



Centro de
Investigaciones Nucleares
Facultad de Ciencias



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR fcien.edu.uy

INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE AGENTES DE IMAGEN PARA MÚSCULO CARDÍACO

TESINA DE GRADO

LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

JOEL GONZÁLEZ

TUTORES: PROFESOR DR. *HUGO CERECETTO*; DRA. *VICTORIA CALZADA*

AGOSTO 2017

AGRADECIMIENTOS.

- *A mis tutores. Por sus conocimientos e insuperable paciencia.*
- *A mis compañeros del Área de Radiofarmacia del CIN. Por su alegría y su apoyo en todo momento.*
- *A Marcos Couto, Fernanda García y Carlos Osorio por su invaluable e incondicional apoyo y aportes a mi formación.*
- *A mi familia que amo.*
- *A mis amigos.*

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
1) INTRODUCCIÓN.....	3
1.1) IMAGENOLOGÍA MOLECULAR Y MEDICINA NUCLEAR.....	4
1.1.a) TÉCNICAS INVOLUCRADAS.....	4
Tomografía por emisión de fotón único (SPECT).....	5
Tomografía de emisión de positrones (PET).....	6
1.1.b) RADIOFÁRMACOS EN IMAGENOLOGÍA MOLECULAR.....	7
Radiofármacos.....	8
Aplicaciones de radiofármacos.....	8
Propiedades del ^{99m} Tc.....	8
Radiofármacos de ^{99m} Tc.....	11
1.1.c) ESTRATEGIAS DE MARCACIÓN CON ^{99m}Tc.....	11
Enfoque integrado.....	11
Estrategia del uso de agentes bifuncionales.....	12
Enfoque híbrido.....	12
1.1.d) EL AGENTE BIFUNCIONAL HYNIC.....	13
Grupos protectores para HYNIC.....	14
1.2) CARDIOPATÍA ISQUÉMICA.....	15
1.3) METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS Y “MEMORIA ISQUÉMICA”.....	16
1.4) ÁCIDOS GRASO Y ANÁLOGOS DE ÁCIDOS GRASOS COMO MARCADORES DE METABOLISMO ISQUÉMICO.....	18
Ácidos grasos y análogos de marcados con ^{99m} Tc.....	18
Agentes para imagen de perfusión cardíaca para SPECT.....	20
Agentes de imagen de metabolismo miocárdico para SPECT.....	21
Agentes de imagen de metabolismo miocárdico o evaluación de viabilidad para PET.....	21
2) OBJETIVOS.....	22
2.a) OBJETIVOS GENERALES.....	23
2.b) OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3) EXPERIMENTAL.....	24
3.1) METODOLOGÍA EXPERIMENTAL, GENERALIDADES.....	25

3.2) MARCACIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS ANÁLOGOS DE ÁCIDO GRASO SINTETIZADOS, METODOLOGÍA EXPERIMENTAL: GENERALIDADES	25
3.3) SÍNTESIS DE 6-AMINOHEXANOATO DE METILO (1) Y ÁCIDO 6-(TER-BUTILOXICARBONILAMINO)HEXANOICO (2)	26
3.3.a) ESTERIFICACIÓN DEL ÁCIDO 6-AMINOHEXANOICO	26
3.3.b) PROTECCIÓN DEL GRUPO AMINA DEL ÁCIDO 6-AMINOHEXANOICO	27
3.4) SÍNTESIS DE 6-(6-TER-BUTILOXICARBONILAMINOHEXILCARBONILAMINO) HEXANOATO DE METILO (3)	28
3.5) SÍNTESIS DEL AGENTE QUELANTE BIFUNCIONAL HYNIC	28
3.6) ACOPLA DEL GRUPO HYNIC	30
3.6.a) DERIVATIZACIÓN DE 6-AMINOHEXANOATO DE METILO (1) CON HYNIC (1a)	30
3.6.b) DERIVATIZACIÓN DEL COMPUESTO 3 CON HYNIC (3a)	31
3.7) PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA OBTENCIÓN DE 1c Y 3c	32
3.8) DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN O LogP	33
3.9) EVALUACIÓN BIOLÓGICA in vivo	33
4) RESULTADOS	34
4.1) SÍNTESIS DE 6-AMINOHEXANOATO DE METILO (1) Y DE 6-(6-TER-BUTILOXICARBONILAMINOHEXILCARBONILAMINO)HEXANOATO DE METILO (3)	35
4.1.a) ESTERIFICACIÓN DEL ÁCIDO 6-AMINOHEXANOICO	36
4.1.b) PROTECCIÓN DEL GRUPO AMINA DEL ÁCIDO 6-AMINOHEXANO	36
4.1.c) FORMACIÓN DEL COMPUESTO 3	37
4.2) SÍNTESIS DEL AGENTE BIFUNCIONAL HYNIC	39
4.3) ACOPLA DEL GRUPO HYNIC PARA LA FORMACIÓN DE LOS COMPUESTOS 1a y 3a	39
4.4) PREPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS 1b y 3b	39
4.5) MARCACIÓN CON ^{99m}Tc: OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS 1c Y 3c	40
4.6) COEFICIENTE DE REPARTO O Log P	41
4.7) EVALUACIÓN BIOLÓGICA in vivo: ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN	41
5) DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS	44
6) BIBLIOGRAFÍA	47

ABREVIATURAS

- AB – Agente bifuncional
- AcOEt- Acetato de etilo
- AGCL- Ácido graso de cadena larga
- ATP – Trifosfato de adenosina
- BMIPP- Ácido beta-meti-15-(*p*-iodofenil)pentadecanoico
- Boc – Grupo *t*-butoxicarbonilo
- Boc₂O – Di-*t*-butildicarbonato
- CT – Tomografía Computada
- DCC- Diciclohexilcarbodiimida
- DCU – Diciclohexilurea
- DMF – Dimetilformamida
- EDDA – Ácido etilendiaminodiacético
- EI-EM – Espectrometría de masas de impacto electrónico
- EP – Éter de petróleo (fracción 60-70 °C)
- Et₂O – Éter dietílico
- Et₃N –Trietilamina
- FDA – Food and Drug Administration
- FDG – Fluorodesoxiglucosa
- HDA – Ácido hexadecanoico
- HPLC – Cromatografía líquida de alta resolución
- HYNIC- Agrupamiento 6-hidrazinilnicotilo
- IPPA – Ácido 15-(*p*-iodofenil)pentadecanoico
- MeOH – Metanol
- MS – espectrometría de masas
- NHS – *N*-hidroxisuccinimida
- PET – Tomografía de emisión de positrones
- RMN – Resonancia magnética nuclear
- SPECT- Tomografía por emisión de fotón único

- Succ – Grupo succinimidilo
- TFA – Ácido trifluoroacético
- THF – Tetrahidrofurano
- TLC – Cromatografía en capa fina
- UV – Radiación ultravioleta

RESUMEN

Objetivo: Identificar complejos ^{99m}Tc análogos de ácidos grasos que se utilizarán como agentes de imagen del miocardio, permitiendo el estudio de anomalías cardíacas en pacientes de alto riesgo. La subestructura mimética de ácidos grasos diseñada incluye un grupo amida que, entre otras propiedades, podría mejorar el tiempo de retención miocárdica.

Materiales y métodos: A partir de una síntesis orgánica convergente se preparó una diamida con una longitud de cadena de 15 átomos y portando el quelante bifuncional 6 - hidrazinonicotinil (HYNIC) y se marcó radioactivamente con ^{99m}Tc usando tricina como coligante único. La prueba in vivo del concepto se realizó utilizando ratones sanos.

Resultados: Se preparó el complejo ^{99m}Tc deseado, junto con un análogo con una cadena de carbono corta, con pureza radioquímica adecuada. Las lipofilias estaban de acuerdo con la longitud de las cadenas. Aunque ambos complejos de ^{99m}Tc mostraron captación en el músculo miocárdico, el radiofármaco diseñado posee una buena captación y retención en el órgano blanco en comparación con otros complejos descritos en la bibliografía.

Conclusión: Los resultados merecen más estudios que implican ensayos de imagen, modificaciones sintéticas y ensayo de nuevos coligandos para ^{99m}Tc -HYNIC complejos.

1) INTRODUCCIÓN

1.1) IMAGENOLGÍA MOLECULAR Y MEDICINA NUCLEAR

La imagenología molecular se define como la representación visual, caracterización y cuantificación de los procesos biológicos a nivel celular y molecular en los seres vivos, combinando técnicas de imagen mínimamente invasivas, con herramientas de biología molecular/celular básica, química, medicina, farmacología, física médica, biomatemática y bioinformática^{1,2}. Es un campo multidisciplinario, en el cual las imágenes producidas reflejan las rutas celulares y metabólicas y los mecanismos *in vivo* de las enfermedades presentes dentro del contexto del microambiente fisiológico.

Las aplicaciones las cuales incluyen a los organismos *in vivo* son: **(a)** la visualización de los mecanismos de expresión y entrega genética; **(b)** la evaluación de los procesos celulares; **(c)** el desarrollo de nuevas técnicas de imagen; **(d)** la facilitación para el desarrollo de nuevas drogas y **(e)** el diseño de nuevos métodos para el monitoreo terapéutico y visualización de diferentes mecanismos moleculares.

Convencionalmente, la imagenología se basaba en una visualización estructural y anatómica. Más adelante, avances en Biología Molecular, Medicina Nuclear y Radiofarmacia, entre otras disciplinas, hicieron posible visualizar procesos celulares y bioquímicos surgiendo la imagenología molecular.

1.1.a) TÉCNICAS INVOLUCRADAS

Entre las técnicas imagenológicas aplicadas en medicina nuclear encontramos a la centellografía, la tomografía de emisión de positrones (en inglés, Positron Emission Tomography, PET) y la tomografía por emisión de fotón único (en inglés, Single Photon Emission Computer Tomography, SPECT). Todas estas modalidades han tenido una significativa contribución a la imagenología molecular^{3,4}.

Estos sistemas son modalidades de imagen que utilizan moléculas marcadas radioactivamente, lo que quiere decir que se incluyen radionucleidos en su estructura. Tras su administración y luego de su distribución en el organismo y las imágenes serán formadas por detección externa de la emisión gamma.

Actualmente, la imagenología molecular tiende a la fusión de técnicas como la tomografía computada (CT) y la resonancia magnética nuclear (RMN), junto con PET y SPECT, combinando la información funcional con la anatómica para lograr obtener una información estructural más detallada^{5,6,7}.

Dentro de las técnicas que utilizan la radiación electromagnética se pueden diferenciar: **(1)** las que utilizan la radiación electromagnética no ionizante como la RMN; y **(2)** las que utilizan las radiaciones ionizantes, que incluyen la CT, los rayos X, radiaciones gamma en centellografía, SPECT y PET.

Todos estos sistemas se diferencian en sus propiedades físicas, su sensibilidad y resolución temporal y espacial. Las técnicas RMN y CT poseen una mayor resolución comparada con la centellografía, pero requieren de una administración de mayor cantidad de material para poder alcanzar un adecuado contraste de la imagen (miligramos en RMN y gramos en CT). Dicha concentración elevada de material tiene el inconveniente de que podría llegar a alterar la biodistribución normal del agente como también podría aumentar el riesgo de reacciones adversas.

La técnica de localización visual más utilizada en Medicina Nuclear es la denominada "técnica centellográfica", la cual está fundamentada en la interacción de los tejidos y fluidos con la radiación

electromagnética, suministrando así la información como imágenes bidimensionales. Ha sido muy utilizada para demostrar una amplia variedad de procesos fisiológicos, los que incluyen cambios en los niveles de glucosa, proteínas, etc; así como también cambios en la expresión de ciertos genes y en la detección de algunos receptores para determinadas señales celulares. A su vez, la centellografía gamma posee la característica de ser del tipo cuantitativo, debido a que recoge cada centelleo y lo escanea en una matriz de imagen, la cual será representada en una imagen visualizable, pudiendo así captar la imagen localizada de todo el organismo. El tiempo requerido para obtener este tipo de imágenes oscila dentro de los 2 segundos a los 20 minutos, dependiendo ya sea, del proceso al cual se toma la imagen y de la actividad del radionucleido administrado.

TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE FOTÓN ÚNICO (SPECT)

La gamma cámara es un dispositivo de captura de imágenes que consta de un equipo de detección de la radiación gamma. En esta técnica, luego de la administración al paciente de un radionucleido emisor gamma puro (por ejemplo, ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{123}I y ^{125}I), una o varias gamma cámaras rotan alrededor del paciente para obtener y reconstruir los datos obtenidos por la emisión de un fotón único en forma de rayos gamma, produciendo una imagen en forma de cortes que puede ser presentada en cualquier plano incluyendo en 3D. En la figura 1 se muestra un esquema del proceso de adquisición de una imagen SPECT y en la figura 2 se muestran los sistemas híbridos SPECT-CT utilizados para humanos y pequeños animales.

La SPECT es una técnica poderosa que se ha usado para obtener la imagen molecular de varios procesos moleculares y celulares ^{9, 10, 11}.

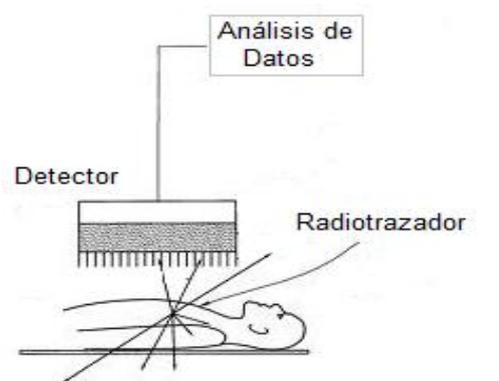


Figura 1. Esquema del proceso de adquisición de una imagen SPECT.



Figura 2. (Derecha) Sistema híbrido SPECT-CT de humanos. (Fuente: Hicks RJ; Lau EWF; Binns DS. Hybrid imaging is the future of molecular imaging. *Biomed Imaging Interv J.* 2007; 3(3):e49). (Izquierda) Sistema híbrido SPECT-CT para pequeños animales-Triumph Trimodality scanner (Fuente: Khalil MM; Tremoleda JL; Bayomy TB; Gsell W. Molecular SPECT Imaging: An Overview. *Int Journal of Mol Imaging.* 2011. DOI:10.1155/2011/796025).

TOMOGRAFÍA DE EMISIÓN DE POSITRONES (PET)

Esta técnica explora procesos moleculares y el metabolismo tisular mediante la inyección endovenosa de un radionucleido emisor de positrones, los que por aniquilación producen 2 fotones en direcciones opuestas de 511 keV, que luego serán rastreados por los detectores fotosensibles del equipo PET.

El radionucleido más empleado en la PET es el ^{18}F con el cual se marca la glucosa (fluordesoxiglucosa, FDG). Además del ^{18}F también se pueden producir otros nucleidos emisores de positrones como el ^{13}N , ^{15}O y ^{11}C , que tienen una vida media más corta que el ^{18}F y ello dificulta su manejo y aplicación clínica.

Tiene aplicaciones en oncología, en los procesos inflamatorios e infecciosos, en la cardiología, en neurología y psiquiatría se utiliza en investigación sobre el cerebro y en el estudio del mapa de las funciones cerebrales. Pre-clínicamente ha sido particularmente útil en el monitoreo de la expresión de receptores extracelulares y la eficacia de vectores de terapia genética [12](#), [13](#), [14](#).

En la figura 3 se muestra el esquema del proceso de adquisición de una imagen PET y en la figura 4 se muestran los sistemas híbridos PET-CT utilizados para humanos y pequeños animales.

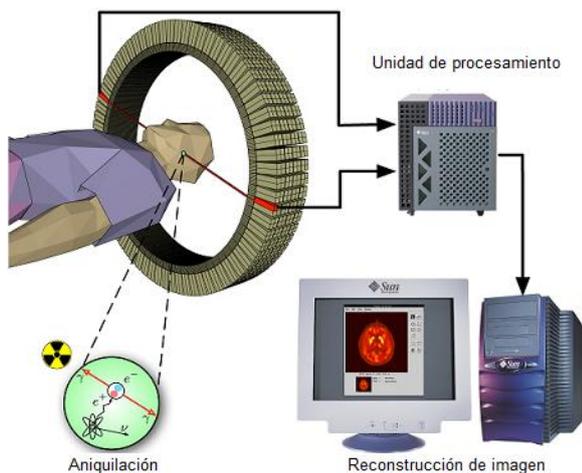


Figura 3. Esquema del proceso de adquisición de una imagen PET (Fuente: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PET-schema.png>)



Figura 4. (Derecha) Sistema híbrido PET-CT para humanos (Fuente: <http://madrid-oncologia.quiron.es/index.php/es/tomografia-por-emision-de-positrones>). (Izquierda) Sistema híbrido PET-CT para pequeños animales. (Fuente: Borrajo-Sánchez J; Cabrero-Fraile FJ. Positron emission tomography (PET): fundamentals and technological limitations. ARCH SOC ESP OFTALMOL. 2010; 85(4):129-130)

1.1.b) RADIOFÁRMACOS EN IMAGENOLÓGÍA MOLECULAR

Con la aparición del nuevo campo de la imagenología molecular, existe una elevada demanda para el desarrollo de nuevos agentes de imagen que sean sensibles y específicos. Para lograr este objetivo, es esencial el desarrollo de agentes de imagen que sean sumamente específicos.

Las técnicas de imagen SPECT y PET poseen la habilidad para detectar y monitorear en forma seriada y no invasiva una variedad de procesos biológicos y fisiopatológicos, en general en cantidades de un radiotrazador peptídico, proteico u otras moléculas, a dosis libres de efectos farmacológicos ¹⁴.

RADIOFÁRMACOS

Un radiotrazador es una sustancia química definida que contiene en su composición al menos un átomo radioactivo el cual permite su detección y medición. Este compuesto se debe comportar de forma idéntica al compuesto de interés.

Un radiofármaco es un radiotrazador, que por su forma farmacéutica y tipo de radiación es adecuado para ser administrado a seres humanos con fines terapéuticos y/o de diagnóstico ¹⁵. Todos los radiofármacos son administrados por vía intravenosa.

APLICACIONES DE RADIOFÁRMACOS

Según sus aplicaciones médicas, los radiofármacos se pueden clasificar en dos clases: de terapia o de diagnóstico. Los radiofármacos de diagnóstico utilizados en centellografía gamma (SPECT) contienen radionucleidos que emiten radiación gamma en un rango de energía de entre 30 y 300 keV. En el caso de los radiofármacos utilizados para la técnica de PET, los radionucleidos son emisores de positrones como son ¹⁸F, ¹¹C y ¹⁵O como ejemplos.

Para evitar efectos farmacológicos, y dada la alta sensibilidad de las técnicas de detección de radionucleidos, por lo general los radiofármacos de diagnóstico se administran en muy bajas concentraciones (10^{-8} a 10^{-6} M).

Los radiofármacos de diagnóstico, al complementarse con CT y RMN, tienen como fin obtener de forma no invasiva la descripción detallada y morfología de órganos y de tejidos así como una visión de sus funciones fisiológicas. Requieren una pureza radioquímica superior al 90 %, ya que al administrar una mezcla de distintas especies del radionucleido puede afectar negativamente la captación del órgano blanco y aumentar la captación e irradiación de órganos no blanco ¹⁶.

Algunos radiofármacos de diagnóstico son complejos metálicos. Entre los metales más utilizados se encuentra el ^{99m}Tc, el más ampliamente utilizado en medicina nuclear (cerca del 80 % de los radiofármacos de diagnóstico portan este radionucleido).

Por otro lado, existen también radiofármacos de diagnóstico que incorporan nucleidos radioactivos no metálicos como ¹⁸F o ¹²⁵I ^{16,17}.

PROPIEDADES DEL ^{99m}Tc

La elección del radionucleido a utilizar depende en gran medida de sus propiedades físicas y nucleares, así como de su disponibilidad y costos. Esto hace del ^{99m}Tc un buen candidato ya que presenta un período de semidesintegración ($t_{1/2}$) de 6,01 h, el cual es un tiempo óptimo para la preparación del radiofármaco, la administración al paciente y la toma de imágenes. Es un radionucleido que decae por transición isomérica mediante la emisión de un fotón gamma de 142 keV al radionucleido ⁹⁹Tc ($t_{1/2} = 2,5 \times 10^5$ años) ¹⁸. El Tc, el elemento número 43 de la tabla periódica, es un metal de la segunda serie de transición perteneciente al grupo 7B ^{19, 20}. Se encuentra ubicado entre el Mn (primera serie) y el Re (tercera serie), presentando propiedades fisicoquímicas comunes a estos en especial el Re (como resultado de la contracción lantánida).

El ^{99m}Tc es el radionucleido más utilizado en medicina nuclear en Uruguay y en el mundo.

Su configuración electrónica, en estado basal neutro, es $[\text{Kr}]4d^65s^1$, lo que indica que los orbitales $4d$ y $5s$ contribuyen para que existan varios estados de oxidación cuyos valores pueden variar entre -1 y $+7$, siendo los estados $+7$ (TcO_4^-) y $+4$ (TcO_2) los más estables. Puede poseer un índice de coordinación entre 4 y 9 .

En estado acuoso el ^{99m}Tc se encuentra como anión pertecneiato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) el cual es la forma más estable ¹⁷.

El ^{99m}Tc es producto del decaimiento β^- del ^{99}Mo ($t_{1/2} = 66$ h) y es obtenido a través de un generador. Un generador ^{99}Mo - ^{99m}Tc se basa en la adsorción del radionucleido ^{99}Mo en una columna de alúmina. El ^{99}Mo adsorbido y no soluble en agua decae a ^{99m}Tc , el cual en su forma $^{99m}\text{TcO}_4^-$ es soluble en agua, y se obtiene por elución de la columna de alúmina utilizando, generalmente para fines farmacéuticos, en una disolución salina estéril y apirógena. El eluido, en la forma de $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ representa el mayor estado de oxidación (VII) del Tc y de esta forma se logra la disponibilidad de ^{99m}Tc en una disolución estéril, apirógena y libre de portador (figura 5) ²¹.

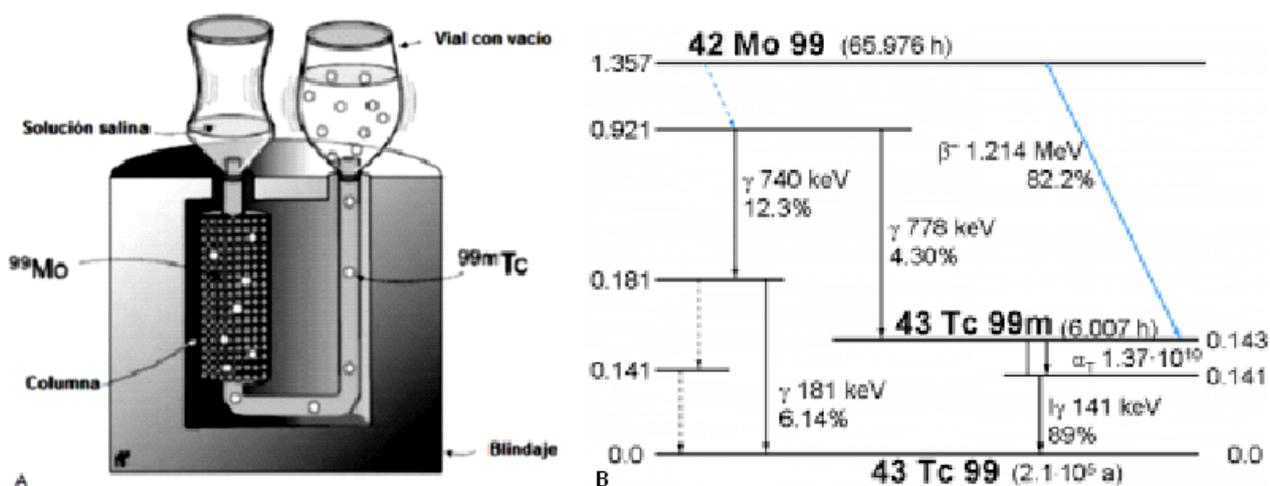


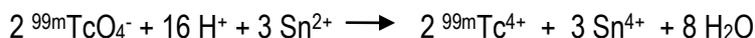
Figura 5. A) Generador ^{99}Mo - ^{99m}Tc . B) Esquema de decaimiento del ^{99}Mo .

La obtención de ^{99m}Tc a través de un generador, a diferencia de otros radionucleidos, permite la disponibilidad permanente y a bajo costo en cualquier servicio de Medicina Nuclear.

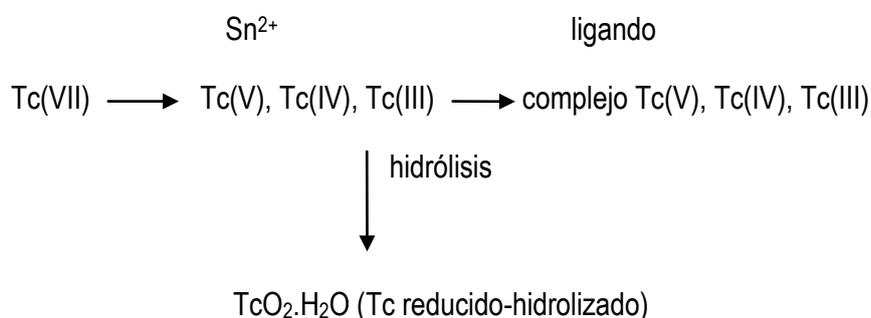
Sin embargo, debido a la estabilidad y poca reactividad del anión pertecneiato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) no puede ser quelado o añadido a otra molécula directamente por lo cual es necesaria su transformación, en general reducción del metal a un estado de oxidación menor, para aumentar su reactividad química con agentes reductores adecuados ¹⁷.

A bajos estados de oxidación el ^{99m}Tc se puede unir a un gran número de moléculas orgánicas como inorgánicas formando compuestos de coordinación. Estos estados reducidos de Tc se obtienen por tratamiento del pertecneiato con una variedad de agentes reductores, como HCl concentrado, ácido ascórbico, Sn^{2+} , etc. Siendo el ión estannoso (Sn^{2+}) en disolución acuosa el más utilizado en la producción de radiofármacos con ^{99m}Tc . El Sn^{2+} presenta baja toxicidad y buen poder reductor con buenos rendimientos de marcación. Este ión puede ser usado en forma de cloruro, fluoruro, citrato o tartrato.

La reducción del anión TcO_4^- con Sn^{2+} es la siguiente:



Siendo esta reacción reversible y se debe agregar un agente complejante para que quede en disolución el Tc con estado de oxidación reducido. Luego de la reducción puede coexistir en disolución una mezcla de Tc(III), Tc(IV) y Tc(V), dependiendo de las condiciones en la que se realizó la reacción: en disoluciones con un pH inferior a 1,2 predomina la especie TcO_2^- ; con pH con valores entre 1,5 y 2,0 la especie mayoritaria es $\text{TcO}(\text{OH})^+$, con valores mayores a 2,0 se obtiene la forma neutra TcO_2 .



Las especies hidrolizadas de Tc, como el dióxido de tecnecio hidratado, pueden disminuir el rendimiento del marcado además de interferir en el diagnóstico. Por esto se puede decir que en el preparado final pueden coexistir tres especies radioactivas: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ libre bajo la forma de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ que no se redujo por el agente reductor, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ reducido que no reaccionó con el agente quelante y se encuentra en forma de $^{99\text{m}}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; finalmente, el compuesto de interés con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ complejado ²².

RADIOFÁRMACOS DE $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Gracias a los diferentes estados de oxidación del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se hace posible la formación de complejos que presentan variadas características. Estos complejos se los puede clasificar como radiofármacos de primera, segunda y tercera generación.

Radiofármacos de primera generación:

Son aquellos donde el ^{99m}Tc cumple únicamente la función de radiotrazador, su biodistribución normal no se altera por la adición del radionucleido, por lo que el ^{99m}Tc tiene la función de monitorizar externamente la biodistribución del fármaco.

Estos fármacos sirven para lograr determinar funciones básicas e inespecíficas. Consisten en formulaciones de viales estériles y liofilizados que contiene SnCl_2 como agente reductor y que son reconstituidos mediante el agregado de pertecneiato.

Radiofármacos de segunda generación:

Esta generación de radiofármacos surge de la necesidad de formar complejos de tecnecio en los cuales la biodistribución y captación en el blanco dependan exclusivamente de su lipofilicidad, tamaño y carga. Son compuestos que se diseñan teniendo en cuenta el conocimiento de la química del tecnecio y la relación estructura-actividad, para optimizar la captación en el tejido blanco. En esta generación se encuentran radiofármacos de perfusión cerebral y cardíaca.

Radiofármacos de tercera generación:

Consiste en la marcación de moléculas y biomoléculas con una actividad biológica específica. En este caso la capacidad de unirse al blanco de estas moléculas puede afectarse por la formación del complejo de tecnecio. Por esto, para una unión óptima se debe controlar aspectos como la longitud del conector (*linker*), sitio de acción, tamaño, carga, lipofilicidad del conjugado, etc.

1.1.c) ESTRATEGIAS DE MARCACIÓN CON ^{99m}Tc .

Para dirigir específicamente un fármaco a su blanco molecular se han desarrollado distintas estrategias o enfoques que permiten la incorporación de ^{99m}Tc a biomoléculas.

ENFOQUE INTEGRADO.

Consiste en la adición de un quelante no natural, produciendo así alteraciones mínimas en el tamaño, conformación y afinidad por el receptor ¹⁵.

La desventaja de este enfoque es que ha llevado a la producción de ligandos con menor afinidad, probablemente el reemplazo de enlaces C-C por enlaces con heteroátomos como -S,-O, -N, influye en el tamaño y conformación, lo que conlleva a una disminución de la afinidad ⁵¹.

ESTRATEGIA DEL USO DE AGENTES BIFUNCIONALES (AB).

Esta estrategia está basada en la utilización de una molécula con afinidad por un receptor blanco y un AB capaz de unirse covalentemente a la molécula y al mismo tiempo coordinar el metal. El AB, opcionalmente, puede estar unido a la molécula a través de un espaciador para preservar el sitio bioactivo o para modificar propiedades farmacocinéticas (figura 6). La molécula con afinidad (o molécula vector) por el blanco puede ser una proteína, péptido, molécula pequeña, etc. La elección del AB está determinada por el radiometal y su estado de oxidación.

Esta estrategia es actualmente una de las más utilizadas ya que permite conservar la afinidad de la molécula vector y la elección adecuada del AB dependiendo de la naturaleza del radiometal ^{16, 22}.

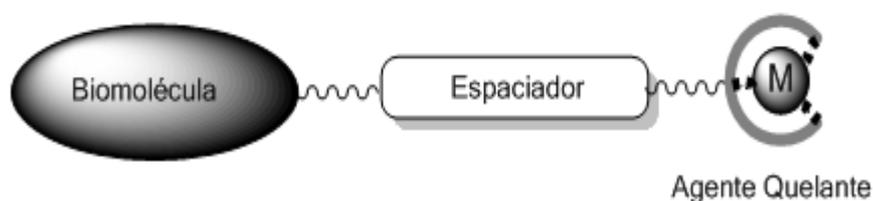


Figura 6. Estrategia de uso de Agentes Quelantes Bifuncionales (AQB). . (Adaptado de S. Liu. 2003)

ENFOQUE HÍBRIDO.

Un ejemplo de este enfoque consiste en la coordinación del radiometal mediante la secuencia de tres aminoácidos, (Gly-Gly-Gly, ó Cys-Gly-Gly ó Cys-Gly-Cys) con átomos donadores de electrones. Esta secuencia puede ser parte de una estructura lineal o cíclica (figura 7) ²³.

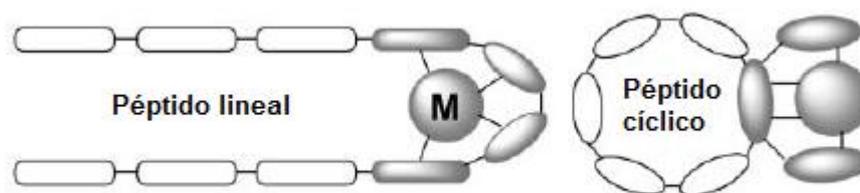


Figura 7. Representación del enfoque híbrido de marcación. . (Adaptado de S. Liu. 2003)

1.1.d) EL AGENTE BIFUNCIONAL HYNIC.

El agrupamiento 6-hidrazinilnicotilo (HYNIC), un derivado del heterocíclico piridina, es un AB ampliamente utilizado y ha sido conjugado a distintas biomoléculas para el desarrollo de radiofármacos de ^{99m}Tc (figura 8).

Los primeros en describir la síntesis y la evaluación *in vivo* de bioconjugados de HYNIC fueron Abrams y colaboradores en 1990. Desde entonces ha sido exitosamente utilizado para el marcado radioactivo de biomoléculas como anticuerpos y pequeñas biomoléculas como péptidos y oligonucleótidos ^{23-31, 52}.

La conjugación de HYNIC a biomoléculas puede darse mediante la formación de un enlace amida a raíz de la reacción del éster activado del HYNIC, en general como succinimidilo (Succ-HYNIC, figura 8), con una amina presente en la biomolécula.

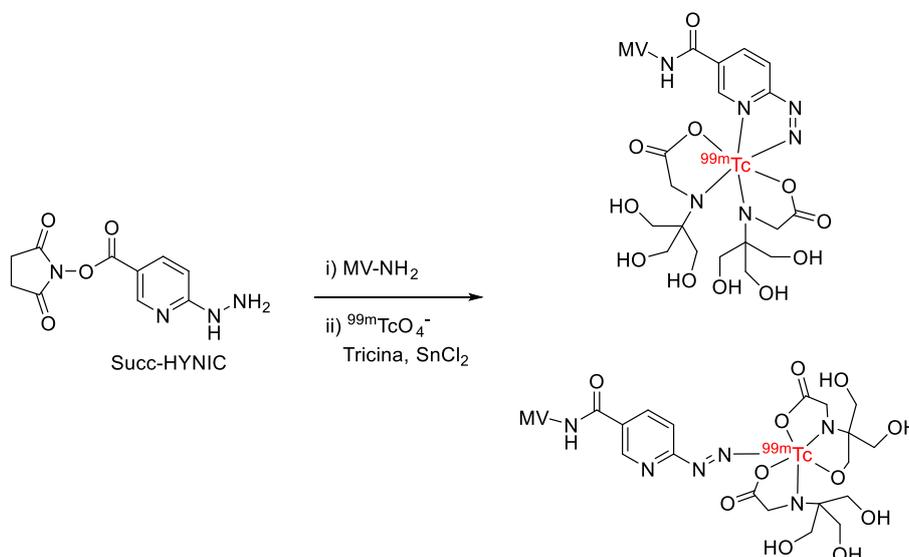


Figura 8. Uso de HYNIC como AB. Representación de las estructuras propuestas para los radioconjugados formados utilizando tricina como coligando. (MV: Molecula Vector)

HYNIC puede coordinar al metal por el átomo de nitrógeno del anillo de piridina y por el nitrógeno del grupo hidracino, o por ambos, pero para completar la esfera de coordinación del tecnecio se requiere del uso de co-ligandos como la tricina (ver ejemplo en figura 8).

La elección del coligando permite modular propiedades como la hidrofiliicidad y farmacocinética del compuesto ³². El uso de distinto co-ligandos posee la ventaja de permitir una gran versatilidad de los complejos diseñados, pero corre con la desventaja de generar incertidumbre para determinar la constitución de la esfera de coordinación para el tecnecio y como optimizar los complejos y posibles impurezas radioquímicas en la preparación.

El HYNIC no es un quelante por sí solo sino que es necesario el uso de un co-ligando para completar la esfera de coordinación. La tricina es de los co-ligandos más utilizados, es un ligando bidentado en un sistema de ligandos binarios siendo uno de los más favorables para la reducción y coordinación con el tecnecio. Sin embargo se observa que tiene una estabilidad baja en disoluciones diluidas y genera varios complejos con el tecnecio. Por otro lado el uso del co-ligando ácido etilendiaminodiacético (EDDA) (figura 9) genera menor cantidad de complejos con mayor estabilidad, pero tiene una menor eficiencia de marcación ^{33, 34}.

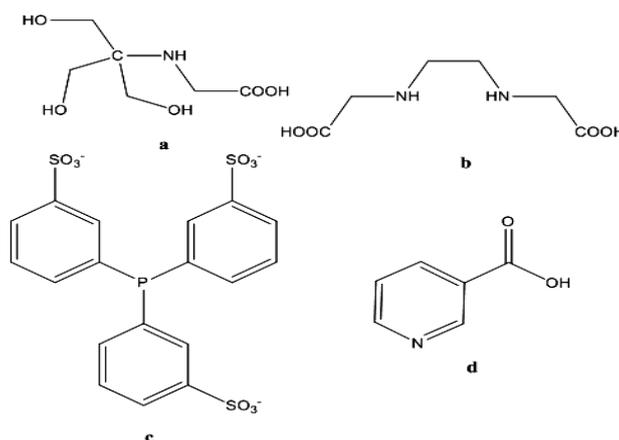


Figura 9. Co-ligandos más utilizados para la marcación de HYNIC con ^{99m}Tc: a) Tricina; b) EDDA; c) derivado hidrosoluble de trifenilfosfina; d) ácido nicotínico. (Fuente: Liu, Shang, 2005).

GRUPOS PROTECTORES PARA HYNIC.

El grupo hidracino libre, presente en derivados de HYNIC como en conjugados HYNIC-biomolécula tiene una alta susceptibilidad a dar reacciones de oxidación por acción de la luz. Debido a este tipo de reacciones, las cuales pueden provocar la descomposición del agente bifuncional, este debe ser almacenado a bajas temperaturas, protegido de la luz y preferentemente bajo la forma de una sal (generalmente como clorhidrato o trifluoroacetato). Además, la elevada nucleofilia del grupo hidracino libre puede dar reacciones con grupos electrófilos. Por ejemplo, puede reaccionar con aldehídos y cetonas presentes en muchos materiales plásticos y en el caso del derivado Succ-HYNIC, el cual presenta un agrupamiento éster activado en su estructura, puede reaccionar consigo mismo conduciendo a reacciones de polimerización.

Por este motivo, es de vital importancia el uso de derivados de HYNIC que presenten el grupo hidracino protegido evitando de esta forma la interferencia del grupo hidracino durante la conjugación y permitiendo una protección contra la oxidación y el bloqueo del mismo por formación de, por ejemplo, una hidrazona debido a la presencia de aldehídos contaminantes.

Este tipo de reacciones no deseadas puede hacer muy difícil mantener la pureza y estabilidad del complejo HYNIC-biomolécula durante el proceso de síntesis. Para prevenir la descomposición o degradación del conjugado se han logrado sintetizar diferentes derivados de HYNIC los cuales presentan al grupo hidracino adecuadamente protegido. Los principales grupos protectores utilizados son el *t*-butoxicarbonil (Boc)³⁴, trifluorometilcarbonil (TFA) y agrupamientos hidrazona ³⁶ (figura 10). En este sentido, la formación de hidrazonas, en los conjugados HYNIC-biomolécula, tiene como ventaja que su formación puede darse eficientemente en un medio anhidro y posteriormente durante el proceso de radiomarcado en medio acuoso se lleva a cabo la desprotección y formación del complejo con ^{99m}Tc vía hidracino libre en un solo paso ⁵⁴. El rendimiento de la formación del complejo entre el ^{99m}Tc con el agente bifuncional y co-ligando depende ampliamente de la cinética de la hidrólisis de la hidrazona, así como de la concentración total del conjugado de HYNIC-biomolécula en la mezcla de reacción. Cuanto mayor sea el grado de hidrólisis de la hidrazona, mayor será el número de grupos hidracino libres disponibles para coordinarse al ^{99m}Tc, por tanto aumentará

el rendimiento de marcado del complejo formado con ^{99m}Tc . Sin embargo, la hidrólisis no necesita ser completa, dado que generalmente hay varios equivalentes del conjugado biomolécula-HYNIC-hidrazona en exceso por equivalente de tecnecio en la reacción.

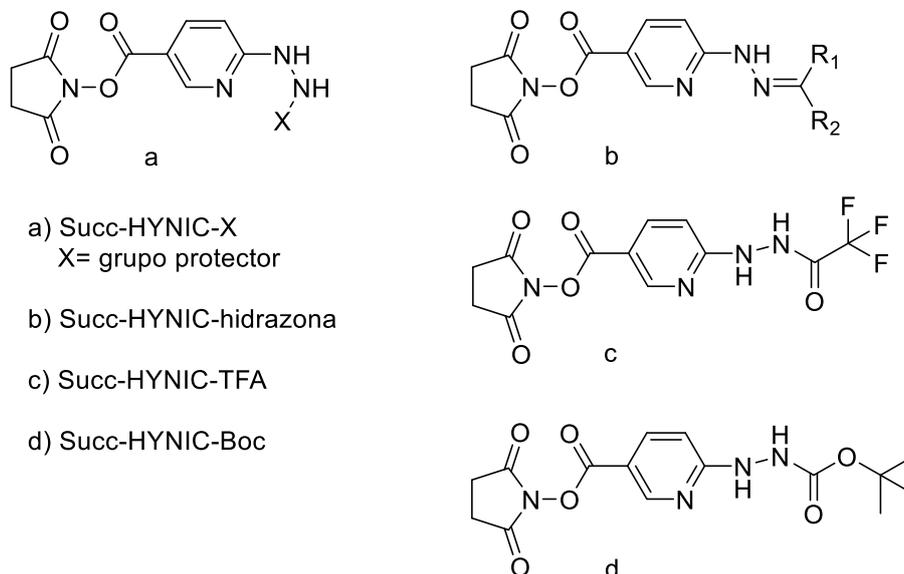


Figura 10. Diferentes grupos protectores para el AB HYNIC.

1.2) CARDIOPATÍA ISQUÉMICA

La cardiopatía isquémica o isquemia cardíaca es el tipo más común de enfermedad cardíaca. Se produce cuando se reduce el flujo sanguíneo al músculo cardíaco por un bloqueo parcial o total de las arterias coronarias lo que lleva a una disminución del suministro de oxígeno y nutrientes a las células del músculo cardíaco afectando el metabolismo del miocito. Un ejemplo de esta obstrucción es la formación de una placa de ateroma en arterias, aunque otros factores como trombosis “espontánea”; vasoespasmo coronario; inflamación; disfunción microvascular; disfunción endotelial y angiogénesis pueden ser capaces de generar cardiopatía isquémica (figura 11) ^{37, 38}.



Figura 11. El "Sistema Solar" de la Enfermedad Isquémica Cardíaca. (de Marzilli et al., 2012). Se muestran las causas que individualmente o combinadas pueden causar isquemia cardíaca.

1.3) METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS Y "MEMORIA ISQUÉMICA"

Condiciones de isquemia en las que el flujo sanguíneo coronario se ve reducido, con un suministro disminuido de oxígeno, ácidos grasos y otras fuentes de energía, causan un cambio en el metabolismo de la oxidación aeróbica de ácidos grasos a la oxidación anaeróbica de glucosa. En el caso de que haya una situación de isquemia transitoria, al restaurarse el flujo sanguíneo el daño a la célula puede ser revertido. Pero a pesar de esta restauración de flujo persiste una disminución del metabolismo de ácidos grasos, a este fenómeno se lo llama *memoria isquémica*. El uso de ácidos grasos como trazadores puede elucidar esta alteración metabólica sin la necesidad de un examen de estrés.

Bajo condiciones de normoxia, el miocardio preferentemente oxida ácidos grasos de cadena larga (AGCL) para generar ATP y satisfacer del 60 % al 90 % de sus demandas energéticas ³⁹. Los ácidos grasos atraviesan la membrana plasmática o el sarcolema a través de difusión pasiva y/o por transporte facilitado gracias a la proteína integral de membrana CD36 y sus proteínas asociadas (figura 12). Una vez en el citoplasma, los ácidos grasos se activan por la Acetil-CoA sintetasa para formar un tioéster más reactivo en un proceso dependiente de ATP ⁴⁰. Las fracciones de ácidos grasos que son sometidos a la β -oxidación en la mitocondria o peroxisomas, dan como resultado la producción de acetil-CoA, la cual entra en la matriz mitocondrial para ser parte del ciclo de Krebs y de la cadena respiratoria del espacio intermembrana de la mitocondria, resultando en la formación de ATP en presencia de oxígeno.

La mayor parte de los derivados de acetil-CoA son metabolizados por β -oxidación, mientras la fracción remanente de estos derivados es almacenada en el *pool* lipídico celular conformado principalmente por fosfolípidos y triacilgliceroles. La rapidez con que se da la oxidación de ácidos grasos está determinada en un principio por el suministro de ácidos grasos por la sangre, la disponibilidad de ATP en el cardiomiocito, el estado redox de la mitocondria, y la disponibilidad de CoA tanto en el compartimento mitocondrial como en el espacio citosólico ⁴².

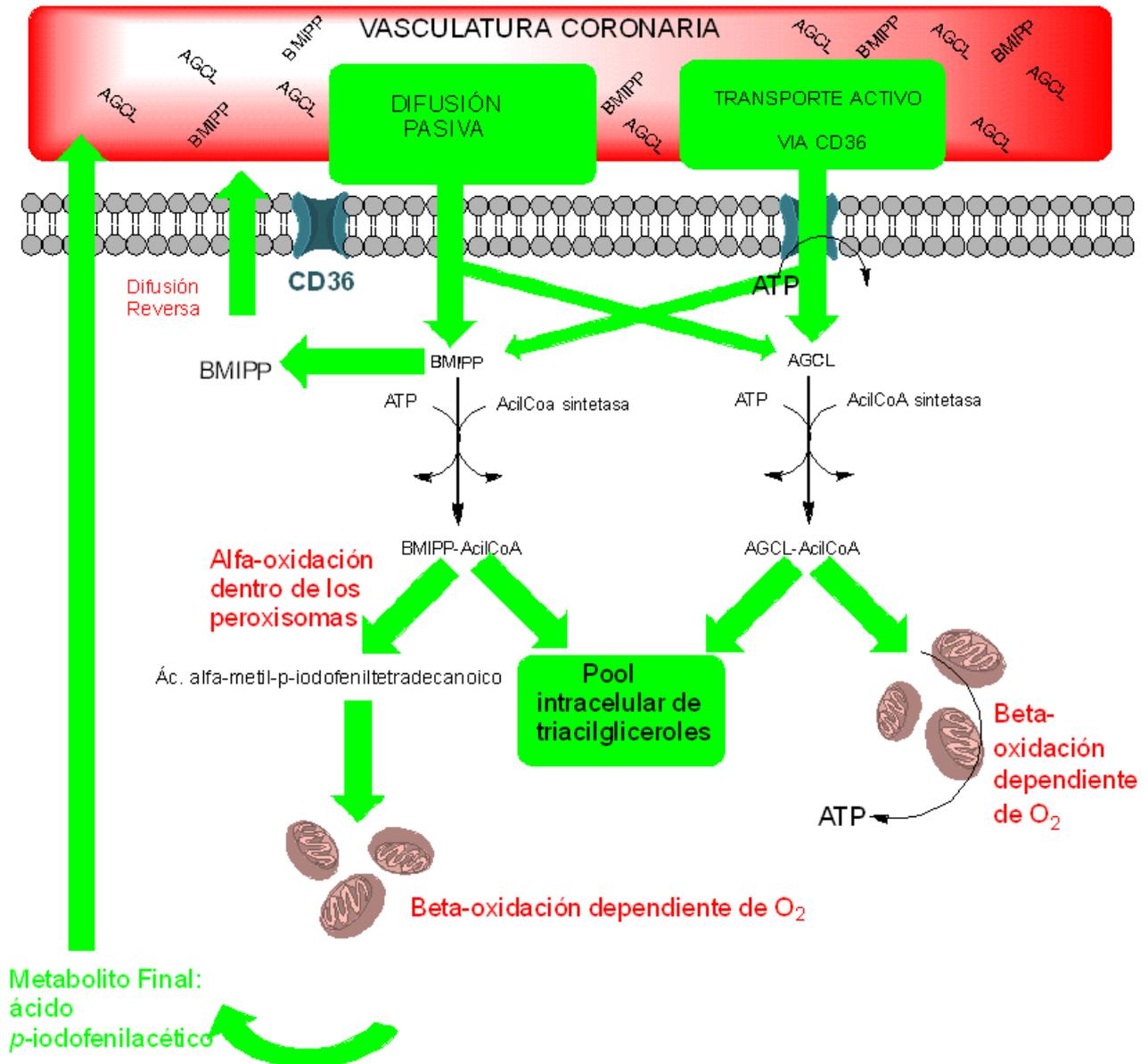


Figura 12. Representación esquemática de las rutas metabólicas de los ácidos grasos dentro del cardiomiocito. Se hace una comparación de un ácido graso de cadena larga (AGCL) y el radiofármaco BMIPP. Tanto el BMIPP como los AGCL pueden internalizarse en el miocito tanto por el transportador CD36 o por difusión pasiva.

Dentro del cardiomiocito isquémico la oxidación de ácidos grasos se ve disminuida y supeditada a la dependencia de oxígeno de este proceso, y a la activación del ácido graso-CoA inicial dependiente de ATP. En cambio, el metabolismo oxidativo de carbohidratos se vuelve la principal fuente de energía para el cardiomiocito ⁴¹. Además, durante la fase aguda de isquemia, existe un incremento del pool intracelular de triglicéridos así como un exceso de ácidos grasos libres e intermedios lipídicos producidos durante la isquemia que pueden producir más efectos adversos en el cardiomiocito afectado. Para prevenir estos eventos, el *pool* lipídico en el miocito se expande, y lo hace de una forma proporcional al grado de isquemia miocárdica. Aún más, los ácidos grasos libres incorporados al *pool* lipídico son retenidos a medida que se reduce la oxidación de estos debido a la disponibilidad disminuida de ATP y O₂. El deterioro de la oxidación lipídica, y su consecuente retención de ácidos grasos de cadena larga en el *pool* lipídico intracelular debido

a la isquemia, continúa después de que el flujo sanguíneo es restaurado, contribuyendo así al fenómeno de *memoria isquémica* ⁴³.

1.4) ÁCIDOS GRASOS Y ANÁLOGOS DE ÁCIDOS GRASOS COMO MARCADORES DE METABOLISMO ISQUÉMICO.

Dadas estas alteraciones metabólicas hasta ahora mencionadas, es de entender por qué ácidos grasos y moléculas estructuralmente relacionados con ácidos grasos han sido utilizados como trazadores para diagnosticar isquemia cardíaca tanto en técnicas PET como SPECT. La formación de imágenes PET con el ácido 1-¹¹C-palmítico (figura 13), el cual refleja los ácidos grasos endógenos, es considerado un marcador preciso para la evaluación de la captación y metabolismo mediante la β -oxidación. Sin embargo, el rápido metabolismo y eliminación combinados con la baja disponibilidad de equipos PET, limitan aún más sus aplicaciones clínicas. A su vez, tanto ácidos grasos de cadena larga ramificados y sin ramificar fueron desarrollados, con un grupo iodofenilo con ¹²³I se han utilizado para imagenología SPECT. Sin embargo los ácidos grasos de cadena larga radioiodados sin ramificar como el ácido 15-(*p*-iodofenil)pentadecanoico (IPPA, figura 13), han demostrado, similarmente al ácido 1-¹¹C-palmítico, un rápido metabolismo y cinéticas de eliminación. Sin embargo, los ácidos grasos ramificados (tales como BMIPP, figura 13) demuestran un metabolismo marcadamente limitado mediante la β -oxidación y una posterior y prolongada retención en el citoplasma del cardiomiocito, adecuado para la adquisición de imágenes mediante SPECT ⁴⁴.

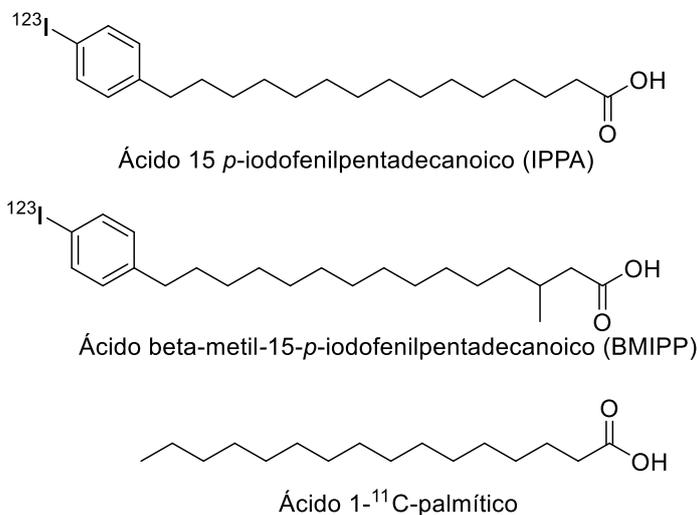


Figura 13. Los principales radiofármacos basados en ácidos grasos utilizados en medicina nuclear.

ÁCIDOS GRASOS Y ANÁLOGOS MARCADOS CON ^{99m}Tc

Las últimas moléculas descritas (IPPA, 1-¹¹C-palmítico, y especialmente el BMIPP) son los ácidos grasos (o derivados de ácidos grasos) más utilizados como agentes de imagen en medicina nuclear. Pero poseen como inconveniente estar marcados con radionucleidos producidos en un ciclotrón, lo cual es una desventaja logística y económica en algunos países. Es por esto que se están desarrollando distintos

derivados de ácidos grasos marcados con ^{99m}Tc con una variedad de agentes quelantes. Las moléculas que se muestran en la figura 14 son derivados de ácidos grasos en etapa experimental los cuales han mostrados buenas captaciones iniciales por parte de los miocitos ⁴⁵⁻⁴⁸. En los compuestos de fórmula general e) (figura 14) se puede observar que la modificación en el carbono 6 de un grupo CH_2 por un átomo de S aportó una mejor distribución de este tipo de compuestos a los 5 min ⁴⁷. Esto puede sugerir que este tipo de modificaciones podrían alterar el metabolismo de estos análogos de ácidos grasos, tal como ocurre con el compuesto ^{123}I -BMIPP, aumentando el tiempo de retención del compuesto y la relación órgano blanco / órgano no blanco.

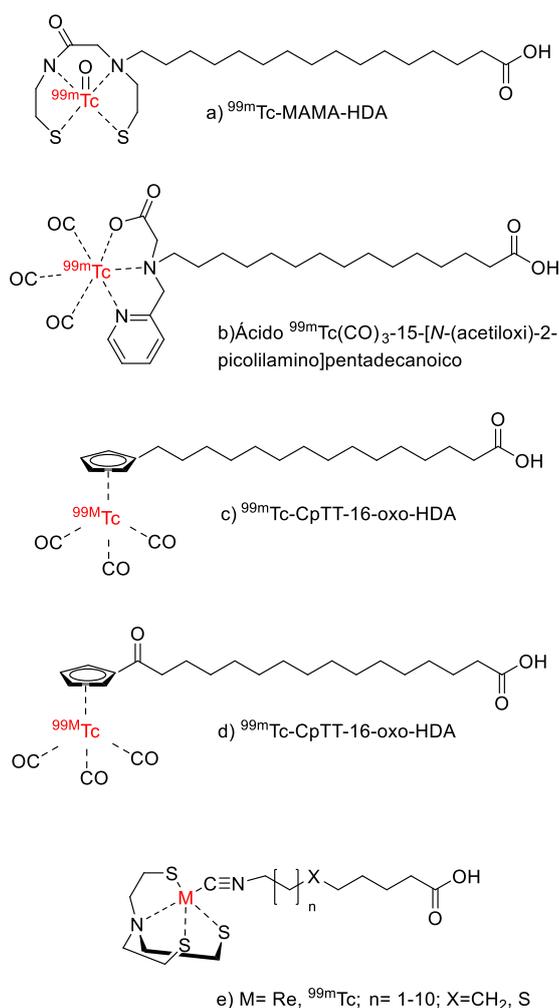


Figura 14. Algunos de los análogos de ácidos grasos radiomarcados, en etapa de investigación, con buenos captaciones en miocardio.

Hasta este momento no se han descrito agentes de imagen donde la molécula vector sean derivados de ácidos grasos marcados con ^{99m}Tc utilizando HYNIC como agente bifuncional.

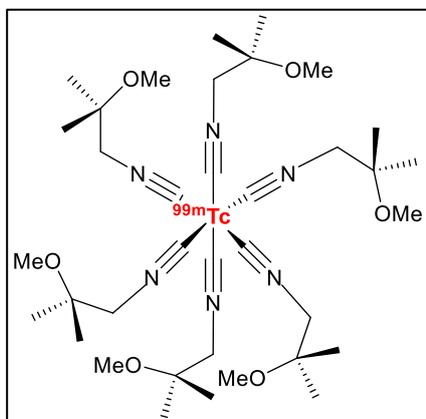
A continuación se muestra una pequeña reseña de distintos agentes de imagen cardíaca y sus principales características⁴⁹.

AGENTES PARA IMAGEN DE PERFUSIÓN CARDÍACA PARA SPECT

El agente de perfusión cardíaca ideal debe tener una relación lineal entre la captación del miocardio y el flujo sanguíneo, una alta extracción sobre un amplio rango de flujos sanguíneos, baja captación extracardíaca, una redistribución mínima en el miocardio, estabilidad química y una adecuada síntesis radioquímica y purificación.

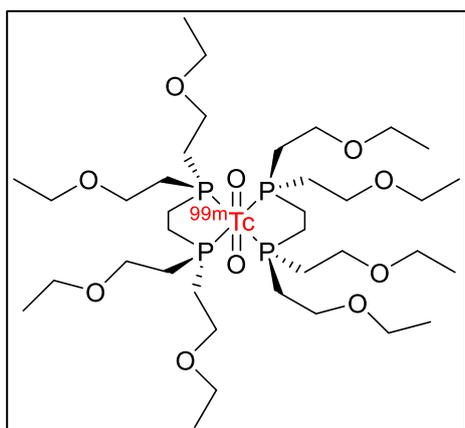
Una familia de radiotrazadores basados en ^{99m}Tc fueron desarrollados en los años '90s incluido el ^{99m}Tc -sestamibi (Cardiolite, Dupont), ^{99m}Tc -Tetrofosmin (Myoview, GE Healthcare) y ^{99m}Tc -teboroxime (Cardiotec, Squibb Diagnostics). De estos trazadores, ^{99m}Tc -sestamibi y ^{99m}Tc -tetrofosmin han experimentado un gran uso clínico cumpliendo con la mayoría de los criterios mencionados.

^{99m}Tc -sestamibi (Cardiolite).

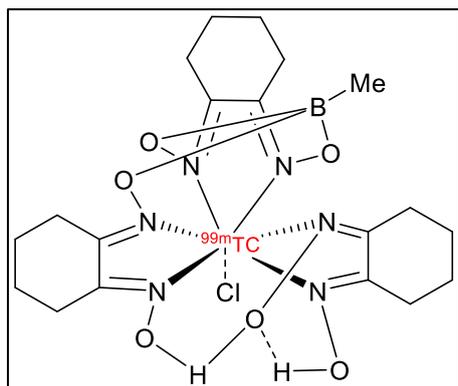


- (i) Difusión pasiva no específica a través de la membrana miocárdica proporcional al flujo sanguíneo
- (ii) Actividad intracelular dirigida por el potencial transmembrana negativo a través de las bicapas del sarcolema celular
- (iii) El 90 % se asocia con la mitocondria en un proceso dependiente de energía
- (iv) Casi sin redistribución, bajo clearance
- (v) Su captación es del 1,0 % de la dosis inyectada en reposo y del 1,4 % en el pico de estrés a los 5 minutos
- (vi) Aprobado por la FDA en diciembre de 1990

^{99m}Tc -tetrofosmin (Myoview)



- (i) Difusión pasiva no específica a través de la membrana miocárdica proporcional al flujo sanguíneo
- (ii) Actividad intracelular dirigida por el potencial transmembrana negativo a través de las bicapas del sarcolema celular
- (iii) También se asocia con la mitocondria en un proceso dependiente de energía
- (iv) Bajo clearance
- (v) 1,2 % de la dosis inyectada en reposo y 1,5 % en el pico de estrés a los 5 minutos
- (vi) Aprobado por la FDA en febrero de 1996

^{99m}Tc-teboroxime (CardioTec)

(vi) La FDA lo aprobó en 2002 aunque actualmente no es comercializado

(i) Complejo neutro, difusión pasiva no específica a través de la membrana celular del miocardio

(ii) Localización no específica en componentes de mitocondria o citosol

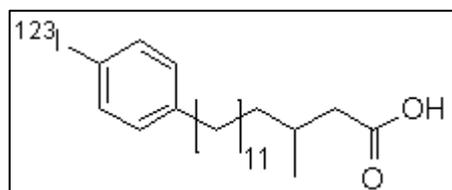
(iii) La imagen debe ser obtenida en los primeros minutos de inyección dado su alta extracción inicial (2 minutos) y posee una rápida eliminación a flujos altos

(iv) Otra desventaja es que las células dañadas tienen eliminación más rápida

(v) Además tiene una unión significativa a glóbulos rojos.

AGENTES DE IMAGEN DE METABOLISMO MIOCÁRDICO PARA SPECT

Ácido β -metil-*p*-(¹²³I)iodofenilpentadecanoico (¹²³I-BMIPP), inicialmente propuesto por Knapp Jr. y colaboradores ⁵⁰ como agente de imagen, es un ácido graso iodado y con una ramificación de un grupo metilo en su carbono β . Los ácidos grasos son la principal fuente de energía del músculo cardíaco en reposo cuando las demandas metabólicas son bajas y cuando hay suficiente sangre rica en oxígeno para el metabolismo. Al poseer un grupo metilo en el carbono beta al ácido carboxílico, el metabolismo de BMIPP se ve afectado en comparación con el de los ácidos grasos no ramificados ⁵⁰. En reposo BMIPP se metabolizará dependiendo de, además de la disponibilidad de oxígeno, de cómo se utilicen los carbohidratos. Esta dependencia de múltiples factores resulta en un delicado balance entre captación en músculo cardíaco, retención y metabolismo. A pesar de su complicado metabolismo se ha experimentado con BMIPP en varios casos de enfermedades cardíacas siendo el derivado de ácido graso más utilizado en imagen cardíaca.

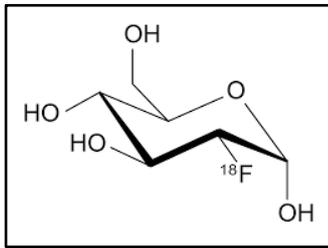
Ácido ¹²³I- β -metil-*p*-iodofenilpentadecanoico (¹²³I-BMIPP)

(i) captación uniforme, retención y bajo lavado bajo condiciones de reposo

(ii) resistente contra la β -oxidación dependiendo de la disponibilidad de carbohidratos

(iii) capacidad de detectar memoria isquémica

AGENTES DE IMAGEN DE METABOLISMO MIOCÁRDICO O EVALUACIÓN DE VIABILIDAD PARA PET.



2-deoxi-2-(¹⁸F)fluoroglucosa (18FDG)

- (i) captación en miocardio mediante transportadores de glucosa con retención de la actividad metabólica
- (ii) sustituto para inflamación miocárdica o vascular
- (iii) corre con la desventaja de marcar inespecíficamente muchos tipos de tejidos (aquellos metabólicamente activos, con alto consumo de glucosa)

2) OBJETIVOS

En el presente trabajo se pretende desarrollar un agente de imagen de buena captación cardíaca y de bajo costo. Para esto, se sintetizaron análogos de ácido graso los cuales presentarán modificaciones su cadena alquílica. A modo de hipótesis, estas modificaciones podrían generar diferencias en la hidrofilia de la molécula afectando su tiempo de retención en el músculo cardíaco.

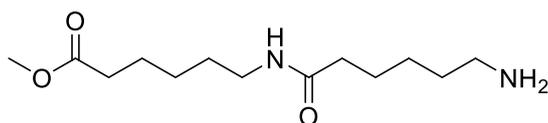
Por otra parte, se desea generar un mimético de ácido graso el cual pueda ser marcado con ^{99m}Tc . Este radionucleido es el más utilizado en Uruguay en agentes de imagen para diagnóstico y el de mayor disponibilidad. Para lograr esta marcación se acoplará grupo hidracinonicotinamida (HYNIC) a los análogos de ácidos grasos. El grupo HYNIC es ampliamente utilizado en biomoléculas (especialmente en proteínas) para formar un complejo estable con el ^{99m}Tc . Esta formación de complejo se llevará a cabo con técnicas puestas a punto en el laboratorio del Área de Radiofarmacia del Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, UdelaR [26-31, 52,53](#).

2.a) OBJETIVO GENERAL

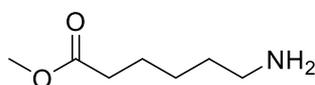
Síntesis y evaluación de moléculas relacionadas estructuralmente con ácidos grasos marcados con ^{99m}Tc , utilizando como agente bifuncional hidracinonicotinamida (HYNIC), para el desarrollo de agentes de imagen SPECT de músculo cardíaco.

2.b) OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Síntesis de **6-(6-aminohexanoilamino)hexanoato de metilo**, un análogo de un ácido graso de una longitud de equivalente a 14 átomos de carbono, y **6-aminohexanoato de metilo** el cual sería un análogo a un ácido graso corto de una longitud de 7 átomos de carbono.



6-(6-aminohexanoil)hexanoato de metilo



6-aminohexanoato de metilo

- Derivatización con **HYNIC** de los compuestos del objetivo anterior.
- Marcación con ^{99m}Tc de los compuestos derivatizados en el objetivo anterior.
- Evaluación de propiedades fisicoquímicas de las moléculas radiomarcadas: pureza radioquímica y logP.
- Realización de estudios biológicos *in vivo*: ensayos de biodistribución en ratones sanos.

3) METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1) GENERALIDADES

En este apartado se detallan los procedimientos experimentales de obtención y caracterización de los compuestos (intermedios y finales) obtenidos por síntesis orgánica convencional. Además se detallan los procedimientos experimentales para la marcación y evaluación biológica de los radiofármacos generados en este trabajo.

Los disolventes utilizados fueron purificados y secados por métodos convencionales. Otros reactivos fueron adquiridos en empresas comerciales: ácido 6-aminohexanoico (Aldrich), ácido 6-cloronicotínico, hidrato de hidrazina (50-60 % N_2H_4), di-*ter*-butildicarbonato (97 %), dicitclohexilcarbodiimida (99 %) (Sigma-Aldrich), hidróxido de sodio (Mallinckrodt), *N*-hidroxisuccinimida (Merck), tetrahidrofurano (Biopack), *ter*-butanol (Sigma-Aldrich), ácido *p*-toluensulfónico (Sigma-Aldrich), éter sulfúrico (Química Gamma), ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich) y metanol (Sigma-Aldrich).

Los grados de avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinaron por cromatografía en capa fina (TLC). Se utilizó sílicagel con indicador fluorescente sobre placas de poliéster (Alugram® Sil G/UV254) u óxido de aluminio con indicador fluorescente sobre placas de poliéster (Poligram® Alox N/UV254). Las fases móviles usadas han sido mezclas (en distintas proporciones) de acetato de etilo y éter de petróleo o diclorometano y metanol. Los métodos de revelado utilizados fueron exposición a la luz ultravioleta (254 nm) y exposición a vapores de yodo. Para las cromatografía en columna se utilizó sílicagel (Kieselgel, tamaño 0.063-0.2 mm, J. T. Baker) u óxido de aluminio (Neutral Alúmina AG® 7 100-200 mesh, Bio Rad).

Los espectros de RMN se realizaron en un equipo Bruker DPX 400 (400 MHz) utilizando los disolventes indicados en cada caso y tetrametilsilano como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico son descritos en unidades de δ (ppm) y las multiplicidades según s: singulete, sa: singulete ancho, d: doblete, dd: doblete de doblete, t: triplete, c: cuarteto, q: quinteto, m: multiplete.

La espectroscopía de masa fue realizada en un equipo Shimadzu GCMS-QP 2010 ULTRA, utilizando impacto electrónico (EI, 70 eV) como forma de ionización.

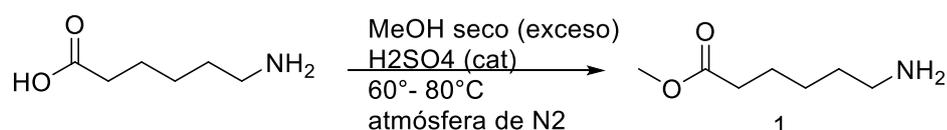
Para el radiomarcado se utiliza tricina (Sigma), cloruro de estaño (II), agua bidestilada, cloruro de sodio 0,9 % (Fluka-Garanite), trietilamina (Aldrich), ácido clorhídrico 0,1 M y un generador $^{99}Mo - ^{99m}Tc$ (TecnoNuclear).

Los equipos empleados fueron los siguientes: Calibrador de dosis Capintec CRC-7, contador de centelleo sólido de pozo; detector de cristal de NaI(Tl) de 3"x3" asociado a un analizador monocanal ORTEC.

Las cromatografías líquidas de alta resolución (HPLC) fueron realizadas en un equipo Agilent Serie Infinity 1200 equipado con detector GABI Star y una columna de fase reversa C18 (300 mm x 4.6 x 10 μ m) Thermo Scientific Hypersil ODS, con detector UV (280 nm) y detector gamma. El método utilizado fue un gradiente de 20 minutos utilizando como fase móvil H₂O/TFA 0,05 % (A), metanol (B).

3.3) SINTESIS DE 6-AMINOHEXANOATO DE METILO (1) Y ÁCIDO 6-(TER-BUTOXICARBONILAMINO)HEXANOICO (2).

3.3.a) ESTERIFICACIÓN DEL ÁCIDO 6-AMINOHEXANOICO.



A una mezcla de ácido 6-aminohexanoico (500 mg; 4,3 mmol), metanol seco (10 mL) y H₂SO₄ (c) (cantidades catalíticas) se la calienta a reflujo en un balón de tres bocas en una atmósfera inerte (N₂) conectado a un ecalizador con tamices moleculares y a un refrigerante de agua (figura 15) durante 24 h. Cuando el ecalizador se llena de disolvente se abre la llave para que gotee el metanol aproximadamente a la misma velocidad con la que condensa dentro del ecalizador.

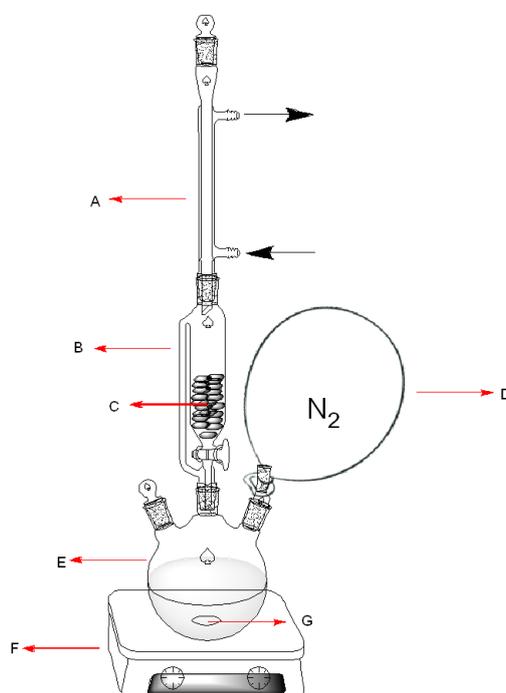
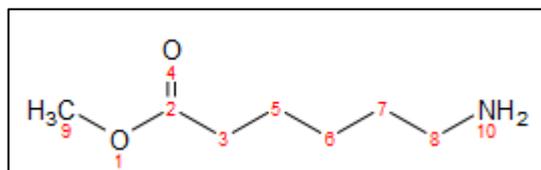


Figura 15. Sistema de reflujo para la esterificación del ácido 6-aminohexanoico. A- Refrigerante con contracorriente de agua. B- ecalizador con C- tamices moleculares. D- Globo con N₂, E-Balón de reacción de tres bocas. F- Plancha calefactora. G-Pastilla magnética de agitación.

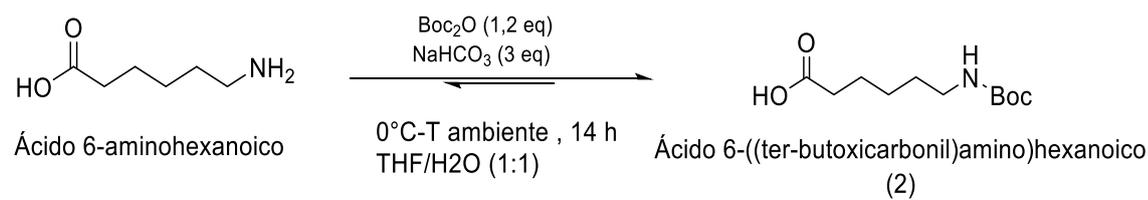
El avance de reacción se sigue por TLC en sílicagel con una fase móvil de MeOH : CH₂Cl₂ (8 : 2). Al completarse la reacción se evapora el disolvente a vacío y el residuo se neutraliza con 25 mL de una disolución acuosa de NaHCO₃ (saturado) y se realizan tres extracciones, de la fase acuosa, con CH₂Cl₂ (50 mL cada una). La fase orgánica se filtra a través de celite, se seca con Na₂SO₄ y se evapora a presión reducida. El rendimiento de la reacción fue de un 68 % dando como producto un aceite de color marrón rojizo con una alta viscosidad.



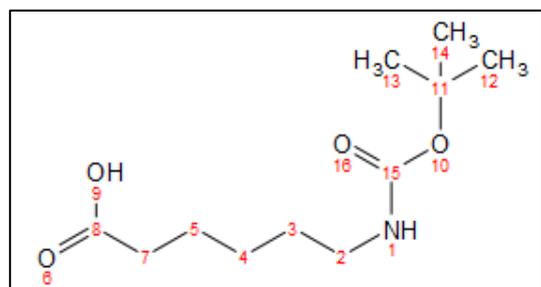
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 3.67 (s, 1H, 9), 2.36 (t+q, J = 14.4, 7.2 Hz, 4H, 3+8), 1.72 – 1.61 (m, 4H, 5,7).

EI-EM *m/z* (abundancia): 111 (M⁺ - H₂O - CH₃⁺), 97 (M⁺ - NH₃⁺ - OCH₃).

3.3.b) PROTECCIÓN DEL GRUPO AMINA DEL ÁCIDO 6-AMINOHEXANOICO.



A una disolución de ácido 6-aminohexanoico (0,88 g, 7,6 mmol) y NaHCO₃ (1,93 g, 23 mmol) en una mezcla de THF / H₂O (1:1) (45 mL), se agrega di-*ter*-butildicarbonato (Boc₂O) (2,00 g, 9,15 mmol) a 0 °C. Luego de 30 minutos la disolución se agita durante toda la noche a temperatura ambiente. La disolución turbia se extrae con Et₂O (2 x 30 mL). La capa acuosa se acidifica a pH 4-5 con disolución acuosa de HCl (10 %) a 0°C y se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 200 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ se evapora a presión reducida obteniéndose el producto como un sólido incoloro. El rendimiento de la reacción fue de un 10 %.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.13 (dd, J = 12.8, 6.5 Hz, 2H, 2), 2.36 (t, J = 7.4 Hz, 2H, 7), 1.71 – 1.62 (m, 4H, 5 y 3), 1.45 (s, 9H, 12, 13 y 14), 1.42 – 1.35 (m, 2H, 4).

MS-EI *m/z* (abundancia): 213 (M⁺ - H₂O), 175 (M⁺ - CH₂=C(CH₃)₂), 140 (M⁺ - H₂O - OC(CH₃)₃).

3.4) SÍNTESIS DE 6-(6-TER-BUTOLOXICARBONILAMINOHEXILCARBONILAMINO) HEXANOATO DE METILO (3).

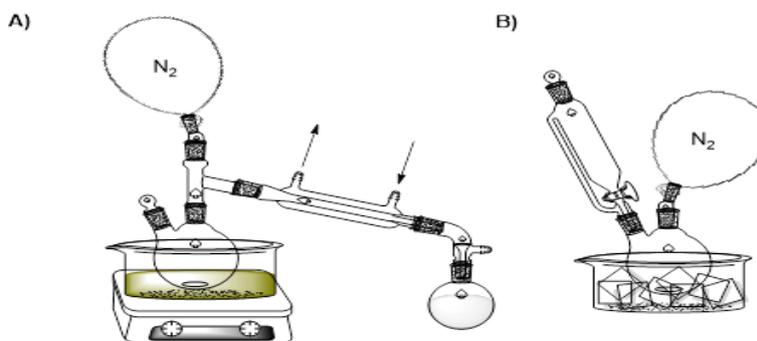
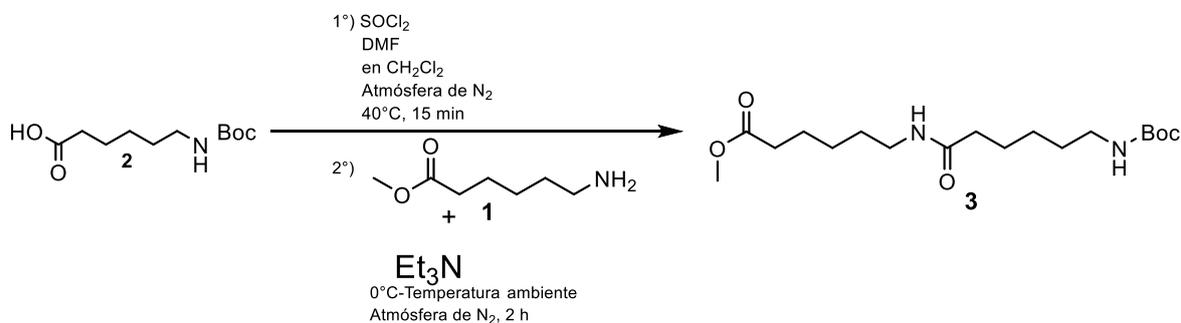


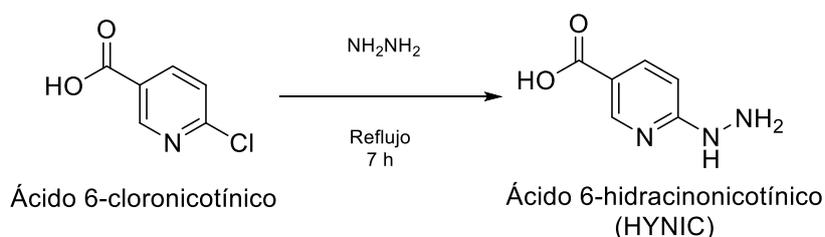
Figura 16. Representación de los sistemas utilizados para las dos etapas de reacción de obtención del compuesto 3: A) Sistema para la primera etapa; reacción con SOCl₂ y DMF en CH₂Cl₂ seco a 40 °C, en el balón se recoge CH₂Cl₂ y el exceso de SOCl₂ de la formación del cloruro de ácido. B) Sistema para la segunda etapa de reacción en baño de hielo donde se añade el 6-aminohexanoato de metilo en CH₂Cl₂ seco de a gotas mediante un eculizador.

En una atmósfera de N₂ se pone a reaccionar 1 equivalente del compuesto **2** con 10 equivalentes de SOCl₂ y 0,1 equivalentes de DMF en CH₂Cl₂ seco a reflujo durante 15 min en un sistema como el que se muestra en la figura 16A. Luego que se da la conversión se evapora a presión reducida para eliminar el disolvente y el SOCl₂ restante. Se obtiene un aceite duro marrón claro. En la segunda etapa, primero se neutraliza el producto obtenido, con 15 equivalentes de Et₃N, luego, al cloruro de ácido formado se le agrega 6-aminohexanoato de metilo (1 equivalente) (**1**) en diclorometano anhidro a 0 °C de a gotas mediante un eculizador. Cuando se termina de añadir el compuesto **1** se deja en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Se agrega disolución acuosa de NaCl (sat) (20 mL) y se extrae con acetato de etilo (10 x 100 mL), la capa orgánica se seca con Na₂SO₄ y se evapora a presión reducida y el crudo se purifica en columna cromatográfica de sílicagel con un gradiente 90 : 1 de AcOEt : MeOH. El rendimiento obtenido de esta reacción fue de 17,6 %.

3.5) SÍNTESIS DEL AGENTE QUELANTE BIFUNCIONAL HYNIC.

La síntesis de este agente quelante se llevó a cabo según la técnica de Abrams (Abrams et al 1990)

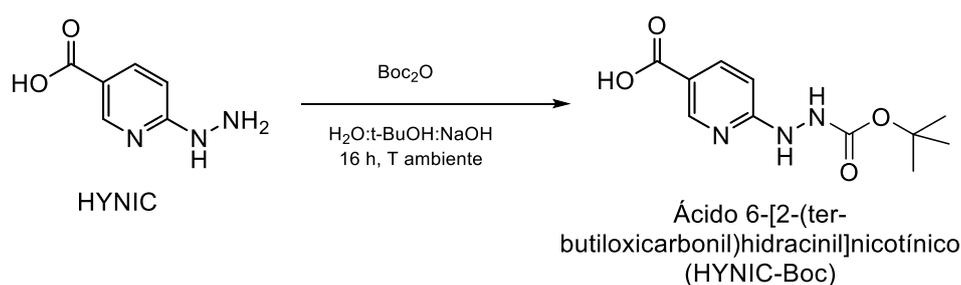
PASO 1



Se calienta a reflujo durante 4 horas una mezcla de ácido 6-cloronicotínico (3 g, 0,019 mol) en un exceso de hidrato de hidracina (20 eq). Luego se enfría, se pasa a un matraz y se ajusta el pH a 5,5 con HCl concentrado gota a gota, obteniéndose un precipitado amarillo. Se filtra y se lava el sólido obtenido con etanol absoluto y éter etílico. Luego se deja en desecador por 24 h. El producto obtenido es comparado cromatográficamente (TLC) con un patrón previamente preparado en nuestro laboratorio. Rendimiento 78%.

PASO 2

PROTECCIÓN DEL GRUPO HIDRACINA

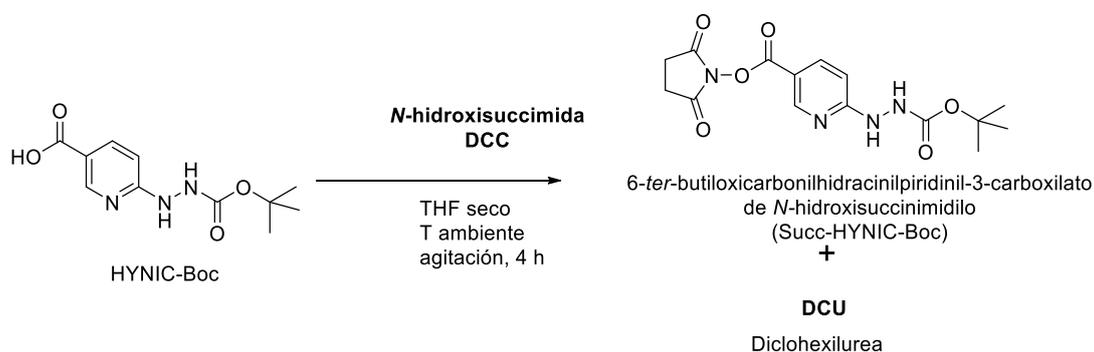


Se disuelve HYNIC (2 g, 13 mmol) en una mezcla de agua: *t*-butanol (1 : 1) (15 mL) con hidróxido de sodio (0,68g, 17 mmol). Luego se añade Boc_2O (3,27 g 15 mmol) se deja reaccionar a temperatura ambiente en agitación por 16 h. El avance de reacción se controla por TLC en sílicagel con una fase móvil de AcOEt : EP (7 : 3). Una vez completada la reacción se ajusta el pH a 5,5 con una disolución acuosa de HCl (1 M). Una vez alcanzado el pH deseado se realizan extracciones con 10 mL de AcOEt, la fase orgánica se seca con Na_2SO_4 y se evapora a vacío. El residuo orgánico se purifica en columna cromatográfica en sílicagel flash con AcOEt : EP (6 : 4) (100 mL), seguido de AcOEt : EP (7 : 3) (200 mL). Las fracciones obtenidas con el

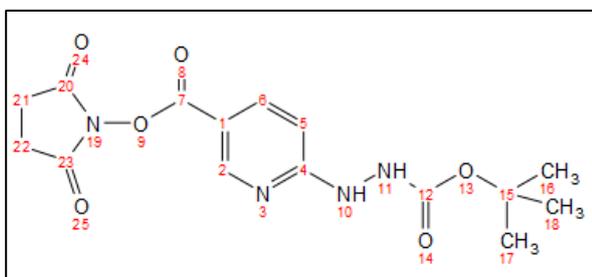
producto se evaporan a presión reducida obteniéndose un sólido de color amarillo. El producto obtenido es comparado cromatográficamente (TLC) con un patrón previamente preparado en nuestro laboratorio. Rendimiento 27%.

PASO 3

ACTIVACIÓN DEL ÁCIDO CARBOXILICO CON *N*-HIDROXISUCCINIMIDA (*Succ*-HYNIC-*Boc*).



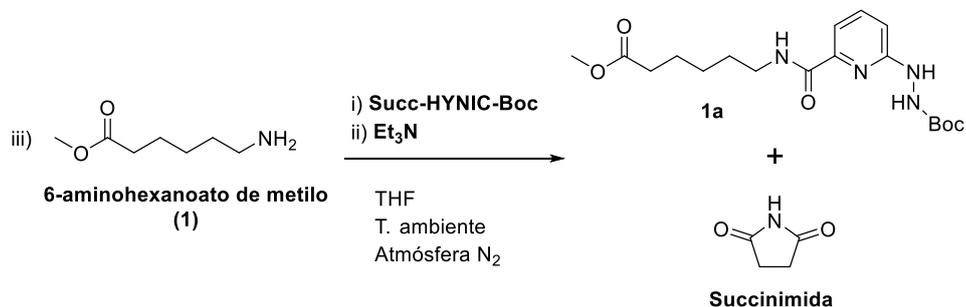
Se disuelve HYNIC-Boc (0,8 g, 3,5 mmol) en THF seco y se añade *N*-hidroxisuccinimida (NHS, 1 eq) disuelto en THF, se agita y luego se añade, de a gotas, una disolución de diciclohexilcarbodiimida (DCC, 1 eq) en THF. Se controla el avance de reacción mediante TLC en sílicagel con una fase móvil de AcOEt : EP (7 : 3). Luego de 4 h de reacción se filtra a vacío la diciclohexilurea (DCU) y se lava con THF frío. Se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose un crudo aceitoso. La purificación se realiza en columna cromatográfica en sílicagel flash con AcOEt : EP (6 : 4) (100 mL), seguido de AcOEt : EP (7 : 3) (200 mL). Se trata repetidas veces con hexano, evaporando a presión reducida, hasta obtener un sólido amarillo. Rendimiento 32%



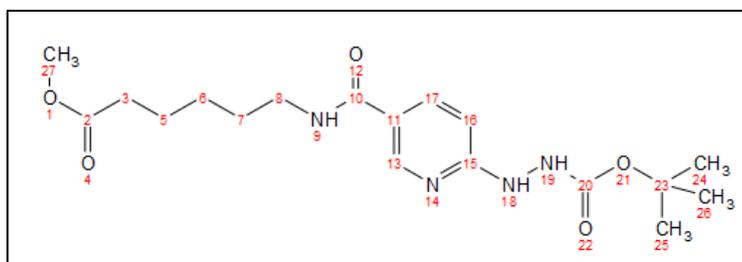
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 8.81 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, 2), 8.18 (dd, $J = 8.9, 1.7$ Hz, 1H, 6), 6.78 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, 5), 2.91 (s, 4H, 21, 22), 1.51 (s, 9H, 16, 17 y 18).

3.6) ACOPLA DEL GRUPO HYNIC.

3.6.a) DERIVATIZACIÓN DE 6-AMINOHEXANOATO DE METILO (1) CON HYNIC (1a).



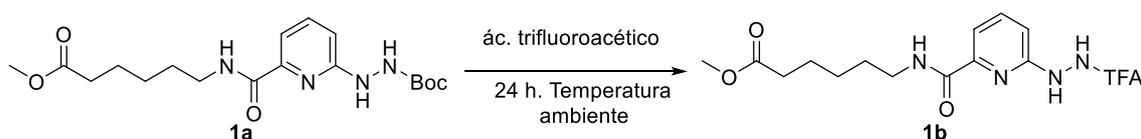
Se disuelve Succ-HYNIC-Boc (0,02 g, $3,35 \times 10^{-5}$ mol) en THF y se agrega un exceso de 5 equivalentes de Et₃N a temperatura ambiente en una atmósfera de N₂. Se deja en agitación durante 5 min y luego se añade el compuesto **1** (1 eq). Se deja en agitación durante 24 h. Se controla mediante TLC, AcOEt : EP (7 : 3) en sílicagel. Se destila a vacío para eliminar la Et₃N. Luego se realiza un reparto de AcOEt : agua. Se seca la fase orgánica con Na₂SO₄, se filtra y se evapora a vacío. La purificación del compuesto se lleva a cabo por cromatografía en columna de sílicagel con una fase móvil de AcOEt : EP (7 : 3) obteniéndose un aceite marrón rojizo con un rendimiento de 35 %.



¹H NMR (400 MHz, CD₃COCD₃): δ 8.63 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, **13**), 8.03 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 1H, **17**), 7.62 (sa, 1H, **9**), 6.71 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, **16**), 3.61 (s, 3H, **27**), 3.38 (dd, *J* = 12.8, 6.9 Hz, 2H, **8**), 2.32 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, **3**), 1.45 (s, 9H, **24, 25 y 26**), 1.43-1.35 (m, 6H,

5, 6, 7).

Con el fin de obtener un mayor rendimiento en el momento de la marcación con ^{99m}Tc, y por lo tanto una mejor eficiencia de marcado ⁵³, se genera un intercambio del grupo protector de aminas Boc por el grupo trifluoroacetilo.

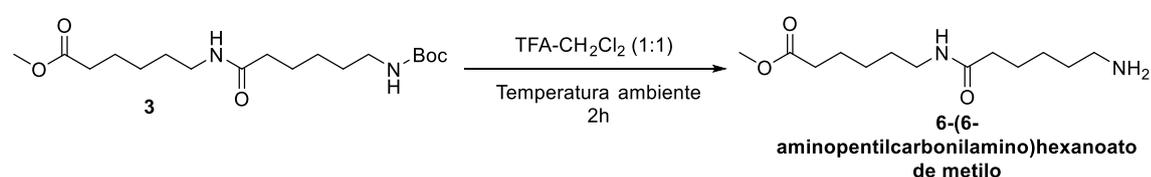


Se disuelve el compuesto **1a** en TFA a temperatura ambiente durante 24 horas. Dando como producto el intercambio completo de grupo protectores Boc por TFA. El producto no se aísla, sino que se utiliza inmediatamente en el proceso de marcación.

3.6.b) DERIVATIZACIÓN DEL COMPUESTO 3 CON HYNIC (3a)

Para poder acoplar el grupo HYNIC al compuesto **3** se procede en dos etapas: la primera, una desprotección del grupo amina; la segunda consiste en el acople del grupo HYNIC a dicho compuesto.

1°) DESPROTECCIÓN DEL GRUPO AMINA.

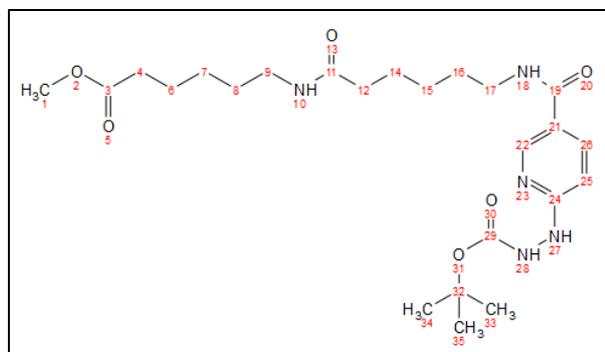


Se disuelve el compuesto **3** (30,4 mg, $8,48 \times 10^{-5}$ mol) en el volumen mínimo necesario de CH_2Cl_2 . Luego en agitación, se añade ácido trifluoroacético (TFA, 127,2 μL), en atmósfera de N_2 . Se agita por dos horas a temperatura ambiente. Se controla el avance de la reacción por TLC (sílicagel con una fase móvil CH_2Cl_2 : MeOH (95:5)). Cuando la reacción se completa se realizan extracciones con AcOEt (10 x 100 mL): H_2O se evapora el AcOEt obteniéndose un aceite de color amarillo.

2°) ACOPLA DEL GRUPO HYNIC A 6-(6-AMINOPENTILCARBOXILAMINO)HEXANOATO DE METILO



Al producto de la reacción anterior (58,3 mg, 0,17 mmol) se lo hace reaccionar en atmósfera inerte de N_2 a temperatura ambiente por 16 h con el compuesto **Succ-HYNIC-Boc** (1 eq) en THF seco con 22 eq de Et_3N . El avance de reacción se sigue mediante TLC en las mismas condiciones que la derivatización del 6-aminohexanoato de metilo. La purificación del compuesto se lleva a cabo por cromatografía en columna de sílicagel con una fase móvil de AcOEt : EP (7 : 3) obteniéndose un aceite marrón rojizo. El rendimiento de la reacción es de 50 %.



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.87 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, **22**), 8.18 (dd, $J = 8.9, 1.9$ Hz, 1H, **26**), 6.80 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, **25**), 3.67 (s, 3H, **1**), 3.07 – 2.97 (m, 4H, **9 y 17**), 2.36 – 2.20 (m, 4H, **4 y 12**), 1.76 – 1.54 (m, 12H, **6, 7, 8, 14, 15, 16**), 1.47 (s, 9H, **33, 34 y 35**).

Al igual que para el compuesto **1a** se realiza un intercambio del grupo protector **Boc** por el grupo trifluoroacetilo para aumentar la eficiencia de marcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, según:



Al igual que el compuesto **1a**, se disuelve el compuesto **3a** en TFA a temperatura ambiente. El producto resultante (**3b**) será utilizado para la marcación con $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

3.7) PROCEDIMIENTOS PARA LA OBTENCIÓN DE 1c Y 3c

Al compuesto **1b** (40 μg , 0,107 μmol) en disolución acuosa de NaCl 0,9 %, se le añade una disolución de tricina (1 mg/mL, 38 μL , 0,214 μmol). Luego se añade $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ (74 – 296 MBq, 100 μL). Posteriormente se adiciona una disolución de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en HCl 0,1 M (15 μL , 0,107 μmol). Se ajusta el pH a un valor entre 4,5 y 5. La mezcla se incubó a 75 °C durante una hora y se controla por HPLC.

Al compuesto **3b** (40 μg , 0,082 μmol) en disolución acuosa de NaCl 0,9 %, se le añade una disolución de tricina (1mg/mL, 29 μL , 0,164 μmol). Luego se añade $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ (74 – 296 MBq, 100 μL). Posteriormente se adiciona una disolución de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en HCl 0,1M (19 μL , 0,082 μmol). Al igual que para el compuesto **1b** se ajusta el pH a un valor entre 4,5 y 5. El volumen final de la mezcla es de 1 mL. La mezcla se incubó a 75 °C durante una hora y se controla por HPLC.

La pureza radioquímica de los compuestos se evaluó por HPLC.

3.8) DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN O LogP.

Para determinar el valor del LogP, se purificaron por HPLC los compuestos de interés, **1c** y **3c**. Las muestras se incuban en un vial con 500 μL de PBS y 500 μL de *n*-octanol. Se centrifuga por 5 min a 3000

RPM. Tres fracciones de 200 μ L fueron colectadas de ambas fases para la medición en un contador γ . El coeficiente de reparto se obtuvo como el \log_{10} (cuentas en octanol / cuentas en fase acuosa).

3.9) EVALUACIÓN BIOLÓGICA *in vivo*.

La evaluación biológica de los compuestos **1c** y **3c** se lleva a cabo mediante la realización de ensayos de biodistribución en ratones BALB/c sanos (n= 20 para cada compuesto) entre 6 y 10 semanas de edad y 19 y 25 g de peso. Los procedimientos con animales fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la UdelaR. A cada ratón se le inyecta cada compuesto, por vía intravenosa, con una actividad entre 10 y 22 MBq. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical luego de 2, 5, 10, 30, 60 y 120 minutos post-inyección. La actividad captada en cada tejido se expresó como el porcentaje de la actividad inyectada inicialmente por gramo de órgano/tejido (% ID/g) y como el porcentaje de la actividad inyectada inicialmente (% ID).

4) RESULTADOS

4.1) SINTESIS DE 6-AMINOHEXANOATO DE METILO (1) Y DE 6-(6-TER-BUTOXICARBONILAMINOHEXILCARBONILAMINO)HEXANOATO DE METILO (3).

Para la síntesis de estos compuestos, así como de los compuestos radiomarcados, se utilizó como reactivo de partida el ácido 6-aminohexanoico como se indica en el esquema siguiente:

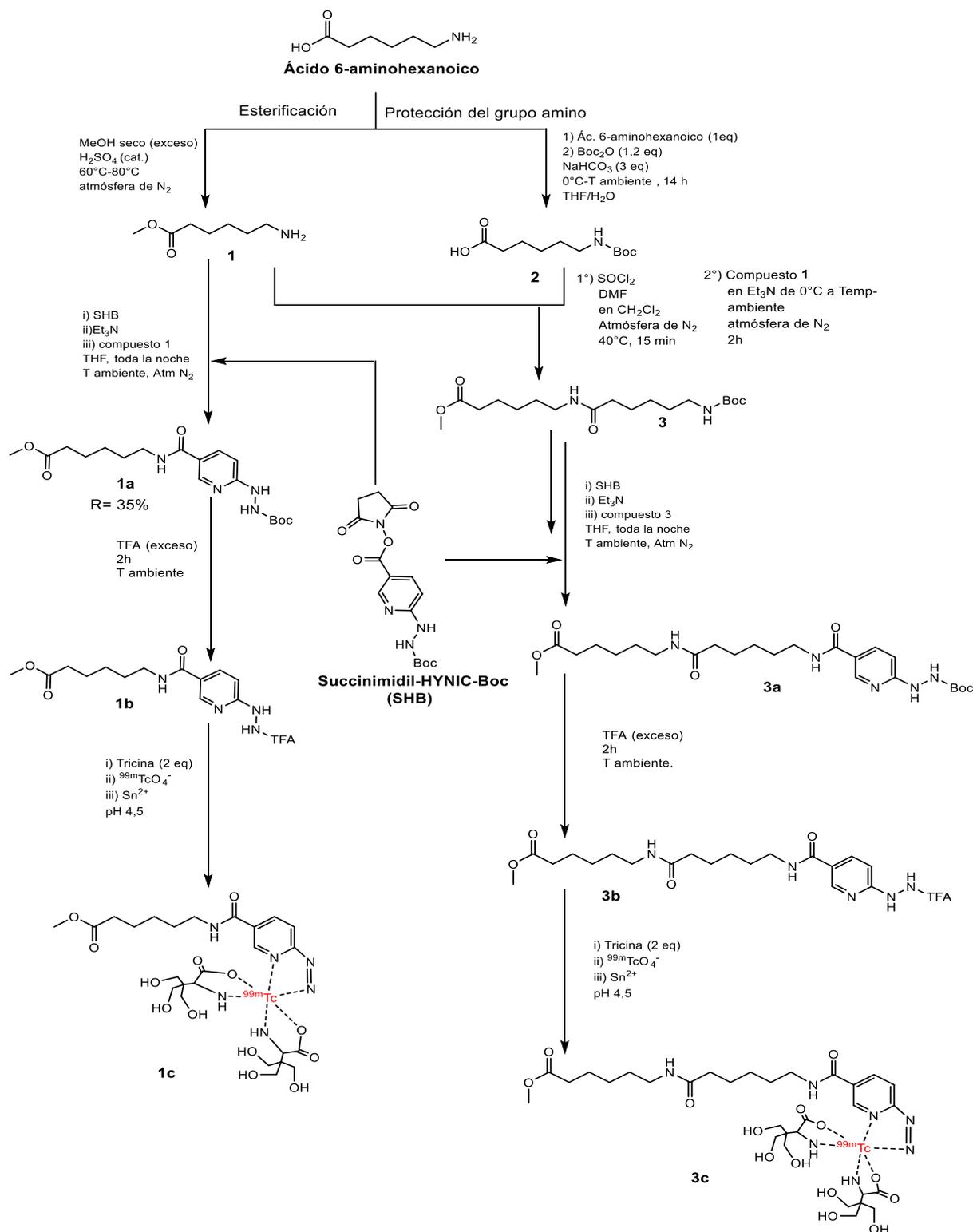


Figura 17. Esquema global de síntesis de los compuestos a evaluar

4.1.a) ESTERIFICACIÓN DEL ÁCIDO 6-AMINOHEXANOICO.

Para la formación de 6-aminohexanoato de metilo se diseñó un sistema como el que se observa en la figura 12 (ver sección Experimental). Los tamices moleculares permiten sacar el agua del medio de reacción para poder desplazar el equilibrio hacia la formación del 6-aminohexanoato de metilo y de esta forma evitar la reacción reversa del equilibrio. Este procedimiento fue propuesto dado que el procedimiento tradicional de esterificación conducía al producto deseado con muy bajo rendimiento.

Así, el rendimiento de la reacción fue de un 68 % dando como producto un aceite de color marrón rojizo con una alta viscosidad.

El producto fue caracterizado por ^1H RMN y además para confirmar la estructura de este compuesto, se llevó a cabo un análisis por espectrometría de masas mediante impacto electrónico (EI-EM). El resultado de la espectrometría de masas se muestra en la figura 18.

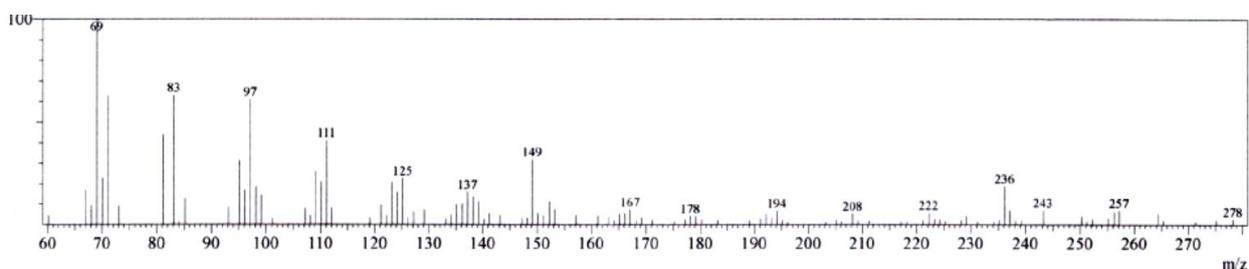


Figura 18. Espectro de masa de 6-aminohexanoato de metilo

Si bien no se observa el pico correspondiente al ion molecular protonado ($m/z = 146$) aparece un patrón de fragmentación en concordancia con la estructura de 6-aminohexanoato de metilo. Por ejemplo, el ión de $m/z = 97$ corresponde a la fragmentación característica del grupo amina del 6-aminohexanoato de metilo seguido de la fragmentación del grupo metoxi del éster. Los demás picos corresponden a iones coherentes con la fragmentación del compuesto.

4.1.b) PROTECCIÓN DEL GRUPO AMINA DEL ÁCIDO 6-AMINOHEXANOICO.

El rendimiento de esta reacción fue de un 10 %. Este bajo rendimiento es acorde con el descrito en la literatura para este procedimiento específico.

Al igual que para el 6-aminohexanoato de metilo se realizó para este compuesto un análisis de EI-EM (figura 19).

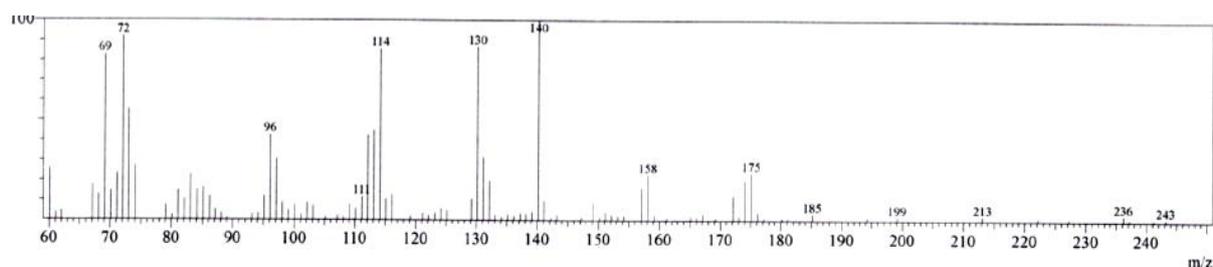


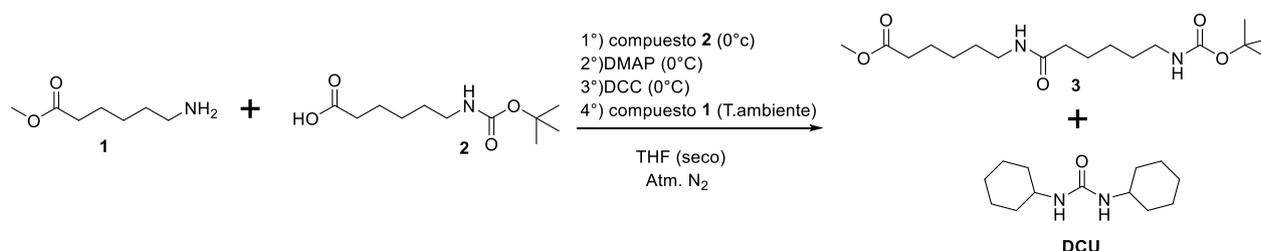
Figura 19. Espectro de masa de ácido 6-(*ter*-butiloxycarbonylamino)hexanoico.

En este aparecen señales correspondientes a iones de fragmentación del compuesto **2** a pesar que, nuevamente, no aparece el correspondiente al ion molecular ($m/z = 231$). Un ejemplo de esto es la presencia del ión $m/z = 175$ correspondiente a la fragmentación y pérdida característica del grupo *ter*-butilo, bajo la forma de isopreno, del grupo protector Boc. Los demás iones presentes corresponden a la presencia de productos de fragmentación coherentes con la estructura propuesta para el compuesto **2**.

4.1.c) FORMACIÓN DEL COMPUESTO 3

Para la formación del compuesto **3** se ensayaron diferentes condiciones (tabla 1) para lograr el enlace amida entre el 6-aminohexanoato de metilo (**1**) y el ácido 6-(*ter*-butiloxycarbonylamino)hexanoico (**2**).

En un principio se llevó a cabo la formación de enlace amida utilizando como agente activante DCC (diciclohexilcarbodiimida).



Al aplicar esta condición de reacción se observa, analizando por ^1H RMN, la presencia del intermediario **2i** (figura 20) como producto mayoritario de reacción, por lo que la reacción no se completa. Además, el producto deseado (**3**), a pesar de ser aislado cromatográficamente, se obtiene contaminado con DCU. Por lo que, el rendimiento para el compuesto **3**, en estas condiciones de reacción, resulta ser menor al 15 %.

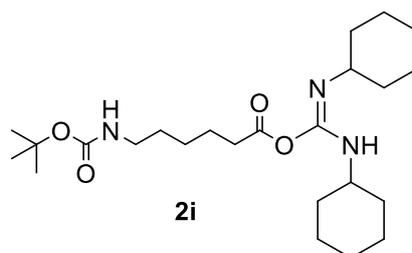
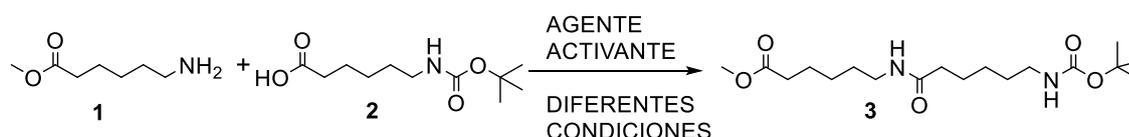


Figura 20. Compuesto intermedio (2i) formado al utilizar DCC como agente activante.

Por estos motivos, se decide aumentar, en primera instancia, la relación entre los compuestos **1** y **2** (con un exceso del nucleófilo) y calentar a reflujo a fin de favorecer la formación del compuesto **3a**. En esta condición el producto mayoritario sigue siendo el compuesto **2i**, obteniéndose un rendimiento muy bajo (menor al 2 %) además de obtenerse contaminado con DCU.

Al no tener cambios significativos en el rendimiento de reacción además de la persistencia de la DCU como impureza, se opta por una nueva estrategia para la formación del enlace amida entre los compuestos **1** y **2**. Esta vez se utiliza cloruro de tionilo (SOCl_2) como se describió en la sección Experimental. En este caso el rendimiento de la reacción fue de 17,6 %.



AGENTE ACTIVANTE	TIEMPO DE REACCIÓN	TEMPERATURA	RELACIÓN MOLAR (1/2)	RENDIMIENTO (%)	OBSERVACIONES
DCC	16 horas	Ambiente	1	<15	DCU como impureza
DCC	16 horas	Reflujo	1	<15	DCU como impureza
DCC	16 horas	Reflujo	1,5	<2	DCU como impureza
SOCl_2	2,5 horas	1) Reflujo 2) 0 °C → T. amb	1	17,6	-

Tabla 1. Resumen de las condiciones y resultados de las reacciones de preparación del compuesto 3.

Al igual que para los compuestos **1** y **2** se realizó un análisis de espectrometría de masas donde no se observa la señal correspondiente al ion molecular ($m/z = 358$), pero los iones presentes en el espectro

corresponden a la presencia de productos de fragmentación en concordancia con la estructura del compuesto 3.

4.2) SÍNTESIS DEL AGENTE BIFUNCIONAL HYNIC

En este caso se siguieron los procedimientos previamente establecidos en nuestro laboratorio ⁵³. Los rendimientos de las tres etapas para formar el 6-*ter*-butiloxicarbonilhidracinilpiridinil-3-carboxilato de *N*-hidroxisuccinimidilo (Succ-HYNIC-Boc) se muestran en la tabla 2. La confirmación espectroscópica por ¹H RMN se realizó para el producto final.

ETAPA	REACTIVOS	PRODUCTO	RENDIMIENTO (%)
1	Ác. 6-cloronicotínico / NH ₂ NH ₂	Ác. 6-hidrazinilnicotínico (HYNIC)	78
2	HYNIC / Boc ₂ O	Ác. 6-[2-(<i>ter</i> -butiloxicarbonil)hidracinil]nicotínico (HYNIC-Boc)	27
3	HYNIC-Boc / <i>N</i> -hidroxisuccinimida / DCC	6- <i>ter</i> -butiloxicarbonilhidracinilpiridinil-3-carboxilato de <i>N</i> -hidroxisuccinimidilo (Succ-HYNIC-Boc)	32

Tabla 2 Resultados de cada una de las etapas de preparación del agente bifuncional Succ-HYNIC-Boc

4.3) ACOPLÉ DEL GRUPO HYNIC PARA LA FORMACIÓN DE LOS COMPUESTOS 1a y 3a.

En la tabla siguiente se muestran los rendimientos de la obtención de los compuestos 1a y 3a.

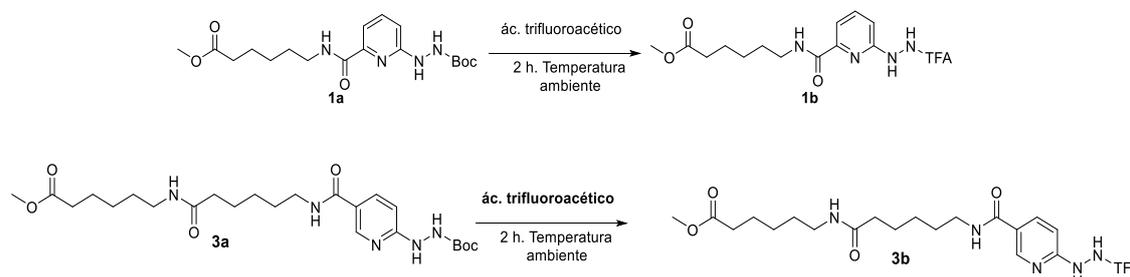
ACOPLE	RENDIMIENTO %
1 + Succ-HYNIC-Boc → 1a	35
3 + Succ-HYNIC-Boc → 3a	50

Tabla 3. Rendimientos de las obtenciones de los compuestos 1a y 3a.

Los productos **1a** y **3a** fueron caracterizados espectroscópicamente confirmando la formación de los productos de interés.

4.4) PREPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS 1b y 3b.

Con el fin de obtener un mayor rendimiento en el momento de la marcación con ^{99m}Tc , y por lo tanto una mejor eficiencia de marcado, se sustituye el grupo protector de aminas Boc por el grupo trifluoroacetilo. Los antecedentes indican que este grupo es fácilmente desprotegido durante la marcación ^{52,53}. Esta conversión, se describe en la literatura con un rendimiento mayor al 99%. En este trabajo, los productos de dicha reacción (**1b** ó **3b**) no fueron aislados ni caracterizados.



4.5) MARCACIÓN CON ^{99m}Tc : OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS 1c Y 3c.

Se trabajó, en el proceso de marcación, directamente con el producto de reacción ya que la escala de trabajo en estos casos fue del orden de 1 mg. Por esto, se separó la muestra en fracciones de 40 μg las cuales se marcaron y se utilizaron en los ensayos de biodistribución y determinación del coeficiente de reparto.

El compuesto **1c** se obtuvo con una pureza radioquímica de 81,52 % utilizando tricina como coligando con un tiempo de retención en el rango 13 – 15 minutos. Los picos observados en el rango de 3 a 4 minutos se corresponden al complejo tricina- ^{99m}Tc .

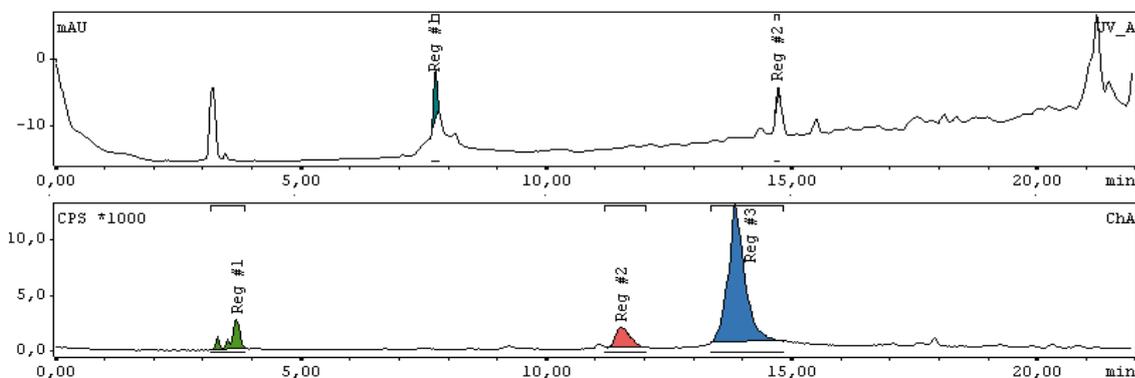


Figura 21. Cromatograma de RP-HPLC del compuesto **1c**. Arriba: detección UV (280 nm); abajo: detección gamma.

Para el compuesto **3c** se observa picos de actividad en el rango de 7 a 11 minutos de tiempo de retención. La diversidad de picos observada en este compuesto se puede deber al coligando tricina, el cual forma distintas especies marcadas debido a su inestabilidad en disolución ^{33, 55}.

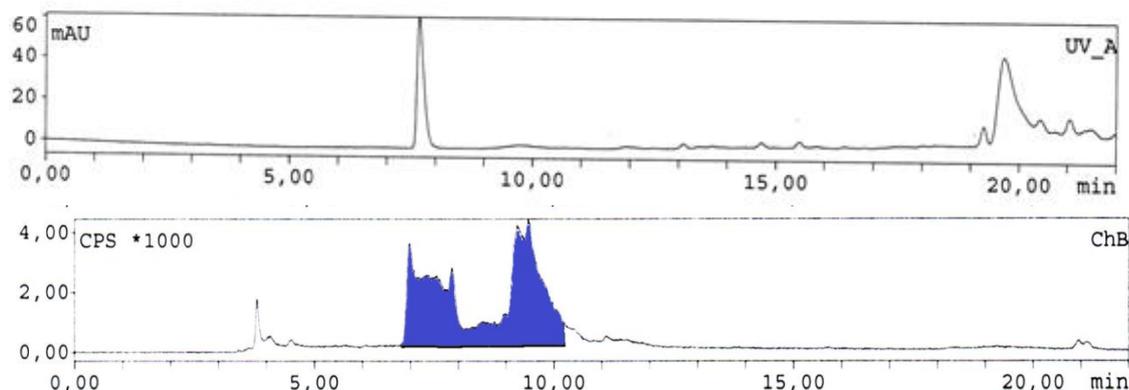


Figura 22. Cromatograma de RP-HPLC del compuesto 3c. Arriba: detección UV (280 nm); abajo: detección gamma.

4.6) COEFICIENTE DE REPARTO O Log P.

Se evaluó el carácter hidrofílico/lipófilo de los compuestos radiomarcados mediante el cálculo de coeficiente de reparto octanol-agua. Los resultados se muestran en la tabla a continuación. Ambos complejos estudiados mostraron tener un carácter hidrofílico al tener un Log P negativo y los valores están en concordancia con las diferencias estructurales entre los compuestos, mayor cadena hidrocarbonada para **3c** y por ende un mayor carácter lipófilo.

COMPUESTO RADIOMARCADO CON ^{99m} Tc	Log P
1c	-1,23 ± 0,03
3c	-1,05 ± 0,21

Tabla 4. Coeficiente de reparto de los compuestos de interés 1c y 3c.

4.7) EVALUACIÓN BIOLÓGICA *in vivo*: ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN.

La evaluación biológica *in vivo* de los compuestos radiomarcados fue llevada a cabo mediante la realización de estudios de biodistribución en ratones BALB/c sanos. Las biodistribuciones (figuras 23 y 24) fueron realizadas a los 2, 5, 30, 60 y 120 minutos post-inyección para el compuesto **1c** y a los 2, 5, 10 y 30 minutos post-inyección para el compuesto **3c**.

Se pudo observar, para ambos compuestos, un máximo de captación en corazón a los dos minutos post inyección (figuras 23-25), siendo $3,33 \pm 0,80$ del porcentaje de la actividad inyectada inicialmente por gramo de órgano (%ID/g) para el compuesto **1c** y $5,15 \pm 0,54$ %ID/g para el compuesto **3c**, resultando ambas significativamente diferentes ($p < 0,14$, test *t*-Student).

En este sentido, la captación también fue significativamente diferente ($p < 0,12$, test *t*-Student) entre ambos compuestos a los treinta minutos post inyección (figuras 23-25), pero en este caso a favor del compuesto **1c**, $2,91 \pm 1,18$ %ID/g para el compuesto **1c** y $1,17 \pm 0,31$ %ID/g para el compuesto **3c**.

Así, la captación del compuesto **1c** se mantiene constante, sin diferencias significativas entre tiempos consecutivos, hasta los sesenta minutos post inyección. Disminuyendo significativamente ($p < 0,10$, test *t*-Student) a los ciento veinte minutos post-inyección (figura 25a). En cuanto a la captación por músculo esquelético, excepto para los ciento veinte minutos, en todos los tiempos fue menor que la captación por músculo cardíaco, resultando la diferencia significativa a los cinco, treinta y sesenta minutos (figura 25a).

Por otro lado, la captación del compuesto **3c** decrece significativamente con el tiempo en el lapso de estudio, o sea entre los dos y los treinta minutos pos inyección (figura 25b). En cuanto a la captación por músculo esquelético, para este compuesto, en todos los tiempos fue menor que la captación por músculo cardíaco, resultando la diferencia significativa a los dos, cinco y diez minutos (figura 25b).

La eliminación de los compuestos radiomarcados fue rápida observándose un $38,95 \pm 1,97$ %ID/g y $29,82 \pm 10,41$ %ID/g (significativamente no diferentes, test *t*-Student) en orina para los compuestos **1c** y **3c**, respectivamente, luego de 30 minutos de biodistribución (recuadro superior derecho en figuras 23 y 24).

Tanto los valores de biodistribución en músculo cardíaco como los valores de eliminación urinaria, para cada uno de los compuestos, se encuentran completamente de acuerdo con la estructura química de cada uno de los radiofármacos y con sus valores de LogP.

Las relaciones órgano blanco (corazón) / órgano no blanco (tablas 5 y 6) muestran, para ambos radiofármacos, una menor captación en corazón en comparación con los tejidos circundantes pulmones e hígado a todos los tiempos del estudio.

En el caso del compuesto **1c** la relación músculo cardíaco/pulmones crece significativamente con el tiempo, entre dos y sesenta minutos, mientras que la relación músculo cardíaco/hígado se mantiene constante con el tiempo. Para el compuesto **3c** tanto la relación músculo cardíaco/pulmones como la relación músculo cardíaco/hígado se mantienen constantes con el tiempo. Cabe destacar que a los dos y cinco minutos la

relación músculo cardíaco/hígado para el compuesto **3c** es significativamente mayor que para el compuesto **1c**.

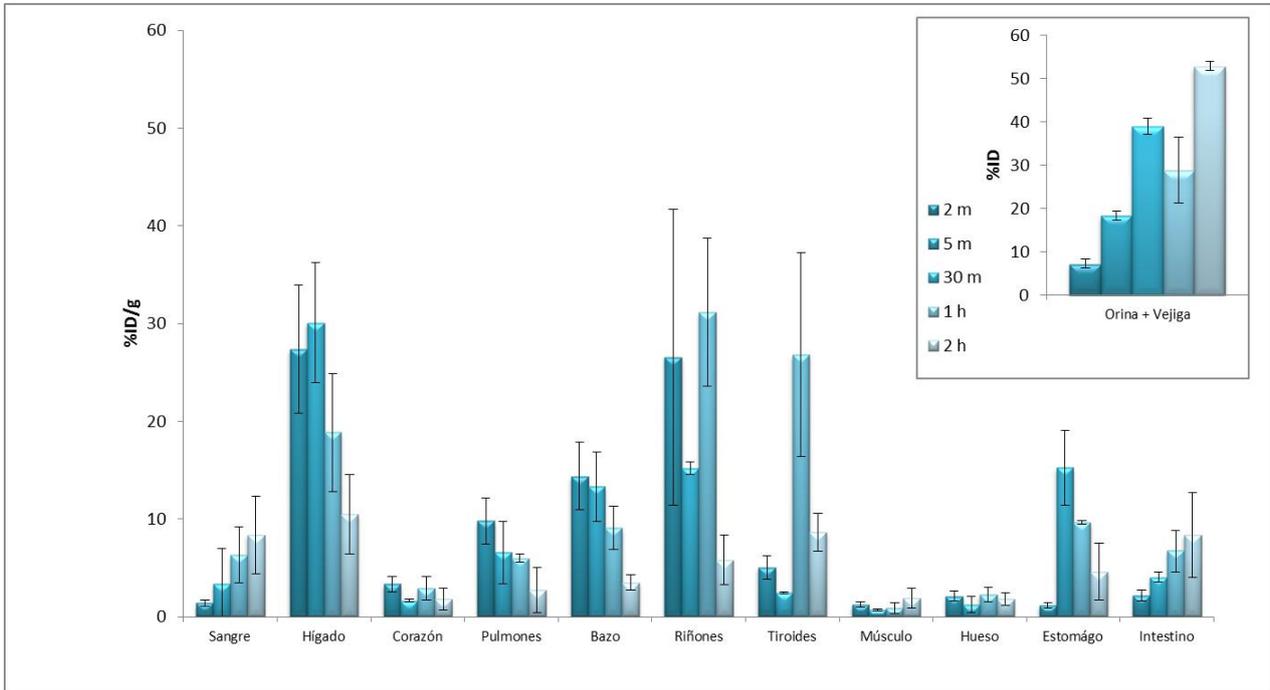


Figura 23. Biodistribución en ratones BALB/c para el compuesto 1c. (n= 4, %DI/g). En recuadro superior derecho se observa el porcentaje de dosis inyectada eliminada por orina.

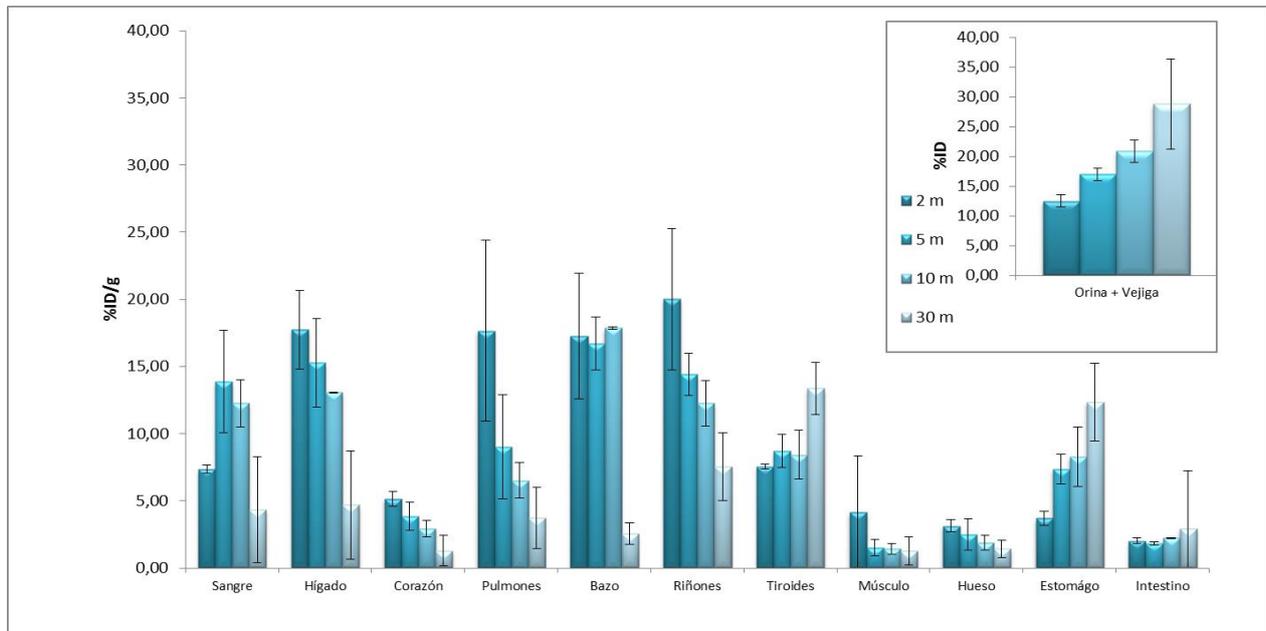
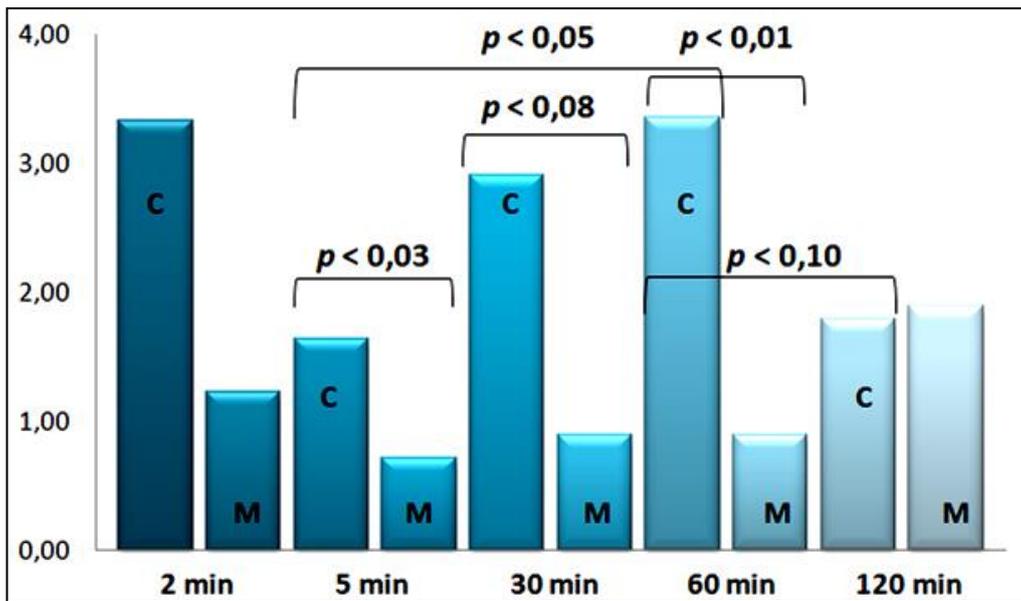


Figura 24. Biodistribución en ratones BALB/c para el compuesto 3c. (n= 4, %DI/g). En recuadro superior derecho se observa el porcentaje de dosis inyectada eliminada por orina.

a)



b)

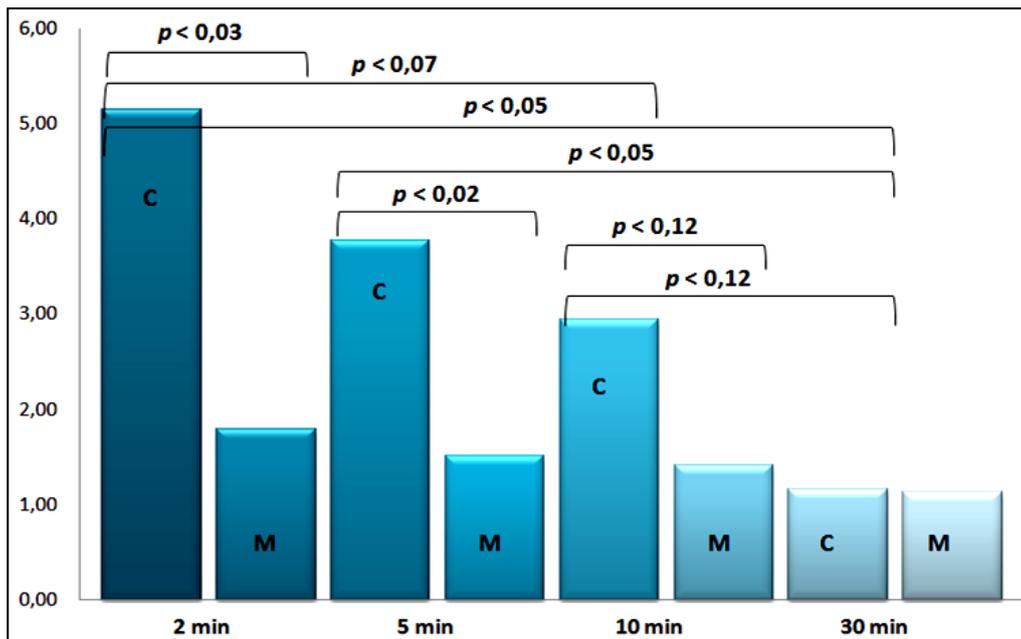


Figura 25. Biodistribución en músculos cardíaco (C) y esquelético (M) en ratones BALB/c para el compuesto 1c. (n= 4, %DI/g) (a) y compuesto 3c. (n= 4, %DI/g) (b).

Las relaciones músculo cardíaco / sangre (otro órgano circundante) también fueron menores que la unidad para el compuesto 3c en todos los tiempos estudiados y para el compuesto 1c a partir de los treinta minutos post inyección. En ambos compuestos dichas relaciones decrecen significativamente con el tiempo, mostrando la depuración desde corazón hacia la sangre periférica.

Por otro lado, se ve una buena captación del músculo cardíaco en relación con el músculo esquelético (figura 25), siendo en todos los tiempos estudiados la relación mayor a la unidad.

Relaciones Órgano Blanco / Órgano no Blanco de 1c					
	2 min	5 min	30 min	60 min	120 min
Corazón/Sangre	2,40 ± 0,01 (a),(b),(c)	1,17 ± 1,24	0,57 ± 0,42 (a)	0,45 ± 0,26 (b)	0,23 ± 0,15 (c)
Corazón/Hígado	0,12 ± 0,01 (b)	0,06 ± 0,01 (b)	0,17 ± 0,10	0,18 ± 0,04	0,18 ± 0,11
Corazón/Músculo	2,72 ± 0,02 (b)	2,34 ± 0,42 (d)	5,2 ± 5,5	4,62 ± 3,03 (e)	0,54 ± 0,27 (b),(d),(e)
Corazón/Pulmones	0,34 ± 0,01 (b)	0,28 ± 0,11 (f)	0,49 ± 0,22	0,64 ± 0,03 (b),(f)	0,81 ± 0,57

Tabla 5. Relaciones de captación del compuesto 1c con los principales tejidos cercanos al músculo cardíaco, en los diferentes tiempos post-inyección. En una fila, letras iguales significa significativamente diferentes: (a) $p < 0.02$; (b) $p < 0.01$; (c) $p < 0.01$; (d) $p < 0.06$; (e) $p < 0.15$; (f) $p < 0.13$.

Relaciones Órgano Blanco / Órgano no Blanco de 3c				
	2 min	5 min	10 min	30 min
Corazón/Sangre	0,71 ± 0,11 (*),(a),(b),(c)	0,24 ± 0,08 (a)	0,24 ± 0,01 (b)	0,31 ± 0,08 (c)
Corazón/Hígado	0,29 ± 0,01 (**)	0,24 ± 0,10 (***)	0,23 ± 0,05	0,24 ± 0,14
Corazón/Músculo	2,95 ± 0,57 (d)	2,61 ± 0,49 (e)	2,23 ± 1,07	1,03 ± 0,12 (*),(d),(e)
Corazón/Pulmones	0,37 ± 0,03 (f)	0,44 ± 0,11	0,45 ± 0,01 (f)	0,31 ± 0,11

Tabla 6 Relaciones de captación del compuesto 3c con los principales tejidos cercanos al músculo cardíaco, en los diferentes tiempos post-inyección. Significativamente diferente que la misma relación, en el mismo tiempo, para el compuesto 1c: (*) $p < 0.03$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.10$. En una fila, letras iguales significa significativamente diferentes: (a) $p < 0.05$; (b) $p < 0.10$; (c) $p < 0.06$; (d) $p < 0.13$; (e) $p < 0.03$; (f) $p < 0.11$.

5) CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Al comparar (tabla 7) los compuestos **1c** y **3c** con otros análogos de ácidos grasos en etapa de investigación con buena captación cardíaca (**W**, por el compuesto sintetizado por Walther *et al* ⁴⁷, **Ma1** y **Ma2**, por los compuestos sintetizados por Mathur *et al* ⁵⁵, figura 26), se puede observar un comportamiento similar en las relaciones entre corazón / músculo esquelético, excepto para el compuesto **Ma1**, con valores mayores a la unidad, así como un comportamiento similar en la relación corazón / hígado para los tres primeros compuestos:

	Corazón / Hígado	Corazón / Pulmones	Corazón / Sangre	Corazón / músculo	Log P
1c	0,12	0,34	2,40	2,72	-1,23 ± 0,03
3c	0,29	0,37	0,71	2,95	-1,05 ± 0,21
W	0,25	4,38	8,56	7,0	no descrito
Ma1	0,08	0,46	0,30	487	-0,31
Ma2	0,05	0,63	0,54	2,01	-0,12

Tabla 7. Relaciones órgano blanco / no blanco para los compuestos 1c, 3c, W, Ma1 y Ma2 en sus tiempos de máxima captación cardíaca (2 minutos, excepto para W donde los autores estudian como primer tiempo de biodistribución 5 minutos).

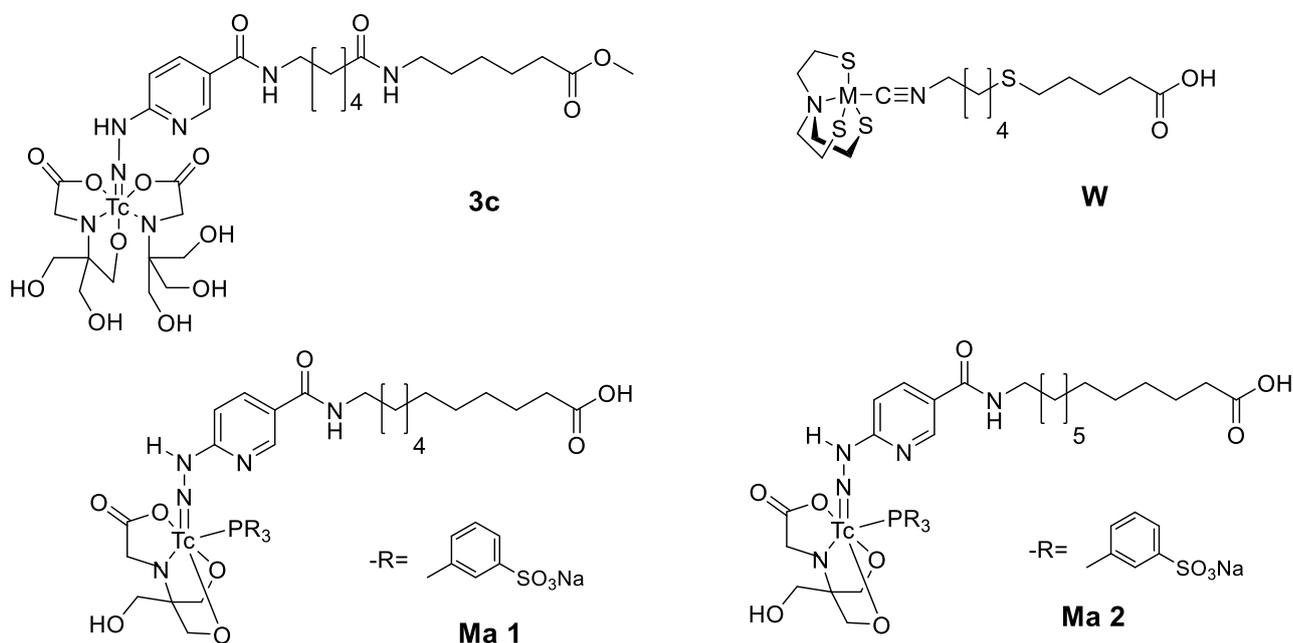


Figura 26. Compuestos utilizados para comparación (en W: M= ^{99m}Tc)

Debido a su proximidad a la caja torácica, y por lo tanto al músculo cardíaco, el hígado debe ser considerado en el momento de la realización de imágenes. Por ello, cuanto más altas relaciones corazón / hígado mejores serán las imágenes adquiridas.

Las mejores relaciones corazón / hígado para los compuestos desarrollados en este trabajo, **1c** y **3c**, frente a los derivados **Ma1** y **Ma2**, que al igual que nuestros compuestos utilizan HYNIC como ligando y tricina como co-ligando, se pueden deber al mayor carácter hidrofílico de los primeros (Tabla 7). Esta mayor hidrofilia es el resultado de los agrupamientos elegidos en el diseño original: el conector amida, el agente HYNIC y el coligando tricina (color magenta, verde y celeste, respectivamente, en figura 27).

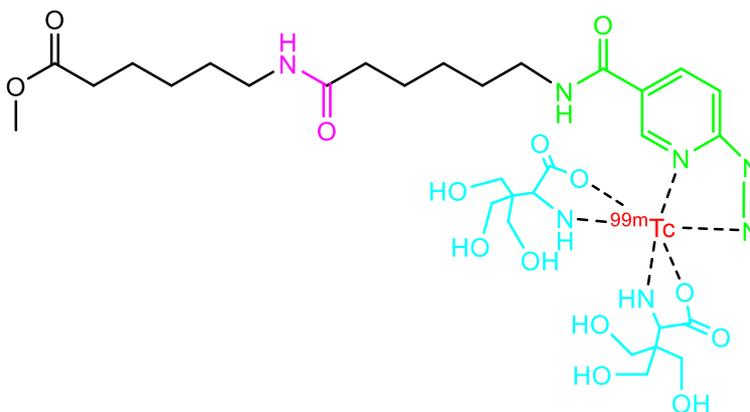


Figura 27. Representación en colores de los grupos que confieren carácter hidrofílico en el compuesto 3c.

El agente desarrollado **3c** ha demostrado poseer un perfil adecuado como para ser considerado un prototipo para futuras modificaciones estructurales con el fin de mejorar las relaciones órgano blanco / no blanco y de este modo su potencial como agente de imagen para músculo cardíaco.

6) BIBLIOGRAFÍA

1. **Weissleder R.; Mahmood U.** Molecular Imaging. *Radiology*. 2001; 219:316- 33.
2. **Nichol C.; Kim E.E.** *Molecular imaging and gene therapy*. Journal of Nuclear Medicine. 2001; 42(9): 1368-1374
3. **Phelps M.E.** *PET: the merging of biology and imaging into molecular imaging*. Journal of Nuclear Medicine and Biology. 2000; 41(4):661-681.
4. **Meikle S.R.; et al.** Small animal SPECT and its place in the matrix of molecular imaging technologies. *Physics Medicine and Biology*. 2005; 50(22):R45-R61.
5. **Eleta F.; et al.** *Imágenes moleculares: morfología y función*. Revista Argentina de Radiología. 2004; 68: 201-22.
6. **Kurdziel K.A.; Ravizzini G.** *The evolving role of nuclear molecular imaging in cancer*. Expert Opinion on Medical Diagnostics. 2008; 2(7):829-842.
7. **Mankoff D.** Molecular imaging as a tool for translating breast cancer science. *Breast Cancer Research*. 2008; 10(Suppl 1): S3.
8. **Dobrucki L.W.; et al.** *Approaches to multimodality imaging of angiogenesis*. Journal of Nuclear Medicine. 2010; 51(Suppl 1):66S-79S.
9. **Dobrucki L.W.; Sinusas A.J.** *PET and SPECT in cardiovascular molecular imaging*. Nature reviews. Cardiology. 2010;7(1):38-47.
10. **Sinusas A.J.; Thomas J.D.; Mills G.** *The future of molecular imaging*. JACC Cardiovasc Imaging. 2011;4(7):799-806.
11. **Morrison A.R.; Sinusas A.J.** *Advances in radionuclide imaging in myocardial biology*. Journal of nuclear Medicine. 2010; 17(1):116-34.
12. **Blankenberg F.G.; et al.** *In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998; 95:6349-54.
13. **Miles K .A.** *Perfusion CT for the assessment of tumour vascularity: which protocol?* British Journal of Radiology. 2003; 76: 36-42.
14. **Maria Moresco R.; et al.** *PET in psychopharmacology*. Pharmacological Research.2001; 44:151-9.
15. **Kowalski R.; Falen S.** *Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine*, segunda edicion American Pharmacists Association. 2004.
16. **S. Liu.** The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. *Chemical Society Reviews*. 2003; 27: 43-55.
17. **Saleh T.**, Radiopharmacy basis, de basic science of nuclear medicine, Springer, 2010.
18. **Abram U; Alberto R.** *Technetium and rhenium - coordination chemistry and nuclear medical applications*. Journal of the Brazilian Chemical Society 2006; 17(8):1486-1500.
19. **Mazzi U.** *Technetium in Medicine*. Technetium-99m pharmaceuticals. 2007; 7-58.

20. **H.Spies H.; Pietzch H.J.** *Stannous chloride in the preparation of 99mTc pharmaceuticals.* Technetium 99m Pharmaceuticals. 2007; 59-64
21. **Dilworth J. R.; Parrott J.S.** *The biomedical chemistry of technetium and rhenium.* Chemical Society Reviews 1998; 27: 43-55.
22. **S. Liu.** Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target specific delivery of metallic radionuclides. *Advanced drugs delivery reviews*, 2008; 60: 1347-1370.
23. **Rennen H. J. J. M.; et al.** Labeling proteins with 99mTc via hidrazinonicotinamide (HYNIC): Optimization of the conjugation reaction. *Nuclear Medicine and Biology* 2000, 27: 599-604.
24. **Decristóforo C.; et al.** 99mTc-HYNIC-[Tyr3]-Octreotide for imaging somatostatin-receptor-positive tumors: Preclinical evaluation and comparison with 111In-Octreotide. *Journal of Nuclear Medicine* 2000 41(6), 1114-1119.
25. **Li Y.C.; et al.** Anti-sense oligonucleotide labeled with technetium-99m using hydrazinonicotinamide derivative and N-hydroxysuccinimidyl S-acetylmercaptoacetyltriglycine: a comparison of radiochemical behaviors and biological properties. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(14):2235-40.
26. **Calzada V, García MF, Alonso-Martínez LM, Camacho X, Goicochea E, Fernández M, Castillo AX, Díaz-Miqueli A, Iznaga-Escobar N, Montaña RL, Alonso O, Gambini JP, Cabral P.** *Fab(nimotuzumab)-HYNIC-99mTc: Antibody fragmentation for molecular imaging agents.* *Anticancer Agents Med Chem.* 2016 Mar 10.
27. **García MF, Zhang X, Shah M, Newton-Northup J, Cabral P, Cerecetto H, Quinn T.** *(99m)Tc-bioorthogonal click chemistry reagent for in vivo pretargeted imaging.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2016 Mar 15;24(6):1209-15.
28. **García MF, Calzada V, Camacho X, Goicochea E, Gambini JP, Quinn TP, Porcal W, Cabral P.** Microwave-assisted synthesis of HYNIC protected analogue for 99mTc labeled antibody. *Current Radiopharmaceuticals.* 2014;7(2):84-90.
29. **García MF, Zhang X, Gallazzi F, Fernández M, Moreno M, Gambini JP, Porcal W, Cabral P, Quinn TP.** Evaluation of tricine and EDDA as Co-ligands for 99mTc-labeled HYNIC-MSH analogs for melanoma imaging. *Anticancer Agents Med Chem.* 2015;15(1):122-30.
30. **Kovacs L, Tassano M, Cabrera M, Fernández M, Porcal W, Anjos RM, Cabral P.** *Labeling polyamidoamine (PAMAM) dendrimers with technetium-99m via hydrazinonicotinamide (HYNIC).* *Current Radiopharmaceuticals.* 2014;7(2):115-22.
31. **Calzada V, García F, Fernández M, Porcal W, Quinn T, Alonso O, Gambini JP, Cabral P.** Labeling and Biological Evaluation of (99m)Tc-HYNIC-Trastuzumab as a Potential Radiopharmaceutical for In Vivo Evaluation of HER2 Expression in Breast Cancer. *World Journal of Nuclear Medicine.* 2013 Jan;12(1):27-32.

32. **Decristóforo C.; Mather S.** 99m-Techneium-Labelled peptide HYNIC conjugates: Effects of lipophilicity and stability on biodistribution, *Nuclear Medicine and Biology*. 1999; 26:389-396.
33. **Meszaros L.K.; et al.** Hydrazinonicotinic acid (HYNIC) – Coordination chemistry and applications in radiopharmaceutical chemistry. *Inorganica Chimica Acta*. 2010; 363(6):1059–1069.
34. **Liu S.; et al.** Technetium complexes of a hydrazinonicotinamide-conjugated cyclic peptide and 2-hydrazinopyridine: Synthesis and characterization. *Inorg Chem*. 1999;38: 1326–1335.
35. **M. B. Surfraz et al.** Trifluoroacetyl-HYNIC peptides: synthesis and 99mTc radiolabeling. *Journal of Medicinal Chemistry* 2007; 50.
36. **T. D. Harris, et al.** Synthesis of stable hydrazones of a hidrazinonicotinyl-modified peptide for the preparation of 99mTc-labeled radiopharmaceuticals. *Bioconjugate Chemistry*, 1999; 10: 808-814
37. **Steenbergen, Charles and Frangogiannis, Nikolaos G.** *Muscle*. *Fundamental Biology and Mechanisms of Disease* 2012, Vol 1; Chapter 36: 495–521
38. **Marzilli et al.** *Journal of the american college of cardiology* 2012; 60 (11): 951-956
39. **Zierler KL:** Fatty acids as substrates for heart and skeletal muscle. *Circulation Research* 1976, 38:459-463.
40. **van der Vusse GJ, Glatz JF, Stam HC, et al.** *Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart*. *Physiological Reviews* 1992, 72:881-940.
41. **Schwenk R.W. et al.** Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease. *Cardiovascular Research* 2008; 79: 249–258.
42. **van der Vusse GJ et al.** *Cardiovascular Research* 2000; 45: 279 –293.
43. **Messina et al.** Delayed recovery of fatty acid metabolism after transient myocardial ischemia: A potential imaging target for "Ischemic Memory". *Current Cardiology Reports* 2007, 9:159-165.
44. **Nagara Tamaki et al.** The Role of Fatty Acids in Cardiac Imaging. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2000 41 (9)
45. **Lee et al.** 16-Cyclopentadienyl tricarbonyl 99mTc 16-Oxo-hexadecanoic acid: Synthesis and evaluation of fatty acid metabolism in mouse myocardium. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, Vol. 51, No. 12
46. **Magata et al.** A Tc-99m-Labeled long chain fatty acid derivative for myocardial imaging bioconjugate chemistry 2004; 15 (2)
47. **Walther et al.** Synthesis and biological evaluation of a new type of 99mTechnetium-labeled fatty acid for myocardial metabolism imaging bioconjugate chemistry 2007; 18 (1)
48. **Michael Eisenhut,** Trapping and metabolism of radioiodinated PHIPA 3-10 in the rat myocardium. *The Journal of Nuclear Medicine* 1997; 38 (12)
49. **Sogbein, Oyebola O.** New SPECT and PET radiopharmaceuticals for imaging cardiovascular disease. *BioMed Research International* Volume 2014, Article ID 942960

50. **Knapp FF Jr, et al.** New radioiodinated methyl-branched fatty acids for cardiac studies. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 1986, 12: S39-S44.
51. **Hom R.; Katzenellenbogen J.** Technetium-99m-labeled receptor-specific small-molecule radiopharmaceuticals: recent developments and encouraging results. *Nuclear Medicine and Biology* 1997; 24(6):485-98.
52. **Camacho X, García MF, Calzada V, Fernández M, Porcal W, Alonso O, Gambini JP, Cabral P.** Synthesis and evaluation of (99m)Tc chelate-conjugated bevacizumab. *Current Radiopharmaceuticals*. 2013 Mar;6(1):12-9.
53. **García MF.** Síntesis de ligandos heterocíclicos como agentes bifuncionales para la marcación de ^{99m}Tc de péptidos para imagen molecular de la expresión del receptor de alfa-MSH. Tesis de Maestría en Química. Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay, PEDECIBA Química. Diciembre 2012.
54. **T. D. Harris, M. Sworin, N. Williams, M. Rajopadhye, P. R. Dampohousse, D. Glowacka, M.J. Poirier y K. Yu.** Synthesis of stable hydrazones of a hidrazinonicotiny-Modified peptide for the preparation of 99mTc-labeled radiopharmaceuticals. *Bioconjugate Chemistry* 1999, 10, 808-814.
55. **Mathur, A. et al.** Syntheses and biological evaluation of ^{99m}Tc-HYNIC-fatty acids complex for myocardial imaging. *Royal Society of Chemistry Advances* 2015, 5, 93374-93385.