

$N^5, N^{10}$ -  
dióxido de 2-amino-7(8)-  
fluorofenazina (FNZ)  
marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  en  
imagenología de tejidos  
hipóxicos.

Bach. Joaquín Afonso Panizza

Tutoras:

Mirel Cabrera (Área de Radiofarmacia, Facultad de Ciencias, Universidad de la República).

Nicole Lecot (Laboratorio de ATN en Bioquímica y Biotecnología/Grupo de Química Medicinal, Facultad de Ciencias, Universidad de la República).

## Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que de una u otra forma me acompañaron durante este proceso y que sin ellas todo esto no hubiese sido posible.

En primer lugar quiero agradecer a mi madre, a mi padre y a mi hermana por el apoyo constante, por el amor incondicional, por ayudarme a dar todo y por siempre impulsarme a poder más. Además quiero agradecer al resto de mi familia, abuelas y abuelo, tíos y tías y primas por siempre estar.

A mi novio Paul por siempre apoyarme, por siempre ayudar a que diera lo mejor de mí, por el amor constante y por siempre confiar en que podía dar más.

A mis amigos de la vida, Nacho y Kriz que estuvieron presentes desde el comienzo de esta travesía, dándome siempre sus palabras de aliento y por su confianza en mí. A Caro, Mai E. y Mai. R. por siempre apoyarme y estar cuando más las necesitaba. A mis amigos de la facultad, sobretodo a Eri, Lu, Fede, Ceci, Eli, Agus y Gasti por acompañarme en todo este proceso y vivirlo juntos, compartiendo tantas horas de estudio, salidas y risas. A mis amigos del colegio Majó, Juan, Gabriel, Diego Z. y Diego P. por tantos años compartidos.

Finalmente, y no menos importante, un eterno agradecimiento a mis tutoras Nicole Lecot y Mirel Cabrera por su paciencia, por su apoyo constante, por siempre acompañarme y por todas las enseñanzas.

Además, un agradecimiento especial a Hugo Cerecetto y Marcelo Fernández por tantas enseñanzas.

A las agencias financiadoras, como ANII que otorgó financiamiento de reactivos y equipamiento a través del proyecto FCE\_1\_2014\_1\_104714; y PEDECIBA (reactivos para el proyecto).

Además, se obtuvo un apoyo por parte del instituto CIN (Centro de Investigaciones nucleares), que me apoyó con unos meses de cargo docente para la finalización de dicho proyecto de tesis de grado.

# Índice

Índice de imágenes.....	6
<b>1. Resumen.....</b>	<b>9</b>
<b>2. Introducción</b>	
2.1 Cáncer.....	10
2.2 Cáncer de mama: Generalidades.....	11
2.3 Cáncer de mama: Tipos.....	12
2.4 Epidemiología del cáncer.....	12
2.5 Modelo de cáncer de mama inducido 4T1.....	16
2.6 Radiofármacos.....	16
2.7 Radiofármacos de terapia.....	17
2.8 Radiofármacos de diagnóstico.....	17
2.8.1 Radiofármacos de diagnóstico: el $^{99m}\text{Tc}$ .....	18
2.8.2 Estrategias de marcación con $^{99m}\text{Tc}$ .....	21
2.9 Renio (Re) como herramienta biomédica.....	22
2.10 Derivados de Fenazina.....	23
2.11 Medicina nuclear e imagenología molecular.....	24
<b>3. Antecedentes</b>	
3.1 <i>N</i> -óxido de FNZ. ....	26
<b>4. Objetivos</b>	
4.1 Objetivo general.....	27
4.2 Objetivos específicos.....	27
<b>5. Materiales utilizados</b>	
Síntesis de N5,N10-dióxido de 2-amino-7(8)-fluorofenazina (FNZ).....	28
Síntesis del complejo $\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$ .....	28
Síntesis del complejo $\text{FNZ-}^{99m}\text{Tc}$ .....	28
Seguimiento de estabilidad del marcado.....	29
Estudio de lipofilia (Log P).....	29
Ensayo de competencia con histidina.....	29

Ensayo de unión a proteína.....	29
Ensayo de biodistribución del complejo FNZ- <sup>99m</sup> Tc .....	29
Estudio preliminar de la formación del complejo FNZ- <sup>185</sup> Re, mediante caracterización por HPLC.....	30
Estudio por microscopía electrónica de barrido del complejo FNZ- <sup>185</sup> Re.....	30

## 6. Métodos

6.1 Síntesis de la FNZ.....	31
6.2 Síntesis del complejo Tc(CO) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> .....	32
6.3 Síntesis del complejo FNZ- <sup>99m</sup> Tc.....	33
6.4 Seguimiento de estabilidad del marcado.....	33
6.5 Estudio de lipofilia (Log P).....	33
6.6 Ensayo de competencia con histidina.....	34
6.7 Ensayo de unión a proteína.....	34
6.8 Ensayo de biodistribución del complejo FNZ- <sup>99m</sup> Tc .....	34
6.9 Estudio preliminar de la formación del complejo FNZ- <sup>185</sup> Re, mediante caracterización por HPLC .....	35
6.10 Estudio por microscopía electrónica de barrido del complejo FNZ- <sup>185</sup> Re.....	36

## 7. Resultados y discusión

7.1 Síntesis de la FNZ.....	37
7.1.1. Caracterización de FNZ por HPLC.....	39
7.2 Síntesis del complejo Tc(CO) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> .....	40
7.3 Síntesis del complejo FNZ- <sup>99m</sup> Tc.....	41
7.4 Seguimiento de estabilidad del marcado.....	44
7.5 Estudio de lipofilia (Log P).....	48
7.6 Ensayo de competencia con histidina.....	48
7.7 Ensayo de unión a proteína.....	51
7.8 Ensayo de biodistribución del complejo FNZ- <sup>99m</sup> Tc .....	51
7.8.1 Imágenes centellográficas.....	59
7.9 Estudio preliminar de la formación del complejo FNZ- <sup>185</sup> Re, mediante caracterización por HPLC.....	60

7.10 Estudio por microscopía electrónica de barrido del complejo FNZ- <sup>185</sup> Re.....	66
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>68</b>
<b>9. Perspectivas.....</b>	<b>69</b>
<b>10. Abreviaturas.....</b>	<b>70</b>
<b>11. Bibliografía.....</b>	<b>71</b>

# Índice de imágenes

Figura 1. Proporciones de incidencia y mortalidad del cáncer por región y en el mundo ( <a href="https://gco.iarc.fr/">https://gco.iarc.fr/</a> )	13
Figura 2. Proporciones de incidencia y mortalidad del cáncer por región y en el mundo según sexo ( <a href="https://gco.iarc.fr/">https://gco.iarc.fr/</a> )	14
Figura 3. Proporciones de mortalidad del cáncer en mujeres a nivel internacional ( <a href="https://gco.iarc.fr/">https://gco.iarc.fr/</a> )	15
Figura 4. Proporciones de incidencia del cáncer en mujeres a nivel internacional ( <a href="https://gco.iarc.fr/">https://gco.iarc.fr/</a> )	15
Figura 5. Proporciones de incidencia del cáncer en hombres a nivel internacional ( <a href="https://gco.iarc.fr/">https://gco.iarc.fr/</a> )	16
Figura 6. Esquema de decaimiento del $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ ( <a href="http://www.medicinanuclear.cl">www.medicinanuclear.cl</a> )	19
Figura 7. Esquema de generador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ ( <a href="http://www.nucleus.iaea.org">www.nucleus.iaea.org</a> )	19
Figura 8. Imagen de generador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ que muestra su interior ( <a href="http://www.medicinanuclear.cl">www.medicinanuclear.cl</a> )	20
Figura 9. Cores más comunes en complejos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Verdera et al, 2009)	20
Figura 10. Esquema del enfoque integrado de las estrategias de marcación con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Liu, 2004)	22
Figura 11. Esquema del enfoque bifuncional de las estrategias de marcación con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Liu, 2004)	22
Figura 12. Esquema de la bio-reducción de N-óxidos aromáticos (Cerecetto, H. y col. 2006)	25
Figura 13. Diseño de un potencial pro-fármaco bio-reducible (Tesina de posgrado de Lavaggi, M.L. 2009)	26
Figura 14. Equipo Bruker BioSpin In Vivo FX PRO Imager ( <a href="https://www.selectscience.net/">https://www.selectscience.net/</a> )	35
Figura 15. TLC de p-aminofenol, 5-fluorobenzofuroxano, compuesto JA2016-2, compuesto JA2016-3 y FNZ de lote	37
Figura 16. TLC de aguas madres de compuesto JA2016-2 y aguas madres de compuesto JA2016-3	38
Figura 17. TLC de p-aminofenol, 5-fluorobenzofuroxano, FNZ de lote y reacción en curso	38
Figura 18. TLC de p-aminofenol, 5-fluorobenzofuroxano, FNZ de lote, sólido filtrado y aguas madres de la filtración	39

Figura 19. Cromatograma de HPLC para FNZ y cuadro de purezas relativas de las señales	39
Figura 20. Cromatograma de HPLC para $Tc(CO)_2(H_2O)_3$ y cuadro de purezas relativas de las señales	40
Figura 21. Cromatograma de HPLC para el complejo $FNZ-^{99m}Tc$ , con 2,5 mCi de actividad y cuadro de purezas relativas de las señales	39
Figura 22. Cromatograma de HPLC para la mezcla de reacción del complejo $FNZ-^{99m}Tc$ , con 4,88 mCi de actividad y cuadro de purezas relativas de las señales	43
Figura 23. Cromatograma de HPLC para el complejo $FNZ-^{99m}Tc$ , con 5,47 mCi de actividad y cuadro de purezas relativas de las señales	44
Figuras 24. Cromatograma de HPLC para el complejo $FNZ-^{99m}Tc$ luego de 1 hora de su marcación y cuadro de purezas relativas de las señales	45
Figura 25. Cromatograma de HPLC para el complejo $FNZ-^{99m}Tc$ luego de 2 horas de su marcación y cuadro de purezas relativas de las señales	45
Figura 26. Cromatograma de HPLC para el complejo $FNZ-^{99m}Tc$ luego de 3 horas de su marcación y cuadro de purezas relativas de las señales	46
Figura 27. Cromatograma de HPLC para el complejo $FNZ-^{99m}Tc$ luego de 4 horas de su marcación y cuadro de purezas relativas de las señales	46
Figura 28. Cromatograma de HPLC para el complejo $FNZ-^{99m}Tc$ luego de 24 horas de su marcación y cuadro de purezas relativas de las señales	47
Figura 29. Gráfico de relación entre PRQ y tiempo en el control de estabilidad	48
Figura 30. Gráfico de porcentaje de actividad de los órganos del ratón en función al tiempo post-inyección para 30 minutos, 1 hora y 2 horas post-inyección (primer experimento)	55
Figura 31. Gráfico de porcentaje de actividad por gramo de los órganos del ratón en función al tiempo post-inyección para 30 minutos, 1 hora y 2 horas post-inyección (primer experimento)	55
Figura 32. Gráfico de porcentaje de actividad de los órganos del ratón en función al tiempo post-inyección para 1 hora y 2 horas post-inyección (segundo experimento)	58
Figura 33. Gráfico de porcentaje de actividad por gramo de los órganos del ratón en función al tiempo post-inyección para 1 hora y 2 horas post-inyección (segundo experimento)	58
Figura 34. Esquema del proceso de obtención del pro-fármaco y inyección en ratones para la obtención de la imagen	60
Figura 35. Cromatograma de HPLC para el complejo $FNZ-^{185}Re$ en proporción 1:1 y cuadro de purezas relativas de las señales	61

Figura 36. Cromatograma de HPLC para el sólido filtrado del sistema de reacción del complejo FNZ- <sup>185</sup> Re en proporción 1:1 y cuadro de purezas relativas de las señales	62
Figura 37. Cromatograma de HPLC para el sólido remanente de la filtración del sistema de reacción del complejo FNZ- <sup>185</sup> Re en proporción 1:1 y cuadro de purezas relativas de las señales	62
Figura 38. Cromatograma de HPLC para las aguas madres del sistema de reacción del complejo FNZ- <sup>185</sup> Re en proporción 1:1 y cuadro de purezas relativas de las señales	63
Figura 39. TLC preparativa C18 de aguas madres	65
Figura 40. Cromatograma de HPLC para la punta de espátula del producto de TLC preparativa de aguas madres rotavaporado y cuadro de purezas relativas de las señales	65
Figura 41. a) Microfotografía de los sólidos seleccionados para ser estudiados por microscopía electrónica de barrido. b)-e) Análisis elemental de los sólidos seleccionados	66



# 1. Resumen

El cáncer es una enfermedad que posee una alta tasa de incidencia y mortalidad en Uruguay y en el mundo. Los pacientes de dicha enfermedad se tratan con uno o una combinación de los siguientes tratamientos: quimioterapia, radioterapia, cirugía, o combinación de éstos. Reportándose en la mayoría de los casos la cirugía como la técnica de preferencia.

En estos últimos años se han estado investigando nuevos radiofármacos para el diagnóstico y la terapia de los tumores sólidos de modo de otorgar nuevas alternativas al tratamiento y erradicación de tumores sólidos. En este sentido, el uso de radionucleidos de tecnecio y de renio en conjunto con moléculas biológicamente activas es una de las estrategias que se usa para cumplir con dichos objetivos. Dentro de la familia de moléculas biológicamente activas, es de gran interés para este fin, el grupo de prodrogas activadas por hipoxia como los derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina, ya que presentan citotoxicidad en hipoxia de forma selectiva frente a oxia e interactúa con el ADN en las mismas condiciones.

Es así, que planteamos la marcación de Dióxido de  $N^5,N^{10}$ -dióxido de 2-amino-7(8)-fluorofenazina (FNZ) marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  como potencial agente para el diagnóstico de cáncer de mama metastásico símil fase 4 humano.

En este sentido, planteamos la síntesis de FNZ, su complejación con  $^{186}\text{Re}$ , la cual se obtuvo de manera eficiente con rendimientos del 10 %. Ésta se caracterizó de manera también eficiente, por cromatografía preparativa en capa fina, un análisis elemental llamado espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) y cromatografía HPLC.

Se optimizó el método de incorporación del agente radiactivo ( $^{99m}\text{Tc}$ ) a la molécula de FNZ (FNZ- $^{99m}\text{Tc}$ ), en base a los estudios estructurales de la molécula FNZ- $^{186}\text{Re}$ , con resultados que indican una marcación exitosa con una pureza radioquímica del 95.4 % determinado por cromatografía en capa fina y HPLC.

Se evaluó FNZ- $^{99m}\text{Tc}$  como agente imagenológico, realizando estudios *in vivo* de biodistribución del radiofármaco en ratones portadores de tumor mamario (4T1). Se obtuvieron imágenes centellográficas, las que permitieron observar una buena captación por dicho tumor y su buena performance a las 2 hrs.

En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que estamos frente a un posible agente de diagnóstico para su potencial uso en cáncer de mama metastásico.

## 2.Introducción:

### 2.1.Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades que implica el crecimiento y división descontrolada de células. Las células normales se dividen de forma ordenada y secuencial, pero en el caso del cáncer, las mismas crecen fuera de control y a una tasa superior que las células normales<sup>1</sup>.

Generalmente, las células se reproducen cuando se necesita un mayor número de éstas, y mueren cuando están defectuosas y no son necesarias, pero en el caso del cáncer, dicho orden en los sucesos se ve afectado<sup>2</sup>. Pueden extenderse a otras partes del organismo y generar lo que se denomina metástasis.

Los tipos de cáncer se manifiestan de formas variadas según la zona del cuerpo afectada, pudiendo crecer de forma rápida o lenta, y respondiendo de forma específica a los diferentes tratamientos<sup>1</sup>.

La mayoría de los cánceres generan cúmulos celulares denominados tumores, que involucran células que no se dividen de forma ordenada, sino que lo hacen de forma descontrolada. Éstas además pueden propagarse a otras regiones del organismo, generando lo que se conoce como metástasis. Los tumores pueden ser de dos tipos, según sean o no ocasionados por la enfermedad, conocidos como benignos (no ocasionan enfermedad) y malignos (ocasionan enfermedad)<sup>1</sup>.

Los tumores benignos no invaden ni se extienden a tejidos contiguos, aunque sí pueden adquirir tamaños apreciables. En general cuando éstos se extirpan no vuelven a crecer, lo que implica una diferencia con los tumores malignos.

Los tumores malignos, en cambio, sí son capaces de invadir tejidos contiguos. Además, a medida que estos tumores malignos crecen, algunas de sus células son capaces de extenderse a regiones distantes en el organismo, a través de la sangre o el líquido linfático, y formar nuevos tumores<sup>2</sup>. En este sentido, el grado de invasión del cáncer da cuenta de la etapa en la que se encuentra. Las etapas menores implican poca extensión de la enfermedad mientras que las mayores implican una mayor extensión de la misma.

Las formas más comunes de tratarlo son mediante cirugía, radioterapia y quimioterapia. El método quirúrgico, implica la extirpación de parte o la totalidad de la zona corporal afectada, que dependerá del tipo de cáncer.

El segundo método, la radioterapia, se utiliza para enlentecer o matar a las células cancerosas, y se puede usar en conjunto con el primer y el tercer método. Asimismo, la quimioterapia también implica el enlentecimiento o muerte de las células afectadas. Además, como las drogas utilizadas son administradas de forma sistémica, resulta una buena estrategia para el tratamiento de cánceres que se han extendido<sup>1</sup>.

Los cánceres se clasifican según el tipo de célula en el que se originan. Dado que las células en los tejidos cumplen diferentes funciones en el organismo, difieren también en su estructura. Las categorías según estos tipos celulares, son las siguientes:

- 1) Carcinoma
- 2) Leucemia
- 3) Linfoma y mieloma múltiple
- 4) Sarcoma

El carcinoma es un tipo de cáncer que se forma a partir del tejido epitelial de los órganos. Existen variados subtipos, entre ellos el adenocarcinoma, carcinoma de célula basal, carcinoma celular de transición y carcinoma de célula escamosa<sup>3</sup>.

La leucemia es un tipo de cáncer que genera una afección en la sangre que impacta en la formación de glóbulos blancos a nivel de la médula espinal. Esto hace que se produzca un gran número de células sanguíneas afectadas que se transportan por el torrente sanguíneo.

El mieloma múltiple también es un tipo de cáncer que afecta al sistema linfático. Se forma a partir de las células del plasma, un tipo de glóbulo blanco que produce anticuerpos y se origina en la médula ósea.

Finalmente, el sarcoma es un tipo de cáncer que puede originarse en varios tejidos como el adiposo y el muscular; así como en otras estructuras, tales como vasos sanguíneos, cartílago y hueso. El cáncer a nivel del cerebro o de la espina dorsal, está asociado al sistema nervioso central.

## **2.2.Cáncer de mama: Generalidades**

El cáncer de mama se genera cuando un tumor maligno se desarrolla en tejidos de la mama, tales como ductos y lóbulos<sup>4</sup>. Con menor frecuencia, puede originarse en los tejidos estromales, que incluyen tejidos conjuntivos grasos y fibrosos presentes en la mama. Con el correr del tiempo, las células cancerosas adquieren la capacidad de invadir el tejido mamario circundante y llegar a los ganglios linfáticos de las axilas. Éstos son los que le permiten a las células cancerosas la propagación a otras partes del cuerpo<sup>5</sup>. Aunque la causa exacta de este tipo de cáncer es aún desconocida, hay varios factores que inciden negativamente y contribuyen a su aparición, tales como: obesidad, consumo de alcohol, edad avanzada, antecedentes familiares de dicha enfermedad, exposición a estrógeno exógeno y la herencia de genes susceptibles a mutaciones, tales como BRCA1 y BRCA2.

BRCA1 y BRCA2 son genes supresores de tumor, presentes en los cromosomas 17 y 13, respectivamente. Se heredan de forma autosomal y dominante, son altamente penetrantes, y causan un riesgo aumentado de cánceres asociados a genes BRCA en familias afectadas<sup>4</sup>. El mecanismo que participa activamente en la generación y progresión del tumor es el daño en los mecanismos de reparación de ADN. Si una mujer presenta mutaciones en los genes BRCA, tiene entre un 40% y un 85% de posibilidades de desarrollar cáncer de mama a lo largo de su vida.

Un análisis llevado a cabo por Antoniou y col. en 2003 reportó un riesgo acumulado de desarrollar dicha enfermedad de 65% y 45% para BRCA1 y BRCA2, respectivamente <sup>6</sup>. Por lo tanto, la identificación del gen BRCA y la posterior caracterización de manifestaciones clínico-patológicas de mutaciones en dicho gen permite la identificación de los “carriers” de dichas mutaciones<sup>4</sup>.

### **2.3.Cáncer de mama: Tipos**

El cáncer de mama a pesar de que se lo considere una única enfermedad, incluye varios subtipos que difieren en comportamiento biológico y en apariencia microscópica.

En este sentido, IDC (Carcinoma infiltrante ductal) es el tipo más prevalente, ya que incluye al 70-80% de todos los casos<sup>7</sup>. Puede ser invasivo a través del tejido mamario, vasos sanguíneos y linfáticos, pudiendo llevar a la metástasis en nódulos linfáticos u otras zonas del cuerpo. El IDC se puede clasificar según su grado de diferenciación en 3 grupos, siendo el grado 1 bien diferenciado y el grado 3 poco diferenciado. Dos tercios de los casos de IDC expresan los receptores para progesterona o estrógenos, que los hace sensibles a estas hormonas. Aproximadamente un 20% del total de los casos expresan HER2, un receptor de factor de crecimiento, que está asociado al carácter agresivo de algunos de estos tumores.

El segundo tipo más común de cáncer de mama es el ILC (Carcinoma infiltrante lobular), que tiene una mayor frecuencia de bilateralidad y multicentricidad que el IDC. Este tipo presenta mayor incidencia en mujeres mayores, ya que tienen receptores de estrógeno mayormente diferenciados. Desde el punto de vista clínico, se observa una disminución en la cohesión celular debida a modificaciones en una molécula de E-cadherina que participa en este proceso.

Hay otros tipos histológicos de cáncer de mama, por ejemplo, carcinoma tubular, carcinoma metaplásico, carcinoma adenoide quístico, carcinoma medular, entre otros, que presentan menor incidencia que los anteriores.

### **2.4.Epidemiología del cáncer**

A nivel internacional, el cáncer es la segunda causa de muerte en la población, habiendo generado 8.8 millones de muertes en el año 2015. Globalmente alrededor de 1 de 6 muertes son ocasionadas por cáncer<sup>8</sup>.

En 2012 hubo 14.1 millones de casos nuevos de cáncer, siendo 8.2 millones las muertes y 32.6 millones las personas que vivían con la enfermedad (a 5 años de su diagnóstico, máximo)<sup>9</sup>.

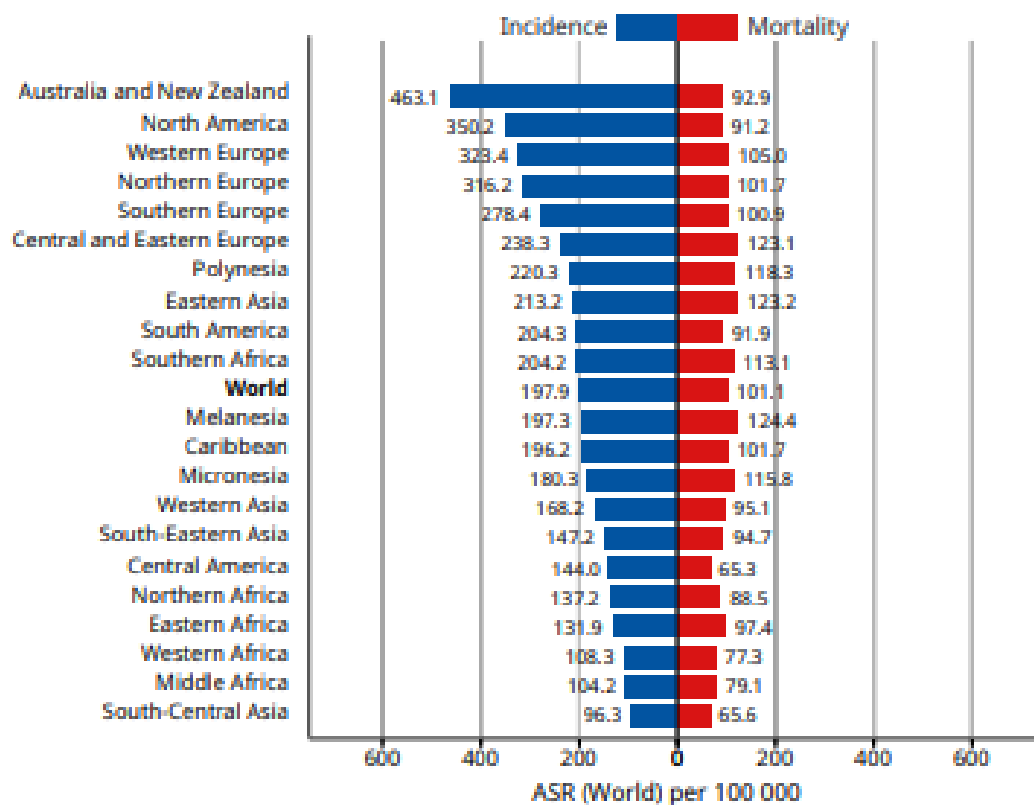


Figura 1. Proporciones estandarizadas según la edad de la incidencia (azul) y mortalidad (rojo) del cáncer a nivel de las diferentes zonas y del mundo en su totalidad (<https://gco.iarc.fr/>).

Si bien en zonas más desarrolladas la incidencia del cáncer es claramente mayor, su mortalidad se aproxima a la de los países menos desarrollados. A su vez, en líneas generales, la incidencia del cáncer es más variable que la mortalidad, ya que presenta cierta constancia si comparamos distintas regiones del planeta.

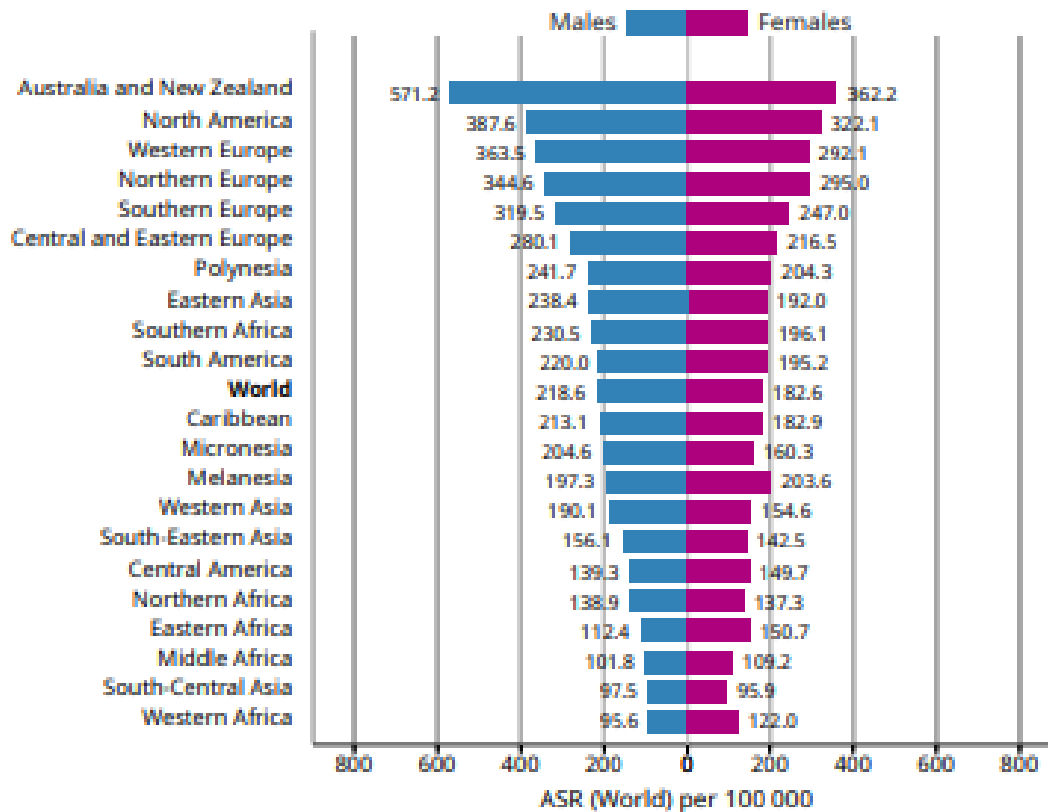


Figura 2. Proporciones estandarizadas según la edad de la incidencia del cáncer a nivel de las diferentes zonas y del mundo en su totalidad, según género masculino (azul) y femenino (violeta) (<https://gco.iarc.fr/>).

En Uruguay, las muertes por cáncer sin tomar en cuenta el género, representan un 26% del total. Siendo antecedidas por las muertes ocasionadas por las enfermedades cardiovasculares, que representan un 28% del total<sup>10</sup>.

Como se puede observar en la Figura 3, la tasa de mortalidad de las personas pertenecientes al género femenino en Uruguay está dentro de la categoría más alta. Esto representa una de las razones por las que es de interés investigar este tipo de cáncer.

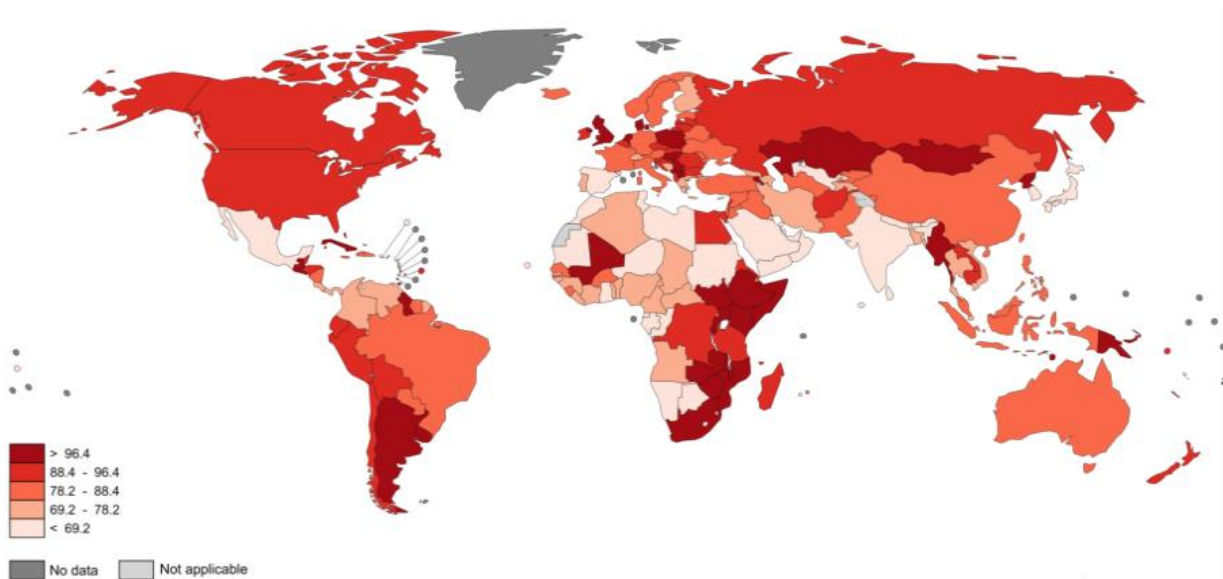


Figura 3. Proporciones de la mortalidad del cáncer en mujeres a nivel internacional. Los números son en base a 100000 habitantes de esa región (<https://gco.iarc.fr/>).

Como se puede observar en las Figuras 4 y 5, la incidencia del cáncer en Uruguay tanto en hombres como en mujeres es relativamente alta (<https://gco.iarc.fr/>).

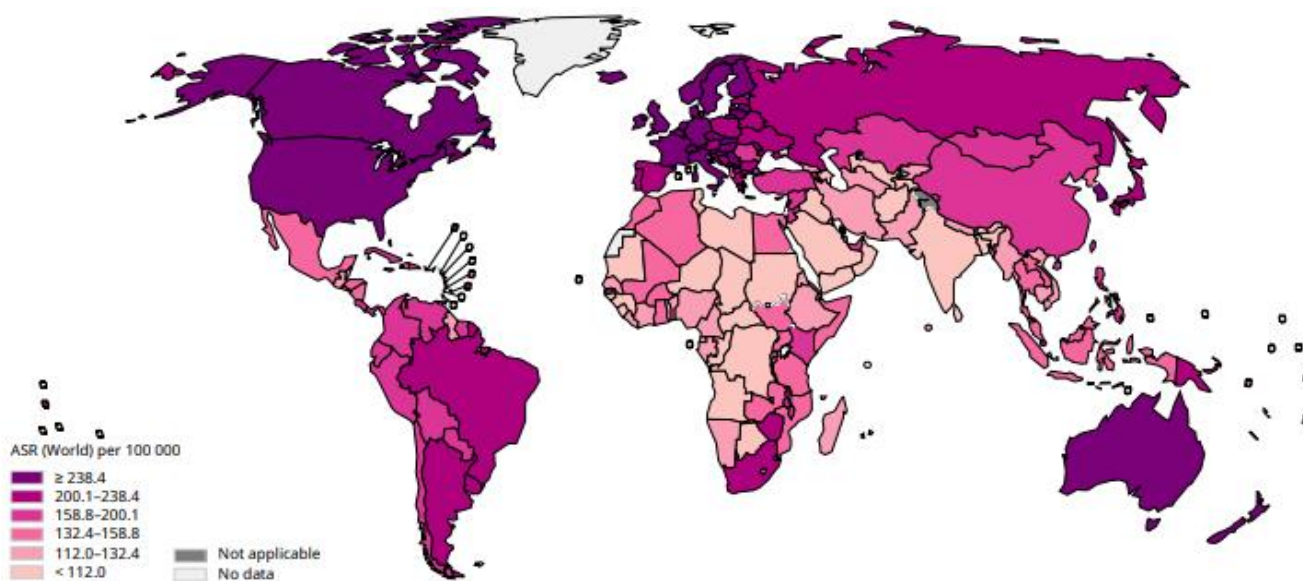


Figura 4. Proporciones de la incidencia del cáncer en mujeres a nivel internacional. Los números son en base a 100000 habitantes de esa región (<https://gco.iarc.fr/>).



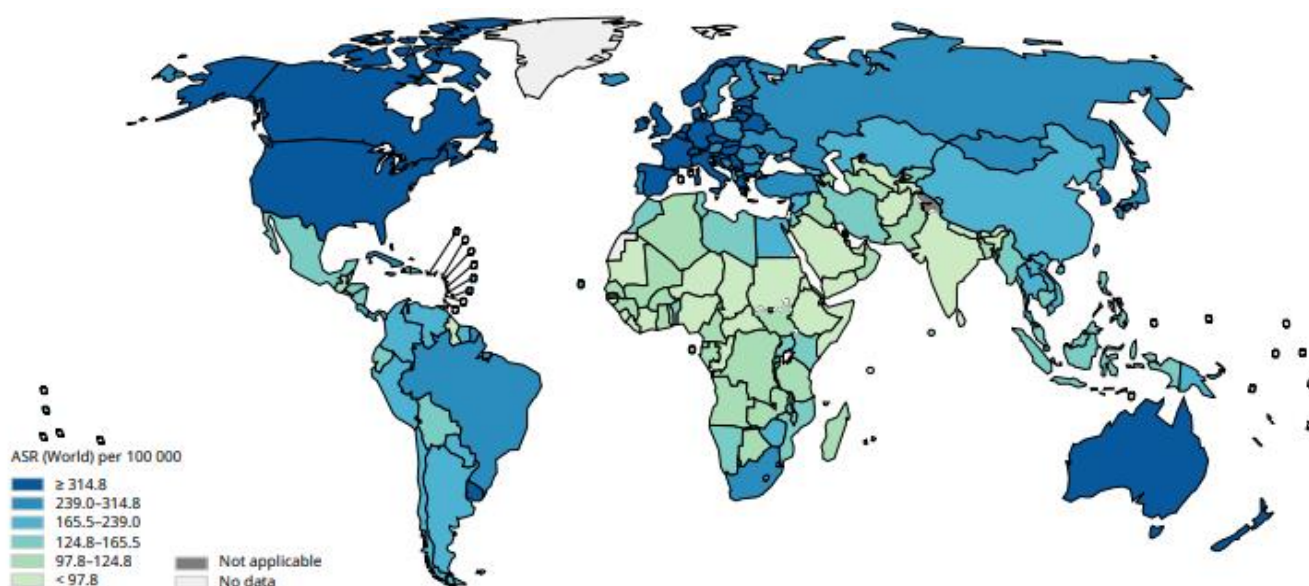


Figura 5. Proporciones de la incidencia del cáncer en hombres a nivel internacional. Los números son en base a 100000 habitantes de esa región (<https://gco.iarc.fr/>).

## 2.5. Modelo de cáncer de mama inducido 4T1

Muchos modelos de cáncer de mama han sido desarrollados para estudiar mecanismos moleculares y la progresión de metástasis, con el fin de generar agentes terapéuticos e imagenológicos<sup>11,12,13,14</sup>. Un tumor mamario generado por una inyección de células tumorales, presenta como grandes ventajas la progresión más acelerada del mismo en el ratón y su fácil seguimiento *in vivo*<sup>15</sup>. En este modelo, las células tumorales son inoculadas en el tejido adiposo mamario. Pasado el tiempo deseado para el estudio, el tumor mamario puede ser extirpado como sucede en el caso del tumor mamario humano. Además nos permitiría estudiar distintos estadios del cáncer de mama, hasta llegar a la metástasis, ya que las células tumorales 4T1 son muy invasivas<sup>16,17,12,18</sup>.

## 2.6. Radiofármacos

Un radiofármaco es una sustancia química que, en su estructura, contiene átomos radiactivos y que por varias de sus características (ya sean su forma farmacéutica, su calidad de la radiación emitida y su cantidad) es adecuada para su administración a seres humanos con objetivos del tipo terapéutico y de diagnóstico<sup>b</sup>. El concepto de dosis absorbida de radiación refleja la energía absorbida por unidad de masa de cualquier material (no necesariamente tejido humano). Este concepto relaciona la energía neta impartida por las radiaciones ionizantes con el volumen de masa determinado al que se le adjudica dicha energía<sup>26</sup>.

Los radiofármacos se pueden clasificar de dos formas: de terapia y de diagnóstico<sup>20</sup>. Por lo general tienen dos componentes en su estructura: el radionucleido emisor de la radiación



(que permite la detección del radiofármaco) y una molécula soporte que se une a dicho radionucleido, y que determinará la distribución del radiofármaco en el organismo<sup>21</sup>.

## **2.7. Radiofármacos de terapia**

El objetivo de este tipo de radiofármacos es destruir a las células causantes de la enfermedad a través de la radiación emitida por los mismos, que son administrados de forma sistémica.

Están formados por tres componentes clave: molécula vector, un radionucleido y una molécula que enlace a ambos. En cuanto al segundo, la dosis de radiación administrada a las células cancerígenas, debe estar directamente asociada a la respuesta radiobiológica. Ésta dependerá de la capacidad de recuperación de cada tejido frente a los daños ocasionados por radiaciones, y a la habilidad de controlar la posible reaparición del tumor. Debido a esto, un determinado nivel de entrega de energía debe superarse para alcanzar la muerte celular. Los radionucleidos de estos radiofármacos deben realizar emisiones beta, aunque también pueden utilizarse emisores alfa.

Los radiofármacos de terapia se basan en la captación selectiva del mismo por parte de un blanco molecular. A este tipo de terapia también se la llama radioterapia molecular dirigida (RMD), que permite la captación selectiva de dosis específicas de radiación a tejidos blanco. La RMD necesita de la administración de dosis de actividad significativamente más altas que en el caso de radiofármacos de diagnóstico.

Para que la RMD sea exitosa, diferentes parámetros físicos, fisiológicos y biológicos deben ser estudiados para optimizar la elección del radionucleido. La misma está esencialmente relacionada con la dosis absorbida de radiación que debe implicar una entrega de dosis de radiación citotóxica, pero, a su vez, evitando la radiación innecesaria a tejidos sanos cercanos<sup>22,23,24,25</sup>.

## **2.8. Radiofármacos de diagnóstico**

Los radiofármacos empleados para diagnóstico contienen en su estructura un radionucleido emisor de radiación unido a una molécula específicamente seleccionada por su comportamiento biológico, que se adecúa para el estudio morfológico y funcional de un órgano o tejido<sup>26,27</sup>. Los elementos radiactivos utilizados, generalmente son de corta vida media que desaparecen del organismo al cabo de horas o días<sup>28</sup>.

Se administran sistémicamente y emiten principalmente rayos gamma y positrones unidos a sus correspondientes ligandos (que ocasiona que se acumule selectivamente en tejido canceroso). Mediante el uso de un dispositivo específico denominado gamma cámara, es posible detectar las emisiones gamma del material radiactivo, creando imágenes de la distribución relativa de la fuente de radiaciones en el organismo. Estas emisiones detectadas se dan por parte de la desintegración espontánea de un núcleo inestable, que da lugar a emisiones de fotones o radiación electromagnética.

Este tipo de radiofármaco debe reunir las siguientes propiedades relacionadas al radionucleido y a la biomolécula marcada: vía de administración específica, mecanismos de

localización, elevada relación órgano blanco/fondo, estabilidad *in vitro* e *in vivo*, una concentración radiactiva específica, actividad específica, vida media efectiva, una determinada energía de emisión y un determinado tipo de emisión radiactiva. Éstas permiten aportar la máxima información diagnóstica con el mínimo de dosis de radiación recibida por el paciente.

Asimismo, es importante mencionar que los radiofármacos de diagnóstico para su posterior uso en humanos requieren una pureza radioquímica (PRQ) mayor al 90%, debido a que un porcentaje menor implicaría una mezcla mayor de distintas especies químicas de radionucleido, lo que disminuye la captación del órgano blanco y aumenta la dosis de radiación a órganos no blancos<sup>29</sup>.

### **2.8.1. Radiofármacos de diagnóstico: el <sup>99m</sup>Tc**

El <sup>99m</sup>Tc es un elemento que se presenta en varios estados de oxidación, rango que se encuentra entre -1 y +7. Está en el grupo entre el Re y el Mn en la tabla periódica. Los tres tienen radios iónicos similares, siendo una de las varias similitudes que presentan. Dadas sus características físicas, química versátil (que puede manipularse para marcar una gran variedad de ligandos) y disponibilidad, es el radioisótopo más ampliamente utilizado en Medicina Nuclear para la generación de radiofármacos de diagnóstico.

Los radiofármacos que contienen <sup>99m</sup>Tc han sido reportados para la evaluación de la función renal, perfusión cerebral, enfermedades óseas, entre otros<sup>30</sup>.

En imagenología SPECT, se ha utilizado ampliamente dadas sus características físicas ideales, tales como su tiempo de vida media corta (aproximadamente de 6 horas) y su emisión de fotones gamma monoenergéticos de 140 keV. El hecho de que tenga un tiempo de vida media corto hace que sea un isótopo óptimo para el marcado, ya que produce un número más alto de desintegraciones en unas pocas horas, para luego alcanzar una velocidad de dosis absorbida mayor<sup>31</sup>. Estas características hacen del <sup>99m</sup>Tc efectivo tanto para la obtención de imágenes, como para la seguridad del paciente. Otro punto importante es que puede ser producido y obtenido fácilmente por un sistema generador de molibdeno-99 y tecnecio-99 metaestable (<sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc)<sup>20</sup>.

Existen dos tipos de generadores: los de columna seca (que son los más utilizados) y los de columna húmeda. Los segundos están constantemente en contacto con suero en su columna, mientras que los primeros únicamente están en contacto con el suero al momento de eluir el <sup>99m</sup>Tc.



Durante este proceso, se puede obtener una mezcla de estados reducidos de  $^{99m}\text{Tc}$ , por lo que es de gran importancia controlar las condiciones de reacción para así obtener el estado de interés en mayor proporción.



Figura 8. Generador de  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99m}\text{Tc}$  que muestra su interior la columna de alúmina y conexiones. En la parte superior se visualizan agujas de entrada y salida de  $^{99m}\text{Tc}$  ([www.medicinanuclear.cl](http://www.medicinanuclear.cl)).

En el preparado final, generalmente pueden encontrarse tres especies radiactivas de  $^{99m}\text{Tc}$ :  $^{99m}\text{Tc}$  libre (en la estructura del  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ), que no ha sido reducido por el agente reductor empleado, impurezas en forma de reducido hidrolizado con un estado de oxidación menor al compuesto de interés, y el radiofármaco de interés marcado con  $^{99m}\text{Tc}$ .

Se deben diseñar metodologías de marcación que aseguren la minimización de las fracciones libres e hidrolizadas para que no interfieran con el procedimiento diagnóstico.

El  $^{99m}\text{Tc}$  se caracteriza por adoptar diferentes configuraciones en su primera esfera de coordinación (“núcleos” o “cores”) <sup>33</sup>.

El  $^{99m}\text{Tc}$  fue seleccionado con fines biomédicos por sus propiedades físicas muy favorables, como las citadas anteriormente. Esto permite una administración de dosis del orden de mCi (mili Curie), sin que sea significativa para el paciente <sup>34</sup>.

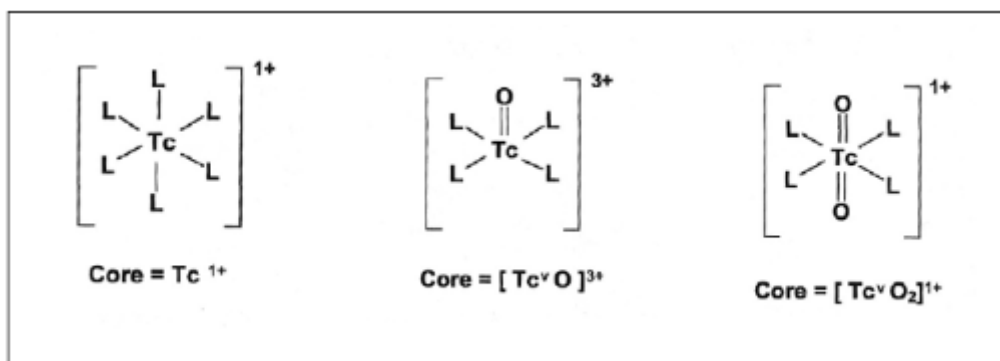


Figura 9. Cores más comunes en complejos de  $^{99m}\text{Tc}$  (Verdera et al, 2009).

A los radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$  se le realizan varios controles para evaluar su calidad como potencial radiofármaco de uso diagnóstico. Entre ellos se encuentra la determinación de la cantidad de radiactividad presente en una preparación, así como también el control del pH, la isotonicidad y la evaluación de su aspecto, para su posible administración vía endovenosa.

Otro tipo de control involucra a la pureza química (PQ) y radioquímica (PRQ). La primera se basa en determinar cuáles son las especies no deseadas, tanto químicas como del radiofármaco<sup>35</sup>. Se refiere al porcentaje de la actividad del radionucleido en la forma química establecida en relación con la actividad total presente del radionucleido, que debe ser igual o mayor al 95%, ya que la calidad de la imagen centellográfica (que se obtiene para observar la biodistribución del radiofármaco), y la dosis absorbida de radiación, están directamente vinculadas con la PRQ. Para su identificación, se utilizan varios métodos analíticos para determinar la PRQ de un determinado radiofármaco<sup>26</sup>. Se mide a través de controles cromatográficos como la cromatografía líquida de alta performance (HPLC), cromatografía Instantánea en Capa Fina, Sílica Gel (ITLC-SG) o por gel permeación. A través de estas técnicas se identificarán las impurezas radioquímicas presentes, como el  $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  y  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  libre en el preparado. Éstos interfieren en la calidad de la imagen y, por ende, en la calidad diagnóstica del radiofármaco si están presentes<sup>35</sup>.

Los radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$  se clasifican en primera, segunda y tercera generación. Los primeros, son fármacos radiomarcados que pueden estar dirigidos a un órgano determinado sin diana molecular específica, o ser utilizados para estudios de procesos fisiológicos. En los segundos, se utiliza un radiometal unido con ligantes con una geometría bien definida. Su biodistribución se establece por sus características fisicoquímicas, como ser carga total, peso molecular, forma y lipofilia. Los terceros, consisten en la marcación de moléculas y biomoléculas con una actividad biológica específica. Son únicos en su capacidad para detectar *in vivo* sitios bioquímicos determinados, tales como receptores y enzimas. Se caracterizan por estar conformados por la biomolécula, el radionucleido y un agente quelante bifuncional. El fragmento bioactivo, sirve como un transportador que lleva al radionucleido al sitio receptor en las células o moléculas blanco. Dada la llegada de la imagenología molecular, fue necesaria la creación de nuevos radiotrazadores de dicha generación que permiten estudios de procesos bioquímicos *in vivo* por métodos que no son invasivos, marcando ligandos biológicos<sup>36,37</sup>.

### **2.8.2. Estrategias de marcación con $^{99m}\text{Tc}$**

Se conocen diferentes estrategias para formar radiofármacos marcados con  $^{99m}\text{Tc}$  que estén dirigidos a blancos moleculares. Las más importantes son el enfoque integrado y el uso de agentes quelantes bifuncionales (radiofármacos de tercera generación)<sup>38</sup>.

- Enfoque integrado: Consiste en reemplazar un fragmento de ligando por un quelante que no es natural, que da lugar a alteraciones mínimas en la conformación, el tamaño y la afinidad por el receptor<sup>39</sup>.

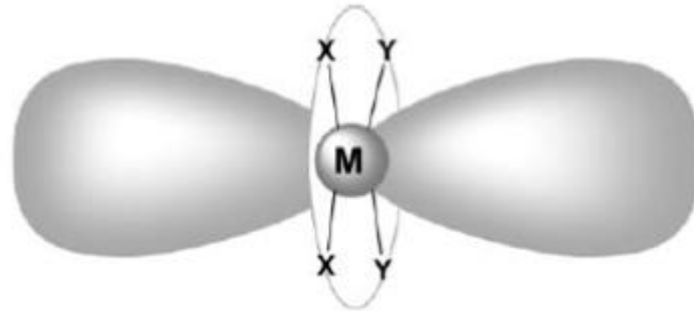


Figura 10. Esquema de enfoque integrado (Liu, 2004).

- Estrategia de agentes quelantes bifuncionales (AQB): Se utiliza una biomolécula que posee afinidad por un receptor blanco que sea capaz de unirse a ésta y coordinar, a su vez, un metal. Este AQB tiene pares de electrones libres para la quelación del radioisótopo y un segundo grupo funcional reactivo que puede unirse covalentemente a la biomolécula, formando lo que se denomina “bioconjugado”. Es opcional el uso de un espaciador o linker, y se utiliza únicamente en casos que se quiera preservar el sitio bioactivo o cuando se quiera modificar las propiedades farmacocinéticas. Esta es una de las estrategias más utilizadas en la actualidad, debido a que ofrece la posibilidad de elegir el agente bifuncional, así como también por su carácter de conservación de las propiedades de reconocimiento de la molécula vector. Algunos de los agentes quelantes bifuncionales más utilizados son el anhídrido cíclico del ácido dietiléntriaminopentaacético (DTPA) y el HYNIC<sup>38,40,41</sup>.



Figura 11. Esquema del enfoque bifuncional (Liu, 2004).

## 2.9. Renio (Re) como herramienta biomédica

El Re se encuentra en el grupo VIIB y es un metal de transición que se encuentra en tercera fila y está estrechamente vinculado con los metales que se encuentran en dicho grupo, como el Manganeso y el Tecnecio. El isótopo <sup>99m</sup>Tc de éste y el Renio han sido los principales

exponentes de la medicina nuclear por más de medio siglo<sup>42-44</sup>. El Re posee varios estados de oxidación, que van desde el -1 hasta el +7; y un número de coordinación elevado<sup>45-49</sup>.

El <sup>188</sup>Re es un candidato particularmente atractivo para ser utilizado como radionucleido terapéutico, dado que es un emisor  $\beta^-$ . Posee propiedades ideales, tales como: tiempo de semidesintegración de 16,9 horas, energía máxima de emisiones  $\beta$  correspondiente a 2,12 MeV, energía máxima de emisiones  $\gamma$  de 155 keV (las cuales representan únicamente un 15% de las emisiones totales) y su disponibilidad con una alta actividad dado el modo de producción de su generador<sup>42-44</sup>. El Re es capaz de formar complejos con una variedad muy amplia de ligandos y AQB<sup>45-49</sup>. Para efectuar estudios estructurales, el <sup>185</sup>Re “frío” se utiliza como un homólogo del <sup>99m</sup>Tc radiactivo para identificar sus características químicas, basado en similitudes que presentan estas dos especies al formar un complejo<sup>50</sup>. Existen dos isótopos potencialmente útiles a nivel terapéutico, el <sup>186</sup>Re y el <sup>188</sup>Re. <sup>188</sup>Re es producido con actividad específica elevadas, debido al modo de producción, mientras que <sup>186</sup>Re es producido mediante un reactor y con baja actividad específica<sup>51</sup>.

En términos de tiempo de semidesintegración, el de <sup>188</sup>Re es de aproximadamente 17 horas, mientras que el de <sup>186</sup>Re es mayor. Basado en similitudes químicas y la disponibilidad de isótopos no radiactivos, el Renio ha sido utilizado como sustituto del <sup>99m</sup>Tc. Generalmente da lugar a la producción de complejos con características físicas y propiedades de biodistribución similares a aquellos que contienen <sup>99m</sup>Tc, y, generalmente, se utiliza como una opción no radiactiva para síntesis a gran escala y caracterización estructural<sup>52</sup>.

Por el otro lado, los radiofármacos marcados con <sup>99m</sup>Tc son útiles como modelo para preparar radiotrazadores con <sup>186</sup>Re y <sup>188</sup>Re, utilizando métodos de marcación similares. A pesar de sus similitudes, existen grandes diferencias entre los mismos, particularmente relacionadas a la cinética de sus reacciones y sus comportamientos redox. El ión perrenato es mucho más difícil de reducir que el ión pernectato, lo cual es de gran importancia ya que éste último es el que se obtiene a partir de los generadores. Las razones por las cuales el <sup>188</sup>Re no se utiliza ampliamente como radiofármaco puede ser su rica y compleja química, además de la escasa disponibilidad del mismo con carácter farmacéutico<sup>53-56</sup>.

## 2.10. Derivados de fenazina

Los heterociclos *N*-óxidos son una interesante clase de citotoxinas antitumorales que matan selectivamente células hipóxicas en tumores sólidos<sup>51</sup>. Uno de los compuestos reportados que lidera este grupo es la Tirapazamina, debido a su actividad selectiva en hipoxia<sup>52</sup>. Ésta posee dicha capacidad dada la bio-reducción monoelectrónica que forma una prodroga radical intermedia sensible al oxígeno. En condiciones hipóxicas, el tiempo de vida extendido de dicho radical permite su conversión a una molécula altamente dañina para el ADN a través de mecanismos de “desoxigenación” que involucran la pérdida de un oxígeno en uno de sus grupos *N*-óxido. En un principio, teniendo en cuenta su mecanismo de acción, se observó que ésta actuaba selectivamente en condiciones de hipoxia. A partir de este punto se comenzó la búsqueda de otras moléculas alternativas del mismo grupo, que derivó a investigaciones relacionadas con las fenazinas<sup>53</sup>. Es así que nuestro grupo de investigación ha estado

investigando y desarrollando diversas estrategias, con el fin de actuar selectivamente en diversos modelos tumorales para su erradicación<sup>54,55,56</sup>.

En ausencia de oxígeno, los derivados de fenazina son capaces de activarse y transformarse en especies citotóxicas a nivel de los tejidos hipóxicos tumorales. Por esta razón, han sido desarrollados como agentes antitumorales selectivos<sup>57</sup>. En lo que respecta a su estructura, presenta un farmacóforo que interactúa con ADN de forma no covalente, posterior a su biorreducción por acción de las enzimas reductasas sobre expresadas en condiciones de hipoxia.

En su estructura, la Fenazina posee esencialmente 3 heterociclos alifáticos con 2 *N*-óxidos en el anillo central<sup>1,58,59</sup>.

Se han descrito diversos compuestos que poseen un *N*-óxido en su estructura que pueden dañar a las células hipóxicas, ya que interactúan directamente con el ADN o con biomoléculas asociadas a éste. Dichos compuestos pueden ser *N*-óxidos aromáticos y alifáticos, quinonas, nitroaromáticos y compuestos organometálicos<sup>58</sup>.

Lo expresado anteriormente brinda la posibilidad de tratar tumores sólidos y la metástasis. Las especies citotóxicas producidas por los compuestos antedichos son capaces de difundirse, matando a las células tumorales que rodean el *core* hipóxico. Una vez que los *N*-óxidos de fenazina están en condiciones de hipoxia, son reducidos, dando lugar a un compuesto intermedio con radicales libres. Éste induce a la formación de radicales libres OH·, que son capaces de producir la fragmentación de ADN<sup>57</sup>.

## 2.11. Medicina nuclear e Imagenología molecular

En la medicina nuclear diagnóstica se inyectan ciertas sustancias emisoras de radiaciones ionizantes a organismos seleccionados para su estudio. Pueden encontrarse en la forma de compuestos químicos simples o radiofármacos. En éstos, las sustancias emisoras están unidas a una molécula farmacológicamente activa.

El objetivo de la imagenología molecular es monitorear de forma no invasiva las células *in vivo*, específicamente, los procesos biológicos que ocurren a nivel celular y molecular. Esto se logra combinando diferentes herramientas utilizadas en ciertas disciplinas tales como: biología molecular, farmacología, biología celular básica y otras<sup>60,61</sup>.

Algunos mecanismos de imagenología nuclear, tales como los escaneos de Tomografía de Emisión de Positrones (PET) y Tomografía de Emisión de Fotón Único (SPECT), utilizan trazadores moleculares marcados radiactivamente para crear imágenes funcionales de la fisiología y la bioquímica del organismo<sup>62,63</sup>. Las modalidades de diagnóstico por imagenología nuclear tienen un rol muy importante en los estudios de enfermedades en humanos y en el desarrollo de nuevos tratamientos<sup>64</sup>.



## 3. Antecedentes

### 3.1. N-óxido de FNZ

Un gran número de moléculas que poseen un grupo *N*-óxido en su estructura y la capacidad de bio-reducirse, han sido estudiadas<sup>65,66,67,68</sup>. Éstas pueden ser formadas por la adición de un átomo de oxígeno al único par de electrones libre que se encuentra en un átomo de nitrógeno<sup>69</sup>.

En los tumores sólidos hay sobre-expresión de ciertas enzimas con capacidad reductasa en las zonas hipóxicas, que favorece la biorreducción del grupo *N*-óxido<sup>70</sup>. Éste da lugar a las citotoxinas con capacidad selectiva en hipoxia, que pueden reducirse vía uno o dos electrones. Cuando ésta es vía un único electrón, se genera el radical nitróxido, que es capaz de producir daño a nivel del ADN<sup>66</sup>. En cambio, cuando la reducción es a través de dos electrones, el producto obtenido es una amina aromática. Ésta puede protonarse a pH fisiológico, que es favorecido por la acidez del microambiente generado en las células tumorales (ver Figura 12). La carga positiva que ahora posee la molécula, hace que sea más afín al ADN y genera una baja de su lipofilia y de la solubilidad de la bicapa lipídica. Dos factores que aseguran la selectividad hacia el tejido no sano son, por un lado, el aumento en la afinidad por el ADN, y por otro el impedimento de atravesar la bicapa lipídica<sup>69</sup>.

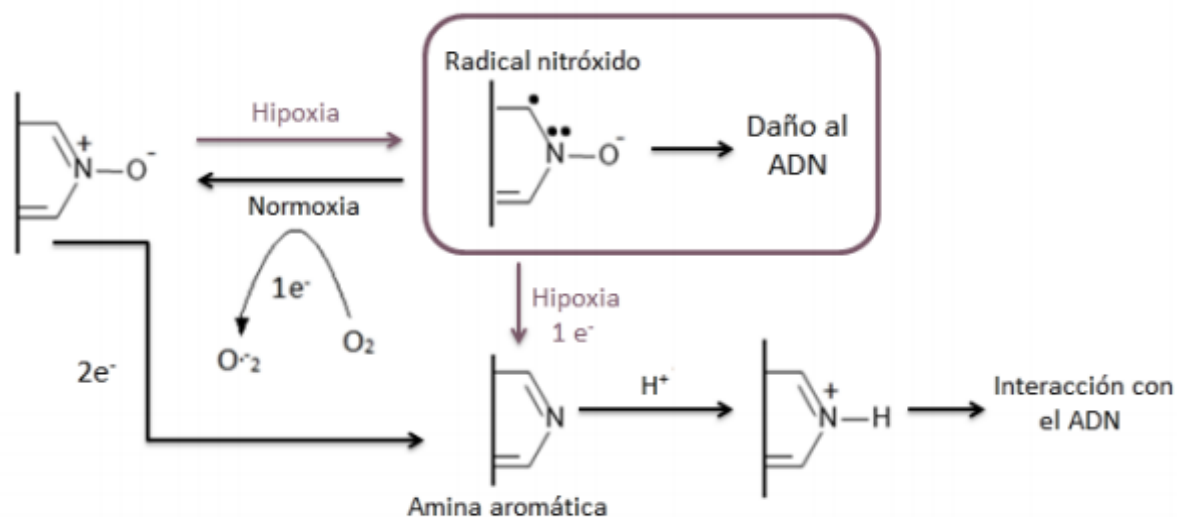


Figura 12. Esquema que representa la bio-reducción de *N*-óxidos aromáticos. Imagen obtenida de Cerecetto, H. y col. (2006).

Se han desarrollado muchos agentes anti-tumorales que tienen como principal mecanismo de citotoxicidad intercalarse entre las bases del ADN, generando daño. Entre éstos, se encuentran la Tirapazamina y la Mitoxantrona<sup>71</sup>. Estructuralmente estos compuestos tienen similitud en el cromóforo plano que contienen, que es representado por un sistema aromático de tres anillos que permite intercalarse entre las bases nitrogenadas<sup>72,73</sup>. Esta

intercalación implica que el sistema cromóforo poli-aromático plano se inserte entre los pares de bases de la doble hélice de ADN, favorecido por las interacciones de apilamiento<sup>74</sup>.

El Laboratorio de Química Orgánica Medicinal ha reportado el desarrollo de varias series diferentes de compuestos derivados de *N*-óxido que pueden actuar como potenciales agentes bio-reducibles<sup>75-88</sup>. De éstos, los que resultan de mayor relevancia son aquellos derivados de *N,N'*-dióxido de FNZ, debido a su carácter híbrido: tienen la capacidad de intercalarse entre las bases del ADN y en hipoxia, tienen citotoxicidad selectiva<sup>75,84-86</sup>. Al igual que la tirapazamina, este sistema de anillos presenta dos grupos *N*-óxido, que tienen la capacidad de reducirse fácilmente en condiciones de hipoxia y dar lugar a la formación de pro-fármacos bio-reducibles.

Los derivados de *N,N'*-dióxido de FNZ tienen aspectos comunes con la Mitoxantrona, ya que presentan un anillo tricíclico (Figura 13, región en amarillo) que le otorga la capacidad de intercalarse al ADN de forma irreversible, impidiendo la acción de las enzimas topoisomerasas, responsables de la síntesis y reparación del ADN. Teniendo en cuenta las características y las ventajas antedichas de la FNZ es que resulta apropiada su elección para el presente trabajo.

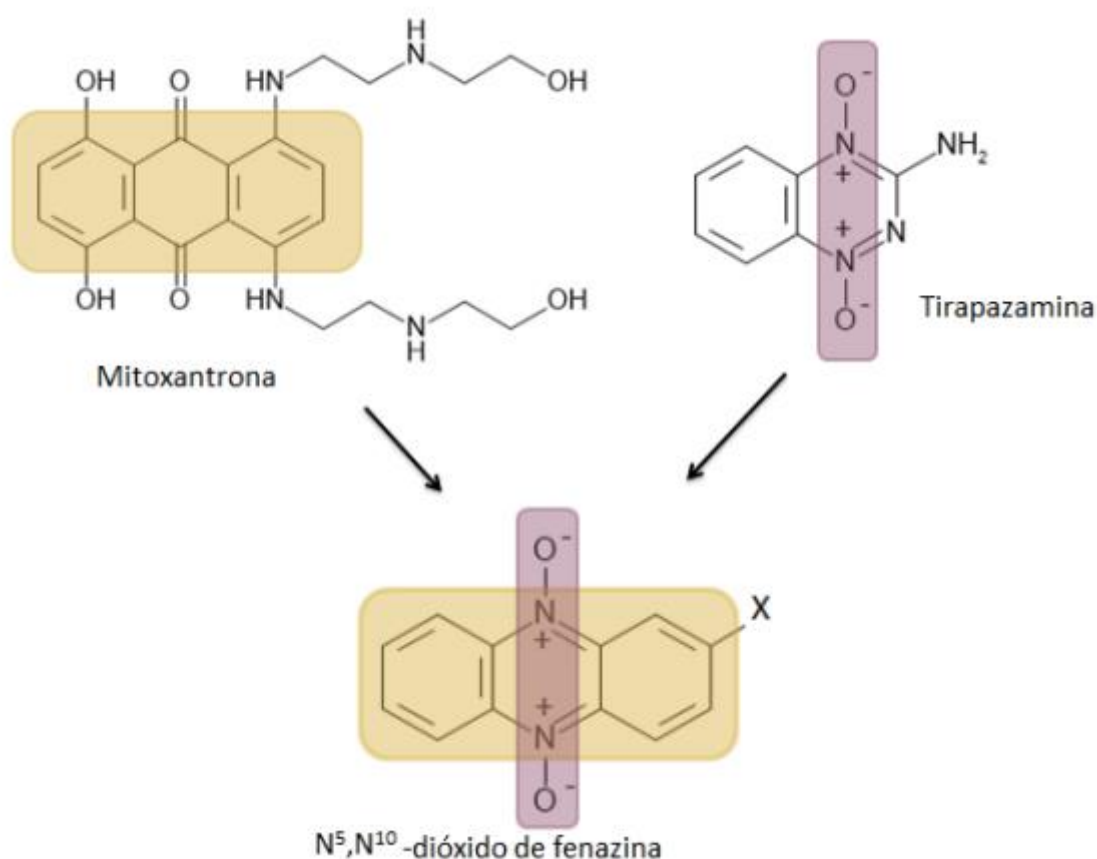


Figura 13. Diseño de un potencial pro-fármaco bio-reducible utilizando dos fármacos ya descritos, potenciando así su actividad citotóxica en condiciones de hipoxia tumoral. Extraído de la Tesina de posgrado de Lavaggi, M.L. (2009)<sup>89</sup>.

## 4.Objetivos

### 4.1.Objetivo general

Evaluar un nuevo agente imagenológico a través de la marcación del  $N^5,N^{10'}$ -dióxido de FNZ con un agente radiactivo ( $^{99m}\text{Tc}$ ) como potencial radiofármaco de diagnóstico oncológico en modelo de cáncer de mama inducido con células 4T1 en un modelo de ratón Balb/c.

### 4.2.Objetivos específicos

- Sintetizar el complejo  $N^5,N^{10'}$ -dióxido de FNZ- $^{185}\text{Re}$ .
- Optimizar el método de incorporación del agente radiactivo ( $^{99m}\text{Tc}$ ) a la molécula de  $N,N'$ -dióxido de FNZ, control de calidad y estabilidad de FNZ- $^{99m}\text{Tc}$ .
- Estudio *in vivo* de la biodistribución del radiofármaco en ratones portadores de tumor mamario murino 4T1.
- Estudio de biodistribución *in vivo* por imagen centellográfica, que permitirá analizar si estamos frente a un potencial agente de imagen.

## 5. Materiales utilizados

### Síntesis de N5,N10-dióxido de 2-amino-7(8)-fluorofenazina (FNZ)

Los materiales utilizados para la síntesis de FNZ fueron: 4-fluoro-2-nitroanilina, hidróxido de sodio, hipoclorito de sodio, metanol, ácido clorhídrico, agua destilada, el 5-fluorobenzofuroxano obtenido en una etapa previa (Bfx), p-aminofenol (P-AF), trietilamina, N, N-dimetilformamida (DMF), éter de petróleo (EP), n-hexano, acetato de etilo (AcEt), buffer fosfato 2 mM de pH 2,5 al 1% de etanolamina, sodio fosfato dibásico, sodio fosfato monobásico, nitrógeno gaseoso (N<sub>2</sub>(g)), dimetilsulfóxido (DMSO), agua milliRo, papel indicador de pH, papel ITLC, placas de cromatografía en capa fina (TLC), placas de sílica, sistema de reflujo, embudos, papel de filtro, balones (100 mL), matraces (250 mL), baño de aceite, termómetro, columna cromatográfica C18 (30 cm, partícula 10 µm, marca Restek), heladera con freezer, bomba de vacío (Buchi), agitador magnético con placa calefactora (Labotecgroup, modelo 925), Cromatografía líquida de alta resolución, HPLC (UV-Visible), del inglés, *High-performance liquid Chromatography* (Agilent 1200 Series Infinity Star, Santa Clara, EEUU), espectrometría de resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H (equipo BRUKER DPX-400 (400MHz)), balanza analítica (Schmadzu, modelo AUX 220), Liofilizador (Labconco Lymph Lock 6 y L05, F.i.c, Scientific Instrumental Manufacturing, Buenos Aires, Argentina).

### Síntesis del complejo Tc(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>

Los materiales utilizados para la síntesis del complejo Tc(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub> fueron: eluido fresco de <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>, disolución acuosa de HCl 0,1 M, buffer fosfato 2 mM de pH 2,5 al 1% de etanolamina, MeOH, disolución de MeOH y HCl 6N, DMSO, kit Tricarbonilo Isolink (Mallinckrodt, EEUU), papel indicador de pH, papel Whatman 1, papel de alúmina, tijeras, columna cromatográfica C18 (30 cm, partícula 10 µm, marca Restek), agitador magnético con placa calefactora (Labotecgroup, modelo 925), Cromatografía líquida de alta resolución, HPLC (UV-Visible), del inglés, *High-performance liquid Chromatography* (Agilent 1200 Series Infinity Star, Santa Clara, EEUU), Equipo ORTEC: contador de centelleo sólido con detector de cristal NaI (TI) "3x3" asociado con un analizador de canal único analizador monocanal, (ORTEC, Oak Ridge, TN), balanza analítica (Schmadzu, modelo AUX 220). Se utilizaron generadores de <sup>99</sup>Mo-<sup>99m</sup>Tc de TecnoNuclear (Argentina).

### Síntesis del complejo FNZ-<sup>99m</sup>Tc

Los materiales utilizados para la síntesis de dicho complejo fueron: MeOH, HCl (utilizados como fase móvil), DMSO, eluido fresco de <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>, fase móvil MeOH:HCl 6N, Tc(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O), FNZ, kit Tricarbonilo Isolink (Mallinckrodt, EEUU), papel Whatman 1, papel de alúmina, jeringa Hamilton, papel indicador de pH, eppendorfs, micropipeta p1000, columna cromatográfica C18 (30 cm, partícula 10 µm, marca Restek), Equipo ORTEC: contador de centelleo sólido con detector de cristal NaI (TI) "3x3" asociado con un analizador de canal único analizador

monocanal, (ORTEC, Oak Ridge, TN), Cromatografía líquida de alta resolución, HPLC (UV-Visible), del inglés, *High-performance liquid Chromatography* (Agilent 1200 Series Infinity Star, Santa Clara, EEUU), placa calefactora, centrífuga, espectrómetro de resonancia magnética nuclear (equipo BRUKER DPX-400 (400MHz)), balanza analítica (Schmadzu, modelo AUX 220). Se utilizaron generadores de  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc}$  de TecnoNuclear (Argentina).

## Seguimiento de estabilidad del marcado

Los materiales utilizados para el seguimiento de estabilidad del producto marcado fueron: DMSO, complejo  $\text{FNZ-Tc}(\text{CO})_2(\text{H}_2\text{O})_n$ , jeringa Hamilton, columna cromatográfica C18 (30 cm, partícula 10  $\mu\text{m}$ , marca Restek), Cromatografía líquida de alta resolución, HPLC (UV-Visible), del inglés, *High-performance liquid Chromatography* (Agilent 1200 Series Infinity Star, Santa Clara, EEUU).

## Estudio de lipofilia (Log P)

Los materiales utilizados para el estudio de lipofilia fueron: el complejo formado  $\text{FNZ-Tc}(\text{CO})_2(\text{H}_2\text{O})_n$ , n-octanol, PBS, eppendorfs, micropipeta p1000, vórtex, centrífuga, Equipo ORTEC: contador de centelleo sólido con detector de cristal NaI (TI) "3x3" asociado con un analizador de canal único analizador monocanal (ORTEC, Oak Ridge, TN).

## Ensayo de competencia con histidina

Los materiales utilizados para el ensayo de competencia con histidina fueron: el complejo formado complejo  $\text{FNZ-Tc}(\text{CO})_2(\text{H}_2\text{O})_n$ , disoluciones de concentraciones 0,1 mM y 1 mM de histidina, DMSO, acetonitrilo, eppendorfs, jeringa Hamilton, columna cromatográfica C18 (30 cm, partícula 10  $\mu\text{m}$ , marca Restek), agitador magnético con placa calefactora (Labotec group, modelo 925), HPLC UV-Visible: Cromatografía líquida de alta resolución, del inglés, *High-performance liquid Chromatography* (Agilent 1200 Series Infinity Star, Santa Clara, EEUU).

## Ensayo de unión a proteína

Los materiales utilizados para el ensayo de unión a proteína fueron: Complejo  $\text{FNZ-}^{99\text{m}}\text{Tc}$  purificado del HPLC, suero fetal bovino, acetonitrilo, agitador magnético con placa calefactora (Labotecgroup, modelo 925), centrífuga, Equipo Ortec: contador de centelleo sólido con detector de cristal NaI (TI) "3x3" asociado con un analizador de canal único analizador monocanal (ORTEC, Oak Ridge, TN).

## Ensayo de biodistribución del complejo $\text{FNZ-}^{99\text{m}}\text{Tc}$

Los materiales utilizados para la realización del ensayo de biodistribución fueron: Cloruro de sodio (NaCl) (Fluka-Garantie, EE.UU.), PBS, recipientes para biodistribución (15 mL), jeringas 25G de 1mL, ratones hembras Balb/c de 6-8 semanas, obtenidos del bioterio URBE, Facultad de medicina, UdelaR. El número de protocolo utilizado es el aprobado de nombre CHEA-UdelaR 240011-002249-15. Kit Tricarbonilo Isolink (Mallinckrodt, EEUU), balanza analítica (Schmadzu, modelo AUX 220), Equipo ORTEC: contador de centelleo sólido con detector de

cristal NaI (TI) "3x3" asociado con un analizador de canal único analizador monocanal, (ORTEC, Oak Ridge, TN), Liofilizador (Labconco Lyph Lock 6 y L05, F.i.c, Scientific Instrumental Manufacturing, Buenos Aires, Argentina), Cromatografía líquida de alta resolución, HPLC (UV-Visible), del inglés, *High-performance liquid Chromatography* (Agilent 1200 Series Infinity Star, Santa Clara, EEUU). Se utilizaron generadores de  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc}$  de TecnoNuclear (Argentina).

El avance del radiomarcado y la calidad del producto fueron seguidos por radio detección de TLC (ITLC) en tiras de gel de sílice (Pall Corporation, Port Washington, NY) y por cromatografía HPLC de fase inversa (RP-HPLC) (Agilent 1200 Series Infinity Star, Santa Clara-EE.UU.) con una columna cromatográfica C18 (30 cm, partícula 10  $\mu\text{m}$ , marca Restek) y se analizó por detecciones UV y gamma.

Todos los disolventes empleados fueron de calidad analítica y se emplearon sin ningún otro tipo de purificación.

El agua fue purificada y desionizada (18 M $\Omega$ /cm $^2$ ) en un sistema de filtración de agua Milli-Q (Millipore Corp., Milford).

## Estudio preliminar de la formación del complejo FNZ- $^{185}\text{Re}$ , mediante caracterización por HPLC

Los materiales utilizados para la síntesis de dicho complejo fueron: FNZ sintetizada previamente, bromuro de pentacarbonilo de renio, tolueno, dietil éter, acetona, buffer fosfato 2 mM de pH 2,5 al 1% de etanolamina, sodio fosfato dibásico, sodio fosfato monobásico, agua milliRo, Et $_3$ N, MeOH, DMSO, N $_2$ (g), alúmina, placa cromatográfica C18, matraces (250 mL), balones (100 mL), contenedor (para el baño de aceite), sistema de reflujo, columna cromatográfica C18 (30 cm, partícula 10  $\mu\text{m}$ , marca Restek), agitador magnético con placa calefactora (Labotecgroup, modelo 925), evaporador rotatorio (Buchi R-114), Cromatografía líquida de alta resolución, HPLC (UV-Visible), del inglés, *High-performance liquid Chromatography* (Agilent 1200 Series Infinity Star, Santa Clara, EEUU), espectrómetro de resonancia magnética nuclear (equipo BRUKER DPX-400 (400MHz)), balanza analítica (Schmadzu, modelo AUX 220)

## Estudio por microscopía electrónica de barrido del complejo FNZ- $^{185}\text{Re}$

Los materiales utilizados para la realización de este ensayo fueron: complejo FNZ- $^{185}\text{Re}$ , Microscopio electrónico de barrido equipo Scanning Electron Microscopy (JEOL JSM-5900-LV), balanza analítica (Schmadzu, modelo AUX 220). La técnica utilizada fue "energy dispersive spectrometry", la sonda es "Ultra Dry" de Thermo Scientific, y el software empleado para el procesamiento es "NSS 2.3 X-Ray Microanalysis". La muestra fue recubierta con oro.

## 6. Métodos

### 6.1. Síntesis de la FNZ

La síntesis de FNZ se hizo siguiendo el protocolo descrito por Lavaggi y cols. (2015), y se incluyeron algunas modificaciones. El intermediario se sintetiza solubilizando 1,0 g de 4-fluoro-2-nitroanilina en 71,4 mL de MeOH en un balón por 10 minutos en agitación constante, utilizando un baño de hielo. Luego, se agregan 10,7 mL de disolución acuosa de NaOH 50% e inmediatamente se agregan 42,85 mL de NaClO (100 g/L) con pipeta, estando el sistema de reacción en agitación vigorosa (200 rpm). Posteriormente, se agregan 31 mL de disolución acuosa de HCl 50%, hasta alcanzar un pH de 5,5 o 6, que se controla utilizando papel indicador de pH. Una vez que se ha alcanzado este valor de pH, se procede a realizar una TLC del sistema de reacción para corroborar la formación del producto de interés. A continuación se filtra el sistema de reacción a vacío, lavando lo filtrado 3 o 4 veces con 5 mL de AcEt. Previamente el pH fue disminuido con el HCl debido a que provoca la solubilización del Bfx 1.1, que, luego del filtrado, pasaría a estar en las Aguas Madre (AM) y no en el sólido obtenido. Por esta razón es que se proceden a evaporarlas a vacío.

Finalmente, se deja el balón secando en el desecador y se raspa el sólido obtenido, que representa a Bfx 1.1. Se procede a la síntesis siguiente sin mayor caracterización ni pasos de purificación. En la tabla que figura a continuación se encuentran las proporciones de los reactivos utilizados para la síntesis de Bfx 1.1.

Tabla 1. Proporciones de reactivos de la reacción de síntesis de Bfx 1.1.

Reactivos	m (g)	V (mL)
4-fluoro-2-nitroanilina	1,0	-
Disolución acuosa de NaOH (50%)	-	10,7
NaClO	-	42,85
MeOH	-	71,4
Disolución acuosa de HCl (50%)	-	31

Una vez sintetizado el Bfx 1.1, se procede a sintetizar la FNZ. Para ello, se utiliza Bfx 1.1, paraaminofenol (P-AF), trietilamina ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) y dimetilformamida (DMF). La relación molar en la reacción es de 1:0,8:1 entre Bfx 1.1, el P-AF y el  $\text{Et}_3\text{N}$ , respectivamente. Para realizar dicha síntesis, se agrega a un balón: 1,0 g de Bfx 1.1, 0,5662 g de P-AF y 1,6 mL de DMF en baño de hielo y se coloca este sistema de reacción en atmósfera de  $\text{N}_2$ . Se deja reaccionando en agitación constante por 10 minutos y se procede a agregar 0,9 mL de  $\text{Et}_3\text{N}$ . En diferentes puntos de la reacción, se controla por TLC para verificar el avance de la misma, y evidenciar la formación del producto de interés. Se deja reaccionando 30 minutos y se retira el baño de hielo. Se deja en agitación constante a temperatura ambiente por 24 h y posteriormente se coloca en el freezer (a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) por otras 24 h. Finalmente, se filtra a vacío y se controla por TLC para verificar que se haya formado el producto deseado. El cuadro de reacción aquí mencionado puede visualizarse en la Tabla 2.

Tabla 2. Proporciones de reactivos de la reacción de síntesis del intermediario

Reactivos	m (g)	n (mol)	PM (g/mol)	V (mL)	PMP
Bfx	1,0	$6,49 \times 10^{-3}$	154	-	1
P-AF	0,5662	$5,19 \times 10^{-3}$	109	-	0,8
Et <sub>3</sub> N	-	$6,49 \times 10^{-3}$	101,2	0,9	1
DMF	-	-	-	1,6	-

Posterior a la síntesis, el producto obtenido se caracteriza por HPLC con un patrón de FNZ (concentración 1 mg/mL en DMSO). Esta cromatografía se obtuvo luego de hacer optimizaciones en la concentración del Buffer Fosfato utilizando una columna C18 (Restek) como fase estacionaria, buffer fosfato 2mM con pH 2,5 al 1% de etanolamina (A) y MeOH (B) como fases móviles, inyectando 25  $\mu$ L utilizando jeringa Hamilton. El gradiente utilizado es el que se puede observar en la Tabla 3.

## 6.2. Síntesis del complejo $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$

Esta síntesis se realiza utilizando el Kit Isolink, según los siguientes pasos: se agrega 1 mL de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  de actividad =  $18,50 \pm 3,18$  mCi (n=4) al Kit comercial Tricarbonilo Isolink® y se agita por 1 minuto. Posteriormente, se calienta la solución obtenida a 100°C durante 30 minutos. Luego se deja enfriar y se ajusta el pH de la disolución a 7-8 utilizando 1130  $\mu$ L de una disolución acuosa de HCl 0,1 M. El control se realiza por HPLC (con columna C18 Restek de 10 $\mu$ m de poro y 30 cm de largo) utilizando un gradiente como el que se observa en la Tabla 3. Se debe considerar que el buffer fosfato 2mM de pH 2,5 al 1% de etanolamina es A y el MeOH es B, y los porcentajes de A y B van variando dentro de cada rango temporal.

Tabla 3. Gradiente de las corridas de HPLC

Rango de tiempo (minutos)	Porcentaje de A	Porcentaje de B
0-3	100	0
3-6	75	25
6-9	66	34
9-20	30	70
20-33	0	100
33-38	100	0

Se inyectaron 25  $\mu$ L de la disolución de marcado. Se hace también un control por 2 sistemas cromatográficos: en papel Whatman 1 y en capa fina con base de alúmina. Como fase móvil se utilizó MeOH:HCl 6N en proporción 99,5:0,5 para ambos sistemas. En las dos cromatografías utilizadas, los R<sub>f</sub> son diferentes. Estas diferencias se hacen claras al observar la Tabla 4 a continuación:



Tabla 4. Rf de varias moléculas en los sistemas cromatográficos Whatman 1 y TLC

Moléculas	Rf en Whatman 1 (cm)	Rf en TLC (cm)
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	0,5	0,57
$\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$	0,52	0,1
$^{99m}\text{TcO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	0	0

Luego de la elución se cortan las tiras cromatográficas de 1 cm de largo a las que se les mide la actividad en el contador de centelleo sólido de pozo "ORTEC". Se puede analizar la eficacia de la marcación y formación del complejo  $\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$  utilizando los siguientes métodos: el HPLC y las cromatografías en placas.

### 6.3.Síntesis del complejo FNZ- $^{99m}\text{Tc}$

Una vez obtenido el complejo  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$ , se marca la molécula de FNZ. Luego de ensayar marcaciones con actividades específicas diferentes (4,50-5,63mCi), se obtiene que la mejor fue de  $4,88 \pm 0,38$  mCi (n=6). Para ello se agregan 4,88 mCi del complejo  $\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$  a 300 $\mu\text{L}$  de FNZ, que se dejan incubando a 70 °C por 30 minutos.

Se le realiza un control de pH al complejo FNZ- $^{99m}\text{Tc}$ , procedido de la marcación de la FNZ por los mismos métodos que se utilizaron anteriormente: HPLC y cromatografía en placa. En el HPLC se inyectan 30  $\mu\text{L}$  de una mezcla con actividad  $4,10 \pm 0,01$  mCi (n=2).

También se realiza una corrida de HPLC para el  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , en la que se inyecta 10  $\mu\text{L}$  para ver el tiempo de retención correspondiente a esta posible impureza.

En las cromatografías en placa se utiliza la misma fase móvil de MeOH:HCl 6N en proporción 99,5:0,5 y se mide la actividad en el contador de centelleo sólido de pozo "ORTEC". Estos resultados se analizan en conjunto (cromatografía y HPLC) para verificar la eficacia y evaluar la PRQ del complejo FNZ- $^{99m}\text{Tc}$  obtenido.

### 6.4.Seguimiento de estabilidad del marcado en la mezcla de reacción

Se optimiza la marcación, y se realiza un seguimiento de su estabilidad durante 24 horas a través de la cromatografía HPLC del complejo formado desde su síntesis.

### 6.5.Estudio de lipofilia (Log P)

Este estudio se realiza para evaluar la hidrofiliidad del complejo formado. Para esto, se debe determinar el coeficiente de reparto entre dos fases líquidas diferentes que en este caso son n-octanol y PBS. Se colecta aproximadamente 1 mL de la corrida de HPLC al tiempo de retención que corresponde al complejo FNZ- $^{99m}\text{Tc}$ . Dicho volumen se diluye en 2 mL de PBS.

De esta dilución en PBS se toman 3 fracciones de 0,5 mL cada una (cuya actividad promedio es de 1,475  $\mu\text{Ci}$ ) y se colocan en un eppendorff con el mismo volumen de n-octanol (0,5 mL). Se agitan utilizando un vórtex y luego se centrifugan a 1500 rpm durante 10 minutos. Se realizan 3 tomas por fase por cada eppendorff. Al ser 3 en total, se realizan 18 tomas (9 por

fase) de 100  $\mu\text{L}$  cada una y se colocan en otro eppendorff. A cada uno de estos 18 eppendorffs se les mide la actividad en el contador de centelleo sólido de pozo "ORTEC".

El coeficiente de reparto se calcula como el log de la división entre las cuentas en *n*-octanol sobre las cuentas en PBS, como se visualiza a continuación:

$$K = \frac{cp10s \text{ Octanol}}{cp10s \text{ PBS}}$$

## **6.6. Ensayo de competencia con Histidina**

Se colectan 180  $\mu\text{L}$  de FNZ marcada del HPLC y se mezclan con 20  $\mu\text{L}$  de cada una de las concentraciones de las disoluciones acuosas de histidina (0,1 mM y 1 mM) por duplicado por cada tiempo. A estos eppendorffs se los incuba a 37°C durante 1 y 3 horas. Luego de cada tiempo, se hace un control de ambas concentraciones por HPLC utilizando la columna C18, inyectando 50  $\mu\text{L}$ . Se obtienen los cromatogramas correspondientes.

## **6.7. Ensayo de unión a proteínas**

Para realizar este ensayo, se purifica el complejo FNZ-<sup>99m</sup>Tc, colectando una muestra del HPLC en el tiempo de retención previamente determinado para dicho complejo. A continuación, se incuba una alícuota con actividad 50  $\mu\text{Ci}$  en 500  $\mu\text{L}$  de suero fetal bovino a 37°C durante 1 y 3 h. Luego se procede a precipitar las proteínas utilizando 500  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo, para centrifugarlas a 1750 rpm por 5 minutos a 4 °C. Posteriormente se mide la actividad del precipitado y el sobrenadante con el contador de centelleo sólido de pozo "ORTEC". Este estudio se realiza por triplicado, es decir que se obtienen 3 sobrenadantes y 3 pellet para 1 hora y lo mismo para 3 horas.

## **6.8. Estudio de biodistribución del complejo FNZ-<sup>99m</sup>Tc**

Para el primer experimento de este ensayo se utilizan 12 ratones Balb/c portadores de tumor de mama inducido con células 4T1, apenas palpables, 5 días post-inoculación de células. A éstos se les inyecta 0,2 mL del complejo de interés con una actividad de 100  $\mu\text{Ci}$  aproximadamente, disuelto en suero fisiológico.

Al primer grupo (n= 4) se los sacrifica por dislocación cervical a los 30 minutos posterior a la inyección del radiofármaco, al segundo (n=4) se los sacrifica a 1 hora y en el tercer grupo (n=4) a las 2 horas post-inyección.

Se masan contenedores o vasos de biodistribución para contener cada una de las muestras de órganos/fluidos (para un n=12 ratones) en la balanza analítica. Se procede a la extracción de una muestra de sangre, hígado, corazón, pulmones, bazo, riñones, glándula tiroides, músculo, hueso (su fémur), estómago, intestino, orina, vejiga, la carcasa, y el tumor de mama en estos ratones. Se colocan las muestras sobre papel, se le retiran el exceso de fluidos, para posteriormente colocarlos en los recipientes, medir la actividad y así poder seguir al radiofármaco en su distribución.

Se determina la actividad específica por unidad de masa para cada uno de los órganos anteriormente mencionados en un contador de centelleo sólido de pozo "ORTEC".

Se obtienen imágenes de los especímenes a 30 minutos, 1 y 2 horas en el equipo In Vivo FX PRO Imager.



Figura 14. Equipo Bruker BioSpin In Vivo FX PRO Imager (<https://www.selectscience.net/>)<sup>90</sup>

Para el segundo estudio de biodistribución en ratones Balb/c (n=8) portadores de tumor de mama inducido con células 4T1, se encontraban en un estadio tumoral más avanzado con tumores de aproximadamente 1.6 cm<sup>3</sup>. Debido a esto, se esperan encontrar más sitios hipóxicos en los mismos. Los ratones de este experimento fueron utilizados 14 días post-inoculación de células, ya que para este tiempo, se espera una angiogénesis importante, un grado alto de metástasis. El tumor no podía superar el 10% del peso total del ratón. Fueron inoculados con aproximadamente 100  $\mu$ Ci del complejo de interés marcado en un volumen de 200  $\mu$ L y se dividieron en dos grupos (n=4) para ser sacrificados a la 1 y 2 h post inyección procediendo con la biodistribución como se describió previamente.

## 6.9. Estudio preliminar de la formación del complejo FNZ-<sup>185</sup>Re, mediante caracterización por HPLC

El procedimiento que se realiza a continuación consiste en agregar una masa de  $6,6 \times 10^{-3}$  g de <sup>185</sup>Re(CO)<sub>5</sub>Br en 1700  $\mu$ L de DMSO. Se ajusta el pH a 7. Este experimento implica una relación entre los reactivos <sup>185</sup>Re(CO)<sub>5</sub>Br y la FNZ de 1:1.

Luego, a la mezcla, se agrega una masa de  $4,0 \times 10^{-3}$  g de FNZ previamente disueltos en 1000  $\mu$ L de DMSO. El sistema de reacción se calienta durante 30 minutos a 65°C, y luego se baja su temperatura a 4°C, para proceder al filtrado a vacío del sólido formado. Se obtienen dos fracciones (aguas madres-AM- y sólido filtrado-SF-) que se caracterizan por HPLC. Luego se comparan con el tiempo de retención correspondiente al complejo de <sup>99m</sup>Tc y se busca el pico que se corresponda con un tiempo de retención característico de la muestra. Esto implica la

obtención de algún pico característico que no aparezca en el espectro de FNZ y que sea representativo de dicho complejo.

A la fracción cuyo tiempo de retención coincide con el complejo de  $^{99m}\text{Tc}$ , se le llamó Complejo2017-1 y en la Tabla 5 adjunta se pueden observar las proporciones de los reactivos utilizados para esta reacción.

Tabla 5. Información acerca de los reactivos de la reacción en proporción 1:1

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Peso molecular (g/mol)	m (g)	n (mol)
FNZ	-	245,2	$4,0 \times 10^{-3}$	$1,63 \times 10^{-4}$
$\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}$	-	406,2	$6,6 \times 10^{-3}$	$1,63 \times 10^{-4}$
DMSO	2700	-	-	-

Luego se siembran las fracciones obtenidas y la FNZ en una cromatografía preparativa C18. En ésta, a su vez se sembraron las aguas madres (AM), el sólido remanente filtrado obtenido (SRF), el sólido filtrado (SR) y la FNZ para comparar las anteriores fracciones y ver cuáles de ellas poseen FNZ. La placa se coloca en fase móvil Buffer Fosfato pH 2,5 al 1% de etanolamina 2 mM: MeOH 50:50. Se raspa y se colecta únicamente lo que podía contener el producto de interés (de color amarronado). Nuestro compuesto se disuelve en 1,5 mL de acetona, se agita vigorosamente y se filtra a gravedad para quitar la sílica. Luego, se quita el disolvente por evaporación a vacío a  $50^\circ\text{C}$ .

## 6.10. Estudio por microscopía electrónica de barrido del complejo FNZ- $^{185}\text{Re}$

Se purifica por placa de C18 el complejo FNZ- $^{185}\text{Re}$ . Este procedimiento se realiza para poder hacer los análisis correspondientes utilizando la técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB) del complejo de interés. Se disuelve el sólido marrón obtenido en 5 mL de acetona, se agitó y se procede a filtrarlo a gravedad, para luego ser analizado por MEB. La muestra es recubierta con oro.

## 7.Resultados y discusión

### 7.1.Síntesis de la FNZ

En primer lugar se obtuvo el intermedio de la síntesis Bfx con buen rendimiento, de aspecto anaranjado. Se calculó el rendimiento para este producto, cuya reacción tuvo un  $n=2$ , denominado Bfx 1.1 de forma genérica, y se observó que el rendimiento promedio fue de 92,49% (0,9293 g). Este valor es muy elevado, siendo muy beneficioso para proseguir con los siguientes pasos de reacción.

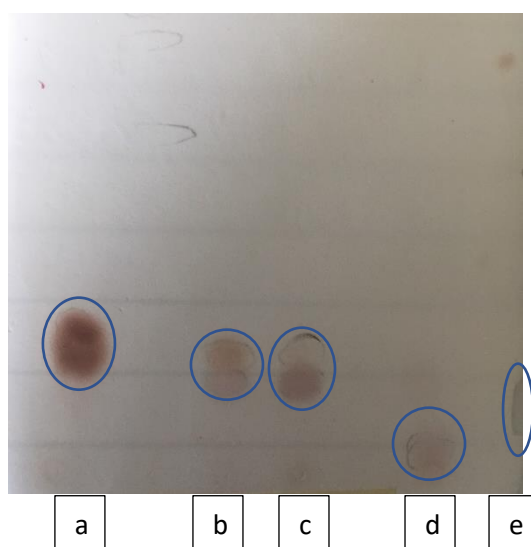


Figura 15. TLC con fase estacionaria sílica y con fase móvil EP:AE 1:1 (de izquierda a derecha): **a**-P-AF, **b**-5-Bfx, **c**-JA2016-2, **d**-JA2016-3 y **e**-FNZ de lote.

Como se puede observar en la Figura 15, las manchas obtenidas para los intermediarios JA2016-2 y JA2016-3 (de dos lotes diferentes del Bfx de interés) son de un color violáceo y poseen un  $R_f$  mayor que el de la FNZ patrón. Esto determina que aún no se ha formado dicho producto de interés, lo que es correcto para esta etapa de la reacción. Con respecto a la FNZ, parece verse representada por una mancha violeta más clara, en el origen.

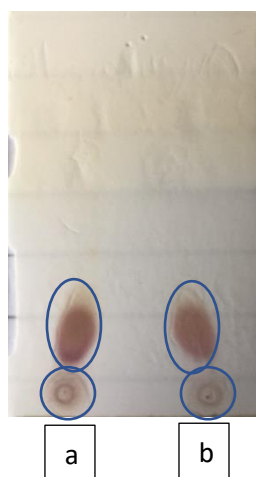


Figura 16. TLC con fase estacionaria sílica y con fase móvil EP:AE 1:1 realizada (de izquierda a derecha): **a**-aguas madres de JA2016-2 y **b**-aguas madres de JA2016-3.

Como se observa en la Figura 16, las AM de ambos productos intermedios poseen manchas de color y Rf similar al P-AF visto en la TLC previamente presentada. Esto podría indicar que el P-AF que no reaccionó para formar el intermediario, pasó a formar parte de las AM, dejando el sólido filtrado con ausencia de este reactivo.

Posterior a la reacción del intermedio se realizó la síntesis de la FNZ rotulado con el código FNZ2016. Se realizó una TLC (como se puede apreciar en la Figura 17) al sistema de reacción, en la que se puede observar un “smear” de color violáceo con inicio en el origen. Esto podría revelar que desde etapas tempranas de la síntesis hay presencia de la FNZ, debido a que su valor de Rf es igual al de la FNZ patrón. Además, si se compara dicho sistema al P-AF, se revela que parece haber presencia de éste en esta etapa de la reacción. También puede considerarse que aún persista el intermedio Bfx 1.1 (con un mayor Rf en la TLC).

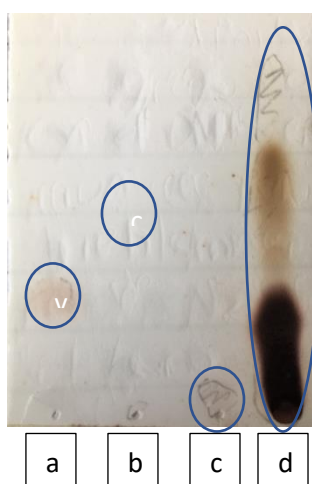


Figura 17. TLC con fase sólida estacionaria y con fase móvil EP:AE 1:1 (de izquierda a derecha): **a**-P-AF, **b**-Bfx, **c**- lote de FNZ y **d**-reacción en curso.

Posterior a finalizar la reacción de la síntesis de la FNZ de nombre FNZ2016, se realizó una última TLC, donde se puede apreciar la formación de FNZ (ver Figura 18). En esta TLC se puede

observar que FNZ2016 y la FNZ patrón se asemejan mucho, presentando ambas manchas en el origen de color violáceo. Además, se puede apreciar que en las AM de la reacción parece haber quedado un pequeño remanente de FNZ (que no fue extraído). Una observación muy positiva es la ausencia de P-AF tanto en el sólido filtrado como en las AM del sistema de reacción. A nivel del sólido y de las AM, tampoco se visualizan restos de Bfx 1.1. Esto refuerza la correcta finalización de la reacción. En ésta, se obtuvo un sólido de color muy oscuro, similar a negro con un tono violáceo. Dadas todas estas observaciones, y su posterior caracterización por  $^1\text{H}$  RMN hemos logrado una reacción exitosa de síntesis de FNZ.

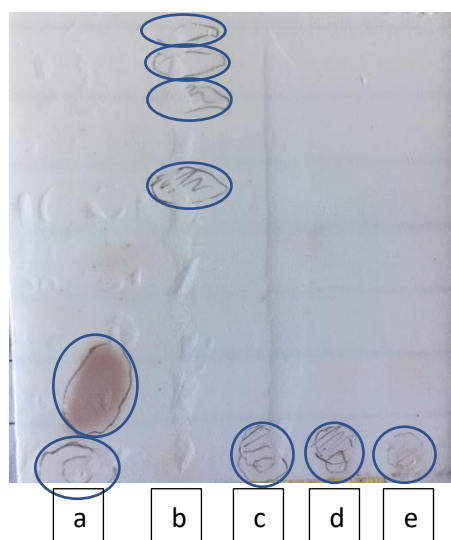
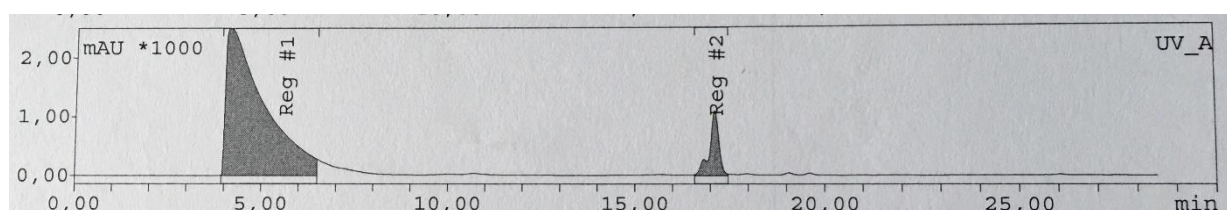


Figura 18. TLC con fase estacionaria sílica y fase móvil EP:AE 1:1 (de izquierda a derecha): **a**-P-AF, **b**-Bfx, **c**-FNZ de lote, **d**-sólido filtrado (FNZ2016) y **e**-aguas madres de filtración.

### 7.1.1. Caracterización de FNZ por HPLC

Finalmente, una vez sintetizada la FNZ, se obtuvo el espectro de HPLC de la misma, que fue desarrollado como se indica en la sección Materiales y Métodos. Se obtuvieron



Sustancia	Tiempo de retención (minutos)	Cuentas de área	% Área (%)
Pico característico FNZ (REG #1)	4,13	180857,2	90,44
Impureza (REG #2)	17,12	19122,5	9,56

Figura 19. Cromatograma de HPLC obtenido para la FNZ. También, está presente el cuadro de purezas relativas de las diferentes señales.

únicamente 2 picos: uno muy ancho característico, en este caso con un tiempo de retención de 4,13 minutos, y otro menos intenso y con una banda menos ancha a los 17,12 minutos de tiempo de retención. Los porcentajes relativos de ambos fueron de 90,44% y 9,56% respectivamente, como se puede apreciar en la Figura 19.

Estos resultados permiten concluir que la banda ancha y de bajo tiempo de retención puede llegar a representar a la FNZ y que las bandas de mayor tiempo de retención pueden ser impurezas que se obtuvieron o reactivos que no reaccionaron en su totalidad.

## 7.2. Formación del complejo $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_2(\text{H}_2\text{O})_3$

Luego de haberse marcado el tricarbonilo con el  $^{99m}\text{Tc}$  ( $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_2(\text{H}_2\text{O})_3$ ), se obtuvo un espectro de HPLC para su confirmación (ver Figura 20). Dicho cromatograma revela un pico muy importante, con un tiempo de retención de 5,43 minutos que corresponde a  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_2(\text{H}_2\text{O})_3$ , mientras que el pico en 3,70 minutos puede corresponderse con algún cambio de solvente.

Se observa una pureza radioquímica del  $\text{Tc}(\text{CO})_2(\text{H}_2\text{O})_3$  de 98,85%, que refleja un marcado verdaderamente exitoso, considerando que el porcentaje de pureza radioquímica debe superar el 90% para un radiofármaco de diagnóstico<sup>91</sup>.

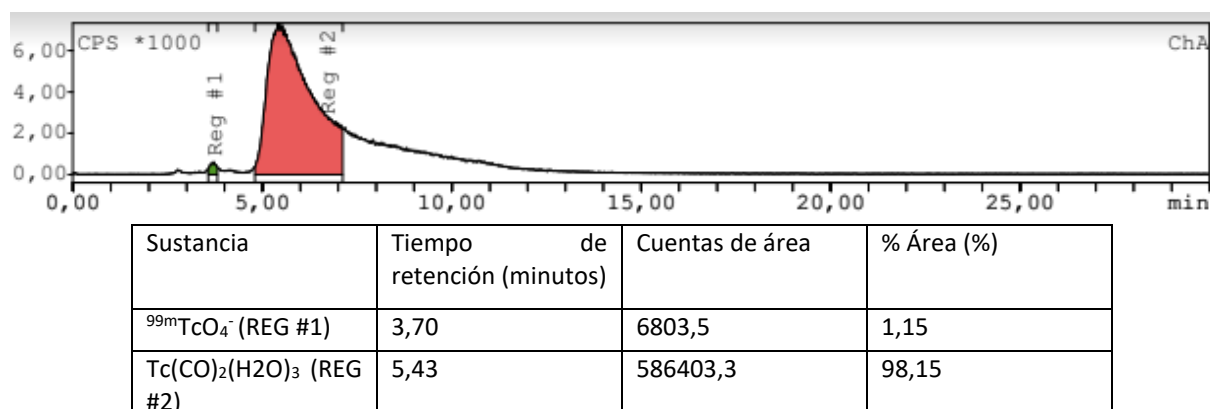


Figura 20. Cromatograma de HPLC obtenido para el  $\text{Tc}(\text{CO})_2(\text{H}_2\text{O})_3$ . También, está presente el cuadro de purzas relativas de las diferentes señales.

El control cromatográfico que se realizó por TLC de alúmina para determinar el porcentaje de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , es de 0,34%. Este valor se obtuvo considerando que la única molécula que migra diferencialmente con respecto a la forma hidrolizada del  $^{99m}\text{Tc}$  ( $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) y con respecto al complejo formado entre el tricarbonilo y el  $^{99m}\text{Tc}$  ( $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$ ), es el  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  que migra con un  $R_f$  de 0,57, mientras que las otras dos moléculas migran con  $R_f$  de 0 y 0,1 respectivamente.

El control cromatográfico que se realizó utilizando el papel Whatman 1 de la mezcla de reacción, anteriormente mencionada, ayudó a obtener el porcentaje de presencia del  $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , que es de 0,50%. Este es el único porcentaje que se puede obtener utilizando este tipo de cromatografía ya que ésta es la molécula que no migra diferencialmente con respecto a las otras, teniendo un  $R_f$  de 0, mientras que  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$  tiene un  $R_f$  de 0,52 y  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  tiene un  $R_f$  de 0,5, como se muestra en la Tabla 6.



Tabla 6. Información acerca de los Rf de las especies que pueden estar involucradas en el marcado con  $^{99m}\text{Tc}$

Especie	Rf sistema con alúmina/MeOH:HCl	Rf sistema con Whatman 1/MeOH:HCl
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	0,57	0,50
$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$	0,10	0,52
$^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0	0

En suma, el porcentaje total de impurezas según los estudios cromatográficos se obtiene por la sumatoria de éstas, dando un resultado total de 1,48%.

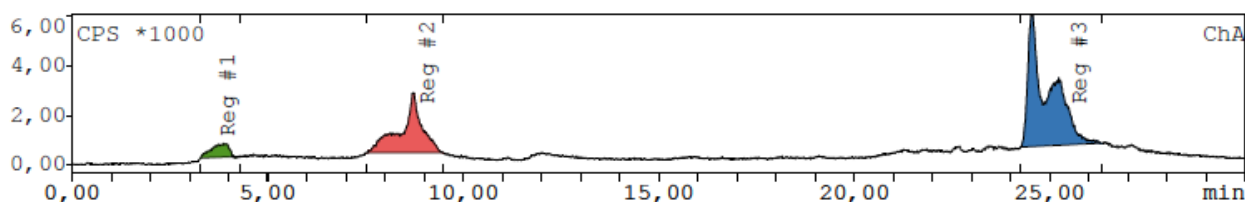
Según el método considerado sea el HPLC o los estudios de capa fina, se observa una leve diferencia entre los porcentajes de pureza radioquímica, que se puede ver claramente en la Tabla 7 a continuación:

Tabla 7. Porcentajes diferenciales de PRQ obtenidos por los diferentes métodos

Método de obtención	PRQ (%)
HPLC	98,85
ITLC	99,66

### 7.3. Formación del complejo FNZ- $^{99m}\text{Tc}$

En primer lugar, se realizó el estudio de marcación con varias actividades específicas, que fueron de 5,63 mCi y 2,5 mCi para 100  $\mu\text{L}$  (1 mg /mL) de FNZ, y se seleccionó la segunda para continuar con los estudios cromatográficos de capa fina. Esto se debe a que la PRQ de la marcación realizada con actividad 2,5 mCi (65,36%), si observamos únicamente los cromatogramas de HPLC, es claramente mayor que la de la marcación realizada con 5,63 mCi (34,64%). Teniendo en cuenta lo anterior, se selecciona la primera para realizarle el estudio de seguimiento de la estabilidad del radiofármaco en el tiempo y los estudios cromatográficos en Alúmina y en Whatman 1 (con MeOH:HCl 6N 99,5:0,5 como fase móvil en ambos casos) para obtener más información sobre la PRQ de la muestra. Se pueden apreciar los cromatogramas con su respectivo cuadro de purezas relativas para la marcación con 2,5 mCi y el cuadro de purezas relativas referente a la marcación con 5,63 mCi en la Figura 21 y la Tabla 8.



Sustancia	Tiempo de retención (minutos)	Cuentas del área	% Área (%)
$^{99m}\text{TcO}_4^-$ (REG #1)	3,92	16666,0	5,63
Impureza (REG #2)	8,73	87595,9	29,58
FNZ- $^{99m}\text{Tc}$ (REG #3)	24,55	191890,6	64,79

Figura 21. Cromatograma de HPLC obtenido para el complejo FNZ- $^{99m}\text{Tc}$ , habiendo marcado con 2,5 mCi. También, está presente el cuadro de purzas relativas de las diferentes señales

Tabla 8. Cuadro de purzas relativas de las diferentes señales obtenido para el complejo FNZ- $^{99m}\text{Tc}$ , habiendo marcado con 5,63 mCi.

Sustancia	Tiempo de retención (minutos)	Cuentas del área	% Área (%)
Impureza (REG #1)	8,85	90925,36	65,36
FNZ- $^{99m}\text{Tc}$ (REG #2)	24,62	48192,17	34,64

Se obtuvo información a partir de las cromatografías en Alúmina y Whatman 1 para la marcación realizada con 2,5 mCi. Esto fue posible tomando en cuenta los Rf de las diferentes especies que puede formar el  $^{99m}\text{Tc}$  durante una marcación, como se muestra en la Tabla 6. La cromatografía en Alúmina aportó información acerca del porcentaje de presencia de las impurezas como el  $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  y del complejo  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$ . Éste se considera una impureza ya que no es el complejo que en este punto se está buscando. El porcentaje que se obtuvo fue de 35,53% según las cromatografías en placa y de 35,21% según los estudios realizados por HPLC.

La cromatografía Whatman 1 permitió conocer el porcentaje de presencia del hidrolizado  $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ , que fue de 1,54%, que resulta un porcentaje adecuado para esta impureza (bajo).

Considerando todo lo anteriormente dicho es que se obtuvo el porcentaje de presencia del complejo de interés FNZ- $^{99m}\text{Tc}$ , que es de 63,25% (Tabla 9), teniendo en cuenta la mayor pureza radioquímica obtenida (marcación realizada con 2,5 mCi).

Tabla 9. Porcentajes de PRQ obtenidos utilizando las dos técnicas diferentes, que son el HPLC y los estudios cromatográficos.

Volumen de FNZ ( $\mu\text{L}$ )	Actividad utilizada (mCi)	PRQ según HPLC (%)	PRQ según cromatografías (%)
100 (0,1 g de FNZ)	2,50	63,25	62,93
100 (0,1 g de FNZ)	5,63	34,64	-

En la Tabla 9 anteriormente expuesta se muestra que, aunque los estudios sean diferentes, los resultados obtenidos acerca del PRQ de este radiofármaco son muy concluyentes, ya que dichas cifras son muy similares entre sí. Se aprecia que la PRQ obtenida mediante la marcación realizada con 2,5 mCi de actividad es mucho mayor a la alcanzada con 5,63 mCi (ver Tabla 9).

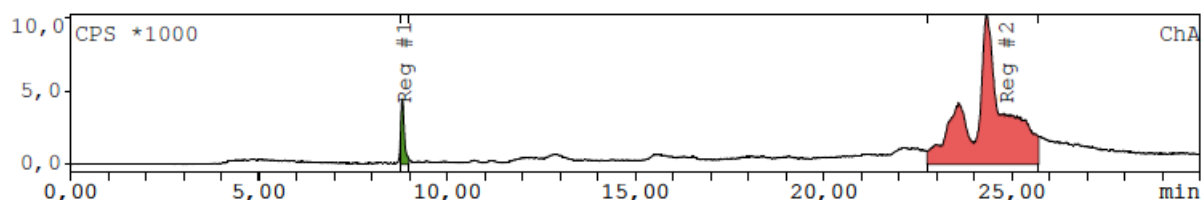
Se marcó un volumen de 100  $\mu$ L de FNZ. Esto indica que había una cantidad menor de moléculas de FNZ disponibles para ser marcadas con el complejo intermedio con respecto a la marcación para el volumen de FNZ de 300  $\mu$ L. Como resultado, se extrae que la PRQ en estos dos casos es considerablemente menor a lo anteriormente descrito (PRQ~95%).

A partir de estos experimentos, en los que las PRQ alcanzaron valores muy inferiores al 90%, se concluye que era necesario marcar un volumen mayor de FNZ (manteniendo su concentración, que implica un mayor número de sitios de unión) para obtener un PRQ proporcional.

Se puede decir que, en términos relativos, se obtuvo un proceso de marcación considerablemente menos efectivo para una marcación con mayor actividad (5,63 mCi). Esto es debido a que hay muchas moléculas del complejo intermedio que quedan libres sin lograr unirse a la FNZ (no pudiendo marcarla) y su cantidad relativa aumenta aún más con respecto a la marcación con 2,5 mCi, minimizando entonces la cantidad relativa de FNZ marcada y dando lugar a una PRQ muy baja.

Luego de comprobar que el marcado con 100  $\mu$ L de FNZ no fue del todo exitoso, se marcaron 300  $\mu$ L de FNZ (1 mg /mL) con una actividad de  $4,88 \pm 0,38$  mCi ( $1,81 \times 10^8 \pm 1.41 \times 10^7$  bq).

Se obtuvo un cromatograma de HPLC de dicho marcado como el que se muestra en la Figura 22. Éste presentó un pequeño pico de impurezas a los 8,82 minutos de tiempo de retención y presenta una presencia porcentual de 4,60%. Se visualiza una serie de picos a los 24,33 minutos de tiempo de retención que puede ser atribuido a la molécula de FNZ marcada. Este tiempo de retención es similar al de uno de los complejos de dióxido de Fenazina marcados con  $^{99m}\text{Tc}$  que reportó Rey *et al* (2015), que fue de 22,5 minutos<sup>92</sup>. Éste presentó un porcentaje de 95,40%, resultando desdoblado, pudiendo representar distintas conformaciones del complejo. Esto es muy positivo ya que indicaría una presencia mayor de la molécula de interés con respecto a la impureza presente, implicando un marcado exitoso. Además, dicho porcentaje es mayor a 90%, que es el mínimo valor de pureza radioquímica para un potencial radiofármaco de diagnóstico.



Sustancia	Tiempo de retención (minutos)	Cuentas del área	% Área (%)
Impureza (REG#1)	8,82	28043,7	4,60
FNZ- $^{99m}\text{Tc}$ (REG#2)	24,33	581270,2	95,40

Figura 22. Cromatograma de HPLC obtenido para la mezcla de reacción de la preparación del complejo FNZ-<sup>99m</sup>Tc, con 4,88 mCi de actividad. También, está presente el cuadro de purezas relativas de las diferentes señales.

## 7.4. Seguimiento de estabilidad del marcado

El cromatograma y los porcentajes de presencia relativa de la molécula FNZ-<sup>99m</sup>Tc a tiempo 0 se pueden apreciar en la Figura 23. Se marcaron 300 µL de dicha molécula con una actividad de 5,47 mCi y al analizarla por HPLC se inyectaron 25 µL. En este caso, se obtuvieron 2 picos claramente diferenciados. Uno muy fino e intenso a los 8,80 minutos de tiempo de retención y otro muy intenso y ancho (que es el que representa a la formación del complejo de interés) con un tiempo de retención de 23,63 minutos. Los porcentajes obtenidos fueron de 6,23% (para el primer pico mencionado) y de 93,77% (para el segundo). La PRQ se obtuvo sustrayendo el porcentaje de la impureza presente a 8,80 minutos y el porcentaje de la impureza hidrolizada <sup>99m</sup>TcxH<sub>2</sub>O, que es de 1,54% (determinado por cromatografía en placa), obteniéndose un PRQ de 92,23%.

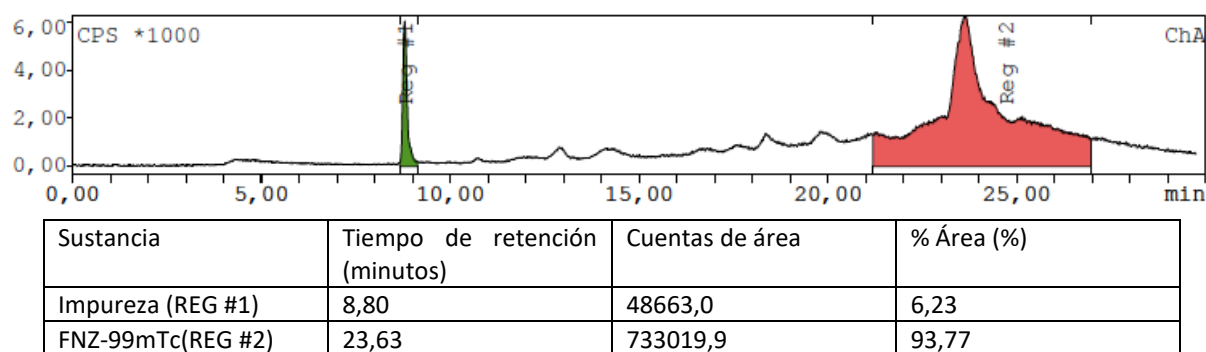


Figura 23. Cromatograma de HPLC obtenido para el complejo FNZ-<sup>99m</sup>Tc habiendo marcado con 5,47 mCi. También, está presente el cuadro de purezas relativas de las diferentes señales.

El siguiente cromatograma de HPLC para el seguimiento de estabilidad se obtuvo 1 hora después de finalizada la marcación. Este cromatograma presentó un pico muy pequeño y muy fino con tiempo de retención de 8,75 minutos y otra región que representa al complejo de interés con un tiempo de retención de 23,60 minutos, tal y como se puede observar en la Figura 24 adjunta. La PRQ se obtuvo restando el porcentaje de presencia de la impureza presente a los 8,82 minutos (que fue de 4,93%), y el porcentaje de la impureza hidrolizada <sup>99m</sup>TcxH<sub>2</sub>O fue de 1,54%. Esto da una PRQ para el primer cromatograma del estudio de estabilidad de 93,53%. Este PRQ implica que el complejo de interés se mantuvo altamente formado y que la FNZ se mantuvo altamente marcada.

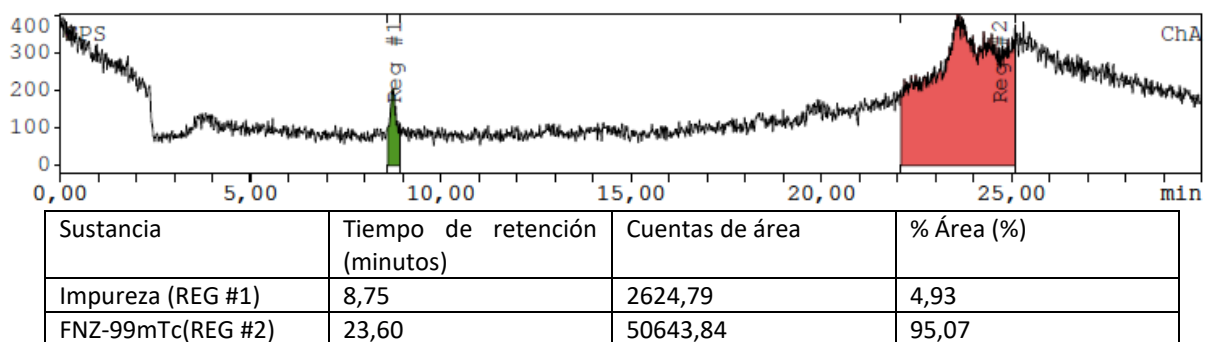
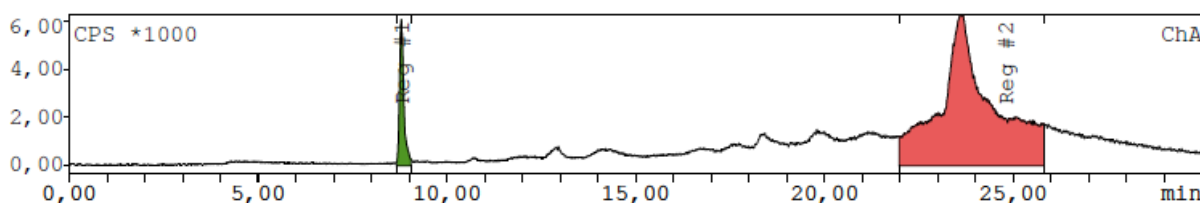


Figura 24. Cromatograma de HPLC obtenido para el complejo FNZ-<sup>99m</sup>Tc luego de pasada 1 hora desde su marcación. También, está presente el cuadro de purezas relativas de las diferentes señales.

El porcentaje inicial de pureza radioquímica conseguido, fue levemente menor que el alcanzado 1 hora después. Esto se explica porque debe considerarse dentro del rango del posible error en la medida. En el cromatograma obtenido 1 hora más tarde de finalizada la marcación, parece ser que las cuentas por segundo (CPS) obtenidas han disminuido notoriamente, lo que podría explicar el porqué de la mínima diferencia. Aun considerando lo anterior, la diferencia del PRQ entre un cromatograma y el otro es exigua, lo que es muy positivo y expresa gran estabilidad 1 hora después.

2 horas posteriores a la finalización de la marcación, se obtuvo un segundo cromatograma de HPLC que presentó el mismo pico, intenso pero muy fino, esta vez con 8,80 minutos de tiempo de retención, un único pico muy intenso y ancho que representa al complejo de interés, con un tiempo de retención de 23,63 minutos, con aparente similitud con el obtenido anteriormente para esta molécula (ver Figura 23 y 25).

El porcentaje de PRQ se calculó considerando la impureza representada por el primer pico mencionado y la impureza hidrolizada <sup>99m</sup>TcxH<sub>2</sub>O, cuyos porcentajes de presencia fueron de 7,63% y 1,54% respectivamente. Esto da lugar a una PRQ de 90,81% 2 horas post inyección.



Sustancia	Tiempo de retención (minutos)	Cuentas de área	% Área (%)
Impureza (REG #1)	8,80	47412,5	7,50
FNZ-99mTc(REG #2)	23,63	92,50	92,50

Figura 25. Cromatograma de HPLC obtenido para el complejo FNZ-<sup>99m</sup>Tc luego de pasadas 2 horas desde su marcación. También, está presente el cuadro de purezas relativas de las diferentes señales.

Se observa que la PRQ tiene una variación mínima con respecto al cromatograma de HPLC obtenido 1 hora antes. Sin embargo sigue presentando un porcentaje de pureza muy elevado, lo que expresa una estabilidad del complejo del radiofármaco muy clara, incluso teniendo en cuenta las 2 horas que transcurrieron desde su formación.

Posteriormente, se obtuvo el cromatograma de HPLC luego de 3 horas de finalizada la marcación. Éste presentó el pico intenso y fino a los 8,87 minutos de tiempo de retención, y otro pico ancho e intenso característico, esta vez con un tiempo de retención de 23,62 minutos, tal y como se puede apreciar en la Figura 26. Nuevamente la PRQ se calculó considerando los porcentajes de la impureza a los 8,78 minutos de tiempo de retención y la impureza hidrolizada <sup>99m</sup>TcxH<sub>2</sub>O, de porcentajes 7,69% y 1,54% respectivamente. Esto da lugar a una PRQ de 90,77%, que sigue sosteniéndose por encima del 90% y que se vio prácticamente inalterada con respecto al anterior cromatograma de HPLC. Esto denota una

gran estabilidad por parte del complejo que forma al radiofármaco, incluso 3 horas después de haber sido formado.

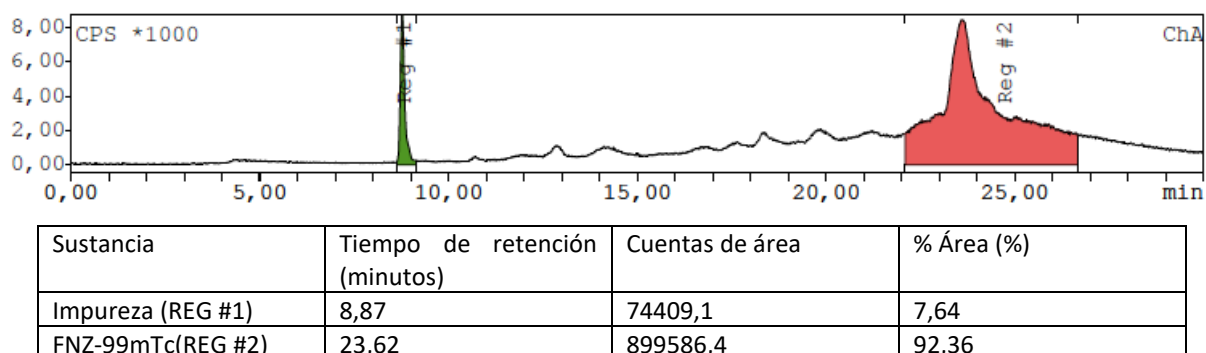


Figura 26. Cromatograma de HPLC obtenido para el complejo FNZ-<sup>99m</sup>Tc luego de pasadas 3 horas desde su marcación. También, está presente el cuadro de purzas relativas de las diferentes señales.

Se obtuvo otro cromatograma de HPLC pasadas 4 horas de finalizada la marcación. En este caso también se inyectaron 40  $\mu$ L de la muestra. Como se observa, presenta, al igual que en los casos anteriores, un pico fino e intenso a los 8,87 minutos de tiempo de retención y otro pico mucho más ancho y también intenso a los 23,75 minutos de tiempo de retención. Dicho cromatograma se puede apreciar en la Figura 27. La PRQ se calculó nuevamente considerando la impureza presente a los 8,87 minutos de tiempo de retención y la impureza hidrolizada <sup>99m</sup>TcxH<sub>2</sub>O, cuyos porcentajes de presencia fueron de 7,68% y 1,54%. La PRQ obtenida fue de 90,78%. Dicho PRQ se mantuvo en su totalidad, habiendo pasado 1 hora más con respecto al marcado y a la formación del complejo de interés, lo que sigue enfatizando la idea de que la estabilidad de complejo es clara, aún 4 horas después de la marcación.

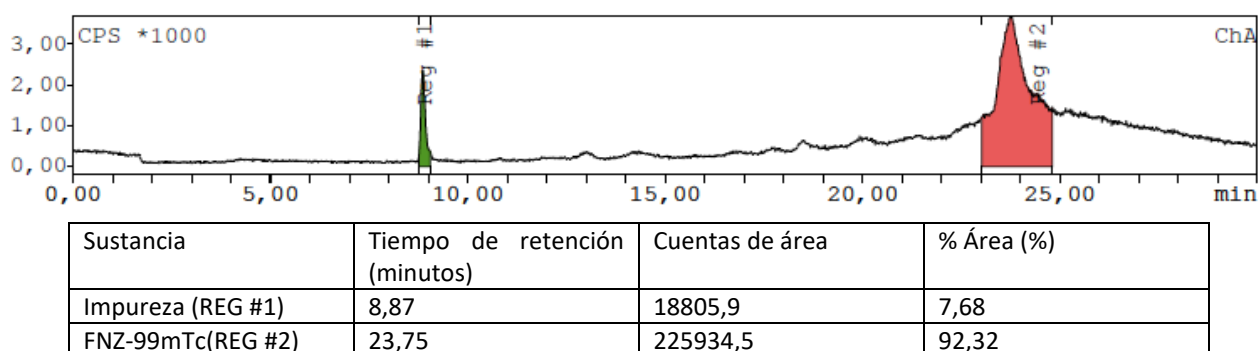


Figura 27. Cromatograma de HPLC obtenido para el complejo FNZ-<sup>99m</sup>Tc luego de pasadas 4 horas desde su marcación. También, está presente el cuadro de purzas relativas de las diferentes señales.

Finalmente se obtuvo un cromatograma de HPLC pasadas 24 horas desde el inicio de la marcación. El cromatograma obtenido (observado en la Figura 28) presenta el pico intenso y fino a los 8,78 minutos de tiempo de retención y el pico característico del complejo a los 23,57 minutos de tiempo de retención. El primer pico mencionado (el de la impureza) se observa en este último espectro, siendo un poco más intenso que en los anteriores, e igual de fino; mientras que el pico característico del complejo se presenta menos intenso que en cromatogramas anteriores (ver Figura 28). La PRQ se calculó considerando los porcentajes de

la impureza presente en el cromatograma, de tiempo de retención 8,78 minutos, y el de la impureza hidrolizada  $^{99m}\text{Tc}\text{xH}_2\text{O}$ ; estos porcentajes son de 12,22% y 1,5%, respectivamente. El porcentaje de la impureza hidrolizada se midió nuevamente a las 24 horas, manteniéndose constante en su valor ~1,5%. La PRQ obtenida es de 86,24%. Aun considerando este descenso, es importante resaltar la gran estabilidad que presentó el complejo de interés, incluso tomando en cuenta que habían pasado 24 horas con respecto a la marcación. Éste último fue el primer cromatograma de HPLC en el que se obtuvo una PRQ inferior al 90%, considerando que, aun así, fue levemente menor con respecto a dicha cifra.

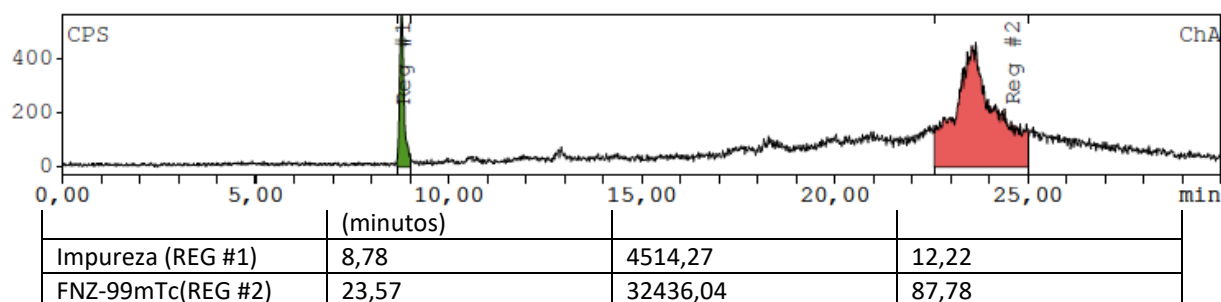


Figura 28. Cromatograma de HPLC obtenido para el complejo FNZ- $^{99m}\text{Tc}$  luego de pasadas 24 horas desde su marcación. También, está presente el cuadro de purzas relativas de las diferentes señales.

Si se observa la Figura 29 se puede apreciar que el descenso de la PRQ con respecto al tiempo transcurrido es muy sutil y que la estabilidad del radiofármaco de interés es muy clara, incluso considerándolo 24 horas después de obtenido. Se observa una estabilidad que implica una PRQ de aproximadamente 90% en todos los tiempos considerados, lo que es muy positivo.

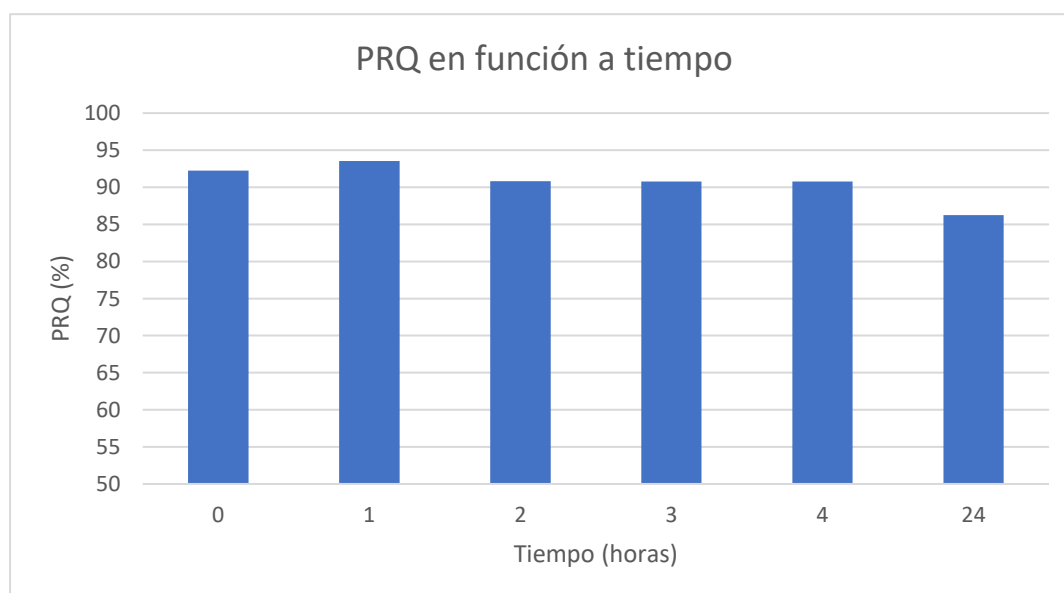


Figura 29. Gráfica que muestra la relación entre la PRQ y el tiempo que se siguió en el control de estabilidad

## **7.5. Estudio de lipofilia (Log P)**

Se le realizó el estudio de lipofilia obteniendo el coeficiente de partición (Log P) entre las fases 1-octanol y PBS. Dicho Log P es de  $0,11 \pm 0,062$ . Este coeficiente de partición se encuentra en el rango de -0,5 a 2, lo que se indica en la literatura es adecuado para el pasaje a través de membranas biológicas.<sup>92</sup> Este coeficiente de partición implica una preferencia leve y poco notoria por la fase acuosa en relación a la fase octanólica, ya que las cuentas obtenidas para la primera fueron un poco mayores que la segunda.

## **7.6. Ensayo de competencia con histidina**

Previo a ejecutar este ensayo se realiza una corrida del marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  de la FNZ en el HPLC. Se obtuvo un cromatograma que presenta un pico pequeño y fino a los 8,82 minutos de tiempo de retención y otro pico muy ancho e intenso con 24,33 minutos de tiempo de retención, con porcentajes de presencia relativa de 4,60% y 95,40%, respectivamente. El tiempo de retención de la FNZ marcada era de aproximadamente 26 minutos. Se recolectaron las 2 muestras del segundo pico para realizar este estudio y el de unión a proteína. Se obtuvieron las actividades de estas tomas, resultando en dos medidas bien diferenciadas: el primer eppendorff tuvo una actividad de 11 mCi, mientras que el segundo tuvo una actividad de 26 mCi. Esto se hizo para obtener un eluido del marcado para realizar el presente ensayo.

Luego de colocar los volúmenes de la FNZ marcada (180  $\mu\text{L}$ ) y la histidina (20  $\mu\text{L}$ ) en cada eppendorff, se procedió a medir la actividad de una de las concentraciones para tener un estimado de la misma, obteniendo un valor de 2 mCi.

Para controlar la estabilidad del complejo de interés frente a la histidina, se realizaron cromatografías de HPLC y se obtuvieron los cromatogramas a 1 y 3 horas después de incubar los eppendorffs a 37 °C (Tabla 10, 11 y 12 y 13). En primer lugar se observa el cuadro de purzas relativas obtenido para la concentración 0,1 mM luego de 1 hora, que está presente en la Tabla 10.

En ésta se puede interpretar la presencia de un pico muy pequeño con un tiempo de retención de 4,07 minutos, también otro pico muy fino y pequeño con un tiempo de retención de 8,93 minutos y finalmente un par de picos que representan a la FNZ marcada con un tiempo de retención de 23,73 minutos. Los porcentajes obtenidos para cada pico o conjunto de éstos son de 17,79%, 6,44% y 75,77%, respectivamente. En el cromatograma ya se ve un descenso importante de la proporción relativa de la FNZ marcada, lo que indicaría que la competencia con histidina está logrando que un número notorio de moléculas de FNZ no puedan estar más unidas al  $^{99m}\text{Tc}$ , ya que éste pasa a estar unido a la histidina en lugar de a la FNZ. Es por ello que el descenso de la presencia porcentual del complejo de FNZ marca el comienzo de la formación del complejo de la histidina con el  $^{99m}\text{Tc}$ . El pico que se visualiza con un tiempo de retención de 8,93 minutos representa a la impureza que siempre está presente al marcar a la FNZ. El otro pico observado con un tiempo de retención de 4,07 minutos puede indicar la presencia del complejo antedicho (entre  $^{99m}\text{Tc}$  e histidina), ya que no estaba presente en la corrida de marcado, y a su vez podría estar indicando una nueva entidad.



Tabla 10. Cuadro de purezas relativas de los diferentes picos obtenido para el complejo FNZ-<sup>99m</sup>Tc en el ensayo de competencia con Histidina luego de pasada 1 hora de incubación con histidina 0,1 mM.

Sustancia	Tiempo de retención (minutos)	Cuentas de área	% Área (%)
Nuevo complejo Histidina- <sup>99m</sup> Tc (REG #1)	4,07	13420,93	18,62
Impureza (REG #2)	8,93	4266,83	5,92
FNZ- <sup>99m</sup> Tc(REG #3)	23,73	54375,06	75,46

Luego se obtuvo el cuadro de purezas relativas de los diferentes picos también de 1 hora de incubación, pero esta vez tomando una concentración de histidina de 1 mM, apreciable en la Tabla 11. En este caso también se inyectaron 50 µL al HPLC. En este cuadro se observó una pureza relativa muy pequeña de tiempo de retención 3,75 minutos, otra señal con pureza relativa también pequeña de tiempo de retención 8,80 minutos y por último la región que representa a la FNZ marcada con un tiempo de retención de 25,42 minutos. Los porcentajes de presencia relativa de estas regiones son de 17,14%, 16,35% y 66,52%, respectivamente. En este caso, en el que se trabajó con una concentración mayor de histidina, se observa que hubo un descenso del porcentaje relativo del complejo de interés y un aumento del mismo para el nuevo complejo formado.

Tabla 11. Cuadro de purezas relativas de los diferentes picos obtenido para el complejo FNZ-<sup>99m</sup>Tc en el ensayo de competencia con Histidina luego de pasada 1 hora de incubación con histidina 1 mM.

Sustancia	Tiempo de retención (minutos)	Cuentas de área	% Área (%)
Nuevo complejo Histidina- <sup>99m</sup> Tc (REG #1)	3,75	7085,40	17,14
Impureza (REG #2)	8,80	6759,63	16,35
FNZ- <sup>99m</sup> Tc(REG #3)	25,42	27505,35	66,52

Luego de transcurridas las 3 horas de incubación, se obtuvo el cuadro de purezas relativas de los diferentes picos para la concentración 0,1 mM, como puede apreciarse en la Tabla 12. Para su obtención se inyectaron 75 µL al HPLC. En este cuadro se visualizaron las regiones en 4,12 minutos de tiempo de retención, 8,82 minutos de tiempo de retención y 24,23 minutos de tiempo de retención. Los porcentajes relativos son de 37,60%, 15,01% y 47,39% respectivamente. La primera región, como ya se mencionó, representa el nuevo complejo entre Histidina y <sup>99</sup>Tc. Su porcentaje de presencia relativa aumentó de forma significativa con respecto a los resultados obtenidos en la Tabla 10. Esto implica que a mayor tiempo, aumenta la formación de este complejo. La segunda región, representa a la impureza comúnmente obtenida en la marcación de FNZ, que también aumentó su presencia relativa con respecto al mismo cromatograma obtenido luego de 1 hora de incubación. Probablemente, esto se debe al descenso relativo del complejo de interés que disminuyó su presencia dada la formación del complejo con la histidina. En último lugar se ve la región representada por el complejo de interés cuya presencia relativa disminuyó notoriamente con respecto a ambas, la corrida de

marcado y al cromatograma obtenido luego de 1 hora de incubación. En este caso los porcentajes del complejo de interés y el nuevo complejo con histidina se asemejan mucho, indicando la gran similitud de presencia relativa de dichos complejos.

Tabla 12. Cuadro de purzas relativas de los diferentes picos obtenido para el complejo FNZ-<sup>99m</sup>Tc en el ensayo de competencia con Histidina luego de pasadas 3 horas de incubación con histidina 0,1 mM.

Sustancia	Tiempo de retención (minutos)	Cuentas de área	% Área (%)
Nuevo complejo Histidina- <sup>99m</sup> Tc (REG #1)	4,12	7373,170	37,60
Impureza (REG #2)	8,82	2943,371	15,01
FNZ- <sup>99m</sup> Tc(REG #3)	24,23	9294,645	47,39

Se obtuvo un cuadro de purzas relativas también luego de 3 horas de incubación pero esta vez con una concentración de Histidina de 1 mM. El mismo se puede observar en la Tabla 13. En este caso se inyectaron 100 µL al HPLC, dado que se consideró que había sido un tiempo considerable de incubación con una concentración relativamente alta de Histidina, además de que el cromatograma anterior ya había presentado picos poco definidos. En el cuadro se observaron regiones con tiempos de retención de 2,05 minutos, 8,78 minutos y 25,38 minutos. La primera región mencionada tiene una presencia porcentual de 23,55% y representa el complejo formado entre la Histidina y el <sup>99m</sup>Tc. Tuvo un leve aumento porcentual con respecto al cuadro obtenido para la misma concentración de Histidina durante 1 hora de incubación. La segunda región con un porcentaje relativo de 19,65% representa la impureza comúnmente obtenida al marcar a la FNZ. El porcentaje no se vio muy modificado con respecto al cromatograma obtenido para la misma concentración luego de 1 hora de incubación. Y finalmente el porcentaje relativo para el complejo de interés disminuyó con respecto al cromatograma obtenido para la misma concentración a 1 hora de incubación.

Tabla 13. Cuadro de purzas relativas de los diferentes picos obtenido para el complejo FNZ-<sup>99m</sup>Tc en el ensayo de competencia con Histidina luego de pasadas 3 horas de incubación con histidina 1 mM.

Sustancia	Tiempo de retención (minutos)	Cuentas de área	% Área (%)
Nuevo complejo Histidina- <sup>99m</sup> Tc (REG #1)	2,05	3507,315	23,55
Impureza (REG #2)	8,78	2926,340	19,65
FNZ- <sup>99m</sup> Tc(REG #3)	25,38	8461,296	56,81

## 7.7. Ensayo de unión a proteínas

Para 1 hora de incubación y considerando las actividades obtenidas en el contador de centelleo sólido de pozo "ORTEC", se calcularon 3 relaciones. Éstas se obtuvieron dividiendo la actividad de cada pellet con la actividad de su correspondiente sobrenadante. Las relaciones obtenidas fueron muy cercanas a 1 (0.95), lo que expresa actividades entre el pellet y el sobrenadante muy similares entre sí para cada fracción considerada.

Para 3 horas de incubación se obtuvieron medidas de actividad, y se calcularon 3 relaciones Pellet/Sobrenadante de la misma forma que se expuso anteriormente. Éstas presentaron un valor por encima de 1. El promedio obtenido es de 1,27, lo que refleja una distribución desigual de la molécula de interés marcada hacia las proteínas, las que a su vez, luego de 3 horas de incubación, tienden a estar en mayor concentración en el pellet que en el sobrenadante. Esto indica que el complejo FNZ-<sup>99m</sup>Tc, luego de 3 horas de incubación, tiene aproximadamente un 50% de unión a proteínas plasmáticas.

Se puede observar entonces como, con el paso del tiempo de incubación, la distribución de las moléculas anteriormente mencionadas se vuelve más desigual y empieza a darse una preferencia por unirse a las proteínas plasmáticas en vez de permanecer en el sobrenadante unidas a FNZ, considerando la diferencia en la relación Pellet/Sobrenadante mencionada.

## 7.8. Estudio de biodistribución del complejo FNZ-<sup>99m</sup>Tc

Los resultados obtenidos en este estudio, se expresan en cuentas por 10 segundos para cada órgano/tejido de los ratones hembras Balb/c, de 6 a 8 semanas portadores de tumor de mama murino inducido con células 4T1. Se obtienen los porcentajes de actividad y porcentajes de actividad por gramo de masa (%Act/g), para cada órgano extraído del organismo del ratón (ver Tabla 14). En este caso, se calcularon para los 4 ratones que fueron sacrificados 30 minutos después de que fueron inyectados. Se muestra un promedio de dichas actividades. En primer lugar se muestran los resultados del primer experimento de biodistribución, en el que se utilizaron 12 ratones.

*Tabla 14. % Actividad y Actividad/g expresadas con su correspondiente desviación estándar para los (n=4) ratones Balb/c portadores de tumor mamario sacrificados 30 minutos después de haberseles inyectado el complejo de Fenazina marcado.*

Órgano	Promedio %Act/g±DE	Promedio %Act±DE
Sangre	5,92±0,76	9,80x10 <sup>-3</sup> ±1,91x10 <sup>-3</sup>
Hígado	34,18±1,25	45,99±2,14
Corazón	1,17±0,22	0,34±0,08
Pulmón	10,99±1,06	2,35±0,54
Bazo	14,53±4,43	2,05±0,57
Riñón	8,95±0,50	3,90±0,11
Tiroides	3,69±0,47	0,51±0,16
Músculo	0,50±0,16	3,90x10 <sup>-3</sup> ±1,77x10 <sup>-3</sup>
Hueso	0,96±0,18	1,80x10 <sup>-3</sup> ±7,08x10 <sup>-4</sup>
Estómago	7,61±1,45	1,87±0,25
TGI	4,60±0,62	10,57±0,65
Tumor	1,09±0,31	0,19±0,07
Vejiga y orina	4,77±0,18	1,67±0,09
Tumor/Músculo	2,21±0,45	-
Tumor/Sangre	0,18±0,03	-

A los 30 minutos de haberse inyectado el radiofármaco, se observa una amplia distribución de éste a nivel del hígado ( $45,99 \pm 2,14$ ) y un porcentaje de actividad por gramo ( $34,18 \pm 1,25$ ). Esto indicaría que la vía hepato biliar es la principal vía de metabolización del complejo de Fenazina marcada.

Se obtuvieron, además, dos relaciones: tumor/músculo y tumor/sangre, de  $2,21 \pm 0,45$  y  $0,18 \pm 0,03$ , respectivamente. En la primera se observa una predominancia (el doble) de la actividad presente en el tumor con respecto a la presente en el músculo. Mientras que de la segunda se desprende una relación tumor/sangre muy inferior a 1, lo que indicaría que a este tiempo de distribución hay altos niveles en sangre, lo que a su vez es coherente con la alta tasa de unión a proteínas plasmáticas que presenta el complejo FNZ-<sup>99m</sup>Tc.

Luego se observan los resultados obtenidos para los ratones que fueron sacrificados 1 hora posterior a su inyección (Tabla 15).

*Tabla 15. % Actividad y Actividad/g expresadas con su correspondiente desviación estándar para los 4 ratones balb/c portadores de tumor mamario sacrificados 1 hora después de haberseles inyectado el radiofármaco.*

Órgano	Promedio %Act/g±DE	Promedio %Act±DE
Sangre	5,60±0,93	$5,00 \times 10^{-3} \pm 1,75 \times 10^{-3}$
Hígado	23,27±0,28	43,16±6,40
Corazón	1,14±0,18	0,36±0,03
Pulmón	12,17±4,78	4,04±1,15
Bazo	6,74±1,13	1,97±1,01
Riñón	9,16±1,54	3,36±0,24
Tiroides	3,59±0,96	0,51±0,02
Músculo	0,63±0,17	$2,00 \times 10^{-3} \pm 2,00 \times 10^{-4}$
Hueso	0,99±0,23	$1,20 \times 10^{-3} \pm 4,00 \times 10^{-4}$
Estómago	7,29±1,68	0,71±0,22
TGI	4,00±1,19	4,48±1,43
Tumor	0,93±0,02	0,29±0,02
Vejiga y orina	29,57±11,20	2,39±0,68
Tumor/Músculo	1,84±0,13	-
Tumor/Sangre	0,22±0,07	-

Posterior a 1 hora desde su inyección, el radiofármaco parece tener una distribución altamente concentrada a nivel hepático, con valores de porcentaje de actividad y porcentaje de actividad por gramo de  $23,27 \pm 0,28$  y  $43,16 \pm 6,40$ , respectivamente. Como se puede observar, de forma comparativa, estos valores son sutilmente menores que los obtenidos para el hígado a los 30 minutos de haberse inyectado a los ratones.

Además se obtienen las siguientes relaciones de actividad por gramo de  $1,84 \pm 0,13$  % para tumor/músculo y  $0,22 \pm 0,07$  % para tumor/sangre. Se observa un descenso de la primera en relación a los 30 minutos post-inyección, que se ve en la disminución de la actividad obtenida para el tumor (en este caso 0,93%, mientras que en el tiempo anterior la actividad era de 1,09%); y de un aumento en la actividad obtenida para el músculo (que es de 0,63% para 1 hora y 0,50% para 30 minutos post-inyección).

Para la segunda relación mencionada, vemos un leve aumento. Mientras que a los 30 minutos luego de la inyección se obtuvo una relación de  $0,18 \pm 0,03$  %, 1 hora posterior a la inyección se alcanzó una relación de  $0,22 \pm 0,07$  %. Este aumento se puede explicar a partir de un posible aumento de actividad situada en el tumor (que no es el caso, como se mencionó anteriormente) o una disminución de la actividad localizada en la sangre, que es observable, ya que para 30 minutos post-inyección la actividad en la sangre es de 5,92% mientras que para 1 hora post-inyección es de 5,60%.

Finalmente, se pueden observar los resultados obtenidos para los ratones que fueron sacrificados 2 horas después de su inyección (Tabla 16).

*Tabla 16. % Actividad y Actividad/g expresadas con su correspondiente desviación estándar para los 4 ratones sacrificados 2 horas después de haberseles inyectado el radiofármaco.*

Órgano	Promedio %Act/g $\pm$ DE	Promedio %Act $\pm$ DE
Sangre	7,23 $\pm$ 1,67	3,90 $\times 10^{-3}$ $\pm$ 1,71 $\times 10^{-3}$
Hígado	28,95 $\pm$ 3,88	47,64 $\pm$ 3,99
Corazón	1,30 $\pm$ 0,31	0,44 $\pm$ 0,15
Pulmón	14,46 $\pm$ 2,99	3,28 $\pm$ 0,86
Bazo	13,42 $\pm$ 4,06	2,60 $\pm$ 0,52
Riñón	8,55 $\pm$ 1,56	3,45 $\pm$ 0,93
Tiroides	3,43 $\pm$ 0,42	0,43 $\pm$ 0,12
Músculo	0,55 $\pm$ 0,13	2,00 $\times 10^{-3}$ $\pm$ 8,44 $\times 10^{-4}$
Hueso	0,91 $\pm$ 0,19	1,00 $\times 10^{-3}$ $\pm$ 4,10 $\times 10^{-4}$
Estómago	6,19 $\pm$ 0,76	1,80 $\pm$ 0,37
TGI	5,53 $\pm$ 1,68	13,98 $\pm$ 2,28
Tumor	1,64 $\pm$ 0,25	0,22 $\pm$ 0,06
Vejiga y orina	9,29 $\pm$ 2,15	4,94 $\pm$ 0,85
Tumor/Músculo	2,29 $\pm$ 0,28	-
Tumor/Sangre	0,19 $\pm$ 0,02	-

A este tiempo post inyección, se puede observar como la distribución del radiofármaco sigue teniendo predominancia en el hígado, con una actividad por gramo  $28,95 \pm 3,88$  % y de actividad  $47,64 \pm 3,99$  %. Se visualiza un pequeño aumento con respecto al último tiempo, debido a que se expresa una mayor captación del radiofármaco a nivel hepático a las 2 horas de inyectado que a la hora.

Las relaciones obtenidas son de  $2,29 \pm 0,28$  % para tumor/músculo y  $0,19 \pm 0,02$  % para tumor/sangre. Se observa un claro aumento con respecto a los dos tiempos anteriores en la primera relación mencionada, que se debe a un aumento significativo de la actividad localizada en el tumor. Estos resultados son sumamente positivos, ya que reflejarían que 2 horas post-inyección refieren al tiempo óptimo de distribución del radiofármaco, aumentando su captación a nivel tumoral. Las relaciones obtenidas para cada tiempo se puede apreciar en la Tabla 17.

Tabla 17. Relaciones porcentuales tumor/músculo y tumor/sangre para cada uno de los tiempos estudiados.

Tiempo (min)	Relación tumor/músculo (%)	Relación tumor/sangre (%)
30	2,21 ± 0,45	0,18 ± 0,03
60	1,84 ± 0,13	0,22 ± 0,07
120	2,29 ± 0,28	0,19 ± 0,02

Por último, como se mencionó anteriormente, la actividad en el tumor aumentó, desde 1,09% para 1 hora, a 1,64% para 2 horas. Este cambio es muy positivo porque indica una mayor selectividad del radiofármaco por el tumor, ya que al aumentar el tiempo es coherente con una captación pasiva<sup>92</sup>.

Se puede observar a continuación las gráficas de los 3 tiempos utilizados para este experimento mostrando el porcentaje de actividad (30 minutos, 1 hora y 2 horas) (Figura 30) y el porcentaje de actividad por gramo (Figura 31).

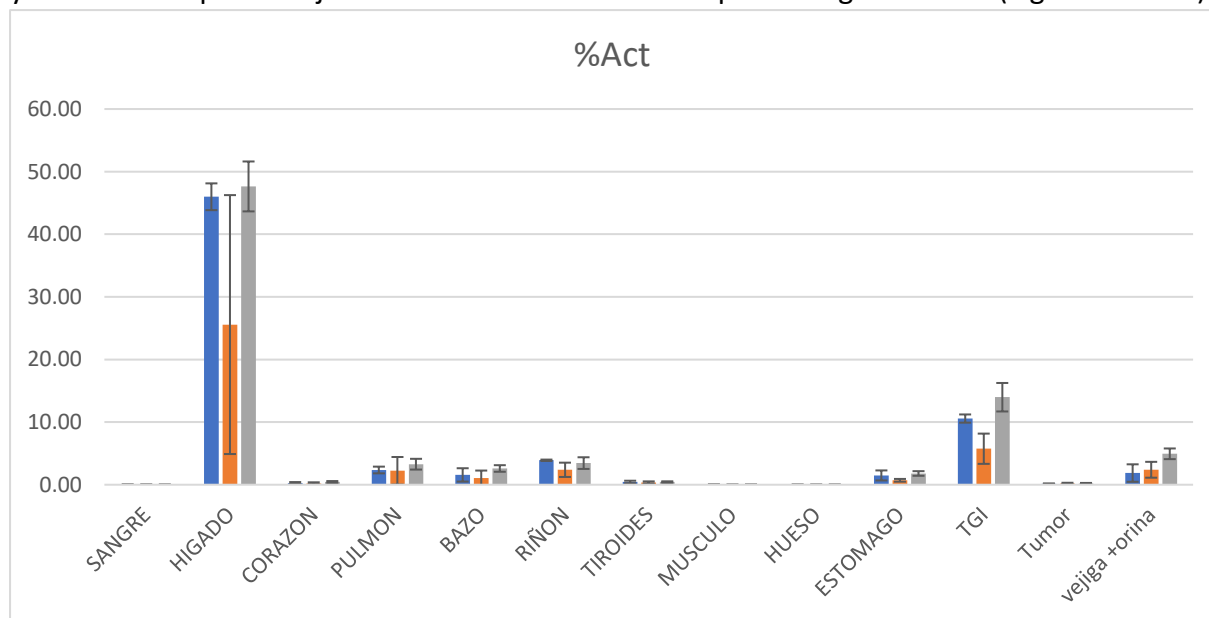


Figura 30. Gráfico del porcentaje de actividad de todos los órganos del ratón, medida en el contador de cuentas por 10 segundos Ortec, en función al tiempo transcurrido desde la inyección del radiofármaco al ratón. En azul se puede apreciar el gráfico de los 30 minutos post-inyección, en naranja el de 1 hora post-inyección y en gris el de 2 horas post-inyección (Primer experimento)

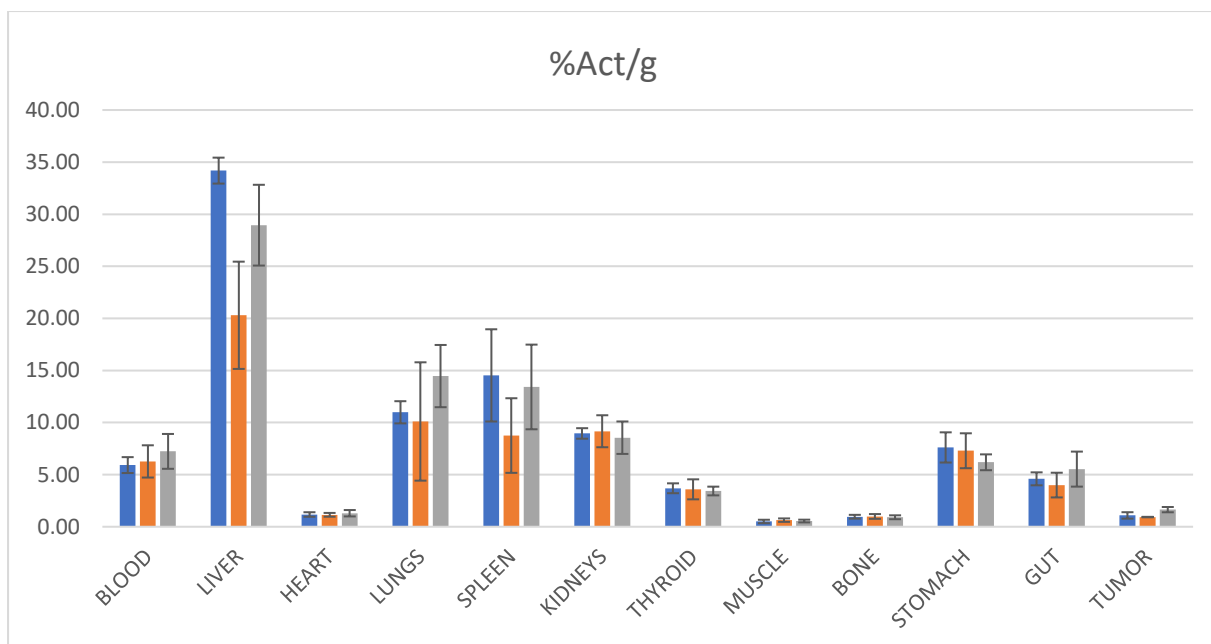


Figura 31. Gráfico del porcentaje de actividad por gramo de todos los órganos del ratón, medida en el contador de cuentas por 10 segundos Ortec, en función al tiempo transcurrido desde la inyección del radiofármaco al ratón. En azul se puede apreciar el gráfico de los 30 minutos post-inyección, en naranja el de 1 hora post-inyección y en gris el de 2 horas post-inyección (Primer experimento).

En la Figura 30 se puede apreciar que las regiones del organismo que poseen el porcentaje de actividad predominante son el hígado y los intestinos (en menor medida). El tumor se visualiza con barras muy pequeñas, esto da el indicio de poca captación del radiofármaco en dicha región.

En la Figura 31 se observa una distribución más homogénea de la actividad por gramo de órgano. Aún se sigue advirtiendo una predominancia del radiofármaco en el hígado. Finalmente, se aprecia que a los 30 minutos de ser inyectados los ratones, a nivel tumoral, la actividad por gramo es mayor que luego de 1 hora. Posteriormente, tiene un aumento luego de pasadas 2 horas de la inyección del radiofármaco.

El segundo experimento en un estadio tumoral más avanzado se realizó con la expectativa de obtener mayores regiones hipóxicas. Éste implicó que se utilizaran 8 ratones, 1 hora (n=4) y 2 horas(n=4) post inyección. A continuación, se pueden observar los resultados obtenidos para los ratones sacrificados luego de 1 hora post inyección (Tabla 18).

Tabla 18. %Actividad y %Actividad/g expresadas con su correspondiente desviación estándar para los 4 ratones sacrificados 1 hora post inyección, en estadio tumoral más avanzado (Segundo experimento).

Órgano	Promedio %Act/g±DE	Promedio %Act±DE
Sangre	6,39±0,60	6,60x10 <sup>-3</sup> ±1,11x10 <sup>-3</sup>
Hígado	44,78±9,64	46,53±6,86
Corazón	1,47±0,22	0,28±0,04
Pulmón	5,85±1,75	1,63±0,28
Bazo	8,86±1,46	1,28±0,58
Riñón	7,80±2,11	2,94±1,03
Tiroides	3,47±1,06	0,48±0,12

Músculo	0,54±0,11	5,60x10 <sup>-3</sup> ±9,34x10 <sup>-4</sup>
Hueso	0,91±0,14	1,90x10 <sup>-3</sup> ±6,33x10 <sup>-4</sup>
Estómago	4,21±0,30	0,87±0,18
TGI	6,35±0,56	12,99±0,36
Tumor	1,33±0,28	0,05±0,01
Vejiga y orina	16,98±2,51	4,05±1,34
Tumor/Músculo	2,55±0,33	-
Tumor/Sangre	0,20±0,06	-

Luego de pasada 1 hora desde su inyección, el radiofármaco presenta alta captación a nivel hepático, como se observa en ambos valores, tanto el porcentaje de actividad por gramo como también el porcentaje de actividad, siendo éstos de 44,78 ± 9,64 % y 46,53 ± 6,86 %, respectivamente.

Se obtuvieron las relaciones tumor/músculo y tumor/sangre, de 2,55 ± 0,33 % y 0,20 ± 0,06 %, respectivamente. El primero da cuenta de una predominancia de la actividad del tumor muy marcada en relación a la obtenida para el músculo. Esto es muy positivo, ya que indica que el radiofármaco fue captado por el tumor con preferencia. En el caso de la segunda relación, se observa una cifra menor a 1, lo que indica selectividad por la sangre por encima del tumor, es decir, la actividad por gramo obtenida para la misma es notoriamente mayor que aquella obtenida para el tumor, demostrando una alta actividad a nivel de pool sanguíneo y una baja captación a nivel tumoral a 1 h post inyección, información que es coherente con la alta unión a proteínas plasmáticas que presenta el complejo marcado.

La otra región en la que se aprecia un porcentaje de actividad por gramo es la vejiga y la orina, lo que indica otra vía de excreción del radiofármaco.

A continuación se puede observar la tabla obtenida para los ratones que fueron sacrificados a las 2 horas de ser inyectados (Tabla 19).

*Tabla 19. % Actividad y %Actividad/g expresadas con su correspondiente desviación estándar para los 4 ratones sacrificados 2 horas post inyección con modelo tumoral de 14 días , correspondiente a estadio tumoral más avanzado.*

Órgano	Promedio %Act/g±DE	Promedio %Act±DE
Sangre	6,88±1,10	3,20x10 <sup>-3</sup> ±1,05x10 <sup>-3</sup>
Hígado	47,50±7,45	47,24±5,04
Corazón	1,57±0,32	0,24±0,01
Pulmón	3,71±1,33	0,51±0,06
Bazo	7,67±1,84	1,09±0,21
Riñón	6,04±0,75	1,86±0,55
Tiroides	3,22±0,67	0,31±0,09
Músculo	0,54±0,11	1,70x10 <sup>-3</sup> ±6,36x10 <sup>-4</sup>
Hueso	1,05±0,20	1,00x10 <sup>-3</sup> ±4,37x10 <sup>-4</sup>
Estómago	3,54±0,56	0,71±0,09
TGI	6,95±0,47	10,24±1,20
Tumor	1,07±0,13	0,16±0,04



Vejiga y orina	17,55±10,09	10,10±2,70
Tumor/Músculo	2,34±0,30	-
Tumor/Sangre	0,30±0,04	-

Luego de 2 horas de que el radiofármaco fue inyectado, se sigue observando su eliminación mayoritariamente hepática, lo que es esperable teniendo en cuenta las marcaciones con tricarbonilo que presentan alta captación hepática<sup>92</sup>. Ambos valores, tanto el porcentaje de actividad por gramo como el porcentaje de actividad son los más elevados, siendo de  $47,50 \pm 7,45 \%$  y  $47,24 \pm 5,04 \%$ , respectivamente.

Luego se obtuvieron las relaciones de tumor/músculo y tumor/sangre a 2 h post inyección, que fueron de  $2,34 \pm 0,30 \%$  y  $0,30 \pm 0,04 \%$ , respectivamente. La primera, como en el caso anterior, es mayor a 1, lo que indica una preferencia y una selectividad del radiofármaco por el tumor y no por el músculo. Esto se puede visualizar en el porcentaje de actividad por gramo, que en el caso del primero es de  $1,07 \pm 0,13 \%$  y en el caso del segundo es de  $0,54 \pm 0,11 \%$ , lo que es notoriamente menor. La relación tumor/sangre es considerablemente menor a 1, lo que implica una mayor presencia del radiomarcado en la sangre que en el tumor, ya que ésta es de  $0,30 \pm 0,04 \%$ .

La actividad presente en el tumor no es muy alta con respecto a otras regiones del organismo del ratón, lo que da indicios de baja selectividad por parte del radiofármaco por esta región. Además se visualiza un pequeño descenso del porcentaje de actividad por gramo con respecto a los ratones sacrificados 1 hora post inyección.

Se observa un porcentaje de actividad por gramo apreciable en la vejiga y en la orina, lo que indica otra vía de excreción del radiofármaco, al igual que en el caso anterior.

A continuación se observan las gráficas obtenidas para el porcentaje de actividad (Figura 32) y para el porcentaje de actividad por gramo (Figura 33) para los dos tiempos tomados en cuenta de 1 hora y 2 horas de sacrificio post-inyección.

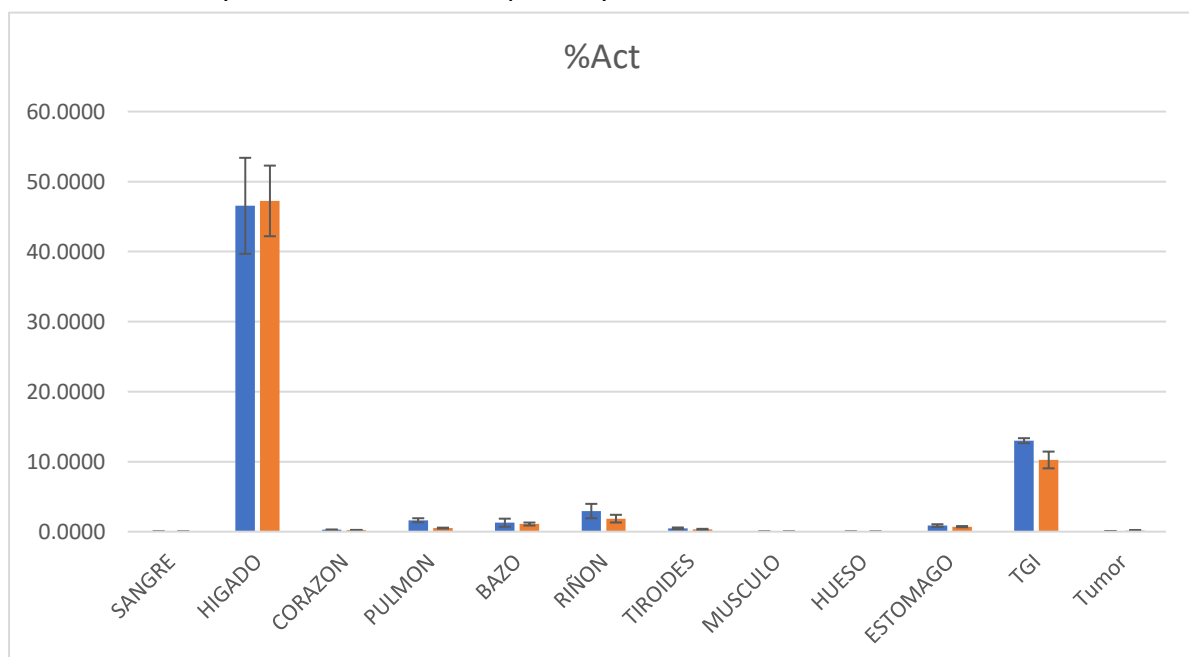


Figura 32. Gráfico del porcentaje de actividad de todos los órganos del ratón, medida en el contador de cuentas por 10 segundos Ortec, en función al tiempo transcurrido desde la inyección del radiofármaco al ratón. En azul se puede apreciar el gráfico de la hora post-inyección y en naranja el de 2 horas post-inyección de modelo tumoral en estadio más avanzado (Segundo experimento).

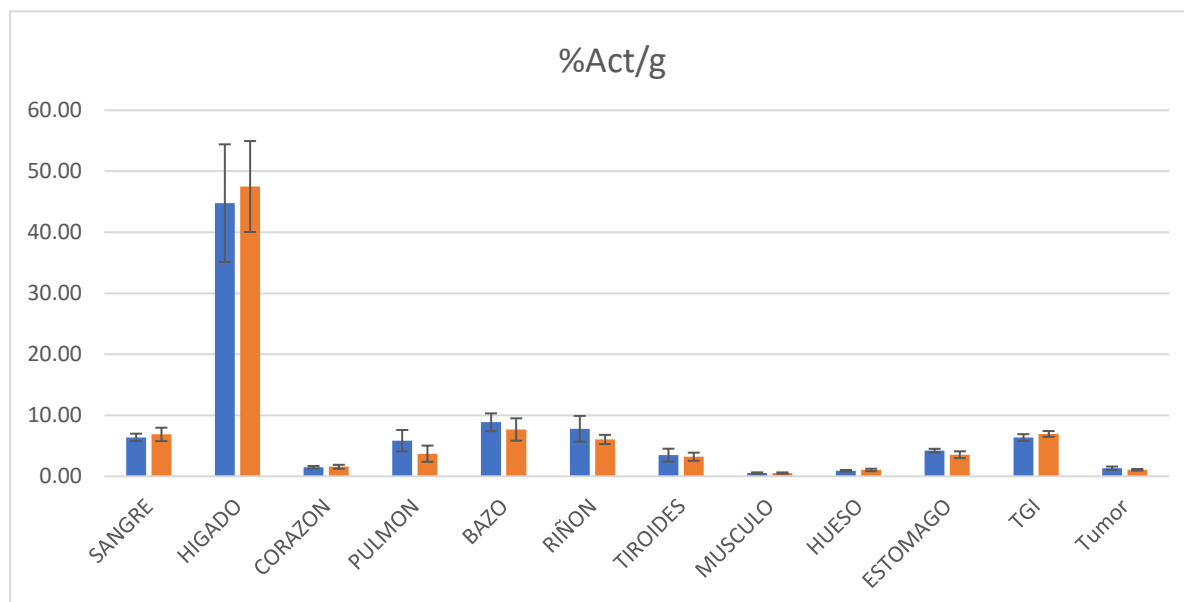


Figura 33. Gráfico del porcentaje de actividad por gramo de todos los órganos del ratón, medida en el contador de cuentas por 10 segundos Ortec, en función al tiempo transcurrido desde la inyección del radiofármaco al ratón. En azul se puede apreciar el gráfico de la hora post-inyección y en naranja el de 2 horas post-inyección del modelo tumoral en estadio más avanzado.

Como se puede observar en el gráfico de la Figura 32, hay una predominancia muy marcada del porcentaje de actividad a nivel hepático, con valores cercanos al 50% aproximadamente. La otra región que posee un gran porcentaje de actividad son los intestinos, aunque se observa que es en una medida menor a la del hígado. Éste tiene un leve aumento de su porcentaje de actividad con el paso del tiempo, mientras que los intestinos tienen un leve descenso a medida que transcurre el tiempo. En el caso del hígado se puede observar que sucede lo mismo que en el experimento anterior: hay un aumento del porcentaje de actividad desde 1 a 2 horas post-inyección, lo que sugiere que es la vía principal de metabolización. El resto de las regiones no posee gran presencia porcentual de actividad. Esto también ocurrió en el primer experimento con un estadio tumoral menos avanzado, en el que las únicas dos regiones que presentaban un porcentaje significativo de actividad eran los intestinos y el hígado, lo que demuestra una biodistribución consistente del complejo FNZ-<sup>99m</sup>Tc.

El hígado tiene un aumento en su porcentaje de actividad por gramo desde 1 a 2 horas post-inyección (Figura 33). En este caso, si se lo compara con el primer experimento realizado, se puede observar el mismo proceso: luego de 2 horas de la inyección, el porcentaje aumenta con respecto a 1 hora posterior. La región que presenta un porcentaje sutilmente mayor al del resto de las regiones es el bazo, lo que difiere con el primer experimento. En el caso de éste, el porcentaje disminuye con el tiempo. Finalmente, al observar el tumor se visualiza que, en el caso del gráfico de la Figura 33 hay una leve disminución de su porcentaje de actividad

por gramo en el transcurso del tiempo. Esto podría sugerir que la FNZ-<sup>99m</sup>Tc no queda apreciablemente retenida a nivel tumoral en este estadio.

### 7.8.1. Imágenes centellográficas

Luego se realizó la obtención de la imagen centellográfica de los ratones con el radiomarcado (Figura 35). En dicha imagen se puede observar la biodistribución a 30 minutos post inyección intravenosa del complejo radiomarcado en el modelo de ratón Balb/c con tumor de mama inducido 4T1, donde claramente hay una captación preferencial por parte del hígado.

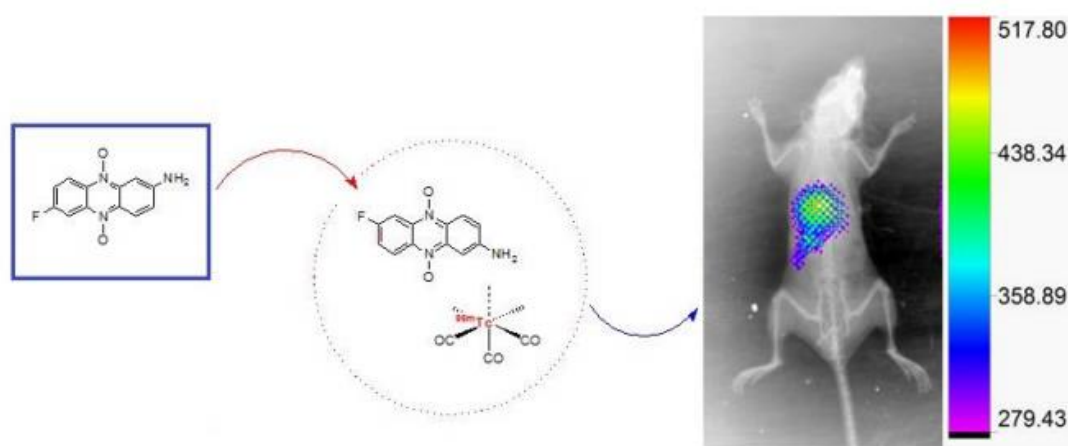


Figura 34. Esquema del proceso de obtención del pro-fármaco y su posterior inyección en los ratones, para la obtención de la imagen. La escala es en unidades arbitrarias.

Esto es coherente con los resultados obtenidos en los ensayos de biodistribución, en donde el hígado también es el que posee mayor actividad y, por tanto, mayor presencia del radiotrazador inyectado. Asimismo, en las imágenes centellográficas obtenidas no se visualiza captación apreciable a nivel tumoral, lo que es coherente con los ensayos de biodistribución. Además es importante mencionar que a 1 y 2 h el patrón de distribución observado en las imágenes centellográficas es muy similar al de 30 min que se muestra anteriormente (datos no mostrados).

### 7.9. Estudio preliminar de la formación del complejo FNZ-<sup>185</sup>Re, mediante caracterización por HPLC

Se realizó la metodología de síntesis con diferentes proporciones de reactivos para determinar la más adecuada y la que presentase mayor rendimiento de formación del producto final de interés (el complejo FNZ-<sup>185</sup>Re). Estas relaciones fueron entre <sup>185</sup>Re:FNZ de 1:10, 1:1 y 1:0,2.

El análisis de los cromatogramas de HPLC de los sistemas de reacción se hizo tomando en cuenta los cambios en el tiempo de retención con respecto a los de los cromatogramas de la FNZ. Se intentó obtener un cromatograma de HPLC para el otro reactivo de interés de esta

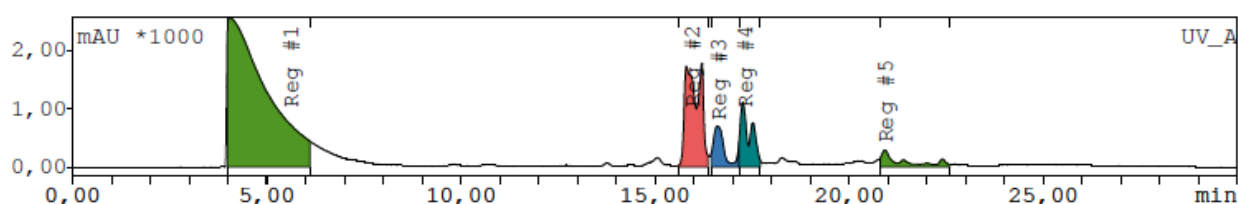
reacción: el Bromuro de pentacarbonilrenio (referido aquí como  $^{185}\text{Re}$ ) pero este compuesto no presentó señales en las condiciones cromatográficas utilizadas.

Todos los cromatogramas mencionados y analizados se obtuvieron con el gradiente descrito en “Materiales y métodos” punto 6.2. Las tres condiciones antedichas fueron analizadas con buffer fosfato 20 mM como una de las fases móviles del HPLC, a excepción de la última que también se realizó con Buffer Fosfato 2 mM porque fue la que mejor resultado ofreció.

Respecto a los rendimientos, la relación que condujo al mayor valor fue la de 1:1. En la Tabla 20 a continuación se muestran estos datos.

Tabla 20. Porcentajes de presencia del complejo FNZ- $^{185}\text{Re}$  de interés de los experimentos con diferentes relaciones entre reactivos.

Proporción de la reacción $^{185}\text{Re}$ :FNZ	Porcentaje de presencia del pico en el entorno a los 20 min de tiempo de retención (%)
1:10 (Buffer Fosfato 20 mM)	0
1:1 (Buffer Fosfato 20 mM)	1,51



Sustancia	Tiempo de retención (minutos)	Cuentas de área	% Área (%)
Pico característico FNZ (REG #1)	4,07	177622,7	66,01
Impureza 1 (REG #2)	15,83	47188,2	17,54
Impureza 2 (REG #3)	16,62	13665,0	5,08
Impureza 3 (REG #4)	17,27	20167,8	7,50
Complejo FNZ- $^{185}\text{Re}$ (REG #5)	20,93	10437,2	3,88

Figura 35. Cromatograma de HPLC obtenido para el complejo FNZ- $^{185}\text{Re}$  en proporción 1:1. También, está presente el cuadro de purzas relativas de los diferentes picos.

El cromatograma del sistema de reacción en proporción 1:1 con la fase móvil buffer Fosfato 2 mM presentó el pico ancho característico de la FNZ con 4,07 minutos de tiempo de retención, otro pico con tiempo de retención 15,83 minutos, otro con tiempo de retención 16,62 minutos, otro con tiempo de retención de 17,27 minutos y por último uno pequeño con tiempo de retención 20,93 minutos (Figura 35). En comparación al cromatograma obtenido con el mismo buffer pero de concentración 10 veces mayor como fase móvil A de la columna, los picos presentan una menor intensidad, pero los tiempos de retención son extremadamente similares y en algunos casos exactamente iguales. La diferencia más notoria refiere a los porcentajes relativos de presencia de cada compuesto. El porcentaje que tuvo un cambio más significativo es el correspondiente al pico de 20,93 minutos de tiempo de

retención. Éste pasó de ser 1,51% a 3,88%. En su mayoría, es un cromatograma muy similar al realizado anteriormente. Si se toma en cuenta que el pico obtenido en 20,93 minutos de tiempo de retención puede llegar a ser el Complejo2017-1, el hecho de que haya aumentado su porcentaje relativo implica un punto positivo, ya que esto implicaría que estas condiciones permiten una mejor resolución.

Luego de esto, se obtuvo el cromatograma de HPLC con el buffer de concentración 2 mM como fase móvil A, de las diferentes fracciones obtenidas una vez que la reacción en proporción 1:1 se repitió. Luego de filtrar el sistema de reacción a vacío, se obtuvieron 3 fracciones diferentes: las aguas madres (AM), el sólido filtrado (SF, que se obtuvo en cantidades muy bajas) y el sólido remanente de la filtración (SRF, que tenía un aspecto bastante similar a la FNZ y se ubicó en el balón de reacción).

El cromatograma de HPLC correspondiente al SF presentó dos picos: Uno en 4,32 minutos de tiempo de retención muy intenso y ancho, que representa el pico característico de la FNZ, y otro muy pequeño de un porcentaje relativo mucho menor, con tiempo de retención 17,87 minutos, que se asemeja al obtenido en el cromatograma de la FNZ (Figura 36). Esto permite extraer que el SF es únicamente FNZ y no contiene el Complejo2017-1.

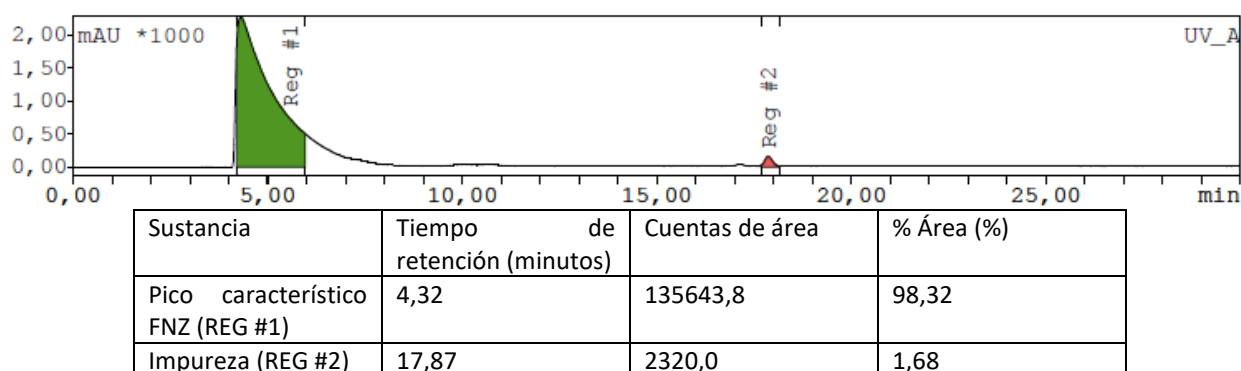
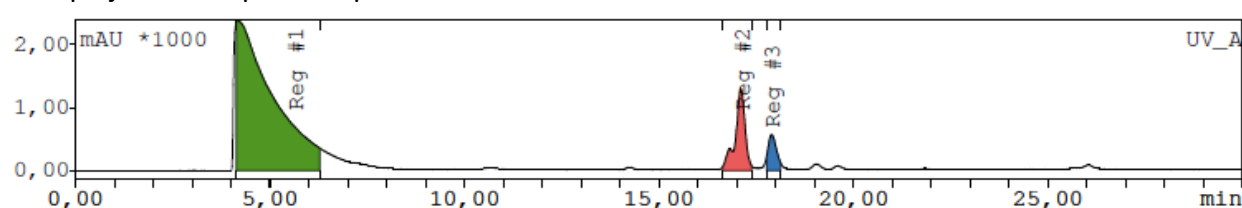


Figura 36. Cromatograma de HPLC obtenido para el sólido filtrado del sistema de reacción del complejo FNZ-<sup>185</sup>Re en proporción 1:1. También, está presente el cuadro de purezas relativas de las diferentes señales.

El cromatograma de HPLC obtenido para el SRF presentó 3 picos: uno muy ancho e intenso a los 4,18 minutos de tiempo de retención, que pertenece a la FNZ, uno con 17,12 minutos de tiempo de retención, que también pertenece a la impureza presente en la FNZ, dada su forma y tiempo de retención similares, y uno pequeño con 17,90 minutos de tiempo de retención, que al no diferenciarse tanto en su tiempo de retención con el pico de la FNZ (diferencia menor a 1 minuto), es probable que también esté presente dada la presencia de la misma (Figura 37). Las diferencias porcentuales entre este espectro y el de la FNZ son muy sutiles, ya que el pico característico de la FNZ a los 4 minutos tiene una presencia porcentual de 90,44% en el cromatograma de la misma, mientras que en el cromatograma aquí descrito dicho porcentaje es de 83,26%, siendo éstos muy similares entre sí. Lo mismo sucede con el otro pico de la FNZ a los 17 minutos, que tiene porcentajes de 9,56% y 12,25% respectivamente para cada uno. Todo lo antedicho lleva a inferir que este SRF tampoco contiene el Complejo2017-1 que se esperaba formar.



Sustancia	Tiempo de retención (minutos)	Cuentas de área	% Área (%)
Pico característico FNZ (REG #1)	4,18	154185,9	83,26
Impureza 1 (REG #2)	17,12	22678,6	12,25
Impureza 2 (REG #3)	17,90	8313,3	4,49

Figura 37. Cromatograma de HPLC obtenido para el sólido remanente de la filtración del sistema de reacción del complejo FNZ-<sup>185</sup>Re en proporción 1:1. También, está presente el cuadro de purzas relativas de las diferentes señales.

Finalmente, se obtuvo el cromatograma de HPLC de las AM. Éste presentó un mayor número de picos que los anteriormente analizados (Figura 38). En primer lugar es importante acotar que el pico característico de la FNZ (con 4 minutos de tiempo de retención aproximadamente) que había aparecido en los cromatogramas de las fracciones anteriores no aparece en éste, lo que indica una presencia menor de FNZ en las AM que en las fracciones anteriores, resultando un aspecto positivo. El primer conjunto de picos se ubica en un tiempo de retención de 16,70 minutos, siendo éstos de gran intensidad y presentando una presencia relativa de 21,68%. El segundo conjunto de picos tiene un tiempo de retención de 17,42 minutos, con una presencia relativa de 31,71%. Luego, el tercer conjunto posee un tiempo de retención de 19,07 minutos y una presencia porcentual de 36,34%. De estos 3 conjuntos de picos, el que podría llegar a representar al Complejo2017-1 es el de tiempo de retención 19,07 minutos, ya que no se ve representado en el cromatograma de la FNZ por ningún pico, lo que indicaría la aparición de una posible nueva molécula (Figura 39). Además, este tiempo de retención presenta cierta similitud a 21,5 y 22,5 minutos de moléculas de FNZ unidas a <sup>99m</sup>Tc lo que es sugerente ya que el átomo de <sup>185</sup>Re presenta características muy similares al átomo de <sup>99m</sup>Tc<sup>93</sup>. Tomando en cuenta los valores de porcentajes relativos de los conjuntos de picos

expresados anteriormente, si el tercero representase al complejo de interés, sería muy positivo, ya que su presencia porcentual es considerable. Por último, se visualiza un pico con tiempo de retención de 26,13 minutos, que también podría llegar a corresponderse con la molécula del Complejo2017-1 formado, y que posee una presencia relativa de 10,26%. Su porcentaje relativo es el más bajo entre los picos del cromatograma, esto indicaría que el rendimiento de la reacción no sería muy alto si este fuese el complejo de interés.

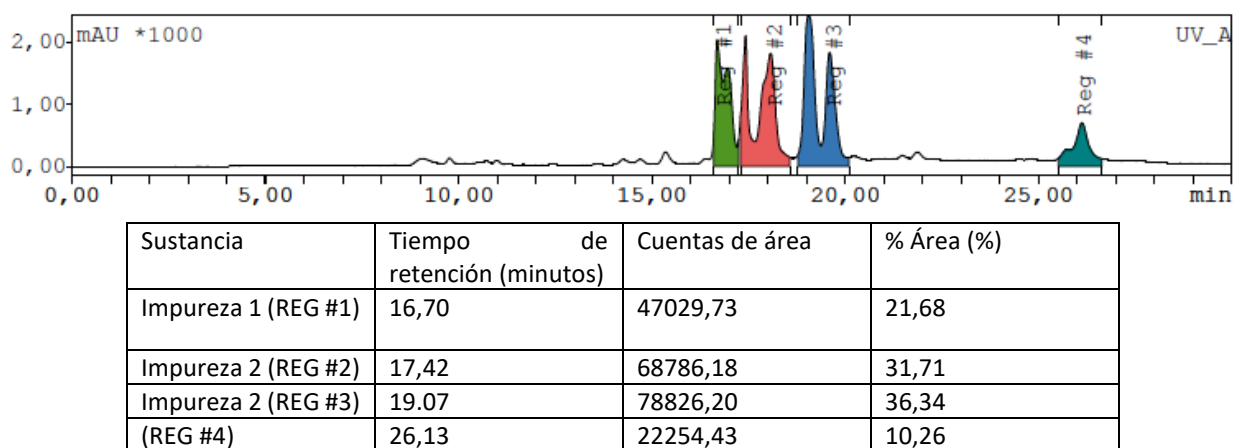


Figura 38. Cromatograma de HPLC obtenido para las aguas madres de la filtración del sistema de reacción del complejo FNZ-<sup>185</sup>Re en proporción 1:1. También, está presente el cuadro de purzas relativas de las diferentes señales.

Considerando el análisis realizado a todos los cromatogramas de HPLC, el complejo formado entre el <sup>185</sup>Re y la FNZ parece estar presente en las AM obtenidas por la filtración del sistema de reacción, dada la presencia de picos alternativos a los ya vistos en el cromatograma de la FNZ obtenido, utilizando buffer de concentración 2 mM como fase móvil. La presencia del complejo se analizará, luego de una cromatografía preparativa en fase C18, por microscopía electrónica de barrido.

En la Figura 40 se puede apreciar una foto de la cromatografía preparativa C18, en la que se sembraron las AM, de forma tal que se purificara la fracción que tentativamente pueda poseer al complejo de interés.

A partir del sembrado de las AM en la TLC preparativa se obtuvieron 4 manchas: la mancha 1, con un tono amarronado, intenso y que se encuentra en el origen de la placa; la mancha 2, con un tono rosado pálido, que se encuentra por debajo de la mancha violácea; la mancha 3, que es violácea y se podría corresponder a la FNZ, comprobado por su R<sub>f</sub>; finalmente, la mancha 4 que es de un tono amarillento y posee un R<sub>f</sub> mayor que el de la mancha 3.

Este análisis de cromatografía preparativa se realizó en fase reversa, fase estacionaria C18 con una fase móvil buffer fosfato pH 2,5 al 1% de etanolamina 2 mM: MeOH 50:50, las manchas 1-4 se corresponderían con registros REG#4-REG#1 de la Figura 38, respectivamente.

El sólido obtenido luego de dicho procedimiento (ver materiales y métodos) se utiliza para la obtención del cromatograma de HPLC. Para realizarlo, se toma una punta de espátula de dicho producto que se diluye en 50  $\mu\text{L}$  de DMSO (ver figura 39)

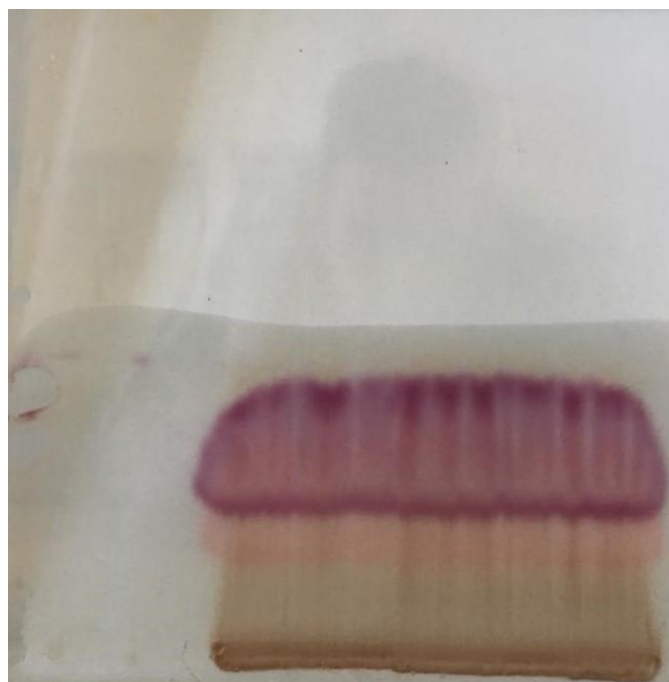


Figura 39. TLC preparativa C18 con AM sembradas.

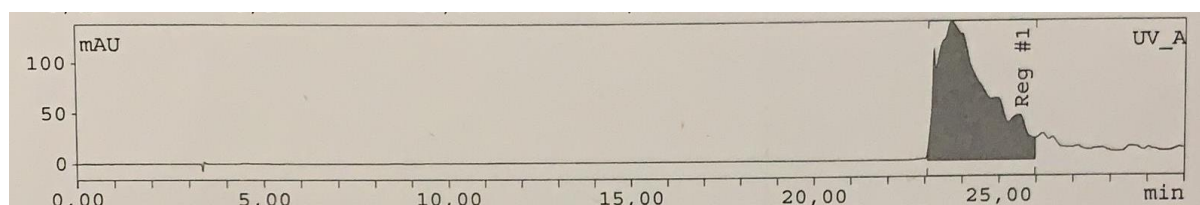


Figura 40. Cromatograma de HPLC obtenido para la punta de espátula del producto rotavaporado de la TLC preparativa de las AM y su cuadro correspondiente de presencias porcentuales relativas.

En el cromatograma de la Figura 40, se obtuvo un único pico a los 23,38 minutos de tiempo de retención para el producto evaporado a vacío de la TLC preparativa para las AM. Aquel representaría al complejo de interés  $\text{FNZ-}^{185}\text{Re}$ , ya que confirma que la reacción de síntesis del mismo fue exitosa y se encuentra en las AM.

Además, este tiempo de retención se asemeja al del complejo  $\text{FNZ-}^{99\text{m}}\text{Tc}^{92}$ , lo que se corresponde con la estructura que se esperaba obtener con Re de este complejo. También el hecho de que se visualice únicamente este pico es concluyente de una única especie (nuestro producto de interés), ya que se espera una mayor pureza del mismo luego de la cromatografía TLC preparativa.



## 7.10. Estudio por microscopía electrónica de barrido del complejo entre $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}$ y FNZ

La mancha 1 se extrajo de la placa de fase reversa, por extracción con acetona, y se procedió a realizar la microscopía electrónica de barrido. De una de las microscopías analizadas pudo obtenerse un espectro completo, que revela el contenido de Re y además otros elementos propios, y no de la estructura esperada (Figura 42).

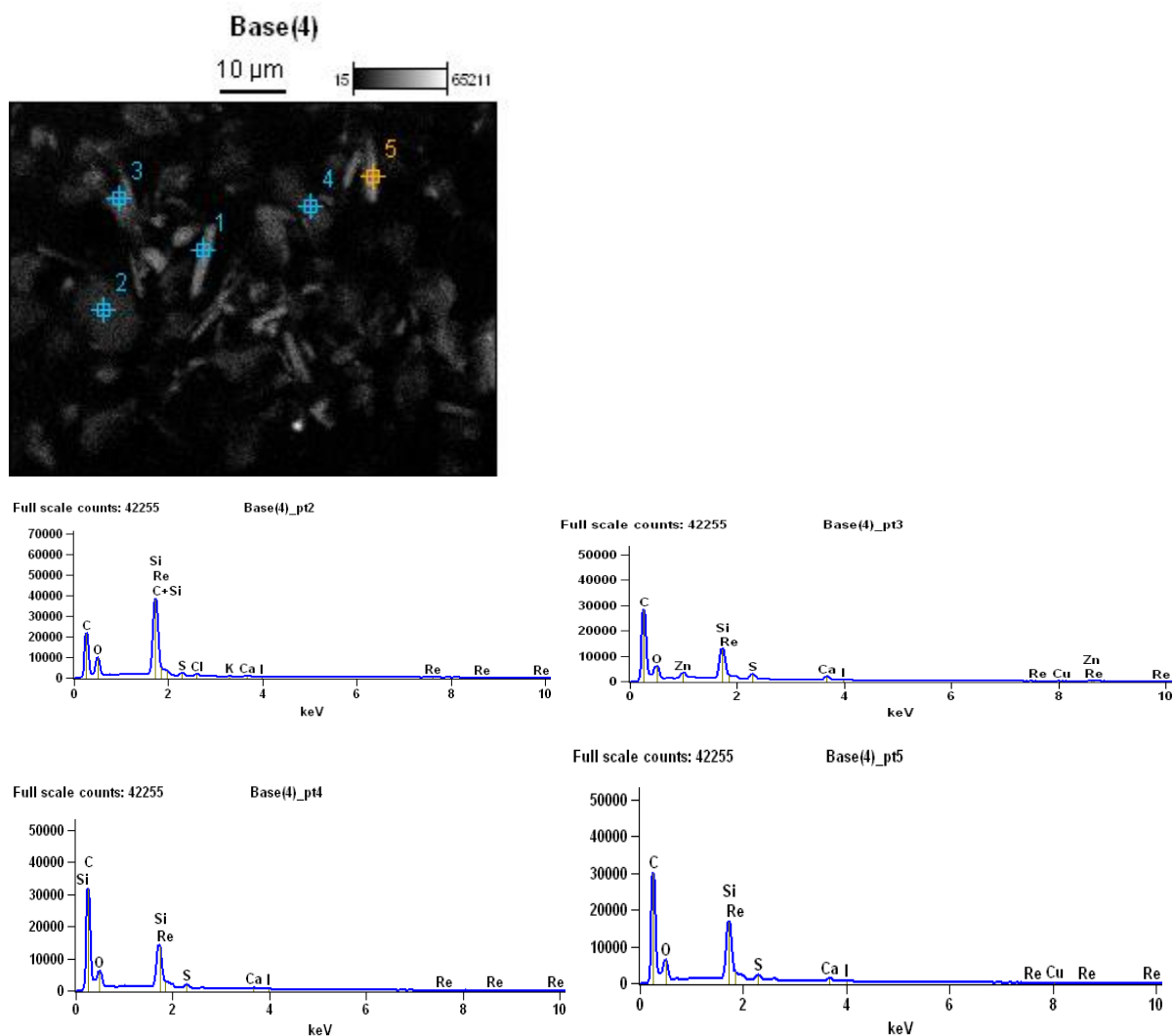


Figura 41. a) Microfotografía de los sólidos seleccionados para ser estudiados. b)-e) Análisis elemental de los sólidos seleccionados.

Lamentablemente en este estudio se evidenció alta proporción de la fase estacionaria de la cromatografía, evidenciado por la presencia de Si propio del Si-C18, y algo del disolvente de reacción y de siembra de la muestra, evidenciado por la presencia de S propio del dimetilsulfóxido. Esto imposibilitó un correcto análisis elemental del complejo  $^{185}\text{Re}$ -FNZ. Sin embargo, algunos resultados interesantes pueden ser extraídos sobre el análisis de las muestras:

- No hay átomos de flúor, lo que estaría mostrando una posible sustitución de este átomo (por su alta capacidad como grupo saliente) por nucleófilos del medio de reacción (agua u otro nucleófilo).
- No hay átomos de bromo, lo que estaría indicando que éste es desplazado del complejo de Re de partida y que tampoco queda como contraión del complejo.
- Un cálculo inicial de la fórmula empírica del complejo (a partir de los datos cuantitativos del análisis, estudios no mostrados) indicaría que es posible (por la baja relación de renio frente a carbono y oxígeno) que los seis ligandos del complejo inicial (los cinco CO y el Br) son sustituidos, en estas condiciones de reacción, por seis FNZ.
- Por la ausencia de contraión, bromuro, en el complejo (excepto que fuese anión hidroxilo) indicaría que la FNZ no estaría coordinando sobre la funcionalidad óxido del *N*-óxido, por lo que las opciones son los electrones no-enlazados del NH<sub>2</sub> o del OH de la FNZ, estando necesariamente uno de estos grupos desprotonados para mantener la neutralidad del Re(I).

## 8. Conclusiones

En la presente tesis se describió y evaluó la funcionalidad de la FNZ como potencial agente diagnóstico en un modelo de cáncer de mama metastásico simil fase 4 humano.

Se sintetizó de forma efectiva y exitosa al complejo FNZ-<sup>99m</sup>Tc, con una pureza radioquímica del 95,7%. Éste es estable en las condiciones de reacción por al menos 24 horas y presenta una lipofilicidad adecuada para su pasaje a través de membranas biológicas. *In vitro* se demuestra que la estabilidad del complejo radiomarcado se podría ver alterada *in vivo* (ensayo de competencia con histidina) y se aprecia una unión a proteínas en suero por al menos 3 horas.

*In vivo* el complejo evidenció que luego de 2 horas de inyectado IV, había una alta captación por parte del tumor, reflejado en las relaciones tumor/músculo, tumor/sangre y tumor/hígado.

Por último, la síntesis del complejo de referencia no radiactivo, el conjugado de FNZ ligado a el <sup>185</sup>Re, se obtuvo eficientemente a partir de las aguas madres de la síntesis propuesta. Se ha podido caracterizar eficientemente.

Aunque todavía se necesitan mayores estudios y evaluaciones de los radiofármacos basados en FNZ, los resultados obtenidos proporcionan información sobre sus perspectivas de aplicación en diagnóstico oncológico que alientan a continuar con dicha investigación.

## 9.Perspectivas

Dicho complejo se podría explorar en otros tipos de cáncer con características hipóxicas que permitan una adecuada internalización, donde sería interesante evaluar su perfusión sanguínea, ya que nos dará indicios de mejoras en la difusión pasiva hacia el tumor.

Además, se podría profundizar en nuevos complejos de otros derivados N-óxido, con interesantes acciones farmacológicas. Esto implicaría nuevos experimentos de síntesis, caracterización y evaluación *in vitro* e *in vivo*.

## 10. Abreviaturas

Bfx: 5-fluorobenzofuroxano

DMF: N, N- dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

Et<sub>3</sub>N: Trietilamina

Et<sub>2</sub>O: Dietiléter

P-AF: p-aminofenol

EtOAc: Acetato de etilo

FNZ: N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-dióxido de 2-amino-7(8)-fluoro

MeOH: Metanol

EP: Éter de petróleo

<sup>1</sup>H 1H RMN: Resonancia Magnética Nuclear de protón.

Tc-FNZ: Tc(CO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-dióxido de 2-amino-7(8)-fluoro

Re(CO)<sub>5</sub>Br: Bromuro de Pentacarbonilo de Renio

PRQ: Pureza Radioquímica

AM: aguas madres

SF: sólido filtrado

SRF: sólido remanente filtrado

FNZ-<sup>185</sup>Re: Complejo formado entre Re(CO)<sub>5</sub>Br y N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-dióxido de 2-amino-7(8)-fluoro

FNZ-<sup>99m</sup>Tc: Complejo formado entre Tc(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub> y N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-dióxido de 2-amino-7(8)-fluoro

IV: Intravenoso

## 11. Bibliografía

1. <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>. Setiembre 2017
2. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. Setiembre 2017.
3. <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer>. Setiembre 2017.
4. Lee, M., Katabathina, V., Bowerson, M., Mityul, M., Shetty, A., Elsayes, K., Balachandran, A., Bhosale, P., McCullough, A. and Menias, C. (2017). BRCA-associated Cancers: Role of Imaging in Screening, Diagnosis, and Management. *RadioGraphics*, 37(4), pp.1005-1023.
5. [https://www.breastcancer.org/es/sintomas/cancer\\_de\\_mama/que\\_es\\_cancer\\_mama](https://www.breastcancer.org/es/sintomas/cancer_de_mama/que_es_cancer_mama). Agosto 2020.
6. Antoniou, A. (2005). Breast and ovarian cancer risks to carriers of the BRCA1 5382insC and 185delAG and BRCA2 6174delT mutations: a combined analysis of 22 population based studies. *Journal of Medical Genetics*, 42(7), pp.602-603.
7. <https://www.cancer.gov/publications/pdq/information-summaries>. Setiembre 2017
8. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Agosto 2018.
9. [https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/07/pr223\\_E.pdf](https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/07/pr223_E.pdf). Agosto 2018.
10. <https://www.who.int/nmh/publications/ncd-profiles-2018/en/>. Agosto 2018.
11. Fantozzi, A., & Christofori, G. Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res.* 8, 212 (2006)
12. Kocaturk, B., & Versteeg, H. H. Orthotopic injection of breast cancer cells into the mammary fat pad of mice to study tumor growth. *J Vis Exp.* (2015).
13. Stewart, T. J., & Abrams, S. I. How tumours escape mass destruction. *Oncogene.* 27, 5894-5903 (2008).
14. Lopez, J. I. et al. CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. *Cancer Res.* 65, 6755-6763 (2005).
15. Danna, E. A. et al. Surgical removal of primary tumor reverses tumor-induced immunosuppression despite the presence of metastatic disease. *Cancer Res.* 64, 2205-2211 (2004).
16. Tao, K., Fang, M., Alroy, J., & Sahagian, G. G. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer.* 8, 228 (2008).
17. Hu, X. et al. Deregulation of apoptotic factors Bcl-xL and Bax confers apoptotic resistance to myeloid-derived suppressor cells and contributes to their persistence in cancer. *J Biol Chem.* 288, 19103-19115 (2013).
18. Kwan, H. et al. Transgenes expressing the Wnt-1 and int-2 proto-oncogenes cooperate during mammary carcinogenesis in doubly transgenic mice. *Mol Cell Biol.* 12, 147-154 (1992).
19. Sasha, G.B. Radiopharmaceuticals and methods of radiolabelling, *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, 5ª Edición, Springer, 1986.
20. González, G., Rabri, C. Para entender las radiaciones. Energía nuclear, medicina, industria, DIRAC-Facultad de Ciencias, 2011.

21. The Role of Coordination Chemistry in the Development of Target-specific Radiopharmaceuticals. Liu S. 33, 2004, Chem Soc Rev, págs. 445-461.
22. Neves, M. Diseño de radiofármacos terapéuticos. Asociación Latinoamericana de Sociedades de Biología y Medicina Molecular, 2007.
23. Jacene, H., Filice, R., Kasecamp, W., Wah, R. Comparison of  $^{90}\text{Y}$ -Ibritumomab Tiuxetan and  $^{131}\text{I}$ -Tositumomab in Clinical Practice. *J. Nucl. Med.*, 48, 1767-1776, 2007.
24. <http://www-naweb.iaea.org/napc/iachem/meetings/F2-TM-36930/announcement.html> Technical Meeting (TM 36930) on Therapeutic Radiopharmaceuticals IAEA HQ 2009. 13 de Febrero 2020.
25. Yu, J.F., Hafeli, U.O., Dong, Y., Sands, M.J., Li, Y.H., Failing, S., Leakakos, T., Tapolsky, G. Radiolabeling of magnetic targeted carriers with several therapeutic and imaging radioisotopes. *Europ. Cells Mat.*, 3, 16-18, 2002.
26. Mallol, J. Radiofarmacia. Trazadores radiactivos de uso clínico. Interamericana-McGraw-Hill, 1989.
27. Kowalsky, R., Perry, J. Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine Practice, 1987.
28. Turker, S., Ózer, Y. Diagnostic Radiopharmaceutical Agents. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 29, 145-154, 2004.
29. Saleh T. Radiopharmacy Basis in Basic Science of Nuclear Medicine. s.l. : Springer, 2010.
  
30. Cutler, C., Smith, C., Ehrhardt, G., Tyler, T., Jurisson, S. and Deutsch, E. (2000). Current and Potential Therapeutic Uses of Lanthanide Radioisotopes. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 15(6), pp.531-545.
31. Shamsi, M. and Pirayesh Islamian, J. (2017). Breast cancer: early diagnosis and effective treatment by drug delivery tracing. *Nuclear Medicine Review*, 20(1), pp.45-48.
32. <http://www.medicinanuclear.cl/generalidades.htm>. 17 de Febrero 2020.
33. Nowotnik DP. Physico-chemical Concepts in the Preparation of Technetium Radiopharmaceuticals. [aut. libro] Sampson CB. Textbook of Radiopharmacy: Theory and Practice. s.l. : Gordon and Breach Science Publishers, 1990, págs. 29-45.
34. Jurisson, S., Berning, D., Jia, W., Ma, D. Coordination Compounds in Nuclear Medicine. *Chem. Rev.*, 93, 1137-1156, 1993.
35. IAEA. Preparation of kits for  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  radiopharmaceuticals. IAEA, 2007.
36. Srivastava, SC., Mease RC. *Progress in Research on Ligand, Nuclides and Techniques for labelling Monoclonal Antibodies*. 18, 1991, Int J Rad Appl Instrum B, Págs. 589-603.
37. Verdera, ES., Gomez de Castiglia, S. Avances en Radiofarmacia. 2009, ALASBIMN Journal, págs. 14-31.
38. Liu, S. The Role of Coordination Chemistry in the Development of Target-specific Radiopharmaceuticals. 33, 2004, Chem Soc Rev, págs. 445-461.
39. Hom, R., Katzenellenbogen, J. Technetium-99m-Labeled Receptor-Specific Small-Molecule Radiopharmaceuticals: Recent Developments and Encouraging Results. 24, 1997, Nucl Med Biol, Vol. 6, págs. 485-498.

40. Chain, Y., Illanes, L. Radiofármacos en medicina nuclear: Fundamentos y aplicación clínica. 2015; p. 33.
41. Liu, S. Bifunctional Coupling Agents for Radiolabeling of Biomolecules and Target Specific Delivery of Metallic Radionuclides. 60, 2008, *Adv Drug Deliv Rev*, págs. 1347-1370.
42. Arano, Y. Recent advances in  $^{99m}\text{Tc}$  radiopharmaceuticals. *Ann Nucl Med.* (2002) 16:79–93.
43. Zolle, I. Technetium-99m Pharmaceuticals. Berlin: Springer-Verlag. (2007). 345 p.
44. Bartholomä, MD., Louie, AS., Valliant, JF., Zubieta, J. Technetium and gallium derived radiopharmaceuticals: comparing and contrasting the chemistry of two important radiometals for the molecular imaging era. *Chem Rev.* (2010) 110:2903–20.
45. Vites, JC., Lynam, MM. Rhenium 1996. *Coord Chem Rev.* (1998) 172:357–88.
46. Alberto, R., Schibli, R., Waibel, R., Abram, U., Schubiger, AP. Basic aqueous chemistry of  $[\text{M}(\text{OH})_2\text{CO}_3]^+$ . (M = Re, Tc) directed towards radiopharmaceutical application. *Coord Chem Rev.* (1999) 190–2:901–19.
47. Bandoli, G., Tisato, F., Refosco, F., Gerber, TIA. Rhenium(V) Complexes: from pure hard donors to mixed soft/hard functionalized phosphine ligands. *Rev Inorg Chem.* (1999) 19:187–210.
48. Liu, G., Hnatowich, DJ. Labeling biomolecules with rhenium - a review of the bifunctional chelators. *Anticancer Agents Med Chem.* (2007) 7:367–77.
49. Hahn, EM., Casini, A., Kühn, FE. Re(VII) and Tc(VII) trioxo complexes stabilized by tridentate ligands and their potential use as radiopharmaceuticals. *Coord Chem Rev.* (2014) 276:97–111.
50. Choi, J., Iacobazzi, R., Perrone, M., Margiotta, N., Cutrignelli, A., Jung, J., Park, D., Moon, B., Denora, N., Kim, S. and Lee, B., 2016. Synthesis and Evaluation of Tricarbonyl  $^{99m}\text{Tc}$ -Labeled 2-(4-Chloro)phenyl-imidazo[1,2-a]pyridine Analogs as Novel SPECT Imaging Radiotracer for TSPO-Rich Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), p.1085.
51. Guertin, A., Duchemin, C., Haddad, F., Michel, N., Métivier, V. Measurements of  $^{186}\text{Re}$  production cross section induced by deuterons on natW target at ARRONAX facility. *Nucl Med Biol.* (2014) 41:e16–8.
52. Tzanopoulou, S., Pirmettis, I., Patsis, G., Paravatou-Petsotas, M., Livaniou, E., Papadopoulos, M. and Pelecanou, M. (2006). Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation of  $\text{M}(\text{I})(\text{CO})_3(\text{NNO})$  Complexes (M = Re,  $^{99m}\text{Tc}$ ) Conjugated to 2-(4-Aminophenyl)benzothiazole as Potential Breast Cancer Radiopharmaceuticals. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(18), pp.5408-5410.
53. Deutsch, E., Libson, K., Vanderheyden, JL., Ketrings, AR., Maxon, HR. The chemistry of rhenium and technetium as related to the use of isotopes of these elements in therapeutic and diagnostic nuclear medicine. *Nucl Med Biol.* (1986) 13:465–77.
54. De Rosales, RTM., Blower, P. Role of  $^{99m}\text{Tc}$  in the development of rhenium radiopharmaceuticals. In: *Technetium-99m Radiopharmaceuticals: Status and Trends*. Vienna: IAEA Radioisotopes and Radiopharmaceuticals Series 1 (2010).
55. Helm, L. Ligand exchange and complex formation kinetics studied by NMR exemplified on  $\text{fac}-[(\text{CO})_3\text{M}(\text{H}_2\text{O})]^+$ . (M = Mn, Tc, Re). *Coord Chem Rev.* (2008) 252:2346–61.



56. Donnelly, PS. The role of coordination chemistry in the development of copper and rhenium radiopharmaceuticals. *Dalton Trans.* (2011) 40:999– 1010.
57. Chowdhury, G., Sarkar, U., Pullen, S., Wilson, W., Rajapakse, A., Fuchs-Knotts, T. and Gates, K., 2011. DNA Strand Cleavage by the Phenazine Di-N-oxide Natural Product Myxin under Both Aerobic and Anaerobic Conditions. *Chemical Research in Toxicology*, 25(1), pp.197-206.
58. Pachón, O., Azqueta, A., Lavaggi, M., López de Cerain, A., Creppy, E., Collins, A., Cerecetto, H., González, M., Centelles, J. and Cascante, M. (2008). Antitumoral Effect of PhenazineN5,N10-Dioxide Derivatives on Caco-2 Cells. *Chemical Research in Toxicology*, 21(8), pp.1578-1585.
59. Cerecetto, H., González, M., Lavaggi, M., Azqueta, A., López de Cerain, A. and Monge, A. (2005). Phenazine 5,10-Dioxide Derivatives as Hypoxic Selective Cytotoxins. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(1), pp.21-23.
60. Ferro-Flores, G., Ocampo-García, B., Santos-Cuevas, C., Morales-Avila, E. and Azorín-Vega, E. (2013). Multifunctional Radiolabeled Nanoparticles for Targeted Therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 21(1), pp.124-138.
61. Weissleder, R., Mahmood, U. Molecular Imaging. 219, 2001, *Radiology*, págs. 316-333.
62. Nichol, C., Kim, EE. Molecular imaging and gene therapy. 42, 2001, *Journal of Nuclear Medicine*, Vol. 9, págs. 1368-1374.
63. Lindner, M., McArthur, R., Deadwyler, S., et al. Development, Optimization and Use of Preclinical Behavioral Models to Maximize the Productivity of Drug Discovery for Alzheimer's Disease. *Animal and Translational Models for CNS Drug Discovery*. 2008: 93–157.
64. Müller, C., Schibli, R. Single photon emission computed tomography tracer. *Recent Results Cancer Res.* 2013; 187: 65–105.
65. McKeown, S.R. Cowen, R.L, Williams, K.J. "Bioreductive Drugs: from Concept to Clinic" *Clinical Oncology*, 19, 427-442, (2007).
66. Guise, C. Mowday, A. Ashoorzadeh, A. Yuan, R. Lin, W. Wu, D. Smaill, J. Patterson, A. Ding, K. "Bioreductive prodrugs as cancer therapeutics: targeting tumor hypoxia". *Chinese Journal of Cancer*, 33, 80-88, (2014).
67. Papadopoulou, M. Ji, M. Rao, M. Bloomer, W. "Reductive Metabolism of the Nitroimidazole-Based Hypoxia-Selective NLCQ-1 (NSC 709257)". *Oncology Research*, 14, 21-29, (2003).
68. McKeown, S. Hejmadi, M. McIntyre, I. McAleer, J. Patterson, L. "AQ4N: an alkylaminoanthraquinone N-oxide showing bioreductive potencial and interaction with radiation in vivo" *British Journal of Cancer*, 72, 76-81, (1995).
69. Cerecetto, H. González, M. Lavaggi, M.L. "Development of Hypoxia Selective Cytotoxins for Cancer Treatment: An Update" *Medicinal Chemistry*, 2, 315-327, (2006).
70. Saunders, M.P. Patterson, A.V. Chinje, E.C. "NADPH: cytochrome c (P450) reductase activates tirapazamina (SR4233) to restore de hypoxic and oxic cytotoxicity in an aerobic resistant derivate of the A549 lung cancer cell line". *British Journal of Cancer*, 82(3), 651-656, (2000).

71. Guise, C. Mowday, A. Ashoorza, A. "Bioreductive prodrugs as cancer therapeutics: targeting tumor hypoxia" *Chinese Journal of Cancer*, 33(2), 80-86, (2014).
72. Brown, J.M. "SR 4233 (Tirapazamine): a new anticancer drug exploiting hypoxia in solid tumors" *British Journal of Cancer*. Vol 67. 1163-1170. (1993).
73. Li, N. Ma, Y. Yang, C. "Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods". *Biophysical Chemistry*. Vol 16. 199-205 (2005).
74. Denny, W. " Acridine Derivatives as chemotherapeutic Agents" *Current Medicinal Chemistry*, 9(18), 1655-1665, (2002).
75. Lavaggi, M.L; Cabrera, M; Pintos, C; Arredondo, C; Pachón, G; Rodríguez, J; Raymondo, S; Pacheco, J.P.; Cascante, M; Olea-Azar, C; López de Ceráin, A; Monge, A; Cerecetto, H; González, M. Novel Phenazine 5,10-Dioxides Release •OH in Simulated hypoxia and induce reduction of tumour volume in vivo. *ISRN Pharmacology*, 2011, 2011, Article ID 314209.
76. Cerecetto, H. González, M. Risso, M. Seoane, M. López, A. Expeleta, O. Mongue, A. Suescum, L. Mombrú, A. Bruno, A. "Synthesis and biological evaluation of 1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential hypoxic cytotoxins and DNA-binders". *Archive der Pharmazie*, 333, 387-393, (2000).
77. Cerecetto, H. González, M. Onetto, S. Risso, M. Saenz, P. Seoane, G. Bruno, A. Alarcón, J. Olea-Azar, C. Ezpeleta, O. Mongue, A. "1,2,4-Triazine N-oxide and di-N-oxide derivatives. Synthesis and evaluation as hypoxia selective cytotoxins". *Medicinal Chemistry Research*, 10, 328-337, (2001).
78. Boinani, M. Cerecetto, H. González, M. Risso, M. Olea-Azar, C. Elpiro, O. Castellano, E. López, A. Ezpeleta, O. Mongue, A. "1,2,5- oxadiazole N-oxide derivatives as potential anti-cancer agents: Synthesis and biological evaluation. Part IV" *European Journal of Medicinal Chemistry*, 36, 771-782, (2001).
79. Cerecetto, H. González, M. Onetto, S. Saenz, P. Expeleta, O. Ceráom, A. MONGUE, A. "1,2,4-Triazine N-oxide derivatives: Studies as potential hypoxic cytotoxins. Part II" *Archive der Pharmazie*, 337, 247-258, (2004).
80. Cerecetto, H. González, M. Risso, M. Saenz, P. Olea-Azar, C. Bruno, A. Azqueta, A. De Cerpain, A. Mongue, A. "1,2,4-Triazine N-oxide derivatives: Studies as potential hypoxic cytotoxins. Part III" *Archive der Pharmazie*, 337, 271-280, (2004).
81. Torre, M. Gambino, D. Araujo, J. Cerecetto, H. González, M. Lacaggi, M. Azqueta, A. López de Cerin, A. Vega, A. Abram, U. Costa-Fiho, A. "Novel Cu(II) quinoxaline N1,N4-dioxide complexes as selective hypoxic cytotoxins" *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 473-480, (2005).
82. Aguirre, G. Boiani, M. Cerecetto, H. Fernández, M. León, E. Pintos, C. Raymondo, S. Arredondo, C. Pacheco, JP. Basombrío, MA. "Furoxan derivati as cytotoxic agents: Preliminary in vivo antitumoral activity studies" *Pharmazie*, 61, 54-59, (2006).
83. Cerecetto, H. González, M. Onetto, S. Risso, M. Rey, A. Giglio, J. León, E. León, A. Pilatti, P. Fernández, M. "Synthesis and characterization of thiol containing furoxan derivatives as coligands for the preparation of potential bioreductive" *Archive der Pharmazie*, 339, 59-66, (2006).

84. Lavaggi, ML. Cabrera, M. González, M. Cerecetto, H. “Differential enzymatic reductions governing the differential hypoxia-selective cytotoxicities of phenazine 5,10-dioxides”. *Chemical Research Toxicology*, 21, 1900-1906, (2008).
85. Lavaggi, ML. Cabrera, M. Aravena, MA. Olea-Azar, C. López de Ceráin, A. Monge, A. Pachón, G. Cascante, M. Bruno, AM. Pietrasanta, LI. González, M. Cerecetto, H. “Study of nemzo[a]phenazine 7,12-dioxide as selective hypoxic cytotoxin-scaffold. Identification of aerobic-antitumoral activity through DNA fragmentation” *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18, 4433-4440, (2010).
86. Cunha, JD. Lavaggi, ML. Abasolo, M. Cerecetto, H. González, M. “2D and 3D-quantitative structure activity relationship studies for a series of phenazine N,N'-dioxide as antitumour agents” *Chemical and Biology Drug Design*, 78, 960-968, (2011).
87. Lavaggi, ML. Cabrera, M. Pintos, M. Arredonde, C. Pachón, G. Rodríguez, J. Raymondo S. Pacheco, JP. Cascante, M. Olea-Azar, C. López De Ceráin, A. Mongue, A. Cerecetto, H. González, M. “Novel Phenazine 5,10-dioxides release •OH in simulated hypoxia and induce reduction of tumour volumen in vivo” *ISRN Pharmacology*, 1-11, (2011).
88. Lavaggi, ML. Nieves, M. Cabrera, M. Olea-Azar, C. López De Ceráin, A. Mongue, A. Cerecetto, H. González, M. “Structural modifications of the phenazine N,N'-dioxide-scaffold looking for new selective hypoxic cytotoxins” *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 5362-5369, (2010).
89. Lavaggi, ML. “Hipoxia como diana terapéutica para el tratamiento de tumores sólidos: desarrollo de fármacos selectivos de N',N'-dióxido de FNZ” *Tesina de Posgrado en Química*, (2009).
90. <https://www.selectscience.net/products/in-vivo-ms-fx-pro/?prodID=113403>. Marzo 2020.
91. <https://www.iaea.org/publications/8110/technetium-99m-radiopharmaceuticals-status-and-trends>. Mayo 2020.
92. Fernandez, S., Berchesi, A., Tejeria, E., Sanz, I., Cerecetto, H., Gonzalez, M., Lavaggi, M.L., Rey, A. 92 Evaluation of <sup>99m</sup>Tc-Labelled Phenazine Dioxides as Potential Tracers for Hypoxia Imaging. *Current Radiopharmaceuticals*, 8(1), 56–61. (2015).
93. Seitz, M., Oliver, A. G., & Raymond, K. N. The Lanthanide Contraction Revisited. *Journal of the American Chemical Society*, 129(36), 11153–11160. (2007).