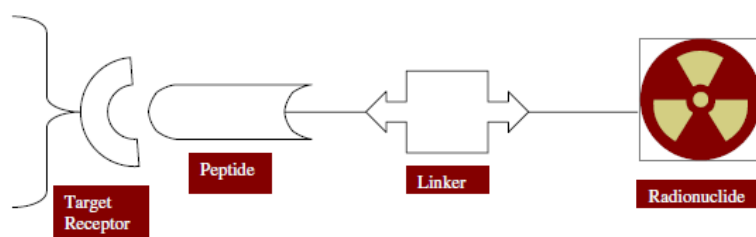


Marcación y evaluación biológica de KCCYSL con ^{99m}Tc como potencial radiofármaco para evaluación *in vivo* de la sobreexpresión de HER-2 en cáncer de mama.



Trabajo Final de la Licenciatura en Bioquímica

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

María Herbert

Febrero 2013

Tutor: Prof. Adj. Dr Pablo Cabral
Área Radiofarmacia
Centro de Investigaciones Nucleares.

ÍNDICE

Resúmen	4
Introducción general.....	5
<i>Cáncer</i>	<i>5</i>
<i>Cáncer de mama</i>	<i>5</i>
<i>Epidemiología y factores de riesgo del cáncer de mama.....</i>	<i>5</i>
<i>Epidemiología del cáncer de mama en Uruguay.....</i>	<i>6</i>
<i>Tipos de cáncer de mama.....</i>	<i>7</i>
<i>Carcinoma de mama in situ.....</i>	<i>7</i>
<i>Neoplasia lobular intraepitelial (LIN)</i>	<i>7</i>
<i>Carcinoma ductal in situ (DCIS)</i>	<i>7</i>
<i>Cáncer de mama invasivo.....</i>	<i>8</i>
<i>Carcinoma ductal invasivo (NOS)</i>	<i>8</i>
<i>Carcinoma lobular invasivo</i>	<i>8</i>
Desarrollo de la tesina.....	9
<i>Biomarcadores para la detección temprana del cáncer de mama</i>	<i>9</i>
<i>Receptores de la familia HER</i>	<i>9</i>
<i>HER-2/neu</i>	<i>11</i>
<i>Incidencia de la sobreexpresión de HER-2 en los distintos tipos de</i> <i>cáncer de mama.....</i>	<i>12</i>
<i>Identificación de biomoléculas a través de librerías de fagos.....</i>	<i>13</i>
<i>Aislamiento de péptidos derivados de la librería de fagos</i>	<i>13</i>
<i>KCCYSL, es un péptido con potencial agente imagenológico</i> <i>para imágenes in vivo.....</i>	<i>15</i>
<i>Radiofármacos peptídicos</i>	<i>16</i>
<i>Características que debe poseer un Radiofármaco peptídico</i> <i>para imágenes in vivo.....</i>	<i>16</i>
<i>Ventajas y limitaciones de un radiofármaco peptídico.....</i>	<i>16</i>
<i>Radiomarcado con ^{99m}Tc.....</i>	<i>17</i>
<i>Características que se deben cumplir para el marcado de</i> <i>biomoléculas con ^{99m}Tc</i>	<i>17</i>
<i>Tecnecio 99 metaestable (^{99m}Tc).....</i>	<i>18</i>

<i>La química redox del tecnecio.....</i>	<i>18</i>
<i>Reducción del $^{99m}\text{TcO}_4^-$ para el marcado de biomoléculas</i>	<i>18</i>
<i>Agentes quelantes bifuncionales.....</i>	<i>19</i>
<i>Requerimientos para un agente quelante bifuncional ideal.....</i>	<i>20</i>
<i>Técnicas de marcado</i>	<i>21</i>
<i> Marcado directo.....</i>	<i>21</i>
<i> Pre-Marcado.....</i>	<i>21</i>
<i> Post-Marcado</i>	<i>21</i>
<i>Técnicas de Imagenología molecular con radionucleídos.....</i>	<i>22</i>
<i> Centellografía de la mama</i>	<i>22</i>
<i> SPECT</i>	<i>22</i>
<i> PET-CT.....</i>	<i>23</i>
Materiales.....	24
Metodología.....	24
<i> Formulación del Vial A.....</i>	<i>24</i>
<i> Conjugación de DAP-KCCYSL-HYNIC (Vial B)</i>	<i>25</i>
<i> Almacenamiento del conjugado HYNIC-DAP-KCCYSL</i>	<i>25</i>
<i> Marcación con ^{99m}Tc del conjugado HYNIC-DAP-KCCYSL.....</i>	<i>25</i>
<i> Controles</i>	<i>25</i>
<i> Ensayos de Biodistribución.....</i>	<i>25</i>
<i> Determinación del Log P</i>	<i>26</i>
<i> Ensayo de Unión in vitro.....</i>	<i>26</i>
<i> Imágenes</i>	<i>26</i>
Resultados	27
Discusión	34
Conclusión	35
Referencias bibliográficas.....	36
Agradecimientos.....	40

RESUMEN

El diagnóstico temprano del cáncer de mama, es de vital importancia para un buen pronóstico de salud. Las señales celulares cambian durante el desarrollo del cáncer, y estos cambios son detectables a través de marcadores biológicos o biomarcadores, es decir, alteraciones medibles de los productos celulares y funciones que caracterizan a las diferentes etapas de la enfermedad.

El receptor HER-2 es un ejemplo de dichos biomarcadores y está amplificado en aproximadamente 20-30% de algunos tipos de cáncer de mama. Dicha sobreexpresión potencia la malignidad y el potencial metastásico del cáncer de mama y está asociado con una escasa probabilidad de sobrevivencia.

El HER-2 también se puede utilizar como blanco para obtener imágenes de distintos tipos de cáncer, entre ellos, el cáncer de mama.

El nuevo desarrollo de péptidos para imagen molecular del cáncer está evolucionando rápidamente debido a la aplicación de la química combinatoria y la librería de fagos. La librería de fagos puede ser un medio atractivo para obtener péptidos, que tienen como objetivo distintos tipos de tumores.

El péptido KCCYSL, fue obtenido de dicha librería, está constituido por seis aminoácidos (K=Lisina, C=Cisteína, C=Cisteína, Y=Tirosina, S=Serina, L=Leucina) y se une al dominio extracelular del receptor peptídico HER-2 que se sobre expresa en las células de algunos tipos de cáncer de mama.

Dicho péptido fue utilizado en el presente trabajo como potencial agente imagenológico molecular *in vivo* para distintos tipos de cáncer de mama que expresan el receptor HER-2. Se utilizó el radionucleído ^{99m}Tc para marcar el péptido, debido a su excelente química y características de imagen, disponibilidad del generador y su bajo costo.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Cáncer

La diferenciación celular y la pérdida de control de la proliferación son las características de las células tumorales, así como las manifestaciones fenotípicas de varias alteraciones genéticas, principalmente modificaciones en los genes reguladores del ciclo celular.¹

La progresión del cáncer es un proceso de varios pasos. Con cada paso, la genética y los eventos epigenéticos en el proceso se vuelven cada vez más complejos y pueden ser más difíciles de tratar. A medida que el cáncer progresa a partir de una sola célula neoplásica a un tumor grande y letal, adquiere una serie de mutaciones, siendo:

- 1) auto-suficiente para las señales de crecimiento; por la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores,
- 2) insensibilidad a las señales de autotrecimiento y apoptosis
- 3) capacidad para realizar replicaciones celulares ilimitadas, y
- 4) metástasis tumorales.

La evidencia experimental y clínica actual indican que éstas propiedades neoplásicas pueden ser necesarias, pero no suficientes, para que una célula cancerígena avance en una población de células tumorales, lo que se hace clínicamente detectable, metastásico, y letal. Para que un tumor pueda desarrollar un fenotipo altamente maligno y mortal, primero debe contratar y mantener su propio suministro de sangre, un proceso conocido como angiogénesis tumoral.^{2, 29}

Cuando el cáncer es descubierto de manera temprana, los pacientes tienen mayor probabilidad de sobrevivencia, requiere menos tratamiento intensivo, y en general, es mejor el pronóstico que en los pacientes con un cáncer más avanzado.³

Cáncer de mama

Epidemiología y factores de riesgo del cáncer de mama

El cáncer de mama es el más común de todos los tipos de cáncer entre las mujeres,⁵ la principal causa de muerte en el mundo y la malignidad invasiva más común en las mujeres en Estados Unidos. Ha habido un incremento sostenido de la incidencia de dicho cáncer en países desarrollados en los años recientes. El cáncer de mama representa un 22% de todos los tipos de cáncer femeninos, que es más del doble de la incidencia del cáncer que en cualquier otro sitio no desarrollado.⁴

La prevalencia del cáncer de mama, como en la mayoría de los tumores epiteliales, aumenta rápidamente con la edad. Alrededor de la década del 90', la incidencia del cáncer de mama aumentó diez veces en todo el mundo, lo que indica importantes diferencias en la distribución de las causas subyacentes. Existe una variación sustancial en las tasas de cáncer de mama entre los diferentes países. La incidencia es seis veces mayor en los EE.UU., Canadá y el norte de Europa que en Asia o entre las poblaciones negras de África. Estas diferencias internacionales en las tasas de cáncer de mama no parecen estar determinadas principalmente por la variación en la susceptibilidad genética. Los estudios de poblaciones que migran de las zonas de bajo riesgo a las de alto riesgo, muestran que las poblaciones migrantes se aproximan al riesgo de contraer cáncer de mama del país anfitrión en una o dos generaciones^{4, 28}, sugiriendo claramente un importante papel de los factores ambientales en la etiología de la enfermedad. La

etiología del cáncer de mama es multifactorial e incluye la dieta, los factores reproductivos y los relacionados con los desequilibrios hormonales. Los factores de riesgo conocidos para el cáncer de mama (Tabla 1) se pueden entender como medidas de la exposición acumulativa de la mama a los estrógenos y probablemente la progesterona. Las acciones de estas hormonas ováricas (y las hormonas utilizadas en la combinación de anticonceptivos orales y terapia de reemplazo hormonal) en el seno no parecen ser genotóxicos, pero sí afecta a la tasa de división celular. Sus consecuencias sobre las tasas de cáncer de mama se manifiestan en sus efectos sobre la proliferación de las células epiteliales de la mama. La activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores (por ejemplo, BRCA1, TP53) producen una serie de cambios genéticos que conducen a un fenotipo maligno. Como las hormonas endógenas afectan directamente el riesgo de contraer cáncer de mama, hay razón para preocuparse por los efectos sobre el riesgo de cáncer de mama, si las mismas hormonas u otras hormonas estrechamente relacionadas son administradas con fines terapéuticos. Se ha relacionado la exposición a factores ambientales con el desarrollo del cáncer de mama (por ejemplo, la radiación, el alcohol, las hormonas exógenas), pero tienen un menor riesgo. A diferencia de la mayoría de las neoplasias humanas, el cáncer de mama a menudo muestra un clustering familiar. Han sido identificados dos genes de alta penetrancia (BRCA 1 y 2) que aumentan considerablemente el riesgo de contraer cáncer de mama. La Tabla 1 muestra los acontecimientos de la vida reproductiva que han sido considerados como factores de riesgo para el cáncer de mama en las mujeres. El cáncer de mama es más frecuente entre las mujeres que tienen una menarquia temprana, son nulíparas o tienen pocos niños y la menopausia con una edad avanzada.^{4, 30}

Tabla 1. Factores de riesgo en el cáncer de mama.⁴

Menarquía temprana
Menopausia tardía
Obesidad (mujer postmenopáusica)
Tener el primer hijo a una edad avanzada
Nuliparidad
Anticonceptivos orales

Epidemiología del Cáncer de mama en Uruguay

En muchos países, incluyendo al Uruguay, el cáncer de mama es un grave problema sanitario, cuya importancia se ha acrecentado en los últimos años.

De acuerdo a la información epidemiológica publicada por Saracci, R. y Repetto, F., se ha notado un aumento importante en la incidencia del cáncer de mama, constituyéndose en el cáncer más frecuente en la mujer después del cáncer de piel. Concomitantemente ha habido un aumento en la mortalidad por cáncer de mama, manteniéndose las dos curvas, morbilidad y mortalidad, paralelas y ascendentes.

En el Uruguay, cuyo perfil oncológico es similar al de los países desarrollados de occidente, el cáncer de mama tiene una importancia primordial. La tendencia de la mortalidad, francamente ascendente y la incidencia que prácticamente duplica la de

pulmón en hombres, hablan de la magnitud de su importancia. En el año 2000, en nuestro país, fallecieron por cáncer de mama 669 mujeres.⁶

Tipos de Cáncer de mama

Todos los carcinomas de mama, tanto invasivos como no invasivos, son clasificados según su apariencia histológica y/o citológica. Sin tomar en cuenta el tipo de carcinoma, determinadas características del mismo deben tomarse en cuenta incluyendo, sitio, tamaño, forma, consistencia, color, apariencia grossa de los márgenes, relación a estructuras mamarias adyacentes (piel, pezón) y extra mamarias (músculo), y el número de focos que aparecen malignos.⁴

Si bien según clasificación histológica se conocen 17 tipos distintos de cáncer de mama, los más comunes son los que se describen a continuación.

Carcinoma de mama in Situ

El carcinoma de mama in situ, es una proliferación maligna de las células epiteliales dentro del sistema ducto-lobular de la mama que en la microscopía de luz no muestra evidencia de rotura de la membrana basal para invadir el estroma adyacente.

Existen dos tipos: ductal y lobular.⁴

Neoplasia lobular intraepitelial (LIN)

Está localizada dentro de la unión ducto-lobular terminal, a menudo acompañada por una implicación pagetoide (pagetoid) de los ductos terminales adyacentes. LIN, generalmente es descubierto durante el período peri menopáusico, es clínicamente no aparente y usualmente detectado incidentalmente en biopsias que se realizan a causa de otras lesiones. Esto está asociado con un incremento en el riesgo de cáncer de mama invasivo de cualquier tipo, en cualquiera de las mamas, y por lo general muchos años después.⁴

Carcinoma ductal in situ (DCIS)

Es un grupo heterogéneo de lesiones pre-malignas que por lo general son asintomáticas e impalpables, pero pueden ser identificables en una mamografía como focos de microcalcificaciones. Existen tres categorías dentro del DCIS:

- 1) DCIS pobremente diferenciado
Este sub-tipo tiene el riesgo más alto de invasión estromal.
- 2) DCIS moderadamente diferenciado
- 3) DCIS bien diferenciado

Las lesiones en el grupo DCIS pobremente diferenciado son generalmente HER-2 positivo. El tratamiento del DCIS depende del tamaño y la distribución de la lesión. El estado de los márgenes de escisión alrededor del tumor sigue siendo el factor más importante en términos de riesgo de recurrencia local. El carcinoma microinvasor (límite de tamaño de 1 mm) es raro y se presenta principalmente en asociación con el carcinoma in situ, por lo general del tipo pobremente diferenciado.⁴

Cáncer de mama invasivo

El cáncer de mama invasivo es un grupo de tumores epiteliales malignos caracterizados por la invasión del tejido adyacente y por una marcada tendencia a la metástasis a sitios distantes. El cáncer de mama surge del epitelio mamario, más frecuentemente de las células de la unidad ducto-lobular terminal. La gran mayoría de estos tumores son adenocarcinomas.⁴

Carcinoma ductal invasivo (NOS)

Este es un grupo heterogéneo, el cual representa el tipo más común de carcinoma invasivo, que comprende entre el 40% y 75% en las series publicadas.⁴ Los tumores NOS ductales como la mayoría de las formas del cáncer de mama, son poco común por debajo de los 40 años de edad.⁴ El carcinoma invasivo se asocia a menudo con un alto grado de carcinoma ductal in situ. Si un carcinoma ductal NOS, va acompañado de un segundo patrón morfológico distinto (lobular), el cáncer se define como mixto. Existen muchas variantes del carcinoma ductal NOS. Aproximadamente un 15-30% de los casos son HER-2 positivo.⁴

Carcinoma lobular invasivo

El carcinoma lobular invasivo representa el 5–15% de los tumores de mama invasivos y frecuentemente son multifocales y bilaterales.⁴

La sobreexpresión del HER-2 es más baja que en el Carcinoma ductal invasivo, con la excepción del patrón pleomórfico.⁴

DESARROLLO DE LA TESINA

Biomarcadores para la detección temprana del cáncer de mama

El cáncer puede ser considerado como una enfermedad genética a nivel somático, y su desarrollo requiere la interacción coordinada de los productos de los genes y las vías de señalización en las células cancerosas genéticamente no reguladas y entre los diferentes tipos de células, transformadas y normales, coexistiendo dentro del tumor.

En los años recientes, mediante varios estudios de la patogénesis molecular del cáncer, se han encontrado nuevas vías de regulación y redes que nos han permitido identificar los genes y las proteínas cuya alteración de la expresión, paralela a la transformación oncogénica, se traduce en modificaciones morfológicas e histológicas de las células.

Las señales celulares cambian durante el desarrollo del cáncer, y estos cambios son detectables a través de marcadores biológicos o biomarcadores, es decir, alteraciones medibles de los productos celulares y funciones que caracterizan a las diferentes etapas de la enfermedad.

En el cáncer de mama, los rasgos que caracterizan la malignidad de las células que son, autosuficiencia en las señales de crecimiento proliferativas (alteraciones que implican productos de oncogenes *ras*, tales como, *c-myc*, hormonas y receptores de factores de crecimiento como miembros de la familia HER/erbB), la insensibilidad a las señales inhibitoras de crecimiento [es decir, la expresión desregulada de las ciclinas, quinasas dependientes de ciclina (CDK) y los inhibidores de CDK (CDKIs)], la evasión de la apoptosis, el potencial de replicación ilimitado (sostenida también por la reactivación de la telomerasa), activación de las vías que conduce a neo-angiogénesis, invasión y metástasis; son ejemplificados por los biomarcadores que han demostrado estar asociados con la progresión de la enfermedad.

Existe una asociación directa o indirecta entre la expresión de distintos biomarcadores que se relacionan con la malignidad y el resultado clínico. Esta asociación es útil para identificar un gradiente en el perfil de riesgo.⁴

Los biomarcadores son capaces de definir riesgos e identificar los estadios tempranos del desarrollo del tumor, ayudar a detectar el tumor y diagnosticarlo, dar un tratamiento adecuado para los pacientes según el grado de avance, predecir los resultados de la enfermedad, y ayudar en la vigilancia de la recurrencia de la enfermedad.³

Receptores de la familia HER

Familia HER

La familia HER pertenece al grupo de receptores de factores de crecimiento epidérmico tirosina quinasa del tipo 1 (RTK) ⁷ y se compone de cuatro genes que codifican para cuatro tipos de receptores homólogos, ellos son; HER-1 ó receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), HER-2/neu, HER-3 y HER-4.⁸

Estos receptores están localizados sobre la membrana celular en una variedad de tejidos. Los receptores interactúan con varios ligandos de factores de crecimiento, los cuales tienen motivos en común semejantes a EGF de aproximadamente 50 aminoácidos.

Los receptores HER tienen una estructura similar, que consiste en un dominio extracelular de unión al ligando rico en cisteína, una parte lipofílica transmembrana y un

dominio intracelular tirosina quinasa transductora de senales, el cual tiene un segmento regulador carboxilo terminal.

Los receptores HER existen como monómeros y su activación depende usualmente de la presencia de sus ligandos. Tras la unión del ligando, los distintos receptores se asocian con cada uno de los otros para formar diez dímeros distintos, los cuales están como homodímeros o heterodímeros. Los dímeros son usualmente más estables que los receptores monoméricos. Los ligandos de los receptores HER poseen un sitio de alta afinidad que se une directamente a HER-1, HER-3, o HER-4 y un sitio de baja afinidad que recluta HER-2 como un heterodimerization partner. De modo que HER-2 funciona como un correceptor para muchos ligandos y es usualmente transactivado por ligandos parecidos a factores de crecimiento endotelial (EGF), resultando en la formación del heterodímero HER1-HER2, mientras que la neuregulina induce la formación de HER2-HER3 y HER2-HER4.^{8, 31} Los heterodímeros son caracterizados por un nivel más lento de disociación de ligandos que los homodímeros y por lo tanto genera una transducción de senales más potente (Fig. 1).

Además, los heterodímeros que contienen HER2 se someten a un nivel más lento de endocitosis inducida por el ligando comparado con los demás receptores HER y de éste modo tiene una potencia de señal particularmente alta.

El heterodímero HER2-HER3 es la combinación mitogénica más potente y es el que predomina en las células de carcinoma.⁸

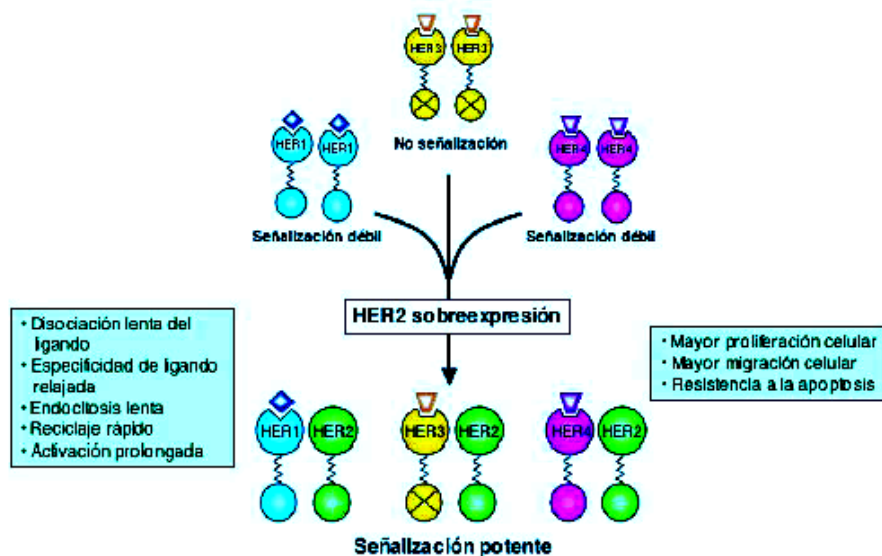


Figura 1: Características de los heterodímeros que contienen HER-2. Cuando HER-2 se sobreexpresa, preferencialmente se forman heterodímeros que contienen HER-2. A diferencia de los homodímeros de la familia HER que o bien son inactivos (homodímeros HER-3) o señalizan de manera muy débil, los heterodímeros que contienen HER-2 tienen características que prolongan y aumentan su señalización (recuadro izquierdo) o sus respuestas celulares (recuadro derecho).²⁶

Her-2/neu

El gen HER-2, también conocido como c-erbB2 ó neu, se encuentra en el cromosoma 17q12 y codifica para un receptor del factor de crecimiento localizado en la membrana celular.¹⁰

HER-2 es una glicoproteína transmembrana, la cual contiene un dominio extracelular extenso, un pequeño dominio transmembrana hidrofóbico, y un dominio intracelular citoplasmático que contiene el dominio quinasa y el dominio carboxilo terminal, el cual es autofosforilado tras la activación del receptor.⁸

HER-2 ha recibido mucha atención como biomarcador para el cáncer de mama y próstata, como un blanco específico para imagen del cáncer y como desarrollo de agente terapéutico.⁹

HER-2 es un miembro de la familia HER de receptores tirosina quinasa y está normalmente involucrado en la transducción de senales principalmente para el crecimiento y diferenciación celular.¹¹

Cuando HER-2 se expresa normalmente, la unión del ligando a los receptores HER, forma solo unos pocos heterodímeros HER-2 y la señal mediada por HER2/neu es débil, resultando en el crecimiento normal de las células.¹²

El gen HER-2, se presenta con una copia simple en células epiteliales normales, y está amplificado en numerosos tipos de células malignas, y dicha sobreexpresión puede contribuir a la iniciación y progresión del cáncer de mama.⁸

El receptor HER-2 está sobre expresado en un 20-30% de los cánceres de mama.⁹ Dicha sobreexpresión potencia la malignidad y el potencial metastásico del cáncer de mama y está asociado con una escasa probabilidad de sobrevivencia.

Los receptores de la familia HER tirosina quinasa son activados por dimerización que puede ser entre receptores idénticos (homodimerización) o entre distintos miembros de la misma familia (heterodimerización) (Fig. 2). Los mecanismos que causan la dimerización son, la unión de ligandos (factores de crecimiento), la sobreexpresión del receptor y la transactivación por otro receptor.^{13, 32}

HER-2 es el receptor más importante de la familia. Éste es el único miembro para el cual no se conoce un ligando específico; sin embargo, es el co-receptor preferido para formar dímeros con receptores de factores de crecimiento epidérmico (EGFR), HER-3 o HER-4. Los heterodímeros entre HER-2 y los otros receptores muestran una mayor capacidad para la transducción de senales mitogénicas que los homodímeros y ellos potencian la transformación celular. HER-2 es considerado el principal coordinador de la activación de la red de senales por los receptores de la familia HER. Cuando los receptores se dimerizan, se desencadena su actividad tirosina quinasa y se autofosforilan los residuos específicos de tirosina del dominio intracelular. Estos eventos causan la activación de una serie de respuestas fisiológicas y bioquímicas involucradas en la transducción de senales celulares mitogénicas.

Una serie de observaciones apoyan que la sobreexpresión de HER-2 tiene un rol directo en la patogénesis y agresividad clínica de los tumores:

- a) La introducción de HER-2 en células sanas causa una transformación maligna,
- b) Los ratones transgénicos que expresan HER-2 desarrollan tumores de mama,
- c) Los tumores humanos de mama que sobreexpresan HER-2 cursan con una mayor agresividad clínica.¹³

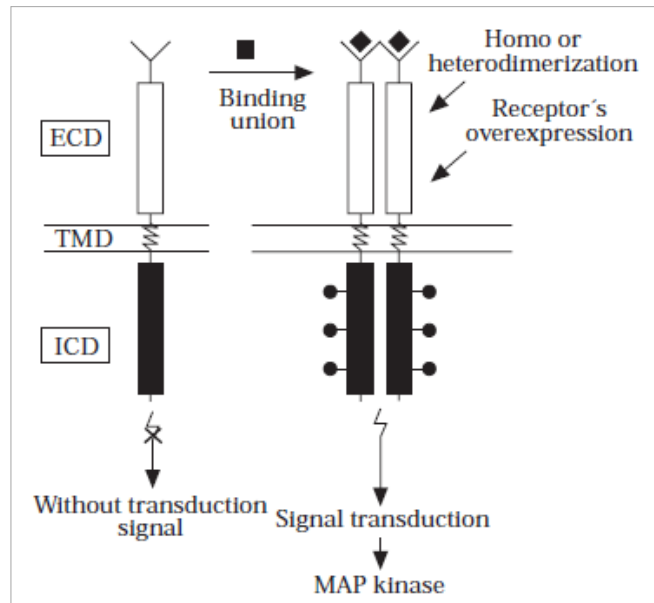


Figura 2: El receptor HER-2 consiste en un dominio extracelular (ECD) para la unión de ligandos, un segmento transmembrana lipofílico (TMD) y un dominio intracelular (ICD) con actividad tirosina quinasa, el cual tiene una porción reguladora carboxilo terminal. Los receptores monoméricos (izquierda) están inactivos, la activación del receptor produce la dimerización (derecha). Luego de la dimerización, se produce la actividad tirosina quinasa y la autofosforilación. Dichos eventos provocan una cascada de respuestas fisiológicas y bioquímicas que finalizan en señales mitogénicas (derecha).¹³

Incidencia de la sobreexpresión de HER-2 en los distintos tipos de cáncer de mama

Varios estudios han demostrado que la sobreexpresión de HER-2 en el cáncer de mama invasivo se correlaciona con un mal pronóstico, menor sobrevivencia, y la alteración de la respuesta a la terapia hormonal y la quimioterapia.^{10, 33} En el carcinoma ductal in situ, la sobreexpresión de HER-2 se encuentra en más del 50% de los casos y se asocia principalmente con el tipo pobremente diferenciado.^{10, 34}

FISH y análisis Southern blot han demostrado que la sobreexpresión de HER-2 en el carcinoma ductal in situ es también el resultado de la amplificación de genes HER-2.¹⁰

La ausencia de la sobreexpresión de HER-2 en los conductos normales y ADH, y la frecuente amplificación de HER-2 encontrada en DCIS sugiere que las alteraciones de HER-2 son eventos importantes en la transformación maligna temprana. Sin embargo, una aparente paradoja es la frecuencia más alta de la amplificación del gen HER-2 en el carcinoma ductal in situ (50%) en comparación con el cáncer de mama invasivo (15-25%). Es muy raro que HER-2 se sobre exprese en el Carcinoma lobular in situ (LCIS), mientras que la enfermedad de Paget del pezón muestra la sobreexpresión de HER-2 en la mayoría de los casos. La hipótesis de que la amplificación de HER-2 en DCIS, tiene una menor probabilidad de convertirse en invasivo en comparación con otros tipos de DCIS, no debe confundirse con la noción de que estas lesiones son inocentes: cuando la amplificación de HER-2 en DCIS se convierte en invasivo, el HER-2 amplificado en el carcinoma invasivo se asocia con una escasa sobrevivencia. Datos recientes han demostrado que el HER-2 positivo se asocia con una regulación positiva de la expresión de la cicloxigenasa de tipo-2 (COX-2) en DCIS. COX-2 ha sido relacionado con el

proceso de tumorigénesis en ratones. Otros informes han demostrado una mayor expresión del nivel de COX-2 en DCIS que en los carcinomas ductales invasivos. Estos hallazgos sugieren que la vía de HER-2 juega un papel importante en la regulación positiva de COX-2 en la etapa pre-invasiva de la tumorigénesis del cáncer de mama.¹⁰

Identificación de biomoléculas a través de librerías de fagos

Los nuevos ensayos basados en péptidos para facilitar la imagen molecular de enfermedades están evolucionando rápidamente debido a la aplicación de la química combinatoria y la librería de fagos.

La librería de fagos es una técnica de gran alcance que permite la detección de extensas secuencias, proporcionando un medio para obtener péptidos que se unen a cualquier blanco dado mejorando su afinidad por él. Desde su creación en 1985, varios miles de péptidos se han aislado e investigado. Estos péptidos se están explorando en distintas áreas, entre ellas, la inhibición de enzimas, el desarrollo de vacunas, las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, etc.

La librería de fagos fue desarrollada por George P. Smith en la Universidad de Missouri en 1985, y se inició con el hallazgo de fagos filamentosos de *Escherichia Coli* (*E. Coli*) que son diseñados para exhibir secuencias de aminoácidos foráneas sobre la cubierta proteica (cp) de algunos fagos, sin comprometer la infectividad del fago o su capacidad de propagación.

La tecnología de la librería de fagos se está convirtiendo en un método poderoso, rápido, económico y eficaz para desarrollar nuevos agentes para imagen molecular y diagnóstico del cáncer.¹⁴

Aislamiento de péptidos derivados de la librería de fagos.

Los fagos filamentosos se auto-ensamblan en una varilla de $\sim 900 \text{ nm} \times 6 \text{ nm}$ como estructuras encapsuladas, dentro de la cual está la información genética para dictar su propia producción. La codificación genética de una biblioteca permite la re-síntesis y la detección de moléculas con la actividad de unión deseada. La amplificación de las moléculas que interactúan en posteriores rondas de selección por afinidad puede producir péptidos que se unen a casi cualquier blanco dado. La expresión de secuencias foráneas en el fago no se limita a pequeños péptidos, también pueden ser exhibidos fragmentos de anticuerpos, receptores y enzimas.¹⁴ Generalmente, en una librería de fagos, pequeños péptidos foráneos (5-45 aminoácidos) se incorporan en el extremo N-terminal menor de la cubierta proteica III (CPIII) del fago fd de modo que más de cinco copias del péptido pueden ser exhibidas.¹⁴ Los péptidos foráneos también han sido fusionados a la cubierta proteica principal VIII (cpVIII) del fago para que cientos o miles de copias del péptido puedan ser exhibidos.¹⁴ Cada clon de fago muestra un solo péptido, pero una biblioteca en su conjunto pueden representar 10^9 péptidos, de manera colectiva. La exposición en la superficie de un fago del péptido foráneo es la clave para el éxito de cribado, ya que permite que un gran número de péptidos puedan ser examinados fácilmente para los clones de péptidos exhibidos que se unen específicamente a una diana molecular dada. El rastreo de una biblioteca de fagos típicamente consiste en pasar la biblioteca sobre las moléculas diana deseadas ya sea *in vitro*, con células cultivadas, *in situ* o *in vivo*, capturando los clones unidos, y lavando los fagos no unidos. Los fagos unidos son recuperados con ácido o por elución

competitiva. Los fagos capturados mantienen la infectividad y pueden ser reproducidos y clonados mediante la infección de bacterias huésped frescas (Figura 3). La estructura primaria del péptido foráneo puede ser fácilmente elucidada mediante secuenciación del péptido de la secuencia codificada en el ADN viral. El proceso de selección por afinidad es iterativo, por lo general se requiere un mínimo de cuatro rondas de selección para obtener una fago enriquecido con una alta afinidad de unión por el blanco.¹⁴

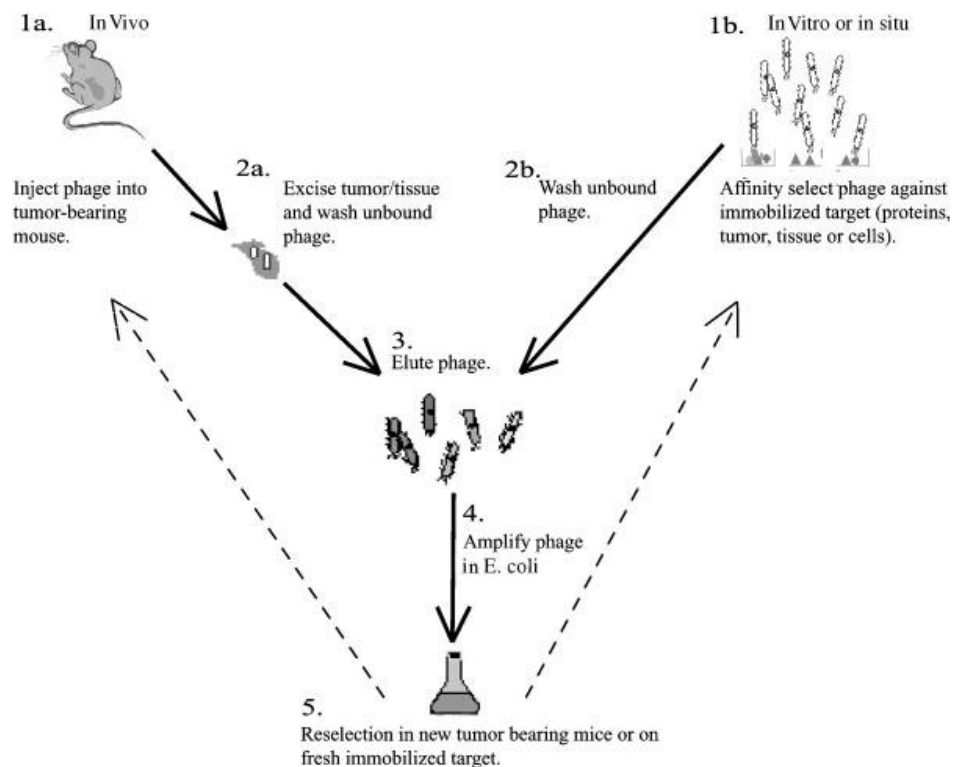


Figura 3: Diagrama esquemático de la selección de fagos in vitro e in vivo de clones de fagos blancos de tumores y resultado deducido de las secuencias peptídicas. La estrategia aleatoria de selección, de la librería de fagos peptídicos de 15 aminoácidos en fUSE5 (G. Smith) son inicialmente pasados (no mostrados) a través de ratones sin tumores (pre-clearance). **1a:** La librería amplificada (10^{12} unidades de transducción) es seleccionada por 1 h en ratones con tumores y el tejido se extirpa. **1b:** Los fagos se añaden a dianas inmovilizadas (proteínas, células cultivadas, biopsias tumorales, secciones de tejidos) y se deja unir. **2a:** Los tumores o tejidos son extirpados del ratón. **2b:** Los fagos no unido son lavados de las placas. **3:** Para eluir los fagos de los tumores y tejidos extirpados, distintas condiciones de elución, incluyendo varios detergentes, se utilizan para recuperar la mayor cantidad de clones con alta afinidad, específicamente fagos unidos. La unión de fagos a los blancos inmovilizados (proteínas, cultivos celulares, biopsias tumorales) son eluidos con un buffer de bajo pH. **4:** Los fagos son amplificados en bacterias *E. Coli* frescas. **5:** Los fagos son re seleccionados en nuevos ratones con tumores o en un blanco inmovilizado.²⁵

KCCYSL, es un péptido con potencial agente imagenológico para imágenes *in vivo*

Los péptidos pueden servir como potentes sondas moleculares que pueden utilizarse en el diagnóstico y tratamiento de pacientes con cáncer. Los péptidos que se unen a marcadores asociados a células tumorales se aplican en estudios de imagen y terapia, ya que poseen propiedades farmacocinéticas apropiadas (alta afinidad, especificidad y captación tumoral) para ser utilizados como agentes de imagen del cáncer.²⁵

Los péptidos ofrecen ventajas fundamentales sobre los anticuerpos para imágenes *in vivo* y diagnóstico molecular, debido a su rápida depuración de la sangre, su alta penetración en los tejidos, mayor difusión, su naturaleza no inmunogénica, y su síntesis directa.¹⁴ Su pequeño tamaño puede reducir o eliminar los efectos secundarios tanto para imagen o terapia que a menudo ocurre con los anticuerpos o fragmentos de éstos. Sin embargo, el péptido marcado con un radionucleído solo puede ser viable como

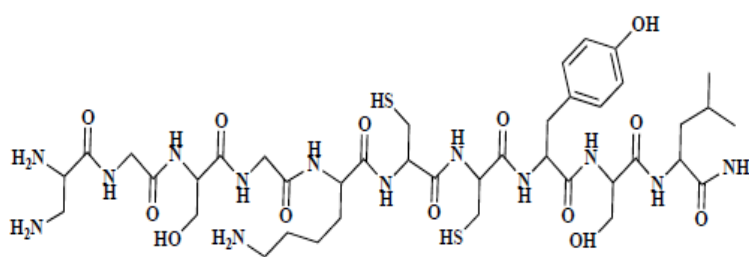


Figura 4: Estructura química de DAP-GSG-KCCYSL.⁹

agente de imagen molecular si retiene una suficiente afinidad de unión por el blanco. Un conjunto limitado de péptidos que se unen a receptores que están sobre expresados en algunos tipos de tumores presentan una alta afinidad de unión (sub-nanomolar) y se están utilizando para estudios de imagen y terapia.¹⁴

Uno de los mejores ejemplos de péptidos seleccionados de la librería de fagos utilizado con éxito en imágenes de tumores es el péptido KCCYSL dirigido contra el receptor peptídico HER-2. KCCYSL se obtuvo a partir de una biblioteca de fagos fUSE5-CPIII generado en el laboratorio de George P. Smith, y está constituido por seis aminoácidos.¹⁴ Los aminoácidos constituyentes del péptido son: **K**=Lisina, **C**=Cisteína, **C**=Cisteína, **Y**=Tirosina, **S**=Serina, **L**=Leucina.

Se han identificado ligandos o factores de crecimiento no conocidos para HER-2, pero se sabe que heterodimeriza con otros miembros de la familia, activando varias vías de señalización resultando en un aumento de la adhesión de las células cancerígenas, crecimiento, angiogénesis y la supervivencia celular. HER-2 ha recibido mucha atención, tanto como biomarcador para el cáncer de mama y de próstata, como blanco para obtener imágenes de cáncer tipo específico y como agente terapéutico. Se ha demostrado que KCCYSL se une al dominio extracelular (ECD) de HER-2, con una alta afinidad y se limita a los cultivos de líneas celulares de carcinoma que sobre expresan HER-2 incluyendo el cáncer de mama, próstata y líneas celulares del cáncer de ovario.¹⁴ El péptido, KCCYSL, fue conjugado con DAP (Fig. 4) y HYNIC conjuntamente, y luego marcado con ^{99m}Tc.

Radiofármacos peptídicos

El marcado de péptidos con radioisótopos constituye el área más importante de investigación en medicina nuclear, así como en muchos campos, como la oncología, neurología, cardiología, infección, inflamación, aterosclerosis, y trombosis, entre otras.¹⁵

La creciente evidencia de la sobreexpresión de los receptores peptídicos en varios tumores ha generado un gran interés en el desarrollo de péptidos específicos para el blanco de estos tumores tanto para diagnóstico como terapia.

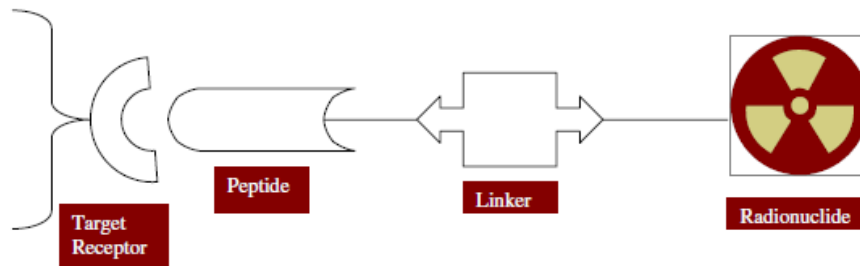


Figura 5: Estrategia general para el target de un receptor con un radiofármaco peptídico.¹⁶

El desarrollo exitoso de un análogo de un péptido radiomarcado que se une a un receptor depende de las modificaciones moleculares del péptido natural conocido, mientras se preserva su afinidad de unión original por el receptor blanco (Fig. 5).¹⁶

Características que debe poseer un Radiofármaco peptídico para imágenes *in vivo*

Varios tumores sobreexpresan diferentes receptores peptídicos y tanto los agonistas como los antagonistas sintéticos radiomarcados para la unión de esos receptores pueden ser usados para imagen y terapia.

Para que un radiofármaco peptídico pueda ser utilizado clínicamente para imagen *in vivo* de tumores debe poseer las siguientes características:

- 1) Alta afinidad por el receptor blanco
- 2) Ser fácil de preparar
- 3) Alta estabilidad *in vivo* y,
- 4) Alta especificidad de captación y retención en los tumores, con un rápido aclaramiento en los tejidos no target vía sistema renal.

La captación del tumor de un radiofármaco peptídico depende no solo de la afinidad de unión al receptor, sino también de la farmacocinética, la cual está determinada por las propiedades físicas y químicas, tanto del péptido como del agente quelante.¹⁶

Ventajas y limitaciones de un radiofármaco peptídico

Los péptidos pequeños son una herramienta de gran valor para el diagnóstico de tumores y radioterapia de receptores peptídicos, porque ellos ofrecen ventajas bien claras con respecto a otras moléculas bioactivas como proteínas y anticuerpos monoclonales.

Los péptidos pequeños son fácilmente sintetizados y manipulados molecularmente para optimizar su afinidad por un receptor particular y exhiben un patrón de biodistribución más específico. Porque dichos péptidos usualmente muestran una farmacocinética favorable caracterizada por una alta concentración en los tejidos blanco y un rápido aclaramiento de la sangre y de los tejidos no blanco. Dichos péptidos tienen la habilidad de penetrar hacia los tumores más rápido que los anticuerpos monoclonales y alcanzan el receptor peptídico en las células tumorales más eficientemente.

Los péptidos poseen la habilidad de tolerar severas condiciones (pH, temperatura, etc.) de la modificación química y/o el radiomarcado.

A pesar de las ventajas, la dificultad con los péptidos es a menudo su corta vida media biológica, por su rápida proteólisis en el plasma debido a las proteasas y peptidasas endógenas. La destrucción enzimática puede ser inhibida a través de modificaciones moleculares.^{16, 36}

Otro problema asociado con los péptidos pequeños es la pérdida de la afinidad de unión cuando se acopla con el quelante y/o la introducción de un radiomarcado.^{14, 35} Dicho problema puede ser minimizado por un radiomarcado directo al sitio que se puede lograr insertando un grupo espaciador entre la secuencia de unión y el agente quelante.¹⁶

Aunque los péptidos radiomarcados son excelentes agentes moleculares de imagen, debido a su corta vida media plasmática y su baja retención renal muchas veces necesitan ser mejorados para ser trasladados a los seres humanos, sobre todo si se utilizan como agentes terapéuticos. La alta captación en el riñón se ha observado para la mayoría de los péptidos radiomarcados comúnmente estudiados.^{14, 37} Para fines de imagen, la gran captación renal reduce mucho la sensibilidad de detección si el tumor se encuentra en la vecindad del riñón.¹⁴

Radiomarcado con ^{99m}Tc

Características que se deben cumplir para el marcado de biomoléculas con ^{99m}Tc

Los radiofármacos de ^{99m}Tc se utilizan en concentraciones muy bajas. Por lo tanto, la cinética de marcado debe de ser tomada en cuenta en el desarrollo de radiofármacos de ^{99m}Tc .

^{99m}Tc se obtiene a partir del generador de ^{99}Mo - ^{99m}Tc como $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (pertechnetato) en solución salina. Esto requiere que el radiomarcado se realice en solución acuosa. Debido a la corta vida media ($t_{1/2} = 6,02 \text{ h}$) del ^{99m}Tc , la radiosíntesis debe de ser completada en 30 minutos. La pureza radioquímica (RCP) del radiofármaco debe ser mayor al 90%, la inyección de una mezcla que contiene diferentes especies de ^{99m}Tc , disminuirá la relación órgano/especificidad, y aumentará innecesariamente la carga de radiación al paciente. Dado que todos los radiofármacos ^{99m}Tc se administran por vía intravenosa, la radiosíntesis debe llevarse a cabo bajo condiciones estériles y libres de pirógenos. Afortunadamente, la mayoría de estos requisitos se han cumplido satisfactoriamente con el desarrollo de la química de coordinación del ^{99m}Tc y de las nuevas técnicas de marcado.¹⁷

Tecnecio 99 metaestable (^{99m}Tc)

El radionucleído ^{99m}Tc , es emisor gamma y tiene un rol dominante en el diagnóstico en medicina nuclear, debido a la disponibilidad del generador, características de decaimiento favorables y bajo costo.¹⁸

^{99m}Tc emite rayos gamma de 140 keV con 89% de abundancia, el cual está próximo al óptimo para imagen con gamma cámaras comerciales. La ausencia del daño al tejido a causa de la radiación permite inyecciones de actividad de más de 30 mCi con una baja exposición a la radiación por parte del paciente.¹⁹

^{99m}Tc se produce a partir de ^{99}Mo , un producto de fisión con una vida media de 2,78 días. En un generador ^{99}Mo - ^{99m}Tc , $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ se absorbe a una columna de alúmina y ^{99m}Tc es formado por el decaimiento del ^{99}Mo .

$^{99m}\text{TcO}_4^-$ se eluye de la columna con solución salina. El ^{99m}Tc producido por el generador no tiene un rendimiento del 100% ya que 13% del ^{99}Mo decae directamente a un isótopo de larga vida media, el ^{99}Tc ($t_{1/2} = 2,13 \times 10^5$). La actividad específica del eluido ^{99m}Tc depende del tiempo de elución anterior (el intervalo de tiempo entre las eluciones).¹⁷

La vida media de 6 horas del ^{99m}Tc es suficientemente larga como para la preparación farmacéutica y la acumulación *in vivo* en el tejido blanco, pero suficientemente pequeña para minimizar la dosis de radiación al paciente o causar repercusiones ambientales.¹⁹

Sin embargo, una de las desventajas de la química del Tecnecio es que el metal, a diferencia del ^{123}I o ^{18}F , no puede sustituir directamente al átomo de hidrógeno de la biomolécula, ni puede otro sustituyente común, como un carbono, nitrógeno y oxígeno, ser reemplazado por el Tecnecio. Consecuentemente, el diseño del agente de imagen en general requiere un considerable desarrollo de la química de coordinación del radiometal.

Todos los estados de oxidación formales del tecnecio entre -1 y +7 están representados por compuestos característicos.¹⁹ El estado de oxidación más estable y fácilmente accesible está a menudo caracterizado por estructuras químicamente robustas, las cuales pueden ser explotadas como plataformas para el desarrollo de reactivos farmacéuticos.

La química redox del tecnecio

Una de las características del tecnecio es su diversa química redox. Puesto que no hay química eficaz que pueda ser utilizada para unir $^{99m}\text{TcO}_4^-$ a las biomoléculas, el Tc (VII) en $^{99m}\text{TcO}_4^-$ tiene que ser reducido a estados de oxidación más bajos. Cuando $^{99m}\text{TcO}_4^-$ se reduce, el estado de oxidación del Tc depende del agente reductor, agente quelante, y condiciones de reacción. La química redox rica y diversa del tecnecio, hace difícil controlar el estado de oxidación y la estabilidad en solución de los quelatos de tecnecio. Al mismo tiempo, también ofrece oportunidades para modificar las estructuras y las propiedades de los complejos de tecnecio para la elección de los quelatos con una alta afinidad por un estado de oxidación específico del Tc.^{17, 38}

Reducción del $^{99m}\text{TcO}_4^-$ para el marcado de biomoléculas

El $^{99m}\text{TcO}_4^-$ se reduce en un solo paso en presencia del conjugado BFC-BM. Las condiciones empleadas en estas preparaciones están determinadas por la corta vida media del ^{99m}Tc , bajas concentraciones de $^{99m}\text{TcO}_4^-$, y la estabilidad química del

conjugado BFC-BM. La reacción generalmente produce una mezcla de especies reducidas de ^{99m}Tc , y en muchos casos la forma química y el estado de oxidación de estas especies de ^{99m}Tc son desconocidos. Sin embargo, el complejo $^{99m}\text{Tc-BFC-BM}$ puede prepararse para que haya solo un producto predominante mediante la elección del agente reductor y un BFC bajo condiciones bien controladas. Varios agentes reductores pueden ser utilizados para reducir el $^{99m}\text{TcO}_4^-$ durante el radiomarcado. Estos incluyen cloruro de estaño, borohidruro, ditionato, ditionito, ácido hipofosfórico, hydroxamina, formamidina sulfínico ácido, y fosfinas solubles en agua. El estaño, Sn (II), es el agente reductor más comúnmente utilizado en kits comerciales para la preparación rápida de radiofármacos de ^{99m}Tc debido a su rápida cinética de reducción. Sin embargo, el uso de Sn (II) a menudo conduce a varios problemas. Por ejemplo, durante la síntesis de un radiofármaco de ^{99m}Tc , la rápida reducción inicial de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ lleva a la formación del intermediario $^{99m}\text{TcO}_4^{2-}$ Tc (VI), el cual es inestable. La reducción de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ puede conducir a la formación de Tc (IV), que se somete a una hidrólisis rápida en solución acuosa para formar $^{99m}\text{TcO}_2$ (óxido de tecnecio). Sn (IV) también se somete a una hidrólisis rápida para formar SnO_2 insoluble. La formación de coloides ($^{99m}\text{TcO}_2/\text{SnO}_2$) pone en peligro el rendimiento del radiomarcado.

Tanto la tricina como el glucoheptonato sirven para dos propósitos: como un ligando para estabilizar el ^{99m}Tc reducido en su estado de oxidación Tc (V), y como un coligando para estabilizar el núcleo de [^{99m}Tc] HYNIC.¹⁷

Finalizada la reacción, el ^{99m}Tc puede estar presente fundamentalmente bajo tres formas:

- la molécula marcada de interés
- ^{99m}Tc no reducido bajo forma de $^{99m}\text{TcO}_4^-$
- ^{99m}Tc reducido pero sin formar parte de la molécula marcada, o sea como $^{99m}\text{TcO}_2$ (especie reducida hidrolizada), según el caso también pueden formarse otras moléculas marcadas, constituyendo o no una impureza radiactiva que interfiera en la biodistribución esperada.

Agentes quelantes Bifuncionales

El uso de agentes quelantes bifuncionales ofrece una estrategia para la unión de metales catiónicos radiactivos a las macromoléculas.¹⁹

Los quelantes que pueden contener metales radiactivos con alta estabilidad en condiciones fisiológicas son esenciales para evitar daños de la radiación excesiva a las células no diana.³⁹

La construcción de un conjugado biomolecular requiere de la selección de una apropiada combinación de un metal radionucleído y un agente quelante orgánico, con las condiciones y estrategias para ensamblar el complejo biomolécula-agente quelante metálico. Los ligandos bifuncionales tienen dos propósitos: unir el metal radionucleído firmemente sin disociación *in vivo* y proveer una estructura de apéndice para la unión de la biomolécula mientras se mantiene la integridad de la biomolécula. De este modo, por un lado los quelatos de tecnecio deben tener la mayor estabilidad cinética alcanzable bajo condiciones biológicas, mientras que por el otro el quelato bifuncional permite una unión covalente a la molécula biológica. Además, en reacciones que involucran proteínas, los agentes bifuncionales deben ser capaces de ser conjugados bajo condiciones ambiente, condiciones acuosas razonablemente cercanas al pH fisiológico, en un tiempo relativamente corto, con una mínima necesidad de procedimientos de purificación.¹⁹

Debido al pequeño tamaño de los péptidos, un agente quelante grande o un grupo prostético sumado a un radiomarcado, puede influir en la afinidad de unión y en las características farmacocinéticas del péptido. Por lo tanto, la elección cuidadosa del agente quelante y el radiomarcado específico de sitio es importante para un radiomarcado exitoso con el radionucleído deseado.¹⁶

Requerimientos para un agente quelante bifuncional ideal

Un agente quelante bifuncional (BFC) ideal es aquel que es capaz de formar un complejo estable de ^{99m}Tc con un alto rendimiento en muy baja concentración del conjugado BFC-BM. Para lograr este objetivo, el BFC selectivamente debe estabilizar un producto intermedio o el menor estado de oxidación de Tc de manera que el complejo ^{99m}Tc no esté sujeto a reacciones redox. Los cambios de estado de oxidación suelen ir acompañados de transquelación de ^{99m}Tc de un complejo ^{99m}Tc -BFC-BM a los ligandos de quelación nativos en sistemas biológicos. El BFC debe formar un complejo ^{99m}Tc que tenga estabilidad termodinámica e inercia cinética con respecto a la disociación o la liberación de ^{99m}Tc . Finalmente, el grupo de conjugación debe de ser fácilmente de unir a la biomolécula blanco.¹⁷

HYNIC

La popularidad del HYNIC (Hidrazinonicotinamida) como ligando bifuncional está relacionada al hecho de que permite un eficiente radiomarcado con ^{99m}Tc , bajo condiciones moderadas cuando es usado en el “post-marcado” (esto es, el radiomarcado es el paso final en la formación del conjugado) y a menudo no se requiere su purificación, incluso cuando se emplean muy bajas concentraciones del péptido para proveer una alta actividad específica.

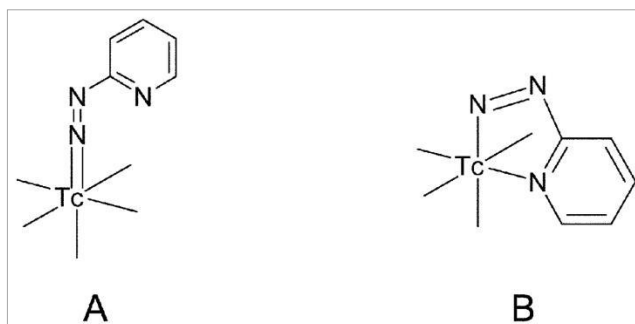


Figura 6: Posibles estructuras del complejo ^{99m}Tc -HYNIC-péptido mostrando la forma de unión monodentada y bidentada del HYNIC al tecnecio.²⁶

En el trabajo de D. Scott Edwards and Shuang Liu publicado en la revista *Transition Met. Chem.*, sobre agentes quelantes bifuncionales, dice que, son capaces de formar complejos ^{99m}Tc estables con alto rendimiento a muy bajas concentraciones del conjugado Péptido-BFC. HYNIC, generalmente²⁰ se usa en la forma de un éster activado, y conjugado a un péptido por una reacción con el grupo amino N-terminal.²⁰ La radiosíntesis es especialmente eficiente cuando se usa la tricina como coligando.²⁰

Debido a que el HYNIC solo puede ocupar uno o dos sitios de coordinación^{17, 40}, un coligando como la tricina, es necesario para completar la esfera de coordinación del tecnecio. La ventaja de utilizar HYNIC como un BFC es su alta eficiencia de marcado con ^{99m}Tc y la elección de coligandos como tricina y glucoheptonato, permiten una fácil modificación de hidrofiliidad y farmacocinética de biomoléculas marcadas con ^{99m}Tc. Sin embargo, el uso de tricina como coligando sufre dos inconvenientes principales: (1) solución inestable de [^{99m}Tc (HYNIC-BM) (tricina)₂], y (2) presencia de múltiples especies en solución, debido a las diferentes modalidades de unión del HYNIC, y coligandos (Figura 6).¹⁷

Investigaciones recientes mediante espectrometría de masas de péptidos marcados con ^{99m}Tc han mostrado la posibilidad de que la presencia de coligandos polidentados como la tricina puede no ser suficiente para suprimir interacciones entre el tecnecio y las cadenas del lado donante de los aminoácidos vecinos.

Tradicionalmente se asume que dos tricinas están unidas al tecnecio además del HYNIC (de hecho, hay evidencias que fundamentan esto en algunos casos), pero la espectrometría de masas del conjugado Péptido-tecnecio en la cual hay una histidina vecina sugiere que en esos casos sólo una tricina está presente. Esto lleva a la hipótesis de que una histidina vecina podría tener un papel de apoyo en la unión al tecnecio, desplazando así a una tricina de la esfera de coordinación.

Desde sus inicios, el HYNIC como ligando bifuncional para el marcado de biomoléculas con ^{99m}Tc, ha sido excepcionalmente eficiente y ha traído varios usos, con muchas aplicaciones y perfeccionamiento en su uso.²⁰

Técnicas de marcado

Existen tres técnicas de marcado para biomoléculas, descritas a continuación:

Marcado directo

El marcado directo generalmente usa un agente reductor como el SnCl₂ para convertir el enlace disulfido en tioles libres, los cuales se unen fuertemente al tecnecio. Este ensayo es fácil de llevar a cabo, pero se aplica sólo a anticuerpos o fragmentos de anticuerpos debido a que muchas moléculas pequeñas no tienen ningún enlace disulfuro, o en muchos casos el enlace disulfuro es demasiado crítico para mantener sus propiedades biológicas al ser reducido.¹⁷

Pre-Marcado

El pre-marcado o quelato preformado implica la formación del quelato ^{99m}Tc-BFC, y la conjugación del quelato ^{99m}Tc-BFC a una biomolécula en una etapa separada. Este enfoque ha sido utilizado con éxito en el marcado de los anticuerpos y fragmentos de éstos con ^{99m}Tc.

En dicho enfoque, la química está mejor definida, y la biomolécula blanco no está expuesta a duras condiciones en la etapa de quelación. Para fines de investigación, este enfoque es muy útil, sin embargo, los múltiples pasos de radiosíntesis son demasiado complejos y consumen mucho tiempo para su uso en la rutina clínica, lo que lo hace muy difícil para el desarrollo de una formulación de un kit.¹⁷

Post-Marcado

En el post-marcado o marcado indirecto, un BFC primero se une a la biomolécula para formar BFC-BM conjugado. Una vez que el conjugado BFC-BM se prepara, el

radiomarcado se lleva a cabo mediante la reducción directa de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ en presencia de una cantidad suficiente del conjugado BFC-BM, o por intercambio de ligando con un complejo ^{99m}Tc intermediario. Este enfoque combina la facilidad de la marcación directa con una química bien definida del quelato preformado. Este es el enfoque más práctico para la formulación de kit y para el desarrollo de productos comerciales.¹⁷ En este trabajo, se utiliza el post-marcado utilizando como BFCs, el HYNIC y el DAP.

Técnicas de Imagenología molecular con radionucleídos

Centellografía de la mama

La imagenología molecular con radionucleídos tiene un rol central. Las gamma cámaras estándar han mostrado la habilidad para diferenciar las lesiones malignas de las benignas, pero no tienen la resolución suficiente para detectar lesiones pequeñas.²³

Varios diseños especializados de gamma cámaras han sido implementados, probados y han demostrado un incremento sustancial en la sensibilidad de detección para lesiones de tamaño menores a 1 centímetro.²³

Algunas técnicas de imagen de la mama utilizan pequeñas gamma cámaras que tienen como origen una técnica antigua denominada gammagrafía. Esta técnica utilizaba gamma cámaras convencionales para imagen, mediante la captación de un radiofármaco, el ^{99m}Tc sestamibi, en los tumores de mama, y fue evaluado extensamente a mediados de la década de 1990. Si bien los resultados mostraban una buena sensibilidad y especificidad global, se encontró que la técnica tenía baja sensibilidad para la detección de pequeños tumores de mama. Su sensibilidad fue solo de aproximadamente 50% para los tumores menores de 15 mm de diámetro. Uno de los principales factores que limitaban la resolución de las imágenes adquiridas con gamma cámaras convencionales fue el gran espacio muerto en el borde de la cámara que requería que el paciente fuese fotografiado con la cámara colocada lateralmente. Esta posición, aumentó la distancia entre el pecho y la cámara, y resultó en una considerable pérdida de resolución.

Durante los últimos 5-7 años se han logrado progresos importantes en el desarrollo de pequeñas gamma cámaras compactas basadas en matrices policristalinos de yoduro de cesio o yoduro de sodio, o, alternativamente, que utilizan materiales semiconductores, como el zinc telurio de cadmio (CZT). Estos detectores pequeños superan una de las principales limitaciones de los sistemas convencionales para la formación de imágenes de mama mediante la reducción del espacio muerto en el borde del campo de vista desde el detector de 8-10 cm hacia abajo a 5-8 mm. El tamaño compacto y la falta de espacio muerto, permite que estos detectores puedan ser utilizados en una geometría similar a la mamografía convencional.⁵

SPECT

Los péptidos se han marcado con radionucleídos, fluoróforos, y otros marcadores de imagen molecular. Uno de los radionucleídos comúnmente empleados para su uso en la SPECT es el ^{99m}Tc debido a sus propiedades nucleares y disponibilidad.¹⁴

Existen básicamente tres razones por las cuales el SPECT es atractivo comparado a las imágenes planares.

1. En una imagen planar, la actividad fuera del órgano de interés se superpone a éste, reduciendo el contraste visible. En cambio, en una imagen transversal reconstruida,

- la distribución de actividad en el órgano se aprecia en forma separada de la actividad de fondo circundante, de modo que el contraste mejora significativamente.
2. Debido a que las imágenes tomográficas contienen información sobre la distribución de actividad en el interior del cuerpo, esencialmente tendremos datos tridimensionales. En muchas ocasiones, la observación de imágenes tridimensionales puede ayudar a ilustrar la relación existente entre diferentes estructuras y realmente mejorar la interpretación del estudio.
 3. Si se corrigen varias fuentes de error, las imágenes de SPECT realmente pueden representar la distribución de actividad en el cuerpo en cantidad de actividad por unidad de volumen. Esta cuantificación absoluta puede ser de utilidad para medir parámetros funcionales y también para estimar la dosis absorbida de radiación en un órgano específico o en un tumor.²⁴

PET-CT

PET es un método imagenológico no invasivo que explota el decaimiento físico de los isótopos que emiten positrones, como los isótopos de oxígeno, carbono, nitrógeno y flúor.²⁵

Varios radiotrazadores han sido utilizados en aplicaciones oncológicas del PET. ¹⁸F-Fluorodeoxiglucosa (¹⁸F-FDG) es el más comúnmente usado en la práctica clínica.²⁵

La captación intracelular de ¹⁸F-FDG está incrementada en la mayoría de los distintos tipos de cáncer cuando se lo compara con la captación en la mayoría de los tejidos normales, reflejando el elevado consumo de glucosa en las células tumorales, debido a la sobreexpresión de las proteínas transportadoras de glucosa (GLUT) en la superficie celular y/o niveles incrementados de hexoquinasa activa. La captación de FDG del tumor es variable, según el órgano de origen, pero también de un tipo de tumor a otro. El grado de captación puede ser expresado por análisis semicuantitativos, utilizando el controversial valor de captación estandarizado (SUV), cuidadosamente y principalmente usado para evaluar la respuesta al tratamiento. Aunque ¹⁸F-FDG puede ser usado como un indicador de la localización del tumor, no es específico para el tumor y algunos procesos benignos pueden captar ¹⁸F-FDG, especialmente cambios infecciosos o inflamatorios (por ej.: post-operatorio) y ciertas condiciones benignas (por ej.: Sarcoidosis).

La diferencia más fundamental con respecto a otras técnicas imagenológicas es que el PET evalúa características funcionales y metabólicas pero la introducción de sistemas híbridos de algunos años atrás ha conducido a un mejoramiento importante en la práctica. La combinación de CT y PET en la misma máquina resultó en exámenes mejores y más rápidas, incrementando la aceptación y el confort del paciente, debido a una corrección de atenuación más eficiente y una mejor localización anatómica de captación normal y anormal.²⁵

En este trabajo, se va a marcar el péptido KCCYSL con ^{99m}Tc, utilizando HYNIC y DAP como agentes bifuncionales, la molécula obtenida, ^{99m}Tc-DAP-KCCYSL-HYNIC, es un potencial agente imagenológico para los tipos de cáncer de mama que tienen sobreexpresión de HER-2.

MATERIALES

Se emplearon los siguientes reactivos y materiales:

Nitrógeno gaseoso de alta pureza (AGA); Tricina (sigma); $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (J. T. Baker); H_2O bidestilada; HYNIC (SoluLink); HCl (36,5-38,0% J. T. Baker); NaCl (Fluka-Garantie); Acetato de sodio (Riedel-deHaen); Seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma); Acetona (Merck); EtOH (BioPak), Amoníaco (Merck); MEK, MeOH; **ACN**; PBS; ITLC-SG (Pall Corporation); Whatman 1 y 3 MM (Whatman International Ltd); Generador ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (TecnoNuclear), 1-Octanol, líneas celulares A431 y H125.

Los estudios de Biodistribución e imágenes se realizaron con ratones hembras CD1 sanos y con adenocarcinoma mamario espontáneo (6 meses de edad y peso 40 gramos aproximadamente).

Se emplearon los siguientes equipos:

HPLC (Varian 5000 Liquid Chromatograph, integrador 4290 Varian, Detector ORTEC), Calibrador de dosis Capintec CRC7, Contador de centelleo sólido de pozo: detector de cristal de NaI(Tl) de 3"x3" asociado a un analizador monocanal ORTEC), Gamma cámara (Sopha cámara, DXR rectangular) del, Centro de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas.

METODOLOGÍA

Radiofármaco: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-DAP-GSG-KCCYSL

Se desarrolló un juego de reactivos (Kit) constituido por 2 viales:

Vial A: Tricina (8 mg), $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10 mg)

Vial B: DAP-KCCYSL-HYNIC (2 mg) previamente conjugado.

Formulación del Vial A

En dos viales distintos se pesan 8 mg de Tricina y 10 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Se solubiliza la Tricina en 0.8 ml de agua.

Se determina el pH de la solución de Tricina (debe estar en 4.5) y se desplaza el oxígeno de la misma con corriente de nitrógeno.

Se adiciona 0.05 ml de HCl 2.0 M para acidificar la solución.

En el otro vial se solubiliza el $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 0.5 ml de HCl 2.0 M y 0.05 ml de esta solución se incorporan al vial que contiene la solución de Tricina.

Se ajusta el volumen total de la solución a 1 ml con NaCl 0.9%.

Esta formulación surgió como resultado de la optimización de las cantidades de Tricina y $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a fin de obtener una alta PRQ.

Conjugación de DAP-KCCYSL-HYNIC (Vial B)

La conjugación de DAP-KCCYSL-HYNIC, se realizó por reacción en fase sólida en la Universidad de Missouri, EE.UU.

Almacenamiento del conjugado HYNIC-DAP-KCCYSL

En solución a 4°C

Marcación con ^{99m}Tc del conjugado HYNIC-DAP-KCCYSL

La marcación con ^{99m}Tc del conjugado DAP-KCCYSL-HYNIC se realiza tal como se describe a continuación:

Técnica de Marcado

Se reconstituye el Vial A con 10 ml de NaCl 0.9%

Se añaden 16 μl al vial DAP-KCCYSL-HYNIC.

Se agrega $^{99m}\text{TcO}_4^-$, 1-3 mCi (no más de 1 ml).

Se incuba por 30 minutos a 75°C.

Controles

Se realizaron distintos controles cromatográficos, descritos a continuación (Tabla 1), con el fin de identificar y cuantificar las impurezas radioquímicas: % ^{99m}Tc -Tricina + % $^{99m}\text{TcO}_4^-$ libre, y % de $^{99m}\text{TcO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$.

Pero no se encontró ningún modelo adecuado, porque ninguno logró separar los distintos componentes de la mezcla correctamente, comparado con el HPLC.

Tabla 2. Distintos sistemas cromatográficos para ^{99m}Tc -HYNIC-DAP-GSG-KCCYSL

Fase estacionaria	Fase móvil
ITLC-SG	NaCl 0,9%
ITLC-SG impregnada en BSA	EtOH:NH ₃ :H ₂ O (2:1:5)
ITLC-SG	ACN 50%

Al mismo tiempo, se analizó por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) el péptido marcado, ^{99m}Tc -HYNIC-DAP-GSG-KCCYSL, y pertecnecioato libre, se utilizó una columna corta para detección gamma. Para ello se realizó un programa isocrático con buffer fosfato 0.01M, pH 7.0 y flujo 1 ml/min, empleando columna de exclusión molecular.

Ensayos de Biodistribución

Se realizaron estudios de biodistribución a los 30 minutos (n=1) en ratones hembras CD1 con adenocarcinoma mamario espontáneo y a 30 min. (n=3), 1 hora (n=3), 2 horas (n=3) y 4 horas (n=3) en ratones sanos según el siguiente procedimiento.

Se administra ^{99m}Tc -HYNIC-DAP-GSG-KCCYSL por vía intravenosa con una actividad de aproximadamente 200 μCi .

Se sacrifican los animales por dislocación cervical una vez transcurrido el tiempo de distribución: 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 4 horas, para ratones hembra CD1 sanos y 30 min. para ratones hembra CD1 con adenocarcinoma mamario.

Inmediatamente se extraen los órganos de interés, se pesan y se mide la actividad de los mismos en detector de centelleo sólido.

Se calcula el % de actividad por órgano y por gramo.

n = Número de ratones

Determinación del Log P

Los valores de Log P del péptido marcado, ^{99m}Tc -HYNIC-DAP-GSG-KCCYSL fueron determinados de acuerdo al siguiente procedimiento:

Aproximadamente 100000 cpm del péptido purificado fue diluido en cantidades iguales (1.0 ml) de PBS (pH 7.4) y 1-Octanol, y la mezcla bifásica resultante se agitó durante 1 minuto. Ambas fases fueron separadas por centrifugación durante 10 min. y se tomaron alícuotas de 0.2 ml de cada fase, las cuales fueron medidas en un contador gamma.

El coeficiente de partición se expresa como el Logaritmo del valor del coeficiente de cpm de la fase 1-octanol sobre cpm en la fase PBS. Se tomaron 3 muestras de cada fase, y se trabajó con el promedio.⁹

Ensayo de Unión *in vitro*

Se realizó el ensayo de unión según el siguiente protocolo:

Aproximadamente 100000 cpm del marcado se ponen en 0,5 ml de medio de cultivo, junto con 10^6 células en 0,2 ml de medio de cultivo (todo por 3).

El estudio se realizó a los 15 min., 30 min., 1 hora, 2 horas y 3 horas, utilizando líneas celulares A431 y H125.

Imágenes

Se realizaron estudios imagenológicos en gamma cámara del Centro de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas. Las imágenes fueron tomadas a las 2 horas (n=3) postinyección en ratones hembras CD1 con adenocarcinoma mamario espontáneo según el siguiente procedimiento:

El péptido marcado se administró al ratón por vía intravenosa con una actividad de aproximadamente 200 μCi .

Luego de un período de tiempo de 2h, se anestesió a los ratones para inmovilizarlos.

Se obtuvo la imagen con gamma cámara y se procesó.

RESULTADOS

Realización del Vial A

Se observa que la disminución de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ genera aumento de las cantidades de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ libre y la disminución de Tricina genera un aumento de las cantidades de $^{99\text{m}}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Se probaron diferentes relaciones de Tricina/ $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y la mejor relación se obtuvo con 8 mg de Tricina y 10 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y una actividad de marcado de 7,1 mCi.

Controles

Los sistemas cromatográficos en papel utilizados no fueron útiles para medir la pureza radioquímica del péptido marcado, ya que no coinciden con el HPLC.

También se utilizó HPLC, con detección gamma, para poder separar los componentes de la mezcla, obteniendo la molécula marcada de interés, con una alta pureza radioquímica, como se observa en la figura 7.2, donde se obtuvo un solo pico correspondiente al péptido radiomarcado, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-DAP-GSG-KCCYSL, y no se observa ni Óxido de tecnecio ni Pertecneciato. En la figura 7.1, se observa el pertecneciato libre, que sale antes que el péptido radiomarcado en el HPLC. Discriminando perfectamente entre pertecneciato libre y pertecneciato unido al péptido.

Tabla 3. Sistema cromatográfico 1

Sistema cromatográfico				
Fase estacionaria	Fase móvil	% de Tricina + Pertecneciato	% de Óxido de tecnecio	% de Compuesto marcado
ITLC-SG	NaCl 0,9%	42		
ITLC-SG	ACN 50%		25	
				33

Tabla 4. Sistema cromatográfico 2

Sistema cromatográfico				
Fase estacionaria	Fase móvil	% de Tricina + Pertecneciato	% de Oxido de tecnecio	% de Compuesto marcado (PRQ)
ITLC-SG	NaCl 0,9%	4		
ITLC-SG	EtOH:NH ₃ :H ₂ O (2:1:5)		43	
				53

Tabla 5. Sistema cromatográfico 3

Sistema cromatográfico				
Fase estacionaria	Fase móvil	% de Tricina + Pertecneciato	% de Oxido de tecnecio	% de Compuesto marcado (PRQ)
ITLC-SG	NaCl 0,9%	5		
ITLC-SG	ACN 50%		62	
				33

Tabla 6. Sistema cromatográfico 4

Sistema cromatográfico				
Fase estacionaria	Fase móvil	% de Tricina + Pertecneciato	% de Oxido de tecnecio	% de Compuesto marcado (PRQ)
ITLC-SG	NaCl 0,9%	3		
ITLC-SG embebida en BSA	EtOH:NH ₃ :H ₂ O (2:1:5)		38	
				59



Figura 7.1: HPLC, detección gamma del TcO_4^- .

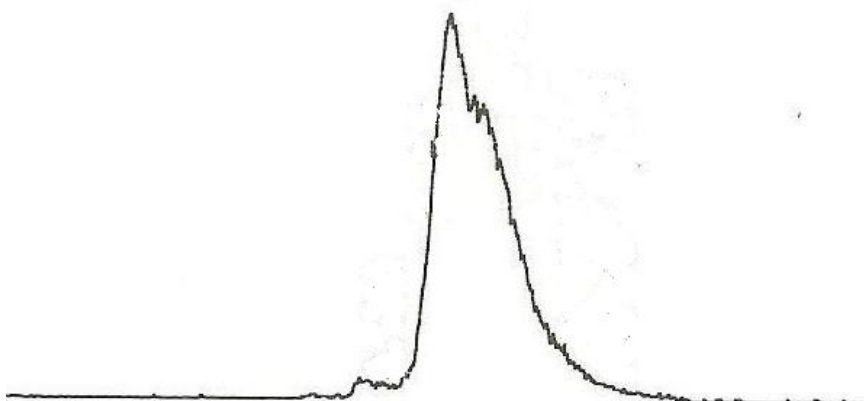


Figura 7.2: HPLC, detección gamma del Péptido marcado, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-DAP-GSG-KCCYSL.

Ensayos de Biodistribución

Se realizaron ensayos de biodistribución en ratones hembra CD1 sanos a los 30 min., a 1 hora, 2 horas y 4 horas, y a los 30 min. en ratones hembra CD1 con adenocarcinoma mamario.

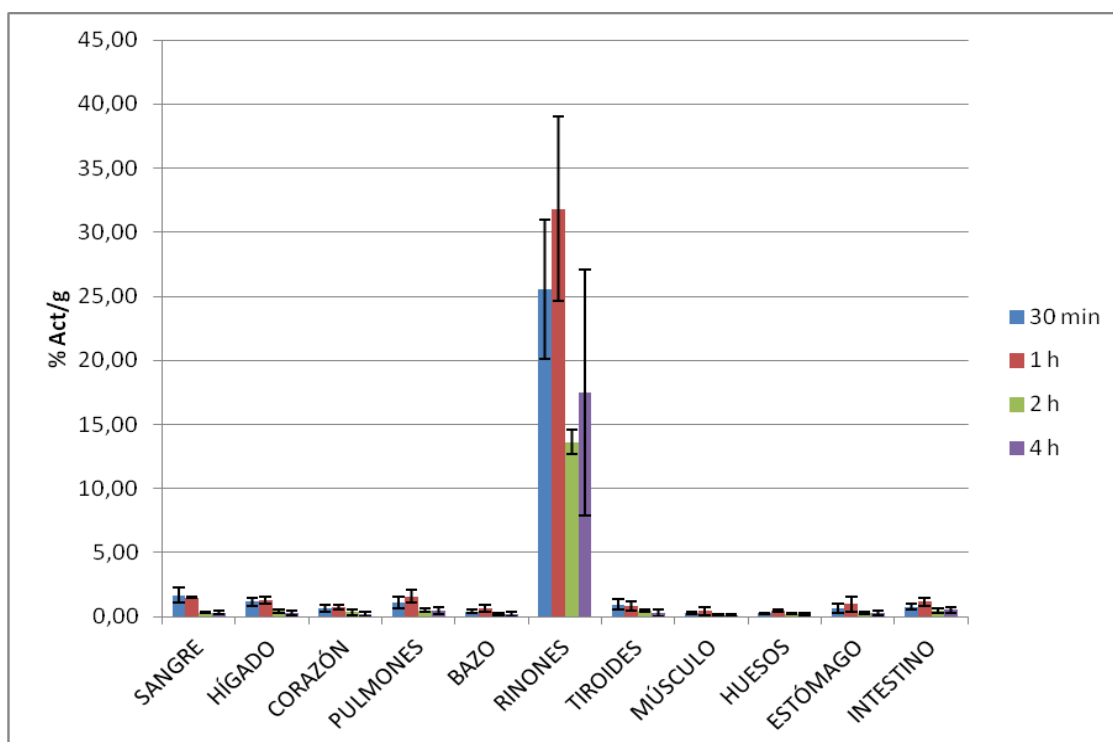


Figura 8. Biodistribuciones a los 30 min., 1 hora, 2 horas y 4 horas en ratones hembra CD1 sanos.

En las biodistribuciones a distintas horas en ratones hembra CD1 sanos, se observó que la mayor captación del radiofármaco fue en los riñones, y en los demás órganos la captación fue baja, como se observa en la figura 8.

Tabla 2. Biodistribución a los 30 minutos en ratones hembra CD1 con adenocarcinoma mamario espontáneo.

%Act/g	1,21	15,71	0,63	17,34	6,76	33,82	1,96
Órgano	Sangre	Hígado	Corazón	Pulmones	Bazo	Riñones	Tiroides
%Act/g	0,19	0,37	1,28	1,29	0,66	114,08	0,71
Órgano	Músculo	Huesos	Estómago	Intestinos	Tumor	Orina + Vejiga	Carcasa

En la biodistribución de ratones hembra CD1 con adenocarcinoma mamario espontáneo a los 30 minutos, se observó que, la relación Tumor/Músculo fue alta, 3,47 y la relación Tumor/Sangre fue baja 0,54. Como indica la tabla 2, en hígado y pulmones se observa

una alta captación del radiofármaco, en el primer caso es debido a que el radiofármaco se elimina por el hígado y en el segundo puede ser a causa de una metástasis. En los órganos no blanco, la captación fue baja, exceptuando en vejiga, orina y riñones, que fue muy alta, ya que el radiofármaco se excreta por esa vía.

Determinación de Log P

Debido a que la lipofilicidad del péptido radiomarcado puede afectar la captación del tumor en el ratón, se determinó el valor de Log P del péptido ^{99m}Tc -HYNIC-DAP-GSG-HYNIC.

El valor de Log P para ^{99m}Tc -HYNIC-DAP-GSG-KCCYSL fue el siguiente:

Log P = $-0,83259629 \pm 0,08871255$

Dicho valor negativo indica que el péptido es hidrofílico.

Ensayos de unión *in vitro*

Se estudió la interacción del péptido radiomarcado con el ErbB-2 sobre expresado en las células de carcinoma mamario para determinar si dicho péptido conserva la afinidad de unión para HER-2.

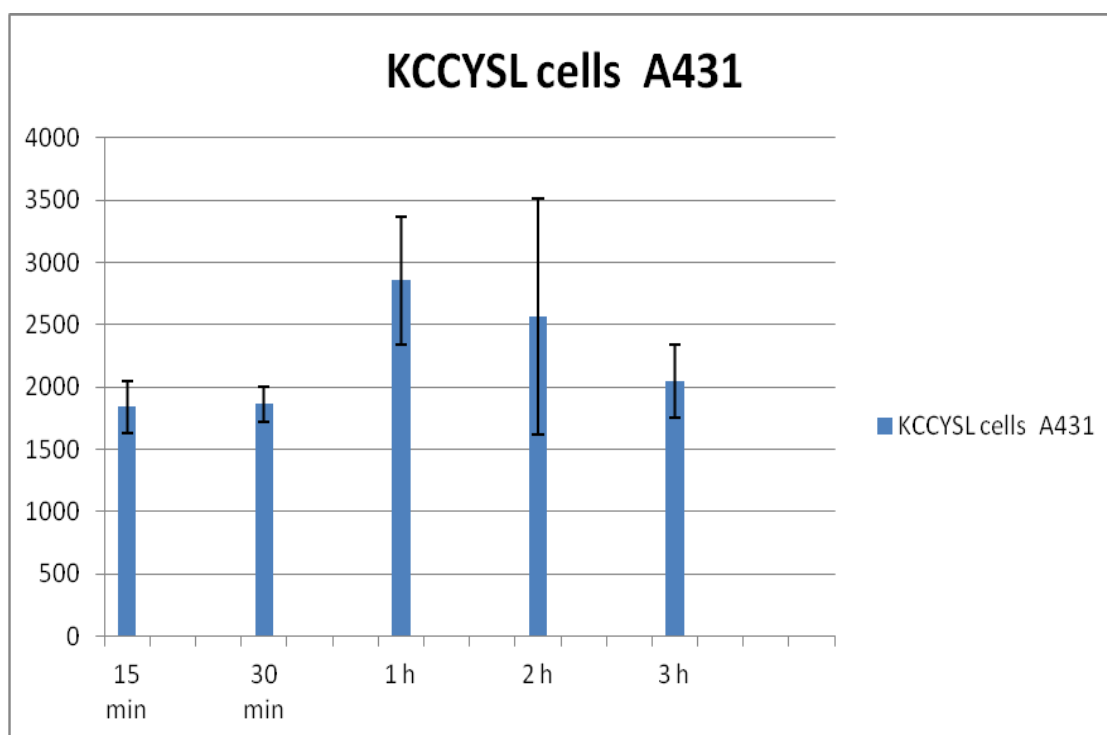


Fig. 9: Ensayo de unión con líneas celulares A431.

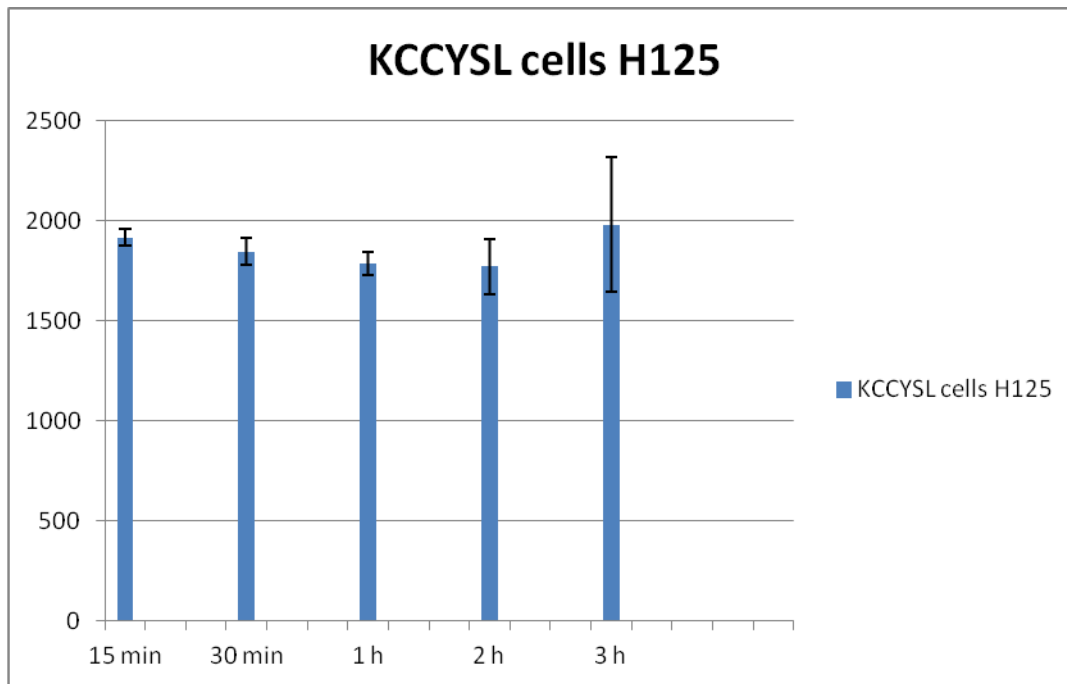


Fig. 10: Ensayo de unión con líneas celulares H125.

En las figuras 9 y 10 se observa que, el péptido radiomarcado conserva la afinidad de unión con el receptor HER-2 sobre expresado en las células de cáncer de mama. La unión del péptido radiomarcado a las células de la línea A431, incrementa hasta 1 hora, donde encuentra su pico máximo, indicando la saturación de unión del péptido a dichas células y luego disminuye gradualmente (Fig.: 9). La unión del péptido radiomarcado a las células de la línea H125, comienza con un pico, disminuyendo gradualmente hasta 2 horas para luego aumentar a las 3 horas, en donde encuentra su pico máximo, indicando la saturación de unión del péptido a las células (Fig.: 10).

Imágenes

Imágen de ratón hembra CD1 con adenocarcinoma mamario espontáneo tomada a las 2 horas post inyección. La actividad inyectada fue de 300 μCi .

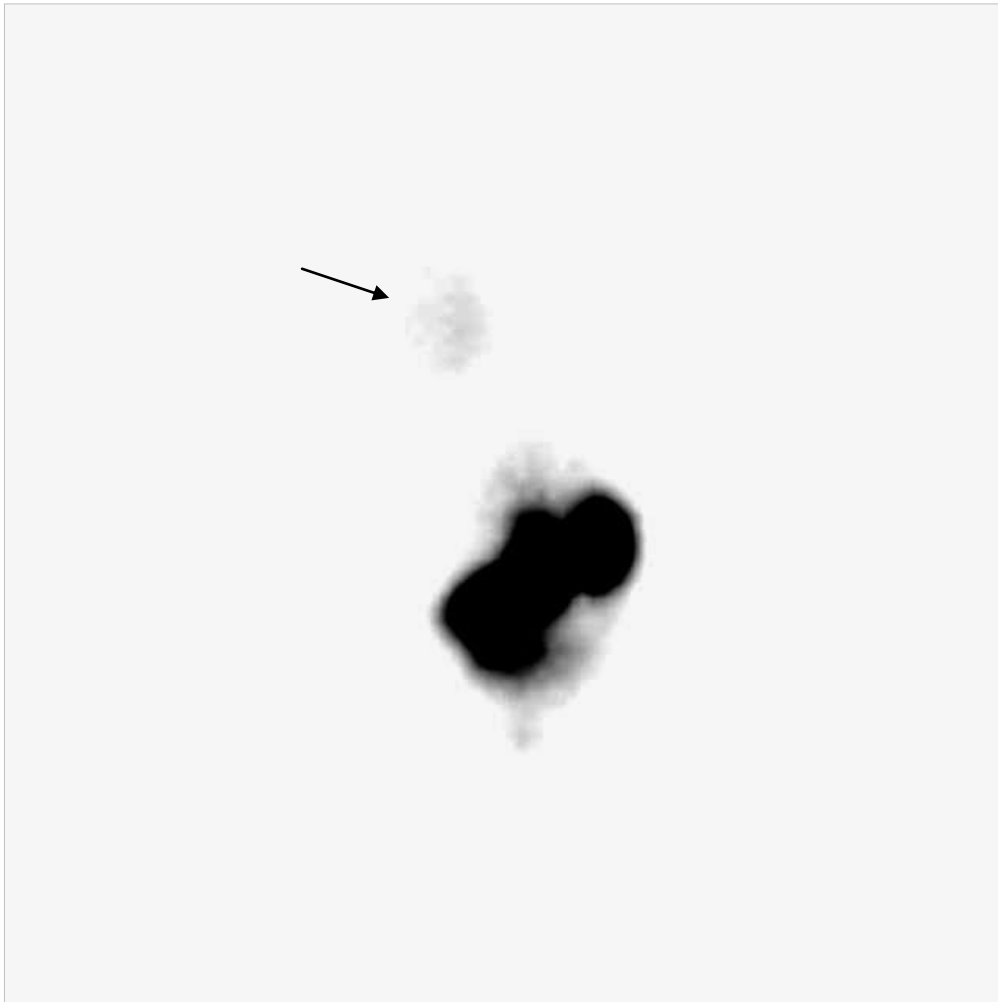


Figura 11: Ratón hembra CD1 con adenocarcinoma mamario espontáneo tomada a las 2 horas post inyección. La flecha indica la localización del tumor.

En la figura 11 se puede observar la imagen del ratón con adenocarcinoma mamario espontáneo, como indica la flecha. El radiofármaco presenta además una alta captación renal.

DISCUSIÓN

El diagnóstico temprano y una correcta estadificación del cáncer de mama, es de suma importancia en la evolución posterior de la enfermedad. Determinar si una paciente posee cáncer de mama con sobre expresión de HER-2, es lo que establecerá, en parte, la gravedad de la patología y el tratamiento a seguir.

Actualmente las técnicas que se utilizan para identificar los niveles de expresión de HER2, FISH e inmunohistoquímica, entre otras, requieren la realización de una biopsia. La incorporación de un nuevo radiofármaco que permita conocer *in vivo* el estado clínico de estas pacientes podría significar una gran ventaja en cuanto sería un método no invasivo y más rápido de realizar.

En dicho estudio se presenta el péptido KCCYSL, que se une al dominio extracelular del receptor HER-2 que se sobre expresa en las células de cáncer de mama HER-2 positivo, como potencial agente de imagen *in vivo* usando el radionucleído ^{99m}Tc .⁹

Con respecto al marcado de HYNIC-DPA-GSG-KCCYSL, se optimizaron las cantidades de reactivos para obtener el ^{99m}Tc -HYNIC-DAP-GSG-KCCYSL con una alta pureza radioquímica (PQR) mayor al 90%, confirmado por la Cromatografía líquida de alta performance (HPLC), ya que los distintos sistemas cromatográficos no fueron buenos, en cuanto que no coinciden con el HPLC.

El ^{99m}Tc -HYNIC-DAP-GSG-KCCYSL es hidrofílico, según su valor negativo de Log P. Esto es importante debido a que la lipofilidad del péptido radiomarcado puede afectar el patrón de biodistribución del radiofármaco, afectando así la captación por parte del tumor y la captación en órganos no blanco.

Se estudió la interacción del péptido radiomarcado con el HER-2 sobre expresado en las células de carcinoma mamario de la línea celular A431 y H125 para determinar si dicho péptido conserva la afinidad de unión para HER-2. De los ensayos de unión a células se verifica la afinidad del radiofármaco por el receptor HER-2.

La estabilidad *in vivo* se comprobó con la realización de estudios de biodistribución con ratones hembra CD1 sanos, en los cuales se observó una rápida depuración sanguínea, con eliminación renal y ausencia de captación apreciable en otros órganos. Este patrón de eliminación es compatible con un agente de imagen ya que permitiría una evaluación de cuerpo entero del paciente obteniendo muy buen contraste.

En la biodistribución en ratones con adenocarcinoma mamario, se observó la captación del radiofármaco a nivel renal. Esta unión no específica del péptido a los riñones ocurre a menudo *in vivo* y la composición en aminoácidos del péptido podría potenciar dicha retención. La lisina cargada positivamente, así como las dos cisteínas que conforman el péptido probablemente contribuyan a una prolongada retención renal de la radioactividad.¹⁰ Los altos niveles de retención de la radioactividad en los riñones, puede ser atribuida a la degradación del radiofármaco, producido por la degradación lisosomal del péptido con largo tiempo de residencia dentro de las células renales y bajo aclaramiento del lisosoma.¹⁰ En hígado y pulmones la captación del radiofármaco fue

alta, en el primer caso es debido a que el radiofármaco se elimina por el hígado y en el segundo puede ser a causa de una metástasis. En el resto de los órganos no blanco, la captación fue baja. La relación Tumor/Sangre fue adecuada según bibliografía. La alta relación Tumor/Músculo, indica una buena captación del radiofármaco por el tumor y por tanto una buena afinidad por el receptor.

En las imágenes centellográficas se observa una alta captación tumoral con un perfil de captación similar a las biodistribuciones. La alta captación tumoral alienta a realizar estudios posteriores de modo de poder realizar una caracterización del estatus HER-2 por técnicas de anatomía patológica estándares y la comparación con las imágenes centellográficas obtenidas.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultado obtenidos en el presente trabajo se concluye que, el ^{99m}Tc -HYNIC-DAP-GSG-KCCYSL, se obtuvo con una muy buena pureza radioquímica, pudiéndose controlar de forma rápida y sencilla. La imagen realizada 2 horas post inyección presentó buena captación a nivel tumoral.

Por lo tanto, el ^{99m}Tc -HYNIC-DAP-GSG-KCCYSL es un potencial radiofármaco para detección de cáncer de mama con sobreexpresión de HER2.

Los pasos posteriores que le siguen a esta investigación serán comparar estos resultados con los resultados de las técnicas clásicas de detección de HER2/neu.

Existe un gran número de métodos disponibles para la detección y medición de la sobreexpresión de HER2/neu; unos se basan en la sobreexpresión de la proteína, con el uso de inmunohistoquímica, y otros evalúan la amplificación del gen con diferentes técnicas, como son: la FISH, la CISH y la PCR en tiempo real.²⁷ Pero todas requieren la realización de una biopsia y consumen gran cantidad de tiempo. Por lo tanto, el descubrimiento de un potencial radiofármaco que permita conocer *in vivo* el estado clínico de las pacientes podría significar una gran ventaja, ya que sería un método no invasivo, teniendo en cuenta la baja dosis de radiación que éste recibe y la rapidez del estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Félix Bonilla Velasco, Pilar España Saz and Mariano Provencio Pulla; Breast cancer: contribution of molecular biology to the management of the disease, *Rev Oncología*; 2001; 3: 130-136.
- 2- Darren W. Davis, Roy S. Herbst, James L. Abbruzzese. *Antiangiogenic Cancer Therapy*; 2008, Ed. CRC Press.
- 3- Victor V. Levenson, Biomarkers for early detection of breast cancer: What, when, and where? *Biochimica et Biophysica Acta* 1770 (2007) 847–856
- 4- Bombardieri , Bonadonna, Gianni. *Breast Cancer Nuclear Medicine in Diagnosis and Therapeutic Options*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2008.
- 5- Michael O'Connor, Deborah Rhodes, and Carrie Hruska. Molecular breast imaging. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2009 August; 9(8): 1073–1080.
- 6- Vassallo, J.A.; Barrios, E., *Actualización Ponderada de los Factores de Riesgo del Cáncer*. Montevideo: Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer, 2003.
- 7- G. Hudelist, C.F. Singer, M. Manavi, K. Pischinger, E. Kubista, and K. Czerwenka. Co-expression of ErbB-family members in human breast cancer: Her-2/neu is the preferred dimerization candidate in nodal-positive tumors. *Breast Cancer Research and Treatment* 80: 353–361, 2003
- 8- Constantin N., Baxevanis AE, Panagiota A., Sotiropoulou Nectaria N., Sotiriadou AE, Michael Papamichail. Immunobiology of HER-2/neu oncoprotein and its potential application in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* (2004) 53: 166–175.
- 9- Xiuli Zhang, Pablo Cabral, Maura Batesa, Juan Pablo Gambini, Marcelo Fernandez, Victoria Calzada, Fabio Gallazzie, Benjamin Larimera, Said D. Figueroa, Omar Alonso, Thomas P. Quinn, Henia S. Balter and Susan L. Deutscher. *In Vitro* and *In Vivo* evaluation of [^{99m}Tc (CO)₃]-Radiolabeled ErbB-2-Targeting Peptides for Breast Carcinoma Imaging. *Current Radiopharmaceuticals*, 2010, 3, 00-00
- 10- Martine J. Piccart, William C. Wood, Chie-Mien Hung Lawrence J. Solin, Fatima Cardoso (Eds.). *Breast Cancer and Molecular Medicine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006. Pags. 106,107.
- 11- Seiji Kawa, Hirohisa Matsushita, Hirokazu Ohbayashi, Kentaro Semba, Tadashi Yamamoto. A novel mouse monoclonal antibody targeting ErbB2 suppresses breast cancer growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 384 (2009) 329–333.

- 12-Sotiriadou AE Michael Papamichail. Immunobiology of HER-2/neu oncoprotein and its potential application in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* (2004) 53: 166–175.
- 13-Joel M. Salazar Cavazos, Juan Francisco González Guerrero, William O. Brito Villanueva, Joan Albanell Mestres and José M. Baselga Torres. Trastuzumab (Herceptin) in the treatment of breast cancer with HER2 overexpression. *REVISIONES. Rev Oncología* 2001; 4: 172-182.
- 14-Susan L. Deutscher. Phage Display in Molecular Imaging and Diagnosis of Cancer. *Chem Rev.* 2010 May 12; 110(5): 3196–3211.
- 15-Hwa Young Lee and Wonjung Kwak, Hai Yan Hong, Byung-Heon Lee and In-San Kim, Byeong-Cheol Ahn and Jaetae Lee, Jeongsoo Yoo, Kyehan Rhee. Radiolabeling, Autoradiogram and in Vivo Imaging of Atherosclerosis-Specific Peptide. *Journal of the Korean Physical Society*, Vol. 52, No. 3, March 2008, pp. 858-864.
- 16-S.M. Okarvi, Peptide-based radiopharmaceuticals and cytotoxic conjugates: Potential tools against cáncer. *Cancer Treatment Reviews* (2008) 34, 13– 26.
- 17-Shuang Liu. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2008) 1347-137.
- 18-Shuye Yang, Xuebin Wang,* Haixun Guo, Jian Liu, Fenglong Wang, Xianzhong Zhang. Synthesis and biodistribution of $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DMSA-MIBI}$ in mice. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Vol. 278, No.1 (2008) 165–171.
- 19-Sangeeta Ray Banerjeea, Kevin P. Marescad, Lynn Francesconib, John Valliantc, John W. Babichd, Jon Zubietaa,* . New directions in the coordination chemistry of ^{99m}Tc : a reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design. *Nuclear Medicine and Biology* 32 (2005) 1–20.
- 20-M. Bashir-Uddin Surfraz, Robert King, Stephen J. Mather, Stefano Biagini, Philip J. Blower. Technetium-binding in labelled HYNIC-peptide conjugates: Role of coordinating amino acids. *Journal of Inorganic Biochemistry* 103 (2009) 971–977.
- 21-F. Garibaldi, E. Cisbani, S. Colilli, F. Cusanno, R. Fratoni, F. Giuliani, M. Gricia, M. Lucentini, R. Fratoni, S. Lo Meo, M.L. Magliozzi, F. Santanvenere, M.N. Cinti, R. Pani, R. Pellegrini, G. Simonetti, O. Schillaci, S. Del Vecchio, M. Salvatore, S. Majewski, R.C. Lanza, G. De Vincentis, F. Scopinaro. Molecular imaging: High-resolution detectors for early diagnosis and therapy monitoring of breast cáncer. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 569 (2006) 286–290).

- 22-Margarita Núñez. Fundamentos de SPECT. Escuela Universitaria de Tecnología Médica. UdelaR, Montevideo, Uruguay. Comité de Tecnólogos de ALASBIMN. 2008.
- 23-Robert Lavayssière, Anne Elizabeth Cabée, Jean Emmanuel Filmont. Positron Emission Tomography (PET) and breast cancer in clinical practice. *European Journal of Radiology* 69 (2009) 50–58.
- 24-Judit Anido Folgueira, Nuevos mecanismos de tumorogénesis del protooncogén HER-2. Implicaciones terapéuticas en cáncer de mama, 2006. Tesis doctoral.
- 25-Linda A. Landon and Susan L. Deutscher. Combinatorial Discovery of Tumor Targeting Peptides Using Phage Display. *Journal of Cellular Biochemistry* 90:509–517 (2003).
- 26-Robert C. King, M. Bashir-Uddin Surfraz, Stefano C. G. Biagini, Philip J. Blower, and Stephen J. Mather. How do HYNIC-conjugated peptides bind technetium? Insights from LC-MS and stability studies. *Dalton Trans.* 2007 November 21; (43): 4998–5007.
- 27-Leonel Andrés González Niño, Andrés Ávila Garavito, Carolina Echeverri Jaramillo, Sergio Jaramillo Velásquez, Rubén Darío Salazar Corcho, Beatriz H. Aristizábal Bernal. Cáncer de mama: HER2/neu, métodos diagnósticos y consideraciones clínicas. *Rev Colomb Cancerol* 2007;11(1):40-57.
- 28-Buell P (1973) Changing incidence of breast cancer in Japanese-American women. *J Natl Cancer Inst* 51: 1479–1483.
- 29-Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285 (21):1182–1186.
- 30-Kelsey JL, Gammon MD, John EM (1993) Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 15: 36–47
- 31-Yarden Y (2001) Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* 61:1
- 32-Lemmon MA, Schlessinger J. Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *TIBS* 1994; 19: 459-463.
- 33-De Potter CR (1994) The neu-oncogene: more than a prognostic indicator? *Hum Pathol* 25:1264–1268.

- 34-Ramachandra S, Machin L, Ashley S, Monaghan P, Gusterson BA (1990) Immunohistochemical distribution of c-erbB-2 in in situ breast carcinoma--a detailed morphological analysis. *J Pathol* 161: 7–14.
- 35-Okarvi SM. Peptide-based radiopharmaceuticals: future tools for diagnostic imaging of cancers and other diseases. *Med Res Rev* 2004; 24:357–97.
- 36-Heppeler A, Froidevaux S, Eberle AN, Maecke HR. Receptor targeting for tumor localisation and therapy with radiopeptides. *Curr Med Chem* 2000; 7:971–94.
- 37-Garcia-Garayoa E., Schibli R., Schubiger P. A. Peptides radiolabeled with Re-186/188 and ^{99m}Tc as potential diagnostic and therapeutic agents. *Nuclear Science and Techniques*. Volume 18, Issue 2, April 2007, Pages 88–100
- 38-Francesco Tisato, Marina Porchia, Cristina Bolzati, Fiorenzo Refosco, Andrea Vittadini. The preparation of substitution-inert ^{99m}Tc metal-fragments: Promising candidates for the design of new ^{99m}Tc radiopharmaceuticals. *Coordination Chemistry Reviews*. Volume 250, Issues 15–16, August 2006, Pages 2034–2045
- 39-C. F. Meares, M. K. Moi, H. Diril, D. L. Kukis, M. J. McCall, S. V. Deshpande, S. J. DeNardo, D. Snook, and A. A. Epenetos. Macrocyclic chelates of radiometals for diagnosis and therapy. *Br J Cancer Suppl*. 1990 July; 10: 21–26.
- 40-J.W. Babich, A.J. Fischman. Effect of “co-ligand” on the biodistribution of ^{99m}Tc -labeled hydrazino nicotinic acid derivatized chemotactic peptides. *Nuclear Medicine and Biology*. Volume 22, Issue 1, January 1995, Pages 25–30

AGRADECIMIENTOS

A Pablo Cabral, mi tutor, por permitirme realizar dicha tesina en su área y por su apoyo, a Victoria Calzada y Marcelo Fernández por ser excelentes compañeros y apoyarme siempre.

Agradecer al Centro de Medicina Nuclear del Hospital de Clínicas por permitir el uso de la gamma cámara.

Finalmente, dar gracias a todos los demás compañeros y familiares, que contribuyeron a que en estos momentos pueda finalizar esta etapa de mi vida.