificación visual intraoperatoria del ganglio linfático a largo plazo.
- 3.** Todas las partículas estudiadas producen una reacción inflamatoria granulomatosa de tipo cuerpo extraño, siendo ésta dependiente del elemento “colorante” encapsulado, del tamaño de partícula y del tiempo. La reacción inflamatoria fue mayor en los ganglios tatuados con partículas basadas en melanina en relación con las C-NPs. Además, el tamaño de la partícula (NPs de ~100 nm o MPs de ~1  $\mu$ m) también afecta a la intensidad de la reacción inflamatoria, siendo mayor en los tatuajes basados en NPs. En todos los casos a excepción de los ganglios tatuados con melanina, la intensidad de la reacción inflamatoria se redujo conforme aumento el tiempo tras la inoculación del vector de marcaje.
- 4.** Los macrófagos fagocitan todos los tipos de partículas inoculados en el ganglio. Tras su fagocitosis, tanto las C-NPs como los fragmentos de melanina cristalizada rompen las membranas de los fagolisosomas, conduciendo a la lisis celular.
- 5.** La tasa de identificación intraoperatoria de los ganglios linfáticos tatuados depende de la concentración de partículas en el vector de marcaje, aunque se reduce hasta un 30 % cuatro meses después de la inoculación. Los vectores con partículas a concentración de 20 mg/ml mostraron tasas de identificación similares que los vectores concentrados a 10 mg/ml, por lo que ésta última dosis de NPs/MPs resulta suficiente para tatuar los ganglios.
- 6.** La elección de micropartículas en lugar de nanopartículas (aumento de la tasa de identificación y reducción de la reacción inflamatoria), encapsulando C-NPs en lugar de melanina (menor reacción inflamatoria) y en concentraciones iguales o superiores a 10 mg/ml, así como el uso de polímeros con mayores períodos de degradación para minimizar la liberación de C-NPs, puede representar una estrategia prometedora para minimizar los efectos de la intervención y tatuar más eficientemente los ganglios linfáticos centinela.



# Bibliografía

- Arnold, M. et al. *Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040*. **The Breast** 66, 15–23 (2022).
- Sung, H. et al. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. **A Cancer J. Clin.** 71, 209–49 (2021).
- Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). *Observatorio de Cáncer. Dimensiones del cáncer* (2020). Disponible online en: <https://observatorio.contraelcancer.es/explora/dimensiones-del-cancer> (Último acceso: 19/05/2024)
- Giaquinto, A. N. et al. *Breast Cancer Statistics, 2022*. **Cancer J. Clin.** 72, 524–541 (2022).
- Brinton, L. et al. *Cancer Epidemiology and Prevention*. 4th ed. **Oxford University Press** (2018).
- Otto, S. et al. *National Evaluation Team for Breast Cancer Screening. Initiation of population-based mammography screening in Dutch municipalities and effect on breastcancer mortality: a systematic review*. **Lancet** 361, 1411–17 (2003).
- Duffy, S. et al. *The relative contributions of screen-detected *in situ* and invasive breast carcinomas in reducing mortality from the disease*. **Eur J Cancer** 39, 1755–60 (2003).
- INE. *Instituto Nacional de Estadística. Defunciones por causas* (2022). Disponible online en: <https://www.ine.es/jaxi/Tabla.htm?tpx=61443&L=1> (Último acceso: 19/05/2024).
- Giordano, S., Buzdar, A. & Hortobagyi, G. *Breast cancer in men*. **Ann Intern Med** 137, 678–87 (2002).
- Greif, J. M., Pezzi, C. M., Klimberg, S. V., Bailey, L. & Zuraek, M. *Gender differences in breast cancer: Analysis of 13,000 breast cancers in men from the national cancer data base*. **Ann. Surg. Oncol.** 19, 3199–3204 (2012).
- Mukama, T. et al. *Risk-Adapted Starting Age of Screening for Relatives of Patients with Breast Cancer*. **JAMA Oncol.** 6, 68–74 (2020).
- Hussein, A. et al. *Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women*. **J. Thorac. Dis.** 5, (2013).
- Azim, H. A. & Partridge, A. H. *Biology of breast cancer in young women*. **Breast Cancer Res.** 16, 1–9 (2014).
- Thakur, P., Seam, R., Gupta, M., Sharma, M. & Fotedar, V. *Breast cancer risk factor evaluation in a Western Himalayan state: A case-control study and comparison with the Western World*. **South Asian J Cancer** 6, 106–9 (2017).
- Wu, M. et al. *Hormonal and body-size factors in relation to breast cancer risk: a prospective study of 11,889 women in a low-incidence area*. **Ann Epidemiol** 16, 223–9 (2006).
- Dai, Q., Liu, B. & Du, Y. *Meta-analysis of the risk factors of breast cancer concerning reproductive factors and oral contraceptive use*. **Front. Med. China** 3, 452–458 (2009).
- Husby, A., Wohlfahrt, J., Øyen, N. & Melbye, M. *Pregnancy duration and breast cancer risk*. **Nat. Commun.** 9, 4255 (2018).
- Beral, V., Bull, D., Doll, R., Peto, R. & Reeves, G. *Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and abortion: collaborative reanalysis of data from 53 epidemiological studies, including 83 000 women with breast cancer from 16 countries*. **Lancet** 363, 1007–16 (2004).
- Listed, N. A. *Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer*. *Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer*. **Lancet** 350, 1048–59 (1997).
- Beaber, E. F. et al. *Recent oral contraceptive use by formulation and breast cancer risk among women 20 to 49 years of age*. **Cancer Res.** 74, 4078–4089 (2014).
- Williams, L. A. et al. *Reproductive risk factor associations with lobular and ductal carcinoma in the Carolina Breast Cancer Study*. **Cancer Causes Control** 29, 25–32 (2018).
- Taheripanah, R., Balash, F., Anbiaee, R., Mahmoodi, M. & Akbari Sene, A. *Breast Cancer and Ovulation Induction Treatments*. **Clin. Breast Cancer** 18, 395–399 (2018).
- Armaou, S. et al. *Contribution of BRCA1 germ-line mutations to breast cancer in Greece: a hospital-based study of 987 unselected breast cancer cases*. **Br. J. Cancer** 101, 32–37 (2009).
- Antoniou, A. et al. *Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: A combined analysis of 22 studies*. **Am. J. Hum. Genet.** 72, 1117–1130 (2003).
- Ford, D., Easton, D. F., Bishop, D. T., Narod, S. A. & Goldgar, D. E. *Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers*. **Lancet** 343, 692–695 (1994).
- Hall, M. J. et al. *BRCA1 and BRCA2 mutations in women of different ethnicities undergoing testing for hereditary breast-ovarian cancer*. **Cancer** 115, 2222–2233 (2009).
- Burke, W. et al. *Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. I. Hereditary nonpolyposis colon cancer*. **J. Am. Med. Assoc.** 277, 915–919 (1997).
- Page, D. L., Dupont, W. D., Rogers, L. W. & Rados, M. S. *Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long-term follow-up study*. **Cancer** 55, 2698–2708 (1985).
- Marshall, L. M. et al. *Risk of breast cancer associated with atypical hyperplasia of lobular and ductal types*. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** 6, 297–301 (1997).

- 30.** Visscher, D. W. et al. Sclerosing adenosis and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 144, 205–212 (2014).
- 31.** Jiralerpong, S. & Goodwin, P. J. Obesity and breast cancer prognosis: Evidence, challenges, and opportunities. *J. Clin. Oncol.* 34, 4203–4216 (2016).
- 32.** Boffetta, P. & Hashibe, M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.* 7, 149–156 (2006).
- 33.** Romieu, I., Amadou, A. & Chajes, I. The Role of Diet, Physical Activity, Body Fatness, and Breastfeeding in Breast Cancer in Young Women: Epidemiological Evidence. *Rev Invest Clin* 69, 193–203 (2017).
- 34.** Tan, P. H. et al. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology* 77, 181–185 (2020).
- 35.** Llombert Bosch, A. & Ruiz Sauri, A. Carcinoma *in situ* de mama: Tipos histológicos y propuesta de clasificación \* *In situ carcinoma of the breast : Histologic types and proposed classification.* *Rev Sen y Pat Mam* 8, 149–59 (1995).
- 36.** Board, W. C. of T. E. WHO classification of tumours: breast tumours. 5th ed. Lyon Int. Agency Res. Cancer (2019).
- 37.** Sánchez, C. A. R. & Martín, M. N. Carcinoma ductal *in situ*. Revis. *Cancer* 23, 10–18 (2009).
- 38.** Sanders, M., Schuyler, P., Simpson, F. & Page, D. Continued observation of the natural history of lowgrade ductal carcinoma *in situ* reaffirms proclivity for local recurrence even after more than 30 years of follow-up. *Mod Pathol* 28, 662–9 (2015).
- 39.** Sanders, M., Shuyler, P., Dupont, W. & Page, D. The natural history of low-grade ductal carcinoma *in situ* of the breast in women treated by biopsy only revealed over 30 years of longterm follow-up. *Cancer* 103, 223–35 (2005).
- 40.** Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H. & Band, V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol. Ther.* 10, 955–960 (2010).
- 41.** Montesinos R. Carcinoma Lobular *in Situ* De Mama. *Rev. Argentina Mastología* 27, 295–300 (2008).
- 42.** Arpino, G. et al. Lobular neoplasia on core-needle biopsy – Clinical significance. *Cancer* 101, 242–50 (2004).
- 43.** De Obstetricia y Ginecología, F. C. Carcinoma infiltrante de mama. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.* 48, 28–31 (1969).
- 44.** De Aquino, R. G. F. et al. Carcinoma ductal invasor: Relação de características anatomo-patológicas com a presença de metástases axilares em 220 casos. *Rev. Col. Bras. Cir.* 44, 163–170 (2017).
- 45.** Martínez, V. & Azzopardi, J. G. Invasive lobular carcinoma of the breast: incidence and variants. *Histopathology* 3, 467–488 (1979).
- 46.** Borst, M. & Ingold, J. Metastatic patterns of invasive lobular versus invasive ductal carcinoma of the breast. *Surgery* 114, 637–41 (1993).
- 47.** Yeatman, T. et al. Tumor Biology of Infiltrating Lobular Carcinoma: implications for management. *Ann Surg* 222, 549–61 (1995).
- 48.** Cornford, E. J. et al. Mammographic features of invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast: A comparative analysis. *Br. J. Radiol.* 68, 450–453 (1995).
- 49.** Musolino, A. et al. A breast cancer patient from Italy with germline mutations in both the BRCA1 and BRCA2 genes. *Breast Cancer Res. Treat.* 91, 203–205 (2005).
- 50.** Chen, W. et al. BRCA1 germline mutations and tumor characteristics in Chinese women with familial or early-onset breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 117, 55–60 (2009).
- 51.** Phillips, K. Immunophenotypic and pathologic differences between BRCA1 and BRCA2 hereditary breast cancers. *J Clin Oncol* 1, 107S–12S (2000).
- 52.** Lippman, M. & Allegra, J. The response to endocrine and citotoxic chemotherapy in human breast cancer and the disease-free interval. *Cancer* 46, 2629–34 (1980).
- 53.** Vollenweider, L., Barrelet, L., Wong, Y., Lemarchand, T. & Gomez, F. The predictive value of estrogen and progesterone receptors' concentrations on the clinical behavior of breast cancer in women. Clinical correlation on 547 patients. *Cancer* 15, 1171–80 (1986).
- 54.** Bishop, H., Elston, C., Blamey, R. & Haybittle, J. Relationship of oestrogen-receptor status to survival in breast cancer. *Lancet* 1, 283–4 (1979).
- 55.** Mason, B., Holdway, I., Mullins, P., Yee, L. & Kay, R. Progesterone and estrogen receptors as prognostic variables in breast cancer. *Cancer Res.* 43, 2985–90 (1983).
- 56.** Fernández Parra, J. & Bernet Vegué, E. Receptores hormonales en cáncer de mama. *Rev. Senol. y Patol. Mamar.* 15, 115–122 (2002).
- 57.** Fent, Y. et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis* 5, 77–106 (2018).
- 58.** Panal Cusati, M. et al. Correlation between Ki67 expression and classical prognostic and predictive factors in early breast cancer. *J. Breast Sci.* 27, 163–9 (2014).
- 59.** Nascimento, R. G. do & Otoni, K. M. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? *Mastology* 30, 1–8 (2020).

- 60.** Sorlie, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Sci Proc Natl Acad* 100, 8413–23 (2003).
- 61.** Chen, H. et al. Association between BRCA status and triple-negative breast cancer: A meta-analysis. *Front Pharmacol*. 9, 1–8 (2018).
- 62.** Cserni, G., Chmielik, E., Cserni, B. & Tot, T. The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Arch*. 472, 697–703 (2018).
- 63.** Hortobagyi, G. et al. AJCC Cancer Staging Manual. 8th ed. Chicago: **Springer International Publishing** (2017).
- 64.** Zheng, Y.Z., Wang, L., Hu, X. & Shao, Z.M. Effect of tumor size on breast cancer-specific survival stratified by joint hormone receptor status in a SEER population-based study. *Oncotarget* 6, 22985–22995 (2015).
- 65.** Strand, F. et al. Long-term prognostic implications of risk factors associated with tumor size: A case study of women regularly attending screening. *Breast Cancer Res*. 20, 1–10 (2018).
- 66.** Narod, S. A. Tumour size predicts long-term survival among women with lymph node-positive breast cancer. *Curr. Oncol.* 19, 249–253 (2012).
- 67.** Fujii, T. et al. Impact of the prognostic value of vascular invasion, but not lymphatic invasion, of the primary tumor in patients with breast cancer. *Anticancer Res*. 34, 1255–1259 (2014).
- 68.** Kurnaz, E., Celebi, B., Karapolat, B., Eken, H. & Kucuktulu, U. Risk factors for axillary lymph node metastasis in breast cancer. *Ann. Med. Res.* 26, 2139 (2019).
- 69.** Blamey, R. W. et al. ONCOPOOL – A European database for 16,944 cases of breast cancer. *Eur. J. Cancer* 46, 56–71 (2010).
- 70.** Pereira, S. G. et al. Quimioterapia neoadyuvante : indicaciones y resultados . Experiencia de 15 años en el Instituto Alexander Fleming. *Rev. Argent. Mastología* 38(138): 14–34, (2019).
- 71.** Sikov, W., Boughey, J. & Al-Hilli, Z. General principles of neoadjuvant management of breast cancer. *UpToDate* (2021).
- 72.** García Sierra, A., Piñero Madrona, A. & Illana Moreno, J. **Guia de Cirugía de la Mama.** (2006).
- 73.** Darby, S. et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: Meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. *Lancet* 378, 1707–1716 (2011).
- 74.** Fisher, B. et al. Twenty-Year Follow-up of a Randomized Trial Comparing Total Mastectomy, Lumpectomy, and Lumpectomy plus Irradiation for the Treatment of Invasive Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 347, 1233–1241 (2002).
- 75.** Veronesi, U. et al. Twenty-Year Follow-up of a Randomized Study Comparing Breast-Conserving Surgery with Radical Mastectomy for Early Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 347, 1227–1232 (2002).
- 76.** Fajdic, J., Djurovic, D., Gotovac, N. & Hrgovic, Z. Criteria and Procedures for Breast Conserving Surgery. *Acta Inform. Medica* 21, 16 (2013).
- 77.** Morrow, M. Limiting breast surgery to the proper minimum. *The Breast* 14, 523–526 (2005).
- 78.** del Val Gil, J. M., López Bañeres, M. F., Rebollo López, F. J., Utrillas Martínez, A. C. & Mingüillón Serrano, A. Cáncer de mama y mastectomía. Estado actual. *Cirugía Española* 69, 56–65 (2001).
- 79.** Macmillan, R. D. & McCulley, S. J. **Oncoplastic Breast Surgery:** What, When and for Whom? *Curr. Breast Cancer Rep.* 8, 112–117 (2016).
- 80.** Massagué, J. & Obenauf, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* 529, 298–306 (2016).
- 81.** American Cancer Society. *Breast Cancer. Facts & Figures 2019–2020.* Disponible online en: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2019-2020.pdf> (Último acceso: 18/03/2024) (2020).
- 82.** Lin, N. U. et al. Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple negative breast cancer. *Cancer* 113, 2638–2645 (2008).
- 83.** Park, M. et al. Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 6806 (2022).
- 84.** Hubalewska, A., Sowa, A. & Huszno, B. Current application of sentinel lymph node lymphoscintigraphy to detect various cancer metastases. *Hell J Nucl Med* 9, 5–9 (2006).
- 85.** Cho, S. et al. Standardized Pathology Report for Breast Cancer Journal Pathology. *J Pathol Transl Med* 55, 5–18 (2021).
- 86.** Lezid, Á. & Rodríguez, P. Estudio histopatológico del ganglio centinela en cáncer de mama. *An Med (Mex)* (2008); 53 (1): 28–35
- 87.** Lee, Y. J. et al. Prospective multicenter feasibility study of laparoscopic sentinel basin dissection for organ preserving surgery in gastric cancer: Quality control study for surgical standardization prior to phase III trial. *Med. (United States)* 94, 1–7 (2015).
- 88.** Banys-Paluchowski, M. et al. Surgical Management of the Axilla in Clinically Node-Positive Breast Cancer Patients Converting to Clinical Node Negativity through Neoadjuvant Chemotherapy: Current Status, Knowledge Gaps, and Rationale for the EUBREAST-O3 AXSANA Study. *Cancers (Basel)*. 13, 1565 (2021).

89. Román, J., Moreno, A. & Vidart, J. *Fundamentos de la biopsia del ganglio centinela en el cáncer de mama*. Psi-cooncología 1, 131–8 (2005).
90. Del Val, J., López, M., Rebollo, F., Utrillas, A. & González, M. *Linfadenectomía axilar y ganglio centinela en el tratamiento quirúrgico actual del cáncer de mama*. Cirugía Española 68, 53–6 (2000).
91. Osborne, M. et al. *Breast conservation in the treatment of early breast cancer. A 20-year follow-up*. Cancer 53, 349–55 (1984).
92. Turner, R., Olilla, D., Krasne, D. & Giuliano, A. *Histopathologic validation of the sentinel lymph node hypothesis for breast carcinoma*. Ann Surg 226, 271–6 (1997).
93. Giuliano, A., Kirgan, D., Guenther, J. & Morton, D. *Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer*. Ann Surg 220, 391–8 (1994).
94. Gould, E., Winship, T., Philbin, P. & Kerr, H. *Observations on a ‘sentinel node’ in cancer of the parotid*. Cancer 13, 77–8 (1960).
95. Chiappa, S., Uslenghi, C., Bonadonna, G., Marano, P. & Ravasi, G. *Combined testicular and foot lymphangiography in testicular carcinomas*. Surg Gynecol Obs. 123, 10–4 (1966).
96. Kett, K. *Direct mammolymphography*. Langenbecks Arch Chir 327, 514–5 (1970).
97. Cabañas, R. *An approach for the treatment of penile carcinoma*. Cancer 39, 456–66 (1977).
98. Morton, D. et al. *Technical details of intraoperative lymphatic mapping for the early stage melanoma*. Arch Surg 127, 392–9 (1992).
99. Osborne, M., Payne, J. & Richardson, V. *The preoperative detection of axillary lymph node metastases in breast cancer by isotope imaging*. Br J Surg 70, 141–4 (1983).
100. Krag, D., Weaver, D., Alex, J. & Fairbank, J. *Surgical resection and radiolocalization of the sentinel node in breast cancer using a gamma probe*. Surg Onc 2, 335–40 (1993).
101. Miner, T., Shriver, C., Jaques, D., Maniscalco, M. & Krag, D. *Ultrasonographically guided injection improves localization of the radiolabeled sentinel lymph node in breast cancer*. Ann Surg Oncol 5, 315–21 (1998).
102. Bernet, L. et al. *Consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Revisión 2013 de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria*. Rev. Esp. Patol. 47, 22–32 (2014).
103. Krag, D. et al. *Technical outcomes of sentinel-lymph-node resection and conventional axillary-lymph-node dissection in patients with clinically node-negative breast cancer: results from the NSABP B-32 randomised phase III trial*. Lancet Oncol. 8, 881–8 (2007).
104. Boughey, J. et al. *Sentinel node surgery after neoadjuvant chemotherapy in patients with node-positive breast cancer: the American College of Surgeons Oncology Group Z1071 clinical trial*. JAMA 310, 1455–61 (2013).
105. Kuehn, T. et al. *Sentinel-lymph-node biopsy in patients with breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy (SENTINA): a prospective, multicenter cohort study*. Lancet Oncol. 14, 608–18 (2013).
106. Boileau, J. et al. *Sentinel node biopsy after neoadjuvant chemotherapy in biopsy-proven node-positive breast cancer: the SN FNAC study*. J Clin Oncol 20, 2588–64 (2015).
107. Cao, S. et al. *Feasibility and reliability of sentinel lymph node biopsy after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients with positive axillary nodes at initial diagnosis: An up-to-date meta-analysis of 3,578 patients*. The Breast 59, 256–269 (2021).
108. Maguire, A. & Brogi, E. *Sentinel lymph nodes for breast carcinoma: An update on current practice*. Histopathology 68, 152–167 (2016).
109. Provenzano, E. *Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer: Moving Beyond Pathological Complete Response in the Molecular Age*. Acta Med. Acad. 50, 88 (2021).
110. Tamayo Carabaño, D. et al. *Sentinel lymph node biopsy in N+ breast cancer with conversion into NO after neoadjuvant chemotherapy*. Rev. Española Med. Nucl. e Imagen Mol. (English Ed. 38, 140–146 (2019).
111. Park, S. et al. *Sentinel Lymph Node Biopsy After Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Cytologically Proven Node-positive Breast Cancer at Diagnosis*. Ann. Surg. Oncol. 20, 2858–2865 (2013).
112. Galimberti, V. et al. *Sentinel node biopsy after neoadjuvant treatment in breast cancer: Five-year follow-up of patients with clinically node-negative or node-positive disease before treatment*. Eur. J. Surg. Oncol. 42, 361–368 (2016).
113. Bi, Z. et al. *Neoadjuvant chemotherapy and timing of sentinel lymph node biopsy in different molecular subtypes of breast cancer with clinically negative axilla*. Breast Cancer 26, 373–377 (2019).
114. Rebollo, A. et al. *Sentinel lymph node biopsy after neoadjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer and positive axillary nodes at initial diagnosis*. Rev Esp Med Nuc Im Mol 32, 240–5 (2013).
115. Tee, S. R. et al. *Meta-analysis of sentinel lymph node biopsy after neoadjuvant chemotherapy in patients with initial biopsy-proven node-positive breast cancer*. Br. J. Surg. 105, 1541–1552 (2018).
116. Tortora, G. & Grabowski, S. *Principios de anatomía y fisiología*. 9a Edición. México: Editorial Oxford University Press. (2000).
117. Idiazabal, G. *Histología del sistema linfático*. Lehrbuch der Lymphologie© 797–804 (2010).

- 118.** Guyton, A. & Hall, J. *Tratado de fisiología médica*. 10a Edición. Madrid: McGrawHill. Interamericana. (2001).
- 119.** Grant, R., Tabah, E. & Adair, F. *The surgical significance of the subareolar lymphatic plexus in cancer of the breast*. *Surgery* 33, 71–3 (1953).
- 120.** Rouvière, H. & Delmas, A. *Anatomía humana descriptiva, topográfica y funcional*. 11a Edición. Barcenola: Masson. (2005).
- 121.** Hunt, K., Green, M. & Buchholz, T. *Enfermedades de la mama. Tratado de Cirugía. Fundamentos biológicos de la práctica quirúrgica moderna*. 19a Edición. Barcenola: Masson. (2013).
- 122.** Standring, S. *'Lymphoid tissues'. Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice*. 41a Edition. Philadelphia. (2016).
- 123.** Schudel, A., Francis, D. M. & Thomas, S. N. *Material design for lymph node drug delivery*. *Nat. Rev. Mater.* 4, 415–428 (2019).
- 124.** Kierszenbaum, A. L. *Sistema inmunitario-linfático. Histología y Biología Celular. Introducción a la Anatomía Patológica*. 2a Edición. 291–325 (2008).
- 125.** Young, B., O'Dowd, G. & Woodford, P. *Wheater's functional histology: a text and colour atlas*. 6th Edition. Philadelphia: Elsevier. (2013).
- 126.** Willard-Mack, C. L. *Normal Structure, Function, and Histology of Lymph Nodes*. *Toxicol. Pathol.* 34, 409–424 (2006).
- 127.** Grant, S. M., Lou, M., Yao, L., Germain, R. N. & Radtke, A. J. *The lymph node at a glance – how spatial organization optimizes the immune response*. *J. Cell Sci.* 133, (2020).
- 128.** Departamento de Anatomía e Histología Humanas, Universidad de Zaragoza. *Atlas de Histología de la Universidad de Zaragoza*. Disponible online en: <http://wzar.unizar.es/acad/histologia/> Último acceso: 17/02/2024 (2016).
- 129.** Fossum, S. & Ford, W. L. *The organization of cell populations within lymph nodes: their origin, life history and functional relationships*. *Histopathology* 9, 469–499 (1985).
- 130.** Boesen, A. M. & Hokland, P. *Ultrastructure of normal human blood T lymphocyte subsets isolated by cell sorting using monoclonal antibodies*. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 41, 107–117 (1982).
- 131.** Cano, L. & Lopera, D. *Introduction to T and B lymphocytes. in Autoimmunity: From Bench to Bedside*. Universidad de Rosario. NBK459471 (2013).
- 132.** Jastrow, H. *Electron Microscopic Atlas of Cells, Tissues, and Organs in the internet*. University of Mainz, Germany. Disponible online en: <http://www.drjastrow.de/WAI/EM/EMAtlas.html> (último acceso el 10/06/2024) (2014).
- 133.** Gray, A. & Doniach, I. *Ultrastructure of plasma cells containing Russell bodies in human stomach and thyroid*. *J. Clin. Pathol.* 23, 608–612 (1970).
- 134.** Klein, B., Lewinski, U., Shabtai, F., Freidin, N. & Djaldetti, M. *Transmission and scanning electron microscopy study on plasma cell leukemia*. *Blut* 35, 11–19 (1977).
- 135.** Cinti, I. & Denton, A. E. *Lymphoid stromal cells—more than just a highway to humoral immunity*. Oxford Open Immunol. 2, (2021).
- 136.** Genovese, L. & Brendolan, A. *Lymphoid Tissue Mesenchymal Stromal Cells in Development and Tissue Remodeling*. *Stem Cells Int.* 2016, 1–7 (2016).
- 137.** Becker, U., Nowach, H., Gay, S. & Timpl, R. *Production and specificity of antibodies against the aminoterminal region in type III collagen*. *Immunology* 1976 44, 727–736.
- 138.** Malhotra, D., Fletcher, A. L. & Turley, S. J. *Stromal and hematopoietic cells in secondary lymphoid organs: partners in immunity*. *Immunol. Rev.* 251, 160–176 (2013).
- 139.** Bajénoff, M. *Stromal cells control soluble material and cellular transport in lymph nodes*. *Front. Immunol.* 3, (2012).
- 140.** Mori, Y. & Lennert, K. *Electron Microscopic Atlas of Lymph Node Cytology and Pathology* (Springer-Verlag, Berlin – New York). (1969).
- 141.** Bergers, G. & Song, S. *The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance*. *Neuro. Oncol.* 7, 452–464 (2005).
- 142.** Sweeney, M. D., Ayyadurai, S. & Zlokovic, B. V. *Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways*. *Nat. Neurosci.* 19, 771–783 (2016).
- 143.** Marson, R. F., Regner, A. P. & da Silva Meirelles, L. *Mesenchymal "stem" cells, or facilitators for the development of regenerative macrophages? Pericytes at the interface of wound healing*. *Front. Cell Dev. Biol.* 11, (2023).
- 144.** Sacchetti, B. et al. *No Identical "Mesenchymal Stem Cells" at Different Times and Sites: Human Committed Progenitors of Distinct Origin and Differentiation Potential Are Incorporated as Adventitial Cells in Microvessels*. *Stem Cell Reports* 6, 897–913 (2016).
- 145.** Grant, R. I. et al. *Organizational hierarchy and structural diversity of microvascular pericytes in adult mouse cortex*. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 39, 411–425 (2019).
- 146.** Zhang, C., Yang, M. & Ericsson, A. C. *Function of Macrophages in Disease: Current Understanding on Molecular Mechanisms*. *Front. Immunol.* 12, (2021).

147. Ratnayake, I., Ahrenkiel, S. P., Hoppe, A. & Thiex, N. *Electron Microscopy and Tomography on Endocytosis of Macrophages*. ***Microsc. Microanal.*** 23, 1268–1269 (2017).
148. Chambers, V. C. & Weiser, R. S. *The ultrastructure of target L-cells and immune macrophages during their interaction in vivo*. ***Cancer Res.*** 31, 2059–2066 (1971).
149. Cohn, Z. A. *The Structure and Function of Monocytes and Macrophages*. ***Adv. Immunol.*** 9, 163–214 (1968).
150. Breedveld, A., Groot Kormelink, T., van Egmond, M. & de Jong, E. C. *Granulocytes as modulators of dendritic cell function*. ***J. Leukoc. Biol.*** 102, 1003–1016 (2017).
151. Bessis, M. & Thiery, J.-P. *Electron Microscopy of Human White Blood Cells and Their Stem Cells*. ***Int. Rev. Cyt.*** (1962). doi:10.1016/S0074-7696(08)60541-0.
152. Spencer, L. A. & Weller, P. F. *Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights*. ***Immunol. Cell Biol.*** 88, 250–256 (2010).
153. Rönnberg, E., Melo, F. R. & Pejler, G. *Mast Cell Proteoglycans*. ***J. Histochem. Cytochem.*** 60, 950–962 (2012).
154. Shukla, S. A., Veerappan, R., Whittimore, J. S., Ellen Miller, L. & Youngberg, G. A. *Mast Cell Ultrastructure and Staining in Tissue*. ***Mast Cells*** 063–076 (Humana Press). doi:10.1385/1-59259-967-2:063.
155. Patella, V. et al. *Human heart mast cells. Isolation, purification, ultrastructure, and immunologic characterization*. ***J. Immunol.*** 154, 2855–65 (1995).
156. Goñi Gironés, E., Tiberio López, G., Martínez Lozano, M. & Estébanez Estébanez, C. *Biopsia selectiva del ganglio centinela en la estadificación axilar del cáncer de mama*. Tesis Doctoral. **Universidad de Navarra**. (2014).
157. Moghimi, S. M. et al. *Surface engineered nanospheres with enhanced drainage into lymphatics and uptake by macrophages of the regional lymph nodes*. ***FEBS Lett.*** 344, 25–30 (1994).
158. Piñero Madrona, A., Giménez, J., Merck, B. & Vázquez, C. *Reunión de consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama*. Sociedad Española de senología y patología mamaria. ***Cir. Esp.*** 82, 146–149 (2007).
159. Mariani, G. et al. *Radioguided sentinel lymph node biopsy in breast cancer surgery*. ***J. Nucl. Med.*** 42, 1198–1215 (2001).
160. Wilhelm, A., Mijnhout, G. & Franssen, E. *Radiopharmaceuticals in sentinel lymph-node detection – an overview*. ***Eur J Nucl Med*** 26, s36–s42 (1999).
161. Wallace, A. M., Hoh, C. K., Darrah, D. D., Schulteis, G. & Vera, D. R. *Sentinel lymph node mapping of breast cancer via intradermal administration of Lymphoseek*. ***Nucl. Med. Biol.*** 34, 849–853 (2007).
162. Bartolomei, M. et al. *Sentinel node localization in cutaneous melanoma: Lymphoscintigraphy with colloids and antibody fragments versus blue dye mapping*. ***Eur. J. Nucl. Med.*** 25, 1489–1494 (1998).
163. Knackstedt, R. & Gastman, B. *Indocyanine Green Fluorescence Imaging with Lymphoscintigraphy Improves the Accuracy of Sentinel Lymph Node Biopsy in Melanoma*. ***Plast Reconstr Surg*** 148, 83e–93e (2021).
164. Malasani, V. et al. *Comparative Study on Intraoperative Localization of Sentinel Lymph Node in Breast Cancer Patients using Tc <sup>99m</sup> Sulfur Colloid and Blue Dye*. ***J. Cancer Sci. Clin. Ther.*** 03, 291–296 (2019).
165. Frumovitz, M. et al. *Near-infrared fluorescence for detection of sentinel lymph nodes in women with cervical and uterine cancers (FILM): a randomised, phase 3, multicentre, non-inferiority trial*. ***Lancet Oncol.*** 19, 1394–1403 (2018).
166. Wada, H. et al. *Minimally invasive electro-magnetic navigational bronchoscopy-integrated near-infrared-guided sentinel lymph node mapping in the porcine lung*. ***PLoS One*** 10, (2015).
167. Xia, L. et al. *Meta-Analysis of the Diagnostic Value of Tracer Staining Technology Based on Nanocarbon Suspension in Sentinel Lymph Node Biopsy of Breast Cancer*. ***Comput. Math. Methods Med.*** 2022, 1–11 (2022).
168. Wu, X. et al. *Sentinel Lymph Node Detection Using Carbon Nanoparticles in Patients with Early Breast Cancer*. ***PLoS One*** 10, e0135714 (2015).
169. Piñero, A. et al. *Superparamagnetic iron oxide as a tracer for sentinel node biopsy in breast cancer: A comparative non-inferiority study*. ***Eur J Surg Oncol*** 41, 991–7 (2015).
170. Rubio, I. T. et al. *The superparamagnetic iron oxide is equivalent to the Tc<sup>99</sup> radiotracer method for identifying the sentinel lymph node in breast cancer*. ***Eur. J. Surg. Oncol.*** 41, 46–51 (2015).
171. Douek, M. et al. *Sentinel node biopsy using a magnetic tracer versus standard technique: the SentiMAG Multicentre Trial*. ***Ann Surg Oncol.*** 21, 1237–45 (2014).
172. Kuwahata, A. et al. *Development of Magnetic Probe for Sentinel Lymph Node Detection in Laparoscopic Navigation for Gastric Cancer Patients*. ***Sci. Rep.*** 10, 1–12 (2020).
173. Goldberg, B. B. et al. *Radiology Sentinel Lymph Nodes in a Swine Model with Melanoma : Lymphatic US 1*. ***Radiology*** 230, 727–734 (2004).
174. Sever, A. R. et al. *Preoperative needle biopsy of sentinel lymph nodes using intradermal microbubbles and contrast-enhanced ultrasound in patients with breast cancer*. ***Am. J. Roentgenol.*** 199, 465–470 (2012).
175. Pleskova, S., Mikheeva, E. & Gornostaeva, E. *Using of quantum dots in biology and medicine*. ***Adv. Exp. Med. Biol.*** 1048, 323–334 (2018).

- 176.** Kumar, C. & Gerion, D. *Fluorescence imaging in biology using nanoprobes*. **Nanosystem Characterization Tools in the Life Sciences (1st Ed)** 1–37 (2006).
- 177.** Drbohlavova, J., Adam, V., Kizek, R. & Hubalek, J. *Quantum dots – characterization, preparation and usage in biological systems*. **Int. J. Mol. Sci.** 10, 656–673 (2009).
- 178.** Kosaka, N., Ogawa, M., Sato, N., Choyke, P. L. & Kobayashi, H. *In vivo real-time, multicolor, quantum dot lymphatic imaging*. **J. Invest. Dermatol.** 129, 2818–2822 (2009).
- 179.** Robe, A. et al. *Quantum dots in axillary lymph node mapping: Biodistribution study in healthy mice*. **BMC Cancer** 8, (2008).
- 180.** Frangioni, J. V., Kim, S.-W., Ohnishi, S., Kim, S. & Bawendi, M. G. *Sentinel Lymph Node Mapping With Type-II Quantum Dots*. in *Quantum Dots*. **Humana Press**, 147–160. doi:10.1385/1-59745-369-2:147.
- 181.** Ballou, B. et al. *Sentinel Lymph Node Imaging Using Quantum Dots in Mouse Tumor Models*. **Bioconjugate Chem** 18, 389–96 (2007).
- 182.** Kojima, C., Ogawa, M. & Magata, Y. *Dendrimer-based sentinel lymph node imaging*. **Front. Bioeng. Biotechnol. Conf. Abstr. 10th World Biomater. Congr.** (2016).
- 183.** Shi, F. et al. *Dendrimer-Entrapped Gold Nanoparticles as Potential CT Contrast Agents for Localizing Sentinel Lymph Node via Indirect CT Lymphography on Rabbit Model*. **Biomed Res. Int.** 2018, (2018).
- 184.** Yang, R. et al. *Synthesis of a novel polyamidoamine dendrimer conjugating with alkali blue as a lymphatic tracer and study on the lymphatic targeting in vivo*. **Drug Deliv.** 23, 2298–2308 (2016).
- 185.** Liu, Z. et al. *Dual-Modality Noninvasive Mapping of Sentinel Lymph Node by Photoacoustic and Near-Infrared Fluorescent Imaging Using Dye-Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles*. **Mol Pharm.** 12, 319–28 (2015).
- 186.** Zhou, Z. et al. *A dual-modal magnetic nanoparticle probe for preoperative and intraoperative mapping of sentinel lymph nodes by magnetic resonance and near infrared fluorescence imaging*. **J Biomater Ap** 28, 100–11 (2016).
- 187.** Mihara, K. et al. *Intraoperative laparoscopic detection of sentinel lymph nodes with indocyanine green and superparamagnetic iron oxide in a swine gallbladder cancer model*. **PLoS One** 16, 1–16 (2021).
- 188.** Tsuchimochi, M., Yamaguchi, H. & Hayama, K. *Future perspective of sentinel lymph node biopsy*. **J Jap Soc Or Onc** 28, 76–85 (2016).
- 189.** Yang, L. et al. *Phase-Transition Nanodroplets for Real-Time Photoacoustic/Ultrasound Dual-Modality Imaging and Photothermal Therapy of Sentinel Lymph Node in Breast Cancer*. **Sci. Rep.** 7, 1–13 (2017).
- 190.** Dai, Y. et al. *Metastatic status of sentinel lymph nodes in breast cancer determined with photoacoustic microscopy via dual-targeting nanoparticles*. **Light Sci. Appl.** 9, (2020).
- 191.** Plecha, D., Bai, S., Patterson, H., Thompson, C. & Shenk, R. *Improving the Accuracy of Axillary Lymph Node Surgery in Breast Cancer with Ultrasound-Guided Wire Localization of Biopsy Proven Metastatic Lymph Nodes*. **Breast Oncol.** 22, 4241–6 (2015).
- 192.** Man, V. & Kwong, A. *Different strategies in marking axillary lymph nodes in breast cancer patients undergoing neoadjuvant medical treatment: a systematic review*. **Breast Cancer Res. Treat.** 186, 607–615 (2021).
- 193.** Kuemmel, S. et al. *A Prospective, Multicenter Registry Study to Evaluate the Clinical Feasibility of Targeted Axillary Dissection (TAD) in Node-positive Breast Cancer Patients*. **Ann. Surg.** 276, e553–e562 (2022).
- 194.** Simons, J. M. et al. *Excision of both pretreatment marked positive nodes and sentinel nodes improves axillary staging after neoadjuvant systemic therapy in breast cancer*. **Br. J. Surg.** 106, 1632–1639 (2019).
- 195.** Straver, M. E., Loo, C. E., Alderliesten, T., Rutgers, E. J. T. & Vrancken Peeters, M. T. F. D. *Marking the axilla with radioactive iodine seeds (MARI procedure) may reduce the need for axillary dissection after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer*. **Br. J. Surg.** 97, 1226–1231 (2010).
- 196.** Donker, M. et al. *Marking Axillary Lymph Nodes With Radioactive Iodine Seeds for Axillary Staging After Neoadjuvant Systemic Treatment in Breast Cancer Patients*. **Ann. Surg.** 261, 378–382 (2015).
- 197.** Caudle, A. S. et al. *Improved Axillary Evaluation Following Neoadjuvant Therapy for Patients With Node-Positive Breast Cancer Using Selective Evaluation of Clipped Nodes: Implementation of Targeted Axillary Dissection*. **J. Clin. Oncol.** 34, 1072–1078 (2016).
- 198.** Greenwood, H. I., Wong, J. M., Mukhtar, R. A., Alvarado, M. D. & Price, E. R. *Feasibility of Magnetic Seeds for Preoperative Localization of Axillary Lymph Nodes in Breast Cancer Treatment*. **Am. J. Roentgenol.** 213, 953–957 (2019).
- 199.** Martínez, M. et al. *Evaluation of Axillary Lymph Node Marking with Magseed® before and after Neoadjuvant Systemic Therapy in Breast Cancer Patients: MAGNET Study*. **Breast J.** 2022, 1–8 (2022).
- 200.** Hartmann, S. et al. *Applicability of magnetic seeds for target lymph node biopsy after neoadjuvant chemotherapy in initially node-positive breast cancer patients: data from the AXSANA study*. **Breast Cancer Res. Treat.** 202, 497–504 (2023).
- 201.** Falcon, S., Weinfurter, R. J., Mooney, B. & Niell, B. L. *SAVI SCOUT® localization of breast lesions as a practical alternative to wires: Outcomes and suggestions for trouble-shooting*. **Clin. Imaging** 52, 280–286 (2018).

- 202.** Sun, J. et al. Feasibility of Axillary Lymph Node Localization and Excision Using Radar Reflector Localization. *Clin. Breast Cancer* 21, e189–e193 (2021).
- 203.** Murthy, V. et al. Options to Determine Pathological Response of Axillary Lymph Node Metastasis after Neoadjuvant Chemotherapy in Advanced Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 13, 4167 (2021).
- 204.** Huang, K. et al. Protection of parathyroid function using carbon nanoparticles during thyroid surgery. *Otolaryngol. Head Neck Surg. (United States)* 149, 845–850 (2013).
- 205.** Xue, S., Ren, P., Wang, P. & Chen, G. Short and Long-Term Potential Role of Carbon Nanoparticles in Total Thyroidectomy with Central Lymph Node Dissection. *Sci. Rep.* 8, 1–8 (2018).
- 206.** Liu, M. et al. Carbon Nanoparticles for Identifying Lymph Nodes during Surgery in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *J. Cancer Ther.* 10, 134–145 (2019).
- 207.** Natsiopoulos, I. et al. Axillary Lymph Node Tattooing and Targeted Axillary Dissection in Breast Cancer Patients Who Presented as cN+ Before Neoadjuvant Chemotherapy and Became cNO After Treatment. *Clin. Breast Cancer* 19, 208–215 (2019).
- 208.** Gatek, J. et al. Targeted axillary dissection with preoperative tattooing of biopsied positive axillary lymph nodes in breast cancer. *Neoplasma* 67, 1329–34 (2020).
- 209.** Allweis, T. M. et al. Ultrasound guided tattooing of axillary lymph nodes in breast cancer patients prior to neoadjuvant therapy, and identification of tattooed nodes at the time of surgery. *Eur. J. Surg. Oncol.* 46, 1041–1045 (2020).
- 210.** Ersoy, Y. E. & Kadioglu, H. Review of Novel Sentinel Lymph Node Biopsy Techniques in Breast Cancer Patients Treated With Neoadjuvant Chemotherapy. *Clin. Breast Cancer* 18, e555–e559 (2018).
- 211.** Choy, N. et al. Initial results with preoperative tattooing of biopsied axillary lymph nodes and correlation to sentinel lymph nodes in breast cancer patients. *Ann Surg Oncol* 22, 377–82 (2015).
- 212.** Park, S. et al. Feasibility of Charcoal Tattooing of Cytology-Proven Metastatic Axillary Lymph Node at Diagnosis and Sentinel Lymph Node Biopsy after Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients. *Cancer Res. Treat.* 50, 801–812 (2018).
- 213.** Patel, R. et al. Pretreatment Tattoo Marking of Suspicious Axillary Lymph Nodes: Reliability and Correlation with Sentinel Lymph Node. *Ann. Surg. Oncol.* 26, 2452–2458 (2019).
- 214.** Hartmann, S. et al. Carbon tattooing for targeted lymph node biopsy after primary systemic therapy in breast cancer: prospective multicentre TATTOO trial. *Br. J. Surg.* 108, 302–307 (2021).
- 215.** de Boniface, J. et al. False-negative rate in the extended prospective TATTOO trial evaluating targeted axillary dissection by carbon tattooing in clinically node-positive breast cancer patients receiving neoadjuvant systemic therapy. *Breast Cancer Res. Treat.* 193, 589–595 (2022).
- 216.** Pinto, D. et al. Targeted Axillary Dissection after Chemotherapy: Feasibility Study with Clip and Carbon Dye Tattoo – Neotarget Trial. *Breast Care* 17, 166–171 (2022).
- 217.** Goyal, A. et al. A multicentre prospective feasibility study of carbon dye tattooing of biopsied axillary node and surgical localisation in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 185, 433–440 (2021).
- 218.** Dostalek, L., Cerny, A., Saskova, P. & Pavlista, D. Selective Extirpation of Tattooed Lymph Node in Combination with Sentinel Lymph Node Biopsy in the Management of Node-Positive Breast Cancer Patients after Neoadjuvant Systemic Therapy. *Breast Care* 16, 623–629 (2021).
- 219.** Gatek, J. et al. Targeted axillary dissection with preoperative tattooing of biopsied positive axillary lymph nodes in breast cancer. *Neoplasma* 67, 1329–1334 (2021).
- 220.** Porpiglia, M. et al. Carbon tattooing of axillary lymph nodes in breast cancer patients before neoadjuvant chemotherapy: A retrospective analysis. *Tumori* J. 109, 301–306 (2023).
- 221.** Pajcini, M. et al. Influence of Imaging Features and Technique on US-guided Tattoo Ink Marking of Axillary Lymph Nodes Removed at Sentinel Lymph Node Biopsy in Women With Breast Cancer. *J. Breast Imaging* 3, 583–590 (2021).
- 222.** Li, J. et al. Long-term tracing and staining of carbon nanoparticles for axillary lymph nodes in patients with locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Asian J. Surg.* 45, 89–96 (2022).
- 223.** Feynmann, R. There's plenty of room at the bottom (Reprint from Annual meeting of the American Physical Society). *Eng Sci* 23, 22–36 (1960).
- 224.** Graur, F., Pitu, F., Neagoe, I., Katona, G. & Diudea, M. Applications of nanotechnology in medicine. *Acad. J. Manuf. Eng.* 8, 36–42 (2010).
- 225.** Chauhan, S., Tirkey, A. & Upadhyay, L. S. B. Nanomaterials in biomedicine: Synthesis and applications. *Advances in Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems* 585–604 (Elsevier, 2022). doi:10.1016/B978-0-323-88450-1.00023-5.
- 226.** Diez-Pascual, A. M. & Rahdar, A. Functional Nanomaterials in Biomedicine: Current Uses and Potential Applications. *ChemMedChem* 17, (2022).
- 227.** Liu, J., Liu, Z., Pang, Y. & Zhou, H. The interaction between nanoparticles and immune system: application in the

- treatment of inflammatory diseases. **J. Nanobiotechnology** 20, 127 (2022).
228. Lobatto, M. E., Fuster, V., Fayad, Z. A. & Mulder, W. J. M. Perspectives and opportunities for nanomedicine in the management of atherosclerosis. **Nat. Rev. Drug Discov.** 10, 835–852 (2011).
229. Liao, S. & von der Weid, P. Y. Lymphatic system: An active pathway for immune protection. **Semin. Cell Dev. Biol.** 38, 83–89 (2015).
230. Cheng, Z., Que, H., Chen, L., Sun, Q. & Wei, X. Nanomaterial-Based Drug Delivery System Targeting Lymph Nodes. **Pharmaceutics** 14, 1372 (2022).
231. Ahmed, M. et al. Optimising magnetic sentinel lymph node biopsy in an in vivo porcine model. **Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.** 11, 993–1002 (2015).
232. Liu, J., Scollard, D. A., Reilly, R. M., Wu, X. Y. & Johnston, M. R. Effect of particle size on the lymphatic distribution of  $^{111}\text{In}$ -aminopolystyrene through intrapleural administration. **Lymphology** 41, 153–160 (2008).
233. Zum Winkel, K. *Lymphologie mit Radionukliden*. Verlag Hildegard Hoffmann, Berlin. (1972).
234. Singh, I., Swami, R., Khan, W. & Sistla, R. Delivery Systems for Lymphatic Targeting. Focal Controlled Drug Delivery. **Advances in Delivery Science and Technology**. Springer, Boston, MA. 429–458 (2014) doi:10.1007/978-1-4614-9434-8\_20.
235. Clement, C. C. et al. Quantitative Profiling of the Lymph Node Clearance Capacity. **Sci. Rep.** 8, 1–16 (2018).
236. Jindal, A., Sarkar, S. & Alam, A. Nanomaterials-Mediated Immunomodulation for Cancer Therapeutics. **Front. Chem.** 9, (2021).
237. Walkey, C. D. & Chan, W. C. W. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. **Chem. Soc. Rev.** 41, 2780–2799 (2012).
238. Mortimer, G. M. et al. Cryptic Epitopes of Albumin Determine Mononuclear Phagocyte System Clearance of Nanomaterials. **ACS Nano** 8, 3357–3366 (2014).
239. Alberts, B. et al. Tráfico de membrana intracelular. **Biología Molecular de la Célula (6a Edición)** 699–757 (2016).
240. Juliano, R. L. Factors affecting the clearance kinetics and tissue distribution of liposomes, microspheres and emulsions. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 2, 31–54 (1988).
241. Gustafson, H. H., Holt-Casper, D., Grainger, D. W. & Ghandehari, H. Nanoparticle uptake: The phagocytosis problem. **Nano Today** 10, 487–510 (2015).
242. Sechi, A. S. Molecular basis of Fc receptor-mediated phagocytosis: Signalling to cytoskeleton remodelling and its subversion by pathogenic microorganisms. **Recent Res. Devel. Cell Sci.** 1, 11–27 (2004).
243. McCall, R. L. & Sirianni, R. W. PLGA Nanoparticles Formed by Single- or Double-emulsion with Vitamin E-TPGS. **J. Vis. Exp.** (2013) doi:10.3791/51015.
244. Lü, J.-M. et al. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. **Expert Rev. Mol. Diagn.** 9, 325–341 (2009).
245. Su, Y. et al. PLGA-based biodegradable microspheres in drug delivery: recent advances in research and application. **Drug Deliv.** 28, 1397–1418 (2021).
246. Li, X. et al. Novel insights on the encapsulation mechanism of PLGA terminal groups on ropivacaine. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 160, 143–151 (2021).
247. Singh, S. & Singha, P. Effect of Modifications in Poly (Lactide-co-Glycolide) (PLGA) on Drug Release and Degradation Characteristics: A Mini Review. **Curr. Drug Deliv.** 18, 1378–1390 (2021).
248. Hussein, A. S., Abdullah, N. & Ahmadun, F. In vitro degradation of poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles loaded with linamarin. **IET Nanobiotechnology** 7, 33–41 (2013).
249. Li, J., Nemes, P. & Guo, J. Mapping intermediate degradation products of poly(lactic-co-glycolic acid) in vitro. **J. Biomed. Mater. Res. – Part B Appl. Biomater.** 106, 1129–1137 (2018).
250. Bäumler, W. Chemical hazard of tattoo colorants. **Presse Med.** 49, 104046 (2020).
251. Negi, S., Bala, L., Shukla, S. & Chopra, D. Tattoo inks are toxicological risks to human health: A systematic review of their ingredients, fate inside skin, toxicity due to polycyclic aromatic hydrocarbons, primary aromatic amines, metals, and overview of regulatory frameworks. **Toxicol. Ind. Health** 38, 417–434 (2022).
252. Martínez, G. et al. Use of a polyol liquid collection medium to obtain ultrasmall magnetic nanoparticles by laser pyrolysis. **Nanotechnology** 23, 425605 (2012).
253. Moreiras, H., Seabra, M. C. & Barral, D. C. Melanin Transfer in the Epidermis: The Pursuit of Skin Pigmentation Control Mechanisms. **Int. J. Mol. Sci.** 22, 4466 (2021).
254. Martinez, G. P., Zabaleta, M. E., Di Giulio, C., Charris, J. E. & Mijares, M. R. The Role of Chloroquine and Hydroxychloroquine in Immune Regulation and Diseases. **Curr. Pharm. Des.** 26, 4467–4485 (2020).
255. Chen, D. et al. Chloroquine modulates antitumor immune response by resetting tumor-associated macrophages toward M1 phenotype. **Nat. Commun.** 9, 873 (2018).
256. Savarino, A., Boelaert, J. R., Cassone, A., Majori, G. & Cauda, R. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases. **Lancet Infect. Dis.** 3, 722–727 (2003).

- 257.** Anand, K. et al. A Phase II Study of the Efficacy and Safety of Chloroquine in Combination With Taxanes in the Treatment of Patients With Advanced or Metastatic Anthracycline-refractory Breast Cancer. *Clin. Breast Cancer* 21, 199–204 (2021).
- 258.** Chen, R. J. et al. Chloroquine potentiates the anticancer effect of pterostilbene on pancreatic cancer by inhibiting autophagy and downregulating the rage/stat3 pathway. *Molecules* 26, (2021).
- 259.** Thongchot, S. et al. Chloroquine exerts anti-metastatic activities under hypoxic conditions in cholangiocarcinoma cells. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 16, 2031–2035 (2015).
- 260.** Yu, F., Li, J., Xie, Y., Sleightholm, R. L. & Oupický, D. Polymeric chloroquine as an inhibitor of cancer cell migration and experimental lung metastasis. *J. Control. Release* 244, 347–356 (2016).
- 261.** Truong, A. et al. Chloroquine sensitizes GNAQ/11-mutated melanoma to MEK1/2 inhibition. *Clin. Cancer Res.* 26, 6374–6386 (2020).
- 262.** Peng, J. et al. Targeted Lipid Nanoparticles Encapsulating Dihydroartemisinin and Chloroquine Phosphate for Suppressing the Proliferation and Liver Metastasis of Colorectal Cancer. *Front. Pharmacol.* 12, 1–17 (2021).
- 263.** Wolfram, J. et al. A chloroquine-induced macrophage-preconditioning strategy for improved nanodelivery. *Sci. Rep.* 7, 1–13 (2017).
- 264.** Dang, Y. & Guan, J. Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. *Smart Mater. Med.* 1, 10–19 (2020).
- 265.** Bee, S.-L. et al. Approaches to Improve Therapeutic Efficacy of Biodegradable PLA/PLGA Microspheres: A Review. *Polym. Rev.* 58, 495–536 (2018).
- 266.** Tong, H., Zhang, X. & Wang, M. A New Nanofiber Fabrication Technique Based on Coaxial Electrospinning. *Mater Lett* 66, 257 (2012).
- 267.** Li, W., Caterson, E., Tuan, R. & Ko, F. Electrosynthesized Nanofibrous Structure as a Novel Scaffold for Tissue Engineering. *J Biomed Mater Res* 60, 613 (2002).
- 268.** Duque Sánchez, L. M., Rodriguez, L. & López, M. Electrospinning: The Nanofibers Age. *Rev. Iberoam. Polímeros Vol. Iber. Polímeros* 14, 10–27 (2014).
- 269.** Wang, L. & Ryan, A. J. Introduction to electrospinning. *Electrospinning Tissue Regen.* 3–33 (2011) doi:10.1533/9780857092915.1.3.
- 270.** Nasouri, K., Haji, A., Shoushtari, A. M. & Kaflou, A. A Novel Study of Electrospun Nanofibers Morphology as a Function of Polymer Solution Properties. *Proc. Int. Conf. Nanomater. Appl. Prop.* 2, 4–7 (2013).
- 271.** Mohammadzadehmoghadam, S. et al. Electrospinning: Current Status and Future Trends. *Springer International Publishing Switzerland* 2016. Nano-Size Polymers (2016). doi:10.1007/978-3-319-39715-3.
- 272.** Parc Recerca UAB, P. *Electrospinning*, Web Page. (2014).
- 273.** Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J. Control. Release* 235, 337–351 (2016).
- 274.** Tziampazis, E., Kohn, J. & Moghe, P. V. PEG-variant biomaterials as selectively adhesive protein templates: Model surfaces for controlled cell adhesion and migration. *Biomaterials* 21, 511–520 (2000).
- 275.** Taniguchi, I. et al. Comparative histology of lymph nodes from aged animals and humans with special reference to the proportional areas of the nodal cortex and sinus. *Ann. Anat. – Anat. Anzeiger* 186, 337–347 (2004).
- 276.** Schindelin, J. et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682 (2012).
- 277.** Kim, W. H. et al. Ultrasound-Guided Restaging and Localization of Axillary Lymph Nodes After Neoadjuvant Chemotherapy for Guidance of Axillary Surgery in Breast Cancer Patients: Experience with Activated Charcoal. *Ann. Surg. Oncol.* 25, 494–500 (2018).
- 278.** Choy, N. et al. Initial Results with Preoperative Tattooing of Biopsied Axillary Lymph Nodes and Correlation to Sentinel Lymph Nodes in Breast Cancer Patients. *Ann. Surg. Oncol.* 22, 377–382 (2015).
- 279.** Song, Y. et al. Diagnostic accuracy of de-escalated surgical procedure in axilla for node-positive breast cancer patients treated with neoadjuvant systemic therapy: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Med.* 11, 4085–4103 (2022).
- 280.** Banys-Paluchowski, M. et al. Axillary ultrasound for prediction of response to neoadjuvant therapy in the context of surgical strategies to axillary dissection in primary breast cancer: a systematic review of the current literature. *Arch. Gynecol. Obstet.* 301, 341–353 (2020).
- 281.** Harlé, G., Kowalski, C., Garnier, L. & Hugues, S. Lymph Node Stromal Cells: Mapmakers of T Cell Immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 7785 (2020).
- 282.** Garba, A., Desmarests, L. M. B., Acar, D. D., Devriendt, B. & Nauwynck, H. J. Immortalized porcine mesenchymal cells derived from nasal mucosa, lungs, lymph nodes, spleen and bone marrow retain their stemness properties and trigger the expression of siglec-1 in co-cultured blood monocytic cells. *PLoS One* 12, e0186343 (2017).
- 283.** He, Y. et al. Mesenchymal stem cells empower T cells in the lymph nodes via MCP-1/PD-L1 axis. *Cell Death Dis.* 13, 365 (2022).
- 284.** Hung, H.-I. et al. PLGA nanoparticle encapsulation reduces toxicity while retaining the therapeutic efficacy of

- EtNBS-PDT in vitro.* **Sci. Rep.** 6, 33234 (2016).
- 285.** Mensah, R. A. et al. Optimising poly(lactic-co-glycolic acid) microparticle fabrication using a Taguchi orthogonal array design-of-experiment approach. **PLoS One** 14, e0222858 (2019).
- 286.** Abdelkader, D. H., El-Gizawy, S. A., Faheem, A. M., McCarron, P. A. & Osman, M. A. Effect of process variables on formulation, in-vitro characterisation and subcutaneous delivery of insulin PLGA nanoparticles: An optimisation study. **J. Drug Deliv. Sci. Technol.** 43, 160–171 (2018).
- 287.** Guo, Y., Li, X., Macgregor, R. B., Yan, H. & Zhang, R. X. Microfluidics-based PLGA nanoparticles of ratiometric multidrug: From encapsulation and release rates to cytotoxicity in human lens epithelial cells. **Heliyon** 9, e18318 (2023).
- 288.** Lim, Y. W. et al. Challenges and Complications of Poly(lactic-co-glycolic acid)-Based Long-Acting Drug Product Development. **Pharmaceutics** 14, 614 (2022).
- 289.** Park, T. G. Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition. **Bio-materials** 16, 1123–1130 (1995).
- 290.** Chigumira, W., Maposa, P., Gadaga, L. & Dube, A. Preparation and Evaluation of Pralidoxime-Loaded PLGA Nanoparticles as Potential Carriers of the Drug across the Blood Brain Barrier. **J. Nanomater.** 692672 (2015) doi:10.1155/2015/692672.
- 291.** Makadia, H. K. & Siegel, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers (Basel)**. 3, 1377–1397 (2011).
- 292.** Gabriele, V. et al. Light- and Melanin Nanoparticle-Induced Cytotoxicity in Metastatic Cancer Cells. **Pharmaceutics** 13, 965 (2021).
- 293.** Marcovici, I. et al. Melanin and Melanin-Functionalized Nanoparticles as Promising Tools in Cancer Research—A Review. **Cancers (Basel)** 14, 1838 (2022).
- 294.** Zhang, L. et al. Sustained release of melatonin from poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres to induce osteogenesis of human mesenchymal stem cells in vitro. **J. Pineal Res.** 54, 24–32 (2013).
- 295.** Xu, Y., Kim, C.-S., Saylor, D. M. & Koo, D. Polymer degradation and drug delivery in PLGA-based drug-polymer applications: A review of experiments and theories. **J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.** 105, 1692–1716 (2017).
- 296.** Al-Bari, M. A. A. Chloroquine analogues in drug discovery: new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. **J. Antimicrob. Chemother.** 70, 1608–1621 (2015).
- 297.** Mannerström, M., Mäenpää, H., Toimela, T., Salminen, L. & Tähti, H. The Phagocytosis of Rod Outer Segments is Inhibited by Selected Drugs in Retinal Pigment Epithelial Cell Cultures. **Pharmacol. Toxicol.** 88, 27–33 (2001).
- 298.** Pasquereau, S. et al. Resveratrol Inhibits HCoV-229E and SARS-CoV-2 Coronavirus Replication In Vitro. **Viruses** 13, 354 (2021).
- 299.** Jamshidzadeh, A., Niknahad, H. & Kashafi, H. Cytotoxicity of chloroquine in isolated rat hepatocytes. **J. Appl. Toxicol.** 27, 322–326 (2007).
- 300.** Incel Uysal, P., Gurel, M. S. & Behzatoglu, K. A Tattoo-Associated Complication: Foreign Body Granulomatous Reaction. **Am. J. Dermatopathol.** 38, 936–937 (2016).
- 301.** Bassi, A. et al. Tattoo-Associated Skin Reaction: The Importance of an Early Diagnosis and Proper Treatment. **Biomed Res. Int.** 2014, 1–7 (2014).
- 302.** Xie, P., Yang, S.-T., He, T., Yang, S. & Tang, X.-H. Bioaccumulation and Toxicity of Carbon Nanoparticles Suspension Injection in Intravenously Exposed Mice. **Int. J. Mol. Sci.** 18, 2562 (2017).
- 303.** Chang, X.-L., Yang, S.-T. & Xing, G. Molecular Toxicity of Nanomaterials. **J. Biomed. Nanotechnol.** 10, 2828–2851 (2014).
- 304.** Liu, J.-H. et al. Biocompatibility of graphene oxide intravenously administrated in mice—effects of dose, size and exposure protocols. **Toxicol. Res. (Camb.)**. 4, 83–91 (2015).
- 305.** Duch, M. C. et al. Minimizing Oxidation and Stable Nanoscale Dispersion Improves the Biocompatibility of Graphene in the Lung. **Nano Lett.** 11, 5201–5207 (2011).
- 306.** Bhogal, R. H. & Thomas, S. S. Necrotizing Black Tattoo Reaction. **Am. J. Clin. Dermatol.** 10, 131–133 (2009).
- 307.** Bălăceanu-Gurău, B. et al. Cutaneous Adverse Reactions Associated with Tattoos and Permanent Makeup Pigments. **J. Clin. Med.** 13, 503 (2024).
- 308.** Kröger, M. et al. Tattoo Pigments Are Localized Intracellularly in the Epidermis and Dermis of Fresh and Old Tattoos: *In vivo* Study Using Two-Photon Excited Fluorescence Lifetime Imaging. **Dermatology** 239, 478–493 (2023).
- 309.** Donahue, N. D., Acar, H. & Wilhelm, S. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 143, 68–96 (2019).
- 310.** Hillaireau, H. & Couvreur, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cell. Mol. Life Sci.** 66, 2873–2896 (2009).
- 311.** Slater, D. N. & Durrant, T. E. Tattoos: light and transmission electron microscopy studies with X-ray microanalysis. **Clin. Exp. Dermatol.** 9, 167–173 (1984).
- 312.** Baranska, A. et al. Unveiling skin macrophage dynamics explains both tattoo persistence and strenuous remo-

- val. *J. Exp. Med.* 215, 1115–1133 (2018).
313. Lea, P. J. & Pawlowski, A. *Human Tattoo*. *Int. J. Dermatol.* 26, 453–458 (1987).
314. Lin, C. et al. Macrophage-like rapid uptake and toxicity of tattoo ink in human monocytes. *Immunology* 171, 388–401 (2024).
315. Chen, R., Jäättelä, M. & Liu, B. Lysosome as a Central Hub for Rewiring pH Homeostasis in Tumors. *Cancers (Basel)* 12, 2437 (2020).
316. del Moral, M. et al. Role of the Lactide:Glycolide Ratio in PLGA Nanoparticle Stability and Release under Lysosomal Conditions for Enzyme Replacement Therapy of Lysosomal Storage Disorders. *J. Funct. Biomater.* 14, 440 (2023).
317. Marchesi, V. T. & Gowans, J. L. The migration of lymphocytes through the endothelium of venules in lymph nodes: an electron microscope study. *Proc. R. Soc.* 283–290 (1996).
318. Sasaki, K., Pabst, R. & Rothotter, H.-J. The unique ultrastructure of high-endothelial venules in inguinal lymph nodes of the pig. *Cell Tissue Res.* 276, 85–90 (1994).
319. Anderson, A. & Anderson, N. Lymphocyte emigration from high endothelial venules in rat lymph nodes. *Immunology* 31, 731–748 (1976).
320. Feng, D., Nagy, J. A., Pyne, K., Dvorak, H. F. & Dvorak, A. M. Neutrophils Emigrate from Venules by a Transendothelial Cell Pathway in Response to FMLP. *J. Exp. Med.* 187, 903–915 (1998).
321. Vera Shinder, Cinamon, G. & Alon, R. Shear forces Promote Neutrophil Transendothelial Migration Triggered by Endothelium-Displayed Chemoattractants. Phase-Contrast Videomicroscopy and Transmission Electron Microscopy Studies. *Microsc. Microanal.* 9, 416–417 (2003).
322. Azzali, G., Arcari, M. L. & Caldara, G. F. The “mode” of lymphocyte extravasation through HEV of Peyer’s patches and its role in normal homing and inflammation. *Microvasc. Res.* 75, 227–237 (2008).
323. Thureson-Klein, Å., Hedqvist, P. & Lindblom, L. Leukocyte diapedesis and plasma extravasation after leukotriene B4: Lack of structural injury to the endothelium. *Tissue Cell* 18, 1–12 (1986).
324. Carman, C. V. et al. Transcellular Diapedesis Is Initiated by Invasive Podosomes. *Immunity* 26, 784–797 (2007).
325. Carman, C. V. & Martinelli, R. T. Lymphocyte–Endothelial Interactions: Emerging Understanding of Trafficking and Antigen-Specific Immunity. *Front. Immunol.* 6, (2015).
326. Kogushi, M., Nakamura, S., Kishi, Y., Kim, S. & Takahashi, K. A study of leukocyte extravasation in early inflammatory changes in the pulp. *J. Endod.* 14, 475–481 (1988).
327. Staunton, D. E., Dustin, M. L., Erickson, H. P. & Springer, T. A. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell* 61, 243–254 (1990).
328. Steiner, O. et al. Differential Roles for Endothelial ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in Shear-Resistant T Cell Arrest, Polarization, and Directed Crawling on Blood–Brain Barrier Endothelium. *J. Immunol.* 185, 4846–4855 (2010).
329. Nourshargh, S. & Alon, R. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity* 41, 694–707 (2014).
330. Vestweber, D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 692–704 (2015).
331. Balcan, E. Ultrastructural Dynamics of Transendothelial Migration of Lymphocytes Through High Endothelial Venules (HEVs) of the Mucosa Associated Peyer’s Patches. *Period. Biol.* 119, 1–7 (2017).
332. Kling, D., Fingerle, J. & Harlan, J. M. Inhibition of leukocyte extravasation with a monoclonal antibody to CD18 during formation of experimental intimal thickening in rabbit carotid arteries. *Arterioscler. Thromb. A J. Vasc. Biol.* 12, 997–1007 (1992).
333. Carman, C. V. & Springer, T. A. Trans-cellular migration: cell–cell contacts get intimate. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 533–540 (2008).
334. Millán, J. et al. Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat. Cell Biol.* 8, 113–123 (2006).
335. Mamdouh, Z., Chen, X., Pierini, L. M., Maxfield, F. R. & Muller, W. A. Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis. *Nature* 421, 748–753 (2003).
336. Middleton, J., Patterson, A. M., Gardner, L., Schmutz, C. & Ashton, B. A. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* 100, 3853–3860 (2002).
337. Carman, C. V. & Springer, T. A. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J. Cell Biol.* 167, 377–388 (2004).





# Anexo 1

# Artículos publicados

# Artículo 1

**"Synthetized Carbon-based Nano and Microparticles for Sentinel Lymph Node Tattooing. Experimental, Histopathological and Ultrastructural Study."**

[Manuscrito en revisión]

1   **Synthetized Carbon-based Nano and Microparticles for Sentinel**  
2   **Lymph Node Tattooing. Experimental, Histopathological and Ul-**  
3   **trastructural Study.**

4   Marta Baselga<sup>1</sup>, Antonio Güemes<sup>1,2</sup>, Manuel Arruebo<sup>1,3,4</sup>, Cristina Yus<sup>1,3,4\*</sup>, Teresa Alejo<sup>1,3,4</sup>, Víc-  
5   tor Sebastián<sup>1,3,4,5</sup>, Gema Martínez<sup>1,3,4,5</sup>, Dolores Arribas<sup>1,2</sup>, Gracia Mendoza<sup>1</sup>, Concepción Jun-  
6   quera<sup>1,6</sup>, Eva Monleón<sup>1,6,7</sup>

7   <sup>1</sup> Institute for Health Research Aragon (IIS Aragón), 50009 Zaragoza, Spain

8   <sup>2</sup> Department of Surgery, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

9   <sup>3</sup> Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA), CSIC – University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

10   <sup>4</sup> Department of Chemical Engineering, University of Zaragoza, Campus Río Ebro, 50018 Zaragoza, Spain

11   <sup>5</sup> Networking Res. Center in Biomaterials, Bioengineering and Nanomedicine (CIBERBBN), Instituto de Salud Carlos  
12   III; 28029 Madrid, Spain

13   <sup>6</sup> Department of Human Anatomy and Histology, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

14   <sup>7</sup> Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain-

15

16   \* Corresponding author: cyargon@unizar.es

17   **Abstract**

18   **Background.** Selective sentinel lymph node biopsy (SNLB) is the standard method for detecting regional  
19   metastases in breast cancer patients. Identifying affected axillary lymph nodes before neoadjuvant treat-  
20   ment is crucial, as such treatment may alter drainage pathways and lymph node morphology, hindering  
21   the identification of sentinel lymph nodes. The use of carbon-based tattooing on sentinel lymph nodes  
22   (SLN) has been employed as a permanent tattooing method in clinical studies of Targeted Axillary Dissec-  
23   tion (TAD), aiding in the SLN identification during surgery.

24   **Results.** Our study introduces a new method of lymph node tattooing based on poly lactic-co-glycolic  
25   (PLGA) particles with encapsulated carbon. This strategy substantially improves tattooing efficiency over  
26   single carbon suspensions currently used in clinical studies. We synthesized and characterized carbon-  
27   loaded PLGA micro- and nanoparticles, experimentally assessing their biological impact on porcine lymph  
28   nodes. The effect of particles' size and concentration was evaluated over time (from 1 to 16 weeks). Light  
29   and electron microscopy studies were conducted to characterize the cellular effects induced by the pres-  
30   ence of these particles.

31   **Conclusions.** Our findings reveal that the diverse physicochemical parameters of the particles interact  
32   differently with the lymphatic tissue, influencing their biodistribution within the lymph nodes and the  
33   intensity of the inflammatory response.

34   **Keywords:** targeted-axillary dissection; sentinel lymph node biopsy; nanoparticles; carbon; ultrastructure;  
35   breast cancer; carbon-tattooing

36   **1. Introduction**

37 At the time of diagnosing all cases of breast cancer (BC), it is essential to determine whether the  
38 axillary nodes are affected by the tumor. The current standard procedure to avoid Axillary Lym-  
39 phadenectomy (AL) and its significant sequelae is the selective sentinel lymph node biopsy  
40 (SLNB). According to the experience on sentinel nodes, if the sentinel node is not affected, the  
41 likelihood of another axillary lymph node being affected is remote. Therefore, SLNB is sufficient  
42 to ascertain the status of the axillary nodes [1,2]. Traditionally, it has been stated that if axillary  
43 involvement is confirmed by ultrasound and biopsy at the time of diagnosis, SLNB is contraindi-  
44 cated, and AL is deemed mandatory. However, this paradigm has shifted in recent years.

45 The administration of neoadjuvant therapy (NAT) can be so effective that it leads to the disap-  
46 pearance, even complete, of tumor cells in both the primary tumor and the axillary lymph nodes.  
47 Detecting the sentinel lymph node (SLN) in patients who have undergone NAT poses significant  
48 challenges, as the treatment can alter lymphatic drainage pathways. Consequently, the tech-  
49 nique exhibits a superior percentage of false negatives, wherein the SLN may not show tumor  
50 cells, while other non-sentinel lymph nodes might. This has profound implications, as it may  
51 leave a chemoresistant tumor in the axilla and underestimate the lesion, potentially resulting in  
52 suboptimal treatment for the patient [3–6]. Furthermore, previously metastatic nodes may not  
53 coincide with the sentinel node due to the blockage of lymphatic circulation. To decrease the  
54 rate of false negatives compared to conventional SLNB, it becomes necessary to macroscopically  
55 identify the nodes previously affected.

56 The ACOSOG Z107 [3], SENTINA [4], and SN FNAC [5] studies demonstrated that, under certain  
57 conditions, performing SLNB after NAT in patients with metastatic lymph nodes was feasible and  
58 safe. The difficulty lies in identifying nodes that, when metastasized, were easily visible by ultra-  
59 sound. However, after NAT, they can become unrecognizable due to their reduced size and the  
60 absence of ultrasound signs of infiltration. To address this challenge, Targeted Axillary Dissection  
61 (TAD) was introduced, involving the preoperative placement of a metallic clip after NAT. Alt-  
62 hough TAD is a promising concept, the preoperative placement of the metallic clip is not straight-  
63 forward and necessitates an X-ray for guiding lymph node removal [7–9]. To avoid these limita-  
64 tions, various techniques have been described, including magnetic seeds [10,11], radioactive  
65 seeds [12–14], radar reflectors [15,16], and carbon-based tattoos [17–26].

66 Carbon-based tattoos could serve as an alternative to the described localization methods, as  
67 they are inert and can remain in the lymph nodes indefinitely, easily visible at a glance. Carbon  
68 tattoos in the TAD technique have gained popularity in recent years. Carbon does not interfere  
69 with the pathological assessment of nodal tissue and provides a distinct macroscopic staining

70 compared to the tissues of the organism, making it suitable for the application.[20] Commercial  
71 charcoal-based suspensions in doses of 0.1-1 ml (carbon black 0.01-1 %w/v) has been the most  
72 widely used in clinical and preclinical trials, reporting nodal detection rates after NAT of 60-95  
73 % and false negative rates of 9.1-22 % [17,18,20–22,24]. However, its adherence to the receptor  
74 tissue is compromised by the low viscosity of the substance itself, leading to its predominant  
75 distribution in the cortex of the lymph node and the surrounding fatty tissue. This results in non-  
76 homogeneous staining, as well as undesired dissemination via the lymphatic pathway, occurring  
77 in approximately 18 % of cases [18,27].

78 The use of polymeric nanostructured systems for sustained, localized, and extended release of  
79 active principles has been widely adopted in clinical practice for various therapeutic purposes,  
80 improving conventional delivery approaches. In this study, we evaluate the *in vivo* response af-  
81 ter the administration of novel biodegradable sustained-release polymeric systems with the aim  
82 of easily detect with the naked eye the tattooed nodes. An exhaustive histopathological study  
83 of the effect of these carriers on the lymphatic tissue was also performed.

84 The aim of the study is to develop a tattooing method for its potential use in metastasized axil-  
85 lary lymph nodes in patients suffering from advanced breast cancer. This procedure will be con-  
86 ducted before NAT, facilitating the detection of those tagged lymph nodes during subsequent  
87 surgeries. We synthesized poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nano- and micro-particles to en-  
88 capsulate tiny carbon nanoparticles by various approaches. We experimentally analyzed the  
89 lymph node tattooing in a total of 7 pigs to study the biological behavior and tattooing efficiency  
90 over time of each type of particle. The effect of the inoculated particles over time (1, 2, 4, 6, and  
91 16 weeks), concentration (10 or 20 mg/ml), and size (micro- and nanoparticles, denoted as CE  
92 and CS, respectively) was assessed through histological and ultrastructural studies.

## 93 **2. Materials and methods**

### 94 **2.1. Synthesis, characterization and *in vitro* studies of micro- and nanoparticles**

#### 95 **2.1.1. Materials**

96 Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA Resomer® RG504H) was purchased from Evonik Industries  
97 AG, Poly(ethylene glycol)-block -poly(propylene glycol)-block-poly(ethylene glycol) (Pluronic® F-  
98 68), chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ), ethyl acetate, dichloromethane (DCM), and polyoxyethylenesorbitan  
99 monolaurate (Tween® 20) were purchased from Sigma Aldrich (Merck KGaA; Darmstadt, Ger-

100 many). The synthesis of the Carbon nanoparticles (C-NPs) was carried out by laser pyrolysis tech-  
101 nology at the Unit 9 of the ICTS NANBISIS. The continuous gas flow reactor system and experi-  
102 mental protocol have been described elsewhere [28,29].

103 Human dermal fibroblasts (NHDF-Ad) were obtained from Lonza (Basel, Switzerland), J774A.1  
104 mouse monocyte-macrophages ATCC-TIB-67™ were acquired from LGC Standards (Barcelona,  
105 Spain) and human breast adenocarcinoma cell line MDA-MB-231 were kindly donated by Dr.  
106 Alberto Jiménez Schumacher (IIS Aragón). These cell lines were used to determinate the subcy-  
107 toxic dose of the nanoparticles used.

108 **2.1.2. Synthesis of nanoparticles with encapsulated carbon**

109 To evaluate the biological behavior of two different particle sizes, approximately in the order of  
110 100 nm and 1000 nm, it was considered the use of well-known particle production approaches:  
111 1) emulsion-solvent evaporation to produce submicrometric particles and 2) electrospraying to  
112 generate micrometric particles. The optimized protocols are briefly described below.

113 The oil-in-water (o/w) single emulsion-solvent evaporation method was used for the encapsula-  
114 tion of the previously prepared C-NPs in the PLGA nanoparticles (**Figure 1 a**). Briefly, the organic  
115 phase was composed of 10 mg/ml of PLGA and 30 mg/ml of surfactant (Pluronic F-68) dissolved  
116 in 5 ml of ethyl acetate containing 5 mg/ml of C-NPs previously prepared by laser pyrolysis. 10  
117 ml of Milli-Q water were added as the aqueous phase. The emulsification of both immiscible  
118 phases (organic and aqueous) was performed by an ultrasonic sonotrode (Branson Digital 450  
119 Sonicator) under 40 % amplitude and for 25 seconds. The resulting emulsion was left to evapo-  
120 rate on a stirring plate at 600 rpm for 3 h to evaporate the organic solvent and precipitate the  
121 particles. The particles were washed and recovered by centrifuging for 15 minutes at 15 °C and  
122 7500 rpm.

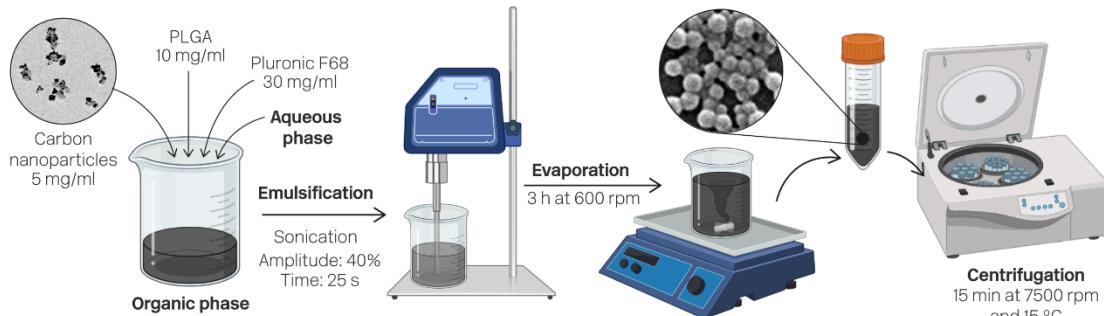
123 Microparticles were synthesized with an electrospinner (Yflow Electrospinner 2.2.D-500) using  
124 the uniaxial technique (**Figure 1 b**). Briefly, a solution of dichloromethane and chloroform was  
125 prepared (DCM:CHCl<sub>3</sub> (4:1)) containing 50 mg/ml of PLGA and 5 mg/ml of C-NPs previously pre-  
126 pared by laser pyrolysis, and stabilized with 10 mg/ml of Tween® 20. After optimization, a 15 cm  
127 distance between the collector and the needle and a dissolution flow rate of 0.5 ml/h were set.  
128 The Taylor cone was stabilized using a voltage of +13 kV and -3.9 kV corresponding to the tip of  
129 the needle and the collector plate, respectively. The synthesized materials were collected on  
130 aluminum foil, placed on a flat collector.

131 **2.1.3. Preparation of tattooing vectors**

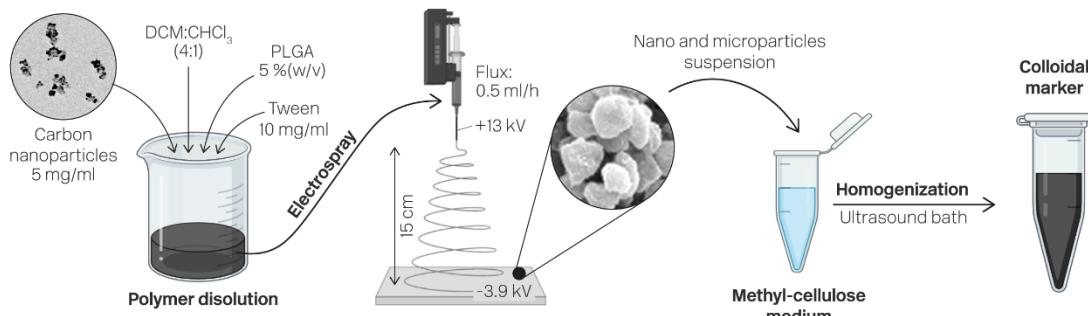
132 The synthesized nano- and microparticles were resuspended in a methylcellulose hydrogel for  
133 the preparation of injectable suspensions (**Figure 1 c**). The criterion for their optimization was  
134 to obtain sufficient viscous media to avoid the spread of the tag through the injection channel  
135 and in the tissue. Briefly, methyl cellulose was dissolved at a concentration of 1.0 % (w/v) in  
136 water by alternately changing the temperature from 80 to 0 °C while the sample was subjected  
137 to magnetic stirring at 600 rpm. After optimization, the previously prepared carbon-encapsu-  
138 lated nano- and microparticles were resuspended at the selected concentrations (10 and 20  
139 mg/ml) in 1.0 % (w/v) methylcellulose.

140 As a result, 4 different vectors loaded with tiny C-NPs were obtained: CS10 (emulsified nanopar-  
141 ticles, at a concentration of 10 mg/ml), CS20 (emulsified nanoparticles, at 20 mg/ml), CE10 (elec-  
142 trosprayed microparticles, at 10 mg/ml) and CE20 (electrosprayed microparticles, at 20 mg/ml).  
143 Additionally, a non-encapsulated carbon nanoparticle suspension at 20 mg/ml was used as pos-  
144 itive control (C-NPs).

#### (a) Emulsion method



#### (b) Electrospraying method



#### (c) Vector preparation

145

146 **Figure 1.** Brief outline of the methods used for the synthesis and preparation of the vectors. (a) Emulsi-  
147 solvent evaporation method. (b) Electrospraying method. (c) Dispersion of the resulting vectors in methyl-  
148 cellulose medium.

#### 149 2.1.4. Scanning and transmission electron microscopy of nano- and microparticles

150 The morphological characterization and size distribution of the resulting particles was per-  
151 formed by scanning electron microscopy (SEM Inspect F50) at an acceleration voltage of 5-10  
152 kV. The particles were prepared on carbon tape on an aluminum slide. The samples were coated  
153 with an Pd layer using a high vacuum coater (Leica EM ACE200, Wetzlar, Germany). Diameter  
154 distributions were obtained from manual measurements with the free Image-J software (v1.52;  
155 National Institutes of Health, 2019) for a sample of  $n=100$ .

156 Particle morphology and dimensions were also characterized using a T20-FEI transmission elec-  
157 tron microscope (FEI Company, Hillsboro, OR, USA) at 200 kV. TEM samples were prepared by  
158 depositing 50  $\mu\text{l}$  of the corresponding colloids dispersed in Milli-Q water on a formvar-coated  
159 copper grid and dried for at least 2 h.

160 **2.1.5. Quantification of encapsulated carbon**

161 Quantification of the carbon encapsulated in the polymeric particles was performed by thermo-  
162 gravimetric analysis (Mettler Toledo TGA/STDA 851e, Mettler Toledo; Columbus, OH, US) using  
163 the degradation temperatures of the materials used during the emulsification and electrospray-  
164 ing ranging from 30 to 800  $^{\circ}\text{C}$  with a  $\text{N}_2$  flow rate of 50 ml/min.

165 **2.1.6. Carbon release study**

166 To obtain the carbon release profiles of the carbon-loaded nano- and microparticles, they were  
167 dispersed in an aqueous medium and kept for 28 days at 37  $^{\circ}\text{C}$  under continuous agitation. Ali-  
168 quots of the supernatants were taken every day during the first week, and once a week for the  
169 rest of the month, i.e. on days 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21 and 28. The amount of carbon released  
170 was quantified by UV-Vis spectroscopy (Jasco V670), with the maximum absorbance at 218 nm  
171 attributed to the electronic transition of the carbon backbone from  $\pi-\pi^*$ .

172 **2.1.7. Cell viability assay**

173 The cytotoxicity of the nanoparticles synthetized in this work was investigated using the Blue  
174 Cell Viability Assay (Abnova, Taiwan) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the  
175 cells were seeded at concentration of 6,000 cells/well for fibroblast and J774 cells and 18,000  
176 cells/well for MBA-MD-323 cell line and were incubated for 24 h at 37  $^{\circ}\text{C}$  and 5 %  $\text{CO}_2$ . Subse-  
177 quently, carbon nanoparticles (C-NPs), electrosprayed carbon loaded microparticles (CE) and  
178 emulsified carbon loaded nanoparticles (CS) at different concentrations were added to the cells  
179 (0.1, 0.05, 0.025 and 0.01 mg/ml). After 24 h, the reagent (10 % (v/v)) was added, cells were  
180 incubated for 4 h at 37  $^{\circ}\text{C}$  and 5 %  $\text{CO}_2$  and fluorescence was read at 530/590 ex/em in a Vari-

181 oskan LUX microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.). Cytotoxicity was evaluated by comparing the values obtained for the treated cells with the ones retrieved from untreated cells, considering these controls as 100 % viability. Four replicas of each experiment were performed in triplicate. All results are presented as mean ± standard deviation.  
185 Data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) (GraphPad Prism 8, San Diego,  
186 US). Statistically significant differences were considered when  $p \leq 0.05$ .

187 **2.2. *In vivo* studies**

188 **2.2.1. Animals**

189 Seven female White Landrace pigs with an average weight of 25 kg (ranging from 22 to 30 kg)  
190 were used. The experimental animals were divided into two study groups. The “short-term  
191 study” included 4 animals which were housed for 1, 2, 4 and 6 weeks, and the “long-term study”  
192 included 3 animals which were housed for 16 weeks. The study was carried out in the facilities  
193 of the Institute of Health Sciences (IIS Aragón, Spain), in accordance with the Spanish Policy for  
194 Animal Protection RD53/2013 which meets the European Union Directive 2010/63. The experi-  
195 mental procedure was approved by the Animal Research Ethics Committee of the University of  
196 Zaragoza under reference PI09/20.

197 **2.2.2. Surgical procedure, lymph node tattooing and sampling**

198 In all animals, injections of the pigments were performed in the selected peritoneal lymph nodes  
199 from the splenic artery root, portal vein root and distal ileum regions. In each animal, 2-3 and 2-  
200 4 lymph nodes were tattooed per animal using both CE20 and CS20 vectors in the “short-term  
201 study” and the “long-term study” groups, respectively. In the “long-term study” group, 3 and 6  
202 peritoneal lymph nodes were also tattooed with CS10 and CE10 vectors respectively to assess  
203 the effect of the particle’s concentration. A control node using carbon nanoparticles (C-NPs) not  
204 encapsulated in the polymeric PLGA-based matrix was tattooed per experimental animal mim-  
205 icking the conventional carbon-based pigments currently used in the clinic. The surgical proce-  
206 dure was performed under general anesthesia with oral intubation, mechanical ventilation and  
207 neuromuscular blockade. Animals were premedicated with zolazepam (Zoletil, Virbac, 0.05  
208 mg/kg) and intramuscular dexmedetomidine (Dexmopet, Fattro Iberica SL, 0.08 ml/kg). Anaes-  
209 thetic induction was performed with disopropylphenol (Propofol 1 % MCT, Fresenius Kabi La-  
210 boratories Spain, 6 mg/kg) and sevofluorane 1.9 % (Baxter SL) was used for maintenance. Muscle  
211 block was induced with pancuronium bromide (Pavulon, Organon Española SA, 4 mg/ml). In-  
212 traoperative analgesia consisted on the continuous infusion of fentanyl (Fentanest, Aurovitae

213 España, 10 µg/kg/h) and Ringer's lactate (8 ml/kg/h) was the solution used as fluid therapy. For  
214 vector administration surgery, a midline laparotomy was performed to expose the abdominal  
215 viscera and isolate the selected mesenteric nodes. Once exposed, the nodes were tattooed for  
216 subsequent identification using different silk stitch patterns. Vectors were loaded in 0.2 ml doses  
217 (10 or 20 mg/ml) into 1 ml syringes and 21G needles were attached. Direct puncture was per-  
218 formed in the lymph nodes of the splenic artery root, portal vein root and distal ileum. After  
219 surgery, the animals were housed in special conditions in heated cages. We used buprenorphine  
220 (Buprenodale, Dechra, 0.05-0.1 mg/kg/day) during the first 72 h after surgery, and antibiotic  
221 prophylaxis with enrofloxacin (Enroflox, Agrovet Market SA, 2.5 mg/kg) until lymph node dissec-  
222 tion surgery performed after 1, 2, 4, 6, or 16 weeks. For lymph node dissection surgeries, a wide  
223 median laparotomy was also performed. Tattooed lymph nodes were identified macroscopically  
224 by showing a dark pigmentation characteristic of the vector administered. The tattooed lymph  
225 nodes were resected next to the identification sites and separated for further processing. At the  
226 end of the experiment, the animals were euthanized by a single injection of potassium chloride  
227 (1 mEq/kg) intravenously, preventing depolarisation of the heart muscle and causing it to stop.

228 **2.2.3. Macroscopic studies**

229 Before dissection surgery, the tattooed lymph nodes were photographed *in situ* and the ease of  
230 their visual identification was qualitatively scored on a scale from 1 to 3, with 1 being 'indistin-  
231 guishable' (tagged with the silk stitch but no optical signal to the naked eye of the vector was  
232 present), 2 "moderate" (tagged with the silk stitch and having a moderate optical signal of the  
233 vector present) and 3 "optimal" (tagged with the silk stitch and having a clear optical signal at-  
234 tributed to the vector present) identification (**Figure 2 a**).

235 After sampling, lymph nodes were fixed in 4 % formalin for 3-5 day. Lymph nodes were dissected  
236 away from the adjacent tissue and the largest tattooed face of the nodes was photographed.  
237 The photographs were used to calculate the percentage of the tattooed lymph node area based  
238 on a histogram analysis (**Figure 2 b**). The background of the image was colored white to subse-  
239 quently remove these pixels and delimit the extent of the lymph node. The image was converted  
240 to greyscale and image correction parameters were manually adjusted to achieve an acceptable  
241 contrast between the untattooed lymph node tissue and the tattooed area. The histogram of  
242 the image was extracted using ImageJ software [30] and the percentage of the tattooed area  
243 was calculated by quantifying the number of pixels with the darkest 30 % of greys, taking into  
244 account the entire pure non-white area. This system was validated by manually calculating the  
245 area of 3 lymph nodes. An error of ±3 % in the tattooed area selected was estimated.

246 **2.2.4. Microscopic studies**

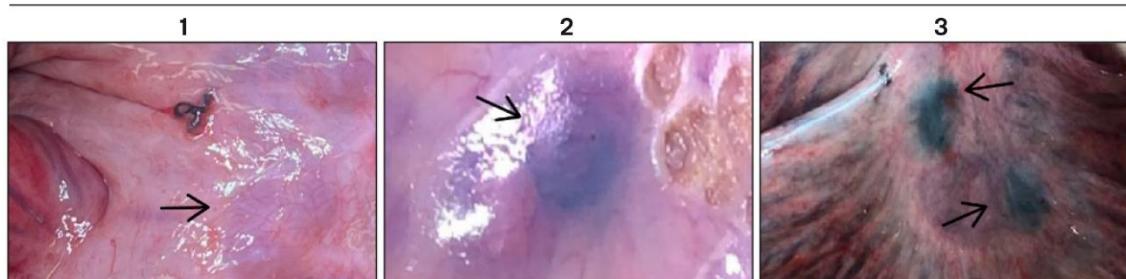
247 The formalin-fixed lymph nodes were cut into approximately 3 mm thick tissue slices and the  
248 most pigmented slice was selected for histological processing. Samples were processed accord-  
249 ing to standard procedures and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for light microscopy  
250 examination. Histological processing and staining were carried out by the Scientific Technical  
251 Services - Microscopy and Pathology at IIS Aragón.

252 Histologic slides were evaluated by light microscopy to determine the presence and location of  
253 the pigment and to assess the histological changes after the administration of the different pig-  
254 ments. In addition, the size of clusters formed by particles agglomerates and the intensity of the  
255 histological changes were evaluated based on a histogram analysis.

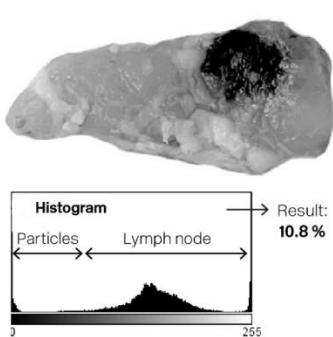
256 The size of the clusters formed by the inoculated particles were measured from micrographs of  
257 each tissue section using ImageJ software [30] (**Figure 2 c**). Six size ranges were established: <5  
258 µm, 5-15 µm, 15-30 µm, 30-45 µm, 45-60 µm and >60 µm. A total of 50 clusters were counted  
259 in each tattooed node ( $n=50$ ).

260 Finally, the degree of intensity of the inflammatory response was quantified according to the  
261 extent of the inflamed tissue. The most extensive section of inflammatory tissue in the lymph  
262 node was manually measured using ImageJ software [30] (**Figure 2 d**).

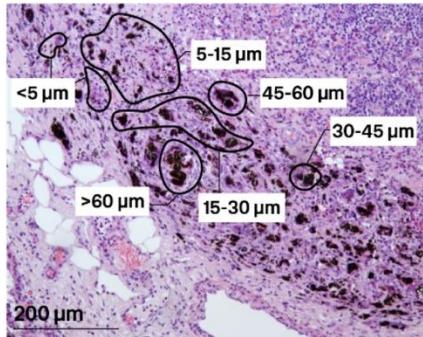
a. Ease of identification scale



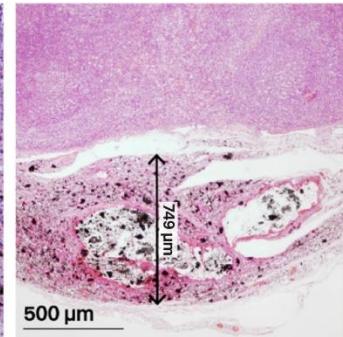
b. Tattooed area



c. Clusters size



d. Extension of inflammation



263

264     **Figure 2.** Macroscopic variables analyzed: (a) Ease of identification scale.  
265     (b) Estimation of the tattooed  
266     nodal area. (c) Morphometry of the particles clusters. (d) Extension measurement of the inflammatory  
response.

267     **2.2.5. Ultrastructural studies**

268     After sampling, biopsies were fixed in 2 % glutaraldehyde in PB for 3 days and subsequently  
269     washed with PB. Samples were post-fixed with 2 % osmium, rinsed, dehydrated in graded ace-  
270     tone (30 %, 50 %, 70 % with 2 % uranyl acetate, 90 %, 100 %), cleared in propylene oxide and  
271     embedded in araldite (Durcupan, Fluka AG; Buchs SG, Switzerland). An RMC MT-XL ultramicro-  
272     tome was used for obtaining semi-fine and ultra-fine slices. Semi-thin (1.5 µm) and ultra-thin  
273     (0.05 µm) sections were cut with a diamond knife. Semi-thin sections were stained with 1 %  
274     toluidine blue and examined by light microscopy (Olympus BX51 microscope, Olympus Imaging  
275     Corporation; Tokyo, Japan). Ultra-thin sections were collected on Formvar-coated single-slot  
276     grids counterstained with 1 % uranyl acetate and Reynold's lead citrate staining. The samples  
277     were observed at the Electronic Microscopy Service of Biological Systems of the University of  
278     Zaragoza with a JEOL JEM 1010 transmission microscope operating at 80 kV.

279     **2.14. Statistical analysis**

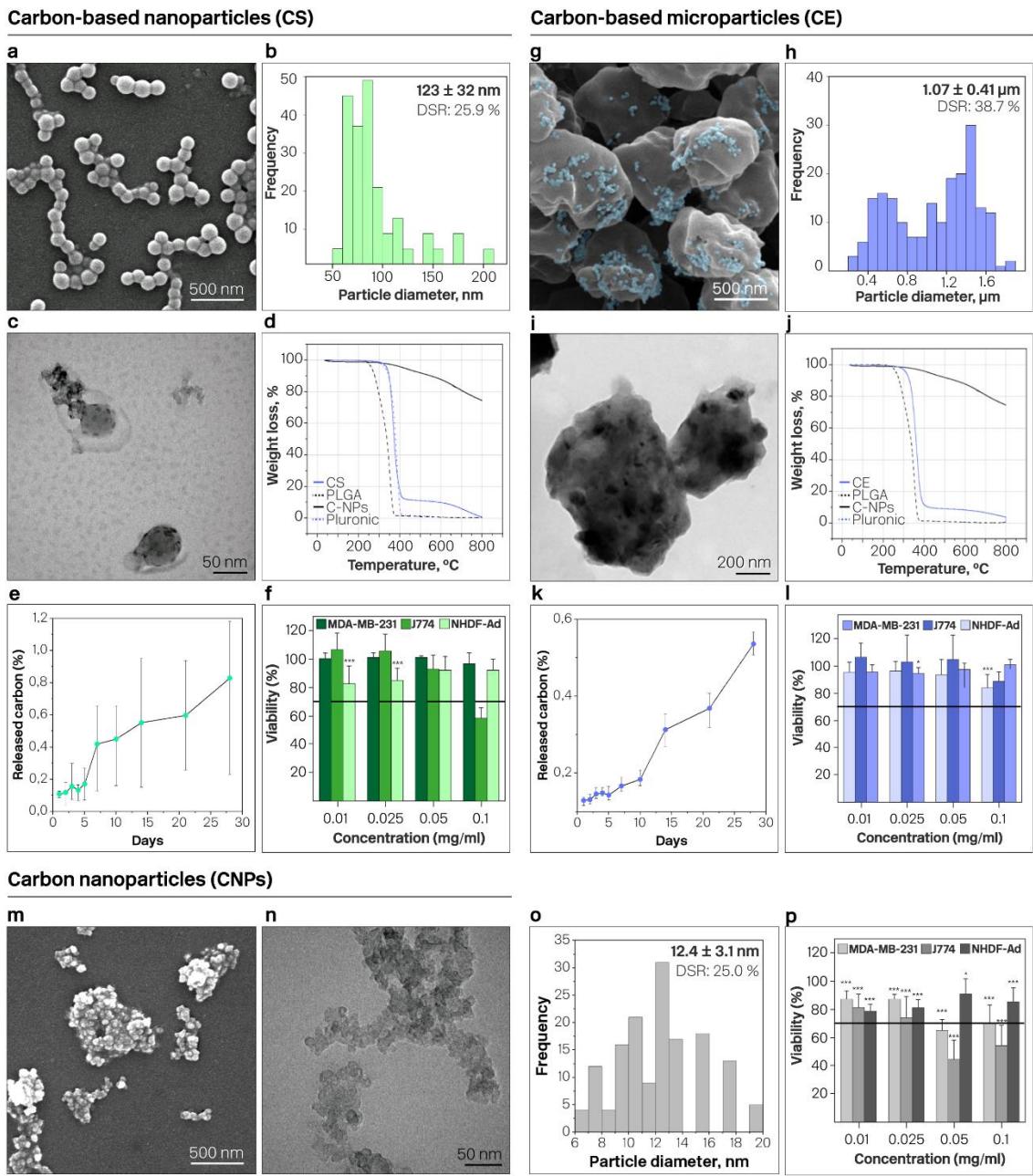
280     Statistical analyses were performed with IBM SPSS Statistics (SPSS Inc.; Illinois, USA). C-NPs-tat-  
281     tooed lymph nodes was only used as control and was not included in the statistical studies. To  
282     study whether the data came from a normal population, they were analyzed using the Shapiro-  
283     Wilk test. The variable of tattooed area showed a normal distribution. According to that, the  
284     corresponding tattooed area was analyzed using the t-Student test and the remaining variables  
285     were assessed using nonparametric tests. Independent groups were then established according  
286     to time ("short-term study" (1-6 weeks) and "long-term study" (16 weeks) groups), type of tat-  
287     tooing (CS10, CE10, CS20 and CE20, considering only data from the "long-term study" group),  
288     concentration (CS10-CE10 and CS20-CE20, considering only data from the "long-term study"  
289     group), and particle size (CS10-CS20 and CE10-CE20). In these groups, the data analysis was per-  
290     formed using the Mann-Whitney U test. Significant differences were considered when  $p \leq 0.05$ .  
291     Correlation studies between variables used Kendall's rank correlation coefficient. Statistically  
292     significant correlations were considered when  $p \leq 0.05$ .

293     **3. Results**

294     **3.1. Characterization of nano- and microparticles**

295 The optimized particle morphology and size distribution histogram were characterized using  
296 scanning electron microscopy (**Figure 3 a,g**). **Figure 3 (m,n)** depicts the morphology and size of  
297 the C-NPs here considered as a cargo in PLGA nano and microparticles. C-NPs have a mean par-  
298 ticle size of  $12.4 \pm 3.1$  nm (Figure 3 o). An average nanoparticle size (emulsion, CS, **Figure 3 b**) of  
299  $123 \pm 32$  nm was estimated, which increased to  $1.07 \pm 0.41$   $\mu\text{m}$  in the case of microparticles (elec-  
300 trospray, CE, **Figure 3 h**). The heterogeneity in particles size was determined with the polydis-  
301 persity index (PDI), which was 0.07 for CS and 0.15 for CE, considering a PDI value lower than  
302 0.25 as a narrow size distribution of the sample [31,32]. Therefore, the CE were more polydis-  
303 perse in size than the CS. Transmission electron micrographs revealed the presence of carbon  
304 nanoparticles (dark contrast dots of approximately 12-20 nm) encapsulated inside the nano- and  
305 microparticles for both synthesis (**Figure 3 c,i**, respectively) although for the CE microparticles  
306 some C-NPs were localized not only in the core but also attached on the surface of the micro-  
307 particles.

308 TGA analysis of the CS obtained by single emulsion-solvent evaporation revealed an average  
309 PLGA content of 87.5 wt.% and an average carbon content of 12.5 wt.% (**Figure 3 d**). The TGA  
310 curves indicate a remaining weight between 6.1 and 23.5 wt.% (associated to carbon), so the  
311 carbon encapsulation performance results may be slightly underestimated. These results were  
312 similar to those of CE, with an average PLGA content of 86.7 wt.% and carbon content of 12.3  
313 wt.% (**Figure 3 j**).



314

315 **Figure 3.** Characterization of the polymeric particles containing C-NPs synthesized (a-f) by emulsion (CS)  
 316 and (g-l) by electrospraying (CE), and (m-p) carbon nanoparticles (C-NPs). (a,g,m) Scanning electron mi-  
 317 crographs of the particles. The carbon nanoparticles have been artificially coloured in blue to make them  
 318 more visible in the micrographs. (b,h,o) Histograms of the size distributions. (c,i,n) Transmission electron  
 319 micrographs of the particles, where carbon is clearly distinguished by its higher electron density. (d,j)  
 320 Thermogravimetric curves. The solid blue line represents the mass loss of the micro and nanoparticles,  
 321 the dashed black line represents the weight loss of empty PLGA, the solid black line represents the weight  
 322 loss of carbon and the dashed blue line represents the weight loss of the stabilizer, in the case of the  
 323 nanoparticles obtained by emulsion. (e,k) Curves of the release kinetics of the encapsulated carbon nano-  
 324 particles from the polymeric nano- and microparticles in PBS 1x medium. (f,l,p) Cell viability in the fibro-

325 blast (NHDF-Ad), macrophages (J774), and human breast adenocarcinoma (MDA-MB-231) cell lines. Un-  
326 treated control cells were assigned as 100% viability. Statistical analyses are referred to untreated control  
327 cells (\* p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001).

328 The carbon released *in vitro* was less than 1 wt.% during the first month for both nano- and  
329 microparticles (**Table 1**, **Figure 3 e,k**). The reduced carbon release rate can be explained by (1)  
330 the large hydrophobicity of the carbon nanoparticles, which does not disperse or solubilize into  
331 the PBS medium and were not released from the PLGA encapsulating mixed matrices and (2)  
332 because the particles to be released were large enough (12.4 ± 3.1 nm, **Figure 3 o**) and would  
333 require an extensive degradation of the PLGA-based polymeric matrix in order to be released.  
334 This represents a positive outcome considering that the longer the permanence of the carbon  
335 nanoparticles within the polymeric particles, the better the intensity of the tattooing. It is im-  
336 portant to point out that according to the manufacturer the degradation timeframe of the PLGA  
337 used (PLGA Resomer® RG504H) is less than 3 months.

338 **Table 1.** Percentage of carbon released in vitro in nano and microparticles.

	Released carbon (%)			
	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
<b>Carbon from Nanoparticles</b>	0.42 ±0.3	0.55 ±0.6	0.59 ±0.5	0.83 ±0.5
<b>Carbon from Microparticles</b>	0.17 ±0.0	0.31 ±0.0	0.37 ±0.0	0.53 ±0.0

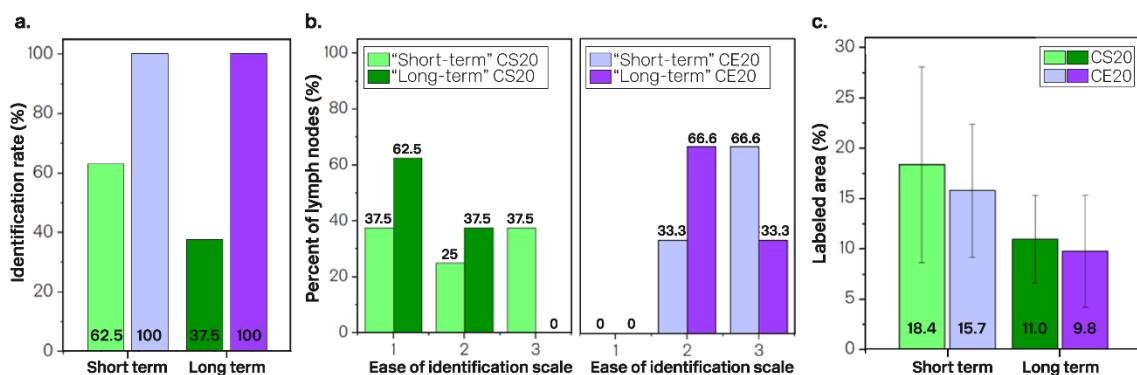
339 The cytotoxic effects of the C-NPs, CE and CS are depicted in **Figure 3 (f,l,p)** compared with the  
340 untreated cells (100% viability). Following the recommendations of the ISO 10993-5 for medical  
341 devices, viability below 70 % is considered cytotoxic. Accordingly, no cytotoxic effect was ob-  
342 served for fibroblast and MDA-MB-231 cell lines for CE and CS particles at any of the concentra-  
343 tions assayed, yielding viability values higher than 75 and 95 %, respectively. For macrophages  
344 a slight increase in the cytotoxicity was observed when cells were treated with CE at the higher  
345 doses assayed. When both, fibroblasts and MDA-MB-231, were treated with C-NPs no cytotoxic  
346 effect was observed but, conversely, high concentrations of C-NPs (0.05 and 0.1 mg/ml) exerted  
347 cytotoxicity for macrophages. These results revealed the significant toxicity reduction when tiny  
348 C-NPs were encapsulated in biocompatible polymeric NPs.

349 **3.2. Macroscopic studies**

350 Both vectors studied were identifiable intraoperatively from 1 to 16 weeks after injection. CE20  
351 tattooed lymph nodes were more easily identified than CS20 were (p=0.053). Compared to the  
352 silk stitch label, 100 % of the lymph nodes were tattooed when using the CE20 vector. In the  
353 case of the CS20 vector, 62.5 and 37 % of the lymph nodes were tattooed in the "short-term"  
354 and "long-term" groups, respectively (**Figure 4 a-b**). The ease of identification decreased with

355 statistical significance over time ( $p=0.005$ ). In the “long term” study, 42.9 and 25 % of the lymph  
356 nodes were tattooed with CE10 and CS10 vectors, respectively. The results show that the in-  
357 crease of concentration in CE-tattooed nodes positively correlated with the ease of identifica-  
358 tion ( $p=0.02$ ). However, no correlation was found for the CS-tattooed nodes.

359 As expected, a significant positive correlation was found between the ease identification and  
360 the percentage area of the lymph nodes tattooed ( $p=0.003$ ). For both vectors, the percentage  
361 area of the lymph nodes tattooed was larger in the “short-term study” than in the “long-term  
362 study” group (**Figure 4 c**). The reduction of the tattooed area over time was statistically signifi-  
363 cant ( $p=0.014$ ). From the first to the 16<sup>th</sup> week, this reduction was ~2.2 and ~1.9 fold for CE20  
364 (22.0 ±2.2 %) and CS20 (20.5 ±11.4 %), respectively. Additionally, the long-term study group  
365 showed a reduction in the percentage of tattooed area related to the decrease in particle con-  
366 centration in the case of CS vectors (CS20 11.0 ±4.4 % - CS10 7.4 ±5.7 %) but not in CE vectors  
367 (CE20 9.9 ±5.6 % - CE10 11.1 ±3.6 %) (**Figure S1**).



368 **Figure 4.** Macroscopic and microscopic variables analyzed. (a) Identification rates of CE20 (colored in blue  
369 and purple) and CS20 (colored in shades of green) tattoos. (b) Frequency of dissected lymph nodes show-  
370 ing difficult (1), moderate (2) or easy (3) identification. (c) Percentage of tattooed area over time for CS20  
371 and CE20 vectors.

373 In the C-NPs-tattooed lymph nodes (control) of “short-term study” group, 66.6 % of lymph nodes  
374 were properly identified. Nevertheless, in the “long-term study” group, no lymph node was eas-  
375 ily identified. In the “short-term study” group, C-NPs vectors tattooed the 15.5 ±0.2 % of the  
376 surface, which was reduced to 2.5 ±3.5 % in the “long-term study” group. This preliminary data  
377 suggests a ~6.2-fold reduction. Therefore, conventional carbon-based markers based on nano-  
378 particles provided a reduced contrast in the tissue compared to our vectors that contain in the  
379 interior of a polymeric matrix those carbon nanoparticles. C-NPs (control) samples were not in-  
380 cluded in the statistical study since the number of lymph nodes obtained after this tattooing was

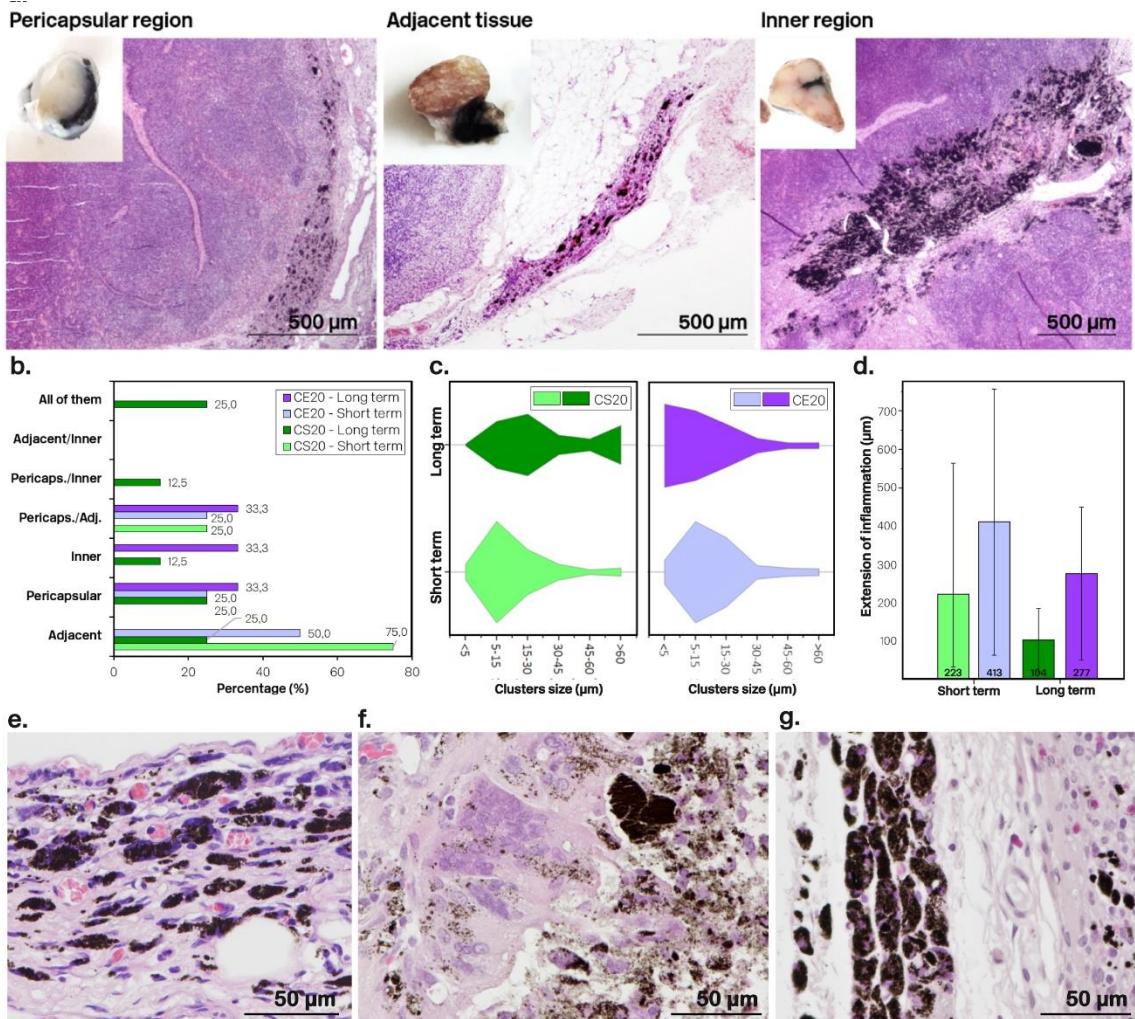
381 reduced. However, we use these results descriptively in the light and electron microscopy stud-  
382 ies.

383 **3.3. Microscopic studies**

384 Histopathologic evaluation of the lymph nodes revealed that CE20 and CS20 vectors were lo-  
385 cated mainly in the inner, in the pericapsular area or/and in the soft tissue adjacent to the node  
386 (**Figure 5 a**). The main location was pericapsular and/or adjacent in all cases (**Figure 5 b**).

387 The polymeric particles rearranged themselves into different microscopic structures, giving rise  
388 to clusters of varied dimensions. Clusters of 5 to 15  $\mu\text{m}$  were most frequently observed (Figure  
389 S2). In the “short-term study” group, average cluster sizes were  $14.5 \pm 4.0$  (CS20) and  $19.1 \pm 10.2$   
390  $\mu\text{m}$  (CE20). In the “long-term study” group, clusters measured  $44.5 \pm 44.1$  (CS20),  $14.1 \pm 8.3$   
391 ( $\mu\text{m}$ ) (CE20),  $21.0 \pm 5.6$  (CS10),  $15.7 \pm 6.6 \mu\text{m}$  (CE10) (**Figure 5 c**). Although not statistically significant,  
392 a reduction in cluster size was observed as stablign time increased.

393 In all samples from the “short-term study”, a foreign body reaction associated with the presence  
394 of the pigments was observed. The inflammatory process was characterized by the presence of  
395 macrophages and giant multinucleated cells (GMC) that engulfed the particles since the first  
396 week. Extracellular particles were also present (**Figure 5 e-g**). Small foci of necrosis associated  
397 with foreign body reaction were observed occasionally for both vectors. CE vectors induced a  
398 larger inflammatory response than CS vectors did ( $p=0.029$ ). Additionally, the extent of the in-  
399flammatory response positively correlated with the tattooed area ( $p=0.051$ ). A statistically sig-  
400nificant reduction in the intensity of the inflammation was observed over the weeks ( $p=0.04$ ).  
401 After 16 weeks of stablign, the presence of inflammation was substantially reduced and almost  
402 all lymph nodes showed mild or no inflammation. The reductions of the extension of the inflam-  
403 matory tissue from the “short-term study” group to the “long-term study” group were from  $223$   
404  $\pm 174$  to  $104 \pm 57 \mu\text{m}$  (CS20) and  $413 \pm 250$  to  $278 \pm 207 \mu\text{m}$  (CE20) (**Figure 5 d**). Thus,  $\sim 2.1$  and  
405  $\sim 1.5$ -fold reductions were identified. A foreign body reaction associated with low particle con-  
406 centration vectors was also observed. The inflammatory reaction was higher in the CE10 (239  
407  $\pm 151 \mu\text{m}$ ) than in CS10 vector ( $75 \pm 16 \mu\text{m}$ ) probably attributed to the larger sizes of the former.



408

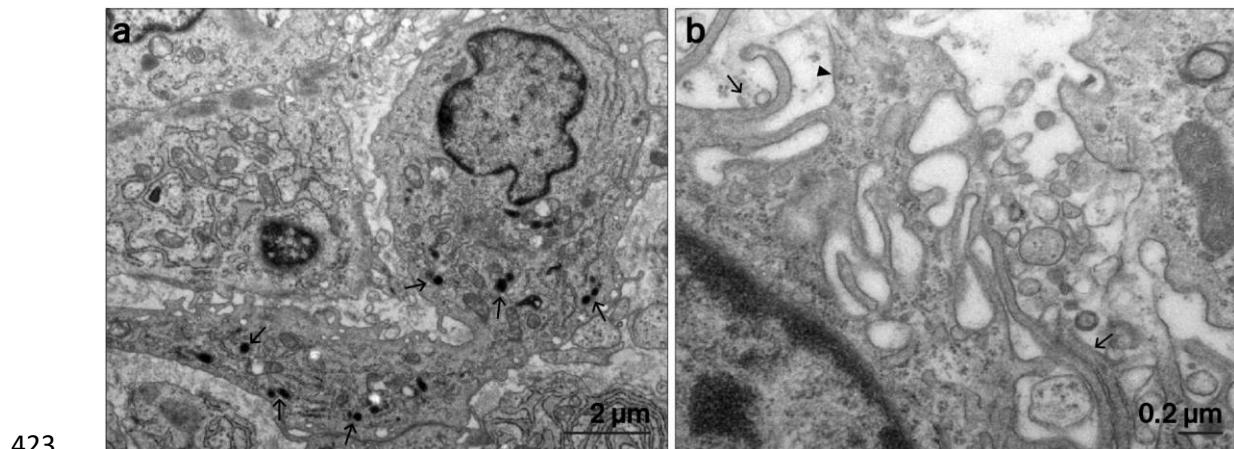
409 **Figure 5.** (a) Particles localization in the three different nodal regions (pericapsular region, adjacent tissue  
 410 and inner region). (b) Particle's location in CS20 and CE20 tattooed nodes. (c) Clusters size in CS20 and  
 411 CE20-tattooed nodes. (d) Extension of the inflammatory tissue in CS and CE20 tattooed nodes. (e-g) Inflam-  
 412 matory reaction associated with (e) CE20 and (f-g) CS20 vectors.

413 In C-NPs samples, samples at short times show the formation of large carbon clusters within the  
 414 lymph node. In “short-term study” group, the average of cluster’s size was  $25.0 \pm 24.4 \mu\text{m}$ , while  
 415 in the “long-term study” group was  $5.8 \pm 0.4 \mu\text{m}$ . There is a tendency for them to disintegrate  
 416 into smaller, more dispersed clusters as the weeks go by. In nodes tattooed with C-NPs (control)  
 417 inflammation was highly variable and reduced from  $541 \pm 245$  to  $14 \pm 19 \mu\text{m}$  ( $\sim 40$ -fold reduction).

### 418 **3.4. Ultrastructural study**

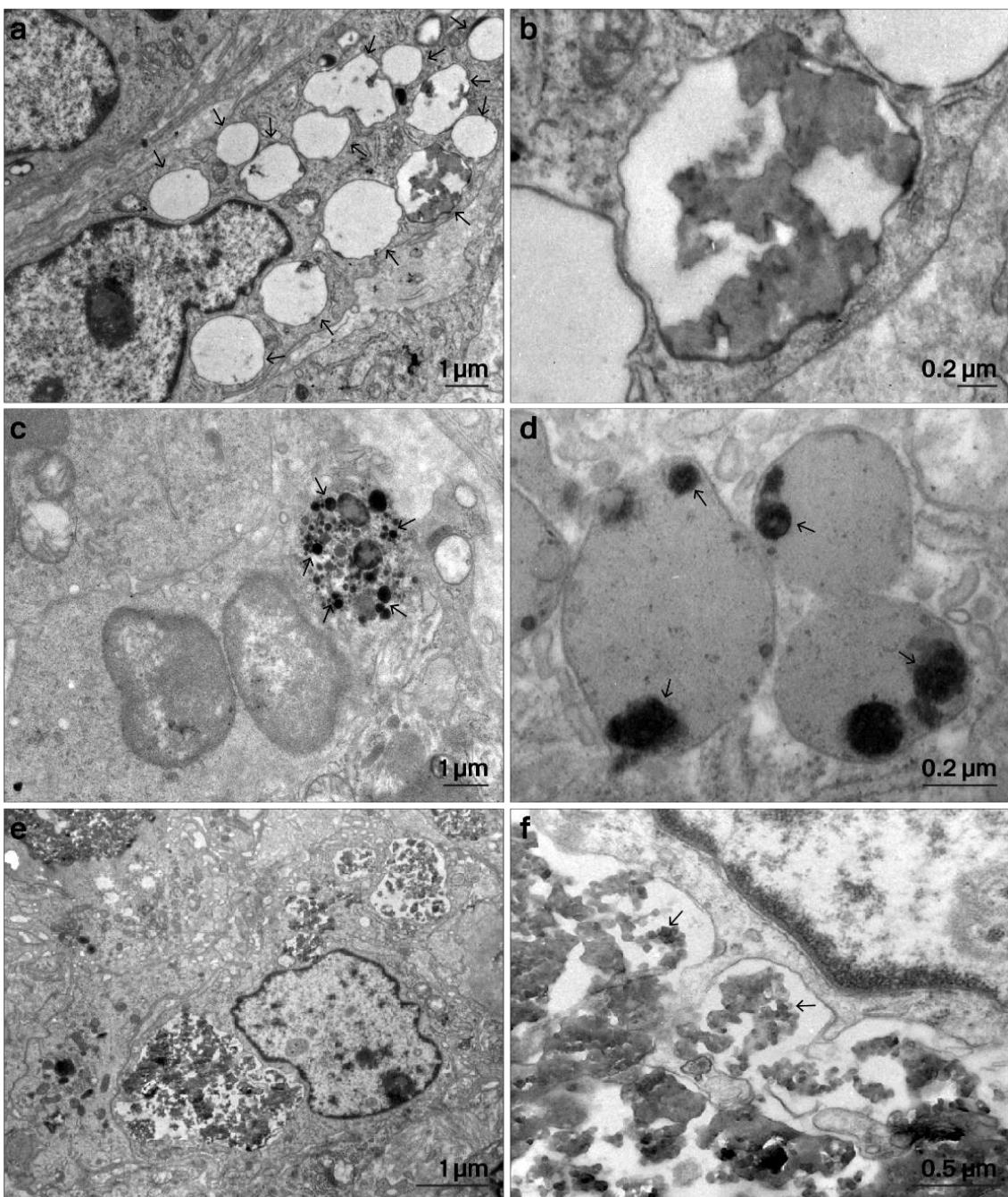
419 Inoculated particles were mainly found internalized in macrophages, isolated by or in the cyto-  
 420 plasm of GMC, or recruited into the connective tissue surrounding the lymph node.

421 In the early stages of the particle uptake process, in all cases macrophages internalize the parti-  
422 cles through the formation of filopodia and lamellipodia (**Figure 6**).



423  
424 **Figure 6.** Structure and ultrastructural features of macrophages. (a) Macrophage with numerous lyso-  
425 somes (arrows) in its cytoplasm. (b) Lamellipodia (arrowhead) and filopodia (arrow) emerging from the  
426 surface of a macrophage.

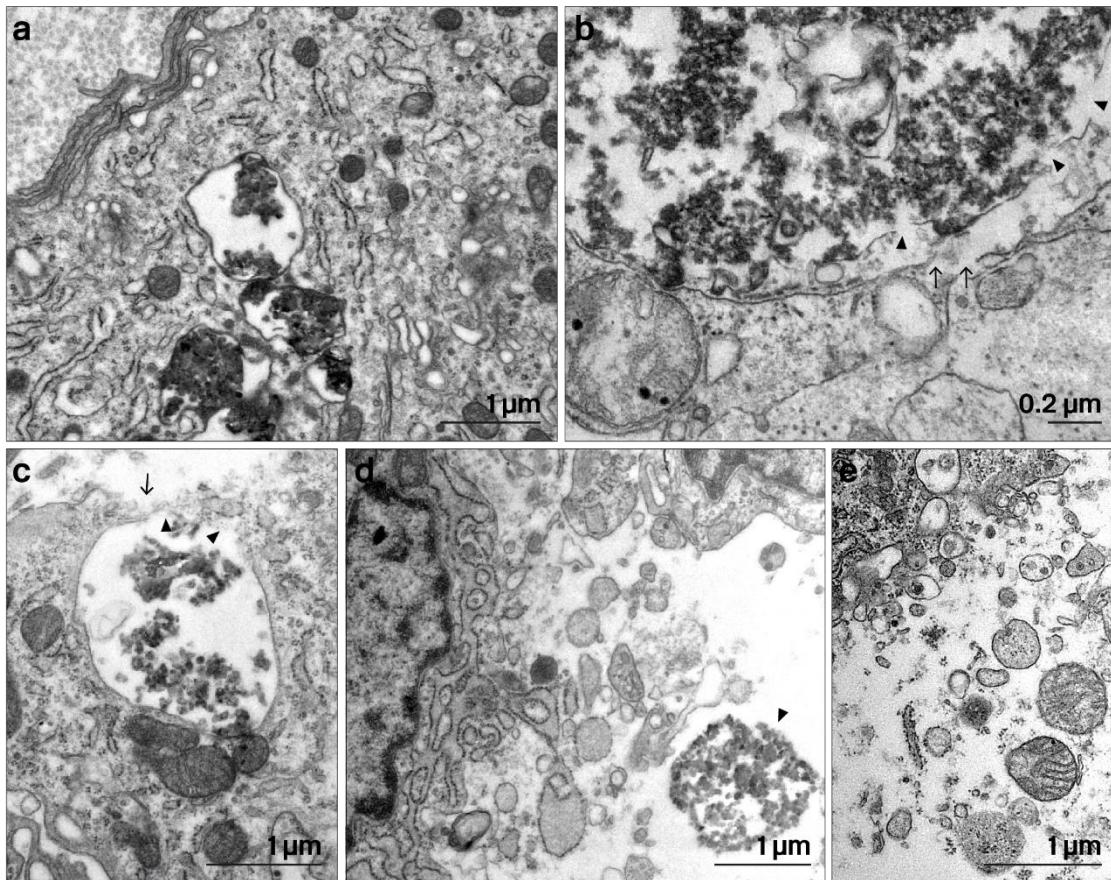
427 Macrophages phagocytosed all three types of particles. They are easily distinguished by their  
428 ultrastructural characteristics: carbon microparticles (CE) (**Figure 7 a-b**), carbon nanoparticles  
429 (CS) (**Figure 7 c-d**) and non-encapsulated carbon particles (C-NPs) (**Figure 7 e-f**). The average size  
430 of phagocytosed CE particles retrieved from the ultrastructural images is  $911.6 \pm 547.9$  nm  
431 ( $n=50$ ). CS particles show an average size of  $99.6 \pm 43.2$  nm ( $n=50$ ). Finally, C-NPs tend to aggre-  
432 gate into structures of  $41.9 \pm 16.6$  nm ( $n=50$ ). The phagolysosomes observed inside macrophages  
433 presented differences in size, morphology and electron density. The membrane of CE and CS  
434 loaded phagolysosomes is physically bounded to the surface of the microparticles, which gener-  
435 ates regular and re-rounded morphologies (**Figure 7 b-c**). However, the morphology of C-NPs  
436 phagolysosomes is more irregular (**Figure 7 e**).



437

438 **Figure 7.** Different types of particles phagocytosed by macrophages. (a-b) Microparticles (CE). (c-d) Nano-  
439 particles (CS). (e-f) Non-capsulated carbon nanoparticles (C-NPs).

440 After particle uptake by macrophages (**Figure 8 a**), the carbon particles cause disruption of the  
441 phagolysosome membrane in all three cases (**Figure 8 b-c**). As a result of membrane rupture,  
442 the lysosomal hydrolases are released into the cytosol, which cause lysis of the cell membrane  
443 itself with subsequent release of the cell organelles into the extracellular space (**Figure 8 d-e**),  
444 with the carbon particles remaining intact (**Figure 8 d**).

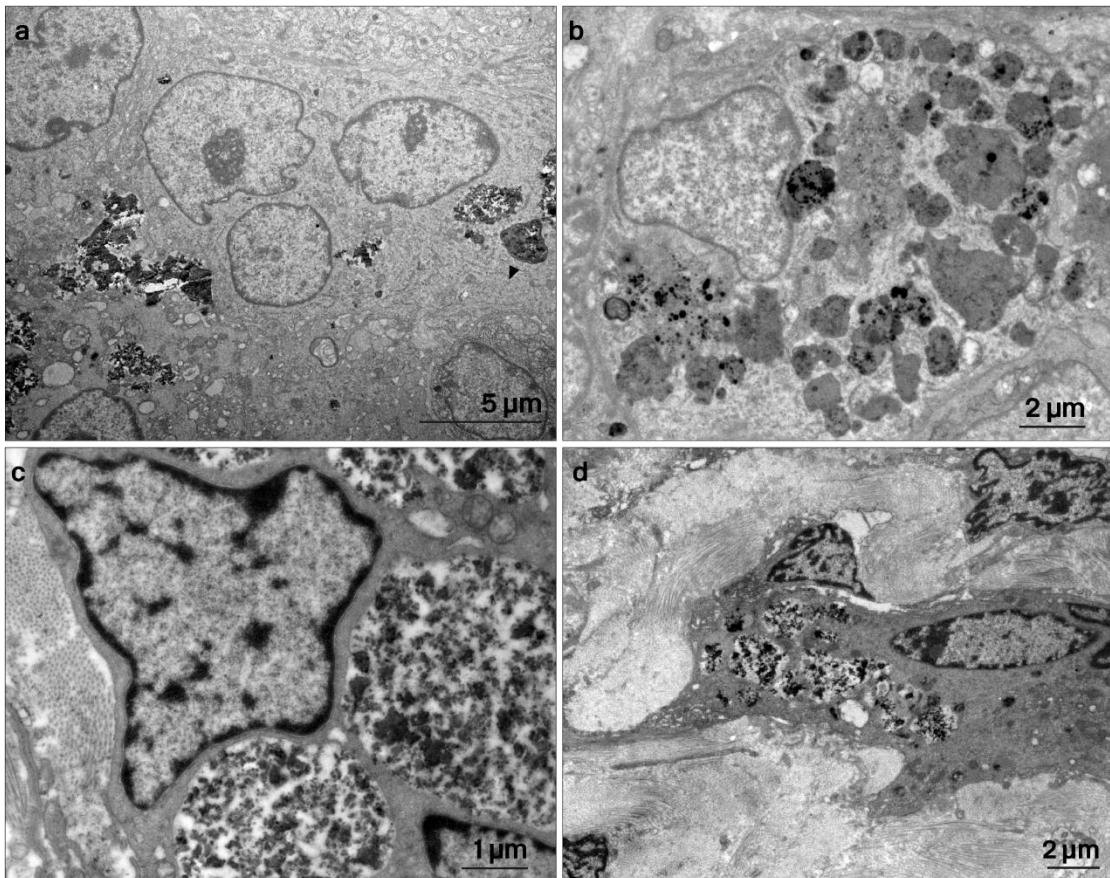


445

446 **Figure 8.** Effect of particles on macrophages. (a) Detail of the cytoplasm of a macrophage showing lysosomes with carbon particles (C-NPs) inside. (b) Carbon particles rupture the membrane of phagolysosomes (arrowheads), releasing lysosomal hydrolases that rupture the cell plasma membrane (arrows). (c) Plasma membrane of a macrophage lysed by spilled hydrolases. The rupture of the phagosome membrane (arrowheads) and the plasma membrane (arrows) is observed. (d) After rupture of the plasma membrane, the carbon particles remain intact in the extracellular medium. (e) The organelles spilled into the extracellular space preserve their structure.

453 Although the particles were mainly found in macrophages, particles were also observed in GMC  
454 which are formed by the fusion of macrophages and can isolate the pigments in the extracellular  
455 space or within the cytoplasm. (**Figure 9 a).**

456 The cellular debris and particles released by the rupture of the macrophage membranes are  
457 phagocytosed by new macrophages and so on. Thus, macrophages with numerous phagolysosomes  
458 with carbon in their interior were found (**Figure 9 b**). After 4 weeks, the polymer de-  
459 graded, and more free carbon particles were found (**Figure 9 b-d**). Isolated high-carbon macro-  
460 phages were observed within a matrix of collagen fibers in the adjacent tissue (**Figure 9 d**).



461

462 **Figure 9.** Particle isolation in GMC and particle interaction with macrophages in the long term. (a) Carbon  
 463 particles (C-NPs) internalized in a GMC. (b) Highly particle-laden macrophage (after 16 weeks). (c) The  
 464 polymer of CS and CE particles is degraded, and free C-NPs appear inside macrophages. (d) Particle-laden  
 465 macrophage is isolated within a matrix of collagen fibers.

#### 466 **4. Discussion**

467 The tattooing of lymph nodes is increasingly employed in clinical trials to tattoo SLN in breast  
 468 cancer patients before NAT. This strategy is low cost, does not require preoperative localization  
 469 procedures and minimizes additional discomfort for the patient, making it promising for lymph  
 470 node tattooing in oncologic patients [33]. Carbon-based tattoos are beginning to be validated in  
 471 clinical studies. In our experimental study, we have developed two carbon-based vectors based  
 472 on C-NPs encapsulated within a biodegradable polymeric matrix and inoculated in pig lymph  
 473 nodes. The identification rate (moderate-optimal visibility on the identification scale) in the  
 474 "short-term study" group (1-6 weeks) was high in lymph nodes tattooed with both vectors (62.5-  
 475 100 %). In the "long-term study" group (16 weeks), the rates were lower (25.0-66.7 %). Our re-  
 476 sults are in line with other clinical studies performed, which reported a positive identification  
 477 rate of 69-100 % [18-25,34,35].

478 Lymph nodes tattooed with 0.2 ml of CE20 vectors were adequately identified in node resection  
479 surgeries. It was possible to identify 100 % of the nodes in both the "Short-term study" and in  
480 the "Long-term study" groups. In the TATTOO multicentric clinical study, lymph nodes were tat-  
481 tooed with 3 ml of Spot® commercial carbon suspension or 0.6 ml of CARBO-REP®. They found  
482 83.6 % of the lymph nodes [22]. Goyal *et al.*[24] tattooed the SLN with 2 ml of Spot® or Black  
483 Eye® reporting an intraoperative identification of 75-82 %. Natsiopoulos *et al.*[18] successfully  
484 identified 93.3 % of nodes injected with 0.3-0.7 ml of Spot®. Allweis *et al.*[20] injected by ultra-  
485 sound guidance 0.2-0.5 ml doses of Spot® with an identification rate of 95 %. Patel *et al.*[21]  
486 reported a 100 % identification rate after injection of 0.1-1 ml Spot®. Dostalek *et al.*[25] tattooed  
487 with 0.1-0.5 ml of an activated carbon dispersion (Carbosorb, IMUNA PHARM, Slovakia) report-  
488 ing an intraoperative detection rate of 81 %. Kim *et al.*[34] reported a 98 % detection rate using  
489 activated charcoal (Charcotrace™). Choy *et al.*[35] used 0.1-0.5 ml of Spot® to tattoo the nodes  
490 with an identification rate of 93.7-94.6 %. Park *et al.*[19] tattooed the nodes with 0.5 ml of Spot®  
491 reporting an identification rate of SLN of 100 %. In another recent clinical trial (NEOTARGET), 69  
492 % of carbon tattooed nodes (Sterimark®) were optimally localized intraoperatively [23].

493 In the present study we explored the effect of factors such as time (1 to 16 weeks), particle size  
494 (range ~100 nm and ~1 µm) and concentration (10 and 20 mg/ml), on the tattooing of the  
495 lymph nodes and the tissue reaction. Studies on tissue response in the different time periods  
496 after injection of carbon-based markers are scarce. The cytotoxicity of carbon nanostructures is  
497 still a matter of debate. Although some authors report that carbon particles are inert and non-  
498 cytotoxic, others reported inflammatory reactions to varied degrees [36–39]. In our study, all  
499 tattoos tested in this work induced foreign body inflammatory reactions. This type of inflamma-  
500 tion is normal after the inoculation of nano- and micro-particles into the body as previously re-  
501 ported [40]. We demonstrate that the pigment particles remaining in the lymph node or in the  
502 adjacent soft tissue are mainly located within inflammatory tissue. As time goes by, the inflam-  
503 matory reaction decreases and the intensity of the tattooing also decreases.

504 Some preclinical studies revealed the diffusion of carbon-based particles to extranodal lymphoid  
505 tissue in 10.7-13.0 % of cases [18,24,35]. They also observed greater dissemination of the tat-  
506 tooing as the time between tattooing and surgery increased [24]. In this work, the statistical  
507 studies do not conclude an evident correlation between the adjacent location of the particles  
508 and the stabling time of the animals. However, some lymph nodes could not be identified in the  
509 lymph node dissection surgery. Therefore, these non-tattooed lymph nodes could have lost the  
510 tattooing by dissemination to adjacent tissue and this study may underestimate this possibility.

511 To study particle size, we synthesized nanoparticles (by emulsion, CS) in the ~100 nm range,  
512 and microparticles (electrosprayed, CE) in the ~1  $\mu$ m range. For both particles, the final ratio  
513 between PLGA and C-NPs loaded was very similar, so variations in the biological effects were  
514 associated with particle size. Lymph nodes tattooed with larger particle sizes (CE) showed easier  
515 identification than smaller particles (CS) did. The tattooed areas were similar in CE and CS-tat-  
516 tooed lymph nodes. We also found that particle size had a significant effect on the intensity of  
517 the inflammatory reaction, with inflammation increasing with particle size. This could be associ-  
518 ated with a higher amount of carbon in these particles. Nonencapsulated C-NPs show large in-  
519 flammatory reactions and increased breakdown of macrophage phagolysosomes (associated  
520 with free C-NPs), leading to a higher rate of cell death according with our ultrastructural studies.  
521 These experimental results were like those obtained in the *in vitro* cytotoxicity assays, where we  
522 found that polymer-encapsulated C-NPs reduce carbon toxicity.

523 The concentration of particles was explored at 10 and 20 mg/ml, only effects on the identifica-  
524 tion rates were observed. The identification rate was higher in CE20 and CS20 nodes with re-  
525 spect to CE10 and CS10, respectively. Additionally, CE20 significantly improved the identification  
526 of lymph nodes compared to CE10. In CS samples, no statically significant conclusions were ob-  
527 served. In contrast, other authors suggest that the administered volume (and, therefore, final  
528 particle concentration) does not correlate with ease of identification [24].

529 The biological effect of tattooing lymph nodes with (nonencapsulated) carbon particles remain  
530 deeply unknown. Using transmission electron microscopy, we were able to observe the interac-  
531 tion of the particles with macrophages. We observed a dynamic process in which phagocytized  
532 particles were released to the extracellular medium and re-uptaken by new macrophages as  
533 part of a detoxification process. We found that particles were phagocytosed or isolated in GMC  
534 from the first week. Phagocytosis of exogenous particles by macrophages is one of the main  
535 mechanisms of innate immune defense [41–43]. Although particles were mainly found in mac-  
536 rophages, large amounts of particles were also observed inside GMC. GMC formation associated  
537 with foreign bodies (typically between 10-100  $\mu$ m) is a frequent phenomenon [44,45]. This is in  
538 accordance with previous studies in skin which demonstrate that dermal macrophages consti-  
539 tute the primary store of dermal tattoo pigment in mice [46].

540 An important aspect before progressing to clinical trials is to ensure that carbon-based tattoos  
541 do not affect the pathological examination of the nodal tissue. However, in other studies  
542 pathologists did not consider histologic evaluation to be complicated by the carbonaceous pig-  
543 ment [18,19,21,22].

544 In this preliminary study, all included variables showed greater efficiency for the synthesized  
545 particles compared to the control tattoos (nonencapsulated C-NPs). In week 1, the inflammation  
546 produced by the nonencapsulated carbon was more than double than that of the polymer-en-  
547 capsulated carbon. Moreover, in the long-term study group, no C-NPs-tattooed lymph nodes  
548 were easily identified. We could not detect nodes tattooed with C-NPs after long periods of sta-  
549 bling (from 6 weeks onwards). Therefore, the encapsulation of C-NPs in polymeric systems im-  
550 proves the efficiency when tattooing nodes.

551 *In vitro* release studies showed very slow-release rates of C-NPs from the polymeric systems  
552 chosen. However, the degradation pattern of the polymers varies as a function of the pH of the  
553 medium [47]. The lysosomal pH is estimated to be between 4.5-5, which accelerates PLGA de-  
554 gradation [47,48]. Under recreated lysosomal conditions, PLGA degradation was estimated to be  
555 close to ~40 % after 4 weeks [49]. These *in vitro* results could explain the higher release rate of  
556 C-NPs in our *in vivo* studies since we found freer C-NPs as early as 4 weeks after inoculation. Our  
557 results are in agreement with previous studies which have shown a faster PLGA degradation rate  
558 *in vivo* compared to *in vitro* attributed to an autocatalytic effect of the acidic hydrolyzed byprod-  
559 ucts [50].

560 At clinical level, ease of identification and a reduced inflammatory reaction are the most relevant  
561 variables to grant subsequent clinical development. On the one hand, our preliminary results  
562 indicate that polymer-encapsulated C-NPs smaller in size (nano over micron) show lower inflam-  
563 matory reaction. In this sense, the use of polymers with larger periods of degradation could  
564 reduce the inflammation since the lower release of C-NPs. On the other hand, polymer-encap-  
565 sulated C-NPs greater in size (micron over nano) lightly improved the ease of identification.

## 566 **5. Conclusions**

567 In this preliminary study, CS20 and CE20 tattooing showed similar reduction in the thickness of  
568 the inflammatory tissue (~2.1 and~1.5-fold, respectively). Likewise, the reduction of the tat-  
569 tooed area was ~1.9-fold (CS20), and ~2.2-fold reduction (CE20) from short-term to long-term  
570 study groups. CE20 showed superior positive identification rates (100 %) and similar tattooed  
571 areas. Therefore, it represents the most efficient tattooing of the lymph node compared to the  
572 other vectors studied. However, further studies are required to confirm these findings.

## 573 **List of abbreviations**

574 AL: Axillary lymphadenectomy  
575 ANOVA: Analysis of variance  
576 BC: Breast cancer  
577 C-NPs: Carbon nanoparticles  
578 DCM: Dichloromethane  
579 GMC: Giant multinucleated cells  
580 NAT: Neoadjuvant therapy  
581 PLGA: poly(lactic-co-glycolic acid)  
582 SEM: Scanning electron microscopy  
583 SLN: Sentinel lymph node  
584 SLNB: Selective sentinel lymph node biopsy  
585 TAD: Targeted axillary dissection  
586 TEM: Transmission electron microscopy  
587 TGA: Thermogravimetric analysis

588 **Declarations**

589 **Ethics approval and consent to participate**

590 This research was approved by the Animal Research Ethics Committee of the University of Zara-  
591 goza under reference PI09/20.

592 **Consent for publication**

593 Not applicable.

594 **Availability of data and materials**

595 All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its  
596 supplementary information file.

597 **Competing interests**

598 The authors declare no competing interests.

599 **Funding**

600 This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) [DTS20/00131].

601 **Authors' contributions**  
602 Conceptualization, A.G., M.A., M.B.; Synthesis and characterization: M.B., C.Y., T.A.; Surgery pro-  
603 cedures: A.G., M.B. and D.A.; Histological studies: E.M., and M.B.; Electron-microscopy investi-  
604 gation, C.J., and M.B.; Statistical analysis: M.B.; Writing – Original Draft, M.B., E.M.; Writing –  
605 Review & Editing, A.G., M.A., V.S., C.Y., C.J., D.A., G.M.; T.A.; Supervision, A.G., M.A., E.M., C.J.

606 **Acknowledgements**

607 Authors would like to acknowledge the use of “Servicio General de Apoyo a la Investigación  
608 (SAI)” from the University of Zaragoza (Zaragoza, Spain), and the use of “Servicio de Microscopía  
609 Electrónica” from the “Centro de Investigación Príncipe Felipe” (Valencia, Spain). G.M. gratefully  
610 acknowledges the support from the Miguel Servet Program (MS19/00092; ISCIII).

611 **Bibliography**

- 612 1. Turner, R.; Olilla, D.; Krasne, D.; Giuliano, A. Histopathologic Validation of the Sentinel Lymph Node  
613 Hypothesis for Breast Carcinoma. *Ann Surg* **1997**, *226*, 271–276.
- 614 2. Giuliano, A.; Kirgan, D.; Guenther, J.; Morton, D. Lymphatic Mapping and Sentinel Lymphadenectomy for  
615 Breast Cancer. *Ann Surg* **1994**, *220*, 391–398.
- 616 3. Boughey, J.; Suman, V.; Mittendorf, E.; Ahrendt, G.; Wilke, L.; Taback, G.; Leitch, A.; Kuerer, H.; Bowling, M.;  
617 Flippo-Morton, T.; et al. Sentinel Node Surgery after Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Node-  
618 Positive Breast Cancer: The American College of Surgeons Oncology Group Z1071 Clinical Trial. *JAMA* **2013**,  
619 *310*, 1455–1461.
- 620 4. Kuehn, T.; Bauerfeind, I.; Fehm, T.; Fleige, B.; Hauschild, M.; Helms, G.; Lebeau, A.; Liedtke, C.; von Minchwitz,  
621 G.; Nekjudova, V.; et al. Sentinel-Lymph-Node Biopsy in Patients with Breast Cancer before and after  
622 Neoadjuvant Chemotherapy (SENTINA): A Prospective, Multicenter Cohort Study. *Lancet Oncol.* **2013**, *14*,  
623 608–618.
- 624 5. Boileau, J.; Porier, B.; Basik, M.; Holloway, C.; Gaboury, L.; Sideris, L.; Meterissian, S.; Arnaout, A.; Brackstone,  
625 M.; McCready, D.; et al. Sentinel Node Biopsy after Neoadjuvant Chemotherapy in Biopsy-Proven Node-  
626 Positive Breast Cancer: The SN FNAC Study. *J Clin Oncol* **2015**, *20*, 2588–64.
- 627 6. Cao, S.; Liu, X.; Cui, J.; Liu, X.; Zhong, J.; Yang, Z.; Sun, D.; Wei, W. Feasibility and Reliability of Sentinel Lymph  
628 Node Biopsy after Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients with Positive Axillary Nodes at Initial  
629 Diagnosis: An up-to-Date Meta-Analysis of 3,578 Patients. *The Breast* **2021**, *59*, 256–269,  
630 doi:10.1016/j.breast.2021.07.015.
- 631 7. Plecha, D.; Bai, S.; Patterson, H.; Thompson, C.; Shenk, R. Improving the Accuracy of Axillary Lymph Node  
632 Surgery in Breast Cancer with Ultrasound-Guided Wire Localization of Biopsy Proven Metastatic Lymph  
633 Nodes. *Breast Oncol.* **2015**, *22*, 4241–4246.
- 634 8. Man, V.; Kwong, A. Different Strategies in Marking Axillary Lymph Nodes in Breast Cancer Patients  
635 Undergoing Neoadjuvant Medical Treatment: A Systematic Review. *Breast Cancer Res. Treat.* **2021**, *186*,  
636 607–615, doi:10.1007/s10549-021-06118-6.
- 637 9. Kuemmel, S.; Heil, J.; Rueland, A.; Seiberling, C.; Harrach, H.; Schindowski, D.; Lubitz, J.; Hellerhoff, K.; Ankel,  
638 C.; Graßhoff, S.-T.; et al. A Prospective, Multicenter Registry Study to Evaluate the Clinical Feasibility of  
639 Targeted Axillary Dissection (TAD) in Node-Positive Breast Cancer Patients. *Ann. Surg.* **2022**, *276*, e553–e562,  
640 doi:10.1097/SLA.0000000000004572.
- 641 10. Greenwood, H.I.; Wong, J.M.; Mukhtar, R.A.; Alvarado, M.D.; Price, E.R. Feasibility of Magnetic Seeds for  
642 Preoperative Localization of Axillary Lymph Nodes in Breast Cancer Treatment. *Am. J. Roentgenol.* **2019**, *213*,  
643 953–957, doi:10.2214/AJR.19.21378.
- 644 11. Martínez, M.; Jiménez, S.; Guzmán, F.; Fernández, M.; Arizaga, E.; Sanz, C. Evaluation of Axillary Lymph Node  
645 Marking with Magseed® before and after Neoadjuvant Systemic Therapy in Breast Cancer Patients: MAGNET  
646 Study. *Breast J.* **2022**, *2022*, 1–8, doi:10.1155/2022/6111907.
- 647 12. Straver, M.E.; Loo, C.E.; Alderliesten, T.; Rutgers, E.J.T.; Vrancken Peeters, M.T.F.D. Marking the Axilla with  
648 Radioactive Iodine Seeds (MARI Procedure) May Reduce the Need for Axillary Dissection after Neoadjuvant  
649 Chemotherapy for Breast Cancer. *Br. J. Surg.* **2010**, *97*, 1226–1231, doi:10.1002/bjs.7073.
- 650 13. Donker, M.; Straver, M.E.; Wesseling, J.; Loo, C.E.; Schot, M.; Drukker, C.A.; van Tinteren, H.; Sonke, G.S.;  
651 Rutgers, E.J.T.; Vrancken Peeters, M.-J.T.F.D. Marking Axillary Lymph Nodes With Radioactive Iodine Seeds

- for Axillary Staging After Neoadjuvant Systemic Treatment in Breast Cancer Patients. *Ann. Surg.* **2015**, *261*, 378–382, doi:10.1097/SLA.0000000000000558.
14. Caudle, A.S.; Yang, W.T.; Krishnamurthy, S.; Mittendorf, E.A.; Black, D.M.; Gilcrease, M.Z.; Bedrosian, I.; Hobbs, B.P.; DeSnyder, S.M.; Hwang, R.F.; et al. Improved Axillary Evaluation Following Neoadjuvant Therapy for Patients With Node-Positive Breast Cancer Using Selective Evaluation of Clipped Nodes: Implementation of Targeted Axillary Dissection. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 1072–1078, doi:10.1200/JCO.2015.64.0094.
15. Falcon, S.; Weinfurter, R.J.; Mooney, B.; Niell, B.L. SAVI SCOUT® Localization of Breast Lesions as a Practical Alternative to Wires: Outcomes and Suggestions for Trouble-Shooting. *Clin. Imaging* **2018**, *52*, 280–286, doi:10.1016/j.clinimag.2018.07.008.
16. Sun, J.; Henry, D.A.; Carr, M.J.; Yazdankhahkenary, A.; Laronga, C.; Lee, M.C.; Hoover, S.J.; Sun, W.; Czerniecki, B.J.; Khakpour, N.; et al. Feasibility of Axillary Lymph Node Localization and Excision Using Radar Reflector Localization. *Clin. Breast Cancer* **2021**, *21*, e189–e193, doi:10.1016/j.clbc.2020.08.001.
17. Choy, N.; Lipson, J.; Porter, C.; Ozawa, M.; Kieryn, A.; Paul, S.; Kao, J.; Trinh, L.; Wheeler, A.; Ikeda, D.; et al. Initial Results with Preoperative Tattooing of Biopsied Axillary Lymph Nodes and Correlation to Sentinel Lymph Nodes in Breast Cancer Patients. *Ann. Surg. Oncol.* **2015**, *22*, 377–382.
18. Natsiopoulos, I.; Intzes, S.; Liappis, T.; Zarampoukas, K.; Zarampoukas, T.; Zacharopoulou, V.; Papazisis, K. Axillary Lymph Node Tattooing and Targeted Axillary Dissection in Breast Cancer Patients Who Presented as CN+ Before Neoadjuvant Chemotherapy and Became CN0 After Treatment. *Clin. Breast Cancer* **2019**, *19*, 208–215, doi:10.1016/j.clbc.2019.01.013.
19. Park, S.; Koo, J.S.; Kim, G.M.; Sohn, J.; Kim, S. Il; Cho, Y.U.; Park, B.-W.; Park, V.Y.; Yoon, J.H.; Moon, H.J.; et al. Feasibility of Charcoal Tattooing of Cytology-Proven Metastatic Axillary Lymph Node at Diagnosis and Sentinel Lymph Node Biopsy after Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients. *Cancer Res. Treat.* **2018**, *50*, 801–812, doi:10.4143/crt.2017.210.
20. Allweis, T.M.; Menes, T.; Rotbart, N.; Rapson, Y.; Cernik, H.; Bokov, I.; Diment, J.; Magen, A.; Golan, O.; Levi-Bendet, N.; et al. Ultrasound Guided Tattooing of Axillary Lymph Nodes in Breast Cancer Patients Prior to Neoadjuvant Therapy, and Identification of Tattooed Nodes at the Time of Surgery. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2020**, *46*, 1041–1045, doi:10.1016/j.ejso.2019.11.501.
21. Patel, R.; MacKerricher, W.; Tsai, J.; Choy, N.; Lipson, J.; Ikeda, D.; Pal, S.; De Martini, W.; Allison, K.H.; Wapnir, I.L. Pretreatment Tattoo Marking of Suspicious Axillary Lymph Nodes: Reliability and Correlation with Sentinel Lymph Node. *Ann. Surg. Oncol.* **2019**, *26*, 2452–2458, doi:10.1245/s10434-019-07419-3.
22. Hartmann, S.; Kühn, T.; de Boniface, J.; Stachs, A.; Winckelmann, A.; Frisell, J.; Wiklander-Bråkenhielm, I.; Stubert, J.; Gerber, B.; Reimer, T. Carbon Tattooing for Targeted Lymph Node Biopsy after Primary Systemic Therapy in Breast Cancer: Prospective Multicentre TATTOO Trial. *Br. J. Surg.* **2021**, *108*, 302–307, doi:10.1093/bjs/znaa083.
23. Pinto, D.; Batista, E.; Gouveia, P.; Mavioso, C.; Anacleto, J.; Ribeiro, J.; Sousa, B.; Gouveia, H.; Ferreira, A.; Chumbo, M.; et al. Targeted Axillary Dissection after Chemotherapy: Feasibility Study with Clip and Carbon Dye Tattoo – Neotarget Trial. *Breast Care* **2022**, *17*, 166–171, doi:10.1159/000517208.
24. Goyal, A.; Puri, S.; Marshall, A.; Valassiadou, K.; Hoosein, M.M.; Carmichael, A.R.; Erdelyi, G.; Sharma, N.; Dunn, J.; York, J. A Multicentre Prospective Feasibility Study of Carbon Dye Tattooing of Biopsied Axillary Node and Surgical Localisation in Breast Cancer Patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **2021**, *185*, 433–440, doi:10.1007/s10549-020-05961-3.
25. Dostalek, L.; Cerny, A.; Saskova, P.; Pavlista, D. Selective Extirpation of Tattooed Lymph Node in Combination with Sentinel Lymph Node Biopsy in the Management of Node-Positive Breast Cancer Patients after Neoadjuvant Systemic Therapy. *Breast Care* **2021**, *16*, 623–629, doi:10.1159/000514266.
26. Li, J.; Jia, S.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Kong, L.; Cao, Y.; Liu, Y.; Zhang, Y.; Chen, B. Long-Term Tracing and Staining of Carbon Nanoparticles for Axillary Lymph Nodes in Patients with Locally Advanced Breast Cancer Treated with Neoadjuvant Chemotherapy. *Asian J. Surg.* **2022**, *45*, 89–96, doi:10.1016/j.asjsur.2021.03.020.
27. Gatek, J.; Petru, V.; Kosak, P.; Ratasky, M.; Duben, J.; Dudesek, B.; Jancik, P.; Zabojnikova, M.; Katrusak, J.; Opeleva, P.; et al. Targeted Axillary Dissection with Preoperative Tattooing of Biopsied Positive Axillary Lymph Nodes in Breast Cancer. *Neoplasma* **2020**, *67*, 1329–1334.
28. Martínez, G.; Malumbres, A.; Mallada, R.; Hueso, J.L.; Irusta, S.; Bomatí-Miguel, O.; Santamaría, J. Use of a Polyol Liquid Collection Medium to Obtain Ultrasmall Magnetic Nanoparticles by Laser Pyrolysis. *Nanotechnology* **2012**, *23*, 425605, doi:10.1088/0957-4484/23/42/425605.
29. Mas, N.; Hueso, J.L.; Martínez, G.; Madrid, A.; Mallada, R.; Ortega-Liebana, M.C.; Bueno-Alejo, C.; Santamaría, J. Laser-Driven Direct Synthesis of Carbon Nanodots and Application as Sensitizers for Visible-Light Photocatalysis. *Carbon N. Y.* **2020**, *156*, 453–462, doi:10.1016/j.carbon.2019.09.073.
30. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682, doi:10.1038/nmeth.2019.
31. Hoseini, B.; Jaafari, M.R.; Golabpour, A.; Momtazi-Borojeni, A.A.; Karimi, M.; Eslami, S. Application of Ensemble Machine Learning Approach to Assess the Factors Affecting Size and Polydispersity Index of Liposomal Nanoparticles. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 18012, doi:10.1038/s41598-023-43689-4.
32. Youshia, J.; Ali, M.E.; Lamprecht, A. Artificial Neural Network Based Particle Size Prediction of Polymeric

- 715      33. Nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *119*, 333–342, doi:10.1016/j.ejpb.2017.06.030.
- 716      33. Banys-Paluchowski, M.; Gruber, I.V.; Hartkopf, A.; Paluchowski, P.; Krawczyk, N.; Marx, M.; Brucker, S.; Hahn, M. Axillary Ultrasound for Prediction of Response to Neoadjuvant Therapy in the Context of Surgical Strategies to Axillary Dissection in Primary Breast Cancer: A Systematic Review of the Current Literature. *Arch. Gynecol. Obstet.* **2020**, *301*, 341–353, doi:10.1007/s00404-019-05428-x.
- 717      34. Kim, W.H.; Kim, H.J.; Jung, J.H.; Park, H.Y.; Lee, J.; Kim, W.W.; Park, J.Y.; Chae, Y.S.; Lee, S.J. Ultrasound-Guided Restaging and Localization of Axillary Lymph Nodes After Neoadjuvant Chemotherapy for Guidance of Axillary Surgery in Breast Cancer Patients: Experience with Activated Charcoal. *Ann. Surg. Oncol.* **2018**, *25*, 494–500, doi:10.1245/s10434-017-6250-3.
- 718      35. Choy, N.; Lipson, J.; Porter, C.; Ozawa, M.; Kieryn, A.; Pal, S.; Kao, J.; Trinh, L.; Wheeler, A.; Ikeda, D.; et al. Initial Results with Preoperative Tattooing of Biopsied Axillary Lymph Nodes and Correlation to Sentinel Lymph Nodes in Breast Cancer Patients. *Ann. Surg. Oncol.* **2015**, *22*, 377–382, doi:10.1245/s10434-014-4034-6.
- 719      36. Xie, P.; Yang, S.-T.; He, T.; Yang, S.; Tang, X.-H. Bioaccumulation and Toxicity of Carbon Nanoparticles Suspension Injection in Intravenously Exposed Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2562, doi:10.3390/ijms18122562.
- 720      37. Chang, X.-L.; Yang, S.-T.; Xing, G. Molecular Toxicity of Nanomaterials. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 2828–2851, doi:10.1166/jbn.2014.1936.
- 721      38. Liu, J.-H.; Wang, T.; Wang, H.; Gu, Y.; Xu, Y.; Tang, H.; Jia, G.; Liu, Y. Biocompatibility of Graphene Oxide Intravenously Administrated in Mice—Effects of Dose, Size and Exposure Protocols. *Toxicol. Res. (Camb.)* **2015**, *4*, 83–91, doi:10.1039/C4TX00044G.
- 722      39. Duch, M.C.; Budinger, G.R.S.; Liang, Y.T.; Soberanes, S.; Urich, D.; Chiarella, S.E.; Campochiaro, L.A.; Gonzalez, A.; Chandel, N.S.; Hersam, M.C.; et al. Minimizing Oxidation and Stable Nanoscale Dispersion Improves the Biocompatibility of Graphene in the Lung. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 5201–5207, doi:10.1021/nl202515a.
- 723      40. Ernst, L.; Casals, E.; Italiani, P.; Boraschi, D.; Puntes, V. The Interactions between Nanoparticles and the Innate Immune System from a Nanotechnologist Perspective. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 2991, doi:10.3390/nano11112991.
- 724      41. Donahue, N.D.; Acar, H.; Wilhelm, S. Concepts of Nanoparticle Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Kinetics in Nanomedicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *143*, 68–96, doi:10.1016/j.addr.2019.04.008.
- 725      42. Juliano, R.L. Factors Affecting the Clearance Kinetics and Tissue Distribution of Liposomes, Microspheres and Emulsions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1988**, *2*, 31–54, doi:10.1016/0169-409X(88)90004-X.
- 726      43. Hillaireau, H.; Couvreur, P. Nanocarriers’ Entry into the Cell: Relevance to Drug Delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 2873–2896, doi:10.1007/s00018-009-0053-z.
- 727      44. Kang, M.-S.; Lee, G.-H.; Kwon, I.H.; Yang, M.-J.; Heo, M.B.; Choi, J.-W.; Lee, T.G.; Yoon, C.-H.; Baek, B.; Sung, M.-C.; et al. Uptake and Toxicity of Cerium Dioxide Nanoparticles with Different Aspect Ratio. *Toxicol. Lett.* **2023**, *373*, 196–209, doi:10.1016/j.toxlet.2022.11.013.
- 728      45. Herde, K.; Hartmann, S.; Brehm, R.; Kilian, O.; Heiss, C.; Hild, A.; Alt, V.; Bergmann, M.; Schnettler, R.; Wenisch, S. Connexin 43 Expression of Foreign Body Giant Cells after Implantation of Nanoparticulate Hydroxyapatite. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4912–4921, doi:10.1016/j.biomaterials.2007.07.027.
- 729      46. Baranska, A.; Shawket, A.; Jouve, M.; Baratin, M.; Malosse, C.; Voluzan, O.; Vu Manh, T.-P.; Fiore, F.; Bajénoff, M.; Benaroch, P.; et al. Unveiling Skin Macrophage Dynamics Explains Both Tattoo Persistence and Strenuous Removal. *J. Exp. Med.* **2018**, *215*, 1115–1133, doi:10.1084/jem.20171608.
- 730      47. Zolnik, B.S.; Burgess, D.J. Effect of Acidic PH on PLGA Microsphere Degradation and Release. *J. Control. Release* **2007**, *122*, 338–344, doi:10.1016/j.jconrel.2007.05.034.
- 731      48. Chen, R.; Jäättelä, M.; Liu, B. Lysosome as a Central Hub for Rewiring PH Homeostasis in Tumors. *Cancers (Basel.)* **2020**, *12*, 2437, doi:10.3390/cancers12092437.
- 732      49. del Moral, M.; Loeck, M.; Muntimadugu, E.; Vives, G.; Pham, V.; Pfeifer, P.; Battaglia, G.; Muro, S. Role of the Lactide:Glycolide Ratio in PLGA Nanoparticle Stability and Release under Lysosomal Conditions for Enzyme Replacement Therapy of Lysosomal Storage Disorders. *J. Funct. Biomater.* **2023**, *14*, 440, doi:10.3390/jfb14090440.
- 733      50. Lu, L.; Peter, S.J.; D. Lyman, M.; Lai, H.-L.; Leite, S.M.; Tamada, J.A.; Uyama, S.; Vacanti, J.P.; Robert Langer; Mikos, A.G. In Vitro and in Vivo Degradation of Porous Poly(DL-Lactic-Co-Glycolic Acid) Foams. *Biomaterials* **2000**, *21*, 1837–1845, doi:10.1016/S0142-9612(00)00047-8.

# Artículo 2

**"Melanin-based Nanoparticles for Lymph Node Tattooing: Experimental, Histopathological and Ultrastructural Study."**

[Artículo de investigación aceptado para publicación en **Nanomaterials**, IF:4,4]

## Article

# Melanin-Based Nanoparticles for Lymph Node Tattooing: Experimental, Histopathological and Ultrastructural Study

Marta Baselga <sup>1</sup>, Antonio Güemes <sup>1,2,\*</sup>, Cristina Yus <sup>1,3,4</sup> , Teresa Alejo <sup>1,3,4</sup>, Víctor Sebastián <sup>1,3,4</sup> , Dolores Arribas <sup>1,2</sup>, Gracia Mendoza <sup>1</sup> , Eva Monleón <sup>1,5,6</sup> and Manuel Arruebo <sup>1,3,4</sup> 

<sup>1</sup> Institute for Health Research Aragon (IIS Aragón), 50009 Zaragoza, Spain; mbaselga@iisaragon.es (M.B.); cyargon@unizar.es (C.Y.); talejo@certest.es (T.A.); victorse@unizar.es (V.S.); mdarribas@salud.aragon.es (D.A.); gmendoza@iisaragon.es (G.M.); emonleon@unizar.es (E.M.); arruebom@unizar.es (M.A.)

<sup>2</sup> Department of Surgery, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

<sup>3</sup> Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón, CSIC—University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

<sup>4</sup> Department of Chemical Engineering, University of Zaragoza, Campus Río Ebro, 50018 Zaragoza, Spain

<sup>5</sup> Department of Human Anatomy and Histology, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

<sup>6</sup> Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

\* Correspondence: aguemes@unizar.es

**Abstract:** In breast cancer, Targeted Axillary Dissection (TAD) allows for the selective excision of the sentinel lymph node (SLN) during primary tumor surgery. TAD consists of the resection of labelled SLNs prior to neoadjuvant chemotherapy (NACT). Numerous clinical and preclinical studies have explored the use of carbon-based colloids for SLN tattooing prior to NACT. However, carbon vectors show varying degrees of inflammatory reactions and, in about one fifth of cases, carbon particles migrate via the lymphatic pathway to other nodes, causing the SLN to mismatch the tattooed node. To overcome these limitations, in this study, we explored the use of melanin as a staining endogenous pigment. We synthesized and characterized melanin-loaded polymeric nanoparticles (Mel-NPs) and used them to tattoo lymph nodes in pig animal models given the similarity in the size of the human and pig nodes. Mel-NPs tattooed lymph nodes showed high identification rates, reaching 83.3% positive identification 16 weeks after tattooing. We did not observe any reduction in the identification as time increased, implying that the colloid is stable in the lymph node tissue. In addition, we performed histological and ultrastructural studies to characterize the biological behavior of the tag. We observed foreign-body-like granulomatous inflammatory responses associated with Mel-NPs, characterized by the formation of multinucleated giant cells. In addition, electron microscopy studies showed that uptake is mainly performed by macrophages, and that macrophages undergo cellular damage associated with particle uptake.

**Keywords:** nanoparticles; lymph node; breast cancer; melanin; tattoo; surgery



**Citation:** Baselga, M.; Güemes, A.; Yus, C.; Alejo, T.; Sebastián, V.; Arribas, D.; Mendoza, G.; Monleón, E.; Arruebo, M. Melanin-Based Nanoparticles for Lymph Node Tattooing: Experimental, Histopathological and Ultrastructural Study. *Nanomaterials* **2024**, *14*, 1149. <https://doi.org/10.3390/nano14131149>

Academic Editor: Elisabetta Esposito

Received: 4 June 2024

Revised: 2 July 2024

Accepted: 2 July 2024

Published: 4 July 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Metastasis is a complex process where cancer cells spread from a primary tumor to other parts of the body, forming secondary tumors in distant organs or tissues [1]. In breast cancer, the most frequent metastatic spread occurs in regional lymph nodes, especially in the homolateral axilla. Metastatic invasion in axillary nodes is one of the most clinically relevant prognostic indicators as it is closely related to the increased likelihood of recurrence and mortality, as well as having a direct influence on the treatment strategy to be followed. According to the American Cancer Society, it is estimated that at the time of diagnosis 27% of patients have regional invasion and 6% have distant metastases [2]. Therefore, histopathological analysis of the sentinel lymph node in breast cancer is indispensable for assessing treatment strategies.

The current gold standard to avoid axillary lymphadenectomy (AL) and its significant sequelae is selective sentinel lymph node biopsy (SLNB), since if the sentinel node is not cancer-positive, the likelihood of another axillary lymph node being involved is remote. Therefore, SLNB is recommended to determine the axillary node status [3–6]. Typically, the technique for SLNB consists of the use of radiotracers (albumin nanocolloids, tin colloids or rhenium sulphide) for preoperative lymphatic mapping and, optionally, in conjunction with the dye-labeling technique or intraoperative probes or imaging techniques, especially if there is difficulty in visualizing the lymphoscintigraphy. Radiotracers are preferably injected intra- or peritumorally, especially in non-palpable lesions, although periareolar or subdermal inoculation is also acceptable. During surgery, when dyes are used, priority is given to the use of isosulfan blue, patent blue V, methylene blue or indocyanine green, although the latter requires cameras with special detectors to macroscopically visualize it. The dye migrates to the SLN, marking the node with an intense blue, facilitating its identification from other axillary tissues [7].

In a large proportion of breast cancer cases, patients receive neoadjuvant chemotherapy (NACT), which is an impediment to performing SLNB. Detection of the SLN in patients who have undergone NACT is a challenge, as the treatment may alter the lymphatic drainage pathways and reduce the size of the SLN. In these cases, the standard for SLNB has high false-negative rates, which may leave a chemoresistant tumor in the axilla and underestimate the lesion [8–11]. To avoid these limitations, the technique of Targeted Axillary Dissection (TAD) has been established, where SLN marking is performed prior to NACT. Among the best known TAD techniques are surgical clips, magnetic seeds, radioactive seeds, or reflector radars [12–19]. In addition to these labeling techniques, the tattooing of the SLN with carbon-based suspensions has recently been proposed. Tattoos are typically performed with commercial carbon-based colloids such as Spot® colloids (GI Supply, Mechanicsburg, EE. UU., Mechanicsburg, PA, USA) and show high intraoperative identification rates (60–95%) and reduced false negative rates of 9.1–22% [20–25]. This technique is not free of limitations, as the reduced viscosity of those colloids restricts their preservation in the SLN, and these colloids often migrate into the surrounding adipose tissue, producing unwanted dissemination via the lymphatic route, which has been reported to occur in about 18% of cases [21,26]. In addition, it has been reported that different carbon-based colloids used for skin tattooing produced several inflammatory foreign-body-type reactions [27,28]. Although some authors suggest that carbon particles are inert and non-cytotoxic, other authors have observed inflammatory reactions of different degrees [29–32].

Novel approaches using nanostructures are available to identify SLN after NACT during surgery. For example, the magnetic detection of superparamagnetic tracers based on iron oxide ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanoparticles has been widely reported [33–36]. The fluorescence emission of quantum dots has also been exploited for SLN localization, especially those based on cadmium selenide or telluride [37–39]. Taking advantage of fluorescence and photoacoustic properties, fluorescent dye-loaded mesoporous silica nanoparticles have also been used to mark lymph nodes [40]. Another approach has been the administration of Gd dendrimers to image the lymph node by magnetic resonance and optical imaging techniques [41,42]. However, these labels are performed for SLN detection after NACT and there is still a need to develop labels that persist in the lymph node for long periods of time and can be used for TAD.

Based on the above, in this study, we explored the use of melanin as a dye-labeling element encapsulated in polymer nanoparticles based on poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) to render SLN tattooing suspensions to reduce the cytotoxicity associated with high doses of melanin [43]. Melanin is an endogenous pigment derived from the amino acid, tyrosine. Its most common formulation includes dihydroxyindole carboxylic acids and their reduced forms, commonly known as eumelanin [44]. In addition, not only to reduce its cytotoxicity at high doses but also to increase the viscosity of the labeling and increase the preservation of the marker in the lymph node, we encapsulated melanin in those polymeric PLGA nanoparticles for achieving a sustained release and an extended duration of its action. We

performed histological evaluation and analyzed the efficacy of lymph node tattooing in a total of 7 pigs to study its biological behavior and tattooing efficiency over time (1, 2, 4, 6, and 16 weeks).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Synthesis, Characterization and In Vitro Studies of Nanoparticles

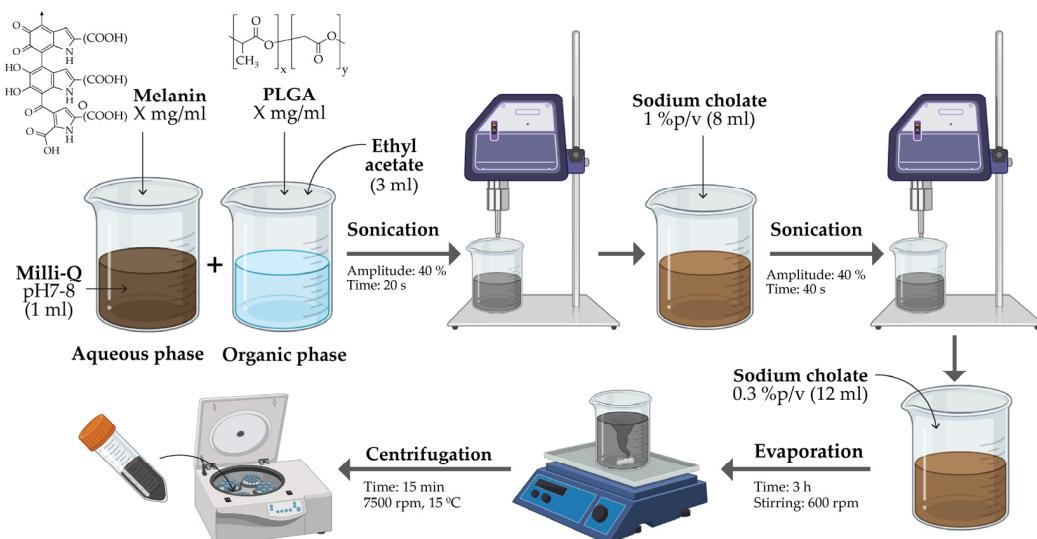
#### 2.1.1. Materials

Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA Resomer® RG504H) was purchased from Evonik Industries AG (Essen, Germany), and sodium cholate, ethyl acetate and melanin (in powder) were purchased from Sigma Aldrich (Merck KGaA; Darmstadt, Germany).

Human dermal fibroblasts (NHDF-Ad) were obtained from Lonza (Basel, Switzerland), J774A.1 mouse monocyte macrophages ATCC-TIB-67™ were acquired from LGC Standards (Barcelona, Spain) and the human breast adenocarcinoma cell line MDA-MB-231 was kindly donated by Dr. Alberto Jiménez Schumacher (Institute for Health Research Aragon, Zaragoza, Spain). These cell lines were used to determinate the subcytotoxic dose of the nanoparticles used.

#### 2.1.2. Synthesis of Nanoparticles with Encapsulated Melanin

Melanin encapsulation was carried out by the double emulsion solvent evaporation method (w/o/w) [45], as illustrated in Figure 1. In the first step, melanin was dissolved in the aqueous phase; for this purpose, a Milli-Q water solution was adjusted to pH 8 using NaOH, and melanin was added at varying concentrations (0.15, 0.3, 0.5 and 1 mg/mL). In parallel, different concentrations (5, 10, 15 and 20 mg/mL) of PLGA and 3 mL of ethyl acetate were used for the preparation of the organic phase. Then, 1 mL of NaOH-melanin was dissolved in the above solution, and 1 mL of Milli-Q water was added again. The mixture was sonicated at 40% amplitude for 20 s (Digital sonifier 450, Branson, MO, USA); 8 mL of 1% sodium cholate was added as surfactant and sonicated again at 40% for 40 s. Finally, 12 mL of 0.3% sodium cholate were added. The solution was left to evaporate for 3 h at 600 rpm on a shaking plate, and the samples were centrifuged at 7500 rpm and 15 °C for 15 min. Finally, the synthesized melanin-loaded nanoparticles (Mel-NPs) were resuspended at 10 or 20 mg/mL in a 1% (w/v) methylcellulose hydrogel for the preparation of suspensions.



**Figure 1.** Schematic representation of the synthesis of melanin-loaded PLGA nanoparticles by the water-in-oil-in-water (w/o/w) method.

### 2.1.3. Electron Microscopy Studies

The morphological characterization and size distribution of the resulting particles were performed by scanning electron microscopy (SEM Inspect F50, FEI Company, Hillsboro, OR, USA) at an acceleration voltage of 5–10 kV. The particles were deposited on carbon tape placed on an aluminum slide. The samples were coated with a Pd layer using a high vacuum coater (Leica EM ACE200, Wetzlar, Germany). Diameter distributions were obtained from manual measurements using the free Image-J software (v1.52; National Institutes of Health, 2019) for a sample of 100 nanoparticles. The morphology and dimensions were also assessed using a T20-FEI transmission electron microscope (FEI Company, Hillsboro, OR, USA) at 200 kV. TEM samples were prepared by depositing 50  $\mu$ L of the corresponding colloids dispersed in Milli-Q water on a formvar-coated copper grid and dried for at least 2 h.

### 2.1.4. Quantification of Melanin Encapsulation

The quantification of the melanin encapsulated in the PLGA NPs was assessed by thermogravimetric analysis (Mettler Toledo TGA/STDA 851e, Mettler Toledo; Columbus, OH, US) using the degradation temperatures of the PLGA and melanin, analyzed from 30 to 800 °C with a N<sub>2</sub> flow rate of 50 mL/min. This quantification was also indirectly performed by the evaluation of the UV–Vis spectra of the supernatants collected after the synthesis. The amount of melanin was quantified by UV–Vis spectroscopy (Jasco V670, Jasco, Easton, MD, USA), using the maximum absorbance at 193 nm attributed to the electronic transition of the melanin  $\pi$ - $\pi^*$  backbone.

### 2.1.5. In Vitro Release Studies

To obtain the melanin release profiles, Mel-NPs were dispersed in distilled water and kept for 28 days at 37 °C under continuous agitation. Aliquots of the supernatants were taken every day during the first week, and once a week for the rest of the month (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, and 28 days after the beginning of the experiment). The concentration of released melanin (in the supernatant) was obtained from the UV–Vis spectrum (absorbance maximum at 193 nm), as detailed in the previous section.

### 2.1.6. Cell Viability Assays

The cytotoxicity of the Mel-NPs was determined using the Blue Cell Viability Assay (Abnova, Taipei, Taiwan) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cells were seeded at concentration of 6000 cells/well for fibroblasts and J774 cells, and then 18,000 cells/well for the MBA-MD-231 cell line, before being incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Subsequently, Mel-NPs at different concentrations were added to the cells (0.1, 0.05, 0.025 and 0.01 mg/mL). After 24 h, the reagent (10% (*v/v*) was added, cells were incubated for 4 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> and fluorescence were read at 530/590 ex/em in a Varioskan LUX microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cytotoxicity was evaluated by comparing the values obtained for the treated cells with those retrieved from untreated cells, assigning to these controls 100% viability. Four replicas of each experiment were performed in triplicate. All results are presented as mean  $\pm$  standard deviation. Data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) (GraphPad Prism 8, San Diego, CA, USA). Statistically significant differences were considered when  $p \leq 0.05$ .

## 2.2. *In Vivo Studies of Mel-NPs*

### 2.2.1. Animals and Surgical Procedures

Seven female White Landrace pigs with an average weight of 25 kg (ranging from 22 to 30 kg) were used. The experimental animals were divided into two study groups. The “short-term study” included 4 animals that were housed for 1, 2, 4 and 6 weeks, and the “long-term study” included 3 animals that were housed for 16 weeks. The study was carried out in the facilities of the Institute for Health Research Aragon (Zaragoza, Spain), in accordance with the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013 which meets the European Union

Directive 2010/63. The experimental procedure was approved by the Animal Research Ethics Committee of the University of Zaragoza under the reference PI09/20.

In all animals, injections of the pigments were administered in selected peritoneal lymph nodes from the splenic artery root, portal vein root and distal ileum regions. A total of 10 lymph nodes were tattooed with Mel-NPs (20 mg/mL) in the “short-term studies”. In the “long-term studies”, 6 lymph nodes were tattooed with 20 mg/mL of Mel-NPs, and 9 lymph nodes were marked with 10 mg/mL of Mel-NPs to also analyze the concentration influence. The surgical procedure was performed under general anesthesia with oral intubation, mechanical ventilation and neuromuscular blockade. Animals were premedicated with zolazepam (Zoletil, Virbac, Hong Kong, 0.05 mg/kg) and intramuscular dexmedetomidine (Dexmopet, Fattro Iberica SL, Sant Just Desvern, Spain, 0.08 mL/kg). Anaesthetic induction was performed with disopropylphenol (Propofol 1% MCT, Fresenius Kabi Laboratories Spain, Barcelona, Spain, 6 mg/kg) and sevofluorane 1.9% (Baxter SL, Valencia, Spain) was used for maintenance. Muscle block was induced with pancuronium bromide (Pavulon, Organon Española SA, Jersey City, NJ, USA, 4 mg/mL). Intraoperative analgesia consisted of the continuous infusion of fentanyl (Fentanest, Aurovitae España, Madrid, Spain, 10 µg/kg/h), and Ringer’s lactate (8 mL/kg/h) was the solution used as fluid therapy. For vector administration surgery, a midline laparotomy was performed to expose the abdominal viscera and isolate the selected mesenteric nodes. Vectors were directly administrated in the lymph nodes (2 or 3 lymph nodes per pig) in 0.2 mL doses (10 and 20 mg/mL) loaded into 1 mL syringes through 21G needles. After surgery, the animals were housed under special conditions in heated cages. We used buprenorphine (Buprenodale, Dechra, Northwich, UK, 0.05–0.1 mg/kg/day) during the first 72 h after surgery, and antibiotic prophylaxis with enrofloxacin (Enroflox, Agrovet Market SA, Lima, Peru, 2.5 mg/kg) until the lymph node dissection surgery was performed after 1, 2, 4, 6 or 16 weeks. For lymph node dissection surgeries, a wide median laparotomy was also performed, and the tattooed lymph nodes were resected. At the end of the experiment, the animals were euthanized by a single injection of potassium chloride (1 mEq/kg) intravenously, preventing depolarization of the heart muscle and causing it to stop.

### 2.2.2. Histopathological Studies

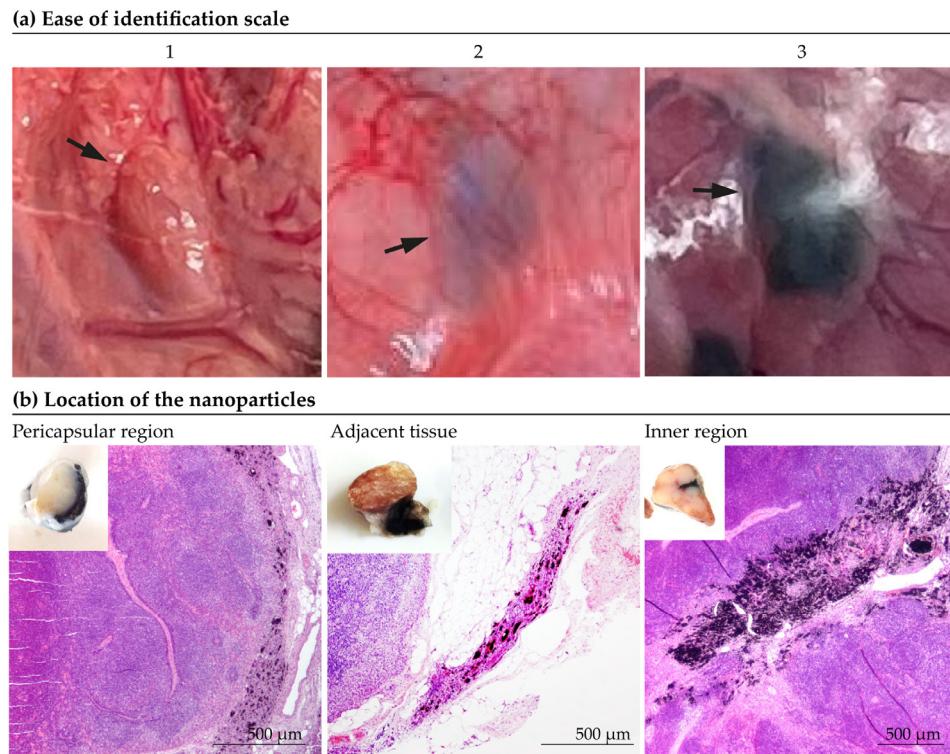
After sampling, lymph nodes were fixed in 4% formalin for 3–5 days and cut into approximately 3 mm thick tissue slices. The most pigmented slice was selected for histological processing. Samples were processed according to standard procedures and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for light microscopy examination by Scientific Technical Services—Microscopy and Pathology from the Institute for Health Research Aragon.

### 2.2.3. Statistical Analysis

This study included 1 macroscopic variable (the ‘ease of identification’) and 3 microscopic variables (the ‘location of the nanoparticles’ and the ‘extent of inflammation’). Study groups were made according to time (‘short term’ and ‘long term’) and Mel-NPs concentration (10 and 20 mg/mL). To study the difference between groups, the Mann-Whitman U test was performed using IBM SPSS Statistics 29.0.10 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA). Statistically significant differences were considered when  $p \leq 0.05$ .

- Ease of identification. Before dissection surgery, the tattooed lymph nodes were evaluated *in situ* and the “ease of visual identification” was subjectively assessed by experienced surgeons on a scale from 1 to 3 (1 being ‘indistinguishable’ and 3 “optimal”), as depicted in Figure 2a.
- Location of the nanoparticles. The determination of the location of the particles was made subjectively according to the predominant location of the marking (Figure 2b). As shown in Figure 2b, the location of the marking was classified as: inner zone, pericapsular region, adjacent tissue, inner zone/pericapsular region, inner zone/adjacent tissue, pericapsular region/adjacent tissue or all locations.

- Extent of inflammation. The degree of intensity of the inflammatory response was quantified according to the extent of the inflamed tissue. The most extensive section of inflammatory tissue in the lymph node was manually measured using the ImageJ software 2024 [46].



**Figure 2.** Determination of the ease of identification and the location of the particles. (a) Ease of identification scale. (b) Examples of location of the nanoparticles.

#### 2.2.4. Ultrastructural Studies

After sampling, biopsies were fixed in 2% glutaraldehyde in PB for 3 days and subsequently washed with PB. Samples were post-fixed with 2% osmium, rinsed, dehydrated in graded acetone (30%, 50%, 70% with 2% uranyl acetate, 90%, 100%), cleared in propylene oxide and embedded in araldite (Durcupan, Fluka AG; Buchs SG, Switzerland, Hatfield, PA, USA). A RMC MT-XL ultramicrotome was used for obtaining semi-fine and ultra-fine tissue slices. Semi-thin (1.5  $\mu\text{m}$ ) and ultra-thin (0.05  $\mu\text{m}$ ) sections were cut with a diamond knife. Semi-thin sections were stained with 1% toluidine blue and examined by light microscopy (Olympus BX51 microscope, Olympus Imaging Corporation; Tokyo, Japan). Ultra-thin sections were collected on Formvar-coated single-slot grids counterstained with 1% uranyl acetate and Reynold's lead citrate staining. The samples were observed at the Electronic Microscopy Service of Biological Systems of the University of Zaragoza with a JEOL JEM 1010 transmission microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) operating at 80 kV.

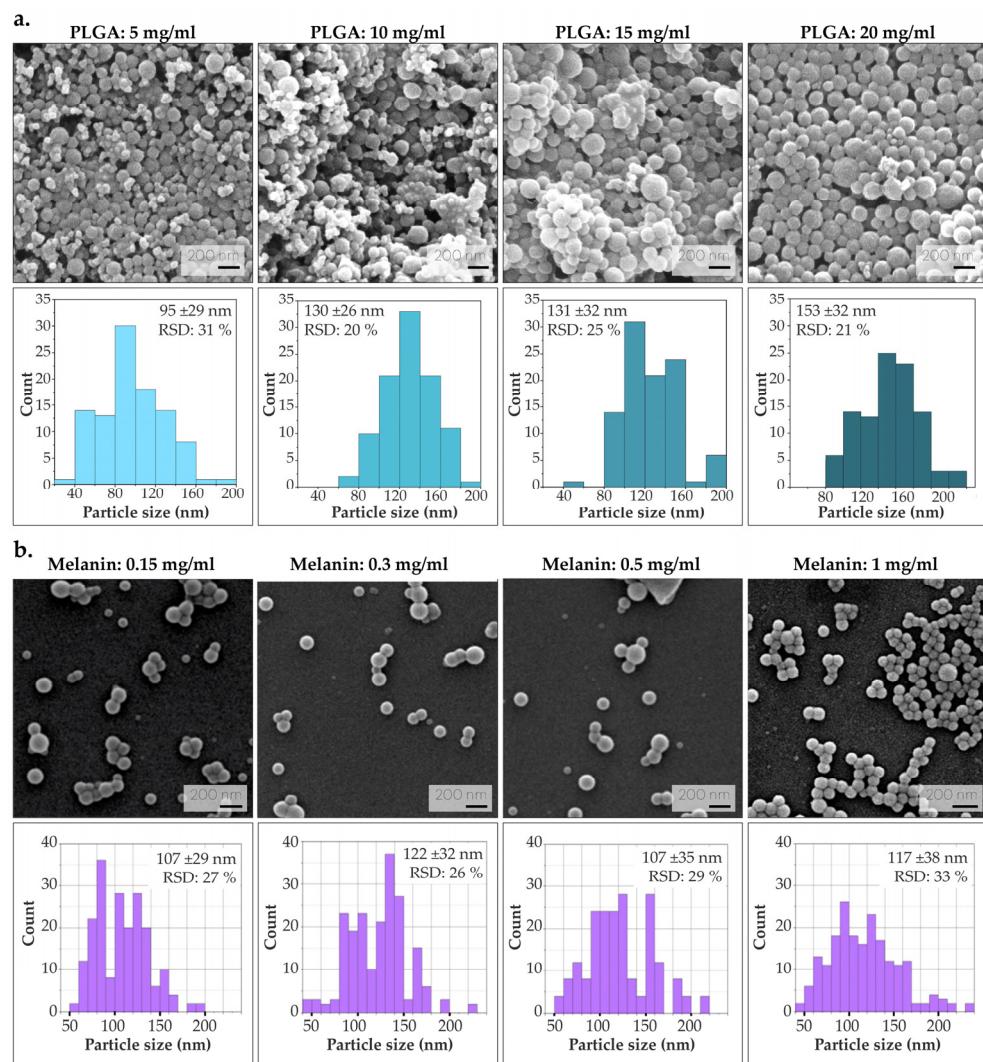
### 3. Results

#### 3.1. Synthesis and Characterization of Melanin-Loaded Nanoparticles

##### 3.1.1. Optimization of PLGA and Melanin Concentration

To analyze the effect of PLGA concentration on particle size, several syntheses were performed by varying the amount of polymer (without encapsulating melanin). As illustrated in Figure 3a, particle size increases with PLGA concentration, attributed to an increased viscosity of the organic solution. This observation is in agreement with previous results, and it is corroborated by the increase in the viscosity of the organic phase along with the increase in PLGA concentration [47]. All colloids were homogeneous in their particle size

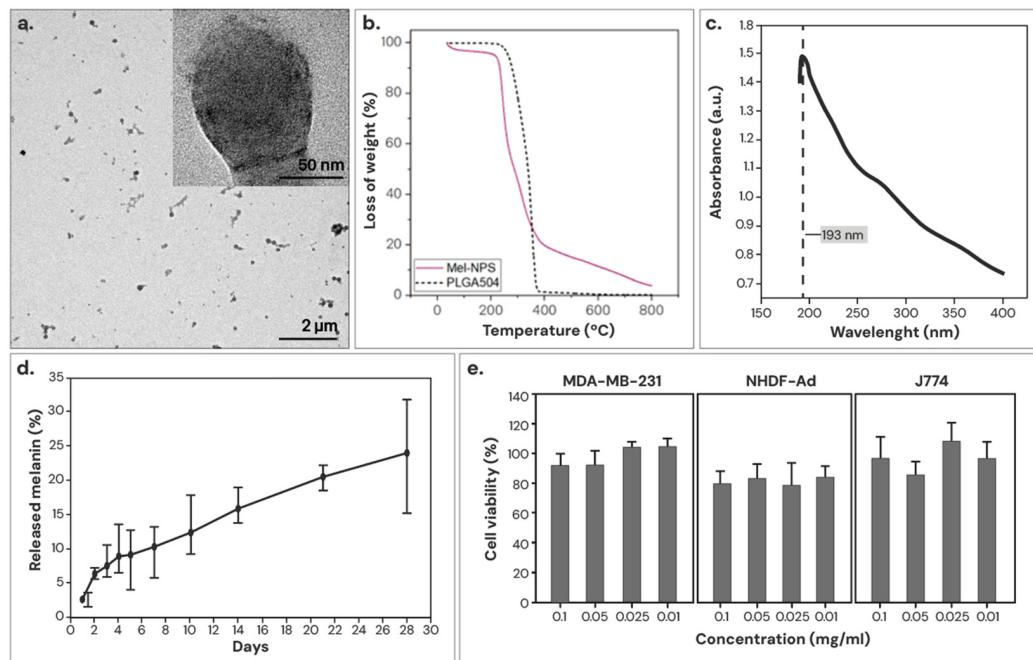
distribution (with a polydispersity index, PDI < 0.01) [48]. It was decided to continue the optimization process using PLGA at a concentration of 10 mg/mL, since this minimizes the use of polymer and no significant difference in the resulting NPs sizes was found. On the other hand, an attempt was made to obtain colloids with high melanin load, as melanin provides the macroscopic coloring necessary for the visualization of lymph nodes with the naked eye. Four different syntheses were performed under varying melanin concentrations (0.15, 0.3, 0.5 and 1 mg/mL). The maximum amount of melanin at 1 mg/mL was set as the solubility limit for achieving its total dissolution in Milli-Q water (pH 8). Increasing the pH of the water to pH 8 provides an environment in which melanin can be properly ionized, increasing its solubility and allowing a better dispersion in water. In all syntheses, the colloids were homogeneous in their particle size distribution (PDI < 0.01). As depicted in Figure 3b, given the morphological similarity of the resulting Mel-NPs, the emulsion with the highest melanin concentration (1 mg/mL) was chosen to subsequently obtain a superior macroscopic staining.



**Figure 3.** Morphology of the NPs during synthesis optimization, SEM micrographs are depicted together with their respective diameter distribution histograms. (a) Optimization of PLGA concentration (5, 10, 15 and 20 mg/mL). (b) Optimization of melanin concentration (0.15, 0.3, 0.5 and 1 mg/mL) using PLGA at 10 mg/mL.

### 3.1.2. Characterization of the Optimized Mel-NPs

The morphology of the optimized Mel-NPs was analyzed using TEM. As shown in Figure 4a, melanin can be observed as a dark pigmentation in the PLGA matrix, indicating a successful melanin encapsulation. The optimized Mel-NPs measured  $117 \pm 38$  nm on average, with a relative standard deviation (RSD) of 32.7% and a PDI < 0.01.



**Figure 4.** Characterization of the Mel-NPs. (a) Transmission electron micrographs of the particles, where melanin is clearly distinguished by its higher electron density. (b) Thermogravimetric curves. (c) UV-Vis absorbance spectrum of melanin, with a maximum of absorbance at 193 nm. (d) Curve of the release kinetics of the encapsulated melanin from the Mel-NPs in distilled water. (e) Cell viability in the human breast adenocarcinoma (MDA-MB-231), macrophages (J774), and fibroblasts (NHDF-Ad) cell lines. Cytotoxicity is determined by assigning 100% cell viability to untreated control cells.

An attempt was made to quantify the encapsulation efficiency by TGA, but Mel-NPs were difficult to differentiate from PLGA since melanin starts to degrade at low temperatures and overlaps with the degradation curve of polymers. However, since the TG curve of Mel-NPs does not completely pyrolyze at  $450^{\circ}\text{C}$ , it was possible to establish a minimum melanin concentration of 17.8% (Figure 4b). To corroborate these findings, the concentration of encapsulated melanin was quantified indirectly through the UV-Vis spectrum of the supernatant knowing the melanin absorbance maximum at 193 nm (Figure 4c). With this method, a melanin encapsulation yield of  $65.8 \pm 9.1\%$  (with respect to the initial concentration used in the synthesis), which represents 23.5% melanin loading by weight in the resulting Mel-NPs.

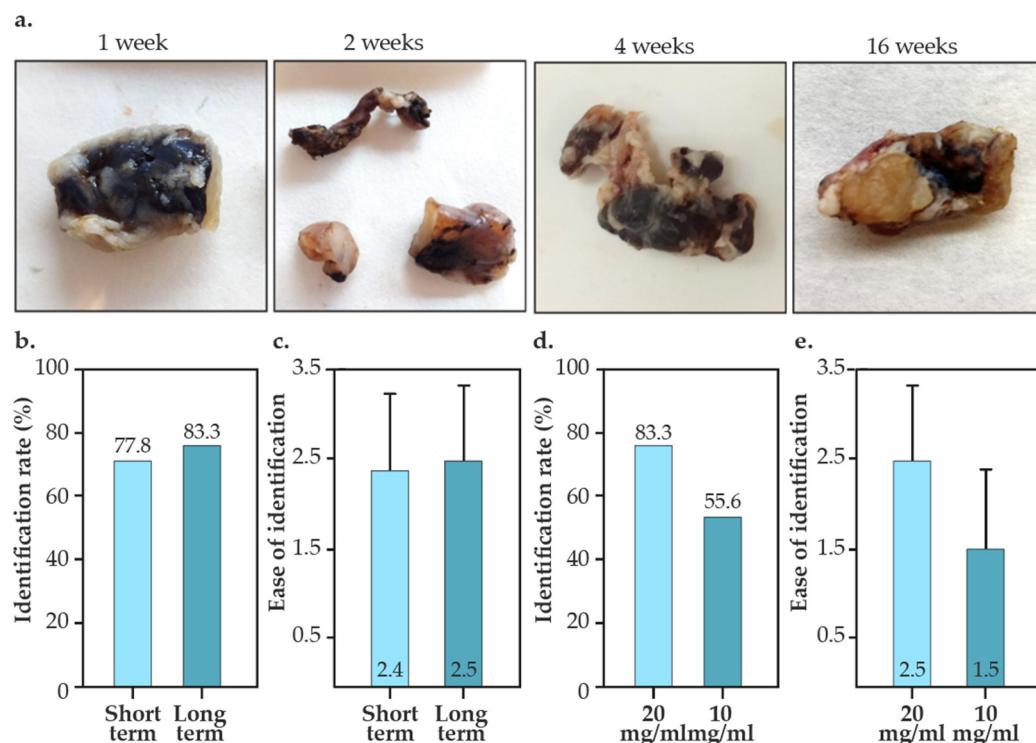
In vitro melanin release was determined by the UV-Vis spectrophotometry of the supernatant. For the experiment, Mel-NPs were dispersed in distilled water and kept for 28 days at  $37^{\circ}\text{C}$  under continuous agitation. As shown in Figure 4d, Mel-NPs exhibits an initial burst release due to the unencapsulated weakly adhering melanin on the nanoparticle surface, and after 4 weeks,  $\sim 24\%$  melanin was continuously released from the NPs synthesized with PLGA. PLGA is a biodegradable polymer that is degraded due to the hydrolysis of its ester linkages, leading to the gradual release of the drug by diffusion as the polymer matrix erodes.

The cytotoxicity of Mel-NPs was determined in three cell lines: MDA-MB-231 (human breast adenocarcinoma), J774 (murine macrophages) and NHDF-Ad (human dermal fibroblasts), 24 h after incubation. As shown in Figure 4e, Mel-NPs were not cytotoxic at any

concentration tested in any of the studied cell lines (79–100%), which are closely related to the intended clinical application. The results are in compliance with ISO 10993-5, which states that cell viability higher than 70% is considered as cytocompatibility [49].

### 3.2. Intraoperative Identification of Tattooed Lymph Nodes

As shown in Figure 5, a total of 25 nodes were tattooed with Mel-NPs-based vectors (10 lymph nodes using 20 mg/mL in the short-term studies; 6 lymph nodes using 20 mg/mL and 9 lymph nodes using 10 mg/mL in the long-term studies). The short-term studies consisted of stabbing for 1–6 weeks, while the long-term studies were conducted 16 weeks after the administration. We did not observe any migration of the tattoo to other lymph nodes in any case, so the correlation between the tattooed lymph node and the lymph node established as ‘sentinel’ corresponds to 100%. As depicted in Figure 5b, 77.8–83.3% of the tattooed nodes were identified during the surgery (identification rate). Vector identification rates of Mel-NPs (20 mg/mL) were similar in the short- and long-term studies, suggesting that tattooing is stable for up to 16 weeks. Additionally, in both short-term and long-term studies, the nodes clearly showed visible tattoos (Figure 5c). Differences in concentration of Mel-NPs were observed, reducing the identification rate by about 30% (Figure 5d). The ease of identification was also notably reduced (Figure 5e and Table S1). However, the difference was not statistically significant.



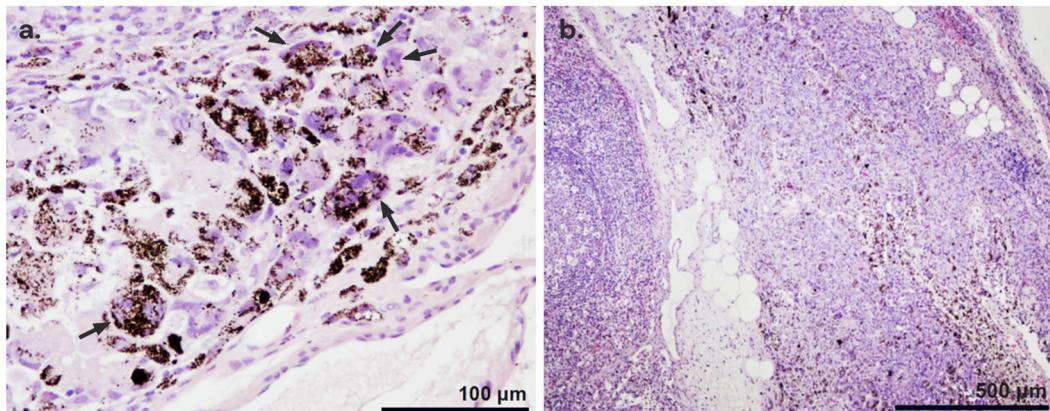
**Figure 5.** Identification rate and ease of identification of Mel-NPs tattooed lymph nodes. (a) Photographs of lymph nodes tattooed with Mel-NPs vectors (20 mg/mL) at different times. (b) Identification rates of lymph nodes tattooed with Mel-NPs vectors (20 mg/mL) in the short- and long-term studies. (c) Ease of identification of lymph nodes tattooed with Mel-NPs vectors (20 mg/mL) in the short and long-term studies. (d) Identification rates of lymph nodes tattooed with Mel-NPs vectors using 20 and 10 mg/mL colloids in the long-term studies. (e) Ease of identification of lymph nodes tattooed with Mel-NPs vectors using 20 and 10 mg/mL colloids in the long-term studies.

### 3.3. Histological Studies

#### 3.3.1. Histopathological Findings

In all tattooed lymph nodes, granulomatous foreign-body-reaction-type inflammation associated with the presence of Mel-NPs was identified. The inflammatory process was

characterized by the presence of macrophages and multinucleated giant cells that phagocytosed and isolated the Mel-NPs from the first week after inoculation (Figure 6a). Necrotic foci associated with the foreign-body-type inflammatory reaction to the administration of the particles were observed in some lymph nodes (Figure 6b).



**Figure 6.** Histopathological findings of tattooed lymph node of Mel-NPs, where Mel-NPs appear brown and are easily distinguished from H&E staining. (a) The distribution of Mel-NPs shows a quite homogeneous morphology characterized by small granules. A foreign body reaction associated with Mel-NPs was observed, characterized by the presence of multinucleated giant cells (arrows). NP-loaded macrophages are also depicted. (b) Foci of necrosis associated with a foreign body reaction were observed in the ‘short-term studies’.

### 3.3.2. Location of the Nanoparticles

A histopathological evaluation of the labelled lymph nodes revealed that the particles were mainly located in the internal region of the node, in the pericapsular area or in the tissue adjacent to the node, although occasionally mixed particles were found (Figure 7). In the short-term studies, Mel-NPs (20 mg/mL) were mainly found in the pericapsular region (50%) and in the adjacent tissue (35.7%). In 14.3% of cases, they were also found in the interior of the lymph node. In the ‘long-term’ studies, Mel-NPs were not found inside the lymph node and were present in the adjacent tissue (44.4%) and in the pericapsular region (55.6%). On the other hand, Mel-NPs at a 10 mg/mL concentration (in the long-term studies) were found in the pericapsular region (36.4%), in the adjacent tissue (36.4%) and inside the lymph node (27.3%) (Figure S1, Table S2). No statistically significant differences were detected.

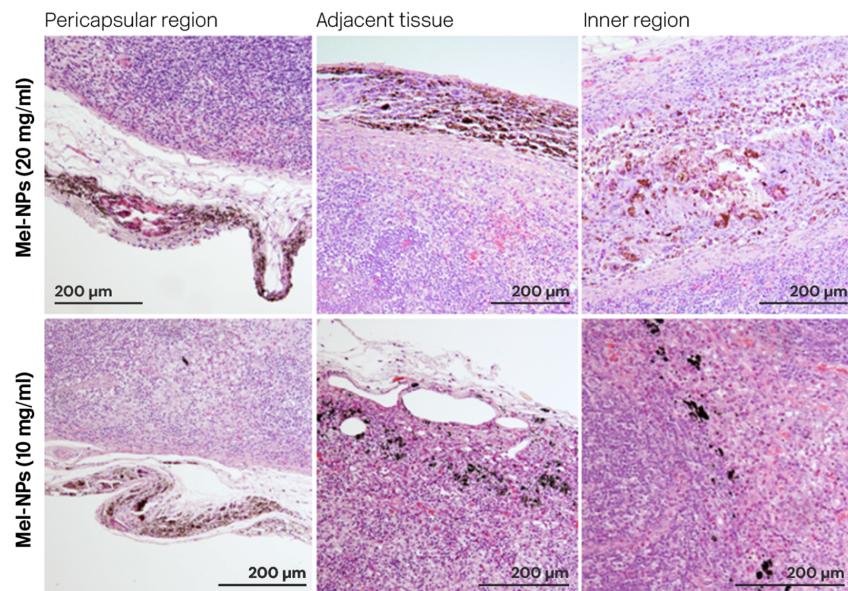
### 3.3.3. Extent of Inflammation

The extent of inflammation produced by Mel-NPs (20 mg/mL) in the ‘short-term studies’ was  $398 \pm 290 \mu\text{m}$ , while in the ‘long-term studies’ it was  $520 \pm 223 \mu\text{m}$  (Table S3). Again, there was a considerable variability between samples. In contrast, in the long-term studies, a substantial reduction in inflammation was observed in Mel-NPs-labelled lymph nodes at 10 mg/mL ( $278 \pm 139 \mu\text{m}$ ), although this was not statistically significant.

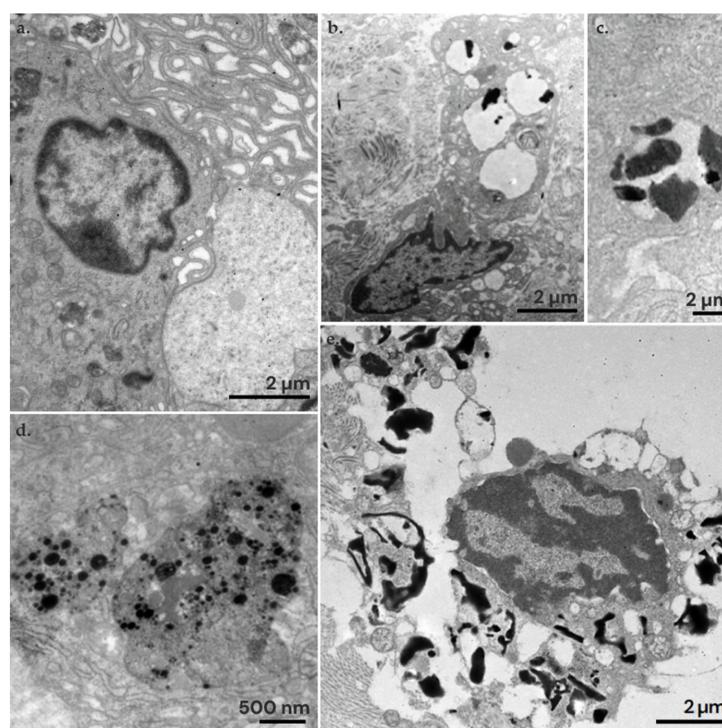
### 3.4. Ultrastructural Study

In the ultrastructural study, Mel-NPs were mainly found internalized in macrophages. Macrophages initiate phagocytosis by forming filopodia and lamellipodia to capture particles from the extracellular space (Figure 8a). Once captured, macrophages internalize the particles into their cytoplasm within phagosomes. Inside the phagosomes or phagolysosomes, Mel-NPs can be identified. In the ‘short-term studies’, the average size of the Mel-NPs was  $264 \pm 97 \text{ nm}$  (Figure 8b,c), which reduced to  $43 \pm 13 \text{ nm}$  in ‘long-term studies’ (Figures 8d and S2). This represents a reduction of approximately  $\sim 3.4$  times their size. However, in all cases, particle aggregation is observed, resulting in large clusters of Mel-NPs. Especially in the long-term

studies, numerous lysed macrophages were observed, with broken plasma membranes and free organelles released into the extracellular space. This suggests that residues of crystallized melanin, with sharp edges, could break the membrane of the macrophages' phagolysosomes and lead to cell lysis (Figure 8e).



**Figure 7.** Location of Mel-NPs (10 and 20 mg/mL) in the adjacent tissue, the pericapsular region, and the inner lymph node region.



**Figure 8.** Ultrastructural findings in the lymph nodes tattooed with Mel-NPs at 20 mg/mL. (a) Activated macrophages with numerous lamellipodia and filopodia for the phagocytosis of Mel-NPs. (b) Macrophage with Mel-NPs in its cytoplasm. (c) Detail of Mel-NPs within the phagosome of the macrophage in the 'short-term studies'. (d) Detail of Mel-NPs within the phagosome in the 'long-term studies', where the particles are more electron-dense and smaller in size. (e) A macrophage lysed by the action of the Mel-NPs. As observed, large amounts of non-encapsulated and potentially crystallized melanin appear that break the membranes and lead to cell death.

#### 4. Discussion

The marking of the SLN through tattooing with carbon-based suspensions is increasingly used in breast cancer patients prior to NACT. To date, more than 800 SLN-labeling studies have been reported in various clinical trials [20–25,50–55], suggesting that, despite its apparent advantages over other methods, its use has not yet become widespread in the majority of healthcare centers. This strategy is low-cost, increases identification rates compared to other techniques (i.e., surgical clips, magnetic seeds, radioactive seeds, reflector radars, etc.), does not require specialized equipment, and minimizes additional discomfort for the patient, making it a promising alternative for SLN marking in the field of oncological surgery [56]. However, the materials available for SLN tattooing are mainly limited to carbon-based suspensions (i.e., Spot® (Mechanicsburg, PA, USA), CARBO-REP® (Sterylab, Milan, Italy) or Black Eye® (The Standard Co., Ltd., Gyeonggido, Republic of Korea)) used for other clinical purposes (such as external marking tumors for surgical resection). Therefore, the development of specific materials showing enhanced marking efficacy is required for the optimization of the technique.

For this purpose, we propose the use of melanin as a tattooing element to replace carbon-based colloids, since as an endogenous pigment, it could potentially reduce associated cytotoxicity [43]. Additionally, melanin exhibits therapeutic properties including antioxidant, photoprotective, anti-inflammatory, and anti-tumoral in melanomas [57]. We estimate that approximately 23.5% by weight of the optimized Mel-NPs is melanin, and that about 24% of melanin is released in vitro after 4 weeks. In other studies on the release of melanin from PLGA NPs (LA:GA 50:50), releases of 85% have been observed after 25 days under similar test conditions [58]. The rate of polymer degradation is subjected to the physicochemical characteristics of the NPs and the conditions of the assay [59]. However, the Mel-NPs synthesized in this study had lower release rates of melanin compared to previous reports. According to previous studies [57], melanin-loaded NPs did not show cytotoxicity in MDA-MB-231 (breast adenocarcinoma) cell lines, fibroblasts, and J774 (macrophages), with viabilities between 79 and 100%. In our case, we did not observe any cytotoxicity at the doses tested.

In the *in vivo* studies, after the stabilization period for each group of animals, we simulated the TAD technique for the selective excision of each lymph node. In short-term studies (1–6 weeks), the intraoperative identification rate was 77.8%, while in long-term studies (16 weeks), the identification rate was 83.3%. These results are similar to those reported in other clinical and preclinical studies conducted with carbon-based suspensions, where average identification rates of  $91.2 \pm 11.7\%$  (64–100%) have been described [20–25,50–53,55]. However, in our study, we used 0.2 mL of Mel-NPs, whereas other studies use variable doses ranging from 0.1 to 1 mL. Additionally, in previous clinical trials a correlation between the tattooed lymph node (TLN) and the SLN of  $81.9 \pm 18.6\%$  (47.9–100%) was described [20–25,50–53,55]. In our study, we found no dissemination to other lymph nodes in any case, so 100% of the SLN would have corresponded to the TLN.

In all the dissected lymph nodes, a foreign-body-type inflammatory reaction was found of varied degrees, characterized by the presence of macrophages and multinucleated giant cells that phagocytosed and isolated the particles inoculated in the node. This type of inflammation associated with the inoculated particles has been previously described in skin tattoo [27,28]. Additionally, in some cases, we found small necrotic foci associated with inflammation. However, in skin tattoos, extensive necrosis has only been described, primarily associated with infections [60,61]. Interestingly, the inflammatory reaction did not decrease over time; instead, it seemed to be more intense after 16 weeks. In our ultrastructural studies, we observed that the melanin loaded on PLGA NPs disrupts macrophage phagosomes, leading to cell lysis. In long-term studies, more non-encapsulated melanin residues were found, suggesting that the polymer degrades and releases the melanin, which appears to be more toxic to cells. Indeed, we observed that Mel-NPs reduced in size by ~3.4 times relative to long-term studies. Although *in vitro* release was less than 25% after 4 weeks, the degradation rate of the polymer is dependent on the pH of

the medium, so that the PLGA degradation of the NPs/MPs is accelerated by the presence of the acidity of the lysosomal enzymes and in vivo conditions. Indeed, under recreated lysosomal conditions, PLGA degradation is estimated to be close to ~40% after 4 weeks, which is in agreement with our in vivo observations [62,63].

## 5. Conclusions

Mel-NPs showed high identification rates and high scores on ease of identification both at 10 and 20 mg/mL, suggesting that 10 mg/mL is sufficient to mark the lymph nodes. Although not statistically significant, it would be expected that more NPs in the lymph node would produce greater inflammatory reactions. Reducing the dose of foreign material in the body is therefore of interest. In our long-term studies, we observed that much of the encapsulated melanin was released, leading to an increased presence of melanin residues. These residues, under the electron microscope, appeared rigidly shaped and edged, making them look crystallized. We observed that these geometries led to cell death by disruption of the phagolysosomes. Therefore, using smaller materials and a slower sustained release of polymers may be a promising approach for the application of sentinel lymph node tattooing.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nano14131149/s1>, Table S1: Ease of identification of the tattooed lymph nodes. According to the identification scale described in Figure 2 of the main body of the manuscript; Figure S1: Percentage of lymph nodes with adjacent, inner or pericapsular localization of Mel-NPs; Table S2: Localization of Mel-NPs in the lymph nodes. According to the localization description showed in Figure 2 of the main body of the manuscript; Table S3: Extent of inflammation maximum length in the lymph nodes. Note that some nodes were not counted due to rupture of nodal tissue during surgical resection or sample; Figure S2: Diameter distribution histograms of Mel-NPs in the short and in long-term studies in vivo.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.G. and M.A.; Synthesis and characterization: M.B., C.Y. and T.A.; Surgery procedures: A.G., M.B. and D.A.; Histological studies: E.M. and M.B.; Electron-microscopy investigation, M.B.; Statistical analysis: M.B.; Writing—Original Draft, M.B.; Writing—Review and Editing, A.G., M.A., V.S., C.Y., D.A., G.M. and T.A.; Supervision, A.G., M.A. and E.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), grant number DTS20/00131.

**Data Availability Statement:** Data are contained within the article and supplementary materials.

**Acknowledgments:** Authors acknowledge the use of “Servicio General de Apoyo a la Investigación (SAI)” from the University of Zaragoza (Zaragoza, Spain), and the use of “Servicio de Microscopía Electrónica” from the “Centro de Investigación Príncipe Felipe” (Valencia, Spain). M.B. would like to thank Concepción Junquera for her support in the transmission electron microscopy studies. G.M. gratefully acknowledges the support from the Miguel Servet Program (MS19/00092; ISCIII).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Massagué, J.; Obenauf, A.C. Metastatic Colonization by Circulating Tumour Cells. *Nature* **2016**, *529*, 298–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. American Cancer Society Breast Cancer. Facts & Figures 2019–2020. 2020. Available online: <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer.html> (accessed on 7 March 2024).
3. Turner, R.; Olilla, D.; Krasne, D.; Giuliano, A. Histopathologic Validation of the Sentinel Lymph Node Hypothesis for Breast Carcinoma. *Ann. Surg.* **1997**, *226*, 271–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Giuliano, A.; Kirgan, D.; Guenther, J.; Morton, D. Lymphatic Mapping and Sentinel Lymphadenectomy for Breast Cancer. *Ann. Surg.* **1994**, *220*, 391–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Zhang-Yin, J.; Mauel, E.; Talpe, S. Update on Sentinel Lymph Node Methods and Pathology in Breast Cancer. *Diagnostics* **2024**, *14*, 252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Schwartz, T.L. Axillary Nodal Staging in Breast Cancer: What Have We Learned? *Clin. Exp. Metastasis* **2024**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Bernet, L.; Piñero, A.; Vidal-Sicart, S.; Peg, V.; Giménez, J.; Algara, M.; Dueñas, B.; Tresserra, F.; Cano, R.; Cordero, J.M.; et al. Consenso Sobre La Biopsia Selectiva Del Ganglio Centinela En El Cáncer de Mama. Revisión 2013 de La Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. *Rev. Esp. Patol.* **2014**, *47*, 22–32. [[CrossRef](#)]

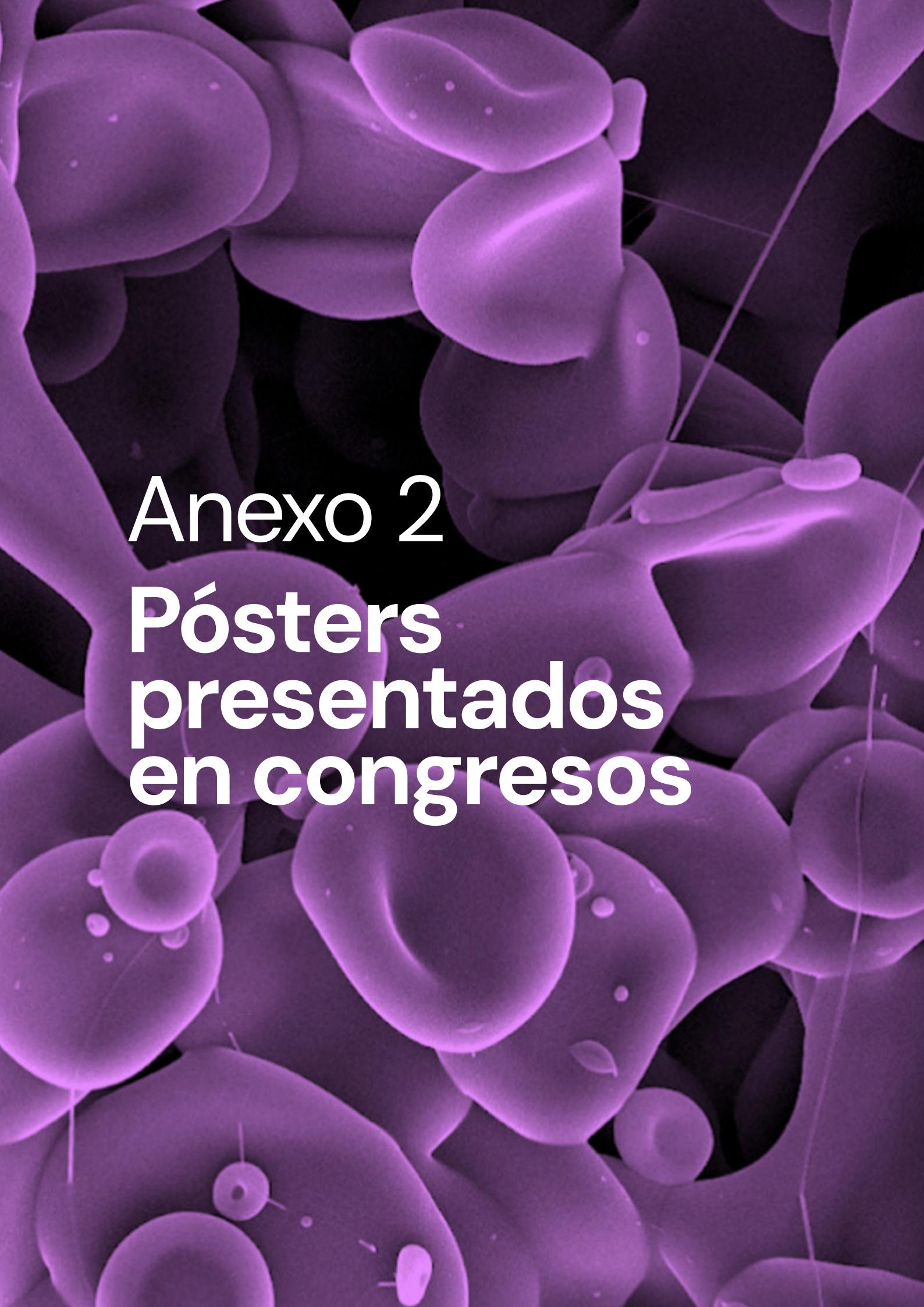
8. Boughey, J.; Suman, V.; Mittendorf, E.; Ahrendt, G.; Wilke, L.; Taback, G.; Leitch, A.; Kuerer, H.; Bowling, M.; Flippo-Morton, T.; et al. Sentinel Node Surgery after Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Node-Positive Breast Cancer: The American College of Surgeons Oncology Group. Z1071 Clinical Trial. *JAMA* **2013**, *310*, 1455–1461. [CrossRef] [PubMed]
9. Kuehn, T.; Bauerfeind, I.; Fehm, T.; Fleige, B.; Hauschild, M.; Helms, G.; Lebeau, A.; Liedtke, C.; von Minchitz, G.; Nekjudova, V.; et al. Sentinel-Lymph-Node Biopsy in Patients with Breast Cancer before and after Neoadjuvant Chemotherapy (SENTINA): A Prospective, Multicenter Cohort Study. *Lancet Oncol.* **2013**, *14*, 608–618. [CrossRef] [PubMed]
10. Boileau, J.; Porier, B.; Basik, M.; Holloway, C.; Gaboury, L.; Sideris, L.; Meterissian, S.; Arnaout, A.; Brackstone, M.; McCready, D.; et al. Sentinel Node Biopsy after Neoadjuvant Chemotherapy in Biopsy-Proven Node-Positive Breast Cancer: The SN FNAC Study. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 258–264.
11. Cao, S.; Liu, X.; Cui, J.; Liu, X.; Zhong, J.; Yang, Z.; Sun, D.; Wei, W. Feasibility and Reliability of Sentinel Lymph Node Biopsy after Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients with Positive Axillary Nodes at Initial Diagnosis: An up-to-Date Meta-Analysis of 3578 Patients. *Breast* **2021**, *59*, 256–269. [CrossRef]
12. Plecha, D.; Bai, S.; Patterson, H.; Thompson, C.; Shenk, R. Improving the Accuracy of Axillary Lymph Node Surgery in Breast Cancer with Ultrasound-Guided Wire Localization of Biopsy Proven Metastatic Lymph Nodes. *Breast Oncol.* **2015**, *22*, 4241–4246. [CrossRef] [PubMed]
13. Man, V.; Kwong, A. Different Strategies in Marking Axillary Lymph Nodes in Breast Cancer Patients Undergoing Neoadjuvant Medical Treatment: A Systematic Review. *Breast Cancer Res. Treat.* **2021**, *186*, 607–615. [CrossRef] [PubMed]
14. Hartmann, S.; Banys-Paluchowski, M.; Stickeler, E.; de Boniface, J.; Gentilini, O.D.; Kontos, M.; Seitz, S.; Kaltenecker, G.; Wärnberg, F.; Zetterlund, L.H.; et al. Applicability of Magnetic Seeds for Target Lymph Node Biopsy after Neoadjuvant Chemotherapy in Initially Node-Positive Breast Cancer Patients: Data from the AXSANA Study. *Breast Cancer Res. Treat.* **2023**, *202*, 497–504. [CrossRef] [PubMed]
15. Donker, M.; Straver, M.E.; Wesseling, J.; Loo, C.E.; Schot, M.; Drukker, C.A.; van Tinteren, H.; Sonke, G.S.; Rutgers, E.J.T.; Vrancken Peeters, M.-J.T.F.D. Marking Axillary Lymph Nodes With Radioactive Iodine Seeds for Axillary Staging After Neoadjuvant Systemic Treatment in Breast Cancer Patients. *Ann. Surg.* **2015**, *261*, 378–382. [CrossRef] [PubMed]
16. Caudle, A.S.; Yang, W.T.; Krishnamurthy, S.; Mittendorf, E.A.; Black, D.M.; Gilcrease, M.Z.; Bedrosian, I.; Hobbs, B.P.; DeSnyder, S.M.; Hwang, R.F.; et al. Improved Axillary Evaluation Following Neoadjuvant Therapy for Patients With Node-Positive Breast Cancer Using Selective Evaluation of Clipped Nodes: Implementation of Targeted Axillary Dissection. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 1072–1078. [CrossRef] [PubMed]
17. Murthy, V.; Young, J.; Tokumaru, Y.; Quinn, M.; Edge, S.B.; Takabe, K. Options to Determine Pathological Response of Axillary Lymph Node Metastasis after Neoadjuvant Chemotherapy in Advanced Breast Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 4167. [CrossRef] [PubMed]
18. Alamoodi, M.; Wazir, U.; Venkataraman, J.; Almukbel, R.; Mokbel, K. Assessing the Efficacy of Radioactive Iodine Seed Localisation in Targeted Axillary Dissection for Node-Positive Early Breast Cancer Patients Undergoing Neoadjuvant Systemic Therapy: A Systematic Review and Pooled Analysis. *Diagnostics* **2024**, *14*, 1175. [CrossRef] [PubMed]
19. Wazir, U.; Michell, M.J.; Alamoodi, M.; Mokbel, K. Evaluating Radar Reflector Localisation in Targeted Axillary Dissection in Patients Undergoing Neoadjuvant Systemic Therapy for Node-Positive Early Breast Cancer: A Systematic Review and Pooled Analysis. *Cancers* **2024**, *16*, 1345. [CrossRef]
20. Choy, N.; Lipson, J.; Porter, C.; Ozawa, M.; Kieryn, A.; Pal, S.; Kao, J.; Trinh, L.; Wheeler, A.; Ikeda, D.; et al. Initial Results with Preoperative Tattooing of Biopsied Axillary Lymph Nodes and Correlation to Sentinel Lymph Nodes in Breast Cancer Patients. *Ann. Surg. Oncol.* **2015**, *22*, 377–382. [CrossRef]
21. Natsiopoulos, I.; Intzes, S.; Liappis, T.; Zarampoukas, K.; Zarampoukas, T.; Zacharopoulou, V.; Papazisis, K. Axillary Lymph Node Tattooing and Targeted Axillary Dissection in Breast Cancer Patients Who Presented as CN+ Before Neoadjuvant Chemotherapy and Became CN0 After Treatment. *Clin. Breast Cancer* **2019**, *19*, 208–215. [CrossRef]
22. Allweis, T.M.; Menes, T.; Rotbart, N.; Rapson, Y.; Cernik, H.; Bokov, I.; Diment, J.; Magen, A.; Golani, O.; Levi-Bendet, N.; et al. Ultrasound Guided Tattooing of Axillary Lymph Nodes in Breast Cancer Patients Prior to Neoadjuvant Therapy, and Identification of Tattooed Nodes at the Time of Surgery. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2020**, *46*, 1041–1045. [CrossRef] [PubMed]
23. Patel, R.; MacKerricher, W.; Tsai, J.; Choy, N.; Lipson, J.; Ikeda, D.; Pal, S.; De Martini, W.; Allison, K.H.; Wapnir, I.L. Pretreatment Tattoo Marking of Suspicious Axillary Lymph Nodes: Reliability and Correlation with Sentinel Lymph Node. *Ann. Surg. Oncol.* **2019**, *26*, 2452–2458. [CrossRef] [PubMed]
24. Hartmann, S.; Kühn, T.; de Boniface, J.; Stachs, A.; Winckelmann, A.; Frisell, J.; Wiklander-Bräkenhielm, I.; Stubert, J.; Gerber, B.; Reimer, T. Carbon Tattooing for Targeted Lymph Node Biopsy after Primary Systemic Therapy in Breast Cancer: Prospective Multicentre TATTOO Trial. *Br. J. Surg.* **2021**, *108*, 302–307. [CrossRef]
25. Goyal, A.; Puri, S.; Marshall, A.; Valassiadou, K.; Hoosein, M.M.; Carmichael, A.R.; Erdelyi, G.; Sharma, N.; Dunn, J.; York, J. A Multicentre Prospective Feasibility Study of Carbon Dye Tattooing of Biopsied Axillary Node and Surgical Localisation in Breast Cancer Patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **2021**, *185*, 433–440. [CrossRef] [PubMed]
26. Gatek, J.; Petru, V.; Kosac, P.; Ratajsky, M.; Duben, J.; Dudesek, B.; Jancik, P.; Zabojnikova, M.; Katrusak, J.; Opelova, P.; et al. Targeted Axillary Dissection with Preoperative Tattooing of Biopsied Positive Axillary Lymph Nodes in Breast Cancer. *Neoplasma* **2020**, *67*, 1329–1334. [CrossRef] [PubMed]

27. Incel Uysal, P.; Gurel, M.S.; Behzatoglu, K. A Tattoo-Associated Complication: Foreign Body Granulomatous Reaction. *Am. J. Dermopathol.* **2016**, *38*, 936–937. [CrossRef] [PubMed]
28. Bassi, A.; Campolmi, P.; Cannarozzo, G.; Conti, R.; Bruscino, N.; Gola, M.; Ermini, S.; Massi, D.; Moretti, S. Tattoo-Associated Skin Reaction: The Importance of an Early Diagnosis and Proper Treatment. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 354608. [CrossRef] [PubMed]
29. Xie, P.; Yang, S.-T.; He, T.; Yang, S.; Tang, X.-H. Bioaccumulation and Toxicity of Carbon Nanoparticles Suspension Injection in Intravenously Exposed Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2562. [CrossRef] [PubMed]
30. Chang, X.-L.; Yang, S.-T.; Xing, G. Molecular Toxicity of Nanomaterials. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 2828–2851. [CrossRef]
31. Liu, J.-H.; Wang, T.; Wang, H.; Gu, Y.; Xu, Y.; Tang, H.; Jia, G.; Liu, Y. Biocompatibility of Graphene Oxide Intravenously Administrated in Mice—Effects of Dose, Size and Exposure Protocols. *Toxicol. Res.* **2015**, *4*, 83–91. [CrossRef]
32. Duch, M.C.; Budinger, G.R.S.; Liang, Y.T.; Soberanes, S.; Urich, D.; Chiarella, S.E.; Campochiaro, L.A.; Gonzalez, A.; Chandel, N.S.; Hersam, M.C.; et al. Minimizing Oxidation and Stable Nanoscale Dispersion Improves the Biocompatibility of Graphene in the Lung. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 5201–5207. [CrossRef]
33. Kuwahata, A.; Tanaka, R.; Matsuda, S.; Amada, E.; Irino, T.; Mayanagi, S.; Chikaki, S.; Saito, I.; Tanabe, N.; Kawakubo, H.; et al. Development of Magnetic Probe for Sentinel Lymph Node Detection in Laparoscopic Navigation for Gastric Cancer Patients. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1798. [CrossRef] [PubMed]
34. Piñero, A.; Torró, J.; León, J.; Castro, G.; Fuster, C.; Pardo, R. Superparamagnetic Iron Oxide as a Tracer for Sentinel Node Biopsy in Breast Cancer: A Comparative Non-Inferiority Study. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2015**, *41*, 991–997. [CrossRef] [PubMed]
35. Rubio, I.T.; Diaz-Botero, S.; Esgueva, A.; Rodriguez, R.; Cortadellas, T.; Cordoba, O.; Espinosa-Bravo, M. The Superparamagnetic Iron Oxide Is Equivalent to the Tc99 Radiotracer Method for Identifying the Sentinel Lymph Node in Breast Cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2015**, *41*, 46–51. [CrossRef]
36. Douek, M.; Klaase, J.; Monypenny, I.; Kothari, A.; Zechmeister, K.; Brown, D.; Wyld, L.; Drew, P.; Garmo, H.; Agbaje, O.; et al. Sentinel Node Biopsy Using a Magnetic Tracer versus Standard Technique: The SentiMAG Multicentre Trial. *Ann. Surg. Oncol.* **2014**, *21*, 1237–1245. [CrossRef] [PubMed]
37. Kumar, C.; Gerion, D. Fluorescence Imaging in Biology Using Nanoprobes. In *Nanosystem Characterization Tools in the Life Sciences*, 1st ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2006; pp. 1–37.
38. Robe, A.; Pic, E.; Lassalle, H.P.; Bezdetnaya, L.; Guillemin, F.; Marchal, F. Quantum Dots in Axillary Lymph Node Mapping: Biodistribution Study in Healthy Mice. *BMC Cancer* **2008**, *8*, 111. [CrossRef] [PubMed]
39. Kosaka, N.; Ogawa, M.; Sato, N.; Choyke, P.L.; Kobayashi, H. In Vivo Real-Time, Multicolor, Quantum Dot Lymphatic Imaging. *J. Invest. Dermatol.* **2009**, *129*, 2818–2822. [CrossRef]
40. Liu, Z.; Rong, P.; Yu, L.; Zhang, X.; Yang, C.; Guo, F.; Zhao, Y.; Zhou, K.; Wang, W.; Zeng, W. Dual-Modality Noninvasive Mapping of Sentinel Lymph Node by Photoacoustic and Near-Infrared Fluorescent Imaging Using Dye-Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 3119–3128. [CrossRef] [PubMed]
41. Kojima, C.; Ogawa, M.; Magata, Y. Dendrimer-Based Sentinel Lymph Node Imaging. In Proceedings of the 10th World Biomaterials Congress, Montréal, QC, Canada, 17–22 May 2016.
42. Yang, R.; Xia, S.; Ye, T.; Yao, J.; Zhang, R.; Wang, S.; Wang, S. Synthesis of a Novel Polyamidoamine Dendrimer Conjugating with Alkali Blue as a Lymphatic Tracer and Study on the Lymphatic Targeting in Vivo. *Drug Deliv.* **2016**, *23*, 2298–2308. [CrossRef]
43. Gabriele, V.; Mazhabi, R.; Alexander, N.; Mukherjee, P.; Seyfried, T.N.; Nwaji, N.; Akinoglu, E.; Mackiewicz, A.; Zhou, G.; Giersig, M.; et al. Light- and Melanin Nanoparticle-Induced Cytotoxicity in Metastatic Cancer Cells. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 965. [CrossRef]
44. Moreiras, H.; Seabra, M.C.; Barral, D.C. Melanin Transfer in the Epidermis: The Pursuit of Skin Pigmentation Control Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4466. [CrossRef] [PubMed]
45. López-Royo, T.; Sebastián, V.; Moreno-Martínez, L.; Uson, L.; Yus, C.; Alejo, T.; Zaragoza, P.; Osta, R.; Arruebo, M.; Manzano, R. Encapsulation of Large-Size Plasmids in PLGA Nanoparticles for Gene Editing: Comparison of Three Different Synthesis Methods. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 2723. [CrossRef] [PubMed]
46. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [CrossRef]
47. Larrea, A.; Clemente, A.; Luque-Michel, E.; Sebastian, V. Efficient Production of Hybrid Bio-Nanomaterials by Continuous Microchannel Emulsification: Dye-Doped SiO<sub>2</sub> and Au-PLGA Nanoparticles. *Chem. Eng. J.* **2017**, *316*, 663–672. [CrossRef]
48. Bhattacharjee, S. DLS and Zeta Potential—What They Are and What They Are Not? *J. Control. Release* **2016**, *235*, 337–351. [CrossRef]
49. ISO 10993-5:2009; Biological Evaluation of Medical Devices (Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity). ISO: Geneva, Switzerland, 2009.
50. Dostalek, L.; Černý, A.; Saskova, P.; Pavlistá, D. Selective Extirpation of Tattooed Lymph Node in Combination with Sentinel Lymph Node Biopsy in the Management of Node-Positive Breast Cancer Patients after Neoadjuvant Systemic Therapy. *Breast Care* **2021**, *16*, 623–629. [CrossRef] [PubMed]
51. Kim, W.H.; Kim, H.J.; Jung, J.H.; Park, H.Y.; Lee, J.; Kim, W.W.; Park, J.Y.; Chae, Y.S.; Lee, S.J. Ultrasound-Guided Restaging and Localization of Axillary Lymph Nodes After Neoadjuvant Chemotherapy for Guidance of Axillary Surgery in Breast Cancer Patients: Experience with Activated Charcoal. *Ann. Surg. Oncol.* **2018**, *25*, 494–500. [CrossRef]

52. Park, S.; Koo, J.S.; Kim, G.M.; Sohn, J.; Kim, S.I.; Cho, Y.U.; Park, B.-W.; Park, V.Y.; Yoon, J.H.; Moon, H.J.; et al. Feasibility of Charcoal Tattooing of Cytology-Proven Metastatic Axillary Lymph Node at Diagnosis and Sentinel Lymph Node Biopsy after Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients. *Cancer Res. Treat.* **2018**, *50*, 801–812. [CrossRef] [PubMed]
53. Pinto, D.; Batista, E.; Gouveia, P.; Mavioso, C.; Anacleto, J.; Ribeiro, J.; Sousa, B.; Gouveia, H.; Ferreira, A.; Chumbo, M.; et al. Targeted Axillary Dissection after Chemotherapy: Feasibility Study with Clip and Carbon Dye Tattoo—Neotarget Trial. *Breast Care* **2022**, *17*, 166–171. [CrossRef]
54. Li, J.; Jia, S.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Kong, L.; Cao, Y.; Liu, Y.; Zhang, Y.; Chen, B. Long-Term Tracing and Staining of Carbon Nanoparticles for Axillary Lymph Nodes in Patients with Locally Advanced Breast Cancer Treated with Neoadjuvant Chemotherapy. *Asian J. Surg.* **2022**, *45*, 89–96. [CrossRef]
55. Pajcini, M.; Wapnir, I.; Tsai, J.; Edquilang, J.; DeMartini, W.; Ikeda, D. Influence of Imaging Features and Technique on US-Guided Tattoo Ink Marking of Axillary Lymph Nodes Removed at Sentinel Lymph Node Biopsy in Women with Breast Cancer. *J. Breast Imaging* **2021**, *3*, 583–590. [CrossRef] [PubMed]
56. Song, Y.; Xu, Z.; Liang, M.; Liu, Z.; Hou, J.; Chen, X.; Xu, D.; Fei, Y.; Tang, J. Diagnostic Accuracy of De-escalated Surgical Procedure in Axilla for Node-positive Breast Cancer Patients Treated with Neoadjuvant Systemic Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cancer Med.* **2022**, *11*, 4085–4103. [CrossRef] [PubMed]
57. Marcovici, I.; Coricovac, D.; Pinzaru, I.; Macasoi, I.; Popescu, R.; Chioibas, R.; Zupko, I.; Dehelean, C. Melanin and Melanin-Functionalized Nanoparticles as Promising Tools in Cancer Research—A Review. *Cancers* **2022**, *14*, 1838. [CrossRef] [PubMed]
58. Zhang, L.; Zhang, J.; Ling, Y.; Chen, C.; Liang, A.; Peng, Y.; Chang, H.; Su, P.; Huang, D. Sustained Release of Melatonin from Poly(Lactic-co-glycolic Acid) (PLGA) Microspheres to Induce Osteogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *J. Pineal Res.* **2013**, *54*, 24–32. [CrossRef] [PubMed]
59. Xu, Y.; Kim, C.-S.; Saylor, D.M.; Koo, D. Polymer Degradation and Drug Delivery in PLGA-Based Drug-Polymer Applications: A Review of Experiments and Theories. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2017**, *105*, 1692–1716. [CrossRef] [PubMed]
60. Bhogal, R.H.; Thomas, S.S. Necrotizing Black Tattoo Reaction. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2009**, *10*, 131–133. [CrossRef] [PubMed]
61. Bălăceanu-Gurău, B.; Apostol, E.; Caraivan, M.; Ion, A.; Tatar, R.; Mihai, M.M.; Popa, L.G.; Gurău, C.-D.; Orzan, O.A. Cutaneous Adverse Reactions Associated with Tattoos and Permanent Makeup Pigments. *J. Clin. Med.* **2024**, *13*, 503. [CrossRef] [PubMed]
62. Chen, R.; Jäättelä, M.; Liu, B. Lysosome as a Central Hub for Rewiring PH Homeostasis in Tumors. *Cancers* **2020**, *12*, 2437. [CrossRef]
63. del Moral, M.; Loeck, M.; Muntimadugu, E.; Vives, G.; Pham, V.; Pfeifer, P.; Battaglia, G.; Muro, S. Role of the Lactide:Glycolide Ratio in PLGA Nanoparticle Stability and Release under Lysosomal Conditions for Enzyme Replacement Therapy of Lysosomal Storage Disorders. *J. Funct. Biomater.* **2023**, *14*, 440. [CrossRef]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.





# Anexo 2

## Pósters presentados en congresos

# Póster 1

**"Carbon-based Nanoparticles for Sentinel Node Labeling: Ultrastructural Study."**

Póster Científico presentado en el Congreso Internacional de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería de Tejidos (Granada, España) en septiembre de 2022.



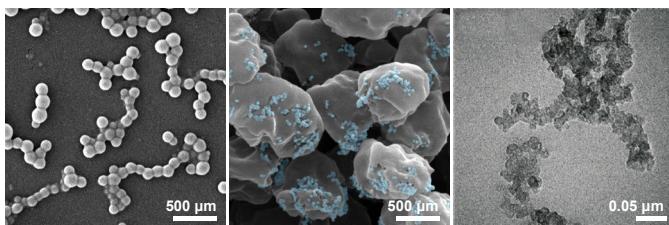
# Carbon-based Nanoparticles for Sentinel Node Labeling: Ultrastructural Study

Baselga M.<sup>1</sup>, Monleón E.<sup>1,2</sup>, Güemes A.<sup>1,3</sup>, Arribas MD.<sup>1,3</sup>, Arruebo M.<sup>1,4,5</sup>, Sebastian V.<sup>1,4,5</sup>, and Junquera C.<sup>1,2</sup>

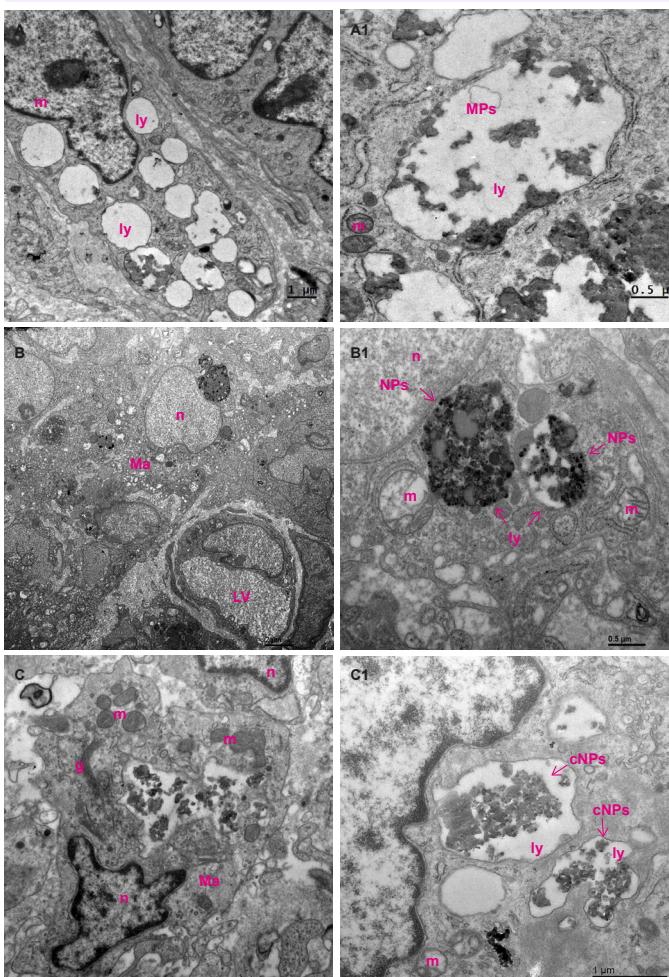
<sup>1</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), Zaragoza, Spain; <sup>2</sup> Department of Anatomy and Histology, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain; <sup>3</sup> Department of Surgery, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain; <sup>4</sup> Department of Chemical and Environmental Engineering, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain; <sup>5</sup> Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA), Zaragoza, Spain.

**INTRODUCTION.** Given the limitations presented by current techniques for labeling the sentinel lymph node (SLN) in patients with breast cancer who have undergone neoadjuvant therapy, the aim is to carry out labeling based on nanoparticles durable over time, stable in the node, and harmless to the health of the patient. There is no ultrastructural study that analyzes the interaction of nanoparticles with the different cell types that make up the sentinel node. (The Histological study is presented in Monleon et al. communication).

**METHODS.** As a labeling pigment, poly(lactic-co-glycolic acid)-based (PLGA) particles with encapsulated carbon nanoparticles (cNPs) have been developed. The particles have been developed using two different techniques: on the one hand, simple emulsion synthesis and, on the other hand, electrohydrodynamic techniques (FIG.1). The animals were kept stable for at least 6 weeks (PI09/20). The biopsies were routinely processed to study them using a Transmission Electron Microscope (TEM).



**FIG.1.** **A)** The nanoparticles obtained by emulsion (NPs) (100-150 nm). **B)** Microparticles resulting from electrospinning reach larger sizes (1-2 µm) (MPs). The obtained particles were suspended in a viscous phase and injected by direct puncture into pig lymph nodes. **C)** Carbon nanoparticles without a polymeric coating (cNPs).

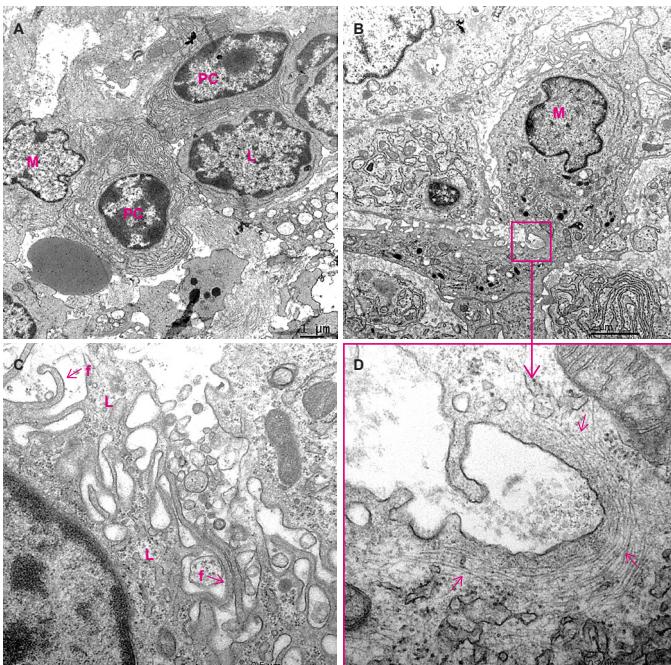


**FIG.3.** Macrophages phagocytosed the three types of particles. **A)** C-PLGA microparticles (MPs). **A1)** Detail of the microparticles contained in a lysosome. **B)** C-PLGA nanoparticles (NPs). **B1)** Detail of the nanoparticles in a lysosome. **C)** Free carbon nanoparticles (cNPs). **C1)** Detail of the different morphologies of phagosomes. Where, Ma: macrophage, ly: lysosome, n: nucleus; g: Golgi; LV: lymphatic vessel.

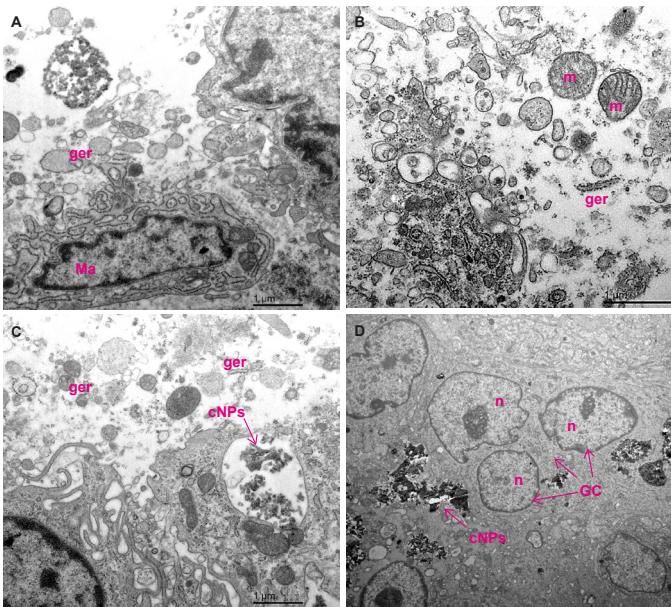
**CONCLUSIONS.** The macrophages drag the pigment towards the lymph node capsule, where the pigment remains stable over time, providing a positive marking of the sentinel node.

**FUNDING AND ACKNOWLEDGMENTS.** Supported by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) project DTS20/00131. Authors would like to acknowledge the use of Servicio General de Apoyo a la Investigación, Universidad de Zaragoza.

**RESULTS.** Nanoparticle-based labeling persisted in the nodes for up to 6 weeks. Both the free carbon and the micro and nanoparticles were not endocytosed by any of the cell types that constitute the stroma of the lymph node (lymphoblasts, B and T lymphocytes, dendritic cells, and monocytes), all the remaining free of labeling (FIG. 2A). Nor were nanoparticles observed inside lymphatic vessels. Macrophages phagocytosed the three types of particles through filopodia and lamellipodia formation (FIG.2C,D). The phagosomes present differences in size, and the type of endocytosed particle can be perfectly distinguished inside (FIG.3). In all three cases, the carbon causes the rupture of the phagolysosome membrane, spilling the lysosomal hydrolases into the cytosol, which leads to the lysis of the cell membrane with the spillage of the cellular organelles into the extracellular space (FIG.4). New macrophages are responsible for phagocytizing cell debris. A foreign body reaction occurs, sometimes observing multinucleated giant cells isolating the pigmented nanoparticles.



**FIG.2.** **A)** Linfatic ganglia, where L: linfocyte, M: monocyte, PC: plasmatic cell. **B)** Macrophage containing lisosomes. **C)** Macrophages emitting lamellipodia (L) and filopodia (f). **D)** Cytoskeleton participation (arrows: actin filaments). Detail of C.



**FIG.4.** **A-B)** Macrophage membrane rupture. Cell organelles expand into intracellular space. **C)** New macrophages phagocytize carbon again together with cellular debris. **D)** Giant cells (GC) isolate the pigment (defense against foreign body).

# Póster 2

**"Carbon and Melanin-based Nanoparticles for lymph node labeling."**

Póster Científico presentado en el Congreso Internacional de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería de Tejidos (Granada, España) en septiembre de 2022.

# Carbon and melanin based nanoparticles for lymph node labeling

Monleón E.<sup>1,2</sup>, Baselga M.<sup>2</sup>, Junquera C.<sup>1,2</sup>, Mendoza G.<sup>2</sup>, Yus C.<sup>2,3,4</sup>, Alejo T.<sup>2,3,4</sup>, and Güemes A.<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup> Department of Anatomy and Histology, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain; <sup>2</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), Zaragoza, Spain; <sup>3</sup> Department of Chemical and Environmental Engineering, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain; <sup>4</sup> Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA), CSIC-Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain; <sup>5</sup> Department of Surgery, University of Zaragoza, Spain

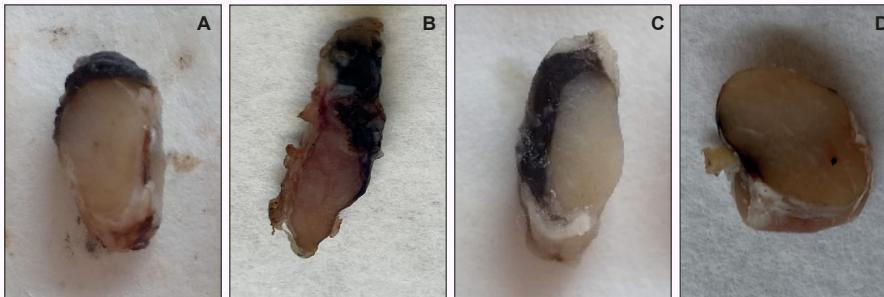
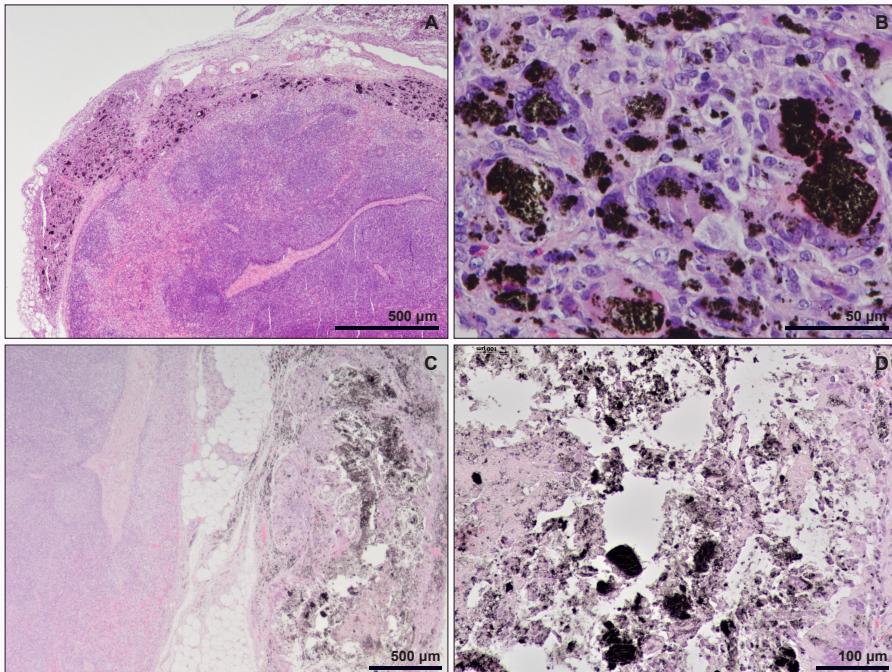


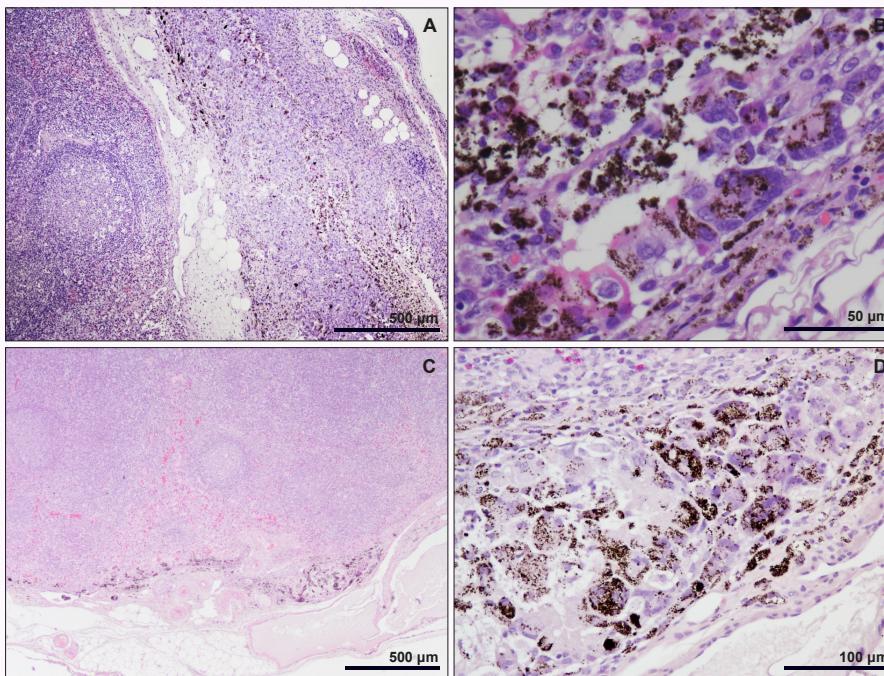
FIG.1. Labeling intensity. Carbon based NPs 1 (a) and 6 (b) weeks after inoculation. Melanin-based NPs 1 (c) and 6 (d) weeks after inoculation.

**MATERIALS AND METHODS.** As labels, poly (lactic-co-glycolic acid)-based (PLGA) particles having encapsulated carbon nanoparticles or melanin were synthesized using the simple or double emulsion-solvent evaporation techniques respectively. Similar nanoparticles size and morphology were obtained using both compounds:  $123 \pm 32$  nm in diameter for carbon and  $117 \pm 38$  nm for melanin. Carbon based NPs development is described in more detail in Baselga et al. communication. The two types of labels were inoculated into 2 or 3 mesenteric lymph nodes from 4 healthy female pigs. Animals were sacrificed at 1, 2, 3 and 6 weeks after inoculation and the mesenteric lymph nodes were collected and fixed in 10% formalin. Procedures were approved by the Animal Experimentation Ethical Commission, University of Zaragoza (permit number: PI09/20). Macroscopically, the marking intensity was subjectively scored based on the extent of labeling. After, formalin-fixed tissues were trimmed and processed according to standard histopathological procedures. Microscopically, location and morphology of the pigments and histological changes associated to them were evaluated.

**FIG.2.** Carbon based NPs 1 (A, detail in B) and 6 (C, detail in D) weeks after inoculation. Pigments are located pericapsular (A) and in the soft tissue surrounding the node (C). In both samples, abundant small granules combined with deposition of coarse clumps of pigment are observed. A foreign body reaction associated with the pigments is observed 1 and 6 weeks after inoculation (B,D). Foci of necrosis associated with foreign body reaction is observed 6 weeks after inoculation (D).



**RESULTS.** Carbon based NPs showed a high labeling intensity that was maintained throughout the study period. In the case of melanin based NPs, the intensity was high 1 week after inoculation but gradually decreased, although in all samples labeling was macroscopically visible (FIG.1). In both types of labeling, the pigments were located pericapsular or / and in the soft tissue surrounding the node (FIG.2,3). Microscopically, melanin based NPs presented a quite homogeneous morphology characterized by small granules of pigment (FIG.3). In C-NPs samples, abundant small granules combined with deposition of coarse clumps of pigment were observed (FIG.2). All samples showed a foreign body reaction associated with the pigments. Foci of necrosis associated with foreign body reaction were observed in melanin based NPs 1 week after inoculation and in carbon based NPs 6 weeks after inoculation (FIG.2,3).



**INTRODUCTION.** In breast cancer patients, labeling of the sentinel lymph node is used to facilitate its relocation at the time of biopsy after neoadjuvant therapy. There are numerous types of labels such as metallic clips, radioactive seeds or endomagnetic markers. These techniques have some drawbacks as displacement of the clips, the use of radiation or the need to access certain materials and equipment [1].

The aim of this study was to assess the lymph node marking intensity and the histological changes induced after injection of two types of labels based on carbon and melanin nanoparticles (NPs).

**DISCUSSION AND CONCLUSIONS.** The carbon and melanin based NPs shown in the present study may be an alternative approach to label lymph nodes as they can be identified macroscopically and remain in place for at least 6 weeks. These labels are relatively inexpensive, require no special equipment, and reduce the disadvantages of other techniques mentioned above. However, although carbon is believed to be nontoxic [2], we show that both carbon and melanin based NPs induce a foreign body reaction evident 1 week after injection and maintained until week 6. In the case of melanin based NPs, the tissue response was higher initially and progressively decreased, while carbon based NPs showed a lower inflammatory reaction after inoculation that progressively increased in intensity. More histological and clinical studies are needed to establish the significance of this tissue reaction.

**FIG 3.** Melanin based NPs 1 (A, detail in B) and 6 (C, detail in D) weeks after inoculation. Pigments are located in the soft tissue surrounding the node (A) and pericapsular (C). In both samples, pigment presents a quite homogeneous morphology characterized by small granules. A foreign body reaction associated with the pigments is observed 1 and 6 weeks after inoculation (B,D). Foci of necrosis associated with foreign body reaction is observed 1 weeks after inoculation (A).

## REFERENCES.

- [1] Zhang L, et al. World J Surg Oncol. 2018 Jun 19;16(1):112.
- [2] Xie P, et al. Int J Mol Sci. 2017 Nov 29;18(12):2562.



