

``Diseño, síntesis y
caracterización *in-vivo* de
un potencial agente de
imagen molecular de la
angiogénesis tumoral``

Tesis de Licenciatura en Bioquímica.

Carolina Perroni.

Tutor: Pablo Cabral

Co-tutor: Ximena Camacho

Índice

1. Resumen	6
2. Objetivos	8
2.1. Objetivo general:	9
2.2. Objetivos específicos:	9
3. Introducción	10
3.1. Cáncer	11
3.1.1. Clasificación	13
3.2. Linfoma	14
3.2.1. Clasificación de Organización Mundial de la Salud de los LH y LNH	15
3.2.2. Etapas, categorías y patogénesis del LNH.	16
3.2.3. LNH de células B	17
3.2.4. Diagnostico LNH	18
3.2.5. Tratamiento	19
3.3. Angiogénesis	20
3.3.1. Activación o switch de la angiogénesis	28
3.3.2. Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	30
3.3.3. Actividades biológicas del VEGF en la angiogénesis	32
3.3.4. Expresión génica del VEGF y su regulación.	32

3.3.5. Factor de crecimiento endotelial vascular-A (VEGF-A).	33
3.3.6. Receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR).	34
3.3.7. Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular-1 (VEGFR-1).	35
3.3.8. Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular-2 (VEGFR-2)	36
3.3.9. Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular-3 (VEGFR-3).	37
3.3.10. Neuropilina 1 y Neuropilina 2 (NRP-1 y NRP-2)	38
3.4. Anticuerpo monoclonal humanizado Bevacizumab 3.5. Angiogénesis y Bevacizumab en LNH	39
3.5. Angiogénesis y Bevacizumab en LNH	41
3.6. Utilización de fragmentos de anticuerpos	41
3.7. Imagenología Molecular	44
3.8. Radiofármacos	46
3.8.1. Radiofármacos de ^{99m} Tc	48
3.8.2. Marcación utilizando el isótopo ^{99m} Tc	51
3.8.3. HYNIC: Agente quelante bifuncional.	52
3.9. Imagenología óptica	54
3.9.1. Sulfo-Cyanine7 NHS-éster (Cy7) o ICG	55
4. Materiales y Métodos	57
4.1. Obtención de Fragmentos Fab`'s del Anticuerpo Bevacizumab (Avastin®)	58
4.2. Controles de proceso y de calidad de los fragmentos.	59
4.3. Conjugación HYNIC- Fab`s (Bevacizumab)	60

4.4. Marcación con ^{99m} Tc de HYNIC-Fab (Bevacizumab) y controles de calidad.	60
4.5. Estabilidad de ^{99m} Tc-HYNIC-Fab (Bevacizumab)	62
4.6. Ensayo de competencia con L-Cisteína.	62
4.7. Cultivo y crecimiento de la línea celular Toledo	63
4.8. Conjugación de Fab (Bevacizumab) con isotiocianato de fluoresceína (FITC)	63
4.9. Análisis por citometría de flujo en la línea celular Toledo con FITC-Fab (Bevacizumab)	63
4.10. Modelo animal e inducción tumoral con la línea celular Toledo	64
4.11. Ensayos biológicos in- vivo de biodistribución con ^{99m} Tc-HYNIC-Fab (Bevacizumab)	64
4.12. Estudios imagenológicos.	65
4.13. Conjugación de Fab's (Bevacizumab) con Cianina 7-NHS éster (Cy7 NHS-éster)	65
4.14. Imágenes fluorescentes in-vivo en LNH con Cy7-Fab's (Bevacizumab)	66
5. Resultados	67
5.1. Obtención de los fragmentos Fab del Bevacizumab	68
5.2. Conjugación HYNIC-Fab(Bevacizumab)	69
5.3. Marcación con ^{99m} Tc del conjugado HYNIC-Fab(Bevacizumab)	71
5.4. Estudios de estabilidad in vitro de ^{99m} Tc-HYNIC-Fab (Bevacizumab)	72
5.5. Conjugación de Fab's (Bevacizumab) con isotiocianato de fluoresceína (FITC)	74
5.6. Análisis por Citometría de flujo en la línea celular Toledo con FITC-Fab's(Bevacizumab)	74
5.7. Estudios de biodistribución en ratones Balb/c nude normales y portadores de LNH inducidos.	75
5.8. Imágenes μ SPECT/CT de ^{99m} Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab)	78

5.9. Conjugación de Fab's(Bevacizumab) con Cianina 7-NHS ester (Cy7 NHS-ester)	80
5.10. Imágenes fluorescentes in-vivo en LNH con Cy7-Fab (Bevacizumab)	80
6. Discusión	82
7. Conclusiones	86
8. Referencias bibliográficas	88
Agradecimientos	98

1. Resumen

La angiogénesis se define como el proceso de desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de los pre-existentes, siendo un proceso esencial para el crecimiento y desarrollo tumoral. Se distinguen dos tipos, fisiológica y patológica, diferenciados por los vasos sanguíneos que las inducen. Es controlada por factores pro-/anti-angiogénicos, el cambio hacia el fenotipo tumoral acontece al sobrepasar el umbral entre pro- y anti-angiogénicos (denominado “cambio angiogénico”). El factor pro-angiogénico más importante es el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), en especial el VEGF-A₁₆₅, el cual es capaz de unirse a tres receptores (VEGFR-1/-2 y-3) y a dos co-receptores (Neuropilina-1 y-2) localizados en la superficie de las células endoteliales vasculares.

El linfoma no Hodgkin (LNH) es la neoplasia hematológica más frecuente y quinta causa de muerte por cáncer en el mundo, más del 90% tiene origen en linfocitos B y existen cada vez más evidencias que el proceso de la angiogénesis tumoral juega un rol muy importante en su desarrollo. Por lo cual, el diseño de agentes capaces de inhibir las cascadas de señalización de dichos factores o receptores, representan prometedoras estrategias anti-angiogénicas para LNH. Uno de estos inhibidores anti-angiogénicos desarrollados es el AcMo anti-VEGF-A₁₆₅, Bevacizumab, capaz de inhibir la unión VEGF-VEGFR-2 neutralizando su actividad biológica.

Si bien los AcMo han sido ampliamente utilizados en la medicina del cáncer, son moléculas que por su gran tamaño poseen una lenta depuración sanguínea y de tejidos no blanco, asociadas a una alta captación hepática mediada por la interacción de los receptores Fc sobre los hepatocitos (disminuyendo la sensibilidad para imágenes de metástasis hepáticas que es un sitio común de diseminación tumoral); limitando sus aplicaciones. Esto ha llevado al desarrollo de otras moléculas de menor tamaño para incrementar su cinética de eliminación, como lo son los fragmentos de unión al antígeno (Fabs) de los AcMo. Estos últimos representan adecuados candidatos como agentes de imagen, debido a que presentan una rápida depuración sanguínea y de tejidos no blanco, asociada a que no son secuestrados por el hígado.

De esta forma en el presente trabajo se pretenden estudiar innovadoras estrategias de marcación de los fragmentos de unión a antígeno (Fabs) del AcMo Bevacizumab tanto con tecnecio-99m (^{99m}Tc) como con Cianina-7 (Cy7). La elección de emplear ^{99m}Tc para la radiomarcación radica principalmente en que es el radionucleido más empleado en Medicina Nuclear, de bajo costo y fácil accesibilidad. Por otro lado, debido a las propiedades de fluorescencia en el infrarrojo cercano que posee la Cy7, representa un adecuado candidato para ser empleado en Imagenología óptica.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

El presente trabajo, tiene como objetivo general el desarrollo y el diseño *in-vivo* de un potencial agente de imagen molecular, basado en la marcación con ^{99m}Tc o con Cianina (Cy7) del fragmento de unión al antígeno (Fab) del anticuerpo monoclonal Bevacizumab, para su uso en el diagnóstico de los procesos angiogénicos tumorales asociados a LNH.

2.2. Objetivos específicos

1. Obtención de los Fragmentos Fabs a partir del AcMo Bevacizumab mediante el empleo de la enzima papaína.
2. Realización de las derivatizaciones de los Fragmentos Fabs con el agente quelante bifuncional hidrazinonicotinoato de succinimidilo (HYNIC).
3. Marcación de los Fragmentos Fabs seleccionados con ^{99m}Tc para Imagenología.
4. Marcación de los Fragmentos Fabs con Cy7-NHS éster para imagenología por fluorescencia.
5. Evaluación fisicoquímica de diferentes parámetros para optimizar las marcaciones con ^{99m}Tc así como la metodología de control de calidad de las moléculas marcadas obtenidas.
6. Estudio de la estabilidad fisicoquímica y biológica por presencia del radionucleido ^{99m}Tc en los Fabs.
7. Ensayos biológicos *in-vitro* que permitan analizar la conservación de la actividad biológica, la cinética y su efecto deseado.
8. Ensayos biológicos *in-vivo* que permitan analizar la conservación de la actividad biológica, la cinética y su efecto deseado.

3. Introducción

3.1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad genética caracterizada por un crecimiento tisular producido por una proliferación continua de células, que sufren modificaciones para adquirir capacidades especiales y así lograr la invasión y destrucción de otros tejidos [1].

Las células benignas son células que crecen localmente y no poseen la capacidad de propagarse; en cambio en una célula tumoral, a medida que el ciclo celular avanza, las mutaciones recibidas comienzan a producir la inactivación de genes supresores tumorales, además son capaces de activar oncogenes, como también desactivar mecanismos de reparación de ADN. Esto conlleva a que la célula pierda su estabilidad, y así genere la capacidad de lograr su propia vascularización y la capacidad de realizar metástasis.

A nivel mundial esta enfermedad es una de las principales causas de muerte, registrando en el año 2012 alrededor de 14 millones de nuevos casos y para el año 2015 ocasionará 8.8 millones de muertes. A raíz de esto se estima que el cáncer aumentará a 22 millones de nuevos casos, lo que equivale a un 70% en las próximas 2 décadas [2].

Según datos obtenidos de la Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer (CHLCC), en el Uruguay, los porcentajes de incidencia y mortalidad de los distintos tipos de cáncer en hombres y mujeres se distribuyen de la siguiente manera: (ver Tabla 1 y 2) [3].

Tabla 1: Tasa de incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer ordenados por mayor incidencia en población Uruguaya de hombres. Tasas ajustadas en por edad a la población mundial estándar expresada en casos por 100000 [3].

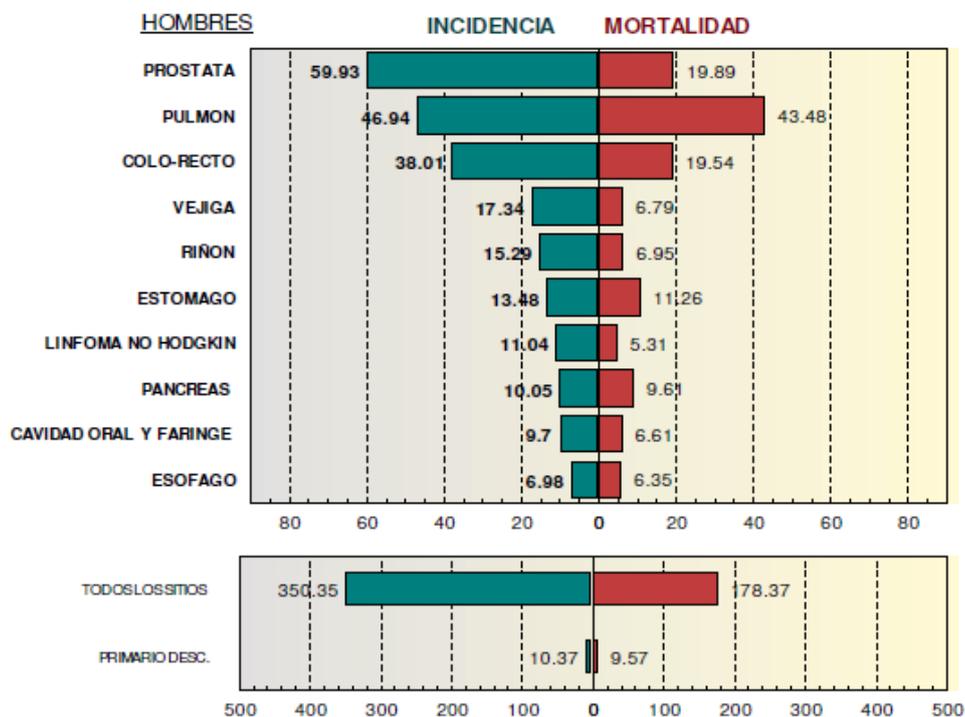
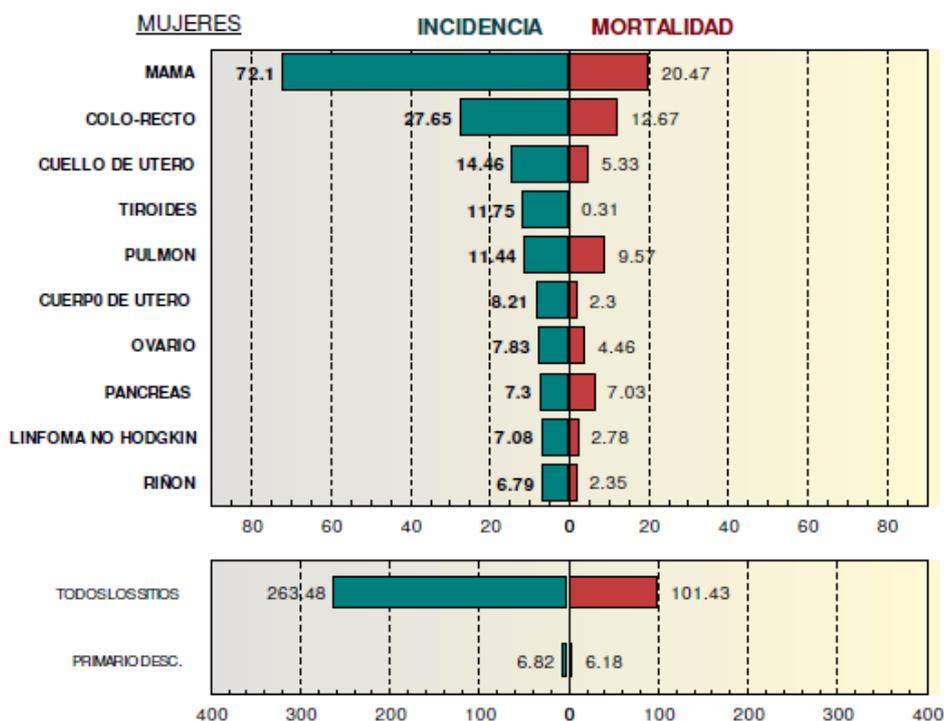


Tabla 2: Tasa de incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer ordenados por mayor incidencia en población Uruguaya de mujeres. Tasas ajustadas en por edad a la población mundial estándar expresada en casos por 100000 [3].



Muchas de las causas del cáncer no han sido identificadas aún, pero existen varias que si se conocen, entre ellas se encuentran: factores intrínsecos como la herencia, la dieta y las hormonas, etc; pero varios estudios científicos apuntan también a factores extrínsecos: como productos químicos (por ejemplo, el cigarrillo), radiación, virus o bacterias. Muchas veces el desarrollo de la enfermedad está dado por uno o varios de estos factores lo cual hace mucho más complejo su estudio [1].

Se pueden diferenciar distintas etapas en el desarrollo del cáncer:

1. **Iniciación:** la cual comienza con la alteración del control de la proliferación celular a causa de una falla o mutación que es capaz de ocasionar activaciones o supresiones de los genes que controlan la proliferación, la diferenciación, el crecimiento, la muerte celular, entre muchos otros genes; lo que lleva a un crecimiento de la masa tumoral.
2. **Promoción:** comienza la formación de los vasos sanguíneos tumorales los cuales se desarrollan de la vasculatura pre-existente mediante precursores endoteliales que estimulan o inhiben el proceso denominado “angiogénesis tumoral”; proceso que es de suma importancia para el posterior crecimiento del tumor.
3. **Progresión tumoral:** continúan las mutaciones genéticas y/o epigenéticas desencadenando un aumento en la malignidad de las células tumorales, adquiriendo la capacidad de invasión a tejidos adyacentes o la diseminación a tejidos más lejanos en un proceso denominado “metástasis”. Este proceso comprende varias etapas entre ellas: pérdida del contacto célula-célula, adquisición de movilidad y viabilidad en el torrente sanguíneo, capacidad de extravasación y generación de nuevos ambientes tumorales (nichos) para el crecimiento tumoral [4-6].

3.1.1. Clasificación

El cáncer no tiene un único sitio de inicio, ni las mismas características en todos los tumores y en las células, es por esto que se utiliza una clasificación según su sitio y tipo celular en [7]:

Carcinomas: es el tipo más común de cáncer que comienzan en la piel o en tejidos que revisten o cubren los órganos internos.

Sarcomas: cáncer que se origina en los tejidos soportes del cuerpo como en hueso, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conjuntivo.

Linfomas y mielomas: comienza en las células del sistema inmunitario y ganglios linfáticos.

Leucemias: surge en el tejido que se forma la sangre en las células sanguíneas inmaduras, como la médula ósea, esto produce grandes cantidades de células sanguíneas anormales que entran al torrente sanguíneo.

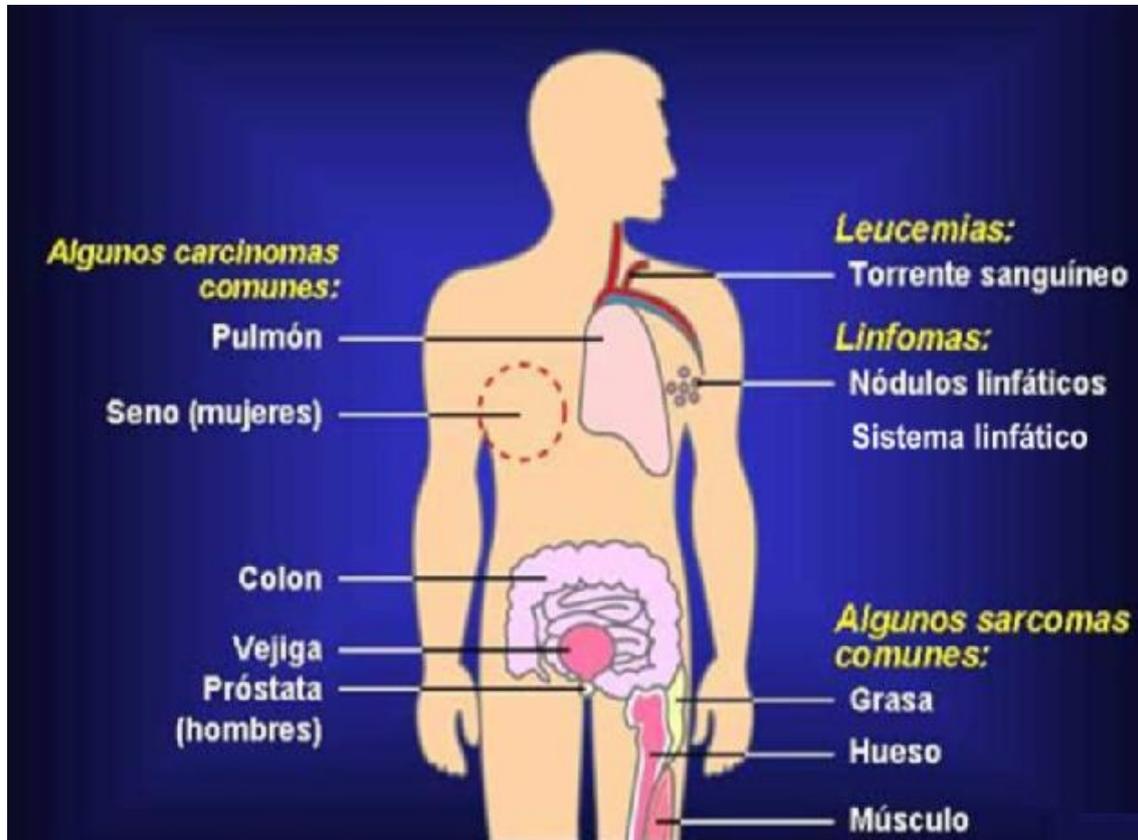


Figura 1: Ilustración de los diferentes tipos de cáncer y sus principales sitios de inicio [1].

3.2. Linfoma

El linfoma es un tipo de cáncer que comienza y compromete a las células del sistema linfático. Dicho sistema forma parte del sistema inmunológico el cual es el encargado de combatir las infecciones y enfermedades del organismo [8].

El linfoma es capaz de iniciarse casi en cualquier sitio del organismo debido a que el sistema linfático se encuentra distribuido por todo el cuerpo, incluyendo los nódulos, intestino asociado al tejido linfático, piel y riñones, entre otros.

Generalmente el fenotipo de célula infectada comprenden a las células del tipo B o del tipo T y también, aunque no tan frecuentemente, al tipo celular natural killer (NK).

Existen dos tipos de linfomas: el linfoma de Hodgkin (LH) y el linfoma no Hodgkin (LNH) los cuales pueden iniciar tanto en niños como en adultos [8].

Datos en Estados Unidos del número de nuevos casos de LH fue de 2.6 por 100.000 hombres y mujeres por año; y el número de muertes fue de 0.3 por 100.000 hombres y mujeres por año. Mientras que el número de nuevos casos de LNH fue de 19.5 por 100.000 hombres y mujeres por año. El número de muertes ocurridas fue de 5.9 por 100.000 hombres y mujeres por año, basándose en las defunciones de 2010-2014 [1].

En Uruguay las estadísticas para el período 2007 - 2011 indicaron que la incidencia de LNH en hombres es de 9,99 con una tasa de mortalidad del 5.23 y del 6.74 de incidencia en mujeres con una tasa de mortalidad del 2.93. Tasas ajustadas por edad a la población mundial estándar expresada en casos x 100000 [3]. Ver tablas 1 y 2.

3.2.1. Clasificación de Organización Mundial de la Salud de los LH y LNH

En la Tabla 3 se observa la distinta clasificación tanto de LH como de LNH [9].

Tabla 3: Clasificación de los LH y LNH y sus frecuencias de incidencia [9].

Linfoma de Hodgkin	Linfoma no Hodgkin
<p>LH Clásico (90-95% de los casos)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Esclerosis nodular (70-80% en adolescentes y 40-50% en menores de 10 años) • Celularidad Mixta (10-15 % en adolescentes y 30-35% en menores) • Depleción linfocítica (poco frecuente en pediatría) • Rico en linfocitos (poco frecuente en pediatría) 	<p>Neoplasias de precursores linfoides</p> <ul style="list-style-type: none"> • Linfoma linfoblastico T (15-20%) • Linfoma linfoblastico B (3%)
<p>Nodular de predominio linfocítico (5-10% de los casos)</p>	<p>Neoplasias de células B maduras</p> <ul style="list-style-type: none"> • Linfoma de Burkitt (35-40%) • Linfoma difuso de células grandes B (15-20%) • Linfoma de células B mediastino primario (1-2%)
	<p>Neoplasias de células T maduras</p> <ul style="list-style-type: none"> • Linfoma anaplasico de células grandes, ALK positivo (15-20%)

3.2.2. Etapas, categorías y patogénesis del LNH.

Las distintas etapas se pueden describir como [10]:

- Etapa I: con afectación de un grupo de ganglios linfáticos
- Etapa II: con afectación de dos o más grupos de ganglios linfáticos del mismo lado del diafragma (un músculo delgado debajo de los pulmones)
- Etapa III: con afectación de grupos de ganglios linfáticos a ambos lados del diafragma
- Etapa IV: con afectación de uno o más órganos aparte de los ganglios linfáticos y posible afectación de los ganglios linfáticos.

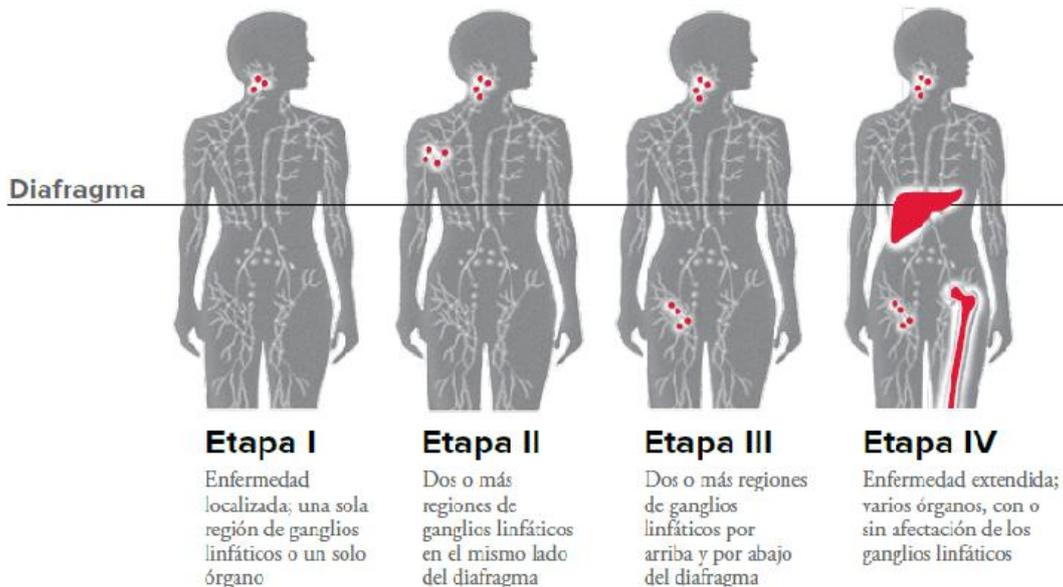


Figura 2: Ilustración de las etapas del LNH según su ubicación en el cuerpo humano [10].

Estas distintas etapas del LNH se pueden sub-dividir en 4 categorías, según los síntomas en cada caso:

- Categoría A: no hay presencia de fiebre, dolor, sudoración ni pérdida de peso.
- Categoría B: hay presencia de fiebre, dolor, sudoración excesiva y pérdida de peso.
- Categoría X: hay presencia de masa tumoral formada por la acumulación de linfocitos.
- Categoría E: comienzan a afectarse zonas cercanas a los ganglios; como tejidos próximos, u órganos cercanos.

En la patogénesis de los diferentes LNH existen varios factores que podrían estar involucrados, muchas de sus causas están aun sin conocer pero se podrían asociar a varias razones [11]:

- Exposición prolongada a productos químicos como pesticidas, solventes, herbicidas, postuladas como sustancias carcinogénicas.
- Enfermedades genéticas hereditarias, como el síndrome de Wiskott-Aldrich
- Varias enfermedades virales, como el VIH
- Algunas enfermedades autoinmunes se han relacionado con el LNH, como la enfermedad de Sjögren, LES, tiroiditis de Hashimoto y artritis reumatoide.

3.2.3. LNH de células B

Los LNH de células B representan aproximadamente el 85% de todos los LNH [9,11].

Se ha visto que en este tipo de LNH se producen transformaciones neoplásicas en los linfocitos B, involucrando genes como los de la diferenciación celular, apoptosis y genes del crecimiento, entre otros.

Las células normales para lograr tener una proliferación celular continua deben de tener los mecanismos de replicación siempre expresados, proceso que lleva a la formación de cromosomas en metafase, el intercambio de la información, conexiones entre cromátidas homólogas y la formación de nuevas células. Pero muchas veces suceden ciertos tipos de translocaciones a nivel genético de los cromosomas que pueden generar daños severos dependiendo del cromosoma afectado y del gen que se expresa en la diferenciación de la célula y en los mecanismos de apoptosis o muerte celular. En la formación de los linfomas existen translocaciones que tienen un impacto importante en su generación y una de las translocaciones que más se ha estudiado es la t(14,18) q(32,21) la cual provoca la yuxtaposición del gen bcl-2 con el segmento de unión de la cadena pesada de Ig; con la consecuente sobre-expresión de la proteína bcl-2. Esta proteína induce un patrón de proliferación policlonal de células B maduras evitando la muerte celular por apoptosis y debido a la translocación se genera su sobre-expresión [12].

Existen marcadores específicos sobre la superficie de las células B como los antígeno CD-20, CD-19, CD-22 (CD: en inglés clúster differentiation) y las Inmunoglobulinas (Ig) de superficie. Estas Ig presentan su región variable mutada, generando un único isotipo, con lo cual su proliferación monoclonal conserva los antígenos específicos de superficie de su precursor, siendo una característica distintiva de las diferentes entidades.

3.2.4. Diagnostico LNH

Para un diagnóstico de LNH se debe realizar una biopsia de una muestra de ganglio linfático u órgano afectado. El análisis correcto incluye [13]:

- Un análisis microscópico para describir la forma celular (pequeñas, grandes, hendidas, redondeadas, etc.), la forma del núcleo, la presencia de nucléolos, citoplasma y existencia de mitosis.
- Una inmunotipificación, para identificar a la población monoclonal y caracterizarla como de células B (CD19, CD20, CD22) o de células T (CD2, CD3, CD7).
- Un análisis citogenético, para examinar las células para ver si hay anomalías cromosómicas.

También existen otros mecanismos de identificación como sobreexpresión de proteínas, inmunotipificaciones utilizando anticuerpos específicos que logran caracterizar el tipo de linfoma entre otras. Es importante lograr especificar y lograr un buen diagnóstico del linfoma ya que esto nos permitiría determinar el tratamiento más adecuado para la situación correspondiente [14].

Existen métodos radiológicos para lograr el diagnóstico de la enfermedad algunos de ellos incluyen:

- Tomografía computarizada con contraste (TAC), la cual presenta una adecuada definición para localizar sitios anatómicos, pero presenta una desventaja ya que no es capaz de distinguir entre malignidad y benignidad.
- Otro estudio que se utiliza mucho es la Tomografía por Emisión de Positrones (PET por sus siglas en inglés), ya que demostró una mejor exactitud a la hora del diagnóstico si lo comparamos con otros estudios imagenológicos tradicionales. Es capaz de evaluar el compromiso de determinados sitios como medula ósea y bazo con más exactitud, pero no permite cuantificar el tamaño

tumoral o determinar la cantidad exacta de áreas anatómicas comprometidas. De forma más reciente se están utilizando los métodos de PET/CT ya que permite una estadificación, un seguimiento y una evaluación a la respuesta del tratamiento a los pacientes [15,16].

3.2.5. Tratamiento

Para asignar el adecuado tratamiento a un paciente se debe considerar [9,14]:

- a) el subtipo histológico del linfoma,
- b) la presencia de factores pronósticos adversos y la edad del paciente,
- c) el estado funcional, y
- d) la presencia de co-morbilidades.

La meta del tratamiento es lograr la “recisión completa” lo que significa eliminar todo indicio de enfermedad. En general, la quimioterapia y la radioterapia son las dos formas principales de tratamiento, en ciertos subtipos de LNH se pueden incluir tratamientos con trasplantes de células madres. Muchos investigadores en todas partes del mundo siguen evaluando e investigando muchas otras nuevas terapias [9].

En la Tabla 4 se muestra algunos fármacos empleados para el tratamiento del LNH. Muchos de estos fármacos son utilizados en combinación entre ellos o a otras modalidades de terapia para mejorar el tratamiento de los distintos tipos de linfomas. Sin embargo es aún más extensa la búsqueda por parte de los investigadores clínicos para encontrar nuevas técnicas y nuevos fármacos que ayuden a aumentar la efectividad de los mismos y de crear nuevos fármacos para los distintos tratamientos.

Tabla 4: Algunos fármacos utilizados para tratamientos del LNH [10].

<p>Fármacos que dañan el ADN</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ bendamustina (Treanda®) ○ carboplatino (Paraplatin®) ○ carmustina (BCNU, BiCNU®) ○ clorambucil (Leukeran®) ○ cisplatino (Platinol®) ○ ciclofosfamida (Cytosan®) ○ dacarbazina (DTIC, DTIC-Dome®) ○ ifosfamida (Ifex®) ○ melfalán (Alkeran®) ○ procarbazona (Matulane®) <p>Antibióticos antitumorales</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ doxorubicina (Adriamycin®) ○ idarrubicina (Idamycin®) ○ mitoxantrona (Novantrone®) <p>Antimetabolitos</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ cladribina (Leustatin®) ○ citarabina (citosina arabinosida, ara-C; Cytosar-U®) ○ fludarabina (Fludara®) ○ gemcitabina (Gemzar®) ○ nelarabina (Arranon®) ○ metotrexato (Rheumatrex®, Trexall®) ○ 6-tioguanina (Thioguanine Tabloid®) 	<p>Fármaco inhibidor del proteosoma</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ bortezomib (Velcade®) <p>Inhibidor de enzimas reparadoras del ADN</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ etopósido (Etopophos®, VePesid®, VP-16) <p>Fármacos que previenen la división celular bloqueando la mitosis</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ paclitaxel (Abraxane®, Onxol®, Taxol®) ○ vinblastina (Velban®) ○ vincristina (Oncovin®) <p>Hormonas que pueden destruir los linfocitos</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ dexametasona (Decadron®) ○ metilprednisolona (Medrol®) ○ prednisona <p>Inmunoterapia</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ rituximab (Rituxan®) ○ itrio-90-ibritumomab tiuxetan (Zevalin®) <p>Inhibidor de la histona deacetilasa</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ vorinostat (Zolinza®) <p>Retinoide</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ bexaroteno (Targretin®)
---	---

3.3. Angiogénesis

Para que una célula tenga un funcionamiento adecuado que le permita crecer y sobrevivir, debe de tener un aporte constante de nutrientes y oxígeno los cuales son proporcionados por el sistema sanguíneo.

Como la difusión de oxígeno a través de los tejidos se encuentra limitada entre 100-200 μm , es necesario el desarrollo de un sistema vascular preciso que logre asegurar que todas la células se encuentren dentro de la distancia necesaria para el suministro de oxígeno. Este sistema vascular además de lograr remover los desperdicios metabólicos, es capaz de también suministrar el oxígeno y los nutrientes que son necesarios para los tejidos y órganos distantes del organismo [17-19].

Para lograr el crecimiento endotelial vascular existen distintos procesos relacionados los cuales incluyen:

1. La linfangiogénesis o formación de nuevos vasos linfáticos,
2. La arteriogénesis o formación de nuevas arterias, y
3. La vasculogénesis o formación *de novo* de vasos sanguíneos, la cual ocurre en la embriogénesis (etapa del desarrollo temprano del embrión), dónde

se da la formación *de novo* de vasos sanguíneos a partir de células precursoras endoteliales (angioblastos), que luego se asocian para formar los vasos sanguíneos primitivos. Estos vasos sanguíneos primitivos son los que posteriormente se diferencian, brotan y se ramifican a partir de los vasos sanguíneos pre-existentes en un proceso denominado “angiogénesis” [20].

El proceso de angiogénesis se refiere a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente. Es un proceso muy complejo, que está controlado por diferentes factores que logran la estimulación o la inhibición de la formación de vasos sanguíneos según las necesidades locales. [17,19].

Se ha logrado diferenciar dos tipos de angiogénesis: la fisiológica y la patológica, que están diferenciadas por los vasos sanguíneos que las inducen:

- Angiogénesis fisiológica: la estructura y funcionamiento de la vasculatura se encuentra ordenada y con una jerarquía adecuada. Los vasos sanguíneos poseen una estructura normal o básica que consta de un lumen central recubierto de células endoteliales rodeadas por una membrana basal. La red vascular se remodela por medio de recortes, ampliaciones y ramificaciones de la vasculatura según las necesidades locales. Según el tipo de vaso, esta estructura básica puede estar rodeada por células de soporte, células de músculo liso y matriz extracelular. Esta estructura produce la formación de un sistema muy vascularizado con el consecuente suministro de todos los nutrientes y oxígeno necesarios a los tejidos sanos. Ocurre durante la embriogénesis donde se da el crecimiento de vascular, y continúa luego del nacimiento durante el desarrollo temprano posnatal; también ayuda a reparar los tejidos dañados está involucrado en la menstruación de la mujer y en la formación de la placenta luego de la fertilización, además este proceso es capaz de proporcionar señales morfológicas y es fundamental para la formación del hueso endocondral y el crecimiento del esqueleto [21-23].
- Angiogénesis tumoral: el tumor depende de la generación de una extensa red de vasos sanguíneos para crecer y sobrevivir ya que al aumentar su tamaño el suministro normal de nutrientes se ve afectado. También el desarrollo de los vasos le aporta al tumor la capacidad de

generar metástasis y de desarrollarse en otras partes del organismo. Esto conduce a un progresión maligna de los tumores.

Los tumores con un diámetro inferior a 2 mm, son estructuras pequeñas y latentes o también llamadas durmientes, ya que reciben nutrientes únicamente por simple difusión. Pero a medida que el tumor aumenta de tamaño y logran desarrollarse comienzan a ser dependiente de la vasculatura existente en el huésped y además de la propia generación de sus vasos sanguíneos [21].

En la figura 3 se muestran todas las etapas de la progresión tumoral en la cuales la angiogénesis está implicada.

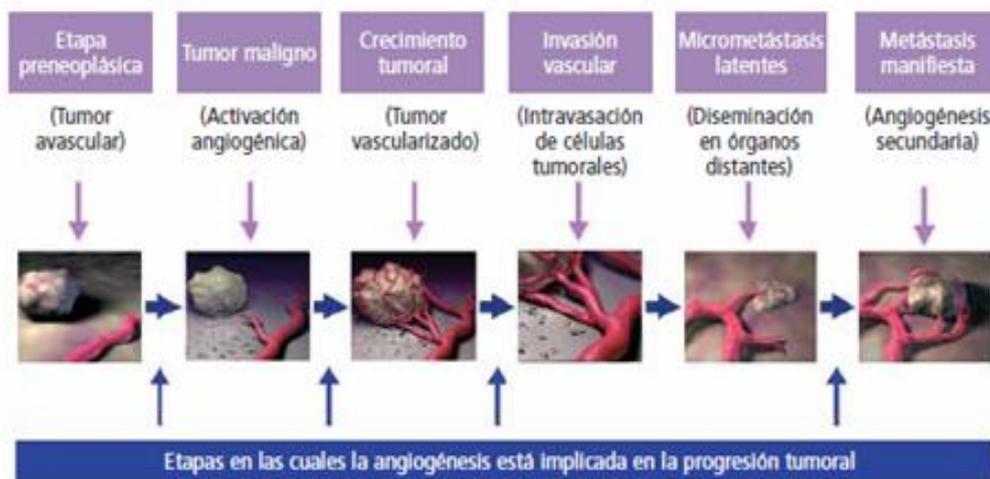


Figura 3. Etapas en que la angiogénesis está implicada en la progresión tumoral [24].

La estructura y función de los vasos tumorales es muy diferente a la de un vaso normal ya que tienen una forma irregular, están dilatados y tienen un diámetro desigual, son sinuosos, contienen fugas y están propensos a hemorragias, están recubiertos de forma imperfecta de células endoteliales (CEs) las cuales poseen una mayor permeabilidad y una mayor cantidad de aberturas, no se organizan en vénulas, arteriolas y capilares definidos, en vez de esto adquieren las características de todos los tipos de vasos y presentan una expresión anómala de antígenos de superficie celular en las células endoteliales [23,25]. Esto genera un flujo sanguíneo irregular que también es llevado a cabo por la sobreexpresión del factor crecimiento endotelial vascular (VEGF).

En la figura 4 se muestra esquemáticamente la comparación de la vasculatura en células normales y tumorales.

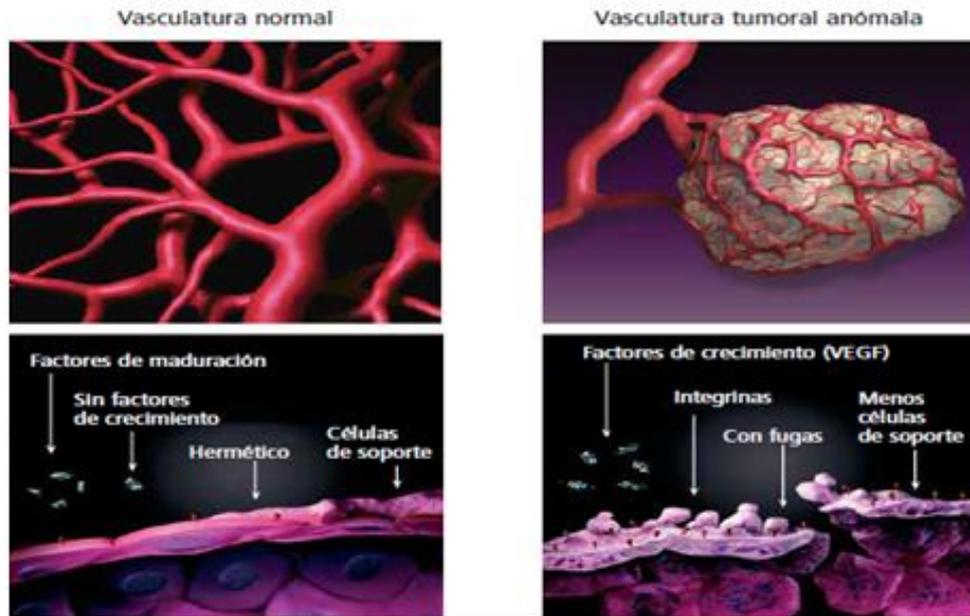


Figura 4: Comparación de la vasculatura en células normales y tumorales [24].

El desarrollo de la angiogénesis es gobernado por un balance entre la producción y liberación de factores pro-angiogénicos o factores que estimulan el desarrollo, y de factores anti-angiogénicos o factores que inhiben el desarrollo de la angiogénesis. En los tumores este balance es destruido y se inicia el crecimiento tumoral en lugares y tiempos indefinidos [25,26].

Los factores pro-angiogénicos son los encargados de estimular y mantener una regulación positiva del desarrollo de la angiogénesis y se pueden clasificar en dos diferentes grupos:

- 1) factores específicos, son liberados por varios tipos celulares, y se unen de forma específica a los receptores de las células endoteliales;
- 2) factores inespecíficos, se unen a las células endoteliales como también células que infiltran el tumor, que incluyen las células endoteliales, fibroblastos, células musculares lisas, plaquetas, células inflamatorias y células tumorales [27].

En la siguiente tabla se encuentran de manera resumida algunas moléculas que actúan como factores pro-angiogénicos junto con sus mecanismos de acción más importantes.

Tabla 5. Moléculas que inducen el proceso de angiogénesis tumoral y sus mecanismos de acción [28].

Moléculas involucradas en la angiogénesis tumoral	
Factores pro-angiogénicos	Mecanismo de acción
Familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Estimula la proliferación, motilidad e interacción de células endoteliales (CE), interfiriendo en la permeabilidad vascular. Reclutamiento de células del sistema inmune promotoras del crecimiento tumoral y de la angiogénesis.
VEGF-C, -D	Estimulan la linfoangiogénesis tumoral.
PIGF	Induce la angiogénesis tumoral
Angiopietina (Ang)/Tie2	Tie2 es sobreexpresada en diversos carcinomas. Induce la migración de CE, actúa en el remodelamiento y maduración de la red vascular tumoral.
Factor de crecimiento de fibroblastos 1 y 2 (FGF-1 y -2)	Actúan en el remodelamiento de la matriz extracelular y en la proliferación y migración de las CE. Es sobreexpresada en diversos tipos tumorales.
PDGF/PDGFR	Mitógeno y quimioatrayente de pericitos, fibroblastos u otras células mesenquimales, regula la angiogénesis indirectamente a través de la inducción del VEGF.
TGF-alfa/beta	Estimula la producción de la matriz extracelular y expresión de integrinas y de VEGF; modula la proliferación y migración de CE; participa en la formación de los tubos capilares; interfiere en la estabilización de los vasos sanguíneos y en la interacción CE-pericito.
TNF-α	Estimula la angiogénesis y diferenciación celular.
COX-2	Estimula la angiogénesis y la vasodilatación vía Tromboxano A2; regula la apoptosis.
Delta-like ligant 4 (DDL4)/vía de Notch	Sobreexpresado en vasos sanguíneos tumorales. Su inhibición compromete a la vascularización y crecimiento tumoral.
Efrinas (Eph)	Sobreexpresadas en linajes de tumor mamario metastásico; ejercen un papel importante en la formación de vasos sanguíneos.
Endotelina (ET-1)	Sobreexpresa la expresión de VEGF por estabilización de HIF-1; interfiere con la secreción de proteasas por las células tumorales.
Óxido nítrico sintasa (NOS)	Estimula la angiogénesis y vasodilatación.
Citocinas/quimiocinas	Papel pleiotrópico en la angiogénesis
Integrinas	Afectan la motilidad, mecano-transducción y proliferación celular, interfiriendo con un amplio espectro de procesos angiogénicos.

VE-caderinas	Estabilizan las uniones de CE en las paredes de los vasos; aumentan la sobrevivencia de CE por la transmisión de una señal anti-apoptótica de VEGFs.
Activadores de plasminógeno	Remodelación de la matriz extracelular; liberación de la activación de factores de crecimiento.
MMPs	Degradan proteínas de la matriz extracelular y activan factores pro-angiogénicos; interfieren en la migración de CE y en el remodelamiento de la red vascular.

Entre todas las moléculas podemos resaltar el rol del VEGF como el factor pro-angiogénico más importante que también está involucrado en la vasculogénesis y en la linfangiogenesis [29-32].

El factor VEGF proviene de una familia de glicoproteínas que incluyen a los diferentes tipos como al VEGF-A,-B,-C,-D y E y al factor de crecimiento placentario PlGF. En el humano, el gen del VEGF-A, es el factor mejor estudiado y el que se encuentra más involucrado en la angiogénesis. El VEGF -C y -D están más involucrados en el desarrollo del sistema linfático pero contribuyen también con la formación de angiogénesis al incrementar la permeabilidad vascular. El PlGF se encuentra expresado en los tumores y parece ser capaz de potenciar la actividad del VEGF-A.

Los factores anti-angiogénicos son producidos tanto por las células normales como por las tumorales y son capaces de inhibir el proceso de angiogénesis. Muchos son proteínas y moléculas pequeñas algunas de ellas se resumen en la siguiente tabla [33-36].

Tabla 6. Resumen de los factores anti-angiogénicos más importantes del proceso angiogénico [28].

Inhibidores endógenos de la angiogénesis		
Inhibidor	Blanco angiogénico	Función
Endostatina	VEGFR, integrina $\alpha 5\beta 1$	Actúa en diversas vías asociadas a la sobrevivencia y migración de células endoteliales. Induce la apoptosis de CE.
Angiostatina	Angiomotina, Integrina $\alpha v\beta 3$, ATP sintasa	Supresor de la angiogénesis tumoral, actuando en varias vías de señalización celular.
TSP-1	MMP-9, CD36,	Inhibición de diversas vías intracelulares. Inhibe la

	Integrina $\alpha v\beta 3$	migración, crecimiento, adhesión y supervivencia de CE. Inhibe proteasas asociadas a la matriz extracelular.
Fragmento de MMP-2 que contiene el dominio hemopexina C-terminal	MMP-2	Supresor de la angiogénesis
IL-12	VEGF, MMP-9	Imunomodulatorio, antitumoral y antimetastásica.
Arrestina	Integrina $\alpha 1\beta 1$	Inhibición de la migración, proliferación de células endoteliales e induce apoptosis de CE/tumorales.
Tumstatina	Integrina $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 1$	Inhibe la síntesis proteica. Atenúa la proliferación de CE.
Canstatina	Integrina $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 1$	Inhibe migración e induce la apoptosis dependiente de CD95 en CE.
Endorepelina	Integrina $\alpha 2\beta 1$	Inhibe la migración celular vía desorganización del citoesqueleto de actina y de adhesiones focales.

El proceso de angiogénesis es muy complejo e involucra una serie de diferentes células, componentes solubles y factores de la matriz extracelular. Se pueden diferenciar diferentes etapas que conducen a la neo-vascularización tumoral [28,37]:

1. Activación de la señalización angiogénica a través de la interacción entre el factor angiogénico (FGF o VEGF) y su receptor (o FGFR o VEGFR) en las células endoteliales presentes en el microambiente tumoral.
2. Secreción de proteasas (enzimas proteolíticas) y subsecuente degradación de la membrana basal de las células endoteliales, por ejemplo, por miembros de la familia de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), particularmente la MMP-2 y la MMP-9.
3. Las MMPs degradan el colágeno y otros componentes de la matriz extracelular, interrumpiendo la barrera de la membrana basal (angiopoyetina-2, un antagonista natural del receptor Tie-2), permitiendo de esta forma a que las

células endoteliales migren, proliferen y se ensamblen en tubos, a partir de los vasos pre-existentes hacia el estímulo angiogénico.

4. Moléculas de adhesión celular vascular contribuyen a la migración de las células endoteliales mediante interacciones célula-matriz extracelular. Un importante mediador es la integrina $\alpha\beta3$, un receptor para proteínas que contienen Arg-Gly-Asp (RGD) tales como la fibronectina, la cual es expresada a bajos niveles en vasos sanguíneos quiescentes. La expresión de la integrina $\alpha\beta3$ es inducida siguiente a la exposición de factores pro-angiogénicos, preferencialmente sobre la superficie de las células endoteliales de los nuevos vasos formados.

5. Luego de la migración y proliferación, las células endoteliales se ensamblan en tubos con un lumen prominente. La formación de dicho lumen podría ser dependiente de E-Selectina, una glicoproteína transmembrana de adhesión celular.

6. Los nuevos tubos nacientes se interconectan y forman una red primaria vascular.

7. Después de la formación de vasos sanguíneos pequeños, ocurre un remodelamiento para la formación de los vasos sanguíneos mayores. Una importante etapa en la producción de los vasos sanguíneos maduros es el reclutamiento de células mesenquimales y su consiguiente diferenciación a células de músculo liso (pericitos), las cuáles se piensa que son capaces de estabilizar la nueva vasculatura formada, de regular la contracción y dilatación de los vasos sanguíneos, proporcionando resistencia y permitiendo la regulación de la perfusión de los vasos y la consiguiente formación de la membrana basal vascular;

8. Los pericitos se unen gradualmente al plexo endotelial recientemente formado, conduciendo de esta forma a la cobertura progresiva del árbol vascular. Durante este período, ocurre una regresión de aquellos capilares no recubiertos por pericitos, la cual cesa luego de la adquisición de la cubierta de pericitos. Esta es la última fase de formación de vasos sanguíneos, caracterizada por pasos de remodelamiento en los cuales los vasos no

protegidos regresan y los vasos cubiertos por pericitos se estabilizan y son menos propensos a la desestabilización y regresión.

9. Por último, una vez que los vasos sanguíneos han sido establecidos, las células endoteliales son sometidas a cambios tejido-específicos para generar vasos sanguíneos distintos funcionalmente.

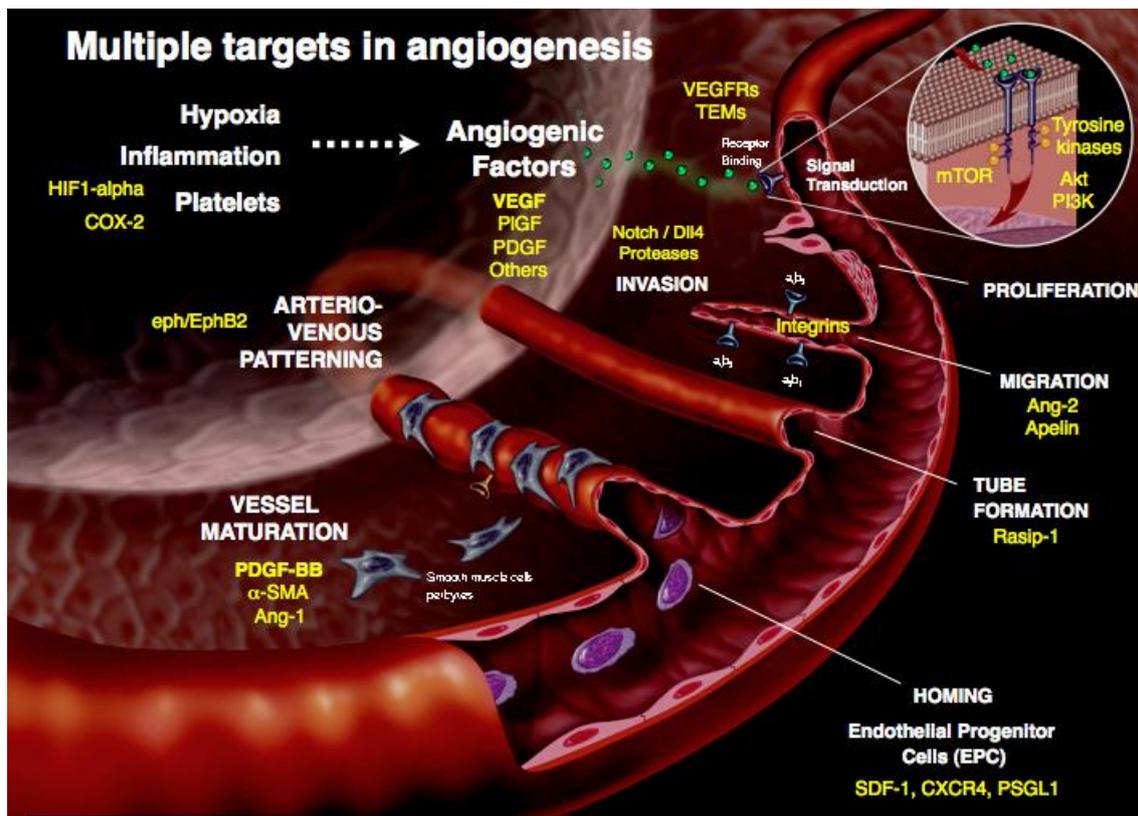


Figura 5. Ilustración de las etapas del proceso de angiogénesis [38].

3.3.1. Activación o switch de la angiogénesis

Como se ha visto para el proceso de angiogénesis se necesitan de varios factores tanto para su desarrollo como para su inhibición. En 1996, Hanahan y Folkman propusieron que existía una especie de activación o encendido angiogénico que generaba un balance positivo hacia la estimulación de los factores pro-angiogénicos, para generar la angiogénesis tumoral [39].

Cuando el tumor se encuentra en “off” se dice que está en una etapa quiescente o durmiente y como ya se ha mencionado su diámetro es de alrededor de 0,2-3mm. Cuando pasa a la etapa de “on” ocurre el rápido crecimiento tumoral, debido a la iniciación de la angiogénesis tumoral, esta etapa se encuentra influenciada tanto por factores del microambiente tumoral, como mutaciones en genes supresores de

tumores (Ej: p53) y en protooncogenes (Bcl-2, K-ras, H-ras, C-myc, etc) capaces de aumentar la expresión de los factores pro-angiogénicos especialmente el VEGF [40].

Dos etapas se pueden diferenciar en el proceso de angiogénesis tumoral, las cuales están separadas por el "switch" angiogénico recién mencionado dependiendo del tipo tumoral y de su microambiente:

1. La primera etapa, denominada fase avascular. Esta caracterizada por la proliferación continua de células neoplásicas, las cuáles reclutan oxígeno y nutrientes a partir de los tejidos y capilares que las rodean. Cuando alcanzan un diámetro de 1-2 mm, sus recursos no son suficientes, por lo que comienzan a producirse procesos de mitosis y muerte celular programada (por apoptosis) a tasas similares, manteniendo un estado durmiente. Por lo tanto, para que un tumor crezca y se desarrollen metástasis se debe producir una nueva vasculatura. Sólo algunos tumores durmientes son capaces de entrar a la segunda fase [41].

2. La segunda etapa, o fase vascular, es caracterizada por un crecimiento tumoral de tipo exponencial, desarrollándose de esta formando clones agresivos y provocando que algunas células tumorales se ubiquen por fuera del límite de difusión del oxígeno, convirtiéndose en tejidos hipóxicos, requisito fundamental para el desarrollo tumoral, ya que dichas condiciones hipóxicas inducen a respuestas compensatorias dentro del tumor. En especial, se activan cascadas de señalización por medio de la actividad quinasa Src, que inducirán al aumento de la expresión del factor inducible por hipoxia, el HIF-1 α [42]. El HIF-1 α induce la expresión de factores pro-angiogénicos, tales como: el VEGF [43], el bFGF [44], el PDGF y la sintetasa de óxido nítrico [45], inclinando la balanza a favor de los factores pro-angiogénicos, proceso conocido con el nombre de "cambio angiogénico" [46].

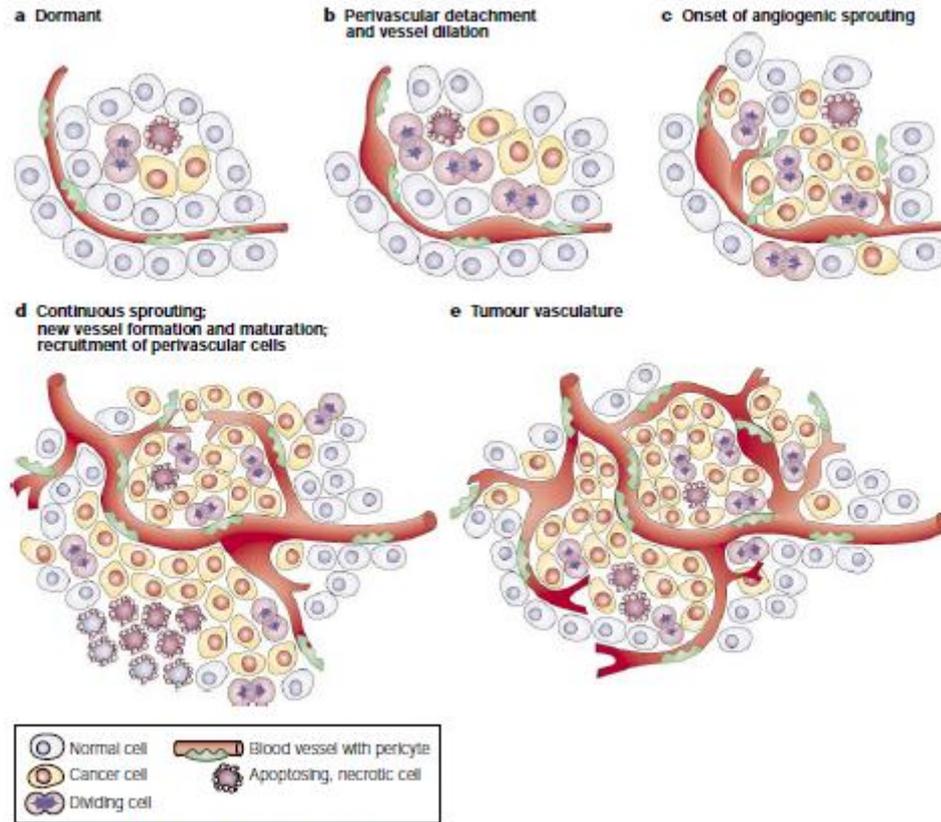


Figura 6. El “cambio angiogénico”. El cambio angiogénico es un paso discreto en el desarrollo tumoral que puede ocurrir en diferentes etapas de la vía de progresión tumoral, en función de la naturaleza del tumor y su microambiente. La mayoría de los tumores comienzan a crecer como nódulos (durmientes) avasculares (A) hasta que llegan a un nivel de equilibrio entre células proliferantes y apoptóticas. La iniciación de la angiogénesis, o del “cambio angiogénico”, tiene que ocurrir para garantizar el crecimiento exponencial del tumor. El cambio comienza con el destacamento perivascular y la dilatación de los vasos (B), seguido de la brotación angiogénica (C), la formación y maduración de nuevos vasos sanguíneos, y el reclutamiento de células perivasculares (D). La formación de vasos sanguíneos continuará mientras el tumor crezca, y los vasos sanguíneos se alimenten específicamente de las áreas hipóxicas y necróticas del tumor para proporcionarle los nutrientes y oxígeno esenciales (E) [47].

3.3.2. Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

El VEGF fue identificado por primera vez en 1983 por Harold F. Dvorak aunque en ese momento no se sabía bien cuál era su mecanismo acción, sino que fue años más tarde, en 1996, por Napoleone Ferrara y colaboradores que lograron descifrar el rol crucial del VEGF en el proceso de angiogénesis, ya sea en la patológica como en la fisiológica [24].

Hoy en día el VEGF y sus receptores se reconocen como el principal sistema regulador de las células endoteliales vasculares y de la formación de vasos sanguíneos [48].

3.3.3. Actividades biológicas del VEGF en la angiogénesis

El VEGF actúa en varias etapas del proceso de angiogénesis descrito anteriormente [53-58].

- Media la secreción y activación de enzimas que se encuentran involucradas en la degradación de la matriz extracelular. Actúa sobre las células endoteliales (CE), induce la expresión del activador del plasminógeno y sus inhibidores, del receptor urokinasa, de las metaloproteinasas de la matriz intersticial (colagenasa y gelatinasa A); mientras disminuye los niveles de los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas 1 y 2.
- Actúa como un factor de supervivencia para las CEs a través de la inhibición de la apoptosis. Esta acción está mediada por las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-A1, la regulación de la ruta fosfatidilinositol 3-quinasa/Akt, incrementando la fosforilización de la quinasa de adhesión focal y la estimulación de la producción de óxido nítrico (NO) y prostaglandina I₂
- Es esencial para la movilización de los precursores de las CEs derivados de la médula ósea.
- Posee un rol importante en la de su propia migración a los sitios de angiogénesis.
- Otras acciones del VEGF incluyen el incremento de la permeabilidad vascular, la inhibición de la diferenciación de las células dendríticas, la regulación del transporte de hexosas dentro de las CEs, la inducción del factor tisular y la inducción de la migración de monocitos.

3.3.4. Expresión génica del VEGF y su regulación

Se detallan algunas de los factores más importantes en la expresión genética del VEGF [59].

1. Tensión de oxígeno: la expresión del ARNm para el VEGF es inducida por la exposición prolongada a la baja tensión de oxígeno, y esta baja tensión es inducida por el factor inducible de hipoxia 1 (HIF-1).
2. Factores de crecimiento: EGF, TGF- α y - β , KGF (factor de crecimiento derivado de queratinocitos), IGF-1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1), FGF y PDGF. Todos estos factores producen un marcado incremento de la expresión del ARNm del VEGF, demostrando que la liberación parácrina o endocrina de

estos factores coopera con la hipoxia local en la regulación de la liberación del VEGF en el microambiente.

3. Citosinas inflamatorias: IL-1 α y β , PGE-2 e IL-6. La IL-1 α , PGE-2 e IL-6 inducen la expresión de VEGF en varios tipos celulares (incluyendo a fibroblastos sinoviales) y La IL-1 α induce la expresión de VEGF en células de músculo liso; esto sugiere que el VEGF podría mediar la angiogénesis y permeabilidad en las enfermedades de origen inflamatorio.
4. A oncogenes activados: Por ejemplo Ras, así como p53 mutado, llevan al incremento de la expresión de VEGF.

Varios de los factores de regulación son resumidos en la figura 9.

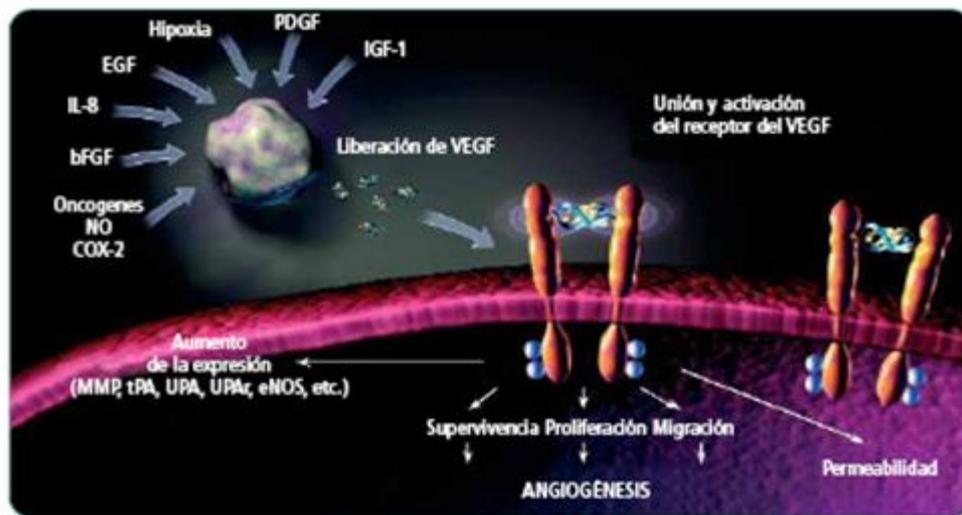


Figura 9. Factores que regulan la expresión del ARNm del VEGF [24].

3.3.5. Factor de crecimiento endotelial vascular-A (VEGF-A)

En el humano el VEGF-A es el factor más estudiado, su gen se organiza en 8 exones los cuales se encuentran separados por 7 intrones, el proceso de splicing alternativo del gen resulta en la generación de seis isoformas diferentes para el VEGF-A; VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₃, VEGF-A₁₈₉ y VEGF-A₂₀₆, (Ver figura 10) siendo los respectivos números el aminoácido correspondiente en el sitios de clivaje. Se encuentra localizado en el cromosoma 6p21.3. Es una glicoproteína homodimérica, de unión a heparina de 34-42 KDa. Todas las isoformas del VEGF-A aumentan la permeabilidad vascular, estimulan la proliferación y migración de CEs, generan señales de supervivencia y anti-senescencia a dichas células dan neuroprotección en desórdenes isquémicos entre otras funciones [59,60].

La forma predominante en es la isoforma VEGF-A₁₆₅, se encuentra cargada positivamente y se une a heparina como mencionamos anteriormente, principalmente

es secretada, pero gran parte continúa unida a la superficie celular de la matriz extracelular. Se une al receptor VEGFR-2 y su afinidad a esta unión se encuentra incrementada hasta 10 veces por la unión a la neuropilina 1 (NRP-1).

En tejidos normales, se han encontrado altos niveles del ARNm del VEGF en pulmones, riñones, corazón y glándulas adrenales de adultos; menores niveles de VEGF-A se hallan en el hígado, bazo y mucosa gástrica.

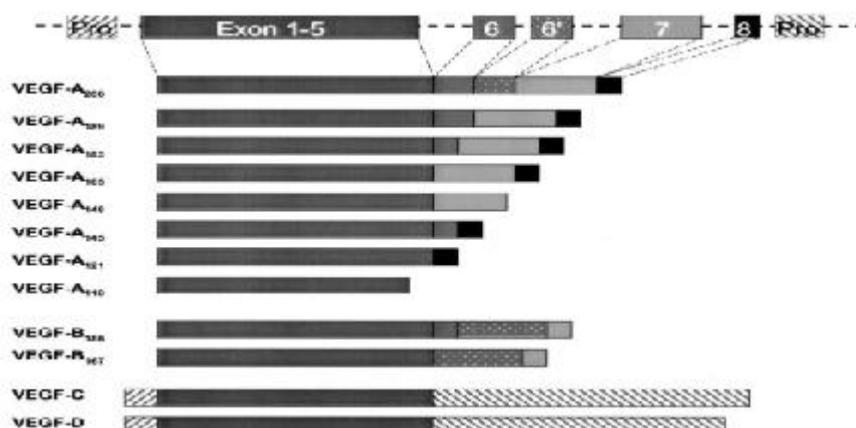


Figura 10. Estructura génica de VEGF-A, -B, -C y -D. El gen del VEGF-A consiste en ocho exones que dan lugar a siete isoformas de 121, 145, 148, 165, 183, 189 y 206 aminoácidos a través de splicing alternativo. Una isoforma adicional del VEGF-A con 110 aminoácidos resulta a partir de la escisión proteolítica. El VEGF-B existe como dos isoformas de 167 y 186 aminoácidos. El VEGF-C y el -D son liberados proteolíticamente a partir de su respectiva pro-proteína. Todos los miembros de la familia del VEGF comparten un dominio VEGF homólogo altamente conservado, codificado por los exones 1 al 5 [61].

3.3.6. Receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR)

Para que se produzca el proceso angiogénico se necesita de una serie de señalizaciones producidas por las uniones que poseen una alta afinidad de los factores a sus receptores, en este caso el factor VEGF se debe unir a su receptor tirosin kinasa que se encuentra sobre la superficie de las células endoteliales vasculares y en células derivadas de la médula ósea en circulación [60].

Todas la formas que se conocen del VEGF nombradas anteriormente son capaces de unirse a los 3 receptores denominados VEGFR-1 (también conocido como Flt-1), VEGFR-2 (KDR o Flk-1) y/o VEGFR-3 (Flt-4). Poseen sobre la superficie extracelular siete dominios que son homólogos a los de las inmunoglobulinas, uno de los dominios se encuentra en la parte transmembrana, otro dominio es yuxtatransmembranal, un dominio de señalización tirosin quinasa intracelular. Los dominios dos y tres están

involucrados en la unión al ligando y las regiones del cuarto al séptimo están involucradas en la dimerización del receptor [59].

Tal como ocurre con otros receptores tirosin quinasa, estos se dimerizan y experimentan una trans-autofosforilación que desencadenan una cascada de señales capaces de fosforilar distintas proteínas, como la proteína kinasa-C (PKC), fosfolipasa C-gamma (PLC-γ), fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y el blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR), regulando mecanismos involucrados en angiogénesis, activados por el VEGF.

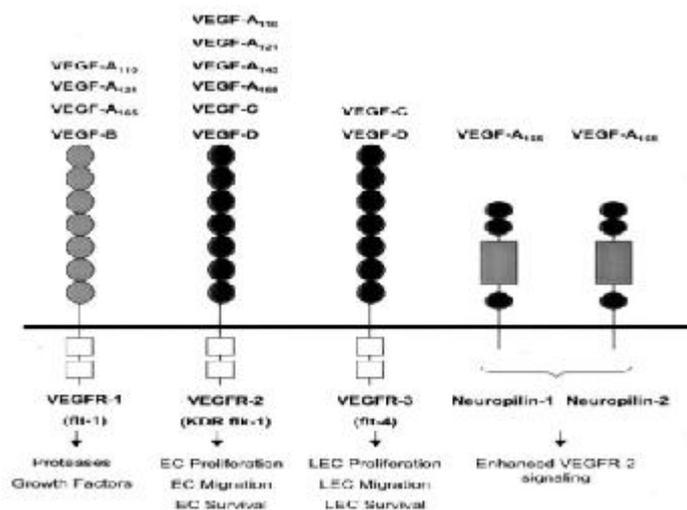


Figura 11. La familia de receptores VEGF. Los tres receptores tirosina quinasa VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (KDR/flk-1) y VEGFR-3 (flt-4) poseen siete dominios parecidos a inmunoglobulinas, una región transmembrana y un dominio tirosina quinasa consenso que está interrumpido por un dominio de inserción a quinasa. Los receptores accesorios, neuropilina 1 y neuropilina 2, no poseen actividad quinasa por ellos mismos pero aumentan la señalización del VEGFR-2 [61].

3.3.7. Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular-1 (VEGFR-1)

Este receptor fue uno de los primeros receptores en ser identificados y es el que posee mayor afinidad por el VEGF [62]. Es una proteína transmembrana de 180kDa, su ARN puede sufrir splicing alternativo generando una glicoproteína más corta con seis dominios extracelulares, se encuentra presente en suero y en él es capaz de regular positivamente y negativamente la unión del VEGF-A y PIGF. También se encuentra en la superficie celular y es capaz de unirse al VEGF-A,-B y PIGF-1 y -2 que generan toda la cascada de señalización de angiogénesis. También podemos encontrarlo inhibiendo y promoviendo quimiotaxis, actuando como un receptor dual:

positivamente, como el Flt-1 en la superficie celular, y/o negativamente, como el Flt-1 soluble (sFlt).

Se encuentra expresado principalmente en las ECs, aunque también en células trofoblásticas, monocitos, células renales mesangiales, células del músculo liso uterino y en distintos tipos celulares tumorales y su expresión es aumentada por hipoxia vía un mecanismo dependiente de HIF-1.

Las proteínas kinasa activadas por mitogeno (MAPKs) no son activadas por este receptor y esto genera que no halla proliferación celular pero si promueve la generación de proteasas como la metaloproteasa de matriz extracelular -9 (MMP-9), las cuales son requeridas para la degradación de la membrana basal de los vasos sanguíneos en las etapas iniciales de la angiogénesis [37,59, 63-65]

3.3.8. Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular-2 (VEGFR-2)

El VEGFR-2 es una glicoproteína de 230 kDa de peso molecular, y su ARNm genera por splicing dos productos funcionales distintos. La región extracelular de VEGFR-2 está compuesta por 762 aminoácidos ácidos plegados en siete dominios de inmunoglobulina, y varios sitios de glicosilación unidos a nitrógeno. La glicosilación es necesaria para la estabilidad del receptor, exposición en la superficie celular e incluso para su activación sobre la unión de VEGF [66].

Varios glicanos están asociados a los receptores de la superficie celular. Entre estos, el ácido siálico (NeuAc) que abarca una gran familia de azúcares, muchas observaciones sugieren una posible implicación de NeuAc en la actividad pro-angiogénica de VEGFR-2 [66,67].

Este receptor se une a VEGF-A y a formas maduras del VEGF-C y -D. Es el principal receptor que actúa en la angiogénesis dado que es el mayor mediador de los efectos mitogénicos y del aumento de la permeabilidad vascular, también tiene respuesta de migración celular cuando es activado por el VEGF [62,68,69]. El VEGFR-2 se encuentra expresado principalmente en las CEs, además de células madre hematopoyéticas, megacariocitos y células progenitoras retínales. Se cree que el aumento en su expresión se deba a un mecanismo post-transcripcional como mecanismo principal pero además su inducción se desencadena bajo condiciones de hipoxia.

Su activación por el VEGF, resulta en la activación de las MAPKs por la fosforilación de las tirosinas de la vía del PI3K-PLC-γ-PKC (Figura 12) [62,70,71]

Interesantemente, la activación del VEGFR-2 aumenta y activa la sintetasa endotelial de óxido nítrico (eNOS), un mecanismo importante si se toma en cuenta que el óxido nítrico juega un papel central en la proliferación de las CEs vasculares, en la migración celular, en la formación tubular, en el aumento de la permeabilidad vascular, en la hipotensión y en la angiogénesis inducida por el VEGF.

La activación de este receptor es suficiente para la activación de todos aquellos transductores de señales que están involucrados en la angiogénesis y en la migración celular, así como en la maquinaria angiogénica y en la permeabilidad vascular (Figura 12) [71].

El mecanismo molecular que está implicado en la actividad pro-angiogénica del receptor es la unión de proteínas de unión a glicano como la galectina -1 y -3 a complejos de N-glicanos en el receptor VEGFR-2.

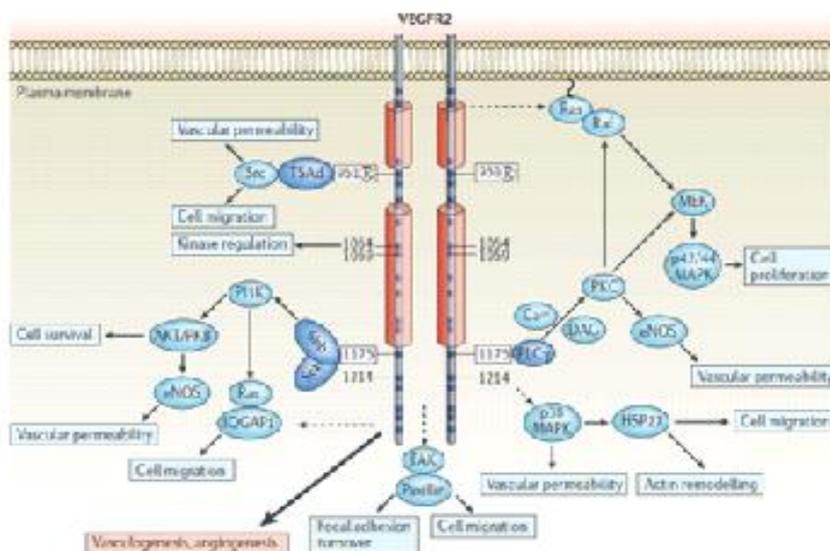


Figura 12. VEGFR-2 y sus mecanismos de acción [72].

3.3.9. Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular-3 (VEGFR-3)

Es un receptor tirosina kinasa relativamente estable de superficie celular que se encuentra altamente glicosilado con un peso molecular aproximado de 180kDa. Su transcripción genera dos diferentes formas que difieren entre sí por sus extremos carboxilo-terminal; la forma predominante en los tejidos, corresponde a un transcrito

de 5.8 Kb, mientras que la variante alternativa consta de 4.5 Kb [73]. Después de la biosíntesis, la forma glicosilada del VEGFR- 3, es cortada proteolíticamente en el quinto dominio de Ig, aunque las cadenas resultante permanecen unidas por un enlace disulfuro. Los ligandos del VEGFR-3 el VEGF-C y VEGF-D están involucrados en la linfangiogénesis, al igual que en la angiogénesis y en la migración celular, a pesar de que el VEGF-A no se une a este receptor.

Es expresado en las CEs vasculares en las etapas tempranas del desarrollo, mientras que después de la organogénesis permanece restringido a las CEs linfáticas; también se puede sobre-expresar tanto en tumores vasculares benignos como malignos de niños y adultos. Este receptor se encuentra activado en los capilares sanguíneos de reciente formación que rodean a los tumores sólidos, siendo importante tanto para la génesis de la neo-vascularización inducida por el tumor, como para el mantenimiento del recubrimiento de las CEs durante la angiogénesis tumoral [59,60,62,70].

3.3.10. Neuropilina 1 y Neuropilina 2 (NRP-1 y NRP-2)

Las neuropilinas homologas NRP-1 y NRP-2; son co-receptores glicoprotéicos para VEGFR-1/2, y para VEGFR-3 respectivamente, sin actividad quinasa, que se encuentran en la superficie celular, son capaces de unirse a las colapsinas/semaforinas proteínas implicadas en la señalización para la guía neuronal.

Ambas son capaces de unirse a VEGF-A₁₆₅ con distintas afinidades; siendo la NRP-1 capaz de unirse a VEGF-B, PlGF y VEGF-E, mientras que la NRP-2 se une a VEGF-A₁₄₅ y VEGF-C [59,62,74,75].

Son expresadas en muchos tipos de células no endoteliales tales como células de músculo liso, neuronas, células epiteliales y células inmunes; y se piensa que las NRPs están implicadas en la regulación de la migración de estos tipos distintos de células.

La NRP-1 de 130-135 KDa contiene solo una cola intracitoplásmica corta y se sabe que es capaz de incrementar la unión del VEGF-A₁₆₅ con el VEGFR-2, actuando a manera de co-receptor [76]. Por sí misma, la NRP-1 puede mediar la señalización que resulta en migración celular y supervivencia de las CEs, aunque no su proliferación. Al igual que el VEGFR-2, la NRP-1 se encuentra particularmente expresada en algunas células tumorales, además de las CEs vasculares, probablemente estimulando el crecimiento y la migración de la célula tumoral [59].

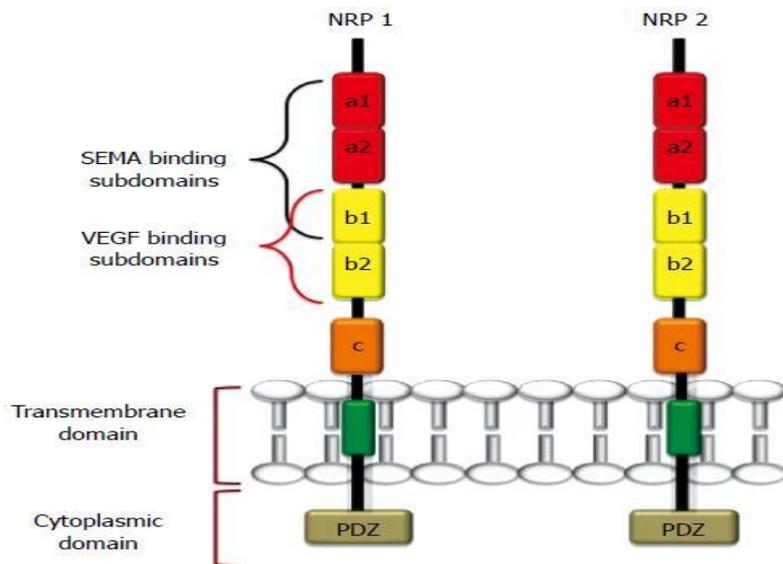


Figura 13: Representación de los receptores de Neuropilinas y sus sitios de unión al VEGF [76].

3.4. Anticuerpo monoclonal humanizado Bevacizumab

Hace más de una década, en 1993, se logró el desarrollo de la humanización del anticuerpo comercial Avastin o Bevacizumab, murino anti-VEGF Mab A.4.6.1 a través de técnicas avanzadas de ingeniería genética, de modo que el anticuerpo resultante conserva la especificidad de la molécula original, siendo 93 % humano y 7 % proveniente del anticuerpo murino [77]. Este anticuerpo humanizado al igual que el murino es capaz de unirse y neutralizar todas las isoformas del VEGF-A en especial a la isoforma 165, con una alta afinidad (K_d = entre 1,1 y 0,8 nmol/L respectivamente) y sus fragmentos proteolíticos bioactivos logrando una inhibición máxima del crecimiento del tumor humano.

Su vida media es de 17-21 días [78], posee 214 aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 149.KDa. El epítipo de unión de Bevacizumab se ha definido por el análisis de la estructura cristalina de un complejo Fab (Fracción variable del anticuerpo) ligando. Las propiedades y farmacocinética del anticuerpo estudiadas en varias especies son consistentes con el anticuerpo monoclonal humanizado [79].



Figura 13. Representación de la molécula de Bevacizumab. Los dominios de unión humano y murino están mostrados en verde y morado, respectivamente [24].

Una vez formado el complejo anticuerpo-VEGF, este impide y bloquea la unión a sus receptores, flt-1 y KDR, sobre la superficie de las CE, neutralizando la actividad biológica del VEGF y provocando la reducción de la vascularización de los tumores [80].

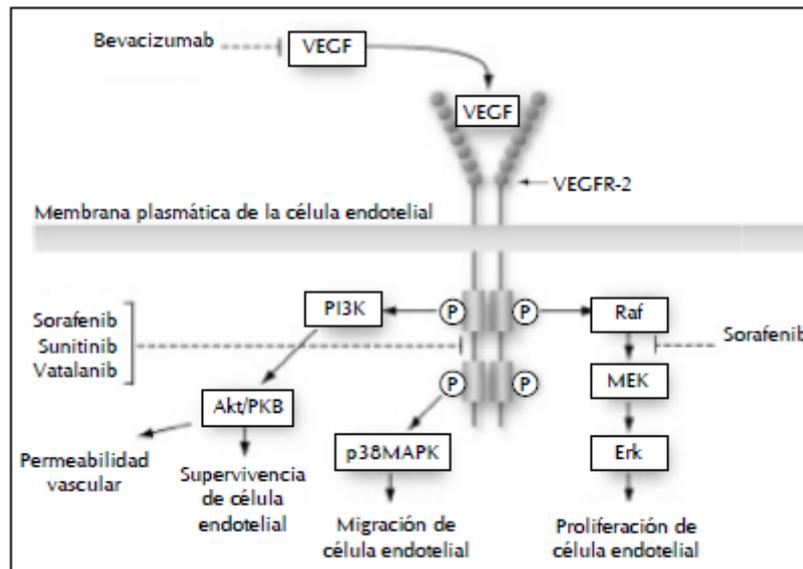


Figura 14. Mecanismo de acción del Bevacizumab [80].

Se encuentran en curso varios ensayos clínicos que utilizan inhibidores del VEGF en una gran variedad de neoplasias malignas [79].

En 1997, Genentech inició ensayos clínicos de fase I con Bevacizumab y fase II. Los estudios de fase I mostraron que la administración del anticuerpo como agente único era relativamente no tóxica y que añadir regímenes de quimioterapia estándar no altera significativamente la asociación de toxicidades. En 1998, se comenzaron los estudios de Fase II con Bevacizumab en diferentes tipos de tumores, ya sea como un solo agente o en combinación con quimioterapia. La combinación del anticuerpo con quimioterapia a base de fluoropirimidinas (5-florouracilo, leucovorin e irinotecan) se estudió por primera vez en la línea de cáncer colorrectal metastásico y el cáncer de pulmón de células no pequeñas de estadio IIIb / IV (NSCLC). Los resultados de eficacia más alentadores fueron vistos cuando se combinó Bevacizumab con quimioterapia en el cáncer colorrectal y de células no pequeñas y cuando se usa como un solo agente en el cáncer de células renales resultando en un incremento del tiempo de progresión y de la supervivencia [79-81]. El Bevacizumab fue aprobado por primera vez en la FDA (Food and Drug Administration) en el año 2004 para el tratamiento del cáncer de colon avanzado y ha sido aprobado para cáncer de pulmón avanzado (2006), riñón y cerebro (glioblastoma) (2009). También fue aprobado para el cáncer de mama metastásico en 2008 bajo el programa de aprobación acelerada. Bajo

este programa un medicamento puede ser aprobado en base a los resultados de los datos clínicos que sugieren que el fármaco tiene un beneficio clínico importante. Sin embargo, se necesita información adicional para confirmar los datos [82].

3.5. Angiogénesis y Bevacizumab en LNH

Una angiogénesis sostenida es esencial para el desarrollo de tumores sólidos, líquidos y para el desarrollo de metástasis. Es por ello que la interrupción de las vías de señalización que rigen la vascularización tumoral proporciona una potencial estrategia para frustrar la progresión del cáncer [85].

Considerando todo lo anterior, se sabe que el VEGF es un factor parácrino derivado de los tumores, donde su expresión es necesaria para la entrega de oxígeno y nutrientes para el crecimiento tumoral, por lo cual su bloqueo ha sido clave para el desarrollo de las denominadas estrategias anti-angiogénicas.

En todos los tipos de LNH se ha observado el proceso de angiogénesis, debido al gran incremento de la expresión de los factores que regulan dicho proceso. El aumento de factores angiogénicos conlleva al desarrollo de la angiogénesis y esto se relaciona con la malignidad, agresividad y subtipos de LNH [83-86].

Se observó en estudios realizados en pacientes con LNH que se encontraban en etapas avanzadas o en las primeras o segundas recidiva, que al tratarlos con Bevacizumab, presentaron respuestas parciales y en un 14 % de ellos la enfermedad se estabilizó. A su vez se confirmó que la expresión del VEGF y del VEGFR-1 se limita a las células malignas, mientras que el VEGFR-2 se expresa predominantemente en las células endoteliales de los LNH; observando que la concentración plasmática de VEGF se reduce durante el tratamiento con Bevacizumab [86].

3.6. Utilización de fragmentos de anticuerpos

La investigación comprende el estudio de variadas aplicaciones que se ajusten económicamente y científicamente al objetivo deseado, es por esto que se debe internalizar en la comprensión y utilización de nuevas técnicas que permitan el posible desarrollo de los objetivos.

La utilización de los anticuerpos produce una amplia gama de efectos no deseados e innecesarios mediados por sus fragmentos constantes (Fc), una solución para liberarse de los Fc es el empleo de los fragmentos de unión al antígeno (Fab) [87].

Otro de los inconvenientes del empleo de los anticuerpos como agentes terapéuticos o de diagnósticos es la falla al suministro, dado que varios de los tumores sólidos tienen barreras físicas sustanciales que impiden la penetración de los anticuerpos al centro tumoral y los efectos para los cuales han sido diseñados se ven disminuidos. También se sabe que los tiempos de vida media de los anticuerpos en el organismo van de los 17 a 25 días, esta prolongada vida media está mediada por la interacción de los Fc con el receptor Fc neonatal (FcRn), y esto dificulta la utilización de los anticuerpos como marcadores de diagnósticos dado a que reduce el contraste de imagen; por lo cual una solución a ello sería el empleo de un agente que sea eliminado rápidamente de la circulación a través del riñón.

Tomando en cuenta lo anterior, los fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos monoclonales brindan la oportunidad de nuevas posibilidades terapéuticas y diagnósticas debido a que poseen procesos de producción más simples y de altos rendimientos.

El fragmento de unión al antígeno (fragmento Fab) se compone de un dominio variable constante y una de cada una de las cadenas pesada y ligera.

El proceso de fragmentación de anticuerpos se lleva a cabo mediante agentes reductores y proteasas que digieren o escinden porciones de algunas partes de la estructura de la proteína inmunoglobulina (IgG). Uno de las proteasas más comúnmente utilizadas es la papaína. Cuando las moléculas de IgG se incuban con papaína en presencia de un agente reductor, uno o más enlaces peptídicos en la región bisagra se dividen, produciendo tres fragmentos de tamaño similar: dos fragmentos Fab y un fragmento Fc [87-89].

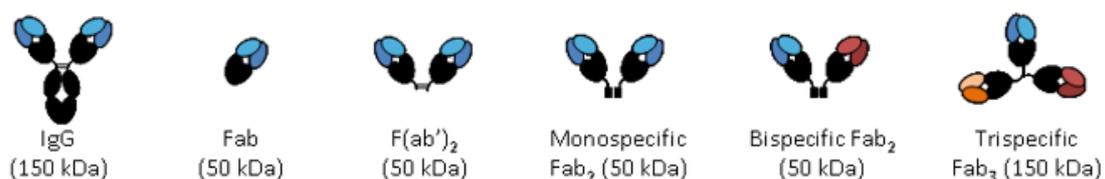


Figura 15. Representación esquemática de las diferentes formas de anticuerpos que muestra la molécula de IgG clásica junto con fragmentos de anticuerpo generados a partir de estos [88].

El empleo de fragmentos más pequeños permite una penetración más profunda con la misma afinidad del anticuerpo. También son útiles en la formación de imágenes y en el diagnóstico o terapia del cáncer. Los que han sido diseñados para ser multiméricos son útiles cuando se dirigen a múltiples antígenos asociados a enfermedades [90].

Algunas de las muchas ventajas que se obtienen al utilizar los fragmentos de los anticuerpos se pueden resumir como [88]:

- Reducción de las interacciones de unión no específica Fc.
- Capacidad para controlar las uniones Fc-proteína.
- Penetración más eficiente en los tejidos.
- Sensibilidad potencialmente mayor en la detección de antígenos.
- Eliminación de la inmunogenicidad de la región Fc en los estudios de unión antígeno-anticuerpo.
- Sistema más simple para el estudio de la base estructural para el reconocimiento inmune.
- Inmunogenicidad por debajo de la del anticuerpo intacto para los experimentos *in-vivo*.
- Sistemas de producción más simples. La producción de fragmentos de anticuerpos es posible con sistemas microbianos tales como *E. coli* y levaduras, que se traduce en un menor costo de los productos y una mayor aplicación de los beneficios de estas moléculas terapéuticas.
- Mayor tasa de depuración a partir del suero y los tejidos.

Durante las últimas tres décadas se han diseñado fragmentos de unión a antígenos más pequeños, inicialmente por proteólisis y posteriormente por ingeniería genética para producir fragmentos mono o multivalentes [91].

Los agentes Fab son la clase más antigua de anticuerpos monoclonales, esta clase de fragmentos también es la más utilizada y la más exitosa y gracias a ello que existen tres aprobados por la FDA para aplicaciones clínicas.

1. **Abciximab** ReoPro, Centocor (Johnson & Johnson) es un Fab de un anticuerpo quimérico contra la glicoproteína plaquetaria IIb / IIIa, aprobada en 1994 como un complemento para prevenir la trombosis durante el cateterismo de la arteria coronaria para el infarto de miocardio con elevación del ST.
2. **Ranibizumab** (Lucentis, Genentech) es un Fab humanizado dirigido contra el factor de crecimiento vascular endotelial A, aprobado en 2006 para la el

tratamiento de la neovascularización (húmeda) en la degeneración macular relacionada con la edad.

3. **Certolizumab** pegol (UCB) es un pegilado anti-TNF α Fab aprobado en 2008 para el tratamiento de la enfermedad de Crohn.

Existen pocas comparaciones directas entre fragmentos y anticuerpos de tamaño completo, pero los datos disponibles sugieren que Certolizumab pegol no es intrínsecamente más seguro o más eficaz que otros anticuerpos anti-TNF α . También se espera que el Bevacizumab se aproxime más a la eficacia de Ranibizumab en forma significativa y con un menor gasto. Otras comparaciones requerirán datos adicionales para moléculas en desarrollo temprano, por ejemplo, anti-CD20 SMIPs TRU-015 o SBI-087 que pueden competir con Rituximab y Ofatumumab, y CAB051, un anticuerpo anti-Her2 / un nuevo anticuerpo "miniaturizado" que puede competir con Trastuzumab.

Los Fabs y las moléculas "3G" incluyendo "nanobodies", "minibodies" y "unibodies", y las diversas moléculas bi- y tri- específicas, están comenzando a desarrollarse clínicamente y la ingeniería molecular sin duda tiene mayores ambiciones por seguir investigando en este desarrollo. Así, la promesa de la terapia de fragmentos de anticuerpos permanece, aún no completa, pero en constante ascenso.

3.7. Imagenología Molecular

La Imagenología molecular se define como la visualización, caracterización y medida de procesos biológicos a nivel molecular y celular en seres humanos u otros seres vivos [92].

La Imagenología molecular es una herramienta más a la hora de la realización de exámenes médicos que nos permite la detección de variadas anomalías moleculares que constituyen a la enfermedad, en especial a las enfermedades relacionadas al área de oncología y neurología. Es capaz de caracterizar, obtener información morfológica, estructural, metabólica y funcional de procesos biológicos de los seres vivos a nivel celular mediante la utilización de imágenes. Es una técnica poco invasiva que tiene como objetivo el diagnóstico temprano en fases iniciales de la enfermedad, siendo un punto a favor a la hora de los tratamientos oncológicos. Esta técnica en investigación se ha puesto cada vez más en manifiesto y es ampliamente empleada en Medicina Nuclear.

En medicina nuclear se emplean sustancias radiactivas en cantidades trazas, permitiendo la obtención de una variada información anatómica y funcional, necesaria para generar un diagnóstico y un tratamiento adecuado de las enfermedades. A su vez se utiliza la interacción de radiación electromagnética con los tejidos y fluidos. Algunas de las técnicas que suelen utilizarse son: tomografía computada, resonancia magnética nuclear, rayos X, radiaciones gamma en centellografía y técnicas aún más recientes como la tomografía por emisión de positrones (PET) y tomografía computada por emisión de simple protón (SPECT) [93,94]. En el correr del tiempo se han ido implementando nuevas técnicas con diferentes propiedades físicas, de resolución y sensibilidad las cuales incluyen la Imagenología óptica.

La tomografía por emisión de positrones acoplada a la tomografía computada (PET/CT) es una técnica no invasiva utilizada en medicina nuclear, brindando información relevante de las distintas patologías. La imagen se basa en la radiación emitida por un trazador radiactivo que es emisor de positrones el cual ha sido incorporado al paciente. Consta de tres componentes principales: el ciclotrón (donde se aceleran partículas y se producen los radionucleidos), los módulos de síntesis ubicados dentro de celdas blindadas (donde se producen los radiofármacos); y las cámaras PET/CT (donde se adquieren y procesan las imágenes de tomografía por emisión de positrones (PET) y tomografía computada (CT, que utiliza rayos X) [96].

La tomografía computada por emisión de simple protón (SPECT) es un equipo desarrollado para la detección de la radiación gamma emitida por el radiotrazador utilizado en la administración al paciente, captura las imágenes que se crean al rotar las gamma cámaras alrededor del paciente y así obtener y analizar los datos que se obtienen de la emisión del fotón único en forma de rayo gamma. La imagen obtenida puede ser presentada en cualquier plano 2D, 3D [95-97].

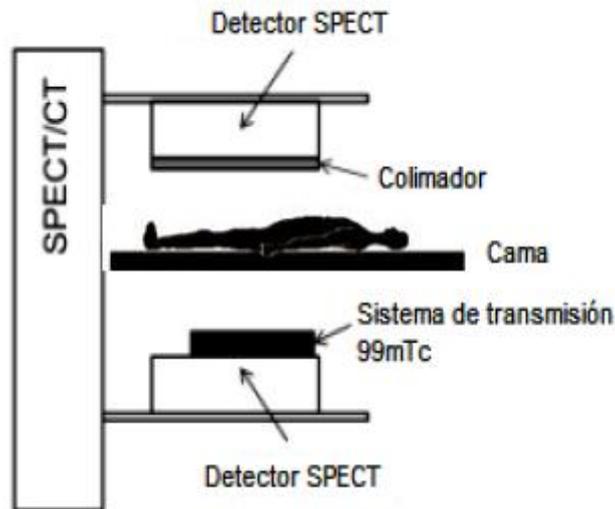


Figura 16: Esquema de un dispositivo de SPECT [105].

Estas técnicas tienen variadas aplicaciones oncológicas, cardiológicas y neurológicas y más del 90 % de los pacientes la utilizan ya que en los pacientes oncológicos permite distinguir entre tumores benignos y malignos, dado que muchas veces existen dudas en la anatomía y en los resultados de las biopsias, que dificultan la correcta identificación. Permite identificar un tumor primario desconocido en pacientes con enfermedad metastásico y establecer el grado de malignidad de un tumor. También nos indica el estadio (extensión) de la enfermedad al diagnóstico y en la recaída (reestadificación). Evalúa la existencia de enfermedad recurrente o residual. Establece la topografía de las lesiones metastásico en pacientes con niveles elevados o en ascenso de marcadores tumorales. Evalúa la respuesta a la terapia oncológica y la planificación de la radioterapia. Además, el PET/CT tiene importantes indicaciones en neurología, vinculadas con el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas (demencias), trastornos del movimiento y epilepsia. Asimismo, dentro de las aplicaciones en cardiología destacamos el estudio de viabilidad y perfusión miocárdica en situaciones clínicas concretas [98].

Gracias a esta nueva generación de técnicas más precisas e innovadoras, utilizadas en medicina nuclear el investigador se ha visto en una constante búsqueda de nuevos agentes de imagen, radiotrazadores o radiofármacos que sean sensibles y específicos y que puedan ayudar a los pacientes, tanto en diagnóstico como en terapia.

3.8. Radiofármacos

Un radiofármaco es una sustancia química, con características farmacológicas apto para ser administrado a seres humanos para fines diagnósticos y /o terapéuticos. Está compuesto por una molécula radioactiva o radioisótopo el cual emite radiación que nos permite ver la distribución y detectar al radiofármaco que se encuentra unida a una molécula orgánica o inorgánica o a macromoléculas como anticuerpos monoclonales o los fragmentos derivados de estos. Esta última es la encargada de transportar el radioisótopo a los órganos, tejidos o células específicos, definiendo así una ruta metabólica para su posterior análisis [99,100].

El radiofármaco puede clasificarse según su uso en el área clínica, en radiofármaco de diagnóstico y/ de terapia [99].

En general puede encontrarse constituido por cuatro partes; la molécula blanco, un linker o también llamado espaciador, un agente quelante bifuncional (AQB) y el radioisótopo.

Una molécula blanco debe ser capaz de unirse a su ligando con muy alta afinidad y especificidad, para que se pueda lograr la selectiva absorción del radiofármaco. Muchas moléculas incluyen anticuerpos monoclonales, fragmentos de los anticuerpos, pequeños péptidos o ligandos no peptídicos los cuales han demostrado una gran capacidad para este fin. El linker es una molécula que se encarga de modificar la farmacocinética del compuesto resultante para que pueda incorporarse correctamente y que no pierda sus características farmacológicas.

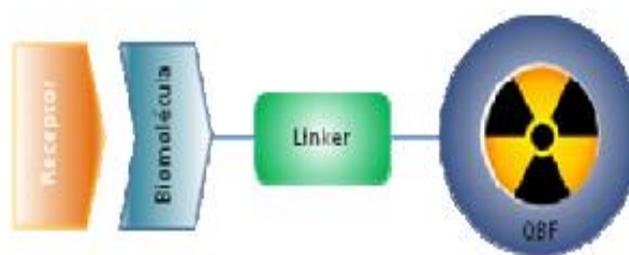


Figura 16. Imagen de la composición de un radiofármaco, incluyendo la molécula, el linker, el AQB, el radioisótopo, y a su receptor o ligando.

El uso, almacenamiento, procedimientos e instalaciones para la correcta producción de un radiofármaco están sujetas a la autorización de las autoridades nacionales y o regionales de cada país y es muy importante que se deban cumplir. También antes de ser utilizado para uso clínico de rutina debe de demostrar su inocuidad en el paciente y el beneficio que ofrece en el tratamiento. Este proceso está

estrictamente regulado por la Food and Drug Administration (FDA) en los Estados Unidos y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en Europa [101].

La distribución radiofarmacéutica *in-vivo* nos proporciona una variedad de imágenes que corresponden a la morfología funcional de los órganos específicos de estudio, en una forma no invasiva, y es de principal importancia a la hora del diagnóstico de muchas enfermedades comunes que están asociadas a funcionamiento incorrecto de los órganos así como también en la detección de distintos tipos de cánceres [102].

Para diagnóstico se utilizan los radioisótopos que emiten rayos gamma penetrantes y son detectados por cámaras SPECT / PET. La radiación emitida por el isótopo usado para la formación de imágenes en general desaparece completamente después de 1 día a través de la desintegración radiactiva del propio isótopo y a través de la excreción normal del cuerpo. Los isótopos que se utilizan con más frecuencia para la formación de imágenes en diagnóstico son: ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{131}I , ^{201}Tl , ^{111}In y ^{18}F [103].

El tecnecio-99m es el radionúclido más utilizado en Medicina Nuclear en todo el mundo, con alrededor de 76.000 escáneres por día, que abarca aproximadamente el 85 % de todos los estudios de SPECT en Medicina Nuclear [104].

Para terapia se utilizan radioisótopos que emiten partículas de corto alcance (alfa o beta) debido a la capacidad que tiene de perder toda su energía a distancias muy cortas, causando así muchos daños locales (como la destrucción celular). Los isótopos utilizados en terapia no desaparecen rápidamente como los utilizados en diagnóstico sino que permanecen más tiempo en el cuerpo ya que se necesita aumentar la eficacia del tratamiento, pero esto sigue siendo limitado a varios días. Los isótopos terapéuticos más comunes son: ^{131}I , ^{90}Y , ^{188}Re y ^{177}Lu [103].

Cada vez es más el uso de la medicina nuclear en el mundo y es por esto que cada vez se está en constante búsqueda de nuevos radiofármacos que nos permitan ayudar en la elaboración de diagnósticos tempranos; y de terapias dirigidas específicas, que ayuden a comprender e investigar la salud y enfermedad humana.

3.8.1. Radiofármacos de ^{99m}Tc

Los radiofármacos que utilizan al isótopo ^{99m}Tc se pueden dividir en tres generaciones [105];

- Primera generación: Los radiofármacos son preparados mediante kits que contienen al ligando, al agente reductor y al buffer necesario para ajustar el pH de la solución. Son utilizados principalmente para la distribución biológica en el organismo y son los mayormente comercializados.
- Segunda generación: son utilizados como vectores específicos es decir están diseñados para lograr la unión específica al receptor para el cual el ligando fue diseñado. Deben ser preparados con agentes quelantes bifuncionales que unan al ligando y a su marcador radiactivo.
- Tercera generación: en este caso el radiofármaco consta de la molécula biológica unida a su isótopo radiactivo sin necesidad de quelantes. La eliminación de este tipo de radiofármaco está condicionada por el tipo de eliminación de la propia molécula biológica.

El tecnecio (Tc) es un elemento químico del grupo 7 de los metales de transición, puede presentar 8 estados de oxidación desde el + 7 al -1, debido a que puede ubicar a sus electrones en las capas 4d y 5s. El estado de oxidación junto con su estabilidad van a depender principalmente del ligando al que se encuentre unido, encontrándolo más habitualmente en los estados de oxidación +4 y +7.

Es el primer elemento químico que se obtuvo de manera artificial, y su peso atómico depende del isótopo que se ha generado. También puede obtenerse por fisión en un reactor nuclear o por la acción de los neutrones sobre el ^{99}Mo .

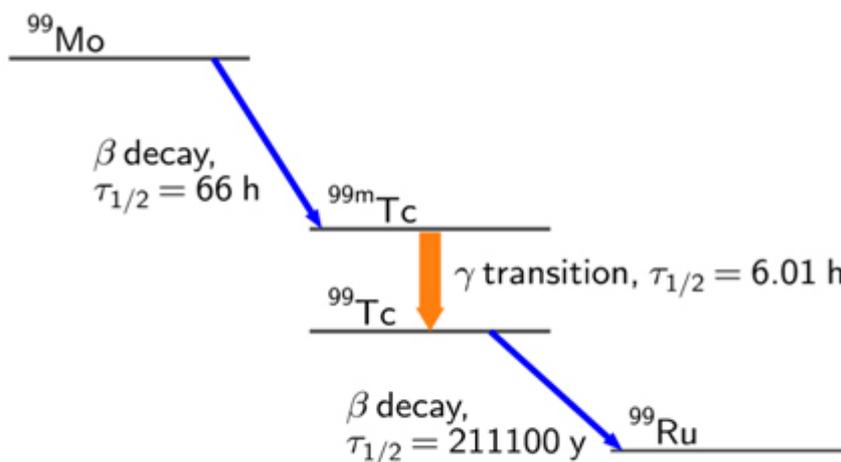


Figura 17: Esquema de generación del ^{99m}Tc a partir de ^{99}Mo y su semidesintegración en ^{99}Tc y ^{99}Ru .

El ^{99m}Tc es el radionucleido que más se utiliza en medicina nuclear dado que tiene un periodo de vida media relativamente corto, de 6,04 horas. Se administra a pacientes a bajas concentraciones, emite una radiación gamma monocromática de 140KeV de energía y es de fácil obtención mediante el generador de ^{99}Mo - ^{99m}Tc . Dicho generador está basado en la adsorción del radionucleido padre ^{99}Mo en una columna de alúmina, mientras que el ^{99m}Tc se obtiene por decaimiento del ^{99}Mo . El ^{99m}Tc se obtiene en forma de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (en estado de oxidación +7) perteneciato, por elución de la columna con una solución salina. El $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (+7) se produce en forma estéril, apirogena y libre de portador, que puede ser utilizada de forma inmediata tanto para la marcación como en la administración, evitando de esta forma las impurezas generadas por la desintegración de ^{99m}Tc a ^{99}Tc que tiene un periodo de semi-desintegración de 2.13×10^5 años [107].

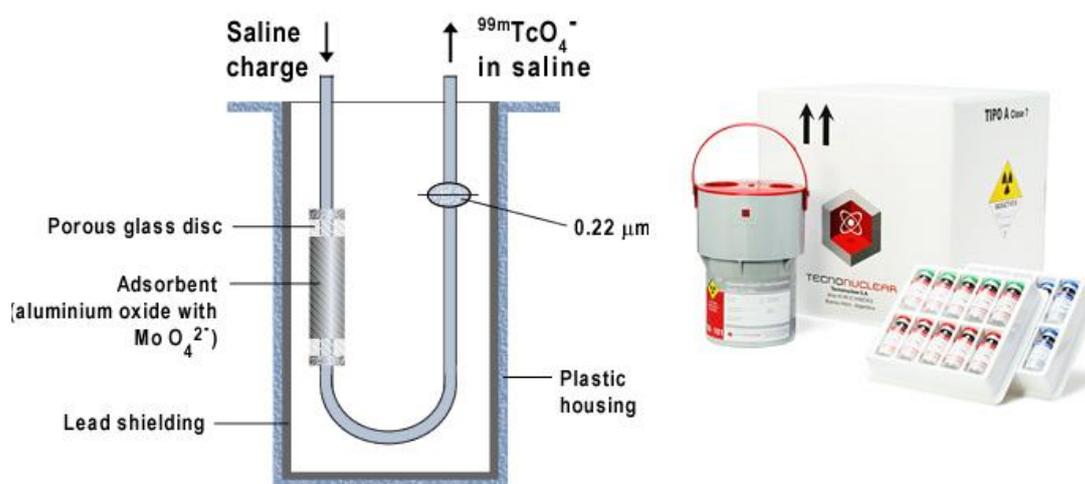


Figura 18. Generador ^{99}Mo - ^{99m}Tc [106].

Los diferentes estados de oxidación del ^{99m}Tc pueden lograrse mediante la utilización de agentes reductores como el HCl concentrado, Acido Ascórbico y Cloruro de estaño entre otros. El más utilizado en la práctica para la elaboración de los radiofármaco de Tc es el ion estannoso Sn^{2+} ya que presenta un abaja toxicidad y se logran elevados rendimientos de marcación. El uso de estos agentes se debe a que el perteneciato obtenido por elución se encuentra en estado de oxidación + 7, lo que lo hace poco reactivo. Al cambiar su estado de oxidación logramos un compuesto que logra interactuar más fácilmente con el agente quelante.

Una vez obtenida la solución, se deben controlar las especies reducidas que se obtiene del ^{99m}Tc , como son: la especie TcO_2^+ que se encuentra a pH inferiores a 1.2;

al elevarse el pH se une a un grupo OH^- estabilizándose, mientras que a valores superiores a 2 se forma la molécula neutra TcO_2^- .

Por lo cual en la mayoría de las preparaciones con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, en el preparado final pueden estar presentes por lo menos tres especies radiactivas:

- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ libre bajo la forma de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, que no ha sido reducido por el agente reductor empleado.
- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ reducido que no reaccionó con el agente ligando y se encuentra como $^{99\text{m}}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.
- Compuesto de interés marcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Los radiofármacos de tecnecio una vez que han sido incorporados al organismo por el sistema vascular, tienen tres etapas de eliminación:

- Una eliminación rápida, donde el ion que se encuentra en los tejidos pasa al fluido intersticial. Se encuentra afectada por la concentración de los iones que están presentes en dicho fluido y por la presión osmótica que se ejerce entre la entrada del ion desde el tejido al fluido.
- Una eliminación intermedia, en esta eliminación intervienen los sistemas glandulares que eliminan al ion perteneciato del tejido por un bombeo iónico dependiendo de la concentración de dicho ion que se encuentre en su interior.
- Una eliminación lenta o eliminación renal, en la cual interviene la tasa de excreción urinaria y la filtración glomerular del ión $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$.

Por esta razón se deben diseñar estrategias de marcado que aseguren la correcta formulación del compuesto para poder ser administrado y utilizado como un adecuado radiotrazador para el diagnóstico de enfermedades [107-109].

3.8.2. Marcación utilizando el isótopo $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Para realizar la correcta marcación con el isótopo de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a la molécula dirigida contra su blanco específico, se han descrito una serie de diferentes enfoques entre los cuales podemos distinguir [110]:

- Enfoque integrado: utiliza un quelante no natural, se utiliza una fracción de la molécula que es removida para ser reemplazada por este metal. Algunas

consecuencias más directas que se pueden presentar son que se pierda afinidad por su receptor, que se produzcan alteraciones en el tamaño y en la conformación de la molécula. Algunos ejemplos que son el cambio de un enlace C-C por enlaces del metal con O, N o S [111].

- Uso de agentes quelantes bifuncionales (AQB): en este caso se utiliza el AQB, una molécula que es capaz de unirse a la molécula y de coordinar al metal. Se puede utilizar un linker o espaciador para casos en los que el sitio bio-activo de la molécula y sus propiedades farmacocinéticas no se desee modificar.
- Enfoque híbrido: Se utiliza una secuencia de tres péptidos para quelar al metal ya que los péptidos Gly,Gly,Gly; Cys,Gly,Gly; Gly,Cys,Cys o Cys,Gly,Cys presentan un grupo de átomos donadores de electrones. La estructura de los péptidos se puede encontrar de forma lineal o cíclica.

La utilización de una de estas técnicas se ve reflejada en el estudio que se quiere realizar y en la disponibilidad de material para poder ser realizada. El uso de los agentes quelantes hoy en día es una de las técnicas más utilizadas a la hora de sintetizar radiofármacos de diagnósticos ya que nos brinda buenas características físicas y químicas que son aptas para ser utilizados [110-112].

3.8.3. HYNIC: Agente quelante bifuncional

El hidrazinonicotinamida o mejor conocido como HYNIC es un quelante bifuncional que posee un grupo hidracina altamente reactivo y con una química de conjugación altamente eficaz para la marcación de biomoléculas con la utilización del isótopo ^{99m}Tc para la obtención de imágenes moleculares.

Más allá de la utilización con tecnecio el agente tiene una variada versatilidad para el desarrollo de mejoras en su eficacia para la utilización en diseños que permiten la mejora de especificidad del sitio, en la disponibilidad de bloques de construcción de aminoácidos, de grupos protectores mejorados y además posee una variada selección de co-ligandos.

También tiene como ventaja que los productos resultantes son relativamente hidrofílicos y esto favorece su rápida depuración [113].

Posee algunas desventajas a la hora de su utilización como el desconocimiento de la estructura exacta de las especies formadas, los complejos resultantes suelen ser

negativamente cargados y no pueden atravesar barreras biológicas como la barrera hematoencefálica [114-117].

La conjugación de la molécula de HYNIC a biomoléculas se basa en la formación de un enlace amida que se forma con un éster activado de HYNIC con un amina presente de la biomolécula. Si la conjugación en moléculas peptídicas el conjugado es mediante acople directo.

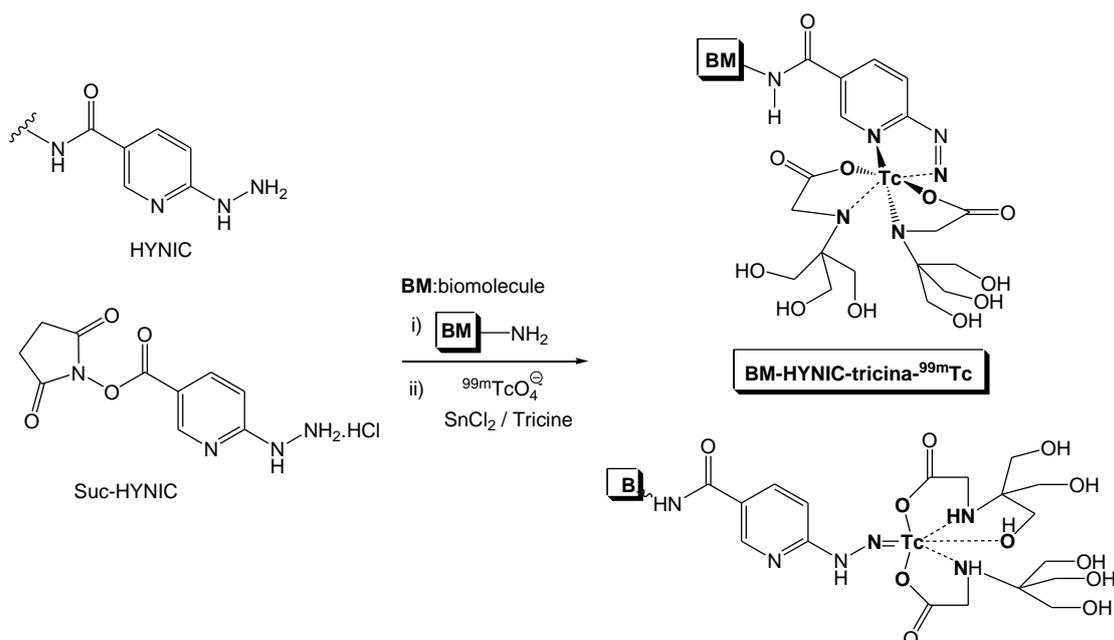


Figura 19: Representación de distintas estructuras para los radioconjugados formados utilizando tricina como coligando.

La molécula es capaz de coordinar al metal a través del átomo de N del anillo de piridina y/o átomo de N del grupo hidracina, pero además se requiere la utilización de co-ligandos para lograr completar la esfera de coordinación del metal.

Para ello se utilizan diferentes co-ligandos y uno de los más utilizados para la conjugación con tecnecio en la tricina, ya que el sistema tricina-HYNIC posee una gran cinética de etiquetado. Sin embargo se ha observado en soluciones diluidas su estabilidad es relativamente baja. Por estas razones se han diseñado otros co-ligandos como el EDDA que genera menor cantidad de complejos con una mayor estabilidad pero en contraparte tiene una eficiencia de marcación menor [118,119].

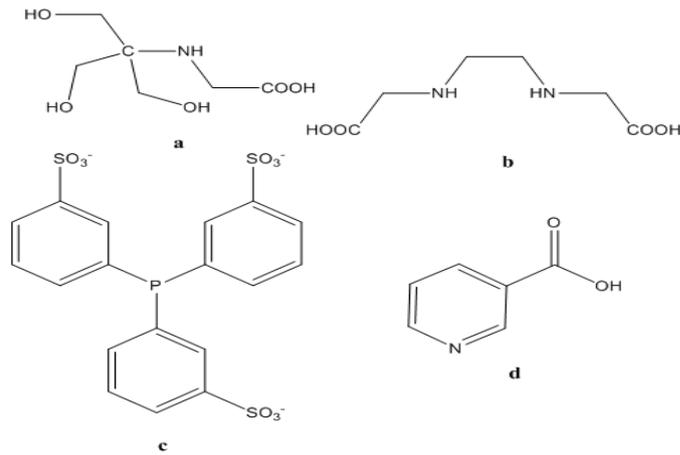


Figura 20. Co-ligandos más utilizados para la marcación de HYNIC con ^{99m}Tc: a) Tricina; b) EDDA; c) derivado hidrosoluble de trifenilfosfina; d) ácido nicotínico [119].

3.9. Imagenología óptica

La Imagenología óptica es una técnica que se basa en la utilización de luz para formar imágenes e interrogar funciones celulares y moleculares en el cuerpo con vida, así como en tejidos de animales y en plantas. La información que logra obtener se basa en la composición del tejido en estudio y de los procesos biomoleculares que estén ocurriendo en él. Las imágenes se producen mediante el uso de fotones de luz con longitudes de onda que van desde el ultravioleta cercano al infrarrojo [121].

Para generar el contraste en la imagen se suelen utilizar:

- Agentes exógenos que nos dan la señal como, tintas o sondas de imagen.
- Agentes endógenos que poseen en su estructura moléculas ópticas como el NADH, hemoglobina, colágenos, etc.
- Genes informadores que nos permiten la identificación correcta de la imagen.

Algunas técnicas de imagen óptica que se pueden encontrar son:

- Imagen de fluorescencia con uso de luz cercana al infrarrojo (700-900nm): esta técnica implica la excitación de un fluorocromo por una fuente de luz de longitud de onda inferior, y la luz emitida o luz de excitación es detectada a una longitud de onda superior. Esta luz es captada por una cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD) de alta sensibilidad.

En la actualidad hay dos fluoroforos aprobados por la FDA para su aplicación clínica: indocianina verde (ICG) y el azul de metileno.

- La tomografía óptica difusa (DOT) se basa en el uso de la luz difusa que penetra en los tejidos con múltiples proyecciones y produce imágenes tomográficas. Utiliza formaciones de láseres y detectores en múltiples configuraciones geométricas alrededor del objeto. Puede proporcionar información cuantitativa acerca de la absorción de la luz, la dispersión de luz, y la captación de agentes de contraste de fluorescencia

- La espectroscopia óptica difusa (DOS) combina la luz cercana al infrarrojo de multifrecuencia con intensidad modulada y onda continua y así cuantifica la absorción del tejido. El espectro de dispersión va desde los 650 hasta 1000nm. Permite el análisis cuantitativo de las concentraciones cromóforas de oxihemoglobina, deoxihemoglobina, metahemoglobina, agua y lípidos en los tejidos.

- El microscopio confocal es un método de microscopía óptica en el que las estructuras en el plano enfocado son visibles y las que están fuera del plano enfocado están suprimidas. Permite la colección de conjuntos de datos de imágenes microscópicas tridimensionales y tiene varias ventajas como la capacidad de controlar la profundidad del campo, la posibilidad de eliminar la información proporcionada por la imagen desenfocada la cual degrada la imagen y la capacidad de obtener secciones ópticas consecutivas en especímenes gruesos. Otras de las técnicas que podemos encontrar son: Dispersión Raman Coherente, Imagen ponderada en superficie, Detección de phase-array, Imagen multifotónica y Microscopía intravital.

Este tipo de técnicas se ha incrementado en los últimos años ya que posee la habilidad de identificar *in-vivo* características moleculares de los tumores que son de gran importancia a la hora de la comprensión del proceso tumoral, con la ventaja de no perturbar el medio biológico, por su fácil utilización así como también por la característica de ser un proceso menos invasivo para el paciente y con muy buenos resultados.

3.9.1. Sulfo-Cyanine7 NHS-éster (Cy7) o ICG

La Cyanina7-NHS-éster (Cy7) es un colorante fluorescente que pertenece a la familia de cianinas de tintes sintéticos de polimetina. Tiene un máximo de absorbancia de 747 nm y un máximo de emisión de 776 nm. Es utilizado en técnicas de marcación de biomoléculas para su empleo en imagenología óptica. Entre sus características están su pequeño tamaño, buena solubilidad acuosa e insensibilidad al pH que ronde entre 3 y 10. Es muy utilizada en marcación de agentes específicos para imagen tumoral, ya

que tiene la propiedad de que no es afectada por la autofluorescencia del tejido, por lo que es un buen candidato para ser empleado para marcado fluorescente de péptidos y anticuerpos [122.123].

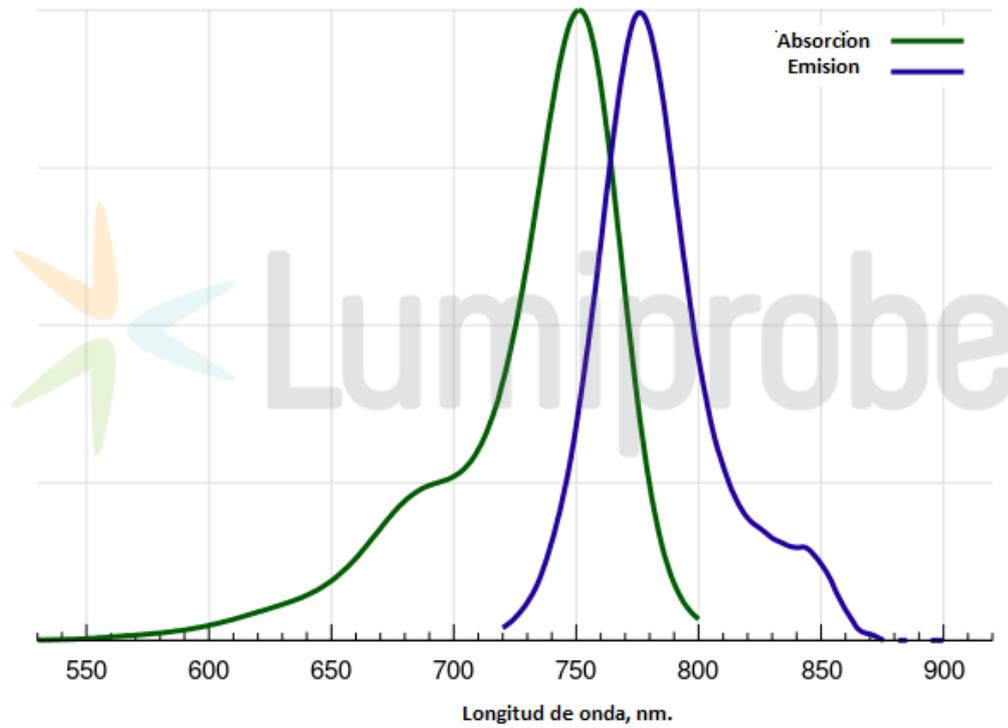


Figura 21: Espectro de absorción y emisión del fluorocromo Cy7, con sus picos de absorción a 747 y de emisión a 776 nm [123].

4. Materiales y Métodos

4.1. Obtención de Fragmentos Fab's del Anticuerpo Bevacizumab (Avastin®)

Para la obtención de Fragmentos Fab del Bevacizumab se llevaron a cabo 2 etapas.

- a) Primera etapa – Digestión del Bevacizumab empleando la enzima papaína, enzima proteolítica que provoca la ruptura de múltiples enlaces, en este caso es empleada para escindir el anticuerpo por la región bisagra para producir los fragmentos Fc y Fab del Bevacizumab.

El anticuerpo monoclonal Bevacizumab (Avastin®; 25 mg/mL) producido por Genetech, Inc., fue proporcionado por laboratorios Roche del Uruguay,

Para llevar a cabo la fragmentación se emplearon dos viales. Un vial conteniendo el anticuerpo Bevacizumab (5 mg, 250 uL) que fue disuelto a un volumen final de 500 uL con Buffer de Digestión (10 mM EDTA, 80 mM L-Cisteína-HCl, pH 7). El otro vial conteniendo la enzima Papaína (relación 1:10, 0.5 mg de Papaína, Sigma-Aldrich) disuelta en 500 ul de Buffer de digestión.

Ambos viales se juntaron y la mezcla de reacción fue incubada a 37 °C, a 225 rpm por durante 24 h.

Pasado el respectivo tiempo, la mezcla de reacción fue centrifugada a 200 xg por 10 min, descartando el pellet y conservando el sobrenadante. Este procedimiento se realizó 3 veces.

Posteriormente el sobrenadante obtenido se transfirió a un Amicon Ultra 0.5 mL centrifugal filters de 30 KDa y se centrifugó a 4500 g durante 10 min. El concentrado obtenido fue disuelto a 500 ul en buffer fosfato salino (PBS, pH 7), este procedimiento se realizó 3 veces.

Por último se midió la Absorbancia para determinar la concentración de la solución obtenida utilizando un coeficiente de extinción molar de 1.45; con la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína (mg/mL)} = \text{Abs}_{280} \cdot \text{Factor de dilución} / E_{280}$$

- b) Segunda etapa - Purificación y afinidad de la digestión, la cual se realizó empleando una columna de Proteína A Agarosa (Thermo Fisher) equilibrada con PBS pH 7.

Los fragmentos Fab's obtenidos fueron recolectados y se determinó su concentración midiendo su respectiva Absorbancia a 280 nm de la misma forma que fuese descrita anteriormente.

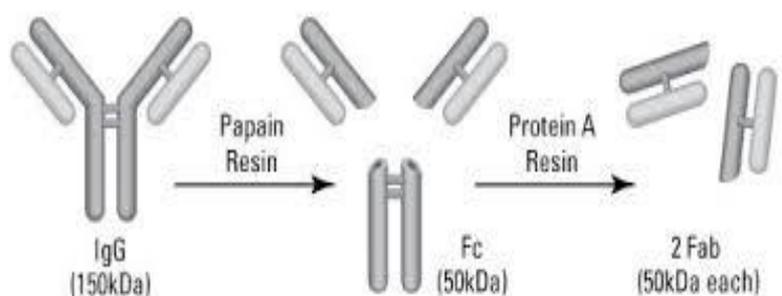


Figura 22: Pasos de la fragmentación de anticuerpos empleando papaína [124].

4.2. Controles de proceso y de calidad de los fragmentos

Controles de proceso: Se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE al 10 % en condiciones no reductoras y reductoras) [125].

Para ello se deben preparar dos geles; el gel concentrador y el gel separador. Para preparar los geles se mezclan todos los componentes exceptuando el TEMED y el APS 10%, los cuales se agregan al final dado que son los responsables de la gelificación.

Tabla 7. Cantidades de los componentes a para la preparación del gel al 10 %

%Poro (ml)	H ₂ O _{DDI} (ml)	Archilamida/Bis (ml)	Buffer (ml)	SDS 10% (ml)	Gel concentrador		Gel separador	
					TEMED	APS	TEMED	APS
10	0.4	3.3	2.5	0.1	10	50	5	25

Una vez solidificado el gel separador se coloca el gel concentrador encima y se espera que solidifique de igual forma que el anterior.

Posteriormente se siembran las muestras preparadas con el buffer de corrida en los carriles y se comienza la corrida a 140 V y 4 mA (amperaje constante). Una vez transcurrido el tiempo de corrida se desarma el cassette y se coloca a teñir el gel en solución de Azul de Comassie R-250 durante toda la noche a temperatura ambiente y

con agitación suave. Finalmente se lava el gel con decolorante a 37°C durante 3-4 hs y se registran los resultados fotográficamente.

Controles de calidad: se realizan los siguientes controles de calidad a los fragmentos obtenidos:

- a. Análisis por espectrometría de masa (MALDI TOF/TOF, Abi Sciex) de adquisición lineal.
- b. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) utilizando una columna TSK-GEL 63000 SWXL 7.8 mm x 30 cm (TOSOHAAS), modo isocrático, buffer fosfato 0,05 M, pH 7.4, flujo 1 mL/min, equipado con detectores UV y NaI(Ti).

4.3. Conjugación HYNIC- Fab`s (Bevacizumab)

El HYNIC utilizado para llevar a cabo la conjugación fue sintetizado en nuestro laboratorio por el grupo del Dr. Pablo Cabral, Dr. Williams Porcal y la Msc. Ma. Fernanda García.

La conjugación de Suc-HYNIC-Fab`s (Bevacizumab) comprende la etapa de derivatización y posteriormente la purificación del conjugado, de esta forma se retira el exceso de HYNIC que pudiera haber permanecido.

La derivatización fue iniciada por adición de 16 µL de NaHCO₃ 1M a la solución de Fab`s (Bevacizumab) previamente purificados (3 mg de Fab`s aproximadamente). Posteriormente se les adicionaron 0.33 µmol Suc-HYNIC en 7.1 µL de DMSO (J. T. Baker). La mezcla fue incubada a 18 - 25 °C durante 30 minutos y oscuridad, pH 8. El conjugado fue purificado del HYNIC libre por cromatografía de exclusión molecular en una columna Sephadex G-25 (PD-10, Amersham Biosciences) con buffer acetato de sodio, 0.15 M, pH 6.4. Se recolectaron 10 fracciones de 1 mL y se realizó una dilución 1/20 de cada fracción con el buffer acetato de sodio. Se midió la Absorbancia de las diluciones 1/20 para determinar la concentración de la muestra (E280 = 1.45). Se juntan en el mismo vial a aquellas fracciones (no diluídas) que haya presentado la mayor concentración de proteína.

Se controla la calidad de la conjugación HYNIC-Fab`s (Bevacizumab) por HPLC y MALDI-TOF.

4.4. Marcación con ^{99m}Tc de HYNIC-Fab (Bevacizumab) y controles de calidad

La marcación del conjugado con ^{99m}Tc se realizó mediante dos etapas.

- a) La primer etapa consistió en preparar una solución de 9 mg de Tricina (N-[Tris(hidroximetil)-metil]glicina, Sigma) y 10 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (J. T. Baker), pH=4.5. Para ello los 9 mg de Tricina se disolvieron en 0.8 mL de agua y se ajustó el pH a 4.5-5 con 0,05 mL de HCl 2.0 M. En un segundo vial, se disolvieron los 10 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 0.5 mL de HCl 2.0 M y se tomaron 0.05 mL de esta solución para adicionarla al vial que contiene la Tricina disuelta.
- b) En una segunda etapa, para llevar a cabo la marcación con ^{99m}Tc , se ajustó el volumen del vial que contiene la mezcla Tricina/ SnCl_2 , hasta un volumen de 10 mL con NaCl 0.9 %. Posteriormente, se adicionaron 12 μL de la solución anterior a la solución de HYNIC-Fab (Bevacizumab), y esta solución se le adicionó $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ (Generador de ^{99}Mo - ^{99m}Tc , Tecno Nuclear) hasta un volumen no mayor de 1 mL y con una actividad máxima de 185 MBq aproximadamente medida utilizando un Calibrador de Dosis Capintec CRC7, contador de centelleo sólido con un cristal 3"x 3" de NaI(Tl) asociado a un analizador multicanal ORTEC. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Todos los solventes empleados fueron previamente purgados con N_2 gas.

La pureza radioquímica del conjugado marcado fue cuantificada mediante el empleo de una columna PD-10, equilibrada y eluída con NaCl 0.9 %, a un flujo de 1.0 mL/min. El eluato fue colectado de a fracciones de 1 mL y su radioactividad fue controlada en el calibrador de dosis mencionado anteriormente.

A su vez la pureza radioquímica fue verificada por tres sistemas cromatográficos diferentes, para lograr identificar todas las impurezas radioquímicas presentes.

Los sistemas cromatográficos utilizados se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8. Controles cromatográficos del ^{99m}Tc -HYNIC-Bevacizumab

Control	Fase estacionaria	Fase móvil	Rf	Molécula
1	ITLC-SG	NaCl 0.9%	0.0	^{99m}Tc -HYNIC-Fab's(Bevacizumab) y $^{99m}\text{TcO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$
			1.0	^{99m}Tc -tricina, $^{99m}\text{TcO}_4^-$
2	Watmann 1	MEK	0.0	^{99m}Tc -HYNIC-Fab's(Bevacizumab), $^{99m}\text{TcO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ y ^{99m}Tc -tricina
			1.0	$^{99m}\text{TcO}_4^-$
3	ITLC-SG impregnada en BSA	EtOH-NH ₃ -H ₂ O (2:1:5)	0.0	$^{99m}\text{TcO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$
			0.8-1.0	^{99m}Tc -HYNIC-Fab's(Bevacizumab), ^{99m}Tc -tricina y $^{99m}\text{TcO}_4^-$

También, la pureza radioquímica fue analizada mediante HPLC utilizando una columna TSK-GEL 63000 SWXL 7.8 mm x 30 cm (TOSOHAAS), modo isocrático, buffer fosfato 0,05 M, pH 7.4, flujo 1 mL/min, equipado con detectores UV y NaI(Ti).

4.5. Estabilidad de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab (Bevacizumab)

La integridad de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab (Bevacizumab) fue analizado por medio de la incubación en NaCl 0.9% y en suero a 37°C. Las mezclas de reacción fueron analizadas por HPLC hasta 4 h.

4.6. Ensayo de competencia con L-Cisteína

La estabilidad radioquímica del ^{99m}Tc -HYNIC-Fab (Bevacizumab) fue analizado mediante un ensayo de competencia, descrito por Hnatowich et al [126]. El ensayo se realizó mediante la incubación de 90 μL (3.7 MBq) de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab (Bevacizumab) con 10 μL de L-Cisteína 1 y 10 mM (Sigma-Aldrich, USA), cuyas concentraciones finales en la solución resultaron de 0.1 y 1 mM de L-Cisteína, respectivamente. Todas las mezclas de reacción fueron incubadas a 37°C y analizadas por HPLC hasta 4h.

4.7. Cultivo y crecimiento de la línea celular Toledo

La línea celular humana Toledo se origina a partir de Linfoma difuso de células grandes (DLCL), subtipo de Linfoma no Hodgkin (LNH). La misma fue adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC). El medio base que se utilizó para esta línea celular fue RPMI-1640 (ATCC), para hacer que el medio de crecimiento sea completo se le agregó al medio Suero Fetal Bovino (SFB) inactivado a una concentración final de 10 % y 2 mM de L-glutamina. El cultivo fue incubado a 37°C con 5% de CO₂.

4.8. Conjugación de Fab (Bevacizumab) con isotiocianato de fluoresceína (FITC)

La reacción de conjugación de FITC con los Fab (Bevacizumab) (FITC-Fab (Bevacizumab)) se llevó a cabo empleando una relación molar 10:1 (pH 9), durante 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad. El exceso de FITC sin reaccionar fue removido mediante centrifugación usando Amicon ULTRA 30k a 14000 rpm por 10 minutos.

Posteriormente fue calculada la concentración de proteína en mg/mL según la siguiente fórmula:

$$\text{mg/mL Proteína} = \text{Abs}_{280} - (\text{Abs}_{492} \times 0,35) / 1.4$$

Los moles de proteína y de FITC fueron calculados según la siguiente fórmula:

$$\text{moles Proteína} = \text{mg/mL Proteína} / 1.5 \times 10^5$$

$$\text{moles FITC} = \text{Abs}_{492} / 0.69 \times 10^5$$

Por último se calculó la relación FITC: proteína (F:P) según la siguiente fórmula:

$$\text{F:P} = \text{moles FITC} / \text{moles Proteína}$$

4.9. Análisis por citometría de flujo en la línea celular Toledo con FITC-Fab (Bevacizumab)

Luego de la disgregación de las células Toledo, éstas fueron lavadas tres veces en PBS (5 min, 600xg), bloqueadas con PBS-BSA 3% por al menos 1 h. Luego fueron nuevamente lavadas e incubadas con 2 µg of FITC:Fab (Bevacizumab) en PBS-BSA 1 %. Luego de 1 h de incubación en oscuridad, las células fueron lavadas tres veces con PBS (5 min, 600xg) y los datos fueron adquiridos empleando el citómetro de flujo FACSCALIBUR® (BD Biosciences, San José, CA, USA). Los controles empleados fueron los siguientes: sólo células y control FITC-isotipo (2µg para cada ensayo) para determinar los niveles de auto-fluorescencia o de reacciones inespecíficas.

4.10. Modelo animal e inducción tumoral con la línea celular Toledo

Fueron utilizados ratones machos Balb/c y hembras Balb/c Nude, de 8-10 semanas (20-24 g), los cuales fueron obtenidos del bioterio animal de la Universidad de la República Oriental del Uruguay y del bioterio central de la Facultad de Medicina-USP.

Para llevar a cabo la inducción tumoral en ratones Balb/c Nude, se les inyectó de forma subcutánea las células Toledo a una concentración 0.5×10^7 (con una viabilidad de por lo menos 95%). Todos los procedimientos fueron realizados según los principios éticos del Colegio Brasileiro de experimentación animal y aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de San Pablo (protocolo aprobado número 279/12). Los ratones fueron mantenidos con agua y comida *ad libitum* durante todo el tiempo de experimentación, en un ambiente de temperatura y humedad controlado. Todos los procedimientos que involucran animales fueron aprobados por el Comisión Honoraria de Experimentación Animal local.

4.11. Ensayos biológicos *in-vivo* de biodistribución con ^{99m}Tc-HYNIC-Fab (Bevacizumab)

La evaluación biológica *in-vivo* del ^{99m}Tc-HYNIC-Fab (Bevacizumab) fue realizada por estudios de biodistribución en ratones machos Balb/c y hembras Balb/c Nude previamente inoculados con células Toledo. Animales (n=5 por grupo) fueron inyectados por la vena de la cola con aproximadamente 7.4 MBq del ^{99m}Tc-HYNIC-Fab (Bevacizumab) purificado y sacrificados por dislocación cervical luego de 2, 6 y 24 h. Los tejidos seleccionados (tumor, corazón, hígado, pulmones, tiroides, riñones, estómago, bazo, tracto gastrointestinal y vejiga) fueron extirpados, enjuagados de la sangre residual, pesados y sus radiactividad medida en un detector de NaI(Tl) anteriormente mencionado. La sangre y orina fueron también colectados y medidos en el contador gamma. La actividad de los órganos o tejidos y tumoral fue expresada como porcentaje de actividad (% Act) y como porcentaje de actividad por gramo de tejido (% Act/g). Para el análisis estadístico se utilizó test de *t de Student* para datos no apareados, se eligió un nivel de 95% de confianza para determinar diferencias significativas entre los compuestos, con un $p < 0.05$.

4.12. Estudios imagenológicos

Las estudios de imágenes SPECT/CT fueron realizados por inyección de 148-370 MBq/mg de ^{99m}Tc-HYNIC-Fab (Bevacizumab) por la vena de la cola en ratones machos Balb/c y hembras Balb/c Nude previamente inoculados con células Toledo. Luego de 0.5, 2 y 6 h post-inyección, los animales (n = 3 por tiempo) fueron anestesiados con una mezcla de gases (aire y 1–1.5% de isoflurano) y sometidos a imágenes SPECT/CT. Las imágenes fueron adquiridos a 0.5, 2 y 6 h luego de la inyección del conjugado marcado en un equipo Triumph micro SPECT/CT (Gama Medica), utilizando dos cristales de yoduro de sodio en combinación con un colimador multi-pinhole de 1 mm de apertura y un radio de rotación de 5.5 cm, 64 proyecciones con $> 9\text{Kctps}$ en todos los animales, seguido de la adquisición CT. Todas las imágenes adquiridas se analizaron por Amide con los mismos parámetros de umbrales (75%) para la interpretación de los datos y fueron reconstruidas con un filtro de corrección OSEM seguido de la generación Amira DICOM [127].

4.13. Conjugación de Fab's (Bevacizumab) con Cianina 7-NHS éster (Cy7 NHS-éster)

Una solución de 2 mg/mL de Fab's (Bevacizumab) fueron disueltos en 0.5 mL de NaCl 0.15 M y centrifugados a 14.000g por 10 min at 4 °C con Amicon Ultra 0.5 mL centrifugal filter 10K MWCO (Sigma-Aldrich). Posteriormente, el buffer fue sustituido por NaHCO₃ 0.1 M (pH 8.3) y esta solución conteniendo el Fab fue mezclada con una solución de Cy7 NHS-éster disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO). La reacción fue llevada a cabo durante 2 horas en oscuridad. Para remover el Cy7-NHS libre, la mezcla fue centrifugada a 14.000g por 10 min a 4 °C usando un Amicon Ultra 0.5 mL centrifugal filter 10K MWCO (Sigma-Aldrich) y luego al conjugado se le reemplazó el buffer con PBS.

Posteriormente fue calculada la concentración de proteína en mg/mL según la siguiente fórmula:

$$\text{mg/mL Proteína} = (\text{Abs}_{280} - 0.04 \times \text{Abs}_{747}) / 1.4$$

La relación de Cy7:Fab en el conjugado final fue calculada según la siguiente fórmula:

$$\text{Cy7/ Fab} = (\text{Abs}_{747} \times \text{PM}) / \text{mg/mL Proteína} \times \epsilon_{\text{cy7}}$$

PM: Pero Molecular del Fab

ϵ_{cy7} : Coeficiente de extinción del Cy7 a $\text{Abs}_{747} = 210000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$

4.14. Imágenes fluorescentes *in-vivo* en LNH con Cy7-Fab's (Bevacizumab)

Las imágenes *in-vivo* fluorescentes en ratones Nude portadores de LNH con Cy7-Fab (Bevacizumab) fueron realizadas para evaluar la distribución tumoral. Las imágenes fueron adquiridas a 0.5, 2, 6, 24, 48 y 72 h luego de la inyección de de Cy7-Fab(Bevacizumab) (100 ug/100 uL por la vena de la cola) empleando el equipo IVIS Spectrum charge-coupled-device camera system (Xenogen Corp., Alameda, CA, USA) y se analizaron las imágenes mediante el empleo del Software Living Image 4.3.1. Las imágenes fueron adquiridas empleando filtros a 745 nm y 800 nm para excitación y emisión respectivamente.

5. Resultados

5.1. Obtención de los fragmentos Fab del Bevacizumab

Para comprobar la efectiva digestión se realizó el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras y no reductoras. En la Figura 23 se observó la presencia de una única banda en condiciones no reductoras correspondiente al anticuerpo Bevacizumab (carril 1, 150 kDa aproximadamente). A su vez se observó tanto en los carriles 2 y 3 la presencia también de una única banda correspondiente a los Fragmentos Fab obtenidos de los anticuerpos Bevacizumab y Tocilizumab con un peso molecular aproximado de 50 KDa. Por otro lado, en condiciones reductoras (carriles 7, 8 y 9), en el caso del Bevacizumab (carril 7) se apreciaron todas las bandas correspondientes a un anticuerpo reducido. A su vez, en estas mismas condiciones empleando los Fab de Bevacizumab (carril 8) y Tocilizumab (carril 9) únicamente se apreciaron dos bandas correspondientes a los pesos moleculares de 50 y 25 kDa.

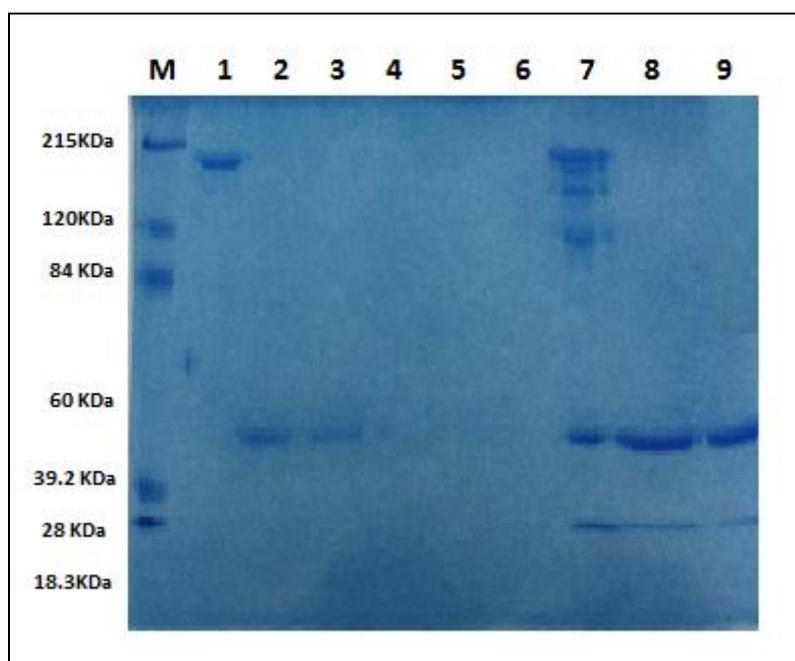


Figura 23: Análisis por SDS-PAGE al 10% en condiciones no reductoras y reductoras.
M: Marcador de peso molecular; Carriles: 1) Bevacizumab, 2) Fab (Bevacizumab), 3) Fab (Tocilizumab), 7) Bevacizumab, 8) Fab (Bevacizumab), 9) Fab (Tocilizumab).

A su vez la efectiva digestión fue analizada mediante un estudio por MALDI-TOF/TOF determinando que la relación m/z del Fab(Bevacizumab) puro fue de 47072.5 Da (Figura 24).

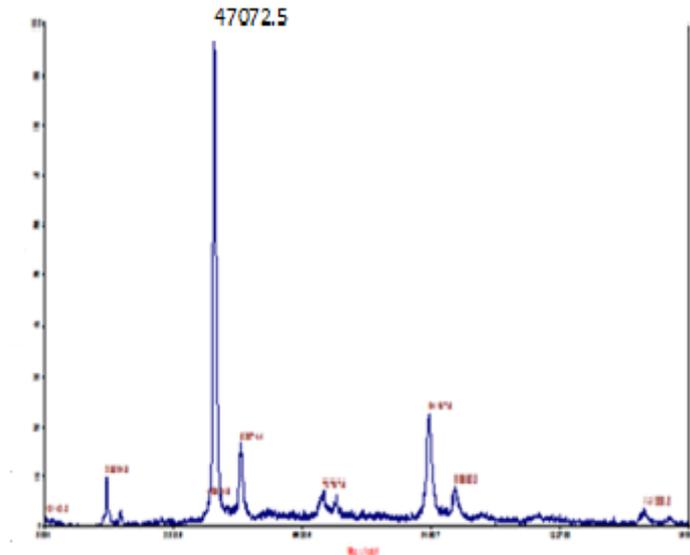


Figura 24: Resultado obtenido del Espectro de masa para el Fragmento (Bevacizumab).

Por último se analizaron los Fragmentos obtenidos mediante HPLC obteniendo un tiempo de retención de 8.38 min (Figura 25).

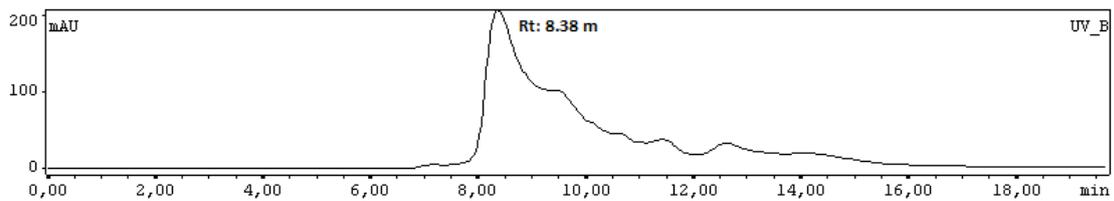


Figura 25: Análisis por HPLC de Fab (Bevacizumab).

5.2. Conjugación HYNIC-Fab(Bevacizumab)

En la reacción de conjugación los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina de los fragmentos Fab's del anticuerpo, reaccionan con el C carboxílico del éster del HYNIC, que es altamente electrofílico, desplazando los fragmentos grupo succinimida.

Con el fin de separar el conjugado HYNIC-Fab(Bevacizumab) del HYNIC libre, se realizó la purificación por columna PD-10 recogiendo las eluciones de 4 y 5 mL, y así recuperando más del 90% de la cantidad del Fragmento inicial conjugado (Figura 26).

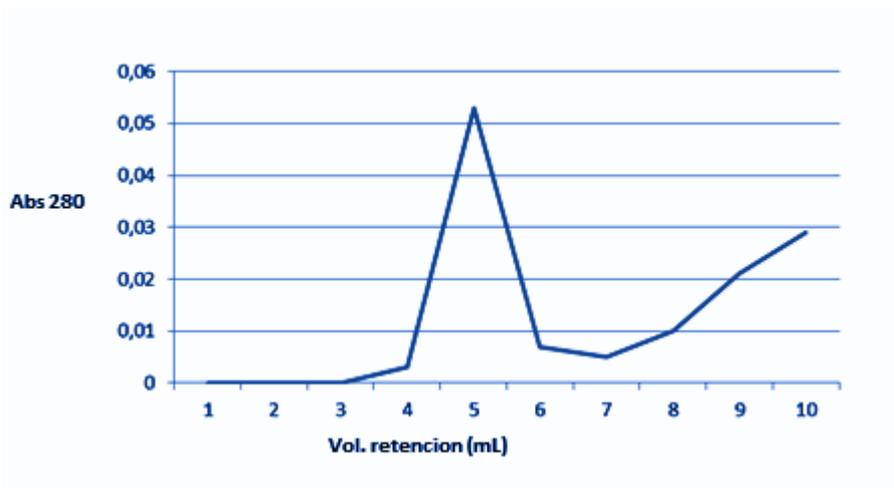


Figura 26: Conjugación HYNIC-Fab`s (Bevacizumab) purificado por PD10. Los picos de absorbancia corresponden a las fracciones de 4 y 5 mL.

La derivatización se controló por MALDI TOF/TOF (Figura 27). La relación m/z de HYNIC-Fab (Bevacizumab) para $(MH)^+$ fue 47173.5 Da, resultando entre 1-2 moléculas de HYNIC por molécula de Fab.

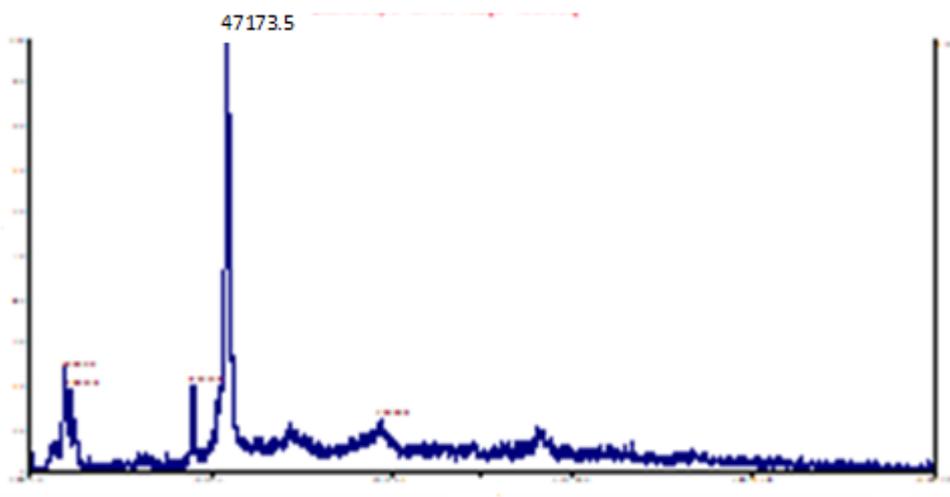


Figura 27: Espectro de masa obtenido para el conjugado HYNIC-Fab (Bevacizumab).

Por último la derivatización se controló por HPLC logrando un tiempo de retención de 8,35 min, Figura 28.

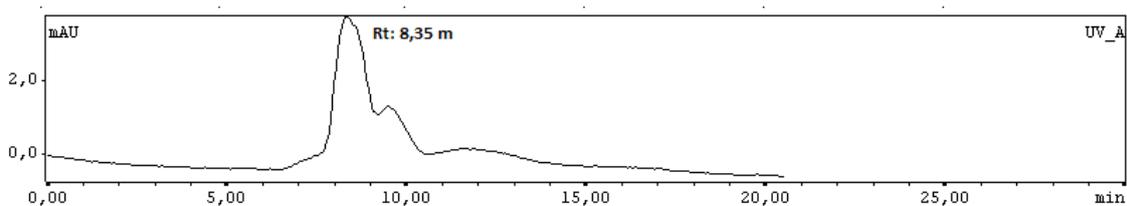


Figura 28: Análisis por HPLC del conjugado HYNIC-Fab (Bevacizumab).

5.3. Marcación con ^{99m}Tc del conjugado HYNIC-Fab(Bevacizumab)

La conjugación de los fragmentos Fab's del Bevacizumab con HYNIC se realizó de forma rápida, sencilla y eficiente. El conjugado HYNIC-Fab (Bevacizumab) fue marcado con ^{99m}Tc a temperatura ambiente con una actividad específica de 89.50 ± 2.83 MBq/mg con una eficiencia de marcación previa a la purificación. Las posibles impurezas ^{99m}Tc -Tricina, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ libre y $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ fueron determinadas por PD-10, ITLC y HPLC.

El análisis por PD-10 mostró que ^{99m}Tc -HYNIC-Fab (Bevacizumab) eluye de la columna a un volumen de retención de 4-5 mL, mientras que el $^{99m}\text{TcO}_4^-$ libre y ^{99m}Tc -Tricina resultan en un pico a 8-9 mL (Figura 29).

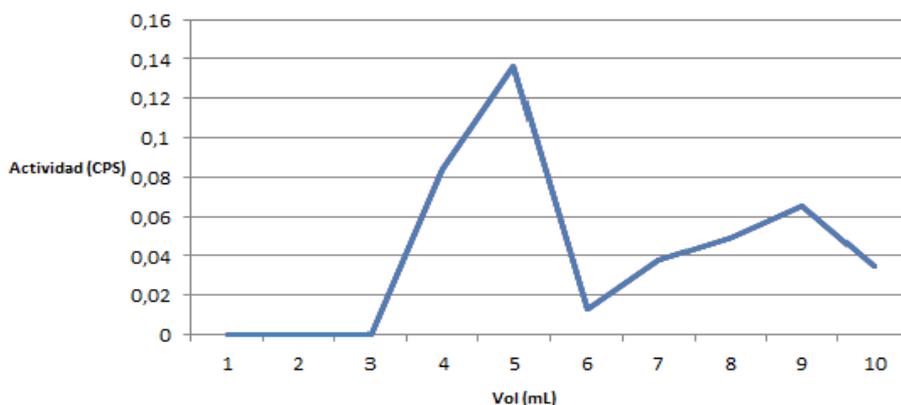


Figura 29: Cromatografía de exclusión molecular de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab), con un volumen de retención de 4-5 ml y de 8-9 ml para $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

El análisis por ITLC empleando una relación de 9 mg de Tricina / 10 mg de Sn reveló que ^{99m}Tc -HYNIC-Fab (Bevacizumab) presenta una pureza radioquímica del 90% a los 30 min post marcación (Tabla 9).

Tabla 9: Porcentaje de pureza radioquímica del marcado ^{99m}Tc -HYNIC-Fab (Bevacizumab) por análisis de ITLC.

Kit Tricina/Estaño	9/10
$^{99m}\text{TcO}_4^-$ (%)	0%
^{99m}Tc -Tricina (%)	0%
$^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (%)	0%
PRQ (%)	90%

En el sistema de HPLC, los radiocromatogramas revelaron un valor de R_t de 11.83 y 8,28 min para $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y ^{99m}Tc -HYNIC-Fab (Bevacizumab), respectivamente (Figura 30). Se observó que el pico de radioactividad para ^{99m}Tc -HYNIC-Fab (Bevacizumab) obtenido a 8,28 min se superpone con el gráfico UV (280 nm; 8,35 min) (Figura 30).

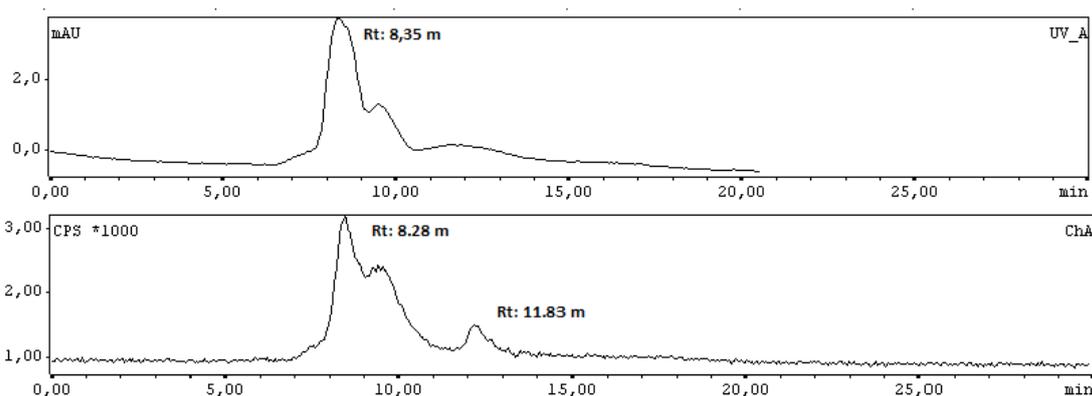


Figura 30: Abajo: Perfil obtenido por HPLC para ^{99m}Tc -HYNIC-Fab (Bevacizumab), con un tiempo de retención de 8,28 minutos. Arriba: Perfil obtenido para HYNIC-Fab (Bevacizumab) con un R_t de 8.35 m.

5.4. Estudios de estabilidad *in vitro* de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab (Bevacizumab)

Los estudios de estabilidad radioquímica de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) revelaron que el marcado fue estable por al menos 3 h en NaCl 0.9% y a 37°C, mostrando una pequeña variación de la integridad del complejo de solo un 8% a las 4 h mientras que en suero se observaron modificaciones de la estabilidad de aproximadamente un 5 % (Tabla 10).

Para evaluar la cinética de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) en condiciones fisiológicas, se llevó a cabo un estudio de competencia por medio de la incubación del conjugado marcado en distintas concentraciones de L-Cisteína. Se observaron inestabilidades del complejo marcado aproximadamente de 7 y 17% luego de 4 h de incubación con 0.1 y 1 mM de L-Cisteína, respectivamente. Como control, todas las incubaciones se realizaron simultáneamente comparando con la incubación en NaCl 0.9% a 37°C (Tabla 10).

Los datos de la Tabla 10 indican que ^{99m}Tc -HYNIC-Fab (Bevacizumab) se mantiene estable tanto en condiciones salinas como en suero, revelando señales de degradación únicamente al incubarse el complejo en cantidades importantes (gran exceso) del ligando competidor. Se sabe que la L-Cisteína es un ligando muy potente y que puede formar complejos muy estables con el ^{99m}Tc .

Tabla 10: Estabilidad radioquímica in vitro de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) en 0,9% NaCl, suero, 0.1 y 1 mM de L-Cisteína a 37°C. Las medidas de HPLC fueron obtenidas con una columna TSK-GEL 63000 SWXL 7.8 mm x 30 cm (TOSOHAAS), modo isocrático, buffer fosfato 0,05 M, pH 7.4, flujo 1 mL/min., equipado con detectores de absorbancia UV y de centelleo NaI(Tl).

Tiempo (h)	%PRQ NaCl 0,9% a 37°C	%PRQ 1 mM L-Cisteína a 37°C	%PRQ 0.1 mM L-Cisteína a 37°C	%PRQ Suero a 37°C
0	99,50 ± 3,08	-	-	-
1	98,33 ± 2,34	93,52 ± 3,96	96,12 ± 3,32	98,58 ± 2,40
2	94,63 ± 3,44	92,39 ± 4,51	92,63 ± 5,68	97,21 ± 4,84
3	93,55 ± 3,22	92,12 ± 3,12	92,51 ± 3,14	94,85 ± 3,27
4	91,05 ± 5,19	82,81 ± 1,02	92,08 ± 1,56	94,17 ± 5,58

5.5. Conjugación de Fab's (Bevacizumab) con isotiocianato de fluoresceína (FITC)

La concentración de proteína en mg/mL obtenida fue de 1.38 mg/mL. A su vez la relación de moles FITC / moles Proteína = 6.37

5.6. Análisis por Citometría de flujo en la línea celular Toledo con FITC-Fab's(Bevacizumab)

En las figuras 31 y 32 se observan los histogramas respectivos de los análisis por citometría de flujo tanto de las células sin permeabilizar (Figura 31) como permeabilizadas con Tween (Figura 32) empleando FITC-Fab(Bevacizumab). Se logró observar el aumento de la capacidad de unión de FITC-Fab(Bevacizumab) al VEGF al ser permeabilizadas las células en comparación a las células sin permeabilizar; verificando de esta forma que dicha línea celular podría ser un adecuado modelo para la inducción de tumores de LNH; así como también para lograr analizar el proceso de la angiogénesis tumoral en LNH asociado a la sobreexpresión del VEGF.

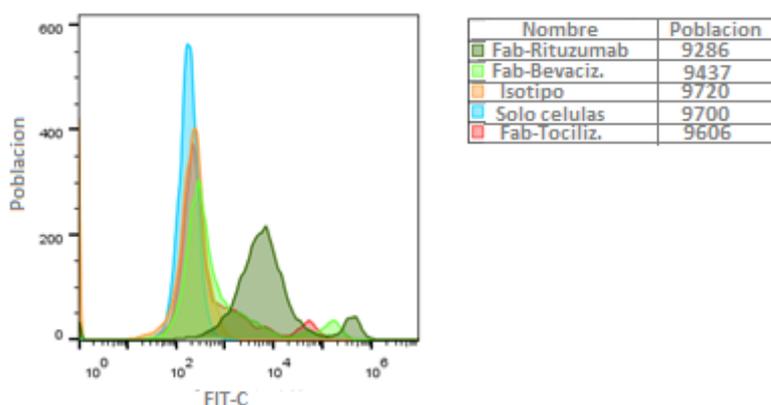


Figura 31: Grafico obtenido del citómetro de las células sin proceso de permeabilización.

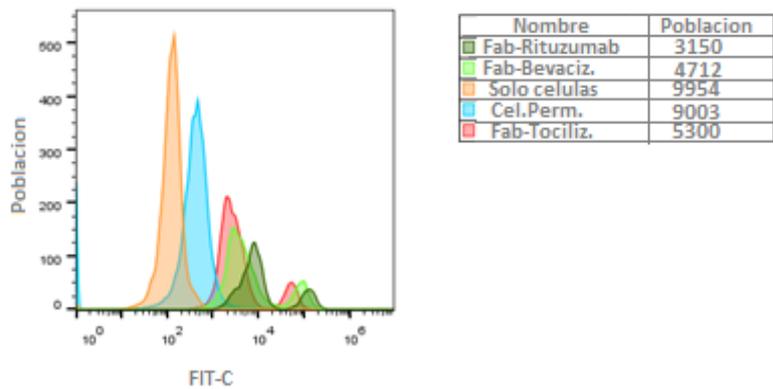


Figura 32: Grafico obtenido de citometro de las células permeabilizadas.

En la figura 33 se observa graficadas las medias geométricas de las células sin permeabilizar vs. células permeabilizadas, notándose un significativo aumento de la media geométrica al estar presente el FITC-Fab(Bev) con las células permeabilizadas; demostrando la efectiva unión del compuesto al factor VEGF que se encuentra a nivel citoplasmático.

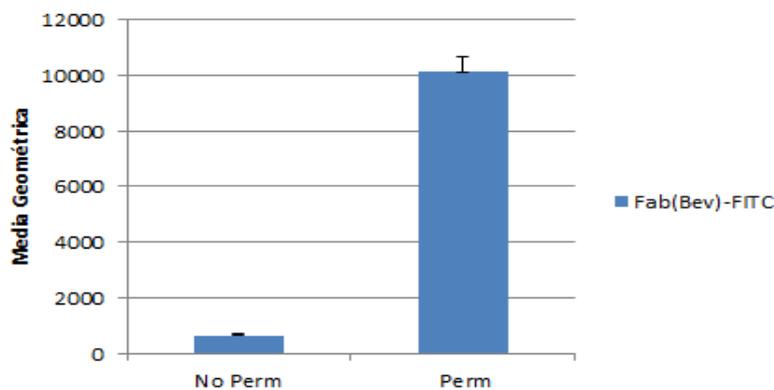


Figura 33: Grafico de la media geométrica de las células Toledo sin permeabilizar y permeabilizadas para Fab(Bevacizumab)-FITC.

5.7. Estudios de biodistribución en ratones Balb/c nude normales y portadores de LNH inducidos.

Los detalles de los estudios farmacocinéticos en ratones Nude normales y portadores de tumores inducidos mediante inoculación de la línea celular Toledo se encuentran detallados en las figuras 34 y 35.

También se detalla el estudio de las relaciones órgano blanco/órgano no blanco (tumor/sangre, tumor/músculo) en la figura 36.

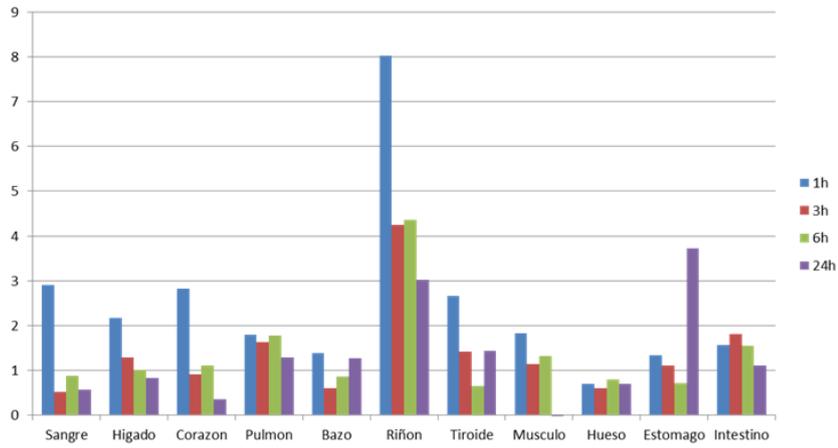


Figura 34. Biodistribución en ratones Balb/C normales. (n=5, %A/g ± DS).

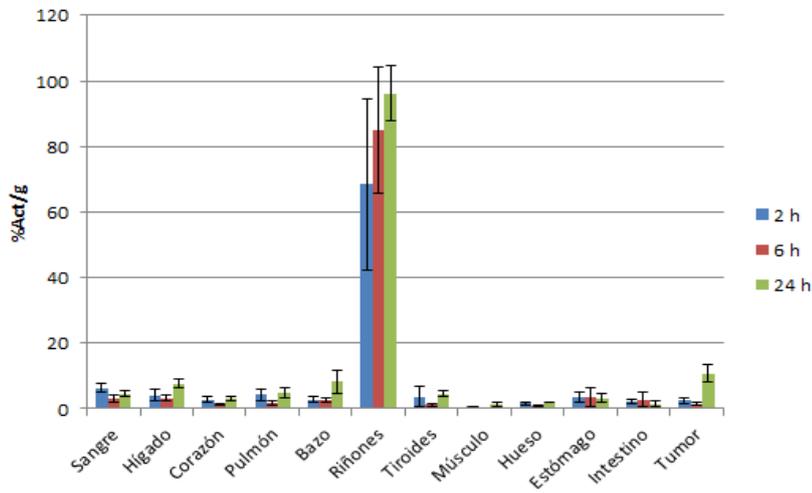


Figura 35: Biodistribución en ratones Balb/C portadores de LNH. (n=5, %Act/g ± DS).

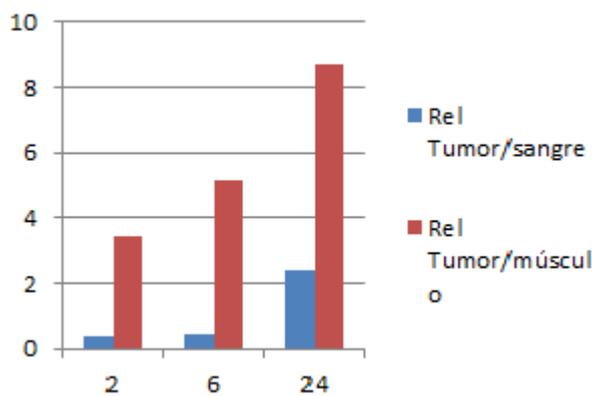


Figura 36: Relación tumor/sangre, tumor/musculo en ratones Balb/C portadores de LNH.

En la Tabla 11 se detallan los valores obtenidos de los estudios farmacocinéticos aplicados a ratones sanos y portadores de LNH.

Tabla 11: Estudios farmacocinéticos de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) utilizando ratones Balb/C normales y portadores de tumores inducido a 2, 6 y 24 h p.i. Los valores fueron expresados como %Act por gramo (o %Act) (media \pm SD, n=5).

Tejidos	Ratones Balb/C normales			Ratones Balb/C nude con tumor inducido		
	2 h	6 h	24 h	2 h	6 h	24 h
Porcentaje de dosis inyectada/gramo (%Act/g)*						
Sangre	0.69 \pm 0.09	0.74 \pm 0.20	0.80 \pm 0.46	7.01 \pm 0.63	3.26 \pm 1.10	1.77 \pm 0.64
Hígado	1.35 \pm 0.03	0.91 \pm 0.14	0.75 \pm 0.21	4.21 \pm 0.33	3.24 \pm 0.95	3.85 \pm 1.38
Corazón	1.04 \pm 0.10	1.01 \pm 0.14	0.61 \pm 1.01	2.69 \pm 0.86	1.27 \pm 0.29	1.51 \pm 0.53
Pulmones	1.84 \pm 0.06	1.41 \pm 0.52	1.76 \pm 0.63	3.16 \pm 1.16	1.88 \pm 0.56	2.37 \pm 1.63
Bazo	0.75 \pm 0.13	0.47 \pm 0.25	1.31 \pm 0.23	3.44 \pm 0.30	2.47 \pm 0.65	1.11 \pm 0.71
Riñones	4.48 \pm 0.08	3.92 \pm 0.63	2.72 \pm 0.50	6.06 \pm 20.97	6.90 \pm 19.36	3.09 \pm 5.79
Tiroides	1.47 \pm 0.43	0.56 \pm 0.12	1.39 \pm 0.79	2.04 \pm 1.24	1.22 \pm 0.35	2.25 \pm 0.86
Músculo	1.06 \pm 0.52	1.10 \pm 0.31	0.40 \pm 0.68	0.71 \pm 0.09	0.28 \pm 0.07	0.62 \pm 0.58
Hueso	1.79 \pm 0.96	2.11 \pm 0.44	1.14 \pm 0.47	1.59 \pm 0.33	0.83 \pm 0.30	0.97 \pm 0.06
Estómago	1.19 \pm 0.26	0.84 \pm 0.18	0.70 \pm 0.46	2.73 \pm 0.79	4.87 \pm 3.00	1.09 \pm 0.07
TI	1.72 \pm 0.27	1.91 \pm 0.51	1.56 \pm 0.40	2.33 \pm 0.69	3.49 \pm 1.40	0.74 \pm 1.00
Tumor	-	-	-	2.44 \pm 0.72	1.43 \pm 0.49	4.90 \pm 1.30
Porcentaje de dosis inyectada (%Act)*						
Intestino	2.76 \pm 0.72	2.72 \pm 0.40	2.45 \pm 0.63	4.16 \pm 1.90	3.60 \pm 1.53	2.84 \pm 1.99
Orina	88.73 \pm 0.63	87.27 \pm 0.48	90.60 \pm 2.22	68.78 \pm 2.60	76.60 \pm 8.20	82.28 \pm 1.56
Relación de absorción de tumor/ tejido normal*						
Tumor/Sangre	-	-	-	0.35	0.44	2.77
Tumor/Músculo	-	-	-	3.42	5.13	7.88

* Datos presentados como %Act/g (o %Act) \pm desviación estándar (DS) (n=5). TI=Tracto intestinal.

De los resultados de la tabla 11 podemos observar una elevada retención de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) a nivel de los riñones, sugiriendo que este radiotrazador posee un metabolismo renal. La radioactividad en los riñones de ratones portadores de tumores fue de 6.06 \pm 20.97 %Act/g, 6.90 \pm 19.36 %Act/g y 3.09 \pm 5.79 %Act/g a 2, 6 y 24 h, respectivamente. En el hígado, la absorción a los mismos tiempo fue 4.21 \pm 0.33 %Act/g, 3.24 \pm 0.95 y 3.85 \pm 1.38 %Act/g, respectivamente. Estos datos están acompañados por el bajo porcentaje de dosis inyectada en el intestino y alto porcentaje de dosis inyectada a nivel de la orina. A 2 h p.i., 68.78 \pm 2.60 %Act de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) ha sido excretada en la orina y 4.16 \pm 1.90 %Act

detectada en los intestinos, en ratones portadores de tumores (n=5). Los valores de la orina incluyen el %Act a partir de la orina colectada y también la obtenida en la vejiga.

Se observó a nivel tumoral una elevada retención de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab). A 2 h luego de la inyección, la absorción a nivel tumoral fue de 2.44 ± 0.72 %Act/g seguido por 1.43 ± 0.49 %Act/g a 6 h y 4.90 ± 1.30 %Act/g a 24 h luego de su inyección. Además se observaron relaciones tumor vs. Músculo de 3.42, 5.13 y 7.88 a 2, 6 y 24 h, respectivamente.

5.8. Imágenes μ SPECT/CT de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab)

Los datos de las biodistribuciones fueron corroborados por la evaluación del radioconjugado mediante la adquisición de imágenes. Las imágenes fueron realizadas a 0.5, 2 y 6 h p.i. de 35-55 MBq de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) por la vena de la cola.

A pesar de una intensa actividad detectada a nivel del tórax, se observó una significativa captación a nivel tumoral (señalado con la fecha). La visualización de captación tumoral comienza desde 0.3 h, logrando su máxima visualización a 2 h p.i. y a 6 h p.i. comienza su depuración, visualizándose una intensa captación renal.

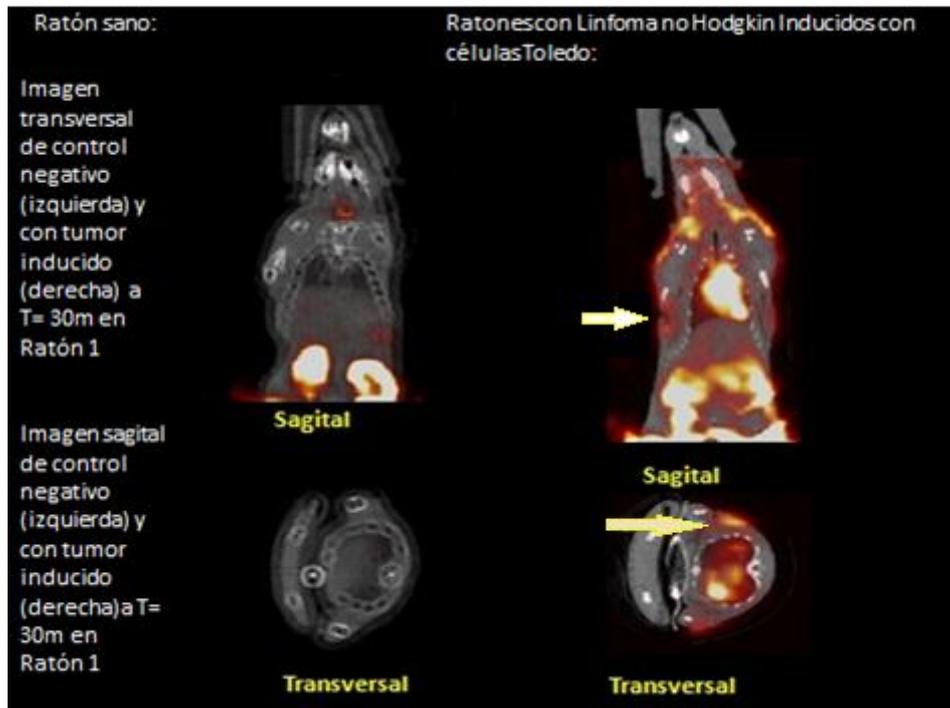


Figura 37. Imagen μ SPECT/CT de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) (colimador HRES con 1,4 mm, 127x127 mm campo de visión trans-axial, 64 proyecciones con $> 9\text{Kcts}$) en ratones Balb/C normales y portadores de LNH inducido a 0.5 h post-inyección de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab).

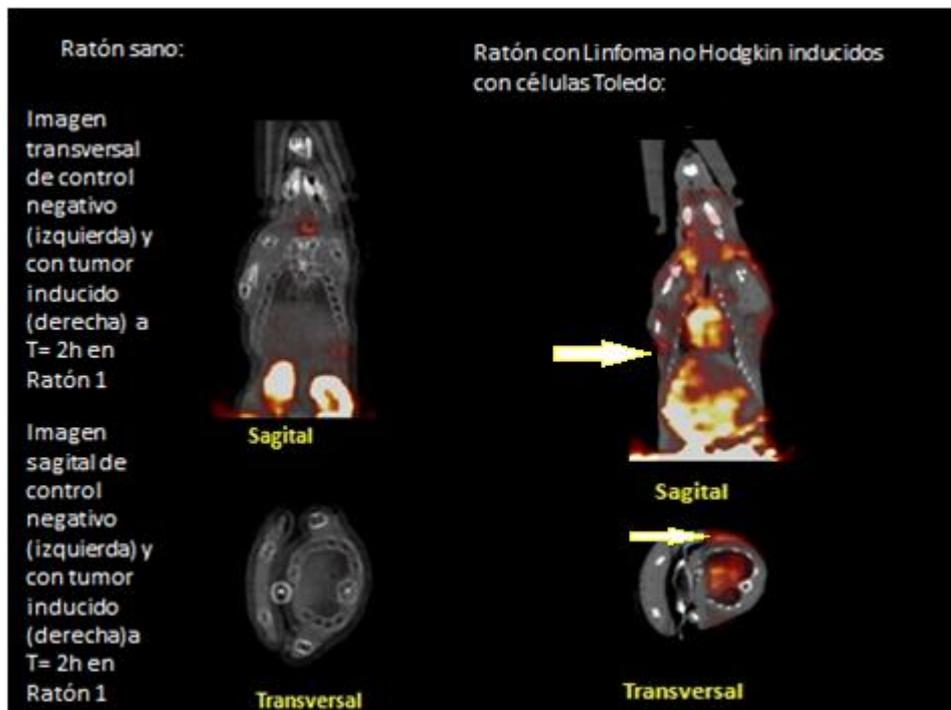


Figura 38. Imagen μ SPECT/CT de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) (colimador HRES con 1,4 mm, 127x127 mm campo de visión trans-axial, 64 proyecciones con $> 9\text{Kcts}$) en ratones Balb/C normales y portadores de LNH inducido a 2 h post-inyección de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab).



Figura 39. Imagen μ SPECT/CT de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) (colimador HRES con 1,4 mm, 127x127 mm campo de visión trans-axial, 64 proyecciones con > 9Kcpts) en ratones Balb/C normales y portadores de LNH inducido a 6 h post-inyección de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab).

5.9. Conjugación de Fab's(Bevacizumab) con Cianina 7-NHS ester (Cy7 NHS-ester)

La concentración de proteína en mg/mL obtenida fue de 1.25 mg/mL. A su vez la relación de Cy7: Fab(Bevacizumab) fue de 2.25.

5.10. Imágenes fluorescentes *in-vivo* en LNH con Cy7-Fab (Bevacizumab)

Los datos de las imágenes por fluorescencia de Cy7-Fab(Bevacizumab) se muestran en la Figura 40. Las imágenes fueron realizadas a 0.5, 2, 24, 48 y 72 h p.i. de 100 ug/100 uL de Cy7-Fab(Bevacizumab), revelando una clara fluorescencia a nivel tumoral y a nivel de los linfonodos axilares hasta 72 h p.i. Dicha fluorescencia a nivel axilar de Cy7-Fab(Bevacizumab) fue verificada al realizar la imagen *ex-vivo*.

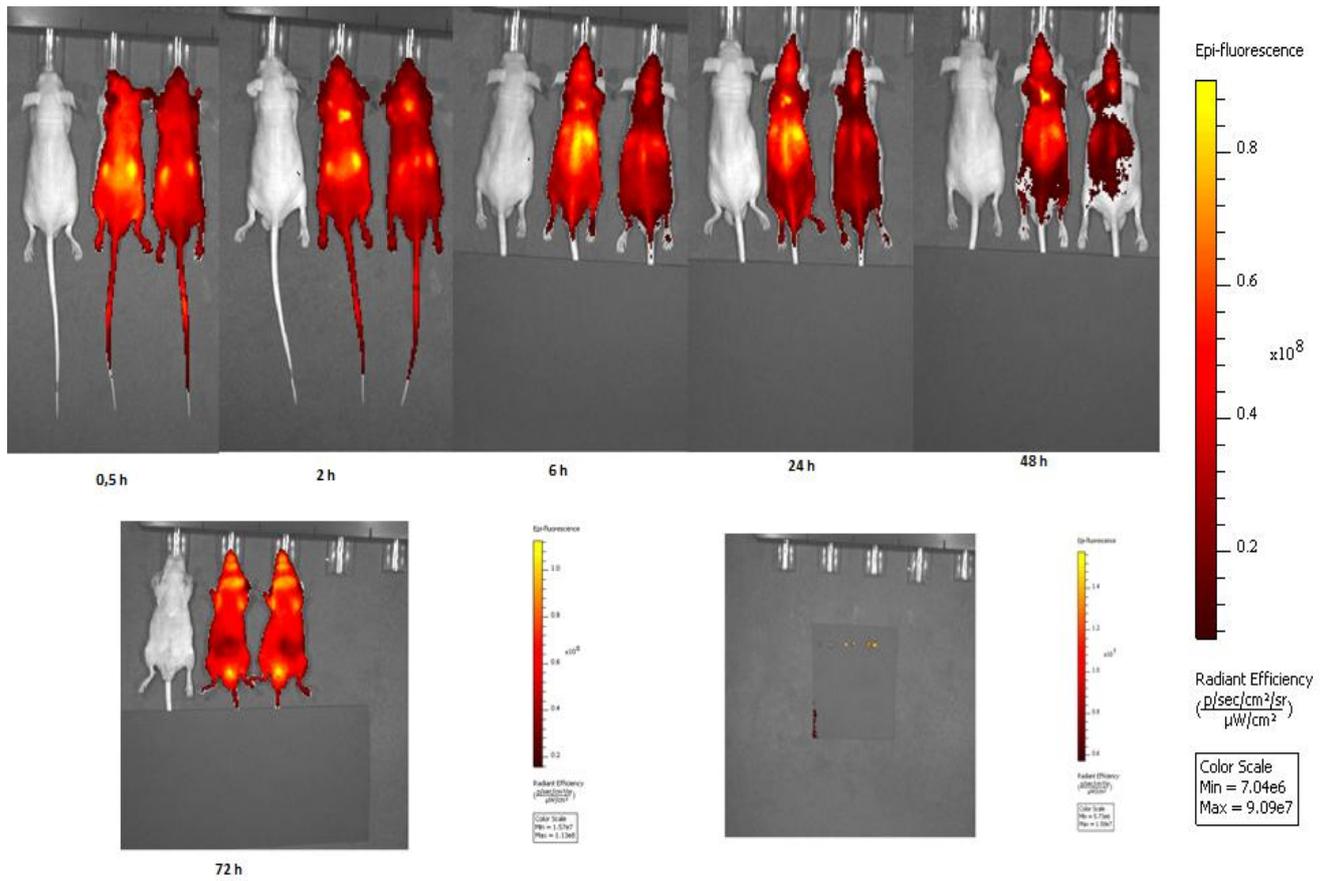


Figura 40. Imágenes iVis (IVIS Spectrum In Vivo ImagingSystem, Perkin Elmer) en ratones Balb/C nude portadores de tumores de LNH inducido a los 0.5, 2, 6, 24, 48 y 72 h, con Cy7-Fab(Bevacizumab) y de los linfonodos axilares a 72 h. Abajo a la derecha, se observa la imagen de los linfonodos axilares ex-vivo.

6. Discusión

La inhibición del proceso de angiogénesis se ha puesto en práctica como una técnica clave para inhibir el crecimiento tumoral y detener el posible desarrollo de metástasis. Una de las posibles estrategias anti-angiogénicas representa la inactivación de la unión de los VEGFs a sus receptores utilizando anticuerpos monoclonales diseñados específicamente contra estos, dado que se ha demostrado que estos factores juegan un rol central en la promoción de la angiogénesis tanto fisiológica como tumoral.

Uno de los anticuerpos monoclonales utilizados en las mencionadas estrategias anti-angiogénicas es el anticuerpo Bevacizumab, el cual es capaz de unirse a dichos factores. El VEGF es ampliamente expresado en la mayoría de los tumores de tipo sólido y actualmente se ha encontrado que se sobre expresa también en tumores líquidos, como es el caso del LNH, relacionando su elevada expresión a un mal pronóstico. Debido a que los fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos monoclonales (fragmentos Fab) poseen adecuadas características para estudios diagnóstico, nos hemos centrado en su empleo dado que representan un excelente blanco para el desarrollo de nuevos agentes de imagen para diagnóstico y terapia del cáncer. La posibilidad de visualizar el status y realizar un screening *in vivo* del VEGF, podría contribuir a la caracterización de su expresión como también al estudio de la progresión tumoral.

De esta forma la marcación de los fragmentos Fab tanto con un emisor gamma (como el ^{99m}Tc) como con un emisor de fluorescencia (como el Cy7), se podrían emplear como método de diagnóstico para evaluar la localización de la lesión como su extensión, así como también para el seguimiento de pacientes con LNH.

Para llevar a cabo los estudios planteados, primariamente se procedió a realizar la fragmentación del AcMo Bevacizumab empleando la enzima papaína, con su posterior purificación mediante el empleo de una columna de proteína A. Se logró verificar mediante SDS al 10 % como por HPLC la presencia de los Fab obtenidos de forma pura, con un peso molecular aproximado de 50 kDa. Posteriormente se realizó su derivatización para su posterior marcación; es muy importante en la marcación de moléculas blanco con radionucleidos metálicos que retengan la actividad biológica de la biomolécula. El grupo 6-hidrazinonicotinil, conocido como HYNIC, es uno de los agente quelantes bifuncionales (AQB) más utilizados y es por ello que los fragmentos Fab purificados fueron derivatizados con dicho agente. Se controló la conjugación mediante espectrometría de masa y HPLC, confirmando la efectiva derivatización de los Fab y esto nos permitió estimar el número de moléculas de AQB por Fab. Al evaluar los pesos moleculares, se obtuvo una relación Fab(Bevacizumab):HYNIC de

aproximadamente 1:1. Estos resultados significan una adecuada conjugación por parte del Fab al AQB, lo que posibilitaría obtener adecuadas actividades específicas.

La amplia mayoría de los radiofármacos que están clínicamente disponibles en Medicina Nuclear son complejos de ^{99m}Tc debido a las favorables características fisicoquímicas de este radionucleido. Además, el ^{99m}Tc es fácilmente disponible y a bajos costos a partir de generadores de ^{99}Mo - ^{99m}Tc .

Las marcaciones de los fragmentos conjugados con ^{99m}Tc se desarrollaron de forma rápida y sencilla, presentando altas purzas radioquímicas, según se pudo evaluar por distintos sistemas cromatográficos; HPLC, ITLC-SG, Watmann 1 mm e ITLC-SG impregnada en BSA. Complementariamente los resultados obtenidos por HPLC revelaron un marcado estable, no presentando una afectación de la integridad del Fab ni la presencia de agregados proteicos.

La estabilidad *in-vitro* del fragmento radiomarcado evaluado mostraron altos niveles de pureza en todas las condiciones estudiadas. El estudio realizado con el agente de competencia L-Cisteína reveló una disminución de la estabilidad aproximadamente de un 17 % a 4 h para concentraciones de 1 mM, mientras que a concentraciones de 0,1 mM se observó un leve cambio del 7 % de la pureza radioquímica. Estos resultados son esperados debido a que la L-Cisteína es un agente de competencia que a altas concentraciones resulta un competidor muy potente por el radionucleido ^{99m}Tc formando complejos muy estables con el mismo.

Para comprobar la capacidad relativa de unión al VEGF de los fragmentos Fab del Bevacizumab se realizó un ensayo por citometría de flujo empleando la línea celular humana de LNH (Toledo). En dicho estudio se logró verificar la efectiva expresión y unión por parte de los fragmentos Fab del Bevacizumab al VEGF a nivel citoplasmático expresado por las células Toledo. Este ensayo nos verificó que la inducción tumoral con dicha línea celular podría ser un adecuado modelo para comprobar la expresión de VEGF asociado a LNH.

Posteriormente, se realizaron estudios para determinar el perfil farmacocinética del Fab(Bevacizumab) radiomarcado mediante la realización de ensayos de biodistribución en ratones Balb/C normales y portadores de LNH inducido a 2, 6 y 24 h. En las biodistribuciones se logró observar que posiblemente las pequeñas diferencias significativas de la absorción de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) entre los ratones normales y portadores de tumores inducidos en todos los órganos analizados, podría deberse a la inducción tumoral empleando ciclofosfamida 24 h previo a la inoculación

de las células. Sin embargo, tanto en los ratones normales como portadores de tumores, se observó una rápida depuración sanguínea, con eliminación renal principalmente, y ausencia de captación apreciable en otros órganos. La eliminación renal, se puede explicar en base a que los productos de metabolización de los Fab (con un peso molecular aproximado de 50 kDa) pueden ser filtrados por el glomérulo renal unido al radionucleido. Los datos de la biodistribución de los ratones portadores de tumores inducidos presentaron a nivel tumoral una elevada retención de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab). Dos horas luego de la inyección, la absorción a nivel tumoral fue de 2.44 ± 0.72 %Act/g seguido por 1.43 ± 0.49 %Act/g y 4.90 ± 1.30 %Act/g a 6 y 24 h, respectivamente. Además se apreciaron adecuadas relaciones tumor vs. músculo, las cuáles nos permitirían pensar en la realización de imágenes a partir de 2 h posterior a la inyección del compuesto marcado. Estos estudios de biodistribución fueron corroborados mediante la realización de imágenes $\mu\text{SPEC}/\text{CT}$ revelando una significativa eliminación renal como retención a nivel tumoral.

La conjugación del fragmento Fab del Bevacizumab con Cy7, se realizó de forma rápida y sencilla, obteniendo un adecuado rendimiento de conjugación que se encuentra dentro del rango esperado para dichos compuestos y proteínas.

La imagen en el iVIS obtenidas en ratones con LNH inducidos verificaron, al igual que el ensayo de biodistribución e imágenes $\mu\text{SPEC}/\text{CT}$ empleando un emisor gamma, la eliminación renal del compuesto marcado como también la retención a nivel tumoral. Dicha retención fue verificada hasta 72 h posterior a su inyección tanto a nivel tumoral como a nivel de los linfonodos axilares. Dicha captación a nivel de los linfonodos se podría deber a que es un lugar de muy alta probabilidad de migración de células tumoral para su posterior diseminación hacia otros sitios.

Esta nueva sonda fluorescente se puede usar para guiar la extirpación quirúrgica de tumores. Debemos tener en cuenta que la fluorescencia de Cy7 podría ser atenuada por los tejidos interpuestos entre el detector y el tumor, pero durante la escisión quirúrgica esos tejidos se eliminarían. Sería interesante como una perspectiva tener un agente híbrido del Fab (Bevacizumab), radiactivo y fluorescente, para combinar las fortalezas de ambas modalidades.

7. Conclusiones

En el presente trabajo se desarrolló una estrategia simple y efectiva para la obtención y marcación de los fragmentos de unión al antígeno (Fab) con ^{99m}Tc o con Cy7 y para su evaluación química y biológica.

El ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) fue obtenido con altas purezas permaneciendo estable durante todo el tiempo de observación. El mismo pudo ser fácilmente y rápidamente controlado por diferentes sistemas cromatográficos. Las imágenes realizadas permitieron una adecuada visualización a nivel tumoral a partir de las 0.5 h p.i hasta 6 h.

Las imágenes en el iVIS obtenidas mediante el empleo de Cy7-Fab(Bevacizumab) fueron similares con las imágenes $\mu\text{SPEC}/\text{CT}$, pero empleando el fragmento fluorescente se logró visualizar la captación tumoral como la migración de las células tumorales a los linfonodos axilares hasta 72 h.

Por lo cual, tanto ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) como Cy7-Fab(Bevacizumab) podrían convertirse en potenciales agentes de imagen para la evaluación de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular en LNH de forma no invasiva; como también podrían contribuir a la decisión de seguir o no con los tratamientos quimioterapéuticos o radioterapéuticos dados el alto costo que el uso de éstos conllevan. Tanto ^{99m}Tc -HYNIC-Fab(Bevacizumab) como Cy7-Fab(Bevacizumab) podrían ser vistos como herramientas clínicas para la realización de estudios de screening del VEGF en tumores que podrían responder a la quimioterapia asociada al uso de Bevacizumab.

8. Referencias bibliográficas

1. Naturaleza del cáncer del Instituto Nacional del Cáncer.
<http://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza>
2. Datos y cifras del Cáncer de febrero 2017 por la Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
3. Registro Nacional del Cáncer, Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer.
4. Folkman J.; Heymach J.; Kalluri R. Tumor angiogenesis. 7th edition Hamilton. Ontario; B.C. Decker. 2006; 157-191.
- 5- Carmeliet P.; Jain R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature 2000; 407:249-57.
- 6- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. Nat Med. 2003; 9:653-60.)
- 7- Pelengaris S.; et al. The Molecular Biology of Cancer. 2006; 1th edition. Australia: University of Warwick)
- 8- Department of Health and Human Services. National Institute of Health. National Institute of Cancer.
- 9- Sánchez de Toledo Codina J.; Sábado Álvarez C. Linfoma de Hodgkin y no Hodgkin. Pediatría integral 2016 XX (6) 300-400 Universidad Autónoma de Barcelona.
- 10- Linfoma no Hodgkin. Sociedad de lucha contra la Leucemia y el Linfoma 2014; 1-53.
- 11- A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. Blood. 1997; 89:3909.
- 12- Lichtman, A.M., Beutler, E., Seligsohn, U., Kaushansky, K., Kipps, T. Willimas hematology 7th Ed. MacGraw-Hill Medical, 2006
- 13- Australian Institute of health and welfare and austrlaasian association of cancer regitries. Cancer in Australia. Canberra: Australian Institute of Health and welfare, 2003.

- 14- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. World Health Organization Classification of tumor. Pathology and genetics of Tumor of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC PRESS: Lyon 2001.
- 15- Najjar, R. Hustinx, G. Jerusalem, G. Fillet, P. Rigo. Positron Emission Tomography (PET) for Staging Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphomas (NHL) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals. 2001; 16(4): 297-304.
- 16- Rodríguez-Vigil, B; Gómez-León, N; Pinilla, I, Hernández-Maraver, D; Coya, J; Curto, L; Madero, R. PET/CT in lymphoma: Prospective study of enhanced full-dose PET/CT versus unenhanced low dose PET/CT. J Nucl Med. 2006; 47(10) 1643-48.
- 17- Carmeliet P.; Jain R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature 2000; 407:249-57.
- 18- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med. 1971;285:1182-6.
- 19- Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. N Engl J Med. 1995;333:1757-1763.
- 20- Risau W. Mechanism of angiogenesis. Nature. 1997;386:671-4.
- 21- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. Nat Med. 2003; 9:653-60.
- 22- Dvorak HF. Angiogenesis update 2005. Thromb Haemost. 2005; 3: 1835-1842.
- 23- Dvorak HF, Rons-Whipple A. How tumors make bad blood vessels and stroma. Am J. Pathol. 2003; 162:1747-1757.
- 24- Avastin Bevacizumab de www.roche.com/Avastin®
- 25- Folkman J. Angiogenesis research: from laboratory to clinic. Formu (Geneva) 1999; 93 Suppl 3:59-62.
- 26- Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance on microvascular hyperpermeability in angiogenesis. Curr Top Microbiol. Immunol. 1999; 237:97-132.
- 27- Rakesh K, Jain Carmeliet, Peter F Carmeliet, Vessels of death or life. Scientifics American 2001.

- 28- Camacho, X; Cabral, P. "Angiogénesis Tumoral: estrategias diagnósticas y terapéuticas". *Salud Militar*, vol 31, pág 34 - 48, 2012.
- 29- Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol. Inmunol.* 1999; 237:97-132.
- 30- Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol.* 2002; 29(6):10-14.
- 31- Brown L.F.; et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS.* 1997; 79:233-269.
- 32- Carmeliet P.; Collen D. Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Inmunol.* 1999; 237:133-158.
- 33- Folkman J. Angiogenesis research: from laboratory to clinic. *Formu (Geneva)* 1999; 93 Suppl 3:59-62.
- 34- Ruhrberg C. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *J Cell Sci.* 2001; 114:3215-16.
- 35- O`Reilly M.S.; et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis Lung carcinoma. *Cell.* 1997; 88(2):277-285
- 36- Singh R.K.; et al. Interferon alpha and beta downregulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc.Natl.Acad Sci.* 1995; 92:4562-4566.
- 37- Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 2005; 438:932-936.
- 38- Angiogenesis ¿Podemos Matar de Hambre al Cáncer? Lazos contra el Cáncer. <http://www.lazoscontraelcancer.com>
- 39- Hanahan D.; Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996; 86:353-64.
- 40- Folkman J.; et al. Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application. *Thromb Haesmost.* 2001; 86:23-33.

- 41- Fidler I.J.; Ellis L.M. The implications of angiogenesis to the biology and the therapy of cancer metastasis. *Cell*. 1994; 47(79):185-188.
- 42- Ellis L.M.; et al. Downregulation of vascular endothelial growth factor in human colon carcinoma cell mice transfected with an antisense expression vector specific for c-src. *J Biol Chem*. 1998; 273(2):1052-1057.
- 43- Folkman J.; Kiogstrum M. Angiogenesis factors. *Science*. 1987; 235:442-447.
- 44- Slavin J. Fibroblast growth factors: At the Herat of angiogenesis. *Cell Biology*. 1995; 19:431-444.
- 45- Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor-1: master regulation of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev*. 1998; 8:588-594.
- 46- Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin. Oncol*. 2002;29: 15-18.
- 47- Bergers G and Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Rev Cancer*. 2003; 3: 401-409
- 48- Martínez -Ezquerro y Herrera, *Cancerología* 1 2006 : 83-96
- 49- Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct*. 2001; 26:25-35
- 50- Dvorak HF. Angiogenesis update 2005. *Thromb Haemost*. 2005; 3: 1835-1842.
- 51- Goodsell D. The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. *Stem Cells*. 2003, 21:118-119.
- 52- Hoeben A, Landuyt B et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol. Rev*. 2004; 56: 549-580
- 53- Gerber H.P.; Dixit V.; Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1998; 273:13313–13316.
- 54- Gerber H.P.; et al. VEGF regulates endothelial cell survival by the PI3-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*. 1998; 273:30336–30343.

- 55- Asahara T.; et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 1999; 18: 3964-3972.
- 56- Rousseau S.; Houle F.; Huot J. Integrating the VEGF signals leading to actin-based motility in vascular endothelial cells. *Physiol.* 2001; 280:C11375-C1386.
- 57- Senger D.R.; et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983; 219:983-985.
- 58- Gabrilicich D.; et al. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood.* 1998; 219:983-985.
- 59- Ferrara N. Hans-Peter G. LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 9, 2003, 669–676.
- 60- Ara, T., DeClerck, Y.A. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *USA EUROPEAN JOURNAL OF CANCER.* 2010; 46:1223-1231.
- 61- Hoeben A, Landuyt B et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2004; 56: 549-580)
- 62- Folkman J.; Klagsbrum M. Angiogenesis factors. *Science.* 1987; 235:442-447.
- 63- Dvorak HF. Angiogenesis update 2005. *Thromb Haemost.* 2005; 3: 1835-1842.
- 64- Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct.* 2001; 26:25-35
- 65- Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3:401–410.
- 66- Chiodelli P, Rezzola S, Urbinati C, Federici Signori F, Monti E, Ronca R, Presta M, Rusnati M. Contribution of vascular endothelial growth factor receptor-2 sialylation to the process of angiogenesis. *Oncogene* 2017.
- 67- Partanen T.A.; Paavonen K. Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microsc Res Tech.* 2001; 55:108-121.
- 68- Gille H.; et al. Analysis of biological effects and signalling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem.* 2001; 276(5): 3222-3230.

- 69- Soker S.; et al. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 1998; 92: 735-745.
- 70- Ferrara N.; Gerber H.P.; LeCounter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003; 9(6): 669-676.
- 71- Olsson AK; Dimberg A; Kreuger J; Claesson-Welsh L. VEGF receptor signaling- in control of vascular function. *Nature Reviews. Mol Cell Biol*. 2006; 7: 359-371.
- 72- Willet C.G.; et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. *Nat Med*. 2004; 10:145-147.
- 73- Hainsworth J.; et al. Phase II trial of bevacizumab and erlotinib in patients with metastatic renal carcinoma (RCC). *Proc Am Soc Clin Oncol*. 2004; 23:381 (abstr4502).
- 74- Presta L.G.; et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res*. 1997; 57:4593-99.
- 75- *World J Gastro enterol* 2015 June 21; 21(23): 7065-7073
- 76- Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jul 29; 333 (2): 328-335.
- 77- Sledge G.; et al. A phase II trial of single-agent rhumab VEGF (recombinant humanized monoclonal antibody o vascular endothelial cell growth factor) in patients with relapsed metastati breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 2000; 19:3u.
- 78- Lander R.C.; et al. Phage display derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *DDT* 9. 2004; 525-529.
- 79- Food and Drug Administration. Avastin (Bevacizumab) information. Department of Health and Human Services.
- 80- Zhu Z.; Witte L. Inhibition of tumor growth and metastasis by targeting tumor-associated angiogenesis with antagonists to the receptors of vascular endothelial growth factor. *Invest New Drugs*. 1999; 17: 195-212.

- 81- Pietras R.; Weinberg O. Antiangiogenic Steroids in Human Cancer Therapy. *eCAM*. 2005; 2(1): 49–57.
- 82- Kim K.J.; et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. 1993; 362: 841-844.
- 83- Fanale M.; Younes A. Monoclonal antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. The University of Texas Center, Houston, USA.
- 84- J.M.LIDDELL. “Production Strategies for Antibody Fragment Therapeutics” <http://www.biopharminternational.com/biopharm/Downstream+Processing/Production-Strategies-for-Antibody-Fragment-Therap/ArticleStandard/Article/detail/601148>. 2009
- 85- Frenken L, van Tuijl E, Bos JW, Müller WH, Verkleij AJ, Verrips CT, ScFv Verhoeyen ME, van der Logt CP, Beggs TS, Davis PJ. Antibody fragments for controlled delivery of therapeutic agents. *Biochem Soc Trans*. 1995; 23:1067-1073.
- 86- <http://absoluteantibody.com/antibody-resources/antibody-engineering/antibody-fragments/>
- 87- Aron L. ;Tufts N. Bioscience Antibody fragments Hope and hype. University School of Medicine; Boston, MA USA 2:1, 77-83; January/February 2010.
- 88- <http://absoluteantibody.com/antibody-resources/antibody-engineering/antibody-fragments>
- 89- Curso básico de metodología de radioisótopos. Modelos Biológicos en Investigación, Docencia y Control de Fármacos” CIN Facultad de Ciencias UdelaR.
- 90- Phelps M.E. PET: the merging of biology and imaging into molecular imaging. *Journal of Nuclear Medicine and Biology*. 2000; 41(4):661-681.
- 91- 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.
- 92- Dobrucki L.W.; et al. Approaches to multimodality imaging of angiogenesis. *J Nucl Med*. 2010; 51(Suppl 1):66S-79S.
- 93- Morrison A.R.; Sinusas A.J. Advances in radionuclide imaging in myocardial biology. *J Nucl Med*. 2010; 17(1):116-34.

- 94- Camacho. X ; Angiogénesis Tumoral: Desarrollo de radiofármacos para terapia y diagnóstico. Facultad de Medicina. Universidad de la Republica. 2013. 60-65.
- 95- Boleaga .B.Imagenología molecular anales de radiología. Mexico 2004-2.63-64.
- 96- Centro Uruguayo de Imagenología Molecular. <http://cudim.org/pet-ct/>
- 97- Kowalski R.; Falen S. Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine segunda edición American Pharmacists Association. 2004.
- 98- RADIOPHARMACEUTICALS Final text for addition to The International Pharmacopoeia (November 2008)
- 99- (Radiofármacos para el manejo eficaz del cáncer en función del costo. Boletín del OIEA 55-4/Diciembre de 2014 (www.iaea.org).
- 100- Curso básico de Metodología de Radioisotopos. Radiofarmacos.
- 101- Kniess T.; Laube M. ;Wust F.; Pietzsch J. Technetium-99m based Small Molecule Radiopharmaceuticals and Radiotracers targeting Inflammation and Infection
- 102- Casado Solanes S. tecnecio 99m: Radiofármaco de diagnóstico usado en la actualidad.
- 103- H.Spies H.; Pietzch H.J. Stannous Chloride in the preparation of 99mTc Pharmaceuticals. Technetium 99m Pharmaceuticals. 2007.
- 104- Mazzi U. Technetium in Medicine. Technetium-99m Pharmaceuticals. 2007; pp 7-58
- 105- www.nucleus.iaea.org y www.tecnonuclear.com.ar
- 106- Dilworth J. R.; Parrott J.S. The biomedical chemistry of technetium and rhenium. Chem. Soc. Rev. 1998; 27: 43-55.
- 107- Liu S. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. Chem. Soc. Rev. 2004; 27: 43-55.
- 108- Hom R.; Katzenellenbogen J. Technetium-99m-labeled receptor-specific small-molecule radiopharmaceuticals: recent developments and encouraging results. Nucl Med Biol. 1997; 24(6):485-98.

- 109- Liu S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target specific delivery of metallic radionuclides. *Advanced drugs delivery reviews*. 2008; 60: 1347-1370.
- 110- Banerjee S.; Pillai M.R.A.; Ramamoorthy N. Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals. *Semin Nucl Med*. 2001; 31:260-277.
- 111- Jain D. Technetium-99m labeled myocardial perfusion imaging agents. *Semin Nucl Med*. 1999; 29:221-236.
- 112- Meszaros L.K.; et al. Hydrazinonicotinic acid (HYNIC) – Coordination chemistry and applications in radiopharmaceutical chemistry. *Inorganica Chimica Acta*. 2010; 363(6):1059–1069.
- 113- Liu S.; et al. Technetium Complexes of a Hydrazinonicotinamide-Conjugated Cyclic Peptide and 2-Hydrazinopyridine: Synthesis and Characterization. *Inorg Chem*. 1999;38: 1326–1335.
- 114- Rennen H. J. J. M.; et al. Labeling Proteins with 99mTc via Hidrazinonicotinamide (HYNIC): Optimization of the Conjugation Reaction. *Nucl. Med.& Biol*. 2000, 27: 599-604.
- 115- Decristóforo C.; et al. 99mTc-HYNIC-[Tyr3]-Octreotide for Imaging Somatostatin-Receptor-Positive Tumors: Preclinical Evaluation and comparison with 111In-Octreotide. *J Nucl Med*. vol. 41, nº 6, pp. 1114-1119.
- 116- 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.
- 117- Calzada V, García MF, Alonso-Martínez LM, Camachoc 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. 2016;16(9):1184-9.
- 118- Calzada V.; Camacho X.; Garcia F.; Fernandez M.; Brugnini A.; Chabalgoity A.; Gambini J.P.; Alonso O.; Balter H; Cabral P. Bevacizumab-HYNIC-99mTc: marcador molecular de angiogénesis tumoral . *Year* 11, Nº 43, January 2009 / Año 11, Nº 43.

- 119- Liu S.; et al. Technetium Complexes of a Hydrazinonicotinamide-Conjugated Cyclic Peptide and 2-Hydrazinopyridine: Synthesis and Characterization. *Inorg Chem.* 1999;38: 1326–1335.
- 120- S0ceti of Nuclear Medicin and Molecular Imagen.
- 121- Sinusas A.J.; Thomas J.D.; Mills G. The future of molecular imaging. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2011;4(7):799-806.
- 122- R.C., Kues, H.A. Absorption and Fluorescence Properties of Cyanine Dyes. *J. Chem. Eng. Data*
123. www.lumiprobe.com/p/cy7-nhs-ester (1977), 22: 379-383.
- 124- www.thermofisher.com. Antibody Fragmentation
- 125- Laemmli UK Cleavage of structural proteins during de assembly of the head of bacteriophage T4.1970.*Nature*227: 680-185.
- 126- Hantowich D.J.; et al. Can a Cysteine Challenge Assay Predict the In vivo Behavior of 99mTc-labeled Antibodies? *Nuc Med Biol.* 1994;21(8), 1035-1044
- 127 - Loening A.M.; Gambhir S.S. AMIDE: una herramienta de software libre para el análisis de imagen multimodalidad médico". *Molecular Imaging.* 2003; 2 (3):131-137.

Agradecimientos

Especialmente quiero agradecer a mi *Padre y familia*, por su apoyo constante, por todo el esfuerzo que pusieron para que esto logre realizarse, por haberme guiado y acompañado en todos los momentos que los he necesitado.

A *Nicolás*, por ser mi fiel compañero en este largo camino, ayudando siempre a que todo sea más fácil, por su apoyo incondicional y todo su cariño.

A todos mis amigos que han hecho posible la realización y finalización de mi grado.

A mi tutor, Dr. Pablo Cabral, y mi co-tutora Ms. Ximena Camacho que me dieron la posibilidad, sin dudar, de realizar este proyecto, por todo su apoyo, confianza, dedicación y motivación que han puesto para que culmine esta gran etapa.

A todos mis compañeros de laboratorio con los cuales he aprendido y disfrutado la realización del proyecto.

A todas las instituciones que han contribuido al desarrollo de este proyecto:

- Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.
- Centro de Investigaciones Nucleares (CIN), Facultad de Ciencias, UdelaR, Uruguay.
- Espacio Interdisciplinario, Universidad de la República, Uruguay.