



---

# Desarrollo y evaluación de potenciales radiotrazadores para Imagenología Molecular en cáncer de mama

---

Q.F. María Pía Pereira Esquirós

Tesis presentada con el objetivo de obtener el título de  
*Magíster en Química*

Facultad de Química

Universidad de la República

Montevideo

Abril 2021

Directores de tesis:

Dra. Ana Rey

Dr. Javier Giglio

A **mamá y papá** por mostrarme siempre  
el camino hacia la superación 🌸.

Te deseo lo necesario para que al final del ciclo  
te descubras más fuerte, más sabio, más agradecido,  
más sensible y paciente, más lleno y en paz.

Fernanda Iglesias.

“Los hombres que tienen éxito son los que saben  
cómo utilizar los fracasos”

Stephen Crane.

## AGRADECIMIENTOS

Estos dos años y seis meses de maestría han sido de los más desafiantes y enriquecedores, crecí más de lo que imaginé, no sólo como profesional sino como persona. Son muchas las personas que hicieron posible esta tesis y a todas ellas les debo un profundo agradecimiento.

En primer lugar les quiero agradecer a mis dos grandes tutores, Ana y Javier, quienes me han apoyado en todo momento. Gracias por siempre alentarme a seguir incluso cuando todo parecía no salir bien, gracias por guiarme, gracias por siempre "buscarle la vuelta" para poder seguir trabajando, gracias por su sabiduría compartida, los momentos de discusiones teóricas, en fin, simplemente gracias por haber sido además de mis tutores, grandes consejeros. Las charlas con ustedes siempre me devolvieron tranquilidad y ganas de seguir en la lucha! Como se los dije siempre, les estaré eternamente agradecida.

A mamá y papá. Mis dos grandes ejemplos a seguir. No me alcanzan las palabras para demostrarles la admiración que siento hacia ustedes. Tampoco me alcanzan las palabras para agradecerles; gracias a ustedes tuve la posibilidad de estudiar lo que me gusta y seguir preparándome en la vida, en lo profesional y en lo humano; gracias por el amor y alegría y gracias por sus sabios consejos de siempre.

A Emilia. Esa persona a quien admiro por el amor y dedicación a su trabajo 🍀. Gracias por enseñarme a descubrir el mundo del investigador. Gracias por TODO el trabajo de laboratorio, gracias por cada ensayo en células... gracias por la amistad construida en estos años, además de una gran compañera de trabajo me llevo una gran amiga; gracias por las risas interminables; gracias por los momentos pocos que me llenaron de energía para continuar; gracias por los sabios consejos; gracias por los fuertes abrazos e infinitas gracias por simplemente ser "la Emi", una gran persona, una excelente compañera y una gran amiga defensora de la "gota puntual".

A Maia, Elena y Carito. Grandes compañeras de trabajo y a quienes me llevo como grandes amigas. Gracias por los todos sus buenos consejos, las risas interminables, aguantes en todo momento y siempre haberme ayudado sin importar la hora y día. Gracias por siempre darme para adelante! Maia muchas gracias por tu gran trabajo y siempre estar dispuesta a ayudarme en el desarrollo de la síntesis del [<sup>18</sup>F]FES.

A el Tano, mi gran compañero. Gracias por el apoyo incondicional, gracias por tu alegría y buena energía de siempre, gracias por siempre querer entender el mundo de la química, gracias por los días sentado a mi lado acompañando mi estudio y gracias por las idas la rambla, al parque o cualquier lugar con un poco de verde para renovar energías. Sos un fiel compañero ♥.

A mis hermanos, Francisco y Pilu. Gracias por siempre estar. Francisco gracias por tus tímidas sonrisas que sé lo que significan, con eso me decís mucho más de lo que necesito; Pilunguis gracias por tu aliento constante, tu alegría y buenos consejos.

A Mariella. Gracias por los sabios consejos; las charlas y risas compartidas quedaran siempre en mi recuerdo.

A Carito, "la negri" y "the blackies" ●. Grandes amigas, grandes consejeras y sobre todo grandes personas. No hubiese sido posible finalizar esta tesis sin su aliento constante.

A Mechita y Paulita. Grandes amigas, para ellas soy su gran científica salvadora del mundo jaja! Espero no desilusionarlas.

A toda mi familia, en especial a mi tía Elena y sus mimos capitalinos. A todas mis "quimi-amigas" y "paysa-amigas", no hubiese sido posible esta tesis sin el aliento de cada una de ellas. Lula, Anto, Bele, Agus Quei, Giorgi, Maida, me hicieron sentir durante todo este tiempo una "verdadera científica" jaja, sus mensajes me dieron energías y ganas para continuar con la lucha. A mi madrina y sus gifs en un intento de comprender mi vida investigadora jaja! A Luisina mi "colega diplomática", gracias por ser una buena compañera y apoyo en los momentos en que se amontonaron todos los parciales jaja puedo decir que sobreviví!

A Marga y Daniela. Gracias por su tiempo y consejos con la catalogada para mí, como la ingrata química orgánica, los cuales me fueron muy útiles para concluir éste trabajo. Gracias por compartir sus conocimientos y gracias por la buena energía.

A Graciela, Gloria, Enrique, Mariana y Vale. Gracias por su tiempo y por compartir sus conocimientos. Vale gracias por siempre querer ayudar, gracias por tu alegría y tus consejos. Sin duda sos una gran investigadora y futura gran Dra.

A la gente de la cátedra de Química Orgánica de Facultad de Química y de Inmunología del Instituto de Higiene. Gracias por compartir los materiales y su lugar de trabajo. Gracias por la buena onda siempre.

A Lucía y Andrea, gracias por la ayuda en los lotes pilotos del [<sup>18</sup>F]FES. A Fátima y Jacqueline por el "plomito" mañanero para poder arrancar la jornada.

Agradecimientos Institucionales:

Facultad de Química - Universidad de la República por permitir continuar mi preparación profesional.

ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) por la beca de maestría otorgada (POS\_FCE\_2018\_1\_1007787), que me permitió dedicarme a este trabajo.

PEDECIBA-Química (Programa para el Desarrollo de las Ciencias Básicas) por el apoyo económico a través de las alícuotas de dinero, que me permitieron acceder a reactivos necesarios para desarrollar las síntesis.

CUDIM (Centro Uruguayo de Imagenología Molecular) por permitir usar sus instalaciones para el desarrollo del [<sup>18</sup>F]FES.

Centro de Medicina Nuclear del Hospital de Clínicas por la donación de pertecneciato.

Cátedra de Inmunología del Instituto de Higiene por permitir usar sus instalaciones para los ensayos en células.

# ÍNDICE

<b>1)</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>10</b>
<b>2)</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
<b>2.1.</b>	<b>Cáncer</b>	<b>13</b>
2.1.1.	Origen del cáncer	14
2.1.2.	Tipos de genes	15
2.1.3.	Estadísticas del cáncer	15
<b>2.2.</b>	<b>Cáncer de mama</b>	<b>16</b>
2.2.1.	Epidemiología	17
2.2.2.	Factores de riesgo	19
2.2.3.	Tipos de cáncer de mama	20
2.2.3.1.	Clasificación histológica	21
2.2.3.2.	Clasificación molecular	21
<b>2.3.</b>	<b>Receptores de hormonas y su función</b>	<b>22</b>
2.3.1.	Receptor de estrógenos y estrógenos	24
<b>2.4.</b>	<b>Detección del cáncer de mama</b>	<b>28</b>
2.4.1.	Medicina Nuclear	30
2.4.2.	Radiofármacos	30
2.4.3.	Radiofármacos de diagnóstico	31
2.4.3.1.	Desarrollo de un potencial radiofármaco	34
2.4.3.2.	Radiofármacos para Imagenología de los RE	35
<b>3)</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>44</b>
<b>3.1.</b>	<b>Objetivo General</b>	<b>45</b>
<b>3.2.</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>45</b>
<b>4)</b>	<b>SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE 16<math>\alpha</math>-[<sup>18</sup>F]FLUOROESTRADIOL ([<sup>18</sup>F]FES)</b>	<b>48</b>
<b>4.1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>49</b>
4.1.1.	Radionucleido: <sup>18</sup> F	49
4.1.1.1.	Fluoración nucleofílica con <sup>18</sup> F	51
4.1.2.	[ <sup>18</sup> F]FES	52
4.1.3.	Módulos automatizados de síntesis	56
4.1.3.1.	Synthra RNplus Research	58
<b>4.2.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>62</b>
4.2.1.	Materiales	62
4.2.2.	Métodos	63
4.2.2.1.	Síntesis de [ <sup>18</sup> F]FES	63
4.2.2.2.	Control de calidad de [ <sup>18</sup> F]FES	64
4.2.2.3.	Estudios <i>in vitro</i>	64
4.2.2.3.1.	Ensayo de Unión a células MCF-7	64
4.2.2.3.2.	Ensayo de Unión dependiente del tiempo	65
<b>4.3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>66</b>
4.3.1.	Síntesis de [ <sup>18</sup> F]FES	66
4.3.2.	Control de calidad de [ <sup>18</sup> F]FES	77
4.3.3.	Estudios <i>in vitro</i> de [ <sup>18</sup> F]FES	79

<b>5)</b>	<b>DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE UN POTENCIAL RADIOTRAZADOR DE <sup>99m</sup>Tc</b>	<b>82</b>
<b>5.1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>83</b>
<b>5.2.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>92</b>
5.2.1.	Materiales	92
5.2.2.	Métodos	93
5.2.2.1.	Síntesis de ligandos	93
5.2.2.1.1.	Síntesis de <b>L1</b>	93
5.2.2.1.2.	Síntesis de <b>L2</b>	96
5.2.2.1.3.	Síntesis de <b>L3</b>	99
5.2.2.2.	Síntesis de los complejos de <sup>99m</sup> Tc	100
5.2.2.2.1.	Síntesis de <b>C2</b>	100
5.2.2.2.1.1.	Determinación de la PRQ de <b>C2</b>	101
5.2.2.2.2.	Síntesis de <b>C3</b>	101
5.2.2.2.2.1.	Síntesis del precursor de [ <sup>99m</sup> Tc]Tc(III)-EDTA	101
5.2.2.2.2.2.	Reacción de sustitución	102
5.2.2.2.2.3.	Control de PRQ de <b>C3</b>	102
5.2.2.2.3.	Estudios <i>in vitro</i> de <b>C3</b>	102
5.2.2.2.3.1.	Estudios fisicoquímicos	102
5.2.2.2.3.1.1.	Estabilidad en el medio de reacción	102
5.2.2.2.3.1.2.	Lipofilicidad	102
5.2.2.2.3.1.3.	Estabilidad en plasma	103
5.2.2.2.3.1.4.	Unión a proteínas plasmáticas (UPP)	103
5.2.2.2.3.2.	Estudios en células MCF-7	103
<b>5.3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>104</b>
5.3.1.	Síntesis de ligandos	104
5.3.1.1.	Síntesis de <b>L1</b>	104
5.3.1.2.	Síntesis de <b>L2</b>	118
5.3.1.3.	Síntesis <b>L3</b>	124
5.3.2.	Síntesis de los complejos de <sup>99m</sup> Tc	127
5.3.2.1.	Síntesis de <b>C2</b>	127
5.3.2.2.	Síntesis de <b>C3</b>	132
5.3.2.2.1.	Síntesis del precursor [ <sup>99m</sup> Tc]Tc(III)-EDTA	133
5.3.2.2.2.	Reacción de sustitución	133
5.3.3.	Estudios <i>in vitro</i> <b>C3</b>	138
5.3.3.1.	Estudios fisicoquímicos	138
5.3.3.2.	Estudio en células MCF-7	140
<b>6)</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>143</b>
<b>7)</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>145</b>
<b>8)</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>161</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>RE</b>	Receptor de estrógeno
<b>RP</b>	Receptor de progesterona
<b>RE<math>\alpha</math></b>	Receptor de estrógeno alfa
<b>RE<math>\beta</math></b>	Receptor de estrógeno beta
<b>[<math>^{18}\text{F}</math>]FES</b>	16 $\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroestradiol
<b>A<sub>m</sub></b>	Actividad molar (radioactividad/ mol)
<b>[<math>^{18}\text{O}</math>]H<sub>2</sub>O</b>	Agua enriquecida mayor a 98% con $^{18}\text{O}$
<b><math>\beta^+</math></b>	Positrones
<b>eV</b>	Electrón voltio
<b>Ci</b>	Curies
<b>CUDIM</b>	Centro Uruguayo de Imagenología Molecular
<b>SPECT</b>	Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón Único
<b>PET</b>	Tomografía por Emisión de Positrones
<b>t<sub>1/2</sub></b>	Período de semidesintegración
<b>PRQ</b>	Pureza radioquímica
<b>n.c.d.</b>	No corregido por decaimiento
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina
<b>Tr</b>	Tiempo de retención
<b>SPE</b>	Cartucho de extracción en fase sólida
<b>S<sub>N</sub></b>	Sustitución nucleofílica
<b>S<sub>N2</sub></b>	Sustitución nucleofílica bimolecular
<b>MeCN</b>	Acetonitrilo
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>MMSE</b>	Precursor 3-O-metoxi-metil-16,17-O-sulfuril-16-epiestriol
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético

<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Carbonato de potasio
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>Hex</b>	Hexano
<b>Py</b>	Piridina
<b>HBTU</b>	Hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazolil)(dimetilamino)-metilen]-N-metilaminio
<b>DIPEA</b>	N,N-Diisopropiletilamina
<b>DMAP</b>	4-Dimetilaminopiridina
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b><sup>1</sup>H-RMN</b>	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón
<b><sup>13</sup>C-RMN</b>	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono 13
<b>δ</b>	Desplazamiento químico de <sup>1</sup> H en ppm
<b>H</b>	Protón
<b>J</b>	Constante de acoplamiento
<b>ESI-EM</b>	Espectrometría de masas mediante ionización por electrospray
<b>d</b>	Doblete
<b>dd</b>	Doblete de doblete
<b>m</b>	Multiplete
<b>t</b>	Triplete
<b>UPP</b>	Unión a proteínas plasmática

## 1) RESUMEN

---

El cáncer de mama es la principal neoplasia en mujeres y la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial (sólo el cáncer de pulmón mata a más mujeres). Aproximadamente dos de cada tres cánceres de mama muestran una sobreexpresión de receptores de hormonas, en particular del receptor de estrógeno (RE) y receptor de progesterona (RP).

El presente trabajo plantea contribuir al diagnóstico y caracterización del cáncer de mama receptor de estrógeno positivo (RE+), a través del desarrollo de potenciales radiofármacos para Imagenología molecular dirigidos al RE.

La primer etapa del trabajo consistió en la síntesis, purificación y formulación del 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]fluoroestradiol ([<sup>18</sup>F]FES), radiofármaco considerado como de referencia en Imagenología de RE en un módulo automatizado de síntesis Synthra RNplus Research. Una vez puesta a punto la misma y realizados tres lotes pilotos se procedió a efectuar estudios *in vitro*, en donde se empleó la línea celular MCF-7 portadora de RE, derivadas de un adenocarcinoma mamario humano. Los estudios demostraron una elevada captación celular, siendo la misma de  $6.3 \pm 0.4$  %.

Al mismo tiempo, se trabajó en la síntesis de ligandos derivados de estradiol para la formación de compuestos de coordinación con <sup>99m</sup>Tc. Para la síntesis de los mismos, se tomó como reactivo de partida al etinilestradiol, fármaco agonista de los receptores de estrógenos. Se probaron distintas estrategias sintéticas para la obtención del ligando Cyclam-2-(2-(1H-1,2,3-triazol-1-il)acetamida) estradiol (L1) sin éxito, lo que llevó a proponer un nuevo ligando: Cyclam-3-(2-(2-(3-(1H-1,2,3-triazol)propoxi)etoxi)etoxi)propanamina estradiol (L2) que permite la formación de un complejo de <sup>99m</sup>Tc. Debido a que no fue posible su adecuada marcación, se diseñó un tercer ligando: 17[4-((2-azido-1-carboxietil)amino)-N-metilidino-4-oxobutano-1-1aminio)-1H-1,2,3-triazol-1-il] estradiol (L3), que permite la formación de un complejo de <sup>99m</sup>Tc(III) "4+1", utilizando como coligando a el ácido 2,2',2"-nitrilotriethanethiol-2-((2-carboxietoxi)metil)propano-1,3-di(oxo)dipropanoico (NS<sub>3</sub>(COOH)<sub>3</sub>). Dicho complejo fue obtenido con una adecuada pureza radioquímica. Los estudios fisicoquímicos demostraron una alta hidrofilia ya que presentó un log P de  $-2.05 \pm 0.20$ . El complejo resultó ser estable en plasma a 37°C y en el medio de reacción durante al menos 4 horas. La unión a proteínas plasmáticas fue moderada siendo la misma de  $32 \pm 7$  %. Los ensayos *in vitro* de unión a células MCF-7 indicaron ausencia de captación celular  $0.10 \pm 0.02$  %, por lo cual no se realizaron estudios *in vivo*. Se planteó como posible hipótesis que la razón de ausencia de unión pudiera ser el bajo valor de lipofilia fuera del rango adecuado para atravesar barreras biológicas.

Los principales logros en el marco de esta tesis fueron: la obtención del [<sup>18</sup>F]FES, para su uso en clínica y como estándar de comparación de potenciales radiofármacos desarrollados y a desarrollar por nuestro grupo de investigación; por otro lado, se realizaron casi todas las etapas involucradas en el desarrollo de un potencial radiofármaco, desde la selección del farmacóforo y radionucleido, síntesis orgánica, marcación, estudios fisicoquímicos y estudios *in vitro*.

## 2) INTRODUCCIÓN

---

## 2.1. Cáncer

La palabra cáncer es un término muy amplio que abarca más de 200 tipos de enfermedades [1, 2]. Existen muchos tipos de cáncer y puede originarse en el seno, en los pulmones, en el colon o hasta en la sangre. Los diferentes tipos de cáncer tienen la similitud de ser siempre originados cuando alguna célula del cuerpo comienza a dividirse sin control y se extiende a tejidos circundantes, pero son diferentes en la manera en que crecen y se propagan [3].

Cada una de las células de nuestro cuerpo tiene ciertas funciones. Las células normales se dividen de manera ordenada según mecanismos de control que regulan el proceso de división celular. Éstas mueren cuando se han desgastado o se dañan sin poder ser reparadas (muerte celular programada o apoptosis), y nuevas células toman su lugar (ver figura 1). De ésta forma se impide que el daño sea heredado por las células descendientes.

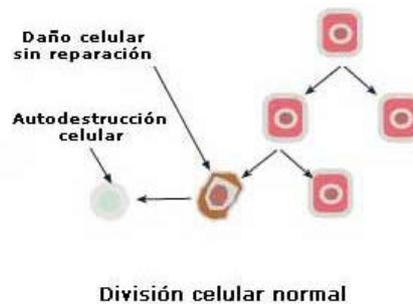


Figura 1: División celular normal. [Fuente: [www.aecc.es](http://www.aecc.es)]

Al tener las células cancerosas un crecimiento descontrolado darán lugar con el tiempo a un tumor o nódulo (ver figura 2). Dichas células siguen creciendo y generando nuevas células cancerosas que desplazan a las células normales. La mayoría de los tumores constituidos por células malignas son tumores sólidos, formados por masas de tejido. Pero también existen tumores no sólidos, como por ejemplo algunos cánceres de la sangre dentro de los cuales se encuentra la leucemia. Los tumores cancerosos son malignos, lo que significa que pueden diseminarse e invadir tejidos cercanos. Las células cancerosas de tumores malignos en crecimiento, pueden desprenderse y viajar a lugares distantes del cuerpo por medio del sistema circulatorio o del sistema linfático para formar tumores secundarios, llamados metástasis. En cambio, los tumores benignos son aquellos que se encuentran localizados, no se extienden a tejidos cercanos y son operables.

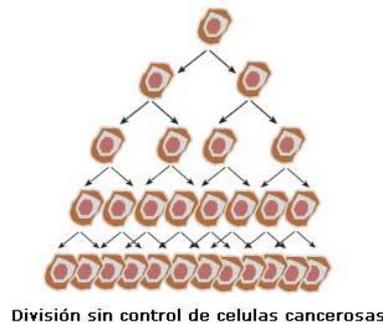


Figura 2: División celular sin control. [Fuente: [www.aecc.es](http://www.aecc.es)]

Las células cancerosas pueden influir en las células, moléculas y vasos sanguíneos normales que rodean y alimentan a un tumor, un área conocida como microambiente. Por ejemplo, las células cancerosas pueden inducir a las células normales cercanas a formar vasos sanguíneos que suministran oxígeno y nutrientes a los tumores, necesarios para crecer. Estos vasos sanguíneos también eliminan los productos de desecho de los tumores [1, 2].

### 2.1.1. Origen del cáncer

El cáncer es una enfermedad genética, es decir, es causada por cambios en los genes que controlan la forma en que funcionan nuestras células, especialmente cómo crecen y se dividen. En general se requieren mutaciones en varios genes para producir el cáncer [3].

Aunque el cáncer es fundamentalmente una enfermedad genética, en la mayoría de los casos no se hereda y además muchos de ellos están influenciados por factores ambientales. El tabaquismo es un factor ambiental que se asocia fuertemente con el cáncer. Otros factores ambientales que inducen cáncer son ciertos tipos de sustancias químicas, como el benceno (que se utiliza como solvente industrial) y los bifenilos policlorados (utilizados en los transformadores y capacitores industriales). La luz ultravioleta, las radiaciones ionizantes y los virus son también conocidos carcinógenos.

El cáncer comienza cuando una sola célula sufre una mutación que la hace dividirse a una velocidad anormalmente elevada. La célula prolifera y origina un clon de células, cada una de las cuales porta la misma mutación. Como las células del clon se dividen más rápidamente que las normales, pronto las sobrepasan en número. Una mutación adicional que surja en algunas de las células del clon puede aumentar más su capacidad de proliferar, y las células que porten las dos mutaciones pronto serán dominantes del clon. Finalmente, podrían ser superadas por células que contienen aún más mutaciones que aumentan la proliferación. En este proceso, llamado evolución clonal, las células tumorales adquieren más mutaciones que les permiten hacerse cada vez más agresivas en sus propiedades proliferativas. La tasa de evolución clonal depende de la frecuencia con la cual aparecen nuevas mutaciones. Cualquier defecto genético que permita la aparición de nuevas mutaciones acelerará la progresión del cáncer.

### 2.1.2. Tipos de genes

Como se mencionó anteriormente el cáncer es una enfermedad causada por alteraciones en el ácido desoxirribonucleico (ADN). Hay, sin embargo, varios tipos de alteraciones genéticas que pueden contribuir a su desarrollo. Los tipos de genes que tienen con frecuencia un papel en el cáncer son: genes supresores de tumores, oncogenes y genes reparadores del ADN. Los genes supresores de tumores inhiben la división celular, es decir inhiben el cáncer. Las células, cuyos genes supresores de tumores se encuentren inactivados pueden dividirse sin control. Los oncogenes (primeros genes causantes de cáncer identificados) estimulan la división celular, por lo que mutaciones que lo hiperactiven o activen en momentos inadecuados favorecen la formación de tumores. Todas las células normales portan secuencias de ADN que están estrechamente relacionadas con los oncogenes. Estos genes celulares se llaman protooncogenes. Son responsables de funciones normales básicas en las células sanas pero, cuando mutan, se transforman en oncogenes que contribuyen al desarrollo de cáncer. Por último, los genes reparadores del ADN codifican proteínas involucradas en eliminar mutaciones en el ADN, las células con mutaciones en estos genes tienden a presentar mutaciones adicionales en otros genes, entre ellos los que regulan la división celular [4].

### 2.1.3. Estadísticas del cáncer

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial. En el año 2018 se le atribuyeron 9.6 millones de muertes. Para el año 2040 se espera que aumente a 16.3 millones de muertes. A nivel mundial, aproximadamente 1 de cada 6 muertes se debe al cáncer. Aproximadamente el 70% de las muertes por cáncer ocurren en países de bajos y medianos ingresos.

Se estima que más de la mitad de los casos y muertes de cáncer ocurren en Asia, en parte porque cerca del 60% de la población mundial reside allí. Europa representa el 23.4% del total de casos y el 20.3% de muertes por cáncer, aunque representa sólo el 9% de la población mundial. América representa un 21% de incidencia y el 14.4% de mortalidad a nivel mundial. A diferencia de otras regiones, la proporción de muertes por cáncer en Asia (57.3%) y África (7.3%) son más altos que los porcentajes de incidencia (48.4% y 5.8% respectivamente) debido a la diferente distribución de tipos de cáncer y tasas más altas de mortalidad en estas regiones [5]. En la figura 3 se muestran los tipos de cáncer más comunes a nivel mundial.

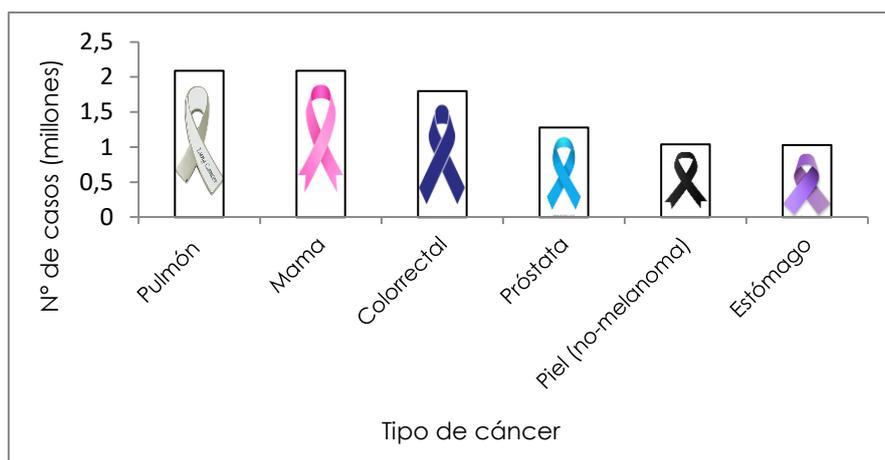


Figura 3: Tipos de cáncer más comunes a nivel mundial [6].

Por otro lado, los tipos de cáncer con mayor índice de mortalidad son: pulmón (1.76 millones de muertes), colón-rectal (862.000 muertes), estómago (783.000 muertes), hígado (782.000 muertes) y mama (627.000 muertes) [6].

En América Latina y el Caribe 1.4 millones de casos de cáncer son diagnosticados anualmente [7]. En el año 2018 Uruguay lideró el grupo de países de América Latina con mayor tasa de incidencia y mortalidad [8]. Según el Ministerio de Salud Pública (MSP) las muertes por cáncer constituyen aproximadamente un cuarto (24.6%) del total de las defunciones registradas en Uruguay cada año, ocupando el segundo lugar como causa de muerte (luego de las enfermedades cardiovasculares). Se registran aproximadamente 16.200 casos nuevos de cáncer cada año. El cáncer con mayor incidencia en hombres corresponde a próstata, mientras que el que presenta mayor mortalidad es el de pulmón. En mujeres, es el cáncer de mama quien presenta mayor incidencia y mortalidad. Tomando las cifras para hombres y mujeres en su conjunto, el cáncer que causa la muerte de más uruguayos cada año es el de pulmón (1.316 personas) [9].

En líneas generales, si bien la incidencia del cáncer en Uruguay (nuevos casos por año) es alta (lo que se explica por el aumento en la expectativa de vida y el estilo de vida occidental) la tasa estandarizada de mortalidad muestra un descenso sostenido. La prevención y detección precoz son fundamentales para continuar avanzando en su control.

## 2.2. Cáncer de mama

La glándula mamaria o mama está formada por tejido conjuntivo, tejido adiposo (grasa) y tejido glandular. La mama limita con el músculo pectoral y en su interior se encuentran principalmente los lóbulos y los conductos galactóforos, además de los ligamentos que la sostienen. En la parte externa, existe una zona de piel más oscura, llamada areola, que presenta en el centro un pequeño abultamiento llamado pezón, por donde se secreta la leche materna. A nivel inmunitario la mama se encuentra rodeada de una cadena de ganglios linfáticos que la protegen de sustancias extrañas y/o nocivas [10].

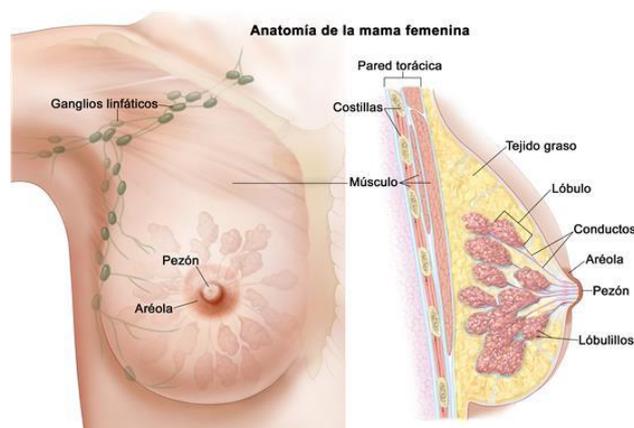


Figura 4: Anatomía de la mama. [Fuente: [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)]

El cáncer de mama es el crecimiento descontrolado de las células mamarias. El término "cáncer de mama" hace referencia a un tumor maligno que se ha desarrollado a partir de células mamarias. Dicho tumor es conocido como carcinoma mamario, ya que se desarrolla a partir de un tejido de origen epitelial [11]. Generalmente el cáncer de mama se origina en las células de los lobulillos, que son las glándulas productoras de leche, o en los conductos, que son las vías que transportan la leche desde los lobulillos hasta el pezón. Con menos frecuencia el cáncer de mama puede originarse en los tejidos estromales, que incluyen a los tejidos conjuntivos grasos y fibrosos de la mama.

Con el paso del tiempo, las células cancerígenas pueden invadir el tejido mamario sano circundante y llegar a los ganglios linfáticos (pequeños órganos que eliminan sustancias extrañas del cuerpo) de las axilas. Si las células cancerígenas llegan a los ganglios linfáticos, obtienen una puerta de acceso hacia otras partes del cuerpo. En este sentido, los estadios del cáncer de mama sirven, entre otras cosas para referenciar lo lejos que se han propagado las células cancerígenas más allá del tumor original, estableciéndose varios niveles de gravedad.

El cáncer de mama siempre se origina por una anomalía genética. No obstante, sólo un 5-10% de los casos son producto de la anomalía heredada de la madre o el padre. En cambio, el 85-90% de los casos de cáncer de mama tienen su origen en anomalías genéticas vinculadas al proceso de envejecimiento y el "desgaste natural" de la vida [12].

### 2.2.1. Epidemiología

Típicamente, se ha identificado que esta enfermedad presenta una mayor incidencia en mujeres postmenopáusicas. Realmente, la incidencia de acuerdo a edad del cáncer de mama, muestra un perfil que se eleva exponencialmente hasta la menopausia (alrededor de los 50 años) y aumenta de manera pausada posteriormente. Estudios epidemiológicos han concluido que los carcinomas son más agresivos y con tendencia a un peor pronóstico conforme más temprana es su aparición (premenopausia) [13, 14].

Se han observado variaciones de factores de riesgo según el grupo etario. Se ha observado que la nuliparidad y obesidad disminuyen el riesgo de padecer cáncer de mama de inicio temprano; mientras que estos mismos se comportan de manera

inversa en mujeres mayores. Por otro lado, la predisposición genética es un factor de riesgo fuerte en mujeres jóvenes [15].

El cáncer de mama es la neoplasia más común en mujeres de la mayoría de los países desarrollados, en donde representa un tercio de las nuevas neoplasias diagnosticadas [16]. A nivel mundial en el año 2018 hubo más de 2 millones de casos nuevos [17]. En Uruguay el cáncer de mama es el cáncer más frecuente y la principal causa de muerte por cáncer en la mujer. Aproximadamente existen 1800 casos nuevos y 600 muertes por año. En el mundo existen marcadas variaciones geográficas en las tasas de incidencia y mortalidad, ubicándose Uruguay entre los países del mundo con tasas más elevadas [18]. Uruguay ocupa el segundo quintil superior en relación a las tasas de incidencia pero el primero en relación a las tasas de mortalidad. En la figura 5 se muestra la incidencia por departamento, mientras que en la figura 6 se muestra la mortalidad por departamento [19].

**Distribución geográfica de la incidencia del cáncer de MAMA en MUJERES**

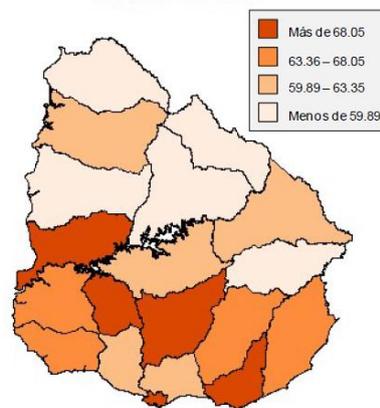


Figura 5: Incidencia del cáncer de mama por departamento. [Fuente: [www.comisioncancer.org.uy](http://www.comisioncancer.org.uy)]

**Distribución geográfica de la mortalidad por cáncer de MAMA en MUJERES**

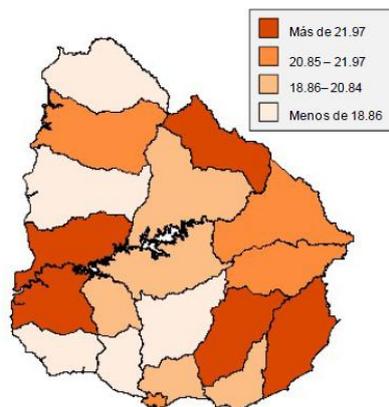


Figura 6: Mortalidad del cáncer de mama por departamento. [Fuente: [www.comisioncancer.org.uy](http://www.comisioncancer.org.uy)]

### 2.2.2. Factores de riesgo

A toda mujer le interesa saber qué hacer para disminuir su riesgo de contraer cáncer de mama. Algunos de los factores asociados con el cáncer de mama (ser mujer, la edad y la genética, por ejemplo) no se pueden cambiar. Otros factores, como el sobrepeso, la falta de ejercicio, fumar y no ingerir comida saludable, se pueden cambiar tomando decisiones.

A continuación se enumeran los factores de riesgo más conocidos:

- **Sexo:** simplemente ser mujer es el mayor factor de riesgo para desarrollar cáncer de mama. Se conoce que el 99% de los cánceres de mama aparecen en mujeres.
- **Edad:** el riesgo de contraer cáncer de mama aumenta a medida que envejecemos. Según la Sociedad Americana de Lucha Contra el Cáncer uno de cada ocho cánceres de mama invasivos se desarrollan en mujeres menores de 45 años. Aproximadamente dos de cada tres cánceres de mama invasivos se encuentran en mujeres de 55 años o mayores.
- **Genética:** Se cree que entre el 5% y el 10% de los cánceres de mama son hereditarios, causados por genes anormales que se transfieren de padres a hijos. La mayoría de los casos hereditarios de cáncer de mama están relacionados con dos genes que presentan anomalías: BRCA 1 (gen de cáncer de mama 1) y BRCA 2 (gen de cáncer de mama 2). Todas las personas tienen genes BRCA 1 y BRCA 2. Las proteínas derivadas de la transcripción de los genes BRCA ejercen una función inhibitoria de las señales desencadenadas por las hormonas esteroideas en el epitelio mamario; hipotéticamente, una alteración en la función de dichas proteínas provocaría una falta de control sobre los caminos de señalización celular derivados de la activación estrogénica, predisponiendo a la carcinogénesis. Los genes BRCA 1 y BRCA 2 con anomalías pueden ser responsables de hasta el 10% de todos los casos de cáncer de mama.
- **Antecedentes personales de cáncer de mama:** las pacientes tratadas por un tumor primario de cáncer de mama tienen un riesgo de desarrollar un segundo cáncer de mama de tres a cinco veces más alto que la población general.
- **Factores hormonales y reproductivos:** la duración total de la actividad hormonal de los ovarios, es el condicionante del riesgo de padecer cáncer de mama. Se estima un aumento del riesgo de padecer cáncer de mama en las situaciones con mayor intervalo de tiempo en que la mama está sometida al influjo hormonal del ovario, como sucede en la menarquía precoz y menopausia tardía.

Durante la gestación las hormonas esteroideas se segregan en cantidad considerable y contribuyen a la diferenciación de las células de los lobulillos, que se preparan para la secreción láctea, lo que les hace resistentes a la carcinogénesis. En las mujeres que tienen hijos disminuye el riesgo de cáncer de mama en comparación con las nulíparas, pero el efecto protector del

embarazo a término se cumple hasta la edad de 30 años, porque en la mujer con primer embarazo después de los 35 años el riesgo relativo aumenta y con incremento progresivo con la edad de la primera gestación.

La edad tardía de la menopausia se relaciona con aumento del riesgo de cáncer de mama. Las mujeres con menopausia natural antes de los 45 años tienen la mitad de riesgo de padecer cáncer de mama comparado con las mujeres que tienen la menopausia después de los 55 años [20].

- Estilo de vida y factores dietéticos: el sobrepeso o la obesidad después de la menopausia aumentan el riesgo de cáncer de seno. Antes de la menopausia, los ovarios producen la mayor cantidad de estrógeno, y el tejido adiposo produce solamente una pequeña parte de la cantidad total. Después de la menopausia (cuando los ovarios dejan de producir estrógeno), la mayor parte del estrógeno de una mujer proviene del tejido adiposo. Un exceso de tejido adiposo después de la menopausia puede elevar los niveles de estrógenos y aumenta su probabilidad de padecer cáncer de seno. Sin embargo, la relación entre el peso y padecer cáncer de seno es compleja. Por ejemplo, el riesgo de cáncer de seno después de la menopausia es mayor para las mujeres que aumentaron de peso como adultas, pero el riesgo antes de la menopausia es en realidad menor en las mujeres obesas. Las razones de esto no están muy claras. La Sociedad Americana Contra el Cáncer recomienda mantener un peso saludable durante el transcurso de la vida y evitar el aumento excesivo de peso mediante el balance del consumo de alimentos con la actividad física. No está claro cómo exactamente la actividad física podría reducir el riesgo de cáncer de seno, pero puede deberse a sus efectos sobre el peso corporal, la inflamación, las hormonas y el balance energético.

El consumo de bebidas alcohólicas está claramente relacionado con un aumento en el riesgo de padecer cáncer de seno. El riesgo aumenta con la cantidad de alcohol consumido. En comparación con las mujeres que no beben alcohol, aquellas que toman una bebida alcohólica al día tienen un pequeño aumento (alrededor del 7 al 10%) en el riesgo [21].

- Exposición a radiaciones ionizantes: la exposición a radiaciones ionizantes aumenta el riesgo de padecer cáncer de mama. Está bien establecido que las radiaciones ionizantes en dosis moderada o alta antes de los 40 años aumenta el riesgo de cáncer de mama [20].
- Ciertas enfermedades de las mamas que no son cancerosas: las mujeres que han tenido cáncer de mama tienen mayores probabilidades de tener esta enfermedad por segunda vez. Algunas enfermedades de las mamas que no son cancerosas, como la hiperplasia atípica, están asociadas a un mayor riesgo de tener cáncer de mama [22].

### 2.2.3. Tipos de cáncer de mama

El cáncer de mama se puede clasificar de varias maneras, sea en función de sus características clínicas, su expresión de marcadores tumorales y su tipo histológico.

### 2.2.3.1. Clasificación histológica

El cáncer de mama se puede clasificar biológica y clínicamente en diferentes subgrupos de acuerdo con el grado y tipo histológico. El grado hace referencia a la evaluación del grado de diferenciación celular así como a la actividad proliferativa. El tipo histológico se refiere al patrón de crecimiento de los tumores. Además, según la extensión de las células neoplásicas, los carcinomas se dividen en: carcinoma *in situ* y carcinoma invasor. El cáncer de mama es invasivo o infiltrante cuando se diseminó del sitio donde comenzó en la mama al tejido sano que lo rodea. Este tipo de cáncer se puede diseminar a otras partes del cuerpo a través del sistema linfático y sanguíneo, se clasifica en ductal y lobulillar [23]. Por el contrario, el cáncer de mama *in situ* es no invasivo cuando las células tumorales no invaden ni se multiplican en tejidos normales dentro o fuera de la mama, por lo que no invade ganglios linfáticos, vasos sanguíneos ni puede metastatizar [24]. Es un tipo de cáncer que hace referencia a una población de células neoplásicas de los conductos y lobulillos.

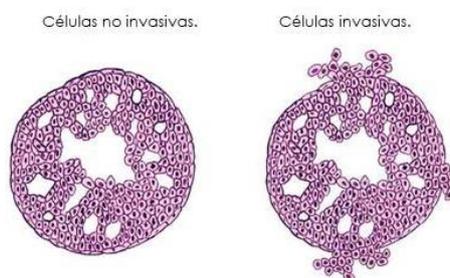


Figura 7: Células no invasivas (carcinoma *in situ*) y células invasivas (carcinoma invasor). [Fuente: [www.breastcancer.org](http://www.breastcancer.org)]

En algunos casos, un cáncer de mama puede ser invasivo y no invasivo a la misma vez. Esto significa que parte del cáncer se multiplicó en el tejido normal y otra parte permaneció dentro del tejido afectado [25].

El carcinoma invasor es el tipo más frecuente, constituye del 70 al 85% de la incidencia de casos de cáncer de mama. Mientras que el carcinoma *in situ* representa del 15% al 30% de los casos de cáncer de mama.

### 2.2.3.2. Clasificación molecular

En la última década se han hecho muchos esfuerzos para complementar la clasificación morfológica del cáncer de mama con parámetros moleculares, que pueden proporcionar un mayor conocimiento sobre los distintos cáncer de mama y su evolución, para mejorar las estrategias de tratamiento dando lugar a la aparición de las conocidas como terapias diana. En ocasiones, el patrón morfológico de las neoplasias no siempre revela su comportamiento oculto, ya que pacientes con el mismo tipo histológico pueden mostrar diferente curso de la enfermedad.

La clasificación molecular es posible realizarla de acuerdo a la caracterización molecular mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) y perfiles de expresión genética [26]. Las técnicas de IHQ consisten en una inmunotinción mediada por anticuerpos monoclonales marcados que reaccionan ante una variedad de antígenos. La técnica se basa en la capacidad de estos anticuerpos marcados con una sustancia que se pueda visualizar, ya sea por conjugación con un marcador

fluorescente o enzima seguida de detección colorimétrica, que al unirse al antígeno lo hacen visible [24]. Por otro lado, un perfil de expresión genética es una prueba de laboratorio que identifica todos los genes de una célula o tejido que producen al ácido ribonucleico mensajero (ARNm). Se realizan en células cancerosas después de la cirugía o la biopsia. Los patrones que se encuentran permiten obtener información sobre el cáncer y adaptar su tratamiento [27, 28]. Aunque actualmente se considera que el análisis de los perfiles de expresión genética constituye la mejor forma de clasificar los carcinomas de mama, en la mayoría de las clínicas su uso se encuentra limitado ya que son técnicas caras. En la práctica la mayor parte de los diagnósticos de rutina se realizan mediante IHQ [29].

El avance de las tecnologías de análisis genómico ha permitido clasificar los carcinomas de mama en cinco subtipos (ver figura 8). Esto demuestra la diversidad biológica del cáncer de mama [26].

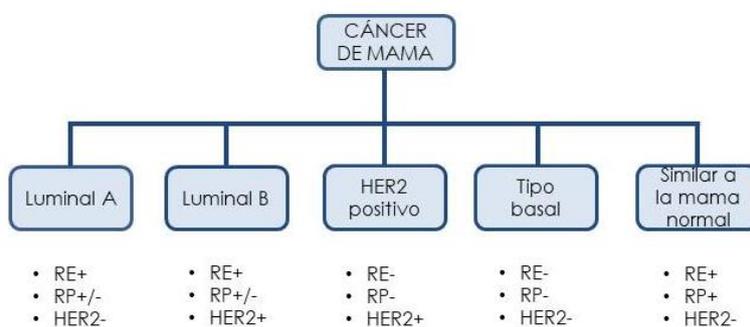


Figura 8: Clasificación molecular del cáncer de mama.

El manejo clínico actual del cáncer de mama se basa en varios factores, incluida la morfología del tumor y el grado de clasificación, tamaño del tumor, presencia de metástasis en ganglios linfáticos y expresión de marcadores biológicos bien definidos: receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) y receptor 2 del factor de crecimiento humano (HER-2 o HER2-neu). A pesar de la gran cantidad adicional de biomarcadores que han sido extensamente estudiado, los anteriormente mencionados son los que se utilizan actualmente en la evaluación patológica de rutina del cáncer de mama. Existen biomarcadores adicionales como factores de proliferación y marcadores "basales" que han sido incluidos gradualmente. Algunos ejemplos son el índice de proliferación celular y citoquinas como CK17 y CK5/6 [26, 29, 30]. Cada uno de estos biomarcadores, solos o en combinación, determina la biología y agresividad del tumor, permitiendo realizar su clasificación molecular. Aunque el conocimiento de estos factores ayuda en la planificación del tratamiento, hay una necesidad clara de mejorar la comprensión de dichos marcadores pronósticos y predictivos que facilitarán el trato personalizado del paciente [26]. Al determinar la presencia (positividad) o ausencia (negatividad) de antígenos receptores hormonales de estrógenos y progesterona, sobreexpresión del gen HER-2 y marcadores adicionales, es posible individualizar óptimamente el tratamiento [24].

### 2.3. Receptores de hormonas y su función

Los receptores de hormonas son un tipo de receptores que se hallan en las células mamarias normales. Las hormonas estradiol y progesterona (principales hormonas

sexuales femeninas), al unirse a sus respectivos receptores hormonales contribuyen al desarrollo y funcionamiento de las células mamarias.

Tal como las células mamarias sanas, la mayoría de las células cancerígenas tienen receptores de hormonas y responden a las señales emitidas por las mismas. Es importante saber si las células cancerígenas de la mama tienen receptores de hormonas o no para tomar decisiones en cuanto al tratamiento a realizar. Si hay células cancerígenas en las mamas con receptores de hormonas, se puede emplear la hormonoterapia (terapia endocrina dirigida) para interrumpir la influencia de las hormonas en el crecimiento y el funcionamiento general de las células. Si se elimina o se bloquea la hormona, tal como lo hacen estos medicamentos, las células cancerígenas tienen menos probabilidades de sobrevivir [31]. Las hormonas estrógenos y progesterona son producidas por los ovarios en mujeres premenopáusicas como posmenopáusicas y en hombres. En mujeres regulan todos los aspectos de la reproducción femenina, desde el comportamiento sexual al embarazo y la lactancia. Las actividades reguladoras de la transcripción llevadas a cabo por estas hormonas están mediadas por los receptores hormonales. Dichos receptores son receptores nucleares específicos, quienes son factores de transcripción cuya actividad se regula con la unión del esteroide específico. La señalización del estradiol esta mediada por uno de dos receptores, el RE alfa (RE $\alpha$ ) y el RE beta (RE $\beta$ ). La señalización de la progesterona está mediada por el PR, del cual dos isoformas han sido identificadas, PRA y PRB [32].

Alrededor de dos de cada tres cánceres de mama son receptores de hormonas positivos (RE+ y/o RP+) mostrando una sobreexpresión de los mismos. Cuanto mayor sea la carga de RE y PR en el tumor, mayor es la probabilidad de la respuesta a la terapia hormonal. En la figura 9 se muestra un gráfico que muestra según la clasificación del cáncer de mama, la tasa de respuesta al tratamiento hormonal.

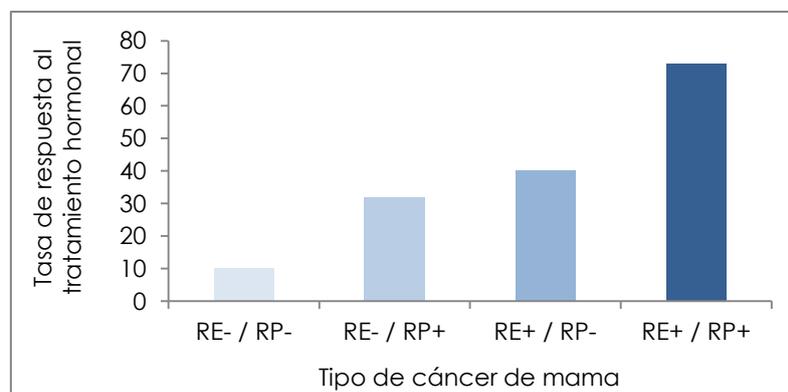


Figura 9: Gráfico de tipo de cáncer de mama vs. tasa de respuesta al tratamiento hormonal.

El comportamiento de la enfermedad positiva a los receptores hormonales es diferente al de aquella con receptores hormonales negativos en cuanto a su agresividad (sobre todo en cuanto a la evolución de la enfermedad y el sitio de recurrencia) [33]. Los tumores RE+ comprenden hasta el 75% de todos los pacientes con cáncer de mama. Los tumores RE+ están en gran medida bien diferenciados, son menos agresivos y están asociados con un mejor resultado después de la cirugía en comparación con los tumores RE negativos (RE-). Aunque el RE por sí solo proporciona un valor pronóstico

limitado, dado la poca diferencia en la supervivencia de los pacientes a largo plazo cuya estadificación está dada por el estatus del RE, ha sido considerado como el factor predictivo único más poderoso identificado en cáncer de mama [15].

### 2.3.1. Receptor de estrógenos y estrógenos

Los estrógenos pertenecen a la familia de hormonas esteroideas que influyen muchos procesos fisiológicos en mamíferos, incluyendo la reproducción, salud cardiovascular, integridad de huesos, cognición y comportamiento [34]. Los estrógenos (especialmente el estradiol) resaltan las características femeninas, controlan los ciclos reproductivos y el embarazo. Es la hormona esteroidea más estudiada, en parte debido al descubrimiento temprano de su receptor soluble y la importancia que tiene en el cáncer de mama. Dado este papel generalizado del estrógeno en la fisiología humana, no es sorprendente que los estrógenos estén implicados también en el desarrollo o progresión de numerosas enfermedades, que incluye pero no está limitado a varios tipos de cáncer (mama, ovario, colon-rectal, próstata y endometrio), osteoporosis, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina, lupus eritematoso, endometriosis y obesidad. En muchas de estas enfermedades, los estrógenos median estos efectos a través del RE, quien sirve como base para muchas intervenciones terapéuticas [35].

La producción de estrógenos varía según diferentes factores (género, edad y ciclos reproductivos). La mayoría de los estrógenos naturales permanecen poco tiempo en la circulación, no se acumulan en el tejido y se metabolizan fácilmente en el hígado. Los estrógenos son sintetizados a partir de precursores androgénicos, testosterona y androstenediona. Las enzimas que intervienen en su conversión a estrógenos constituyen un grupo de aromatasas: el grupo enzimático de los citocromos p450. Estas enzimas se encuentran en la granulosa del ovario (sitio de mayor concentración), el tejido adiposo, los fibroblastos de la piel, la placenta y el cerebro [36].

Los estrógenos, al igual que otras hormonas esteroideas, son derivados químicos del ciclopentanperhidrofenantreno o esterano (ver figura 10). Los anillos se clasifican como A, B, C (ciclohexanos) y D (ciclopentano), posee en total 17 átomos de C [37].

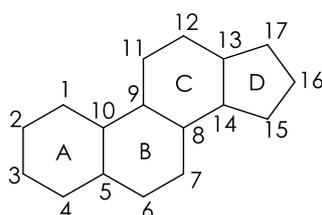


Figura 10: Estructura del ciclopentanperhidrofenantreno o esterano.

El estrógeno natural más potente en seres humanos es el estradiol, seguido de la estrona y el estriol (ver figura 11). Cada una de esas moléculas es un esteroide de 18 átomos de C, que contiene un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3) y un grupo  $\beta$ -hidroxilo (OH) o cetona (C=O) en la posición 17 del anillo D [38]. El estradiol es apolar e hidrofóbico, excepto en los extremos de la molécula, con un  $\log P_{o/w}$  calculado de 4.63 y con un  $\log P_{o/w}$  experimental de 3.26.

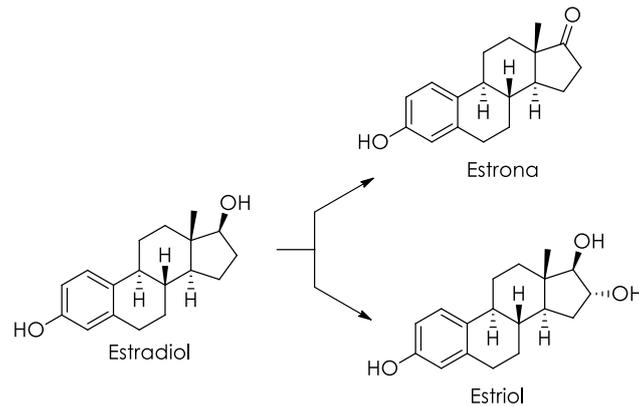


Figura 11: Estructura de los estrógenos naturales del ser humano.

A diferencia de los estrógenos naturales, los sintéticos como el etinilestradiol y el dietilestilbestrol (utilizados como anticonceptivos orales) son más estables y permanecen en el cuerpo durante un mayor tiempo. Los estrógenos naturales son oralmente inactivos o sólo a dosis altas activos, ya que se metabolizan muy rápidamente. Se logró desarrollar compuestos más activos y sobre todo más estables, mediante la introducción de un grupo etinilo en la posición 16 de la molécula de estradiol. A través de la introducción del grupo etinilo en el C17 del etinilestradiol (ver figura 12), el anillo D se convierte en extremadamente estabilizado contra la oxidación, lo que aumenta su biodisponibilidad [39].

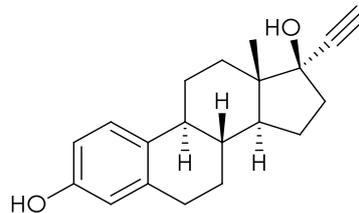


Figura 12: Estructura del etinilestradiol.

La presencia de una proteína receptora de unión a estrógenos fue reportada por primera vez a principios de los años sesenta por Elwood Jensen *et al.* [40]. El ADN que codifica para el RE fue clonado a mediados de los ochenta por Green *et al.* y durante mucho tiempo se creyó que era el único RE existente [41]. Sin embargo, en 1996 un segundo RE fue clonado de la próstata de rata. Este novedoso receptor fue designado como RE $\beta$  y consecuentemente el RE originalmente clonado se renombró como RE $\alpha$  [42].

Las dos isoformas, RE $\alpha$  y RE $\beta$ , tienen distintos patrones de expresión y están codificados por genes diferentes, ESR1 codifica al RE $\alpha$  y ESR2 codifica al RE $\beta$ , ambos genes se encuentran en diferentes localizaciones cromosómicas. EL RE $\alpha$  está presente principalmente en glándulas mamarias, útero, ovario (células tecales), hueso, órganos reproductores masculinos (testículos y epidídimo), próstata (estroma), hígado y tejido adiposo. Por el contrario, el RE $\beta$  se encuentra principalmente en la próstata (epitelio), vejiga, ovario (células granulosa), colon, tejido adiposo y sistema inmunitario. Ambos subtipos se expresan marcadamente en el sistema cardiovascular y sistema nervioso central. Hay algunos roles fisiológicos en común para ambos subtipos, como el desarrollo y función de los ovarios y protección del sistema cardiovascular. El subtipo  $\alpha$

tiene un rol más destacado en la glándula mamaria y útero, así como en la preservación de la homeostasis del esqueleto y regulación del metabolismo. El subtipo  $\beta$  parece tener un mayor efecto en el sistema nervioso central y sistema inmunitario y generalmente contrarresta la hiperproliferación en tejidos promovida por el subtipo  $\alpha$  en mamas y útero [43, 44]. Existe evidencia adicional de los diferentes roles que ambos receptores pueden tener en el cáncer de mama. La isoforma  $\alpha$  está generalmente regulada en aumento cuando ocurre la conversión del epitelio mamario normal en carcinoma, mientras que la isoforma  $\beta$  está regulada en detrimento [45, 46]. Usando células MCF-7 (células de cáncer de mama que expresan RE), Paruthiyil *et al.* demostraron los efectos contrarios de las dos isoformas de RE, mientras el RE $\beta$  inhibe la proliferación celular, el RE $\alpha$  media el cáncer de mama, su unión al estradiol estimula la proliferación celular [47].

Los estrógenos inducen cambios celulares a través de diferentes mecanismos al unirse al RE. En el mecanismo de acción clásico (ver figura 13), el estrógeno atraviesa las membranas de la célula por difusión pasiva y se une al RE que se encuentra localizado en el núcleo celular. Este complejo nuclear, estrógeno-RE, se une a las secuencias específicas de los elementos de respuesta a estrógenos (ERE's) ya sea de forma directa o indirecta a través de interacciones proteína-proteína con la proteína activadora 1 (AP-1) o proteína SP-1 (factores de transcripción) en el promotor de los genes de respuesta a estrógenos, resultando en el reclutamiento de proteínas reguladoras (activadoras o represoras) en el promotor, aumentando o disminuyendo los niveles de ARNm asociado a la producción de proteínas y a la correspondiente respuesta fisiológica. Este mecanismo clásico o "genómico" ocurre en el transcurso de horas. En contraste, los estrógenos pueden actuar más rápidamente (en segundos o minutos) vía mecanismos "no genómicos", ya sea a través de RE localizados en la membrana plasmática o adyacentes a la misma, o a través de otros RE no asociados a la membrana plasmática, resultando en respuestas celulares como aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  u óxido nítrico y activación de las quinasas [48]. Ambos eventos iniciados por los estrógenos, genómicos y rápidos, han sido tradicionalmente atribuidos únicamente a los clásicos RE, RE $\alpha$  y RE $\beta$ . En los últimos años, un receptor miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G, GPR30, ha sido implicado en mediar ambos eventos transcripcionales y rápidos como respuesta a los estrógenos bajo determinadas circunstancias [49].

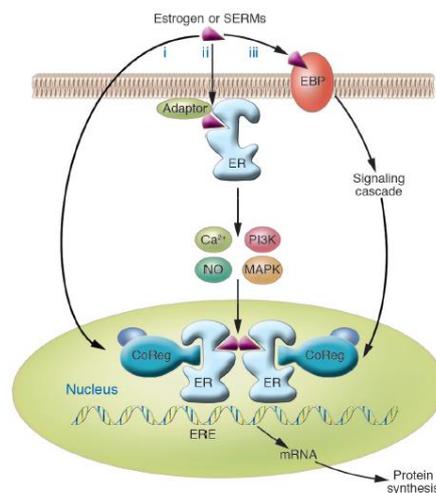


Figura 13: Mecanismo de acción de los estrógenos. (Fuente: [55])

La secuencia de aminoácidos de ambos receptores, en el dominio de unión al ligando (LBD), está conservada en un 59%, lo que representa una significativa diferencia. Sin embargo, las diferencias dentro del LBD están en sólo dos posiciones de aminoácidos: Leu384 y Met421 en el RE $\alpha$  son reemplazadas por la Met336 y Ile373 en el RE $\beta$ , respectivamente. El efecto general de estas sutiles diferencias es la dificultad en el diseño de ligandos selectivos. Sin embargo, los avances en la biología estructural han permitido hoy en día a los investigadores tener un buen contexto para considerar las interacciones con los ligandos cruciales para mantener una buena afinidad, lo que junto con la información de la relación estructura – actividad, ha permitido formular modelos confiables de farmacóforos para el RE [43, 44]. Como farmacóforo se entiende al conjunto de características estructurales en una molécula que es reconocido en el sitio de unión del receptor y es responsable de la actividad biológica de la molécula [50].

Estudios de unión extensivos de análogos del estradiol han permitido obtener una descripción detallada del farmacóforo del RE. El farmacóforo del RE fue descrito por primera vez en 1950 como los dos grupos hidroxilos separados por un espaciador hidrofóbico [51]. A pesar de que el acomodamiento alrededor del anillo A impone un requerimiento absoluto de que los ligandos tengan un anillo aromático, el restante bolsillo de unión puede aceptar un gran número de diferentes grupos hidrofóbicos. Esto puede ser atribuido al tamaño de la cavidad, quien tiene un volumen (450 Å<sup>3</sup>) cercano a dos veces el volumen molecular que ocupa el estradiol (245 Å<sup>3</sup>) [43]. La presentación del farmacóforo comúnmente aceptada para un agonista del RE $\alpha$  incluye (ver figura 14):

- I. Presencia de un anillo aromático (Ar).
- II. Presencia de grupos capaces de formar enlaces de hidrógeno (OH) en cada extremo de la molécula (el OH unido al C3 es más crucial para la unión en comparación al OH unido al C17).
- III. Una distancia precisa de 11Å entre los átomos de oxígeno de los grupos OH unidos al C3 y C17.

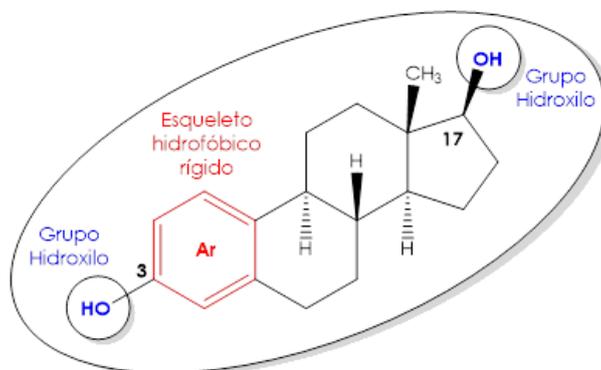


Figura 14: Estructura del 17 $\beta$ -estradiol con las principales características estructurales necesarias para la óptima unión al dominio de unión al ligando del RE $\alpha$ .

Durante el diseño de la molécula a marcar, se busca que la modificación química a realizar no afecte o aumente la actividad biológica *in vivo* mejorando la selectividad,

ya sea aumentando la afinidad de unión al RE, reduciendo la unión a las proteínas del suero o reduciendo su metabolismo. En la figura 15 se indica en donde se han realizado modificaciones o han sido introducidos diferentes sustituyentes en la molécula de estradiol.

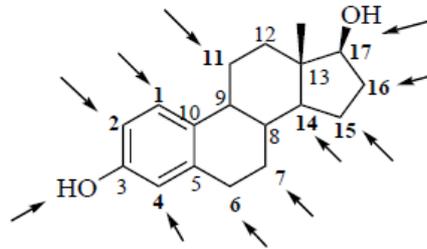


Figura 15: Estructura química del estradiol, se indica con flechas los sitios en donde se han realizado modificaciones estructurales [52].

Estudios realizados luego de introducir modificaciones en el anillo A demostraron que las mismas resultaron ser no beneficiosas, disminuyendo o manteniendo la afinidad por el RE en el caso de grupos pequeños. De igual manera resultaron ser las modificaciones en el C6 del anillo B. En cambio, modificaciones en el C7 del mismo anillo fueron bien toleradas cuando se trató de grupos apolares o grupos polares posicionados a cierta distancia de la estructura esteroide. Sustituyentes relativamente largos y no polares en el C11 y en posición  $\beta$  del anillo C fueron bien tolerados. Sustituyentes del tipo 17 $\alpha$ -etinil en el C17 del anillo D demostraron aumentar la afinidad por el RE, en cambio, sustituyentes más grandes que el grupo etinil fueron usualmente menos tolerados por el RE. Sin embargo, a pesar de la aparente intolerancia estérica en la posición 17 $\alpha$ , muchos sustituyentes derivados organometálicos han demostrado retener la afinidad por el RE, incluso grupos unidos a un grupo etinilo o vinilo. El RE resultó ser moderadamente intolerante a grupos polares en el anillo D, excepto para la posición específica 17 $\alpha$ . Grupos pequeños y no polares son bien tolerados en la posición 16 $\alpha$ , mientras que sustituyentes largos, especialmente aquellos que aumentan la polaridad, resultan en una pobre afinidad. Las posiciones C14 y C15 demostraron aceptar grupos pequeños, no polares sin una apreciable pérdida de la afinidad por el RE [52].

## 2.4. Detección del cáncer de mama

En ocasiones, el cáncer de mama es detectado debido al surgimiento de síntomas, pero muchas mujeres no presentan síntomas. Por esta razón es muy importante hacerse las pruebas de detección programadas, que tienen el propósito de encontrar una enfermedad en las personas que carecen de síntomas.

El objetivo de los exámenes para detectar el cáncer de seno consiste en encontrarlo antes de que empiece a causar síntomas (como una protuberancia que se pueda palpar).

Los cánceres de seno que se encuentran durante los exámenes de detección suelen ser más pequeños y estar aún confinados en el seno. El tamaño y la extensión del cáncer de seno son algunos de los factores más importantes para establecer el pronóstico (expectativa) de una mujer que padezca esta enfermedad [53].

La detección precoz del cáncer de mama ha permitido mejorar los resultados del tratamiento y aumentar las posibilidades de curación hasta casi el 100%. En los últimos años se han puesto en marcha programas que facilitan el diagnóstico precoz de forma sencilla y accesible, enseñando a las mujeres como detectar el cáncer de mama [54]. A continuación se mencionan algunas de las formas para detectar el cáncer de mama:

- Autoexploración mamaria: es un examen visual y mediante palpación que ayuda a vigilar la aparición de bultos en las mamas y axilas y observar si aparecen otros cambios en la piel, la areola o el pezón. Debería empezar a realizarse a partir de los 25 años de forma regular. Se trata de una técnica complementaria que no sustituye a la exploración realizada por un médico.
- Pruebas de Imagen:
  - ✓ Mamografía: la mamografía es un tipo de examen con rayos X que se utiliza para examinar los senos. Este tipo de examen por imágenes consiste en exponer los senos a una pequeña cantidad de radiación ionizante para obtener imágenes del interior de los senos [55].
  - ✓ Ecografía: el ultrasonido de los senos utiliza ondas sonoras para crear imágenes del interior de los senos. Puede capturar imágenes de áreas del seno que podrían ser difíciles de ver con la mamografía [56].
  - ✓ Resonancia magnética nuclear (RMN): la RMN de mama usa ondas de radio e imanes potentes para producir imágenes detalladas del interior del seno. A veces se utiliza en mujeres que ya han sido diagnosticadas con cáncer de mama, para ayudar a medir el tamaño del cáncer, identificar otros tumores en el seno y para detectar tumores en el seno opuesto. No se recomienda como prueba de detección por sí sola, ya que podría no detectar algunos casos de cáncer que la mamografía sí encontraría [57].
  - ✓ Biopsia: se realiza cuando existe una sospecha de un tumor por las pruebas de imagen. Permite obtener una muestra de tejido que se analiza en el laboratorio para ver si la masa detectada por las pruebas de imagen es un tumor o no. Durante una biopsia, un médico obtiene células del área que causa sospecha para que se puedan examinar en el laboratorio, y así saber si existen células cancerosas. Existen diferentes tipos de biopsias, algunas se realizan con agujas y otras mediante una incisión, cada tipo tiene sus ventajas y desventajas y el tipo a emplear depende de varios factores como por ejemplo la localización en el seno y el tamaño [58].

### 2.4.1. Medicina Nuclear

La Medicina Nuclear se define como la rama de la medicina que utiliza compuestos radiactivos, los radiofármacos, que son administrados al paciente, para fines de diagnóstico y/o terapia [59]. En Medicina Nuclear aproximadamente el 95% de los radiofármacos se usan con fines diagnósticos, el restante 5% tiene fines terapéuticos [60].

La Medicina Nuclear es más frecuentemente usada en diagnóstico. Un estudio básico de Medicina Nuclear para diagnóstico (ver figura 16) comienza con la preparación y administración del radiofármaco de diagnóstico al paciente, por lo general, mediante vía intravenosa (puede ser también por vía oral, nasal o intratecal). El radiofármaco se biodistribuye y se concentra en la parte del cuerpo que se está estudiando. Transcurrido un tiempo suficiente, se realiza la adquisición de la imagen mediante un detector externo que permite determinar la cantidad de radiación emitida desde el órgano o sistema que se desea estudiar y obtener una imagen.

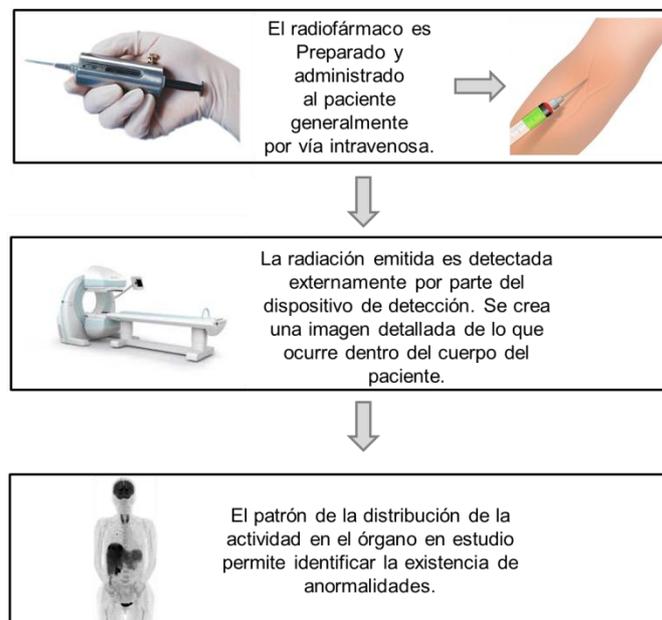


Figura 16: Etapas de un estudio básico de Medicina Nuclear diagnóstico.

### 2.4.2. Radiofármacos

Un radiofármaco es toda sustancia que contiene un átomo radiactivo (radionucleido) y que es administrado en seres humanos con fines diagnóstico y/o terapéuticos [61].

Un radionucleido es una especie atómica inestable que, debido a cambios en la estructura de su núcleo emite de forma espontánea radiación ionizante en forma de partículas alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), o radiación gamma ( $\gamma$ ). Los radiofármacos para diagnóstico contendrán radionucleidos emisores  $\gamma$  o de positrones ( $\beta^+$ ), en cambio, los radiofármacos para terapia incluirán en su estructura radionucleidos emisores de electrones (partículas  $\beta^-$ ) o partículas  $\alpha$ , y podrán ir acompañados o no de emisión de radiación  $\gamma$  [62]. En contraste con los fármacos convencionales, los radiofármacos no tienen efectos farmacológicos, debido a que se usan en cantidades traza [63]. Sin

embargo, los radiofármacos son considerados como medicamentos y deben cumplir con una serie de requisitos farmacéuticos que dependerá de la vía de administración.

Los radiofármacos pueden ser moléculas orgánicas e inorgánicas pequeñas, especies coloidales, macromoléculas (anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y péptidos) o células marcadas con un radionucleido [64]. Es importante que el radionucleido seleccionado tenga propiedades químicas que permitan su fácil introducción en la molécula de interés. Los radionucleidos metálicos son particularmente interesantes para el desarrollo de radiofármacos debido a sus propiedades nucleares tan variables (tipo de radiación emitida, energía de los fotones  $\gamma$  o partículas  $\beta$ , período de semidesintegración) y su rica química de coordinación [65]. Su uso ofrece una amplia variedad de alternativas en el diseño y desarrollo de potenciales radiofármacos basados en moléculas biológicas.

La marcación de biomoléculas con radiometales puede estar basada en diferentes estrategias de marcación. Una de ellas es conocida como marcación integrada o *integrated approach*, la cual consiste en simular con el complejo de coordinación la estructura del compuesto bioactivo de forma tal que el cambio, tanto en el tamaño, conformación y afinidad de unión sea la mínima posible. Otra es la estrategia conocida como *pendent approach* e implica la utilización de agentes quelantes bifuncionales (BFCs, bifunctional chelates). Se basa en la utilización de estructuras moleculares, capaces de por un lado, coordinar al metal por medio de grupos donores de electrones adecuados (unidad quelante) y, por otro lado, unirse covalentemente a la molécula que se quiera marcar (y que contiene el farmacóforo) por medio de grupos químicos capaces de reaccionar con grupos presentes en la molécula en cuestión. En la mayoría de los casos, estos agentes poseen también lo que se conoce como espaciador con el fin de separar espacialmente la región de coordinación del metal del resto de la molécula, y así minimizar la posible interferencia entre el metal y la estructura biológicamente activa de la molécula original (ver figura 17).

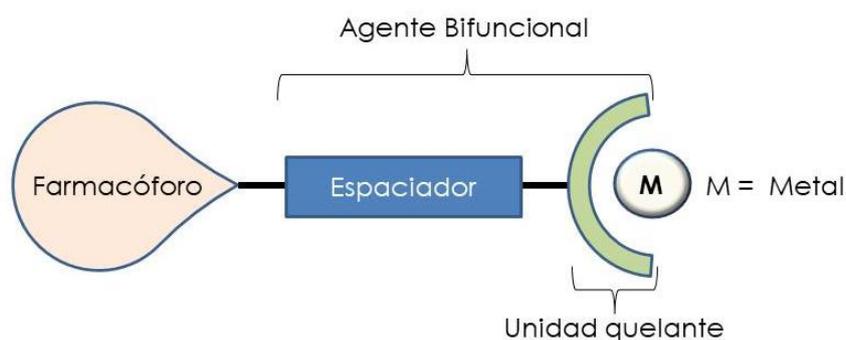


Figura 17: Esquema de un agente bifuncional para el desarrollo de radiofármacos.

La elección del agente bifuncional está determinada por la naturaleza y el estado de oxidación del metal, así como la posibilidad de conjugación al farmacóforo. Es la estrategia más utilizada para el diseño de radiofármacos metálicos [65, 66].

### 2.4.3. Radiofármacos de diagnóstico

Los radiofármacos para diagnóstico son trazadores radiactivos que se administran en el paciente, con el fin de diferenciar una bioquímica, fisiología o anatomía anormal de

la normal mediante dos tipos de procedimientos: análisis de muestras y de obtención de imágenes. Los estudios de análisis de muestras permiten realizar un diagnóstico basándose en la absorción, dilución, concentración o excreción de radiactividad luego de la administración de un radiofármaco. Estos estudios no requieren imágenes, sino que el análisis e interpretación está basado en el conteo de muestras de sangre, orina o heces. Los estudios de obtención de imágenes, proveen información diagnóstica basándose en el patrón de distribución de actividad en el organismo tras la administración de un radiofármaco adecuado. Para poder estudiar un órgano o sistema por estas técnicas es necesario que exista una notoria diferencia de actividad entre la condición patológica y la normal del órgano en estudio, lo que se logra mediante una adecuada selección del radiofármaco.

Al ser los radiofármacos compuestos radiactivos, es importante, que la dosis de radiación recibida por el paciente como consecuencia del estudio diagnóstico sea lo más baja posible, a fin de minimizar el riesgo de efectos adversos. Por este motivo, las propiedades del radiofármaco empleado deben ser tales que permitan una máxima eficiencia de detección de la radiación emitida (para lograr una buena calidad de imagen que permita realizar el diagnóstico) pero con un mínimo de dosis absorbida por el paciente. Por lo tanto, es deseable que el radiofármaco presente un apropiado comportamiento biológico, adecuada estabilidad *in vivo* y rápida excreción una vez finalizado el estudio [67].

La radiación electromagnética ( $X$  y  $\gamma$ ) es la única adecuada para ser detectada con un equipo colocado externamente al paciente. La radiación particulada ( $\beta$ ,  $\alpha$ , electrones Auger) es completamente absorbida en el tejido debido a su escaso poder de penetración, por lo que da lugar a altas dosis de radiación y no puede ser medida desde el exterior del organismo. Los modos de decaimiento deseables para diagnóstico por imágenes son, por lo tanto, la transición isomérica y la captura electrónica, modos en los cuales, en principio, sólo existe radiación  $\gamma$  y asociada. Adicionalmente es deseable que la conversión interna y la emisión de electrones Auger no existan (o sea mínimas). Los radionucleidos emisores de  $\beta^+$  también son adecuados para diagnóstico por imágenes, ya que los rayos  $\gamma$  de 511 KeV emitidos como consecuencia del fenómeno de la aniquilación del positrón pueden ser detectados externamente.

Dependiendo del tipo de emisión que tenga el radionucleido utilizado para el estudio diagnóstico, la tecnología utilizada para tomar la imagen puede ser SPECT o PET. La modalidad SPECT utiliza radiofármacos que poseen radionucleidos emisores  $\gamma$ , mientras que la modalidad PET, permite la utilización de radionucleidos emisores de  $\beta^+$ . Uruguay cuenta con SPECT desde el año 1982, cuando el Centro de Medicina Nuclear de Hospital de Clínicas "Dr. Manuel Quintela" recibió el equipamiento a través de la Organización Internacional de Energía Atómica (OIEA), hecho que significó un importante avance en Medicina Nuclear en nuestro país. Desde principios del año 2010, Uruguay cuenta también con la tecnología PET en CUDIM, hecho que ha representado otro gran avance. En ambas modalidades de detección, a la hora de seleccionar el radionucleido se debe tener en cuenta el período de semidesintegración ( $t_{1/2}$ ) que se define como el tiempo necesario para que se desintegren la mitad de los núcleos de una muestra radiactiva. Dicho tiempo debe ser lo más corto posible, pero compatible con el tiempo para producir el radiofármaco, realizar su control de calidad y completar el estudio del paciente. Otro factor a tener a

en cuenta es la disponibilidad. La mayoría de los radionucleidos usados en PET son producidos mediante un ciclotrón. Un ciclotrón es un acelerador de partículas cargadas (proyectil), las que luego de una serie de pasos colisionan con un material blanco, causando un cambio en el núcleo de dicho material y transformándolo en un radionucleido. Los más usados son el  $^{18}\text{F}$ , el  $^{11}\text{C}$ , el  $^{15}\text{O}$  y el  $^{13}\text{N}$ ; con excepción del  $^{18}\text{F}$ , los demás deben ser producidos cerca del sitio de utilización debido a su  $t_{1/2}$  extremadamente corto. El  $^{18}\text{F}$  al tener un mayor  $t_{1/2}$  puede ser usado en lugares más distantes del lugar de producción. Por otro lado, para la modalidad SPECT el más utilizado es el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , producido a partir de un generador de  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  lo que lo hace fácilmente accesible.

Radionucleido	Modo de decaimiento	Período de semidesintegración	Energía $\gamma$ (keV)
$^{11}\text{C}$	$\beta^+$	20 minutos.	511
$^{13}\text{N}$	$\beta^+$	10 minutos.	511
$^{15}\text{O}$	$\beta^+$	2 minutos.	511
$^{18}\text{F}$	$\beta^+$	110 minutos.	511
$^{67}\text{Ga}$	Captura electrónica	78.2 horas.	93, 185, 299
$^{68}\text{Ga}$	$\beta^+$	68 minutos.	511
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Transición isomérica	6 horas.	140
$^{111}\text{In}$	Captura electrónica	2.8 días.	173, 247
$^{123}\text{I}$	Captura electrónica	13.2 horas.	160
$^{131}\text{I}$	$\beta^-$ , $\gamma$	8 días.	360
$^{201}\text{Tl}$	Captura electrónica	73 horas.	78, 135, 168

Tabla 1: Principales radionucleidos empleados en Medicina Nuclear diagnóstica.

Los radiofármacos de diagnóstico requieren que su pureza radioquímica (PRQ) sea mayor o igual al 90%. La PRQ se define como el porcentaje de la actividad total de la muestra presente en la forma química deseada, en este caso el radiofármaco en cuestión. Se impone un valor límite puesto que la introducción en el paciente de una mezcla de diversas especies que contengan al radionucleido en cuestión, disminuye la captación en el órgano blanco y aumenta innecesariamente la dosis de la radiación en órganos no blancos al mismo tiempo que disminuye la calidad de las imágenes [68].

### 2.4.3.1. Desarrollo de un potencial radiofármaco

Para que un radiotrazador o potencial radiofármaco sea denominado radiofármaco deben cumplirse una serie de requisitos que aseguren su seguridad y eficacia para uso en humanos (ver figura 18).



Figura 18: Diferencias en cuanto al uso del término radiotrazador o potencial radiofármaco vs. radiofármaco.

El desarrollo de nuevos radiofármacos se basa en una serie de etapas que se muestran en la figura 19. A excepción de los estudios *in vivo* el presente trabajo incluyó todas las etapas.

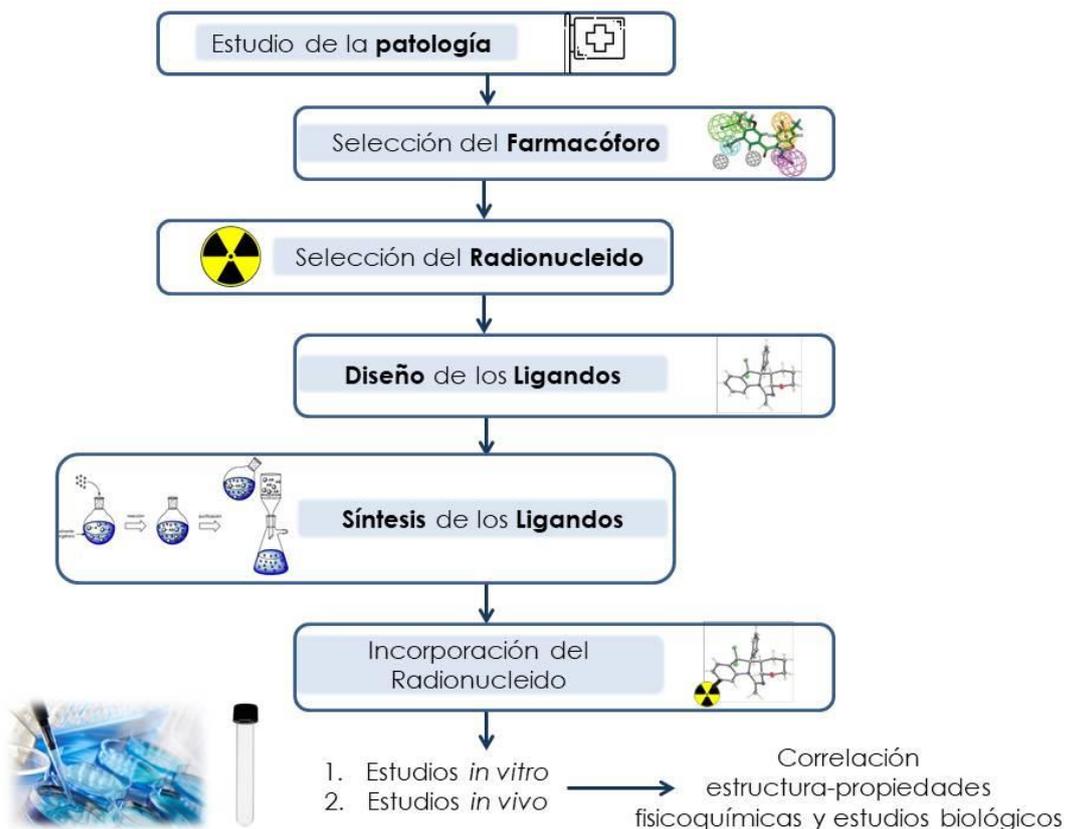


Figura 19: Esquema de las etapas en el desarrollo de un potencial radiofármaco.

En primer lugar se debe realizar un estudio profundo de la enfermedad a diagnosticar o tratar. Una vez adquiridos los conocimientos sobre la misma se procede a seleccionar el blanco molecular (receptor, enzima, etc.) de la enfermedad sobre el cual se trabajará. De acuerdo al blanco molecular se seleccionará el farmacóforo.

La siguiente etapa consiste en la selección del radionucleido que dependerá del posterior uso que se le dará al radiofármaco, es decir, si el mismo estará destinado a diagnóstico o terapia. Es fundamental en este paso realizar una evaluación de las características químicas y físicas del radionucleido seleccionado, así como también evaluar costos y disponibilidad.

Una vez seleccionados el farmacóforo y radionucleido se debe llevar a cabo el diseño de la molécula a marcar. Dicho diseño va a depender del farmacóforo y tipo de radionucleido elegido. Algunos de los aspectos que se deben evaluar en esta etapa son el modo de unión del radionucleido a la biomolécula (enlace covalente o enlace de coordinación), átomos y grupos químicos presentes en la biomolécula, estabilidad de la biomolécula, en caso de ser necesario posibilidad de derivatizar la biomolécula, etc. Una vez realizado el diseño se debe proceder a realizar la síntesis química del ligando y su posterior confirmación mediante técnicas de determinación estructural.

El paso siguiente es la incorporación del radionucleido al ligando sintetizado, proceso que se conoce como reacción de marcación. En esta etapa se deben optimizar condiciones de la marcación como cantidad de ligando, cantidad de radionucleido y agente reductor, temperatura, tiempo, pH, entre otros. También se debe seleccionar el método de purificación (en caso de ser necesario) y de control de la PRQ (cromatografía líquida de alta resolución o HPLC, cromatografía en capa fina o TLC) así como las condiciones cromatográficas del mismo. También corresponde llevar a cabo los análisis de control de calidad que todo radiofármaco debe cumplir según la vía de administración, establecidos en las farmacopeas oficiales.

Una vez demostradas las características adecuadas del potencial radiofármaco para continuar con el estudio, se debe proceder con la realización de los estudios *in vitro*. Se determinan sus propiedades fisicoquímicas y se realizan estudios biológicos, por lo general utilizando una línea celular que contenga al blanco molecular seleccionado. Los estudios *in vitro* permiten predecir el comportamiento *in vivo* del compuesto marcado y son un requisito fundamental para poder realizar las evaluaciones biológicas *in vivo*. Si en dichos estudios se determina que el radiotrazador no presentará un comportamiento biológico adecuado, los estudios *in vivo* no se realizan por razones éticas, por lo que es fundamental se respete el orden *in vitro* → *in vivo*.

Finalmente se realizan los estudios *in vivo*, en primer lugar con animales normales a fin de evaluar el comportamiento biológico del radiofármaco como su biodistribución, farmacocinética en sangre, vías de eliminación y órganos de acumulación. Por último se realizan los estudios en animales portadores de la enfermedad de manera de conocer la acumulación del trazador en el sitio blanco y no blanco.

#### 2.4.3.2. Radiofármacos para Imagenología de los RE

Desde el año 1980 muchos compuestos esteroides y no esteroides han sido evaluados como radiotrazadores PET y SPECT para Imagenología de los RE en pacientes con cáncer de mama. Sin embargo, la gran mayoría de ellos han fallado en los estudios preclínicos o primeras etapas de los clínicos.

En los años 1980 Kiesewetter *et al.* describieron la síntesis y evaluación de estrógenos marcados con  $^{18}\text{F}$ , dentro de los cuales se encontraba el 16 $\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroestradiol (mejor conocido como [ $^{18}\text{F}$ ]FES), el radiofármaco más estudiado al día de hoy para

Imagenología de los RE (ver figura 20). Los cuatro estrógenos marcados con  $^{18}\text{F}$  fueron obtenidos con una elevada pureza química y radioquímica, así como también una adecuada actividad molar ( $A_m$  que se define como la actividad/mol es decir la actividad por unidad de masa) [69]. Todos mostraron una elevada afinidad por el RE y estudios de biodistribución en ratas hembras inmaduras mostraron una captación selectiva en el útero. Es importante destacar los estudios para radiotrazadores dirigidos al RE, se realizan en ratas inmaduras debido a que contienen menor cantidad de estrógenos endógenos.  $[^{18}\text{F}]\text{FES}$  demostró tener la selectividad más elevada, con la relación útero/sangre y útero/tejido no blanco más elevada a las 2 horas post-inyección [70].

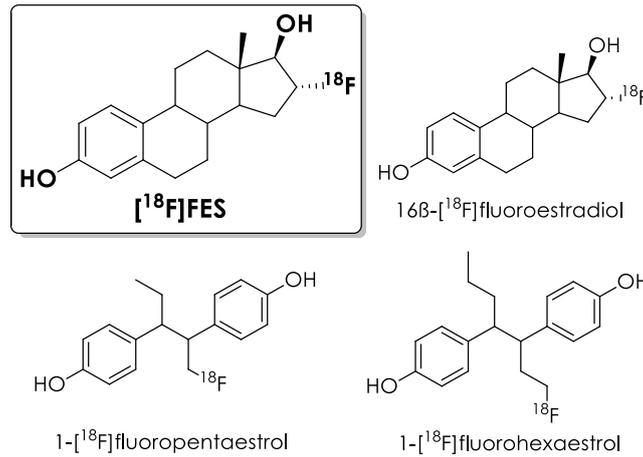


Figura 20: Estructura de compuestos investigados por Kiesewetter *et al.* [69].

Katzenellenbogen *et al.* sintetizaron numerosos análogos de  $[^{18}\text{F}]\text{FES}$  con sustituyentes en el C11 y C17 con el fin de mejorar su comportamiento biológico. La introducción de sustituyentes en dichas posiciones era conocida por alterar el metabolismo estrogénico. Se mantuvo el  $^{18}\text{F}$  en la posición 16a, dado que fue el epímero que mostró una mayor afinidad por el RE. La figura 21 muestra los derivados sintetizados, en donde se varió el grupo R en la posición C11, así como también la posición relativa de los sustituyentes en el C17.

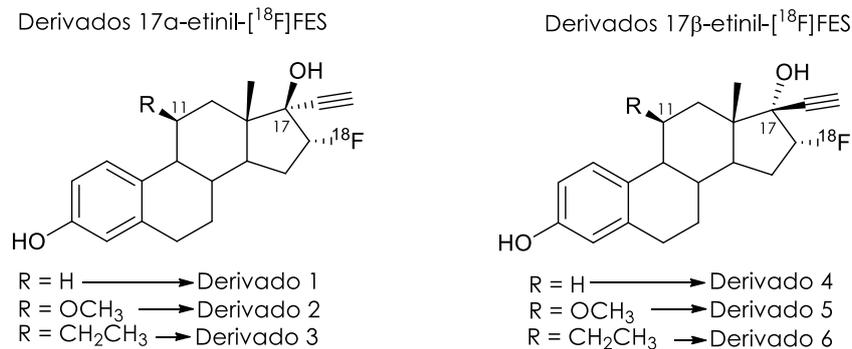


Figura 21: Estructura derivados de  $[^{18}\text{F}]\text{FES}$  sintetizados por Katzenellenbogen *et al.* [52].

Todos los derivados 17β-etinil- $[^{18}\text{F}]\text{FES}$  resultaron en una significativa menor afinidad de unión por el RE. En cuanto a los derivados 17α-etinil- $[^{18}\text{F}]\text{FES}$ , la introducción del grupo 11β-etil, resultó en una mayor afinidad por el RE, pero debido a ser apolar también aumentó la unión inespecífica. Por el contrario, el sustituyente 11β-metoxi, resultó

umentar la unión al RE pero disminuyó la lipofilicidad, con un potencial beneficio en reducir la unión inespecífica. El mismo grupo de investigación también desarrolló los derivados  $16\beta$ - $[^{18}\text{F}]$ fluoroestradiol con sustituyentes en posición  $11\beta$ ,  $17\alpha$  y en ambos al mismo tiempo (ver figura 22).

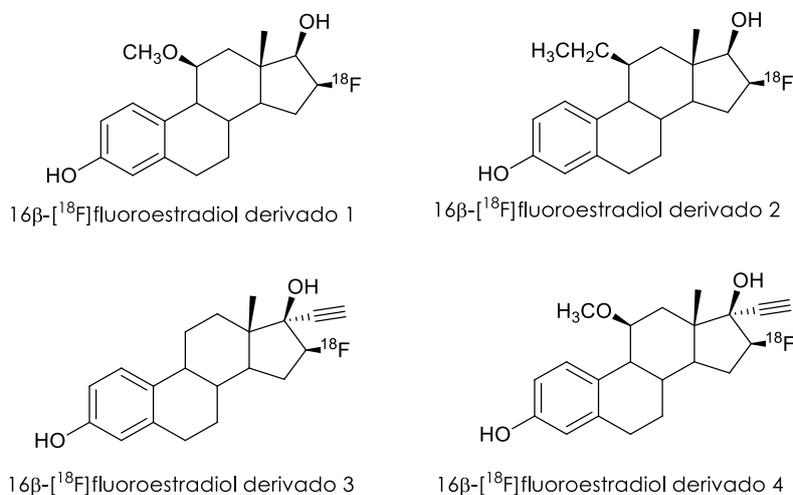


Figura 22: Estructura de los  $16\beta$ - $[^{18}\text{F}]$ fluoroestradiol derivados sintetizados por Jonson *et al.* [71].

Todos presentaron una captación selectiva en los principales tejidos blancos, útero y ovarios, así como también en aquellos con baja concentración de RE (riñones, timus, tejido graso y músculo). El derivado 4 fue el más prometedor,  $17\alpha$ -etil- $11\beta$ -metoxi- $16\beta$ - $[^{18}\text{F}]$ fluoroestradiol ( $\beta$ FMOX), cuya afinidad de unión en útero fue cerca de cuatro veces mayor con respecto al  $[^{18}\text{F}]$ FES. La razón de ésta mayor afinidad de unión se encuentra en la mayor estabilidad *in vivo* en comparación al  $[^{18}\text{F}]$ FES. Sin embargo, estudios preliminares en pacientes evidenciaron una baja captación en tumores RE+ en comparación con  $[^{18}\text{F}]$ FES. Jonson *et al.* demostraron que en humanos, en donde el derivado resultó no actuar como un agente de imagen para RE, la actividad inyectada prácticamente no se redistribuyó desde el sitio de inyección como consecuencia de la baja unión de  $\beta$ FMOX a proteínas plasmáticas [52, 71].

Seimbille *et al.* sintetizaron una serie de derivados de  $[^{18}\text{F}]$ FES con modificaciones en el anillo A, tanto en el C2 como en el C4 (ver figura 23), buscando bloquear la síntesis de catecol estrógenos generados en la principal ruta metabólica del estradiol. El grupo planteó la hipótesis de que el agregado de un átomo de flúor en las posiciones C2 o C4 de  $[^{18}\text{F}]$ FES debería prolongar el tiempo de circulación en sangre, y consecuentemente, mejorar la captación en tejidos blanco. Los estudios realizados demostraron que la adición concomitante de un átomo de flúor en el C4 y un grupo  $11\beta$ -metoximetilo ( $4\text{-F}[^{18}\text{F}]$ MFES) podría aumentar el potencial de  $[^{18}\text{F}]$ FES como radiotrazador para Imagenología Molecular en cáncer de mama. Debido a la favorable biodistribución observada en modelos animales y su elevada relación blanco/no blanco en comparación al  $[^{18}\text{F}]$ FES, el mismo grupo llevó a cabo estudios de biodistribución, dosimetría y seguridad en mujeres sanas [72]. Estudios preliminares de fase II indicaron que  $4\text{-F}[^{18}\text{F}]$ MFES puede detectar tumores RE+ con una relación blanco/ no blanco mayor al  $[^{18}\text{F}]$ FES, mejorando la confianza en el diagnóstico y reduciendo los falsos negativos [73]. Actualmente se encuentra en estudios clínicos de

fase II, por lo que aún queda trabajo que asegure su potencial para superar al hasta el momento considerado estándar de referencia [ $^{18}\text{F}$ ]FES [74].

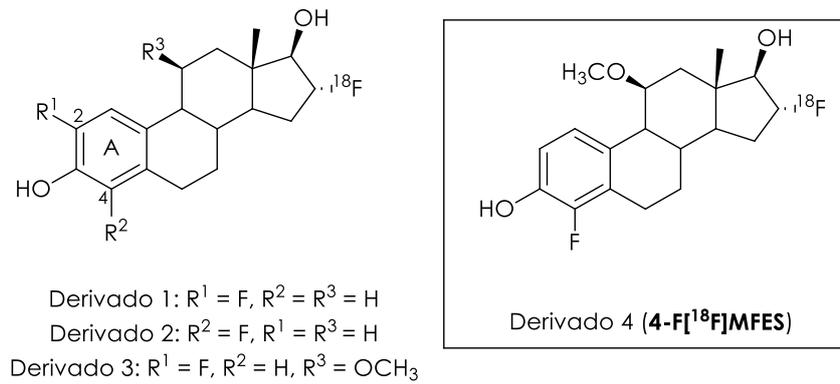


Figura 23: Estructura de derivados de [ $^{18}\text{F}$ ]FES con modificaciones en el anillo A sintetizados por Seimbille *et al.* [72].

Seimbille *et al.* también reportaron la síntesis del 16 $\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]-fluorofulvestrant (análogo del antagonista de RE fulvestrant) y dos derivados (ver figura 24). El marcado se llevó a cabo en la posición C16, de forma similar a la reportada para la síntesis de [ $^{18}\text{F}$ ]FES. Cada derivado presentó un diferente estado de oxidación en el átomo de azufre que forma parte de la cadena unida al C7, incluyendo el sulfóxido, sulfona y sulfuro. Estudios *in vivo* resultaron ser desalentadores, la captación en tejidos RE $^{+}$  resultó un tercio menor en comparación al [ $^{18}\text{F}$ ]FES, al mismo tiempo que la captación en tejidos no blanco fue mayor [75].

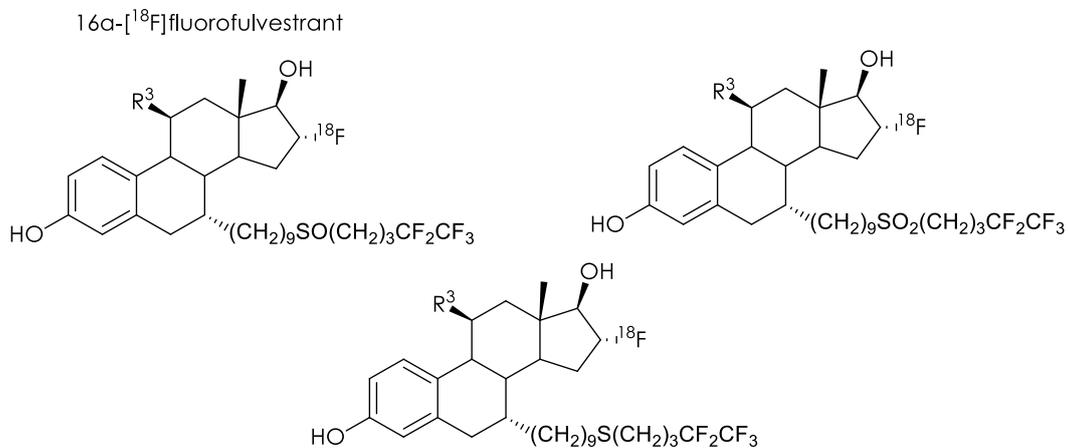


Figura 24: Estructura de 16 $\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]-fluorofulvestrant y sus dos análogos sulfona y sulfuro sintetizados por Seimbille *et al.* [75].

Dentro de los compuestos no esteroides que han sido estudiados como posibles radiotrazadores PET en cáncer de mama RE $^{+}$ , se encuentra el tamoxifeno, una de las drogas más comúnmente usada para la terapia endocrina por ser antagonista de los RE (ver figura 25) [76, 77]. Inoue *et al.* realizaron ensayos clínicos preliminares en pacientes que permitieron evidenciar la utilidad del radiotrazador para predecir el efecto de la terapia hormonal en pacientes con cáncer de mama recurrente o metastásico. Sin embargo, estudios adicionales aún son necesarios para establecer su utilidad clínica [78].

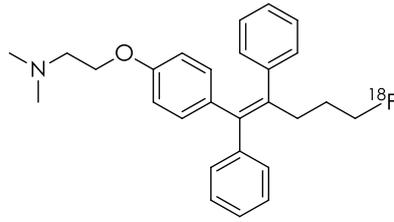


Figura 25: Estructura química de [ $^{18}\text{F}$ ]fluorotamoxifeno.

A pesar del considerable atractivo en el desarrollo de agonistas del RE marcados con  $^{18}\text{F}$  para su uso en PET, aún existe un gran interés en el uso del radionucleido  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  debido a su conveniente  $t_{1/2}$  de 6 hrs. y su amplia disponibilidad. El mayor costo de los radionucleidos producidos mediante ciclotrón y su poca disponibilidad limita la utilidad de los agentes de imagen para RE, como [ $^{18}\text{F}$ ]FES, para uso en clínica.

Algunos autores prepararon los complejos análogos a los de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  con Re estable, debido a las similitudes en las propiedades químicas entre el Re y Tc. Dichos complejos son utilizados para estudios estructurales puesto que la concentración de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  es muy baja, lo que no permite obtener masa suficiente para realizar un estudio estructural. Además al ser no radiactivo facilita el trabajo durante el desarrollo y caracterización de los compuestos.

Existen reportes en donde se han realizado esfuerzos por sintetizar análogos de estrógenos integrados, sin embargo, muchos de los complejos formados resultaron inestables, presentaron una muy baja afinidad por los RE en comparación al estradiol indicando no ser buenos imitadores del ligando original (ver figura 26). Los valores de lipofilicidad obtenidos fueron del mismo orden o mayor en comparación al estradiol lo que aumentó la unión no específica. Es posible que los resultados alcanzados se deban a la deficiencia en la similitud geométrica y electrónica entre los complejos y el estradiol [79, 80].

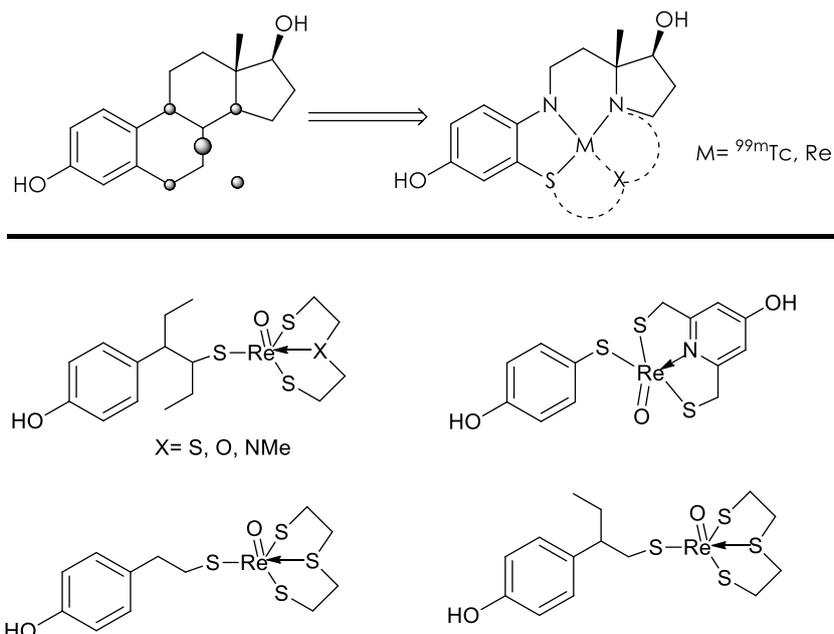


Figura 26: Ejemplos de aplicación del método *integrated approach* [79, 80].

Una mayor cantidad de complejos derivados del estradiol han sido sintetizados aplicando el método *pendent approach*. Los complejos resultantes, siempre y cuando tengan un tamaño adecuado, por lo general resultan estables y mantienen la afinidad de la biomolécula por el RE.

Wüst *et al.* diseñaron, sintetizaron y evaluaron una gran variedad de complejos con Re estable (ver figura 27). Todos los complejos resultaron ser estables en el medio biológico, se demostró que tanto la longitud de la cadena como el agente quelante tienen efecto en la afinidad de unión por el RE. Además los complejos aumentaron la lipofilicidad en al menos un orden de magnitud en comparación al etinilestradiol [81].

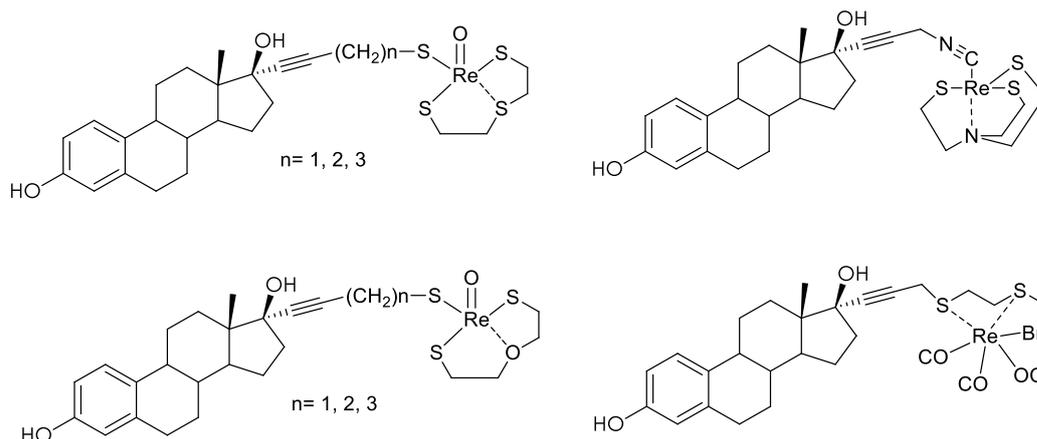


Figura 27: Estructura de algunos complejos sintetizados por Wüst *et al.* [81].

Skaddan *et al.* diseñaron y sintetizaron una gran variedad de complejos de estradiol 7 $\alpha$ -sustituidos con Re estable. Todos los complejos resultaron ser afines al RE en igual o mayor magnitud al ser comparados con el ligando natural estradiol. En la figura 28 se muestran los complejos que mostraron mayor afinidad de unión por el RE, sin embargo, la lipofilicidad de estos complejos demostró ser muy elevada para un adecuado perfil de biodistribución.

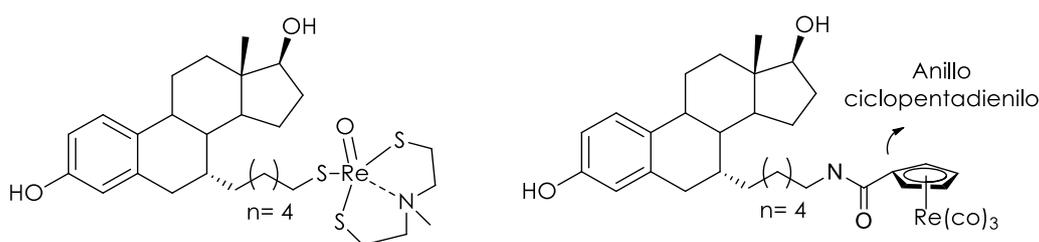


Figura 28: Estructura de complejos evaluados por Skaddan *et al.* [82].

Buscando modificar la lipofilicidad, se enfocaron en el complejo conteniendo el anillo ciclopentadienilo y diseñaron nuevos ligandos con una cadena lateral conteniendo enlaces éter en lugar de una cadena carbonada. Finalmente, obtuvieron buenos resultados con el complejo que se muestra en la figura 29, logrando que el valor de  $\log P_{o/w}$  disminuyera de 6.88 a 5.40 [82].

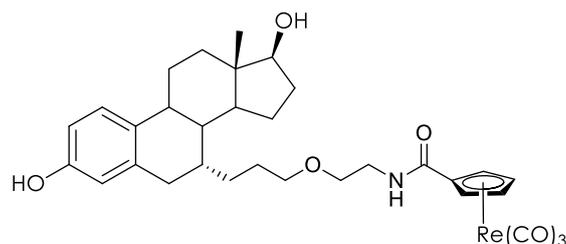


Figura 29: Estructura de un complejo con cadena lateral conteniendo un grupo éter que permitió disminuir el valor de  $\log P_{o/w}$  en los complejos diseñados por Skaddan *et al.* [82].

Xia *et al.* diseñaron, sintetizaron y evaluaron *in vitro* e *in vivo* un derivado de estradiol conteniendo al ácido dietilentriaminopentaácetico (DTPA) como agente quelante (ver figura 30). Con la introducción del DTPA, el grupo buscó aumentar la solubilidad en agua del estradiol para disminuir el metabolismo hepático.

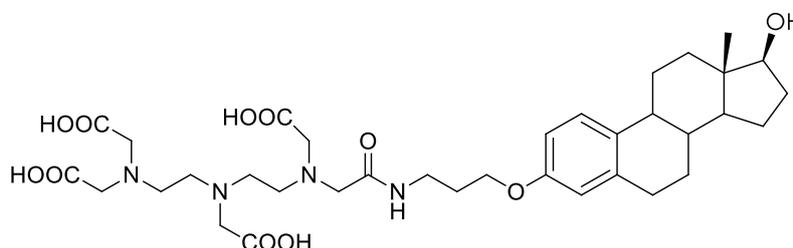


Figura 30: Estructura de  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -DTPA-estradiol sintetizado por Xia *et al.* [83].

El complejo  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -DTPA-estradiol fue fácilmente preparado y obtenido con una pureza radioquímica adecuada. Los estudios *in vitro* demostraron que el complejo resultó estable en histidina, cisteína, buffer fosfato salino y suero humano a 37 °C durante 24 horas. Demostró tener una unión específica al RE manifestando su potencial uso como agente de imagen para el RE. Sin embargo, deberían realizarse más estudios para optimizar el compuesto y tener una mejor farmacocinética *in vivo*, dado que el complejo presentó una elevada captación en hígado [83].

Jaouen *et al.* sintetizaron y evaluaron un complejo análogo del tamoxifeno, antagonista de los RE (ver figura 31). El complejo presentó una unión específica al RE y además se comportó como antiestrógeno con eficacia casi idéntica al metabolito activo del tamoxifeno [84].

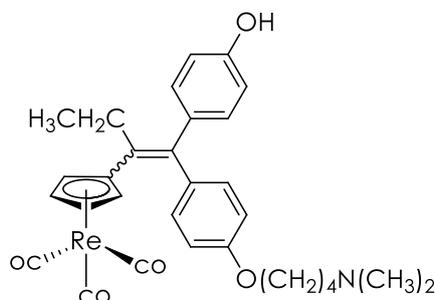


Figura 31: Estructura de uno de los análogos de tamoxifeno conteniendo el anillo ciclopentadienilo sintetizado por Jaouen *et al.* [84].

Bigott *et al.* reportaron la síntesis y evaluación *in vitro* de análogos de ciclofenilo con el anillo C sustituido (ver figura 32). El ciclofenilo es un modulador selectivo del RE, lo que significa que presenta propiedades como agonista y antagonista. Los compuestos presentaron una baja afinidad por el RE por lo cual no se realizaron estudios *in vivo* [85].

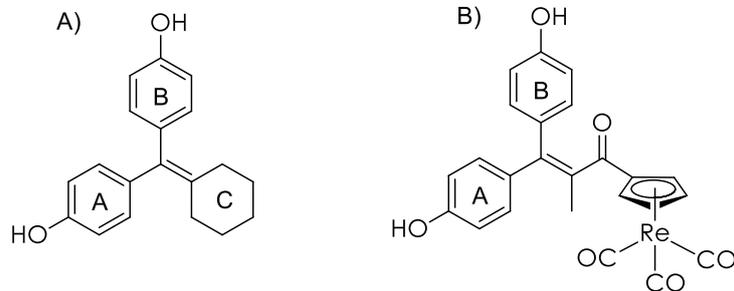


Figura 32: A) Estructura del ciclofenilo, B) Estructura análogo del ciclofenilo sintetizado por Bigott *et al.* [85].

Tejería *et al.* diseñaron y sintetizaron un complejo derivado de estradiol (ver figura 33) que mostró en los estudios *in vitro* una moderada unión a proteínas plasmáticas, lipofilicidad adecuada para atravesar barreras biológicas, estabilidad en el tiempo y una adecuada unión a células conteniendo RE. Sin embargo en los estudios *in vivo* presentó una elevada captación en hígado y tracto gastrointestinal [86].

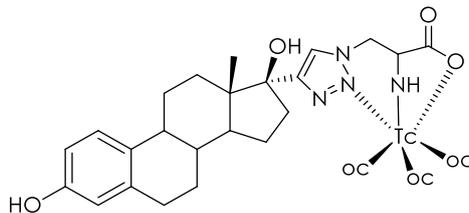


Figura 33: Estructura de un complejo sintetizado por Tejería *et al.* [86].

El mismo grupo también desarrolló y evaluó un complejo conteniendo dos ligandos derivados de estradiol en su estructura (ver figura 34). El complejo presentó una buena unión a células conteniendo RE y una moderada lipofilicidad y unión a proteínas plasmáticas. La unión a células conteniendo RE resultó ser mayor en comparación al complejo anterior (figura 33), sugiriendo que la presencia de dos moléculas de estradiol podría ser la razón de dicho resultado. La evaluación *in vivo* en ratas normales demostró un adecuado perfil de biodistribución, mientras que en animales con tumores inducidos la relación entre músculo y tumor fue buena [87].

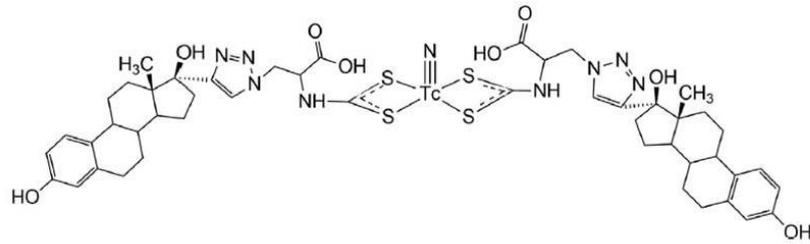


Figura 34: Estructura de un complejo conteniendo dos moléculas de un ligando derivado de estradiol sintetizado por Tejería *et al.* [87].

A pesar de los esfuerzos, hasta el momento no hay radiofármacos SPECT para Imagenología Molecular de los RE en cáncer de mama, ya que todos los que han sido investigados han fallado al intentar ser una alternativa frente al [ $^{18}\text{F}$ ]FES, por lo general debido al bajo nivel de captación tumoral y elevada unión no específica.

## 3) OBJETIVOS

---

### 3.1. Objetivo General

El objetivo del presente trabajo fue el diseño, síntesis y evaluación de potenciales radiotrazadores de  $^{99m}\text{Tc}$  para Imagenología Molecular de receptores de estrógeno en cáncer de mama. Es de gran interés contar con radiotrazadores para Imagenología Molecular como alternativa a los métodos anatomopatológicos clásicos para el análisis de receptores en las muestras tumorales, ya que permite estudiar la totalidad del tumor y superar los errores que surgen al analizar una pequeña muestra, que puede no ser representativa debido a la heterogeneidad del tejido tumoral.

Para lograr este objetivo se abordaron cada una de las etapas básicas en el desarrollo de un nuevo radiotrazador, lo que implica su diseño, síntesis del ligando, marcación, estudio de propiedades fisicoquímicas y finalmente su evaluación biológica.

### 3.2. Objetivos Específicos

- Optimización de la síntesis automática de 16 $\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroestradiol ([ $^{18}\text{F}$ ]FES) en un módulo automático de síntesis Synthra RNplus Research.

En esta etapa se propuso optimizar la síntesis de [ $^{18}\text{F}$ ]FES, empleando una plataforma sintética adecuada para la producción de compuestos marcados con  $^{18}\text{F}$  disponible en CUDIM. La finalidad de su obtención es utilizarlo como estándar para comparar los nuevos compuestos desarrollados, debido a que hasta la actualidad es el radiofármaco de referencia para Imagenología Molecular en cáncer de mama RE+. Si bien existen reportes de síntesis de [ $^{18}\text{F}$ ]FES en varios módulos comerciales o con diseño propio, ninguna ha sido desarrollada en el módulo Synthra RNplus Research con el que cuenta CUDIM, razón por la cual esta parte del trabajo se desarrolló en dicho centro.

- Caracterización biológica *in vitro* del [ $^{18}\text{F}$ ]FES.

Al ser el radiofármaco considerado estándar de referencia, se realizaron estudios *in vitro* de unión a células MCF-7 portadoras de RE, derivadas de un adenocarcinoma mamario humano. Con éstos resultados se podrán realizar comparaciones con potenciales radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$  desarrollados por el grupo de trabajo.

- Diseño y síntesis de un ligando derivado de estradiol conteniendo grupos quelantes adecuados para la marcación con  $^{99m}\text{Tc}$  mediante la formación de un compuesto de coordinación.

En esta etapa de síntesis orgánica se planteó utilizar como material de partida el etinilestradiol, se diseñó una ruta sintética que permitió incorporar a esta molécula grupos quelantes adecuados para la formación de un complejo con  $^{99m}\text{Tc}$ .

- Preparación del complejo de  $^{99m}\text{Tc}$ .

Una vez sintetizado el ligando se procedió a la marcación con  $^{99m}\text{Tc}$ . La forma química en que se une y por lo tanto las condiciones de marcación dependieron de los grupos quelantes presentes en el ligando diseñado. En la figura 35 se muestran las estructuras de los complejos propuestos.

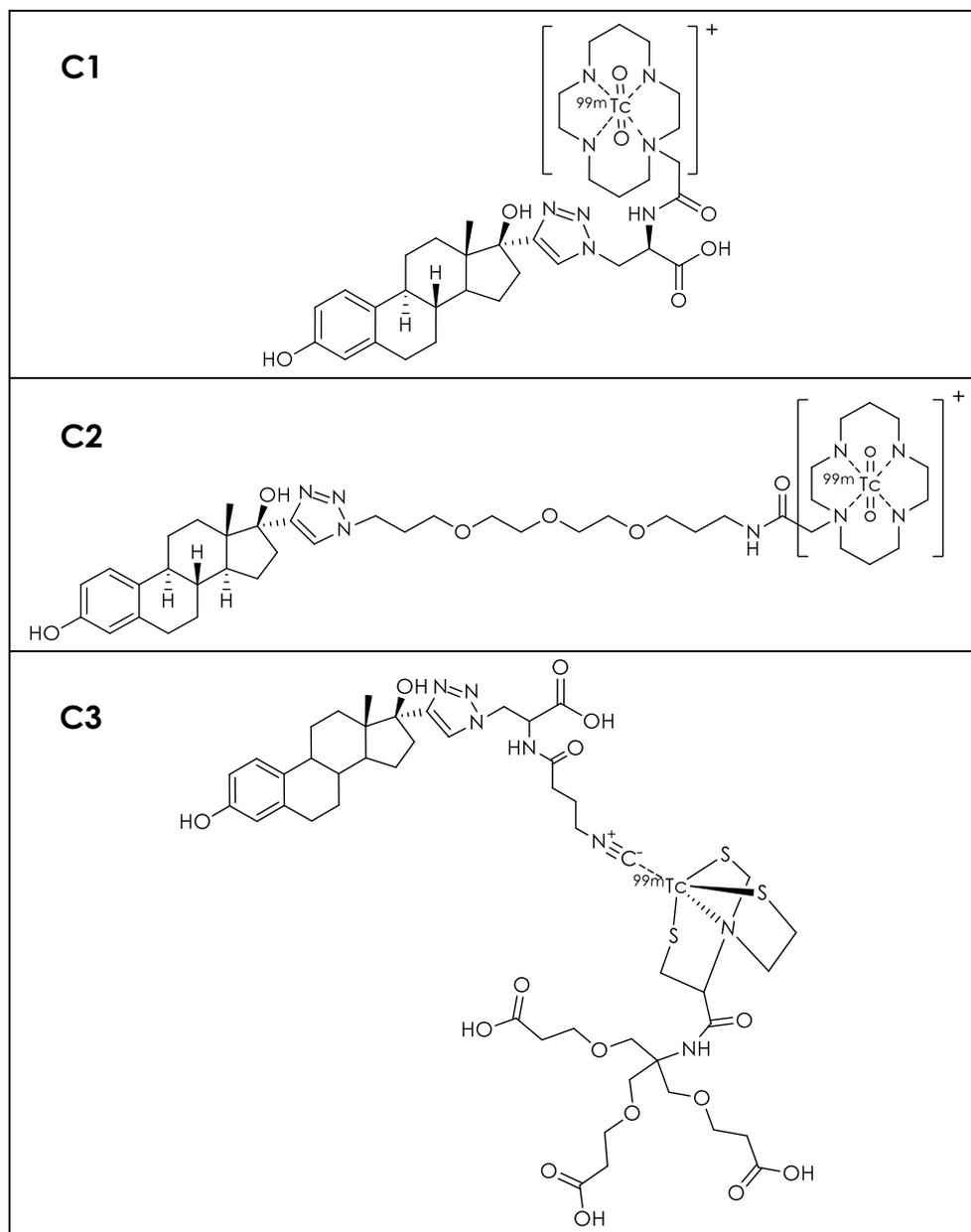


Figura 35: Estructuras propuestas de los complejos de  $^{99m}\text{Tc}$  en estudio en la presente tesis.

- Caracterización fisicoquímica del complejo de  $^{99m}\text{Tc}$ .

En esta etapa se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica del complejo, lo que implicó la determinación de su estabilidad en el medio de reacción, estabilidad en plasma sanguíneo, lipofilicidad y unión a proteínas plasmáticas.

- Caracterización biológica *in vitro* del complejo de  $^{99m}\text{Tc}$ .

La caracterización biológica *in vitro* utilizó células MCF-7, línea celular adherente que conserva varias características del epitelio mamario, incluida la capacidad de procesar estradiol a través de receptores de estrógenos citoplasmáticos y la capacidad de formar dímeros [88]. Como consecuencia fue el modelo celular seleccionado en el que se realizaron los estudios de unión del potencial radiotrazador.

## 4) SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]FLUOROESTRADIOL ([<sup>18</sup>F]FES)

---

## 4.1. INTRODUCCIÓN

### 4.1.1. Radionucleido: <sup>18</sup>F

El <sup>18</sup>F es el radionucleido más empleado en Medicina Nuclear PET. Decae emitiendo partículas  $\beta^+$  (positrones) a <sup>18</sup>O estable con un  $t_{1/2}$  de 109.8 min (ver figura 36).

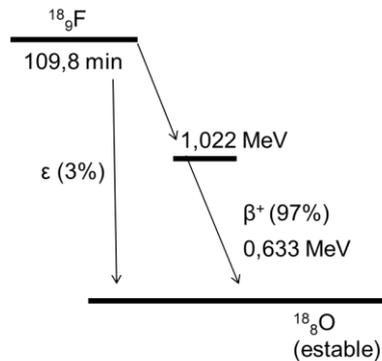


Figura 36: Diagrama de decaimiento del <sup>18</sup>F.

El positrón es la antipartícula del electrón, por lo que comparte sus características a excepción de la carga eléctrica. Estas partículas después de ser emitidas viajan en el medio físico o biológico una cierta distancia (dependiendo de su energía cinética que es característica de cada radionucleido) hasta colisionar con un electrón del medio correspondiente, aniquilándose ambos y transformando toda su masa en energía, lo que corresponde a dos rayos  $\gamma$  de 511 keV cada uno emitidos en direcciones opuestas (ver figura 37) [89].

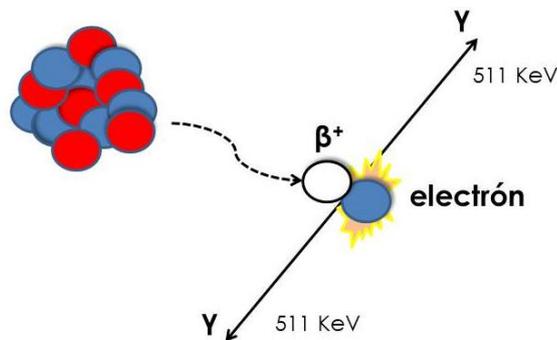


Figura 37: Aniquilación del positrón.

El Flúor, luego del Hidrógeno, es uno de los átomos más pequeños y es el más electronegativo, pudiendo reaccionar con diversos compuestos orgánicos e inorgánicos formando enlaces covalentes o iónicos muy fuertes. Cuando se une al carbono, se forman los enlaces más fuertes en química orgánica. Esto hace que las reacciones con flúor sean atractivas para el desarrollo de productos farmacéuticos [90, 91]. Puede actuar como bioisótopo del hidrógeno debido a su tamaño y electrones de valencia, así como también del oxígeno a causa de su tamaño y electronegatividad [91]. Se han desarrollado muchos métodos radiosintéticos para la incorporación de <sup>18</sup>F a moléculas biológicas que van desde moléculas similares a fármacos hasta anticuerpos y oligonucleótidos.

El <sup>18</sup>F es un radionucleido que ha generado un interés especial debido a sus favorables características físicas y nucleares ya mencionadas, incluyendo el elevado porcentaje de decaimiento β<sup>+</sup> (97%) y baja energía de la radiación β<sup>+</sup> (máximo 0.635 keV) en comparación a otros radionucleidos empleados en PET, lo que resulta en un corto rango de difusión en un medio biológico (< 2.4 mm) que aumenta la resolución de las imágenes PET. Puede obtenerse con una elevada actividad molar ya que no hay dilución isotópica como ocurre en las marcaciones con <sup>11</sup>C, en donde la dilución isotópica se presenta con el CO<sub>2</sub> gaseoso atmosférico. De los radioisótopos emisores β<sup>+</sup> es uno de los más atractivos debido a la posibilidad de obtención mediante ciclotrón (grandes cantidades), a la alta resolución de las imágenes obtenidas, t<sub>1/2</sub> lo suficientemente largo para permitir desarrollar síntesis en más de una etapa y una química única y diversa para la introducción en varios tipos de moléculas [89].

Para uso en Radiofarmacia, el [<sup>18</sup>F]F puede obtenerse como [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> acuoso o [<sup>18</sup>F]F<sub>2</sub> gaseoso. Bajo la forma de [<sup>18</sup>F]F<sub>2</sub> gaseoso suele generarse mediante la reacción nuclear <sup>20</sup>Ne (d,α) <sup>18</sup>F, mientras que para su obtención como [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> acuoso se parte de la reacción <sup>18</sup>O (p, n) <sup>18</sup>F, utilizando [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O (agua enriquecida mayor a 98% con <sup>18</sup>O) como blanco. Los átomos de <sup>18</sup>O son impactados por protones generando el radionucleido <sup>18</sup>F en forma de [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> y liberando un neutrón. Luego el radionucleido es transportado por medio de cañerías blindadas a los módulos automatizados de síntesis, dentro de las celdas blindadas donde ocurre la síntesis del radiofármaco [92, 93]. En la Tabla 2 se muestran las dos formas de producción.

Reacción	<sup>18</sup> O (p, n) <sup>18</sup> F	<sup>20</sup> Ne (d, α) <sup>18</sup> F
Blanco de irradiación	[ <sup>18</sup> O]H <sub>2</sub> O	Ne (200 μmol F <sub>2</sub> )
Energía de la partícula (MeV)	16 - 3	14 - 0
Producto principal	[ <sup>18</sup> F]F <sup>-</sup>	[ <sup>18</sup> F]F <sub>2</sub>
A <sub>m</sub> (MBq/ μmol)	Aprox. 600 x 10 <sup>3</sup>	Aprox. 100

Tabla 2: Principales rutas sintéticas para la obtención de <sup>18</sup>F en un ciclotrón.

Existen dos métodos de marcación con <sup>18</sup>F (ver figura 38).

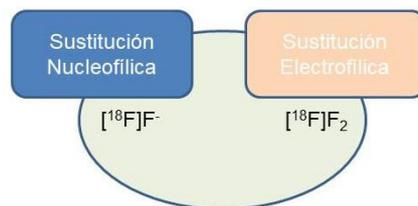


Figura 38: Métodos de marcación con <sup>18</sup>F.

El [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> es utilizado como nucleófilo mientras que el [<sup>18</sup>F]F<sub>2</sub> tiene aplicaciones en métodos electrofílicos. La diferencia clave entre estas dos formas químicas es la A<sub>m</sub> del <sup>18</sup>F. Esta diferencia se debe a que en la síntesis de [<sup>18</sup>F]F<sub>2</sub> se debe agregar <sup>19</sup>F como gas portador para extraer el [<sup>18</sup>F]F<sub>2</sub> producido. Es importante mencionar que la A<sub>m</sub> es crucial cuando se trabaja con sistemas de baja capacidad de unión (por ejemplo unión ligando-receptor). La adición del gas portador conduce a un aumento de la

masa total del radiotrazador final, que puede resultar en la saturación del receptor y la reducción de la señal PET resultado de la unión específica. El alto rendimiento en la producción del ciclotrón junto con la mayor  $A_m$ , que es crucial para la imagen PET de la unión ligando-receptor condiciona a que la preparación de la mayoría de los radiofármacos de <sup>18</sup>F se realice mediante métodos nucleofílicos.

#### 4.1.1.1. Fluoración nucleofílica con <sup>18</sup>F

En una reacción de fluoración nucleofílica, el ion [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> rico en electrones (nucleófilo) reemplaza a un átomo o grupo de átomos (grupo saliente) en una posición electrofílica de una molécula. Para que esto ocurra es fundamental que la molécula contenga un buen grupo saliente en una posición electrofílica, así como también que las condiciones de reacción favorezcan el ataque nucleofílico del [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup>. Para esto último es necesario realizar el acondicionamiento del nucleófilo y controlar las condiciones de reacción como temperatura y disolvente [94].

La fluoración nucleofílica puede realizarse en compuestos alifáticos (sustitución nucleofílica alifática bimolecular:  $S_N2$ ), aromáticos ( $S_NAr$ ) o heteroaromáticos. Las  $S_N2$  suelen ser eficientes. Los grupos salientes más comunes son los haluros (Cl, Br, I) y los sulfonil ésteres (triflato, mesilato, tosilato o nosilato). La reactividad del sustrato aumenta de carbono terciario a primario como causa de impedimentos estéricos y de que la sustitución en un carbono secundario puede ir acompañada por una reacción de eliminación no deseada. En el caso de las  $S_NAr$ , los grupos salientes más comunes son F, NO<sub>2</sub> y NMe<sup>+</sup> siendo a su vez necesaria la activación previa del anillo aromático con un grupo electrón atrayente en posición *orto* o *para* como el NO<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub> o cianuro [95].

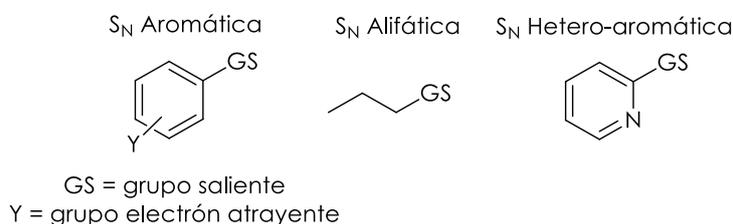


Figura 39: Tres tipos de reacciones de sustitución nucleofílica que pueden darse en las reacciones de marcación con <sup>18</sup>F.

Aunque el ión [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> es un nucleófilo fuerte, en solución acuosa forma enlaces de hidrógeno con moléculas de agua que lo rodean determinando que su reactividad para sustituciones nucleofílicas bimoleculares ( $S_N2$ ) sea menor. Con el fin de aumentar su reactividad, el [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> debe ser acondicionado, lo que implica su purificación del agua mediante intercambio iónico y posterior destilación. Por lo general, una vez purificado por intercambio iónico se lo obtiene bajo la forma de sal K[<sup>18</sup>F]F. El siguiente paso de destilación se realiza formando un azeótropo con MeCN. Para mantener las condiciones anhidras, la reacción de [<sup>18</sup>F]fluoración del precursor que corresponda debe ocurrir en solventes orgánicos polares apróticos (como MeCN, DMSO y THF). La solubilidad [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> en disolventes orgánicos mejora mediante la adición de un catalizador de transferencia de fase (PTC) como el Kryptofix® 2.2.2 o carbonato de tetrabutilamonio, quienes además aumentan la nucleofilia del [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> al dejarlo expuesto (ver figura 40) [94, 96].

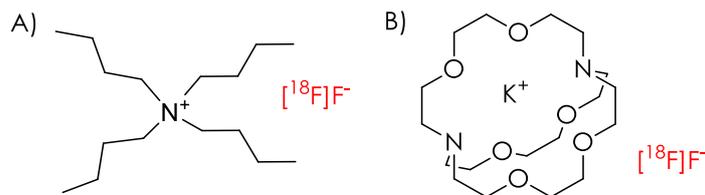


Figura 40: Estructura de los catalizadores de transferencia de fase: A) [<sup>18</sup>F]fluoruro de tetrabutilamonio, B) [<sup>18</sup>F]fluoruro/ Kryptofix® 2.2.2 [94].

El acondicionamiento del nucleófilo debe realizarse en medio básico, de lo contrario se favorece la formación de [<sup>18</sup>F]F<sub>2</sub> gaseoso durante la destilación, lo que conduce a una pérdida de la actividad por volatilización. Comúnmente se utiliza el anión carbonato (CO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (podría también utilizarse bicarbonato, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) para generar el medio básico debido a que es una base pobremente nucleofílica y no compite con la reacción de S<sub>N</sub>2 en el precursor correspondiente. Un medio débilmente básico es suficiente para evitar la formación de [<sup>18</sup>F]F<sub>2</sub> gaseoso, de lo contrario, si el medio es fuertemente básico, puede darse lugar a productos secundarios indeseados formados por la descomposición de precursores que sean sensibles al medio básico [97].

Para evitar reacciones secundarias, muchos parámetros necesitan ser optimizados: 1) la relación catalizador de transferencia de fase/ base/ precursor, 2) temperatura de reacción, 3) elección del grupo saliente. Con una cuidadosa evaluación de estos parámetros, la [<sup>18</sup>F]fluoración nucleofílica alifática es usualmente eficiente en términos de PRQ, además las temperaturas requeridas son moderadas (desde temperatura ambiente a los 100 °C) y los tiempos de reacción relativamente cortos (usualmente hasta los 15 minutos).

Dependiendo de la estabilidad del precursor, la presencia de uno o varios grupos funcionales y la reactividad del grupo saliente, los productos de las [<sup>18</sup>F]fluoraciones alifáticas pueden ser obtenidos en uno o dos pasos. Típicamente el primer paso es la sustitución del grupo saliente por el <sup>18</sup>F y luego, si es necesario, se produce la remoción del grupo saliente o la conversión del intermedio marcado en el producto deseado. La mayoría de los radiofármacos utilizados para la obtención de imágenes PET, como por ejemplo, [<sup>18</sup>F]-FDG, [<sup>18</sup>F]-FLT, [<sup>18</sup>F]-FMISO, [<sup>18</sup>F]-colina, [<sup>18</sup>F]-FES, 18F-fluoroacetato, <sup>18</sup>F-fluoro- $\alpha$ -metiltirosina, O-(2-<sup>18</sup>F-fluoroetil)-L-tirosina (<sup>18</sup>F-FET) y <sup>18</sup>F-fluoro furanil norprogesterona (<sup>18</sup>F-FFNP), son sintetizados vía S<sub>N</sub>2 en donde el [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> desplaza un grupo saliente alifático.

La optimización de una síntesis requerirá la elección de las mejores condiciones en cuanto a solvente, temperatura, contraión, concentración de precursor y Actividad de [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> [98].

#### 4.1.2. [<sup>18</sup>F]FES

El radiofármaco PET 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]fluoroestradiol ([<sup>18</sup>F]FES) es un ligando para el RE que se une a los dos subtipos, RE $\alpha$  y RE $\beta$ , con una preferencia por el RE $\alpha$  [99]. Se desarrolló como agente de imagen para evaluar los niveles del RE en pacientes con cáncer de mama RE+ primario, recurrente o metastásico, permitiendo predecir cuales pueden ser tratados mediante hormonoterapia antiestrogénica (ver figura 41) [100].

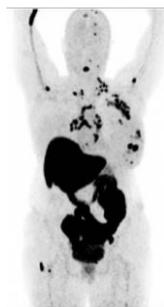


Figura 41: Estudio PET con [<sup>18</sup>F]FES en donde se pueden observar múltiples lesiones en la mama izquierda, múltiples metástasis con RE+ en el ganglio linfático y en hueso [101].

Fue el primer radiofármaco PET para oncología receptor-dirigido. Los estudios PET con [<sup>18</sup>F]FES han demostrado su capacidad para usarse como una forma no invasiva de evaluar la expresión del RE [102]. En suma, los estudios con [<sup>18</sup>F]FES proveen resultados casi inmediatos luego de realizado el estudio en comparación a la biopsia.

Pueden existir diferencias entre la expresión de RE en el tumor y metástasis, lo que ha hecho de la biopsia e inmunohistoquímica técnicas que pueden dar complicaciones y llevar a errores de muestreo. Esto último ocurre especialmente en metástasis con heterogeneidad en la expresión del RE intratumoral [101]. La captación tumoral en un estudio PET con [<sup>18</sup>F]FES se correlaciona cuantitativamente con los niveles de RE determinados *in vitro* y puede ser más predictivo de la respuesta a la terapia endocrina que los ensayos inmunohistoquímicos [103]. Se ha evaluado en la clínica con buenos resultados como un método de cuantificación *in vivo* de la expresión de RE, como predictor de la respuesta a la hormonoterapia y para evaluar la efectividad en el bloqueo de los RE [104]. Es el radiofármaco considerado de referencia para imágenes del RE, al ser el más exitoso hasta la fecha, con estudios clínicos de fase III finalizados [105, 106]. En la actualidad es producido y distribuido en los Estados Unidos por ZIONEXA bajo el nombre de CERIANNA™. En mayo de 2020 la FDA aprobó su uso como un agente de imagen en PET, indicado para la detección de lesiones RE+ y como complemento a la biopsia en pacientes con cáncer de mama recurrente [107, 108].

Kiesewetter *et al.* identificaron al [<sup>18</sup>F]FES como un prometedor agente de imagen, a partir del cual surgió un gran interés en el desarrollo de estrógenos emisores y como agentes de imagen para tumores de cáncer de mama RE. Este grupo comenzó las investigaciones con <sup>19</sup>F como nucleófilo y 3,16β-triflato-17β-oxoestrone como precursor (ver imagen A figura 42). Dado que el grupo hidroxilo fenólico es un potencial nucleófilo que compite en la reacción de S<sub>N</sub>, fue necesaria su protección. Cuando la reacción se llevó a cabo en exceso de <sup>19</sup>F, se obtuvo un par de diasterómeros en la posición 16, lo que podría deberse a que el <sup>19</sup>F actuó como base para epimerizar el 16α-fluorocompuesto deseado. Además, la posterior reducción del grupo cetona con hidruro de litio y aluminio (LiAlH<sub>4</sub>) creó un segundo par de isómeros en la posición 17, generándose un total de 4 isómeros. Con <sup>18</sup>F no ocurrió la epimerización en la posición 16, pero sí en la posición 17 al reducirse el grupo cetona. Sin embargo, mediante la reducción de la cetona a -78°C en éter fue posible obtener el epímero 17β con buena selectividad, lo que dio lugar a la primera síntesis reportada de [<sup>18</sup>F]FES. En el mismo trabajo se reporta también la síntesis del epímero 16β-[<sup>18</sup>F]fluoroestradiol a partir del precursor 3,16α-triflato-17β-hidroxiestrone (ver imagen B y C figura 42) [69].

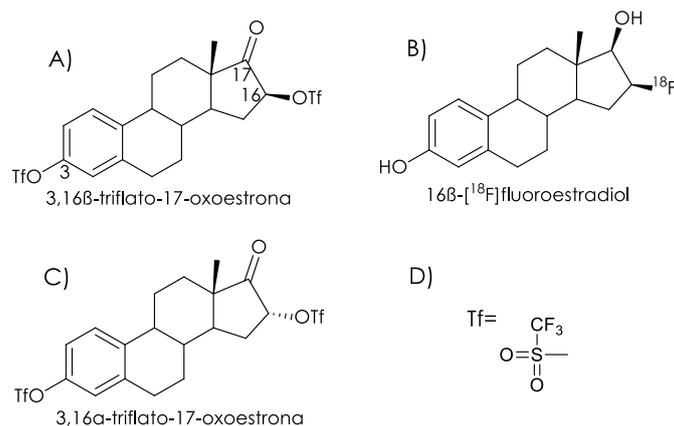


Figura 42: A) Estructura del primer precursor utilizado en la síntesis de [<sup>18</sup>F]FES, B) Estructura del epímero de [<sup>18</sup>F]FES, C) Estructura del precursor para la síntesis del epímero de [<sup>18</sup>F]FES y D) Estructura grupo funcional triflato (Tf) [69].

Durante el mismo año el grupo de investigadores demostró la captación selectiva del [<sup>18</sup>F]FES por los RE, lo que alentó al grupo a trabajar en la optimización de la síntesis originalmente planteada, la cual requería un exceso de [<sup>18</sup>F]F- y tiempos de reacción largos que generaban bajos rendimientos de síntesis [95]. Posteriormente se han reportado varias síntesis alternativas, algunas de las cuales evitan los problemas estereoquímicos en el C17 o aplican la robótica que no existía en el momento del reporte original [69, 109, 110].

La primer síntesis de [<sup>18</sup>F]FES en donde se aplicó la robótica fue desarrollada por Katzenellenbogen *et al.* en el año 1985. La síntesis se realizó en un sistema robótico disponible comercialmente (lo que equivaldría actualmente a un módulo de síntesis) bajo el nombre de Zymark Zymate Laboratory Automation System (ver figura 43), a partir del mismo precursor utilizado por Kiesewetter *et al.* El tiempo total de síntesis fue de 80 minutos, menor a los 90 minutos que requería la síntesis manual, con todos los beneficios del uso de la robótica asociados a la automatización del proceso y a la radioprotección [111].



Figura 43: Vista general del sistema robótico utilizado en la primer síntesis automática de [<sup>18</sup>F]FES [111].

En el año 1996 Lim *et al.* diseñaron y sintetizaron tres posibles precursores para la síntesis de [<sup>18</sup>F]FES (ver figura 44). La diferencia estructural entre ellos radicó en el grupo protector del hidroxilo fenólico. Inicialmente se usó al acetato como grupo protector

(precursor 1), lo que dio buenos resultados con <sup>19</sup>F pero no cuando la reacción se llevó a cabo con <sup>18</sup>F. Bajo las condiciones de marcación se observó la hidrólisis del acetato originando el grupo fenol libre. El segundo precursor sintetizado contenía el grupo hidroxilo protegido como 3-vinileter (precursor 2). La reacción de [<sup>18</sup>F]fluoración ocurrió de forma limpia y el éter vinílico fue fácilmente removido en condiciones ácidas, pero la reacción de síntesis y purificación del precursor fueron engorrosas. Por último, sintetizaron a un tercer precursor cuyo grupo protector fue el metoximetilo (precursor 3). Su síntesis se realizó a partir del epiestriol, pasando por el intermedio 3-metoximetileter del epiestriol para luego formar el 3-O-metoxi-metil-16,17-O-sulfuril-16-epiestriol, comúnmente conocido como precursor MMSE (ver esquema 1).

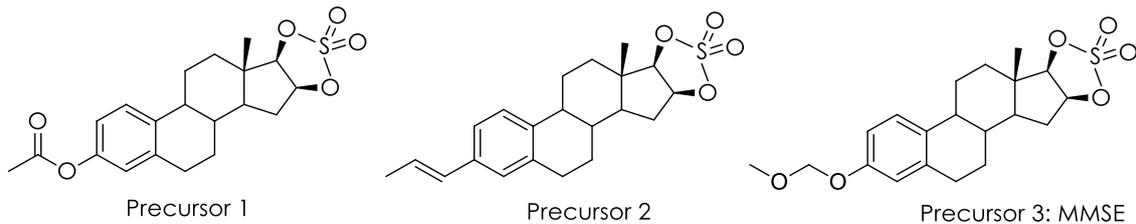
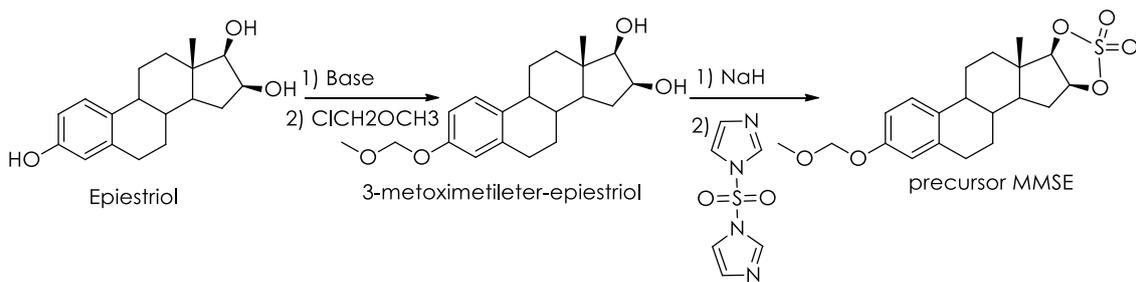


Figura 44: Estructura de precursores diseñados por Lim *et. al* [112].



Esquema 1: Secuencia de síntesis para obtener el precursor MMSE utilizada por Lim *et. al* [112].

El MMSE presentó la gran ventaja de ser un compuesto estable, al menos durante un año a temperatura ambiente, lo que permitía su comercialización. En suma, reaccionó con <sup>18</sup>F con un excelente rendimiento del 40% corregido por decaimiento en 75 - 90 minutos, fue fácilmente desprotegido en condiciones ácidas y dio lugar a [<sup>18</sup>F]FES de forma robusta con una elevada A<sub>m</sub> y pureza. Actualmente es el precursor más utilizado que se comercializa para la obtención de [<sup>18</sup>F]FES [112].

Römmer *et al.* integraron la síntesis de [<sup>18</sup>F]FES a partir del precursor MMSE y la robótica en el año 1998. Adaptaron un módulo que era utilizado para la producción de [<sup>18</sup>F]fluorodesoxiglucosa ([<sup>18</sup>F]FDG) a la síntesis de [<sup>18</sup>F]FES. Los resultados demostraron que es posible aplicar la seguridad y reproducibilidad que otorga un módulo automatizado de síntesis a la síntesis de [<sup>18</sup>F]FES, permitiendo la obtención del radiofármaco en grandes cantidades para su uso de rutina [113].

Varios trabajos han reportado la caracterización *in vitro* e *in vivo* de [<sup>18</sup>F]FES en donde presentó un log P de 3.33, resultó ser estable durante 10 horas en una formulación final con NaCl 0.9% y al igual que el estradiol, se une en un 95% a las proteínas plasmáticas tanto en ratas como en humanos, el restante 5% se encuentra libre. Es bien conocida la unión de los esteroides a proteínas en sangre y en humanos específicamente a la

proteína fijadora de hormonas sexuales. Del 95% un 45% resultó a la unión de [<sup>18</sup>F]FES a dicha hormona, valor similar al estradiol, haciendo del [<sup>18</sup>F]FES un excelente imitador de la unión y cinética del estradiol en humanos. Es importante destacar que a pesar de tener una elevada unión a proteínas, la captación y distribución del [<sup>18</sup>F]FES no se ve alterada, por el contrario dichos parámetros son excelentes, lo que demuestra que el elevado valor de unión es necesario para el transporte a los tejidos blanco y no secuestra al radiofármaco en la circulación. La biodistribución ha sido estudiada en ratas Sprague-Dawley hembras inmaduras y en ratas con tumores de cáncer de mama inducidos químicamente [114]. En ratas hembras inmaduras, [<sup>18</sup>F]FES demostró una elevada captación en útero y ovarios que fue totalmente bloqueada por la administración previa de estradiol. Presentó una relación útero/ sangre de 83 y útero/ tejido no blanco de 45 a las 2 horas post-inyección, la captación en otros tejidos no blanco varió pero fue inafectada por el bloqueo con estradiol, además la captación en hueso fue mínima lo que indicó que la defluoración fue mínima. El hígado y riñones captaron una gran cantidad de [<sup>18</sup>F]FES inmediatamente después de la inyección, por lo que su eliminación se da por metabolismo hepático y excreción urinaria. Estudios en donde se extrajo [<sup>18</sup>F]FES unido al útero luego de la inyección confirmaron que es el [<sup>18</sup>F]FES quien se une a los RE y no sus metabolitos radiactivos. En ratas con tumores de mama la captación de [<sup>18</sup>F]FES fue mayor que en tejido RE- existiendo una correlación entre la concentración de RE y la captación del radiofármaco. Transcurridos 30 minutos de la inyección, menos del 20% de la actividad inyectada correspondió a [<sup>18</sup>F]FES y luego de 60 minutos sólo un 10% [114, 115, 116]. Por otro lado, Mankoff y Tewson estudiaron el metabolismo y eliminación del [<sup>18</sup>F]FES en pacientes. Al igual que en animales, [<sup>18</sup>F]FES fue rápidamente metabolizado por el hígado y luego de 20 minutos menos de un 20% de la actividad circulante se atribuyó al radiofármaco intacto. Existió una elevada captación inicial en hígado, vesícula biliar e intestino y excreción en bilis que demostró una circulación enterohepática. La depuración sanguínea fue rápida, alcanzando una meseta a los 30 minutos luego de la inyección, tiempo en el cual, la captación en tumores RE+ alcanzó un nivel constate. El análisis de los metabolitos en orina y sangre resultó en la presencia de dos metabolitos: sulfato y conjugado con glucorónido; su velocidad de producción resultó ser igual a la de eliminación por orina. Hasta la fecha no se han reportados efectos adversos o de toxicidad para [<sup>18</sup>F]FES. Los estudios de dosimetría han demostrado que la dosis de radiación recibida por diferentes órganos es comparable a la recibida por los típicos estudios de Medicina Nuclear, estando los potenciales riesgos dentro de los límites aceptados [72, 14, 117, 118, 119].

El [<sup>18</sup>F]FES tiene otras aplicaciones que no están relacionadas al cáncer de mama, algunas de ellas son: cáncer de endometrio, hiperplasia endometrial, cáncer de ovario epitelial entre otras [104].

#### 4.1.3. Módulos automatizados de síntesis

Existen tres enfoques básicos para la preparación de radiofármacos emisores  $\beta^+$ : 1) síntesis manual; 2) operación manual de un equipo remoto, correctamente blindado; 3) módulo automatizado de síntesis. Las síntesis manuales, suelen ser las más simples pero inherentemente son las más trabajosas e inevitablemente conducen a una excesiva dosis de radiación para el operador, por lo que su uso queda reservado al manejo de bajas actividades en investigación. Por otro lado, un aparato remoto blindado que funciona manualmente (usando interruptores y/o brazos manipuladores)

es más deseable y puede reducir de forma significativa la dosis de radiación. Para síntesis que son rutinarias, un equipo totalmente automatizado, en donde todas las manipulaciones son controladas por una computadora es la mejor opción desde el punto de vista de la radioprotección. La química radiofarmacéutica requiere un difícil manejo de material radiactivo, tiempos de reacción rápidos, facilidad sintética y resultados reproducibles y rápidos. El uso de la síntesis manual es un desafío por múltiples razones: 1) los radiofármacos deben cumplir estrictos requisitos de esterilidad que se deben cumplir lote a lote, 2) la reproducibilidad lote a lote es requerida, 3) los tiempos de síntesis deben ser cortos cuando se trabaja con radionucleidos con un  $t_{1/2}$  corto, 4) muchas veces los estudios clínicos se realizan a más de un paciente por lo que se requiere trabajar con actividades mayores, exponiéndose el operador a niveles de radioactividad más altos y 5) los costos de producción pueden limitar la utilidad del radiofármaco en la práctica clínica. La producción para la clínica requiere una elevada reproducibilidad, metodologías robustas y estandarizadas. La automatización de estos procesos contribuye a la completa trazabilidad del proceso, un aspecto muy importante debido a las exigencias regulatorias y a la implementación de las GMP (del inglés Good Manufacturing Practices) a todas las preparaciones radiofarmacéuticas [113, 120].

Un módulo automatizado de síntesis es un equipo que permite de forma automática llevar a cabo una secuencia de manipulaciones químicas necesarias para la síntesis de un radiofármaco. Puede ser comercial o fabricado a medida. Consiste en dos partes ensambladas: una parte mecánica y una parte química. La parte mecánica es un ensamblado eléctrico y/o neumático, con conectores, bombas, sistemas de control de temperatura, sensores para monitorear diferentes parámetros (presión, flujo, actividad) o cualquier otro dispositivo físico que no esté en contacto directo con la parte química. La parte química es una red interconectada de contenedores en donde los reactivos gaseosos, líquidos y/o sólidos pueden ser trasladados, mezclados y/o transformados para obtener el producto final deseado. La parte mecánica y química están conectadas y el contacto entre las dos partes puede ser permanente (dispositivo no desechable) o temporal (dispositivo desechable denominado *cassete*). Un *cassete* es una red premontada de contenedores, válvulas y jeringas, destinadas a ser montadas en la parte mecánica del módulo, convirtiéndose en la parte química del mismo. Por lo general son desechables y pueden estar vacíos o contener reactivos.

Un sistema de control proporciona una interfaz con la cual el operador interactúa con el módulo. El software gobierna el sistema de control y generalmente se proporciona por el fabricante del módulo y no es modificable por los usuarios. Es específico para el módulo pero no necesariamente proceso específico. Existe una secuencia específica para cada proceso que corresponde a una lista de instrucciones que el software ejecuta para controlar los distintos pasos realizados durante la preparación de un radiofármaco. Si el software lo permite la secuencia puede ser modificada por el usuario.

Los módulos automatizados de síntesis se encuentran siempre dentro de una celda caliente o *hot cell* (ver figura 45), la cual consiste en una estructura blindada con un espesor de Pb adecuado para brindar protección al operador y con un ambiente controlado para la producción de un radiofármaco inyectable [121].



Figura 45: Imagen ejemplo de *hot cell* que contiene dentro el módulo de síntesis.  
[Fuente: [www.comecer.com](http://www.comecer.com)]

#### 4.1.3.1. Synthra RNplus Research

Synthra RNplus Research (ver figura 46) es un equipo para síntesis radiactiva flexible para investigación de una amplia variedad de péptidos marcados con radiometales y compuestos marcados con <sup>18</sup>F mediante sustitución nucleofílica. El módulo incluye secuencias sintéticas para compuestos como [<sup>18</sup>F]FluoroDOPA, [<sup>18</sup>F]fluorolosartan, [<sup>18</sup>F]FLT, [<sup>18</sup>F]FMISO, [<sup>18</sup>F]Fluorocolina, [M]-DOTATATE y [M]-DOTATOC así como también [<sup>18</sup>F]FPP(RGD)<sub>2</sub>. Para cualquier otro compuesto marcado con <sup>18</sup>F la secuencia de síntesis puede ser creada por el usuario de forma simple y testeada gráficamente mediante una simulación previa a operar. Presenta la posibilidad de funcionar de forma manual o completamente automatizada. En forma manual es el usuario quien comanda cada paso de síntesis a través de una computadora conectada al módulo, en cambio en forma totalmente automatizada, el usuario únicamente debe dar inicio a la síntesis la cual transcurre de forma automática.



Figura 46: Módulo automatizado de síntesis Synthra RNplus Research. [Fuente: [www.synthra.com](http://www.synthra.com)].

La unidad de síntesis incluye todos los componentes necesarios para la preparación, marcación, purificación y formulación de compuestos marcados con <sup>18</sup>F (ver tabla C). También contiene un programa que permite realizar la limpieza de forma automática [122].

COMPONENTES	CARACTERÍSTICAS
16 Viales contenedores	Químicamente inertes y fáciles de limpiar
2 Reactores	De carbono vítreo, capacidad para 11 mL, sistema de calentamiento integrado (-50 °C a 250 °C)
8 Soportes para cartuchos de extracción en fase sólida	1 para la purificación del [ <sup>18</sup> F]F- que llega desde el ciclotrón, 6 para purificación durante la síntesis con opción de calentamiento y 1 para purificación final
Cromatógrafo HPLC	Bomba para realizar gradientes cuaternaria, detector y UV con $\lambda$ variable, posiciones para dos columnas, inyector automático intercambiable de 3 y 5 mL
1 Bomba de vacío	Permite llegar a una presión < a 5 mbar.
6 Detectores de radiación	5 dentro del módulo que permiten tener datos durante la síntesis, 1 fuera del módulo incorporado a la celda caliente que permite medir la A final
Trampa de nitrógeno frío	Permite la recolección de sustancias volátiles radiactivas
Sistema de recolección H <sub>2</sub> <sup>18</sup> O	Permite recuperar el [ <sup>18</sup> O]H <sub>2</sub> O
Computadora	Cumple con las exigencias de GMP en cuanto a registro de datos, permite controlar el módulo de forma manual o automatizada

Tabla 3: Resumen de los principales componentes del módulo y sus respectivas características [122].

En la figura 47 se muestra la interfaz gráfica que conecta al usuario con el módulo en donde se señalan los principales componentes nombrados. En rojo se señalan los dos reactores conectados a la bomba de vacío que se señala en amarillo, en celeste los cuatro detectores de radiación dos de los cuales están asociados a los reactores. Se indican en verde las posiciones para colocar los cartuchos de extracción en fase sólida, en fucsia el contenedor que permite recuperar el [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O y en marrón el vial colector final. En naranja se muestran los 16 viales contenedores y en negro los tres viales contenedores para solventes utilizados en la limpieza del módulo. Por último, en violeta se señala el sistema HPLC con válvula de inyección automática y posiciones para dos columnas cromatográficas, se pueden observar los cuatro contenedores para los solventes HPLC (A, B, C y D).

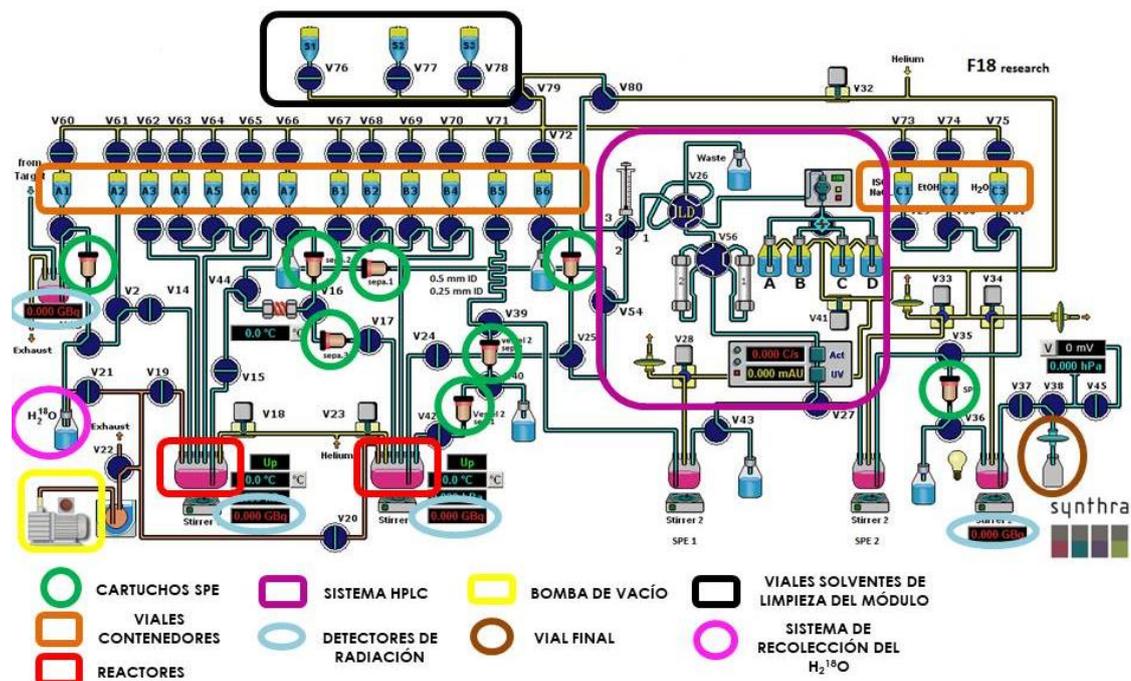


Figura 47: Interfaz gráfica usuario-módulo de síntesis Synthra RNplus Research. SPE = Cartuchos de extracción en fase sólida. [Fuente: [www.synthra.com](http://www.synthra.com)].

CUDIM cuenta con un segundo módulo que permite realizar marcaciones con <sup>18</sup>F, TRACERlab® FX-FN de GE (ver figura 48). Sin embargo, cuenta con muy pocos viales contenedores para reactivos, un único reactor, una sola posición para colocar un cartucho SPE que permite realizar purificaciones únicamente al final de la síntesis y un cromatógrafo HPLC que no permite realizar gradientes. En cambio, Synthra RNplus Research admite realizar síntesis con purificación mediante extracción en fase sólida durante la síntesis y al finalizar la misma, contiene dos reactores que permiten realizar reacciones secuenciales en contenedores diferentes como por ejemplo: marcación e hidrólisis, un cromatógrafo HPLC que permite realizar gradientes de fase móvil, varios viales contenedores y además posibilita recoger más de un pico cromatográfico de interés. Todos estos aspectos hacen a la versatilidad que caracteriza al módulo, gran ventaja frente al TRACERlab® FX-FN de GE.



Figura 48: Módulo de síntesis TRACERlab® FX-FN de GE. [Fuente: [www.rad.washington.edu](http://www.rad.washington.edu)]

Al ser el [<sup>18</sup>F]FES el radiofármaco actualmente considerado referencia para cáncer de mama RE+, queda claro el interés del grupo de investigación por contar con dicho radiofármaco, permitiendo realizar estudios comparativos bajo exactamente las mismas condiciones con otros potenciales radiotrazadores desarrollados. En suma, CUDIM podría incluir a dicho radiofármaco en la lista de radiofármacos para uso clínico, lo que sería un gran avance en nuestro país en lo que refiere a diagnóstico de cáncer de mama.

## 4.2. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.2.1. Materiales

Los reactivos de calidad analítica y solventes grado HPLC utilizados en la síntesis y control de calidad fueron de procedencia comercial (Sigma-Aldrich, Merck, J.T.Baker). El estándar no radiactivo de [<sup>18</sup>F]FES ([<sup>19</sup>F]FES) y el precursor 3-O-metoxi-metil-16,17-O-sulfuril-16-epiestriol (MMSE) fueron adquiridos de FUTURECHEM Co. LTD. Las soluciones acuosas se prepararon con agua de resistividad 18.2 MΩ.cm a 25°C filtrada por filtro de 0.22 μm, obtenida en el momento de un equipo MERK MILLIPORE Direct-Q™ 5.

El [<sup>18</sup>F]F- fue producido por un Ciclotrón PETtrace 10 de 16.5 MeV (GE), mediante la reacción nuclear <sup>18</sup>O(p,n)<sup>18</sup>F a partir de [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O con un enriquecimiento mayor a 98%, adquirida de Iso Solution, Wosotop o Huayi.

La síntesis de [<sup>18</sup>F]FES se realizó en un módulo automático de síntesis Synthra RNplus Reseach que se encuentra dentro de una celda MIP1-1P 1390 LAF (Comecer) con un flujo laminar blindado FHR-50 (Comecer).

En las medidas de actividad durante la síntesis y control de calidad se emplearon un activímetro Capintec® CRC-25 y un contador de centelleo sólido ORTEC® (software Maestro32) multicanal con un cristal de Na(Tl)I de 1 x 1'' plano. Para las medidas de actividad en los estudios *in vitro* se utilizó un contador de centelleo sólido ORTEC® multicanal con un cristal de Na(Tl)I de 3 x 3'' plano.

Para la optimización de la purificación del producto final se utilizaron dos columnas semipreparativas de fase reversa, VP250/10 SynthraReeperbahn de 5μm y VP 250/16 NUCLEOSIL 100 C18 de 7μm, ambas de Macherey-Nagel. También se utilizaron diferentes cartuchos de extracción en fase sólida (SPE): Sep-Pak® C18 Plus Light, Sep-Pak® C18, Oasis® WAX y Oasis® HLB de Waters™.

El control de calidad se realizó en un cromatógrafo HPLC Shimadzu con bomba cuaternaria LC-20AT, detector UV de arreglo de diodos SPD-20A, detector gamma de centelleo sólido plano de 1" x 1" Flow-RAM de LabLogic, con software LabSolution o en un cromatógrafo HPLC Shimadzu UFLC equipado con un detector UV de arreglo de diodos SPD-M20A y un detector γ. Se empleó una columna analítica PhenoSphere™ ODS C18 80Å 5μm de 250 x 4.6 mm (Phenomenex®). Se utilizaron soluciones estándar conteniendo [<sup>19</sup>F]FES y precursor MMSE de 10 μg/mL. El análisis de los solventes residuales se realizó en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2010 Plus, equipado con un detector FID y una columna DuraBond DB-WAX de 30 m x 0.53 mm, 1μm de Agilent. Se preparó un estándar GC conteniendo acetona (0.5%), etanol (EtOH) (0.1%) y acetonitrilo (MeCN) (0.05%). Para la determinación del pH se utilizó un pHmetro de mesa BIRIDEN PHSJ-3F. La determinación de endotoxinas bacterianas se realizó utilizando un equipo portátil Endosafe-PTS (Charles Riber Laboratories, Inc). Para el límite Kryptofix® 2.2.2 se utilizó una placa de sílica gel sobre soporte plástico, un estándar de Kryptofix® 2.2.2 de 50 μg/mL y vapores de I<sub>2</sub>.

Para los estudios de unión e internalización celular se utilizó la línea celular de cáncer de mama MCF-7. La misma fue adquirida en American Type Culture Collection Cell (ATCC® HTB-22™). Para el mantenimiento de las células en cultivo se utilizaron los medios DMEM-ADV-HA (DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium) *Hight Glucose*

(4.5 g/L) *Advanced with L-Glutamina* de Capricorn Scientific, DMEM A1316,9050 de PanReac AppliChem, suero fetal bovino de Capricorn Scientific, penicilina y estreptomina de Sigma-Aldrich, buffer fosfato salino de Sigma-Aldrich y ácido etilendiaminotetraácetico (EDTA) de AMRESCO®. El material plástico para cultivo fue de Greiner Bio-one Cellstar (Greiner). Para la manipulación de las células se trabajó en un flujo laminar NuAire tipo A/B3 y para su incubación se empleó una estufa ESCO® CCL-170B-8.

## 4.2.2. Métodos

### 4.2.2.1. Síntesis de [<sup>18</sup>F]FES

El [<sup>18</sup>F]F- (37 GBq) fue obtenido como solución acuosa en [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O, se purificó por intercambio iónico utilizando un cartucho de intercambio iónico Sep-Pak® QMA Light, el cual se eluyó con una solución conteniendo K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.5 mg) y Kryptofix® 2.2.2 (15 mg) en H<sub>2</sub>O: MeCN (1: 9, 1000 µL). Se evaporaron los solventes a presión reducida con corriente de He gaseoso y calentando a 95°C. Seguidamente se agregó una solución de MMSE (1 mg – 0.0025 mmol) en MeCN seco (1 mL) y se dejó reaccionar durante 10 minutos a 100°C. La mezcla de reacción se transfirió a un segundo reactor, en donde se realizó la reacción de hidrólisis en condiciones ácidas utilizando distintos ácidos (HCl 1N, HCl 2N, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 N o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.06N) en EtOH (3 mL) durante 12 minutos a 100°C. El crudo de reacción se purificó de dos formas, mediante HPLC semipreparativo o extracción en fase sólida utilizando diferentes cartuchos SPE (del inglés *Solid Phase Extraction*) conectados en serie y previamente activados con EtOH (5 mL), H<sub>2</sub>O (5 mL) y aire (5 mL) (ver tabla 4).

Purificación mediante HPLC semipreparativo					
Sistema 1		Sistema 2		Sistema 3	
Fase Móvil	Columna	Fase Móvil	Columna	Fase Móvil	Columna
EtOH: MeCN (50: 50)	SynthraReeper- bahn	H <sub>2</sub> O: EtOH: MeCN (50: 25: 25)	SynthraReeper- bahn	H <sub>2</sub> O: EtOH: MeCN (50: 25: 25)	NUCLEOSIL
		Etapa adicional de purificación mediante cartucho SPE: Sep-Pak® C18 Plus Light			
Flujo: 2.0 y 5.0 mL/min					
Purificación mediante extracción en fase sólida					
Cartucho 1		Oasis® WAX			
Cartucho 2		Sep-Pak® C18			
Cartucho 3		Oasis® HLB Plus			

Tabla 4: Condiciones estudiadas para la purificación del crudo de reacción.

La formulación final se realizó diluyendo con diferentes volúmenes de NaCl 0.9% según el método de purificación empleado (ver tabla 5).

Método de purificación		Volumen NaCl 0.9% en el vial final (mL)
HPLC semiprepartivo	FM: H <sub>2</sub> O: EtOH (50: 50)	17
	FM: H <sub>2</sub> O: EtOH: MeCN (50: 25: 25)	6
Tren de cartuchos SPE		20

Tabla 5: Condiciones estudiadas en la formulación final.

#### 4.2.2.2. Control de calidad de [<sup>18</sup>F]FES

Se controló la apariencia de la solución mediante inspección visual y se determinó el pH utilizando un pHmetro previamente calibrado. La identidad radionucleídica se verificó mediante la determinación del  $t_{1/2}$  y la pureza radionucleídica mediante adquisición del espectro gamma en un contador de centelleo sólido. El límite de Kryptofix® 2.2.2 se determinó mediante cromatografía en capa fina. Las impurezas químicas y radioquímicas fueron detectadas y cuantificadas mediante HPLC analítico con detección UV ( $\lambda = 280$  nm) y acoplado a una columna Phenosphere ODS 80 A de 5 $\mu$ m y 250 x 4.6 mm. La elución se realizó utilizando un gradiente a flujo 1.5 mL/min compuesto por MeCN y H<sub>2</sub>O (ver tabla 6).

Tiempo (min)	% MeCN	% H <sub>2</sub> O
0	10	90
10	90	10
20	90	10

Tabla 6: Condiciones del gradiente de fase móvil para determinación de la PRQ.

Para la determinación de la pureza química se estudió la linealidad del método analítico tanto para el [<sup>19</sup>F]FES como para el precursor MMSE, dentro del rango de concentraciones de 0.5  $\mu$ g/mL a 10  $\mu$ g/mL. La identidad radioquímica del [<sup>18</sup>F]FES se determinó comparando el tiempo de retención ( $t_r$ ) del mismo con el compuesto de referencia [<sup>19</sup>F]FES. La PRQ (%) se calculó considerando la fracción correspondiente al [<sup>18</sup>F]FES en relación a la actividad total. La  $A_m$  se determinó considerando la actividad total de [<sup>18</sup>F]FES y la cantidad de producto expresada en moles. Los solventes residuales (acetona, MeCN y EtOH) fueron analizados por cromatografía gaseosa (GC) de acuerdo al capítulo general de la USP (del inglés *United States Pharmacopeia*) <467> [123]. La esterilidad y la presencia de endotoxinas bacterianas o pirógenos se testearon de acuerdo a los capítulos generales de la USP <71> Y <85>], respectivamente [124,125]. En particular, el test de endotoxinas bacterianas se realizó mediante el ensayo de Lisado de Amebocitos del Limus (test de LAL) [126].

#### 4.2.2.3. Estudios *in vitro*

##### 4.2.2.3.1. Ensayo de Unión a células MCF-7

Las células MCF-7 fueron cultivadas en frascos T-75 con DMEM suplementado (12 mL) con suero fetal bovino (10%), penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100  $\mu$ g/mL) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> gaseoso, hasta la confluencia formando una monocapa (aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup> células por frasco T-75).

Las células fueron incubadas con [<sup>18</sup>F]FES (10  $\mu$ Ci, 20  $\mu$ Ci, 50 $\mu$ Ci y 100  $\mu$ Ci) durante 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> gaseoso. Transcurrido el tiempo de incubación, se removió el

medio de cultivo y se lavó dos veces con buffer fosfato salino (10 mL) que se descartó junto al medio de cultivo en un tubo falcón (tubo falcón con sobrenadante). Las células fueron lisadas mediante incubación con tripsina-EDTA (3 mL) durante 5 minutos. Transcurrido dicho tiempo las células fueron arrastradas con agua (29 mL) dentro del mismo frasco T-75. Se realizaron las medidas de actividad del sobrenadante y células en un contador de centelleo sólido. Se calculó el porcentaje de unión a células como:

$$\% \text{ unión} = \frac{\text{actividad en células}}{\text{actividad en células} + \text{actividad en sobrenadante}} \times \text{FG} \times 100$$

Siendo FG el factor de geometría entre tubo falcón y frasco T-75.

#### 4.2.2.3.2. Ensayo de Unión dependiente del tiempo

Las células fueron preparadas de la misma forma detallada en el punto 4.2.2.3.1.

Las células incubadas con [<sup>18</sup>F]FES ( con la actividad que presentó mayor % de unión en el ensayo anterior) a diferentes tiempos (30 minutos, 60 minutos y 120 minutos) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> gaseoso. Transcurrido cada tiempo de incubación, se removió el medio de cultivo y se lavó dos veces con buffer fosfato salino (10 mL) que se descartó junto al medio de cultivo en un tubo falcón (tubo falcón con sobrenadante). Las células fueron lisadas mediante incubación con tripsina-EDTA (3 mL) durante 5 minutos. Transcurrido dicho tiempo las células fueron arrastradas con agua (29 mL) dentro del mismo frasco T-75. Se realizaron las medidas de actividad del sobrenadante y células en un contador de centelleo sólido. Se calculó el porcentaje de unión a células como:

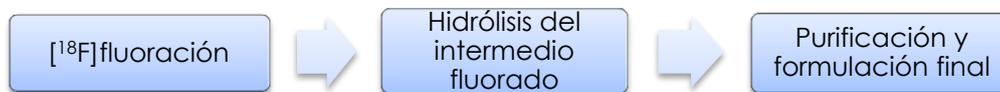
$$\% \text{ unión} = \frac{\text{actividad en células}}{\text{actividad en células} + \text{actividad en sobrenadante}} \times \text{FG} \times 100$$

Siendo FG el factor de geometría entre tubo falcón y frasco T-75.

## 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

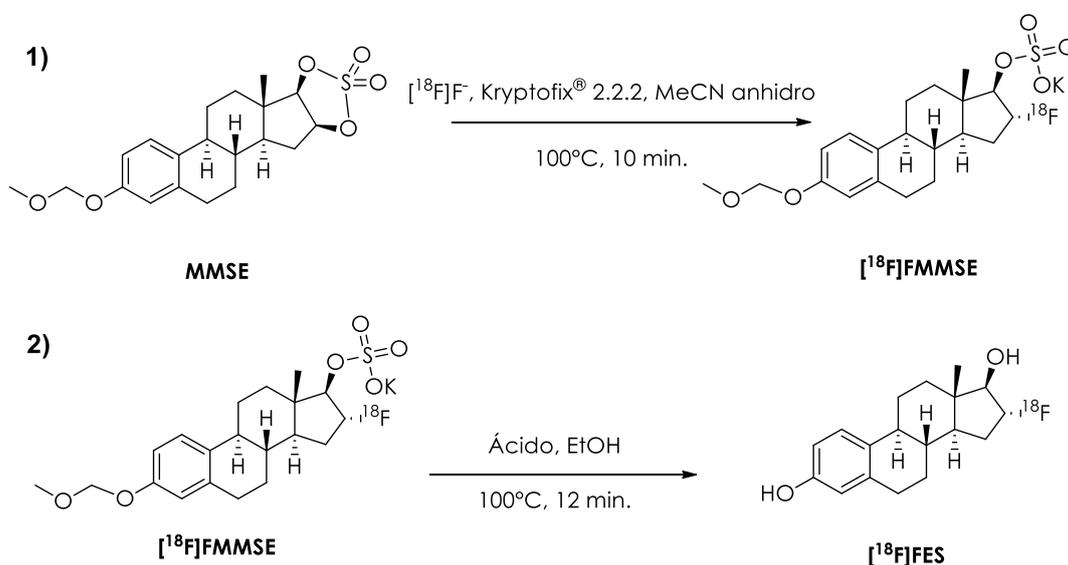
### 4.3.1. Síntesis de [<sup>18</sup>F]FES

La síntesis de [<sup>18</sup>F]FES se realizó en una secuencia de tres etapas (ver esquema 2).



Esquema 2: Secuencia de síntesis de [<sup>18</sup>F]FES.

En la reacción de [<sup>18</sup>F]fluoración, el ión [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> (nucleófilo) se incorporó al precursor 3-O-metoxi-metil-16,17-O-sulfuril-16-epiestriol (MMSE) mediante sustitución nucleofílica para producir el intermedio 3-O-metoxi-metil-16a-[<sup>18</sup>F]fluoro-17β-sulfato de potasio ([<sup>18</sup>F]FMMSE-K o simplemente [<sup>18</sup>F]FMMSE). Seguidamente se realizó la hidrólisis ácida del [<sup>18</sup>F]FMMSE que dio lugar a [<sup>18</sup>F]FES (ver esquema 3).



Esquema 3: 1) Incorporación nucleofílica del [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> al precursor MMSE para generar el [<sup>18</sup>F]FMMSE, 2) Hidrólisis ácida del [<sup>18</sup>F]FMMSE para dar lugar a [<sup>18</sup>F]FES.

El precursor MMSE disponible comercialmente, es sintetizado a partir de la molécula de epiestriol, mediante la protección de sus tres grupos hidroxilos con los grupos protectores metoximetilo y dioxotiol (ver figura 49).

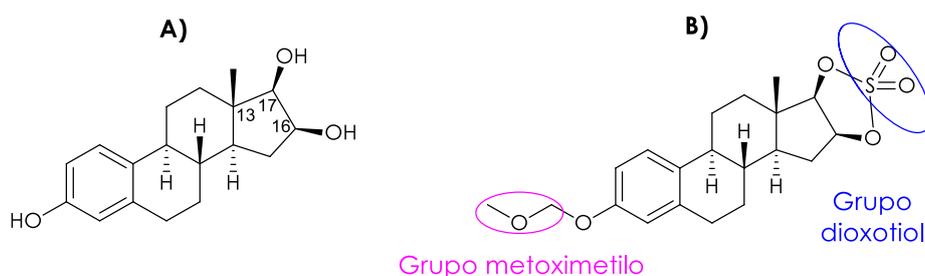


Figura 49: A) Estructura del epiestriol, B) Grupos protectores en el precursor MMSE.

El grupo dioxotiol cumple una doble función, actúa como grupo protector del 17β-hidroxilo y 16β-hidroxilo, al mismo tiempo que activa el desplazamiento nucleofílico por parte del [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> en el C16 al ser el ion sulfato generado un buen grupo saliente (al momento del ataque del [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> y para el siguiente paso de síntesis: hidrólisis) que continúa unido al átomo de C16. El grupo metilo unido al C13 en posición axial previene el ataque por la cara beta del anillo D, por lo que el [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> entra por el lado opuesto, cara alfa (ver figura 50).

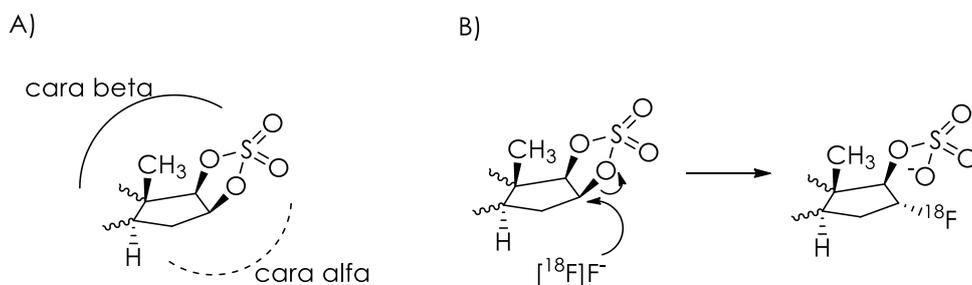


Figura 50: A) Cara alfa y beta del precursor MMSE, B) Ataque nucleofílico del [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup>, se muestra la inversión de la estereoquímica una vez formado el enlace C-[<sup>18</sup>F]F.

En la etapa 1), [<sup>18</sup>F]fluoración, la reacción química que se produjo entre el [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> y el C16 en el MMSE corresponde a una sustitución nucleofílica que transcurre por medio de un mecanismo concertado, específicamente se trata de una sustitución nucleofílica bimolecular (S<sub>N</sub>2). Al ocurrir mediante un mecanismo concertado, la reacción transcurre en una única etapa: ataque y unión del nucleófilo al centro deficiente en electrones, expulsando al mismo tiempo al grupo saliente. Es así que el [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> ataca al átomo de C16 del MMSE a 180° por el lado opuesto del grupo saliente (-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>), produciendo una inversión de la configuración de ese carbono [127].

La etapa 2) consistió en la hidrólisis ácida de los grupos protectores metoximetilo y en el intermedio [<sup>18</sup>F]FMMSE para dar lugar a [<sup>18</sup>F]FES.

En la etapa 3) se realizó la purificación del crudo de reacción y seguidamente la formulación que dio lugar a la solución final de [<sup>18</sup>F]FES para su respectivo control de calidad.

Para confirmar que el producto obtenido correspondió a [<sup>18</sup>F]FES y determinar su respectiva PRQ, se desarrolló un sistema cromatográfico mediante HPLC analítico (ver condiciones en 4.2.2.2.) tomando como referencia el trabajo de Knott *et al.* [128], que permitió identificar mediante coincidencia de los tiempos de retención (tr) el [<sup>18</sup>F]FES, [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> y el precursor MMSE en la solución final de síntesis. Para conocer sus respectivos tr (ver tabla 7) de manera de poder realizar la identificación, se inyectaron los tres compuestos por separado: [<sup>19</sup>F]FES (detección UV), MMSE (detección UV) y [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> (detección γ). Es importante destacar que el detector γ mostró un retraso de aproximadamente 0.3 min con respecto al detector UV bajo las condiciones estudiadas.

Compuesto	Tiempos de retención (min)	Tipo de detector
[ <sup>19</sup> F]FES	10.5	UV
MMSE	12.9	UV
[ <sup>18</sup> F]F-	2.6	γ

Tabla 7: Tiempos de retención (min) de las especies que interesa identificar en la solución final de [<sup>18</sup>F]FES.

También se verificó la capacidad de la columna analítica para separar el [<sup>18</sup>F]FES de su precursor MMSE, inyectando una solución mezcla de [<sup>19</sup>F]FES y MMSE que permitió calcular la resolución (Rs) entre ambos compuestos (ver figura 51). Se calculó el valor de Rs de la siguiente manera:

$$R_s = \frac{2 \times (t_r \text{ precursor} - t_r [\text{}^{19}\text{F}]\text{FES})}{(\omega \text{ precursor MMSE} + \omega [\text{}^{19}\text{F}]\text{FES})}$$

Donde  $\omega$  es el ancho en la base del pico obtenido extrapolando los lados relativamente rectos de los picos hasta la línea de base. El valor obtenido fue de 5.4, una  $R_s \geq 1.5$  es aceptada cuando el tamaño de los picos cromatográficos son similares, como ocurrió en este caso [129].

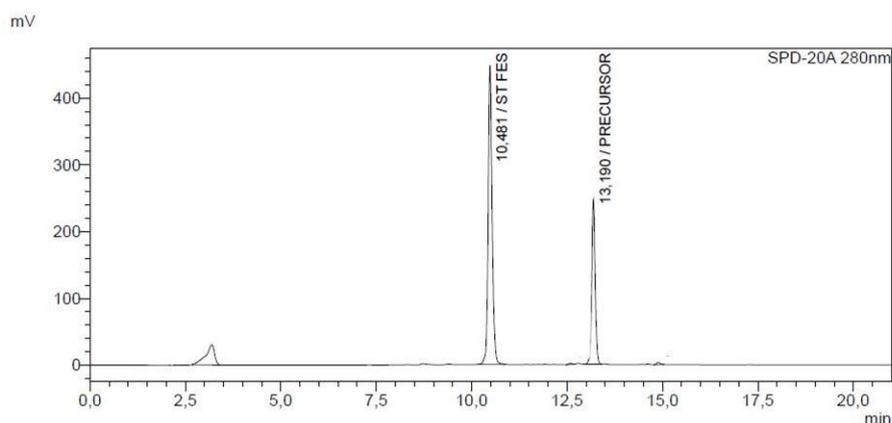


Figura 51: Cromatograma de la solución mezcla de [<sup>19</sup>F]FES y MMSE.

El [<sup>18</sup>F]F- es siempre generado en solución acuosa, por lo que se encuentra bajo la forma de H[<sup>18</sup>F]F acuoso en un volumen final muy variable según las condiciones de síntesis en el ciclotrón. Con el fin de obtenerlo en un volumen fijo, purificarlo de posibles impurezas radionucleídicas presentes en el medio de irradiación y separarlo del [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O sin reaccionar, fue retenido por un cartucho de intercambio iónico Sep-Pak<sup>®</sup> QMA Light, el cual consiste en una resina hidrofílica de intercambio aniónico a base de sílice que contiene al ion carbonato (CO<sub>3</sub><sup>-</sup>) como contraión, quien es reemplazado por los iones [<sup>18</sup>F]F-. El [<sup>18</sup>F]F- retenido se eluyó hacia el reactor con una solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bajo la forma química K[<sup>18</sup>F]F. El fuerte enlace que se forma entre el ión K<sup>+</sup> y [<sup>18</sup>F]F- da lugar a la formación de K[<sup>18</sup>F]F, al mismo tiempo que los iones CO<sub>3</sub><sup>-</sup> (provenientes del K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) devuelven a la resina a su forma iónica original. Junto al K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> se disolvió Kryptofix<sup>®</sup> 2.2.2, éter corona que cumple una doble función: catalizador de transferencia de fase y debilitar el enlace iónico entre el K<sup>+</sup> y el [<sup>18</sup>F]F-, mediante la formación de un complejo con el K<sup>+</sup>, quedando así el [<sup>18</sup>F]F- disponible en el solvente orgánico, para la reacción S<sub>N</sub>2 en el paso de síntesis correspondiente a la marcación. Posteriormente, se realizó la destilación azeotrópica, dándose lugar la evaporación del

solvente con ayuda de corriente de N<sub>2</sub> gaseoso, vacío y temperatura. Dicha etapa fue crítica dado que es fundamental la ausencia de agua en el medio de reacción, pues al ser nucleofílica compite con el [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> en la reacción S<sub>N</sub>2, disminuyendo los rendimientos de síntesis. Seguidamente, se añadió el precursor MMSE disuelto en acetonitrilo seco al residuo seco del reactor, se desarrolló así el paso de [<sup>18</sup>F]fluoración que dio lugar al intermedio [<sup>18</sup>F]FMMSE. Luego, se realizó el paso de hidrólisis de los grupos protectores metoximetilo y dioxotiol. Para ello se utilizaron cuatro condiciones diferentes: HCl 1N, HCl 2N, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5N y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.03N.

Una vez completado el paso de hidrólisis, se procedió a realizar la purificación del crudo de reacción, la cual puede ser realizada de dos formas: HPLC semipreparativo o extracción en fase sólida. En la gran mayoría de los trabajos publicados hasta la fecha, la purificación se realiza mediante HPLC semipreparativo [113, 117, 118, 130, 131, 132], pero también existen publicaciones que utilizan el método de extracción en fase sólida [128, 133]. Debido a la disponibilidad de columnas cromatográficas, se decidió comenzar con el método de purificación mediante HPLC semipreparativo por ser el método más empleado en la purificación de los radiofármacos.

Se ensayaron dos columnas semipreparativas de fase reversa: a) VP250/10 SynthraReeperbahn y b) VP 250/16 NUCLEOSIL, dos fases móviles: H<sub>2</sub>O: EtOH (50: 50) y H<sub>2</sub>O: EtOH: MeCN (50: 25: 25). El uso de la fase móvil H<sub>2</sub>O: EtOH (50: 50) determinó que una vez colectado el pico, como acondicionamiento final solamente fuese necesario diluir con NaCl 0.9%. Es importante aclarar que el término acondicionamiento final hace referencia a la etapa de formulación, que da lugar a la solución del radiofármaco final pronto para su uso en pacientes, por lo que se debe cumplir con las especificaciones del control de calidad correspondiente. Por otro lado, el uso de la fase móvil H<sub>2</sub>O: EtOH: MeCN (50: 25: 25) requirió un paso adicional de purificación, en donde se diluyó el pico colectado con 50 mL de H<sub>2</sub>O y seguidamente se purificó mediante adsorción utilizando un cartucho SPE de fase reversa Sep-Pak® C18 Plus Light. La resina fuertemente hidrofóbica retuvo a el [<sup>18</sup>F]FES logrando su separación del MeCN. Por último, la solución de [<sup>18</sup>F]FES fue trasvasada al vial final conteniendo 6 mL de NaCl 0.9%.

En la Tabla 8 se muestra un resumen de las condiciones de hidrólisis y cromatográficas que fueron estudiadas y los respectivos resultados de PRQ.

Condición	Columna	Ácido	Fase Móvil	Flujo (mL/min)	Acondicionamiento final	PRQ (%)
1	a)	HCl 1N	H <sub>2</sub> O:EtOH (50:50)	2.0	Dilución con NaCl 0.9%	54
2	a)	HCl 2N	H <sub>2</sub> O:EtOH (50:50)	2.0	Dilución con NaCl 0.9%	85
3	a)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5N	H <sub>2</sub> O:EtOH (50:50)	2.0	Dilución con NaCl 0.9%	83
4	a)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5N	H <sub>2</sub> O:EtOH:MeCN (50:25:25)	2.0	Purificación con Sep-Pak C18 Plus Light	100
5	a)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5N	H <sub>2</sub> O:EtOH:MeCN (50:25:25)	5.0	Purificación con Sep-Pak C18 Plus Light	100
6	b)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5N	H <sub>2</sub> O:EtOH:MeCN (50:25:25)	2.0	Purificación con Sep-Pak C18 Plus Light	100
7	b)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5N	H <sub>2</sub> O:EtOH (50:50)	2.0	Purificación con Sep-Pak C18 Plus Light	100
8	a)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5N	H <sub>2</sub> O:EtOH (50:50)	2.0	Purificación con Sep-Pak C18 Plus Light	100

Tabla 8: Resumen de las condiciones estudiadas de hidrólisis y purificación del crudo de reacción mediante HPLC semipreparativo.

En la condición 1, la hidrólisis se realizó con HCl 1N. El cromatograma con detección y del crudo de reacción mostró la presencia de [<sup>18</sup>F]F- sin reaccionar y una impureza radiactiva desconocida de menor tr que el [<sup>18</sup>F]FES. Por otro lado, el cromatograma de la solución final constató la presencia de una impureza radiactiva de estructura desconocida de mayor polaridad que el [<sup>18</sup>F]FES (ver figura 52).

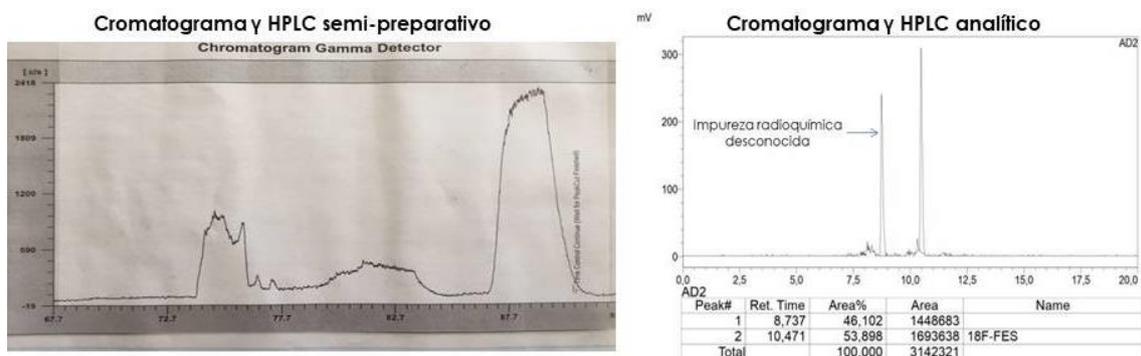
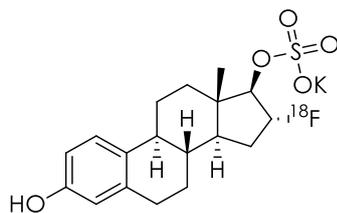


Figura 52: Cromatogramas y de HPLC semipreparativo y analítico, condición 1.

La impureza radioquímica del cromatograma analítico y ( $t_r = 8,7$  min) no permitió cumplir con la especificación de PRQ mayor al 90%. La misma podría corresponderse al intermedio de síntesis [<sup>18</sup>F]FMMSE o al compuesto parcialmente hidrolizado 16a-[<sup>18</sup>F]fluoro-17 $\beta$ -sulfato de potasio (ver figura 53). La hidrólisis del grupo protector

metoximetilo es mucho más rápida que la hidrólisis del grupo dioxotiol, por lo que podría estar dicha impureza presente [130].



16α-[<sup>18</sup>F]fluoro-17β-sulfato de potasio

Figura 53: Estructura del intermedio radiactivo parcialmente hidrolizado que podría estar presente en la solución final.

En busca de una hidrólisis completa, se decidió realizar una nueva síntesis aumentando al doble la concentración de ácido (HCl 2N), condición 2. Sin embargo, al igual que en la condición 1 el cromatograma analítico mostró la presencia de una impureza radiactiva desconocida de mayor polaridad que el [<sup>18</sup>F]FES y que representó el 15% de la actividad.

Knott *et. al* reportaron el uso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como agente hidrolizante para evitar impurezas radiactivas de mayor polaridad que el [<sup>18</sup>F]FES, las cuales eran observadas con el uso de HCl [128]. En estas condiciones el cromatograma y del crudo de reacción mostró ausencia de impurezas radiactivas más polares que el [<sup>18</sup>F]FES. Esto no ocurrió con el cromatograma y de la solución final, siendo la PRQ obtenida menor al 90% (ver figura 54). Sin embargo, el cromatograma UV presentó menor cantidad de impurezas, con lo que sumado al cromatograma y del crudo de reacción más limpio, se decidió establecer el uso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como agente hidrolizante (ver figura 55). Fijada la condición de hidrólisis, se continuó optimizando la etapa de purificación y formulación.

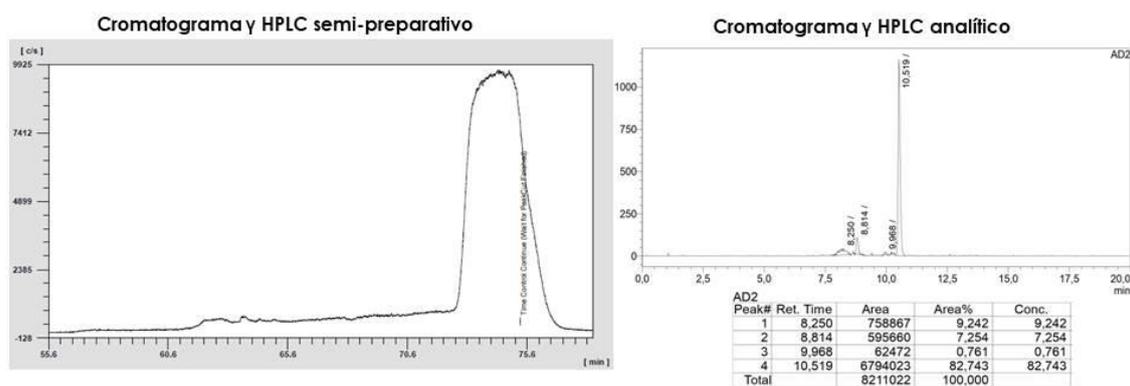


Figura 54: Cromatogramas y de HPLC semipreparativo y analítico, condición 3.

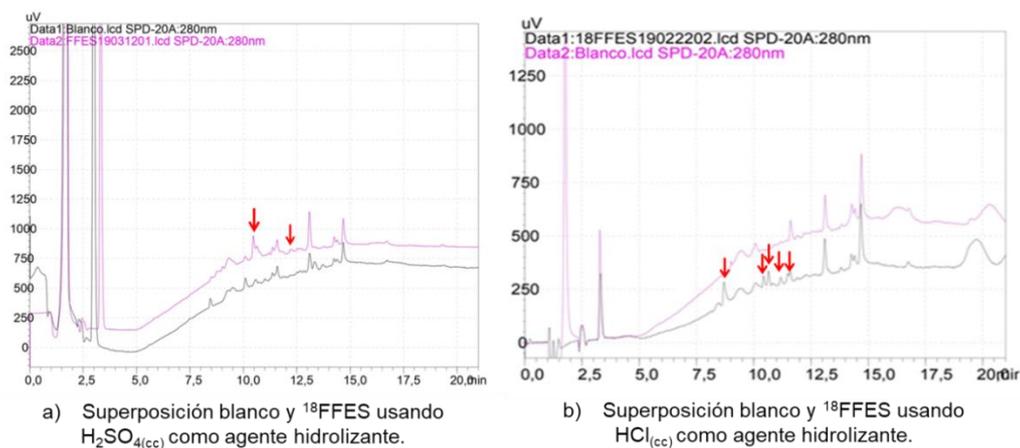


Figura 55: Superposición de cromatogramas blanco y [<sup>18</sup>F]FES usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y HCl como agentes hidrolizantes.

A modo informativo en la figura 56 se muestran algunas de las posibles impurezas no radiactivas que podrían encontrarse en la mezcla de reacción.

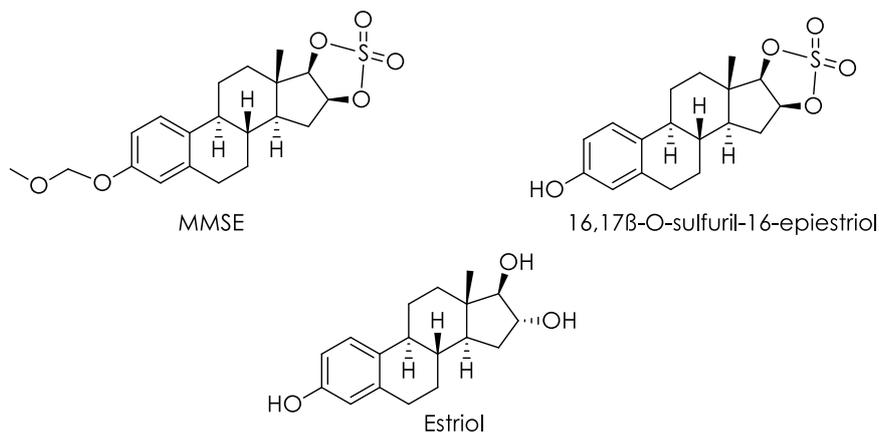


Figura 56: Estructura de posibles impurezas no radiactivas.

Con el fin de lograr una PRQ mayor al 90%, se resolvió realizar un cambio de fase móvil por H<sub>2</sub>O: EtOH: MeCN (50: 25: 25), condición 4. El cromatograma y del HPLC semipreparativo mostró un pico eluido en un tiempo muy extenso, aproximadamente 16 min (ver figura 57). Se colectó parte del pico eluido y se inyectó en el HPLC analítico en donde se obtuvo un cromatograma y con ausencia de impurezas, lo que determinó que la PRQ fuese del 100%.

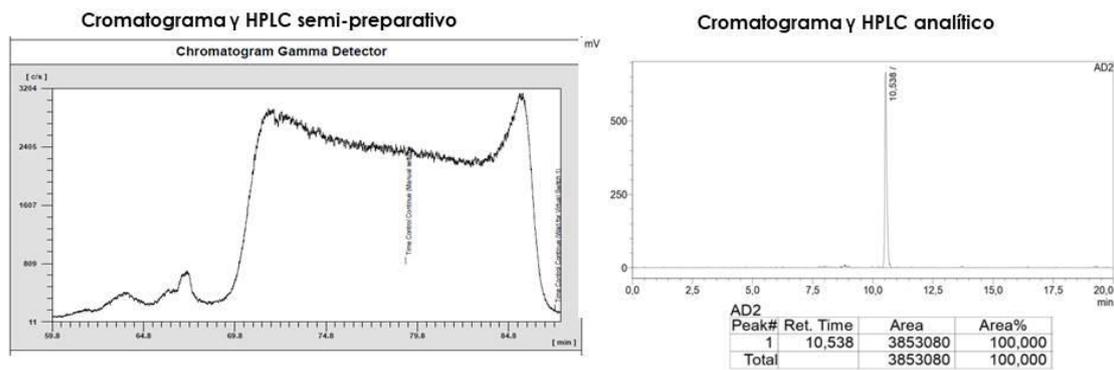


Figura 57: Cromatogramas y de HPLC semipreparativo y analítico, condición 4.

En búsqueda de un mejor pico cromatográfico en el HPLC semipreparativo, se ensayó realizar una síntesis con un aumento de flujo desde 2.0 a 5.0 mL/min, condición 5. Se logró un pico con un menor tiempo de elución (4 minutos), lo que se ajustó mejor a los típicos picos que se observan en HPLC-semipreparativo. Sin embargo, se trabajó al límite de presión del sistema HPLC y el pico no fue eluido con el tiempo esperado, por lo que únicamente se logró coleccionar parte del mismo.

Se ensayó una nueva síntesis bajo la condición 4 (flujo de 2.0 mL/min) debido a que permitía trabajar con una menor presión de columna en comparación a la condición 5, 90 bar vs. 200 bar respectivamente, situación deseada para el cuidado de la columna. El cromatograma y del HPLC semipreparativo resultó en un pico correspondiente a [<sup>18</sup>F]FES pero eluido, al igual que en la condición 4, en un tiempo muy extenso.

Con el objetivo de mejorar el pico cromatográfico, se realizaron pruebas para neutralizar con NaHCO<sub>3</sub> el ácido presente en la mezcla de reacción. El resultado fue la formación de un precipitado color blanco, por lo cual no fue posible de aplicar en el módulo ya que se podría generar una obstrucción en las tubuladuras del mismo.

Se resolvió cambiar a la columna cromatográfica semipreparativa b), de mayor tamaño, condición 6, manteniendo el resto de los parámetros de la última condición ensayada. No obstante, los resultados obtenidos no fueron alentadores, el pico correspondiente a [<sup>18</sup>F]FES nuevamente fue eluido en un tiempo total de aproximadamente 12 minutos.

En la condición 7 se mantuvo la columna b) y se retomó la primer fase móvil ensayada (H<sub>2</sub>O: EtOH (50: 50)). Nuevamente se obtuvo un cromatograma y en el HPLC semipreparativo con un pico correspondiente a [<sup>18</sup>F]FES en su totalidad pero eluido en un tiempo de 21 minutos.

Como último ensayo mediante purificación con HPLC semipreparativo, se decidió retornar a la condición 3, incorporando el paso de purificación adicional con cartucho Sep-Pak® C18 Plus Light que dio lugar a la condición 8. Se logró un cromatograma y con un tiempo de elución de pico adecuado a los que comúnmente se observan en columnas semipreparativas (ver figura 58). La PRQ obtenida fue del 100%, lo que demostró que el uso del cartucho Sep-Pak® C18 Plus Light permitió eliminar impurezas radiactivas eluidas junto a el [<sup>18</sup>F]FES en el HPLC semipreparativo.

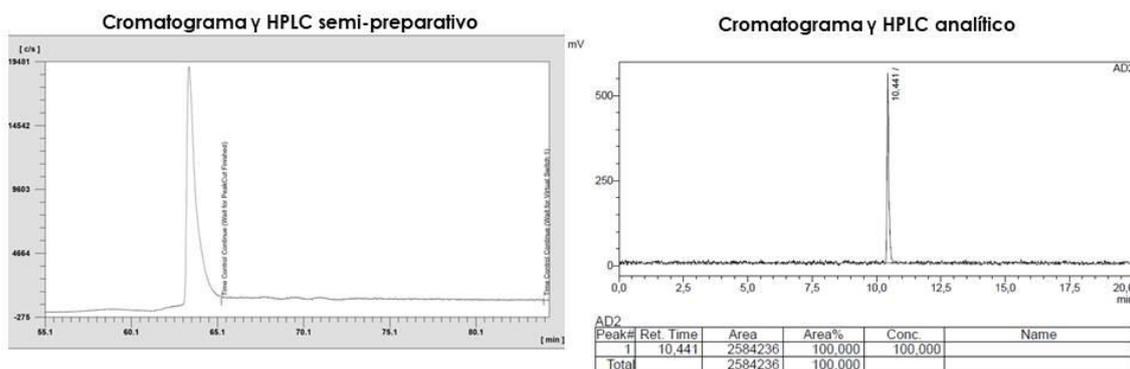


Figura 58: Cromatogramas y de HPLC semipreparativo y analítico, condición 8.

Al repetir la síntesis bajo la condición 8, no fue posible reproducir el cromatograma y en el HPLC semipreparativo. Se planteó la posible hipótesis de que el volumen de inyección elevado (5 mL) generó la desestabilización del sistema cromatográfico.

Debido a los problemas presentados durante la purificación mediante HPLC semipreparativo, se decidió cambiar a la purificación mediante extracción en fase sólida. Es importante mencionar las ventajas de este método de purificación en comparación al uso de HPLC semipreparativo. En primer lugar se destaca el menor tiempo de preparación previo a comenzar la síntesis del radiofármaco, haciendo el proceso en general más sencillo. Los cartuchos SPE requieren como paso previo únicamente ser activados, proceso muy simple y rápido; por el contrario, un sistema de HPLC requiere un lavado previo de la columna, preparación de las fases móviles a usar (que incluye el filtrado por filtro de 0.22  $\mu$ m), estabilización de la columna cromatográfica (proceso que insume mayor tiempo que la activación de un cartucho SPE) y lavado final de la misma una vez recogido el pico correspondiente al radiofármaco. Como desventaja de la extracción en fase sólida, se puede mencionar el mayor costo ya que cada nueva síntesis requiere el uso de un cartucho SPE nuevo, así como también la posible radiólisis debido a la acumulación del radiofármaco en un volumen muy pequeño. Al estar la actividad concentrada en un espacio reducido, podría ocurrir la descomposición del radiofármaco retenido por causa de la radiación emitida por el mismo.

Para la optimización de la purificación por extracción en fase sólida se tomó como trabajo de referencia el realizado por *Knott et al.* La purificación del crudo de reacción una vez finalizada la hidrólisis se realizó utilizando los siguientes cartuchos SPE conectados en serie: Oasis® WAX, Sep-Pak® C18 y Oasis® HLB Plus. La purificación con Oasis® WAX se realiza mediante un modo mixto entre intercambio iónico y adsorción en fase reversa [134]. *Fedorova et al.* comprobaron su capacidad para retener a el [<sup>18</sup>F]FES y [<sup>18</sup>F]FMMSE con aproximadamente una pérdida del 10 – 12% de la actividad. El lavado con EtOH 40% permitió remover el [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> e impurezas radioquímicas de baja lipofiliidad, provocando la pérdida de un 7% de la actividad retenida inicialmente, valor aceptable siempre y cuando se logró el objetivo de obtener al radiofármaco libre de impurezas. La elución del [<sup>18</sup>F]FES desde el cartucho con EtOH 95% permitió purificar el radiofármaco de su principal impureza, [<sup>18</sup>F]FMMSE. Sin embargo encontraron en la solución final impurezas no radiactivas de lipofiliidad similar a el [<sup>18</sup>F]FES y [<sup>18</sup>F]FMMSE, las cuales no pudieron ser eliminadas [133]. Por otro lado, el cartucho Sep-Pak® C18 permite purificar mediante adsorción en fase reversa al estar

compuesto de una resina a base de sílice fuertemente hidrofóbica [135]. De la misma forma actúa el cartucho Oasis® HLB Plus, con la diferencia de estar constituido por un adsorbente de fase reversa polimérico que permite la retención de una amplia gama de ácidos, bases y compuestos neutros de muchas matrices [136]. En el trabajo de Knott *et al.*, el lavado de los cartuchos se efectuó con 110 mL de EtOH 40% y la elución del [<sup>18</sup>F]FES con 5 mL de EtOH 95%. Fue necesario evaporar el EtOH mediante calentamiento y así cumplir con las especificaciones de límite de concentración y masa exigidas por farmacopeas oficiales, de lo contrario la dilución a realizar sería muy grande lo que traería como consecuencia un elevado volumen de administración al paciente. El diseño del módulo Synthra RNplus Research no permitió realizar un lavado de los cartuchos SPE con los volúmenes anteriormente mencionados. Los viales disponibles que se encuentran conectados con la posición en donde se colocan los cartuchos SPE, tienen una capacidad máxima de 20, 8 y 20 mL respectivamente. Por otro lado, tampoco fue posible una vez eluido el [<sup>18</sup>F]FES, el calentamiento para evaporar el EtOH dado que el vial producto carece de sistema calefactor. Por lo tanto, en primera instancia fue necesario adaptar el método a condiciones adecuadas para el módulo Synthra RNplus Research.

Primeramente se ensayó lavar los cartuchos y eluir el [<sup>18</sup>F]FES con volúmenes de solventes menores a los usados por Knott *et al.* Una vez activados los cartuchos, se purificó el crudo de reacción por los cartuchos SPE conectados en serie y se lavó con 20 mL de EtOH 40% (volumen máximo que se puede introducir en el vial). Seguidamente se eluyó el [<sup>18</sup>F]FES retenido con 2 mL de EtOH 95%, sin embargo, como se muestra en el gráfico de la figura 59, solamente un 20% de la actividad retenida inicialmente en el cartucho fue eluida. Se continuó realizando eluciones en fracciones de 1 mL de EtOH 95%, hasta que finalmente luego de un total de 5 mL de EtOH 95% se pudo considerar que el [<sup>18</sup>F]FES fue removido de los cartuchos SPE en su totalidad (se recuperó un 87% de la actividad retenida inicialmente en los cartuchos).

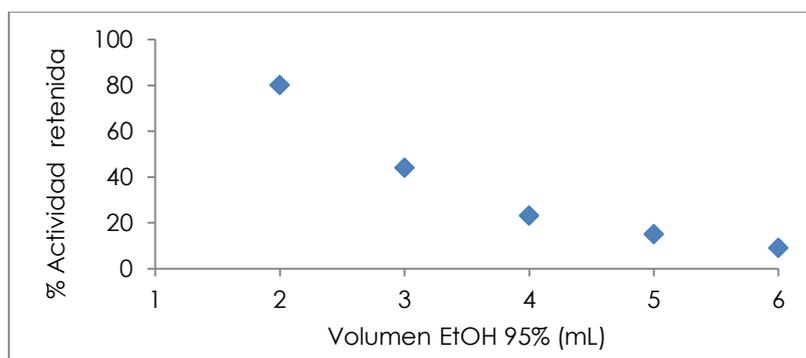
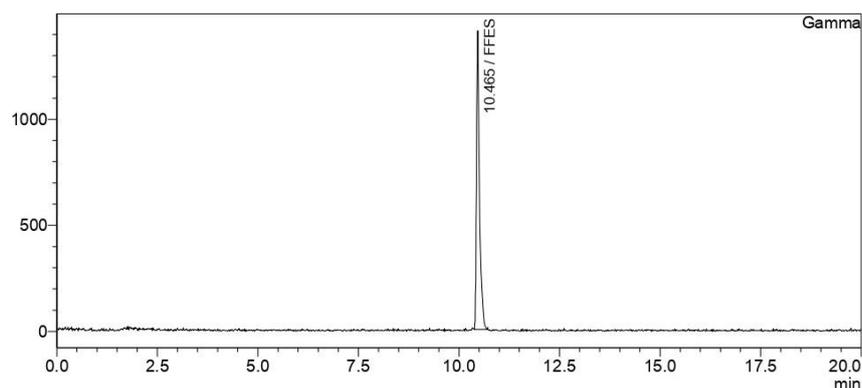


Figura 59: Gráfico de % actividad retenida (calculada con respecto a la actividad retenida inicial) en función del volumen (mL) de EtOH 95% empleado para la elución.

La PRQ de la solución obtenida luego de la purificación por tren de cartuchos SPE fue del 100% (ver figura 60), lo que demostró que 20 mL de EtOH 40% fueron suficientes para eliminar impurezas radiactivas. Existe siempre un compromiso entre la cantidad recuperada de actividad del radiofármaco y la pureza del mismo, una elución total del radiofármaco retenido puede tener como consecuencia la presencia de impurezas en la solución eluida.



Gamma				
Peak#	Ret. Time	Area	Area%	Name
1	10.465	7196683	100.000	FFES
Total		7196683	100.000	

Figura 60: Cromatograma y del [<sup>18</sup>F]FES luego de la purificación a través de cartuchos SPE.

Adicionalmente y con el objetivo de cumplir especificaciones ( $[\text{EtOH}] \leq 10\%$ ), fue necesario reducir la cantidad de EtOH a un volumen menor a 2 mL. Se diseñó una modificación al módulo de síntesis introduciendo una plancha de calentamiento externa que permitió reducir el EtOH mediante evaporación. También con un conector externo se acopló el reactor al vial en donde se mezcló el crudo de reacción final con 40 mL de agua para su posterior purificación por los tres cartuchos SPE.

Luego de 15 minutos de calentamiento y con ayuda de la presión ejercida por el flujo de N<sub>2</sub> gaseoso fue posible cumplir con la especificación de EtOH. Se obtuvo [<sup>18</sup>F]FES con un rendimiento promedio del 43% n.c.d (no corregido por decaimiento) en un tiempo de síntesis de aproximadamente 90 minutos. Dicho tiempo resultó ser bastante prolongado en comparación a los 45 – 75 minutos de las síntesis reportadas que utilizan purificación mediante extracción en fase sólida. Sin embargo, a pesar de ser una síntesis más prolongada el rendimiento del 43% fue mayor al reportado en la literatura (12% n.c.d en tiempo de 45 y 20% n.c.d en 75 minutos) [128, 133].

Con la finalidad de generar condiciones menos agresivas, se ensayó realizar una síntesis con menor concentración de ácido en la etapa de hidrólisis, favoreciendo el cuidado del módulo, al mismo tiempo que se evita la posible formación de productos secundarios radiactivos y no radiactivos por descomposición ácida. Se demostró que el uso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.06N fue suficiente para producir [<sup>18</sup>F]FES con una PRQ del 100%. No existen reportes de síntesis con cantidades del mismo orden o menor, siendo esta una gran ventaja.

Adicionalmente, se verificó la estabilidad del [<sup>18</sup>F]FES en la formulación final durante al menos 4 horas luego de producido. Éste es un período de tiempo suficiente para un radiofármaco de <sup>18</sup>F que asegura realizar varios estudios con un único lote de producción.

Por último, se redactaron los correspondientes documentos de calidad: orden de producción y registro de producción. Mediante la síntesis en forma secuencial de tres lotes piloto, se demostró con evidencia documentada que el procedimiento establecido fue apto para obtener [<sup>18</sup>F]FES.

### 4.3.2. Control de calidad de [<sup>18</sup>F]FES

Previo a la utilización de todo radiofármaco se debe realizar un control de calidad del mismo mediante el análisis de todas las propiedades fisicoquímicas, incluidas la esterilidad y endotoxinas bacterianas. Por lo tanto, la última etapa consistió en la puesta a punto de los métodos a emplear para el control de calidad.

Para la determinación de la pureza química se determinó la linealidad del método analítico cromatográfico descrito en el punto 4.2.2.2., tanto para el [<sup>19</sup>F]FES como para el precursor MMSE. Con dicho fin, se prepararon cinco soluciones de diferentes concentraciones de [<sup>19</sup>F]FES y precursor MMSE, las cuales fueron inyectadas en el sistema cromatográfico para la determinación de su respuesta frente detector UV (mV). Se realizó la correspondiente curva de regresión lineal, se determinó la ecuación de la recta y se calcularon los parámetros de la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación ( $R^2$ ). Los resultados de  $R^2$  de la regresión lineal, tanto para el [<sup>18</sup>F]FES y precursor MMSE fueron mayores a 0.99, lo que demostró la linealidad del método para ambos compuestos (ver figuras 61 y 62).

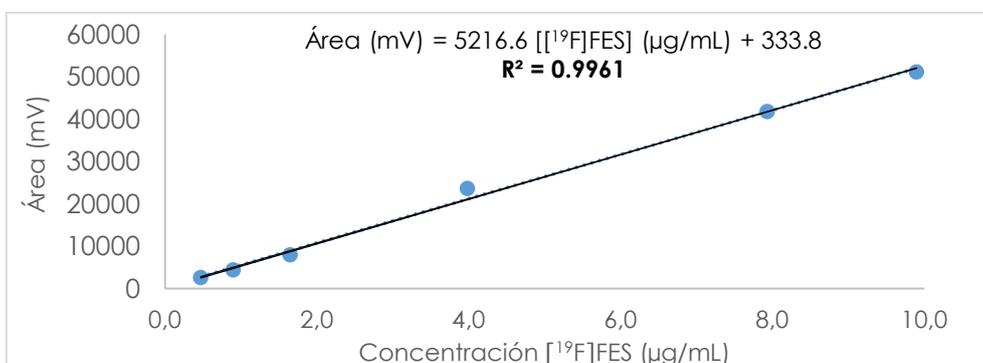


Figura 61: Curva de regresión lineal para [<sup>19</sup>F]FES.

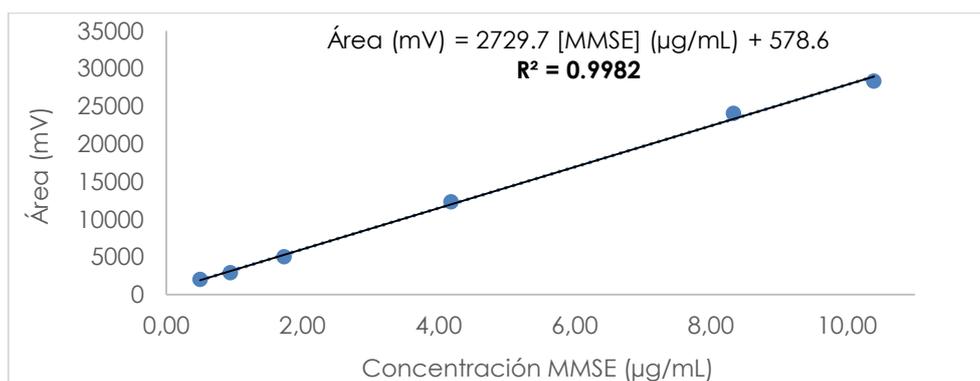


Figura 62: Curva de regresión lineal para precursor MMSE.

A los tres lotes pilotos se les realizó el control de calidad completo correspondiente a todo radiofármaco previo a su administración a pacientes. En la Tabla 9 se muestra un resumen de los mismos y las especificaciones correspondientes. En la tabla 10 se muestra un resumen de los resultados obtenidos para [<sup>18</sup>F]FES. Además de los parámetros fisicoquímicos que se controlan inmediatamente después de producido el lote, se verificó la esterilidad y concentración de endotoxinas bacterianas. El test de esterilidad es un test cuyo resultado no puede ser obtenido en el momento, son

necesaria dos semanas luego de producido el radiofármaco para confirmar la esterilidad del mismo. La liberación del radiofármaco en cuanto a su esterilidad es conocida como liberación paramétrica.

ANÁLISIS	ESPECIFICACIÓN	
Apariencia visual	Solución incolora, transparente libre de partículas visible	
pH	4.0 – 8.0	
Límite de Kryptofix® 2.2.2	< 50 µg/mL	
PRQ (%)	> 90%	
Identidad radioquímica	tr muestra = tr estándar (minutos)	
Identidad radionucleídica t <sub>1/2</sub> (minutos)	105 – 115 minutos	
Solventes Residuales	Acetona	< 0.5 %
	Etanol	< 10 %
	Acetonitrilo	< 0.05 %
Pureza Química	FES	< 100 µg/mL
	MMSE	< 100 µg/mL
	Otras impurezas individuales	< 100 µg/mL
	Total impurezas	< 500 µg/mL
Pureza Radionucleídica	> 99.5% de emisión gamma a 511 keV y/o 1022 keV	
Pirógenos (EU/mL)	< 175 EU/Volumen inyectado	
Esterilidad	Cumple	

Tabla 9: Controles de calidad realizados a los lotes pilotos y sus respectivas especificaciones.

LOTE	LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3
<b>DATOS PRODUCCIÓN</b>			
A [ <sup>18</sup> F]F <sup>-</sup> (mCi)	532	1032	1406
A [ <sup>18</sup> F]FES (mCi)	238	411	630
Volumen final (mL)	18,8	19,2	18,0
Rendimiento n.c.d (%)	45	40	45
Am (Ci/μmol)	0.91	1.58	1.64
<b>Análisis</b>			
Apariencia visual	Cumple	Cumple	Cumple
pH	6.1	6.4	5.8
Límite de Kryptofix® 2.2.2	Cumple	Cumple	Cumple
PRQ (%)	99.3	99.2	99
Identidad radioquímica	Cumple	Cumple	Cumple
Identidad radionucleídica t <sub>1/2</sub> (minutos)	109	109	108
Solventes residuales	Cumple	Cumple	Cumple
Pureza Química	Cumple	Cumple	Cumple
Pureza Radionucleídica	Cumple	Cumple	Cumple
Pirógenos (EU/mL)	18,2	< 10	< 10
Esterilidad	Cumple	Cumple	Cumple

Tabla 10: Resultados de los tres lotes pilotos de [<sup>18</sup>F]FES.

#### 4.3.3. Estudios *in vitro* de [<sup>18</sup>F]FES

Las líneas de cultivos celulares son modelos caracterizados y homogéneos que permiten realizar una evaluación más precisa del comportamiento del radiofármaco a nivel celular y molecular. Los estudios *in vitro* basados en células, como los ensayos de unión, son útiles para brindar información sobre el comportamiento del radiofármaco a nivel celular. En el presente trabajo se realizó el ensayo de unión de [<sup>18</sup>F]FES a células MCF-7, con el objetivo de validar el método y comparar el resultado de unión obtenido con aquellos derivados de realizar el ensayo con potenciales radiotrazadores para Imagenología de los RE, desarrollados por nuestro grupo de investigación. Si bien existen en la literatura reportes de ensayos de unión de [<sup>18</sup>F]FES a células MCF-7, los métodos son diferentes al optimizado por nuestro grupo de trabajo, lo que no permite realizar comparaciones.

Los estudios *in vitro* en células fueron llevados a cabo en células MCF-7, línea celular adherente, aislada por primera vez en 1970 del tejido epitelial mamario de una mujer caucásica. El nombre MCF deriva de *Michigan Cancer Foundation*, lugar en donde se desarrolló la línea celular, se agrega el número siete debido a que fue la séptima línea celular desarrollada por el investigador Herbert D. Soule. Es la línea celular para cáncer

de mama más estudiada a nivel mundial, muy útil para estudios de cáncer de mama *in vitro*, debido a que retiene características ideales particulares del epitelio mamario, como la capacidad para procesar estrógeno en forma de estradiol a través del RE en el citoplasma celular. Una de las contribuciones más importantes de la línea celular MCF-7 ha sido en el estudio del REa, ya que es una de las pocas en expresar niveles sustanciales del mismo, imitando a la mayoría de los cáncer de mama invasivos que expresan el REa. El éxito de un radiofármaco cuyo blanco molecular es un receptor, depende entre otras cosas, de la alta afinidad y de la especificidad de unión al receptor. La línea celular MCF-7 permite evaluar la interacción de dichos radiofármacos con el RE [88, 137].

El día previo a realizar el ensayo se cambió el medio de cultivo por 12 mL de medio fresco y se corroboró el estado de las células al microscopio.

En el ensayo de unión, fueron agregados 10  $\mu$ Ci, 20  $\mu$ Ci, 50  $\mu$ Ci y 100  $\mu$ Ci de [<sup>18</sup>F]FES al medio de cultivo de cada frasco T-75. Las células fueron incubadas durante 60 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo de incubación, se descartó el medio de cultivo en un falcón de 50 mL, se lavaron las células dos veces con buffer fosfato salino, con el fin de eliminar uniones del radiofármaco no específicas, que se descartó en el falcón de 50 mL. Se lisaron las células de la superficie adherente con tripsina-EDTA y se trasvasaron a un segundo falcón de 50 mL, se completó con agua para obtener el mismo volumen del sobrenadante (32 mL). Finalmente, las actividades del sobrenadante y de las células fueron medidas en un contador de centelleo sólido. En la figura 63 se muestran los resultados obtenidos en donde el porcentaje de unión de [<sup>18</sup>F]FES a las células es expresado con respecto a la actividad del radiofármaco que fue incubada. El mayor % de unión resultó de incubar a las células con 10  $\mu$ Ci de [<sup>18</sup>F]FES y fue de  $6.3 \pm 1.3$  %.

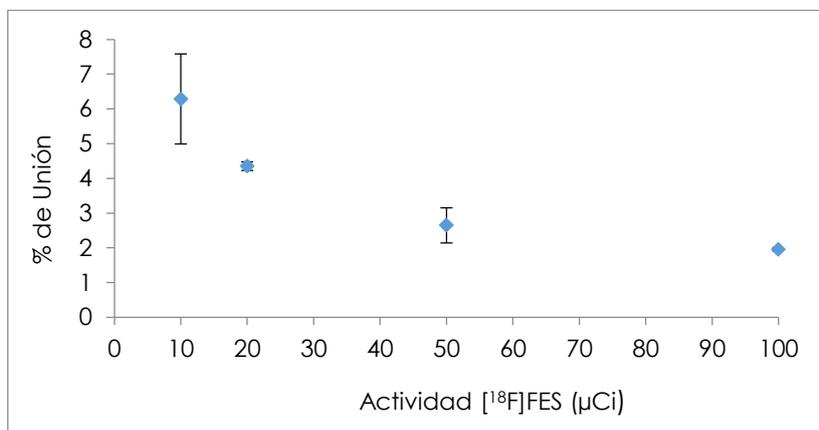


Figura 63: Gráfico de actividad de [<sup>18</sup>F]FES vs. % de unión luego de una hora de incubación. Resultados expresados como promedio de % de unión con respecto a la actividad de [<sup>18</sup>F]FES incubada para  $n=3$ .

Una vez establecida con que actividad de [<sup>18</sup>F]FES se obtuvo el mejor resultado de unión, se procedió con el ensayo de unión dependiente del tiempo. Se agregaron 10  $\mu$ Ci de [<sup>18</sup>F]FES al de medio de cultivo de cada frasco T-75, los cuales fueron incubados a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> gaseoso durante 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos. Transcurrido cada tiempo de incubación, se realizó el mismo procedimiento de lavado y lisado de las células del ensayo anterior. La figura 64 muestra el gráfico con los resultados

obtenidos. Se pudo constatar que no hubo una variación en la unión a células con el tiempo y fue de  $6.3 \pm 0.4$  %, siendo suficientes 30 minutos de incubación para tener al radiofármaco unido en su totalidad a la célula.

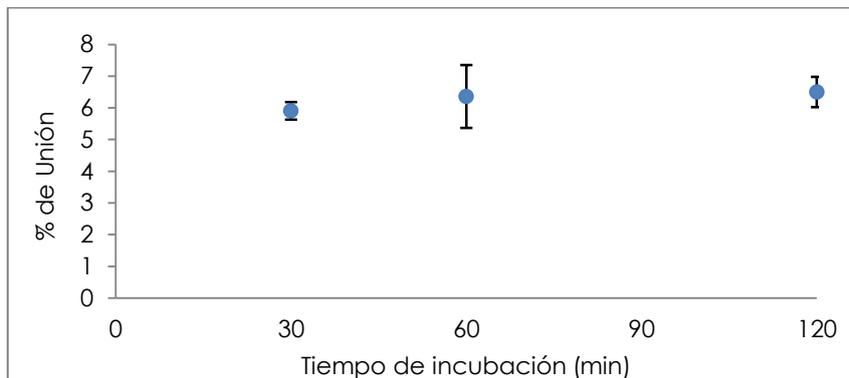


Figura 64: Gráfico de % de unión vs. tiempo de incubación. Resultados expresados como promedio de % de unión con respecto a la actividad de [<sup>18</sup>F]FES incubada para  $n=4$ .

El resultado mostró ser concordante con estudios previamente realizados por nuestro grupo de investigación, en donde se incubó a las células con estradiol tritiado (ver figura 65) durante 60 minutos ( $6.6 \pm 1.4$  %). El estradiol es el ligando natural del RE y como consecuencia su unión a las células es considerada estándar.

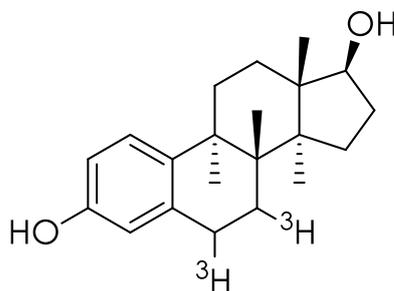


Figura 65: Estructura del estradiol tritiado.

5) DISEÑO, SÍNTESIS Y  
EVALUACIÓN DE UN POTENCIAL  
RADIOTRAZADOR DE  $^{99m}\text{Tc}$

---

## 5.1. INTRODUCCIÓN

El  $^{99m}\text{Tc}$  es el radionucleido más ampliamente usado en Medicina Nuclear mediante la modalidad SPECT debido a sus propiedades nucleares favorables para su uso en diagnóstico. Su descubrimiento en el año 1938 es atribuido a Carlo Perrier y Emilio Segré [138].

El  $^{99m}\text{Tc}$  es un emisor gamma puro con un  $t_{1/2}$  de 6.02 h que decae por transición isomérica mediante la emisión de un fotón gamma de 140.5 keV al isótopo  $^{99}\text{Tc}$  de largo período de semidesintegración ( $t_{1/2}$  de  $2.5 \times 10^5$  años) [66]. A diferencia de otros radionucleidos, es accesible y económico, dado que se obtiene de generadores  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  que permiten una fácil disponibilidad a bajo costo en cualquier servicio de Medicina Nuclear. El primer generador de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  fue desarrollado en el año 1950 en el Laboratorio Nacional Brookhaven del Departamento de Energía de Estados Unidos [139]. Un generador de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  contiene una columna de alúmina en donde está adsorbido el radionucleido  $^{99}\text{Mo}$  (obtenido de la fisión nuclear del  $^{235}\text{U}$ ). El  $^{99}\text{Mo}$  decae emitiendo  $\beta^-$  en un 87.5% a  $^{99m}\text{Tc}$ , el restante 12.5% decae a  $^{99}\text{Tc}$  (ver figura 66 y figura 67) [140, 141].

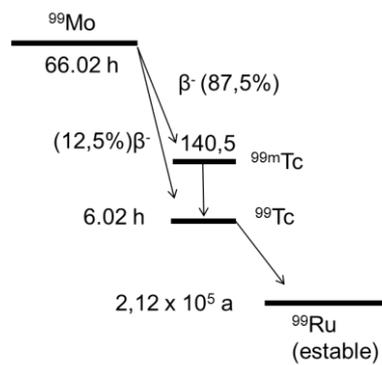


Figura 66: Esquema de decaimiento del  $^{99}\text{Mo}$ .

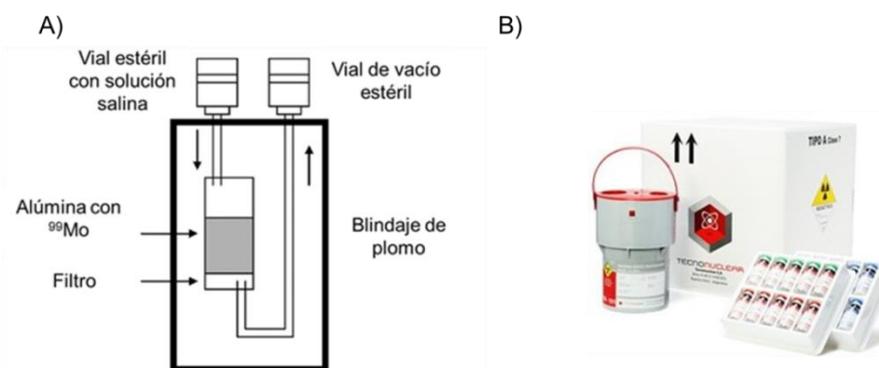


Figura 67: A) Interior del Generador de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ . B) Ejemplo de generador comercial  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ .

El  $t_{1/2}$  de 6.02 h es compatible con el tiempo requerido para la preparación de los radiofármacos, su respectivo control de calidad y el tiempo que lleva un estudio de Medicina Nuclear. Al mismo tiempo el  $t_{1/2}$  es lo suficientemente corto como para permitir la administración de cantidades de mCi de [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-radiofármaco sin causar

una dosis de irradiación elevada en el paciente [66]. La ausencia de emisión de partículas y el  $t_{1/2}$  relativamente corto minimiza los peligros de la radiación tanto para pacientes como para el personal de la salud, al mismo tiempo que hace que los procedimientos de desechos radiactivos sean simples [142].

Desde el punto de vista químico, el Tc es un metal de la segunda serie de transición, perteneciente a la familia 7, conjuntamente con el Mn y el Re. La configuración electrónica del átomo neutro en su estado fundamental es  $[(\text{Kr}) 4d^5s^2]$ . Puede por lo tanto, presentar estados de oxidación entre -1 y +7. La forma química bajo la cual se obtiene el  $^{99m}\text{Tc}$  a partir de su generador es el ion pertechnetato ( $[\text{^{99m}Tc}]\text{TcO}_4^-$ ), material de partida para la preparación de moléculas marcadas mediante la formación de complejos con  $^{99m}\text{Tc}$ . El primer paso para la formación del complejo, es por lo general, la reducción del  $^{99m}\text{Tc}$ , con agentes reductores químicos. De todos los reductores, el más utilizado es el cloruro de estaño II debido a varias razones: el ión  $\text{Sn}^{2+}$  presenta una baja toxicidad, buen poder reductor, efectividad a temperatura ambiente y solubilidad en agua. Sin embargo, debido a su elevado poder reductor es fácilmente oxidado por el oxígeno disuelto en la solución de reacción, dando lugar a  $\text{Sn}^{4+}$  lo podría tener como consecuencia una reducción incompleta del  $[\text{^{99m}Tc}]\text{TcO}_4^-$ . Las formas reducidas del  $^{99m}\text{Tc}$  poseen orbitales  $d$  incompletos y forman fácilmente compuestos de coordinación con ligandos adecuados que posean átomos o grupos de átomos ricos en electrones capaces de formar el enlace covalente coordinado. Diversos factores afectan el estado de oxidación final del metal en el complejo: la naturaleza del reductor y del ligando, el pH y la temperatura. De los factores mencionados anteriormente, la naturaleza del ligando es el de mayor influencia. La química del Tc es dominada por la formación de complejos en los cuales el metal es deficiente en electrones actuando como aceptor de electrones (ácido de Lewis) provenientes de átomos o grupos funcionales capaces de donar electrones (bases de Lewis) y que forman parte de los ligandos. Estos últimos se clasifican según los criterios de Pearson, de acuerdo a su dureza. Los ligandos duros son aquellos átomos o grupos pequeños que retienen la carga negativa asociado a ellos, mientras que los ligandos blandos presentan átomos o grupos grandes que son capaces de compartir la carga negativa. Los mismos criterios pueden usarse en la clasificación del metal, el que actúa como ácido de Lewis. Teniendo además en cuenta que un ácido *duro* de Pearson formará preferentemente complejos estables con bases también *duras*, podemos saber qué tipo de donores serán los preferidos por el tecnecio en sus distintos estados de oxidación. En estados de oxidación altos (+5, +4) la alta carga del centro metálico lo convierte en un ácido *duro*. La estabilidad se logra por enlaces con bases duras como los grupos oxo, nitrato o nitreno. Estos grupos se unen directamente al átomo metálico formando un núcleo o core en el que aún quedan sitios de coordinación disponibles para unión a los ligandos. Estos cores son relativamente inertes, no siendo alterados, en general, ni por la formación del complejo, ni por eventuales reacciones de sustitución de ligandos. Por otro lado, el Tc en estados de oxidación más bajos (+3 y +1) es un ácido blando y por lo tanto se une preferentemente a bases blandas que contienen aceptores  $\pi$  como fosfinas o isonitrilos [66].

Para la Radiofarmacia los estados de oxidación más relevantes son el +1, +3 y +5. En la tabla 11 se resume los principales cores asociados a cada estado de oxidación.

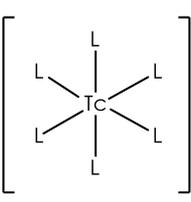
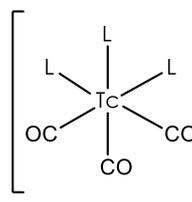
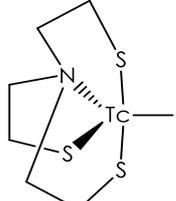
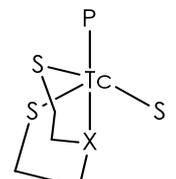
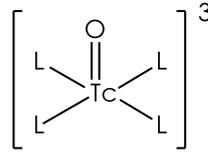
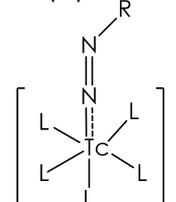
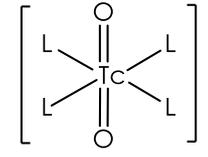
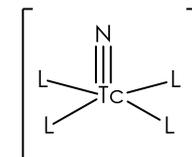
ESTADO DE OXIDACIÓN DEL Tc.	PRINCIPALES CORES	
+1	$-\text{[Tc(I)]}^{+}$  $^{1+}$	$-\text{[Tc(I)(CO)}_3\text{]}^{+}$  $^{1+}$
+3	$-\text{Tc(III) "4+1"}:$  $\text{L} = \text{CN o P.}$	$-\text{Tc(III) "3+1+1"}:$  $\text{X} = \text{S, N, O.}$
+5	$-\text{[Tc(V)O]}^{+3}$  $^{3+}$  $-\text{Tc(V)nitreno:}$ 	$-\text{[Tc(V)O}_2\text{]}^{+}$  $^{1+}$  $-\text{Tc(V)nitruro:}$ 

Tabla 11: Estados de oxidación del Tc frecuentes en Radiofarmacia y principales cores asociados.

### I. Tc(V)

A pesar de la variedad de estados de oxidación que puede adoptar el Tc, en la mayoría de los compuestos se encuentra bajo el estado de oxidación +5 y bajo la forma de core  $[\text{Tc(V)O}]^{3+}$  (core monooxo). Numerosos radiofármacos actualmente utilizados en clínica emplean a dicho core, como el  $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-ECD}$ , radiofármaco de perfusión cerebral (ver figura 68 parte A). El sistema de átomos donador  $\text{N}_2\text{S}_2$  (diaminoditiol) que presenta el complejo  $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-ECD}$  es muy importante dentro del core monooxo. Otro posible sistema quelante para este core podría ser el  $\text{N}_4$  (propilenaminoximas), como se presenta en el radiofármaco  $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HMPAO}$  utilizado también en clínica para perfusión cerebral (ver figura 68 parte B).

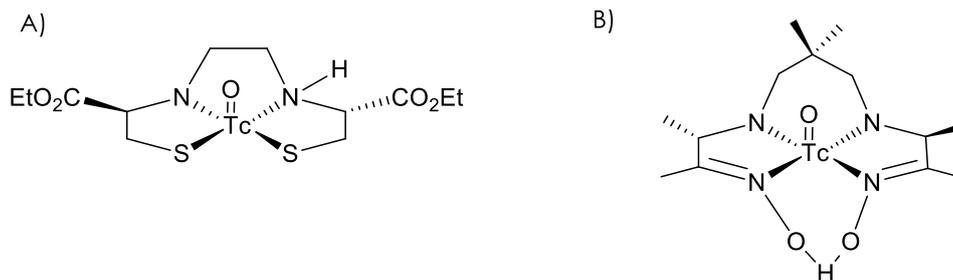


Figura 68: Estructura de A)  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-ECD}$  y B)  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HMPAO}$ , ejemplos de radiofármacos utilizados en clínica que contienen al core monooxo.

Dentro de los complejos de  $\text{Tc(V)}$ , el core  $\text{Tc(V)}$ nitruro inicialmente desarrollado por Baldas *et al.* se caracteriza por la presencia de un enlace  $\text{Tc}\equiv\text{N}$  que deja cuatro posiciones de coordinación disponibles para la unión al ligando [143]. Las mismas pueden llenarse mediante dos ligando bidentados iguales o diferentes, dando lugar a complejos simétricos o asimétricos, respectivamente. Un ejemplo de complejo simétrico se presenta en el  $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcN-NOET}$  (ver figura 69), radiotrazador diseñado para imágenes cardiacas [144].

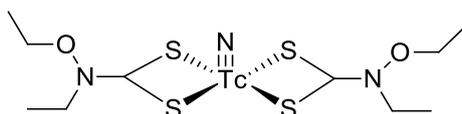


Figura 69: Ejemplo de un complejo simétrico conteniendo el core  $\text{Tc(V)}$ nitruro.

También se han desarrollado algunos nitrocomplejos asimétricos de tipo "3+1" formados por la combinación de un ligando tridentado donador  $\pi$  conteniendo el set de átomos donores [S-, N-, S-] y un ligando monodentado aceptor  $\pi$  de tipo  $\text{PR}_3$  (ver figura 70).

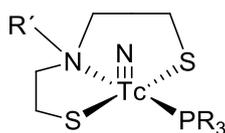


Figura 70: Estructura general para complejos  $\text{Tc(V)}$ nitruro "3+1".

Otro core de  $\text{Tc(V)}$  que ha sido utilizado es el  $\text{Tc(V)}$ nitreno, en el que el grupo nitreno se une directamente al metal dejando cinco posiciones de coordinación libres. El HYNIC (hidracinonicotinamida) es una hidracina aromática que ha sido ampliamente utilizada como agente bifuncional para la formación de complejos de  $\text{Tc}$  con proteínas o péptidos (ver figura 71).

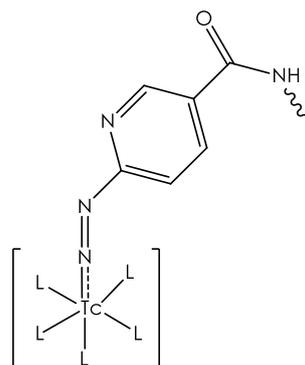


Figura 71: Core Tc(V)nitreno formado por el ligando bifuncional HYNIC.

Continuando con los cores de Tc(V), el core dioxo o  $[\text{Tc(V)O}_2]^+$  no ha sido muy ampliamente utilizado en radiofármacos. En el presente trabajo se plantea la utilización de dicho core para marcar a un ligando derivado de estradiol. Tiene una geometría de coordinación con estructura de octaedro con una alta densidad de carga positiva sobre el  $^{99m}\text{Tc}$ . Parte de la carga positiva se neutraliza mediante la unión en posición trans de dos grupos oxo quedando cuatro posiciones de coordinación disponibles en el plano ecuatorial del octaedro. Estas posiciones de coordinación suelen llenarse con grupos donores de electrones duros, como por ejemplo los grupos aminos. Varios grupos de investigación reportaron la preparación de este tipo de complejos con ligandos tetramínicos alifáticos, así como también aminas imidazólicas o piridínicas [142, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152]. La geometría octaédrica con la esfera de coordinación alrededor del metal totalmente ocupada por los seis sustituyentes da lugar a complejos cinéticamente inertes [142, 153].

El Tetrofosmín (Myoview®), radiofármaco para perfusión cerebral utilizado en clínica, presenta el core dioxo coordinado con dos moléculas del ligando 1,2-bis[di-(2-etoxietil)fosfino]etano (ver figura 72).

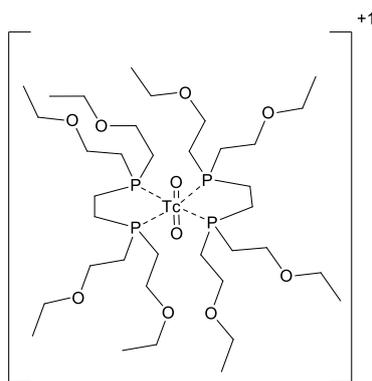


Figura 72: Estructura del radiofármaco Tetrofosmín.

El grupo de *Maina et al.*, ha descrito la utilización de grupos tetraamino alifáticos ( $\text{N}_4$ ) de cadena abierta para la marcación con  $^{99m}\text{Tc}$ , formando el complejo dioxo en péptidos análogos de la somatostatina, neurotensina, bombesina y minigastrina en estudio clínicos con animales y en estudios clínicos con humanos. En todos los casos la marcación es descrita en condiciones alcalinas y a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos. Los respectivos compuestos formados presentaron una PRQ mayor

al 90% con una importante hidrofiliidad favoreciendo su excreción vía urinaria [142, 152, 154, 155, 156].

- **Tc(III)**

El Tc en estado de oxidación +3 es un ácido blando y por tanto se une preferentemente a bases blandas que contienen grupos aceptores  $\pi$ , principalmente fosfinas o isonitrilos. Este estado de oxidación no es demasiado común en radiofármacos. No existen por lo tanto grupos oxo, nitruro o nitreno unidos al metal. Un radiofármaco de segunda generación, el Teboroxime (CardioTec®) sería el único ejemplo de este tipo de complejos aplicado a la Radiofarmacia [153].

Dentro de los complejos de  $^{99m}\text{Tc(III)}$  se ha explorado el concepto de complejos de ligandos mixtos "3+1+1" o "3+2". Los primeros que se estudiaron fueron los complejos "3+1+1" (ver figura 73).

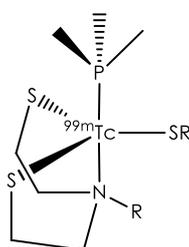


Figura 73: Estructura de los complejos de  $^{99m}\text{Tc(III)}$  "3+1+1".

Los complejos "3+1+1" están formados por un ligando tridentado del tipo  $\text{NS}_2$  (coordina por los dos grupos tioles y el nitrógeno alifático), una fosfina monodentada y un tiol monodentado. Este tipo de complejos plantea la posibilidad de acoplar la biomolécula seleccionada a uno de los ligandos monodentados y emplear el restante para modificar las propiedades fisicoquímicas del complejo, sin embargo, los complejos resultaron ser inestables debido a la presencia de dos ligandos monodentados. La solución a este problema fue pasar a trabajar con complejos "3+2" (ver figura 74).

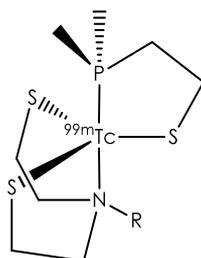


Figura 74: Estructura de los complejos de  $^{99m}\text{Tc(III)}$  "3+2".

La estructura resultó ser más estable, pero se presentaron dificultades al momento de funcionalizar los ligandos polidentados, lo que resultaba bastante difícil de realizar en el laboratorio. Por este motivo fue que los complejos "4+1" cobraron importancia, con el fin de darle estabilidad a la molécula por el efecto quelato del ligando tetradentado y la posibilidad de funcionalizar la biomolécula a través del ligando monodentado. Son complejos en donde el  $^{99m}\text{Tc(III)}$  se encuentra coordinado a un quelante tetradentado 2.2'.2''-nitrilotris-etanotiol ( $\text{NS}_3$ ) o sus derivados ( $\text{NS}_3\text{R}^1$ ) y a un

ligando monodentado el cual coordina mediante un grupo isonitrilo o su derivado ( $\text{CNR}^2$ ) o fosfina terciaria ( $\text{PR}^3$ ). La fórmula general de los complejos es  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{L}^n)(\text{L}^m)]$  en donde  $\text{L}^n = \text{NS}_3$  o su derivado  $\text{NS}_3\text{R}^1$  y  $\text{L}^m = \text{PR}^3$  o  $\text{CNR}^2$ .

En el presente trabajo se planteó el diseño, síntesis y evaluación de un complejo de  $^{99m}\text{Tc}(\text{III})$  "4+1", en donde la biomolécula se funcionalizó a través del ligando monodentado conteniendo un grupo isonitrilo (ver figura 75).

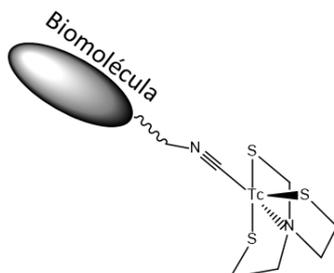


Figura 75: Ejemplo de conjugación de la biomolécula con un ligando monodentado conteniendo el grupo isonitrilo.

Los complejos "4+1", basados en el sistema donador  $\text{NS}_3/\text{CN}$  o  $\text{NS}_3/\text{P}$ , se caracterizan por:

- Elevada estabilidad y estructuras bien definidas.
- Naturaleza lipofílica, no polares, libres de átomos de oxígeno, el átomo de  $^{99m}\text{Tc}$  se encuentra blindado por un arreglo de átomos donadores de electrones.
- Estables frente al intercambio de ligandos como la cisteína o glutatión, así como también en presencia de plasma o sangre entera [157, 158, 159].

En comparación con el core monooxo (muy usado), en donde el Tc se encuentra en estado de oxidación +5, la disposición espacial de ligando y coligando en este tipo de complejos es tal que actúa como blindaje estérico para el metal, tal como se muestra en la figura 76, evitando su interferencia con la unión ligando-receptor, motivo por el cual la influencia del metal en el comportamiento biológico del complejo final será mucho menos importante.



Figura 76: Disposición espacial de ligandos en los cores: A)  $^{99m}\text{Tc}(\text{V})$  monooxo y B)  $^{99m}\text{Tc}$  "4+1".

En suma a lo anterior, tienen la ventaja de permitir controlar la lipofilicidad introduciendo grupos ácidos carboxílicos ( $\text{COOH}$ ), alcoholes ( $\text{OH}$ ) o azúcares en el ligando tetradentado. Estos cambios permiten aumentar la hidrofiliicidad del compuesto final y así poder modular su farmacocinética y excreción.

La preparación de este tipo de complejos se realiza generalmente por sustitución a partir del complejo  $^{99m}\text{Tc}$ Tc-EDTA a fin de evitar la formación de tecnecio reducido hidrolizado.

Si bien la aplicación de estos complejos al desarrollo de potenciales radiofármacos no se ha difundido ampliamente aún, el grupo de investigación que lo desarrolló, Pietzsch *et al.* lo ha utilizado para la marcación de diversos tipos de péptidos, ácidos grasos, etc. Un ejemplo es la marcación de un péptido de la familia RGD (Arg-Gly-Asp) con potencialidad para imágenes de neoangiogénesis tumoral. Estos complejos debido a las características de los ligandos empleados presentan una elevada lipofilidad, la cual puede ser modificada con ligandos tetradentados que posean grupos funcionales hidrofílicos. En la figura 77 se muestra el complejo con el ligando tetradentado  $\text{NS}_3(\text{COOH})_3$ . La marcación se realizó a temperatura ambiente durante 60 minutos usando un exceso del ligando tetradentado de al menos diez veces mayor con respecto al ligando monodentado (que contiene al péptido RGD). Una vez finalizada la marcación se procedió a la purificación mediante HPLC semipreparativo, el complejo obtenido presentó una PRQ mayor al 95% y resultó ser estable durante al menos 24 horas [158, 160].

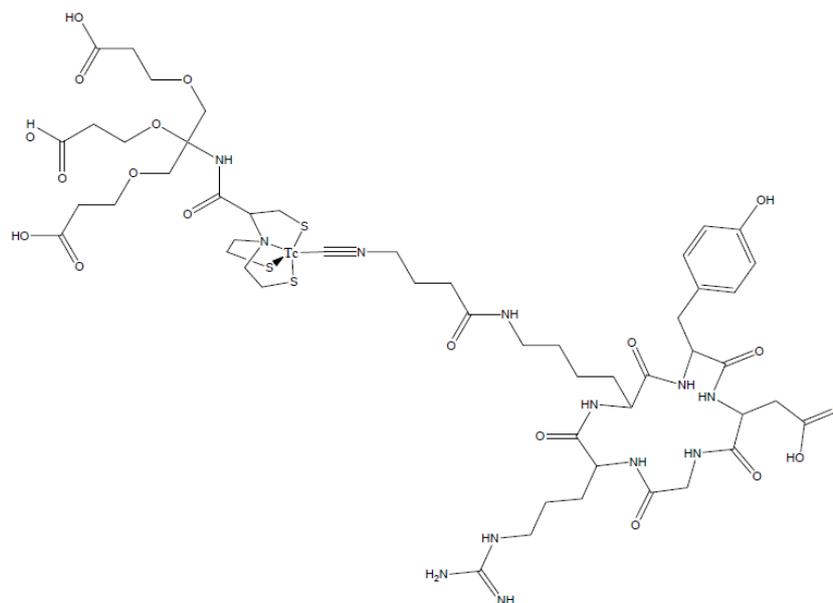


Figura 77: Estructura de un complejo de  $^{99m}\text{Tc}$ (III) "4+1" conteniendo un péptido RGD.

- **Tc(I)**

El  $^{99}\text{Tc}$  en estado de oxidación +1 presenta una configuración  $d^6$  de bajo espín, la que debe ser estabilizada por ligandos deficientes en electrones, como fosfinas e isonitrilos. En estas condiciones el  $\text{Tc}^+$  forma complejos octaédricos por coordinación simultánea de seis ligandos monodentados. Un ejemplo de aplicación clínica actual es el radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ Tc-sestamibi (Cardiolite®), utilizado como trazador de perfusión miocárdica. Se trate de un complejo que contiene seis ligandos monodentados 2-metoxiisobutilisonitrilo (ver figura 78).

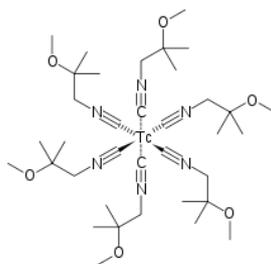


Figura 78: Estructura ejemplo de aplicación del core  $\text{Tc}^+$ ,  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi.

Otro core que ha ganado terreno en el campo de la radioquímica y Radiofarmacia es el  $\text{Tc(II)}$ -tricarbónico o  $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ , en donde el metal se encuentra en estado de oxidación +1 coordinado y estabilizado por tres moléculas de CO. Alberto *et al.* propusieron la formación a baja presión del acuocomplejo tricarbónico de  $\text{Tc(II)}$   $\text{fac}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  que puede ser utilizado como precursor para obtener una gran variedad de potenciales radiofármacos (ver figura 79) [161].

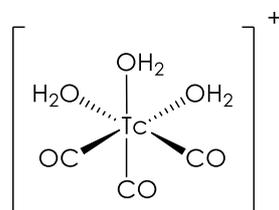


Figura 79: Estructura del complejo precursor  $\text{fac}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ .

Se trata de un complejo en el cual tres de las posiciones de coordinación son ocupadas por grupos carbonilo unidos fuertemente al metal, debido a que estos ligandos son dadores  $\sigma$  y aceptores  $\pi$ . El resto de las posiciones de coordinación disponibles están ocupadas por tres moléculas de agua débilmente unidas, las cuales pueden ser reemplazadas por ligandos que posean una combinación de átomos donores con alta afinidad por el metal. Estos últimos pueden ser ligandos tridentados, combinaciones de bidentados con monodentados o tres ligandos monodentados. Otra posibilidad más reciente ha sido emplear el anillo de ciclopentadienilo (o su respectivo derivado) en la coordinación al metal. La unidad ciclopentadienilo ofrece varias ventajas: es pequeño, tiene bajo peso molecular y permite formar complejos estables y robustos con  $\text{Tc(II)}$  a partir del precursor  $\text{fac}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  (ver figura 80).

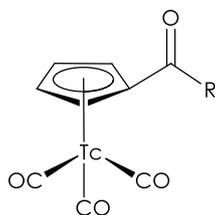


Figura 80: Estructura de un complejo de  $\text{Tc(II)}$  tricarbónico con una molécula de ciclopentadienilo como ligando tridentado.

Para la presente tesis se seleccionó trabajar con los estados de oxidación +3 y +5 representados por los complejos "4+1" de  $\text{Tc(III)}$  y el core dioxo de  $\text{Tc(V)}$  respectivamente.

## 5.2. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.2.1. Materiales

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica y procedencia comercial (Sigma-Aldrich®, Merck®, J.T.Baker®, Dorwil® S.A., Synth®). Las soluciones acuosas se prepararon con agua destilada preparada por un destilador Zhongxin YNSD-5. El diclorometano anhidro fue destilado sobre pentóxido de fósforo.

El [ $^{99m}\text{Tc}$ ]NaTcO<sub>4</sub> empleado en todas las marcaciones fue obtenido de un generador  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  TECNONUCLEAR.

Todas las reacciones que requerían condiciones anhidras se llevaron a cabo bajo atmósfera de N<sub>2</sub> gaseoso utilizando las técnicas estándar de eliminación de aire y humedad.

El avance de las reacciones fue determinado por cromatografía en capa fina analítica (TLC), utilizando como fase estacionaria Sílica-gel Merck® con indicador fluorescente (254 nm) en placas comerciales de 0.20 mm de espesor. Algunos de los métodos empleados de revelado fueron: i) exposición a la luz UV (254 nm); ii) exposición a vapores de yodo; iii) asperjado y posterior quemado de la placa con reveladores como anisaldehído y ninhidrina.

La purificación de los productos de síntesis, cuando corresponde, se realizó por cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria Sílica-gel (Merck®, grado 60, 230-400 mesh).

Para los análisis de espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) y carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN), los espectros de los compuestos fueron obtenidos por un equipo Bruker Avance Neo 400 MHz. Los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ) se expresan en ppm utilizando tetrametilsilano como referencia interna (0.00 ppm), y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hertz. Las multiplicidades se expresan como s: singulete, d: doblete, t: triplete y cuando la señal es ancha y no se le puede asignar una multiplicidad la misma se ignora. Los desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ) se expresan en ppm y son referidos a la línea central de la señal correspondiente al metanol deuterado (49.00 ppm).

Los espectros de masa (EM) se realizaron en un espectrómetro de masas API 2000 LC/MS/MS System, AB Applied Biosystems, MDS SCIEX, asociado al software Analyst, versión 1.5.1. La ionización de las muestras se realizó por electrospray en modo positivo (ESI+) o en modo negativo (ESI-).

En las mediciones de actividad se empleó una cámara de ionización Capintec CRC-55t. También se utilizaron espectrómetros de centelleo sólido con cristal de NaI(Tl) de 3x3 pulgadas de pozo acoplado a una tarjeta multicanal ORTEC y con cristal de NaI(Tl) de 3x3 pulgadas plano acoplado a un sistema analizador monocanal ORTEC.

El control de PRQ se realizó en un HPLC Shimadzu con software Lab Solution versión 5.99, con dos bombas (LC-10-AS) equipado con un detector  $\gamma$ -Parker, empleando una columna analítica  $\mu$ -Bondapak™ C18 125Å 10 $\mu\text{m}$  de 3.9 x 300mm (Waters®) o

Phenomenex Luna C18 de 5  $\mu\text{M}$  100A de 250 x 4.6 mm. Los solventes utilizados fueron de calidad HPLC o previamente filtrados por filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ .

Para los estudios *in vitro* con células MCF-7 se utilizaron los mismos materiales y equipos descritos en la sección 4.2.1, a excepción de la cámara de ionización y espectrómetro de centelleo sólido. En los restantes estudios *in vitro* se utilizó una centrifuga refrigerada TLG-16 y una Hettich EBA III, un baño de agua Selecta® Precistern, un vortex G-560E de Scientific Industries y para la determinación de la unión a proteínas plasmáticas se emplearon columnas MicroSpin™ G-50 de GE.

## 5.2.2. Métodos

### 5.2.2.1. Síntesis de ligandos

Nota: aquellos rendimientos de síntesis mayores al 100% se debieron a la presencia de sales y reactivos sin reaccionar, resultado de que los productos no fueron purificados una vez finalizada la reacción de síntesis.

#### 5.2.2.1.1. Síntesis de **L1**

##### 1. Síntesis del ácido 17[Boc-2-amino-3-(1H-1.2.3-triazol-1-il)]propanoico] estradiol (**1**)

A una solución de etinilestradiol (144 mg – 0.48 mmol) en *tert*-butanol (6 mL) se le agregó N-Boc-azidoalanina (200 mg – 0.49 mmol), ácido ascórbico (19 mg – 0.096 mmol) y acetato de cobre (38.4 mg – 0.21 mmol) disuelto en agua (4 mL). La reacción se agitó hasta desaparición del material de partida (aproximadamente 6 días) a temperatura ambiente, protegida de la luz y bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  gaseoso. Una vez transcurrida la reacción, se evaporó el disolvente a presión reducida, se acidificó y se extrajo de la fase acuosa con AcOEt (4 x 10 mL) o hasta que por TLC no se detectó producto de reacción. Las fases orgánicas combinadas se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó a presión reducida. Se obtuvo **1** como un sólido color amarillo (0.33 g, 128%).

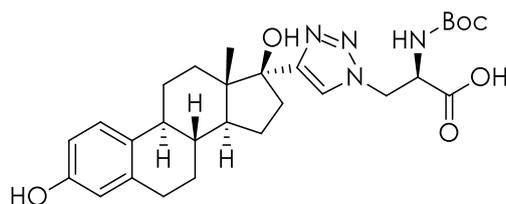


Figura 81: Estructura de **1**.

$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.79 (s, 1H), 7.00 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 6.52 (dd,  $J$  = 8.4, 2.6 Hz, 2H), 6.48 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H), 4.74 – 4.61 (m, 2H), 1.06 (s, 3H). MS( EI, 10 eV)  $m/z$ : 524.9 (M-) 426.7.

##### 2. Síntesis del ácido 17 [(1H-1.2.3-triazol-1-il) propanoico] estradiol (**2**)

A una solución de **1** (200 mg – 0.38 mmol) en de DCM (20 mL), se agregó TFA (361  $\mu\text{L}$  – 4.68 mmol). La reacción se agitó hasta desaparición del material de partida (aproximadamente 2 días) a temperatura ambiente, protegido de la luz y bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  gaseoso. Una vez completada la reacción se evaporó el disolvente a

presión reducida. Se eliminó el TFA azeotrópicamente con tolueno (10 x 10mL). Se obtuvo **2** como un sólido color amarillo (0.44 g, 161%).

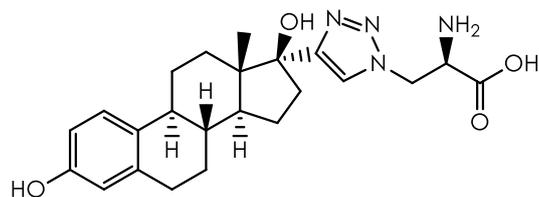


Figura 82: Estructura de **2**.

### 3. Síntesis del tri-tert-butil-1.4.8.11-tetraazaciclotetradecano-1.4.8-tricarboxilato (**3**)

A una solución de 1.4.8.11-tetraazaciclotetradecano (cyclam) (500 mg – 2.50 mmol) en DCM (10 mL) se agregó di-tert-dicarbonato de butilo (1634 mg – 7.49 mmol). La mezcla de reacción se agitó hasta desaparición del material de partida (aproximadamente 2 horas) a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (FM: DCM: MeOH, 9.5: 0.5). Se obtuvo **3** como un aceite incoloro (0.73 g, 56%).

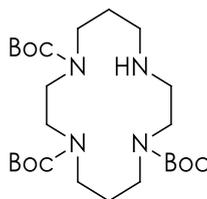


Figura 83: Estructura de **3**.

$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm)= 3.20 – 3.49 (m, 12H), 2.77 (t,  $J = 5.3$  Hz, 2H), 2.57 – 2.64(m, 2H), 1.86 – 1.93 (m, 2H), 1.67 – 1.74 (m, 2H), 1.44 – 1.45 (m, 27).

### 4. Síntesis del tri-tert-butil-11-(2-etoxi-2-oxoetil)-1.4.8.11-tetraazaciclotetradecano-1.4.8-tricarboxilato (**4**)

A una solución de **3** (350 mg – 0.70 mmoles) en DMF (1 mL) se adicionó bromoacetato de etilo (109 mg – 0.65 mmoles) y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (145 mg – 1.05 mmol). La mezcla de reacción se agitó hasta desaparición del material de partida (aproximadamente 16 horas) a 80 – 85°C y bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  gaseoso. Una vez completada la reacción se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se disolvió en cloroformo y se lavó con solución saturada de NaCl. La fase acuosa se extrajo con cloroformo (4 x 10 mL) o hasta que por TLC no se detectó producto de reacción. Se secaron las fases orgánicas combinadas con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó el disolvente a presión reducida. El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (FM: Hex/AcOEt, 3:7). Se obtuvo **4** como un aceite incoloro (0.36 g, 86%).

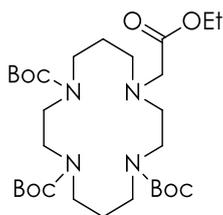


Figura 84: Estructura de **4**.

$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 4.16 – 4.09 (m, 2H), 3.49 – 3.16 (m, 14H), 2.88 – 2.75 (m, 2H), 2.70 – 2.59 (m, 2H), 1.95 – 1.83 (m, 2H), 1.74 – 1.61 (m, 2H), 1.45 (s, 27H), 1.25 (t,  $J = 1.25$  Hz, 3H).

5. Síntesis del ácido 2-(4.8.11-tri(*tert*-butoxicarbonil)-1.4.8.11-tetraazaciclotetradecan-1-il) acético (**5**)

A una solución de **4** (307 mg – 0.52 mmol) en MeOH (2.3 mL) se agregó NaOH 1N (1.17 mL). La mezcla de reacción se agitó hasta desaparición del material de partida (aproximadamente 5 horas) a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción se evaporó el disolvente a presión reducida y se llevó la fase acuosa con NaOH 1N a pH mayor a 6. Se extrajo la fase acuosa con AcOEt (4 x 10 mL) o hasta que por TLC no se detectó producto de reacción. Las capas orgánicas combinadas se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó el disolvente a presión reducida. Se obtuvo **5** como un aceite incoloro (0.22 g, 76%).

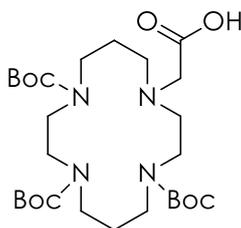


Figura 85: Estructura de **5**.

$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.15 – 3.53 (m, 14H), 2.72 – 2.83 (m, 2H), 2.58 – 2.70 (m, 2H), 1.80 – 1.91 (m, 2H), 1.65 – 1.78 (m, 2H), 1.45 (s, 27H).

6. Síntesis del 2-cloro-2-metilpropano (**6**)

Una mezcla de *tert*-butanol (20.68 g, 0.28 mmol) y HCl 37% (65 mL, 1.16 mmol) se agitó de forma vigorosa durante 5 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se descartó la fase acuosa y se lavó la fase orgánica con  $\text{NaHCO}_3$  (10 mL) para neutralizar el HCl remanente. Se secó la fase orgánica con una punta de espátula de  $\text{CaCl}_2$ . El producto obtenido se purificó mediante destilación a 51°C descartando las primeras gotas obtenidas. Se obtuvo **6** como un líquido incoloro (6.6 mL, 25%).



Figura 86: Estructura de **6**.

RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm): 1.7 (s, 9H).

7. Síntesis del tert-butil-2-amino-3-(tert-butoxi-17[2-amino-3-(1H-1.2.3-triazol-1-il)propanoato] estradiol (**7**)

Método 1

A una solución de **2** (100 mg – 0.23 mmol) en DCM (10 mL) se agregó **6** (84 mg – 0.91 mmol) y Py (41 mg – 0.52 mmol). La mezcla de reacción se agitó hasta desaparición del material de partida (aproximadamente 9 horas) a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción se evaporó el disolvente a presión reducida. Se extrajo la fase acuosa con AcOEt (4 x 10 mL) o hasta que por TLC la fase acuosa mostró ausencia del producto de reacción. Las capas orgánicas combinadas se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y se evaporó el disolvente a presión reducida.

Método 2

A una solución de **2** (231 mg – 0.54 mmol) en DCM (10 mL) se agregó **6** (597 mg – 6.49 mmol) y Py (283 mg – 3.58 mmol). La mezcla de reacción se agitó hasta desaparición del material de partida (aproximadamente 16 horas) a 50°C. Una vez completada la reacción se evaporó el disolvente a presión reducida. Se disolvió el crudo de reacción en AcOEt y se lavó con solución saturada de  $\text{CuSO}_4$  (4 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida.

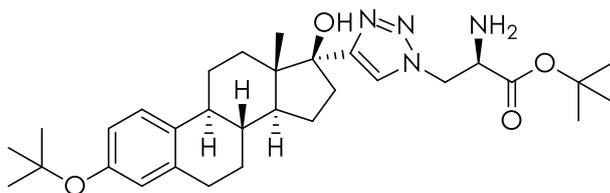


Figura 87: Estructura de **7**.

8. Síntesis del etil-3-azido-2-((tert-butoxicarbonil)amino)propanoato (**8**)

A una solución de N-Boc-Azidoalanina (100 mg – 24 mmol) en EtOH (0.6 mL) se agregó  $\text{SOCl}_2$  (86 mg – 0.72 mmol). La mezcla de reacción se agitó hasta desaparición del material de partida (aproximadamente 6 días) a temperatura ambiente y bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  gaseoso. Una vez culminada la reacción se evaporó el disolvente a presión reducida.

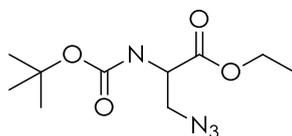


Figura 88: Estructura de **8**.

5.2.2.1.2. Síntesis de **L2**

1. Síntesis del 17[1-(3-(2-(2-(3-aminopropoxi)etoxi)etoxi)propil)-1H-1.2.3-triazol-4-il] estradiol (**9**)

A una solución de etinilestradiol (200 mg – 0.67 mmol) en *tert*-butanol (8 mL) se le agregó 1-Amino-11-azido-3.6.9-trioxodecano (166 mg – 0.67 mmol), ácido ascórbico (27 mg – 0.14 mmol) y acetato de cobre (59 mg – 0.30 mmol) disuelto en agua (5.6 mL). La reacción se agitó hasta desaparición del material de partida (aproximadamente 3 días) a temperatura ambiente, protegida de la luz y bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  gaseoso. Una vez culminada la reacción se evaporó el solvente a presión reducida, se acidificó y se extrajo de la fase acuosa con AcOEt (4 x 10 mL) o hasta que por TLC no se detectó producto de reacción. Las fases orgánicas combinadas se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporaron a presión reducida. Se obtuvo **9** como un sólido color amarillo (0.07g, 19%).

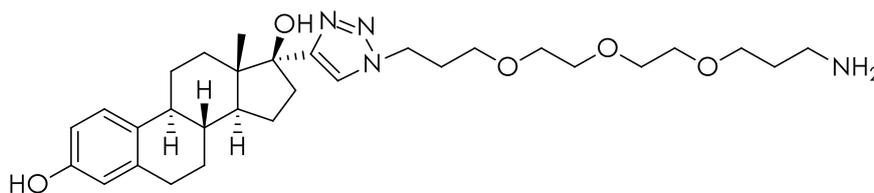


Figura 89: Estructura de **9**.

$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.85 – 7.82 (m, 1H), 7.01 – 6.96 (m, 1H), 6.52 – 6.47 (m, 2H), 4.54 – 4.51 (m, 2H).

2. Síntesis del tri-*tert*-butil-11-(16-azido-2-oxo-7.10.13-trioxa-3-azahexadecil)-1.4.8.11-tetraazaciclotetradecano-1.4.8-tricarboxilato (**10**)

A una solución de **5** (70 mg – 0.13 mmol) en DCM (3 mL) se agregó HBTU (57 mg – 0.15 mmol) bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  gaseoso y en baño de hielo hasta disolución total. Seguidamente se agregó DIPEA (49 mg – 0.38 mmol) y DMAP en cantidades catalíticas y se agitó durante 5 minutos. Se agregó 1-Amino-11-azido-3.6.9-trioxodecano (37 mg – 0.15 mmol) disuelto en DCM. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a  $0^\circ\text{C}$ , se llevó a temperatura ambiente y se dejó reaccionar hasta desaparición del material de partida (aproximadamente 3 días). Una vez culminada la reacción se evaporó el disolvente a presión reducida y el crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (fase móvil: DCM/MeOH, 2:8). Se obtuvo **10** como un aceite incoloro (0.078 g, 77%).

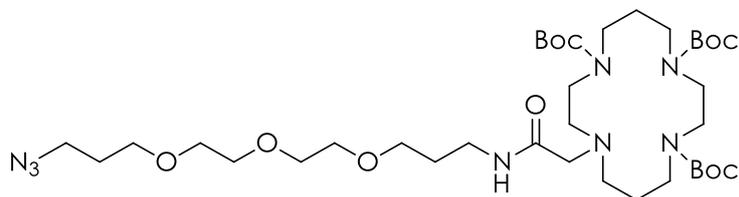


Figura 90: Estructura de **10**.

$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.17 (s, 2H), 2.80 – 2.73 (m, 2H), 2.61 – 2.58 (m, 2H), 1.50 – 1.48 (m, 27H).

3. Síntesis del Boc-Cyclam-3-(2-(2-(3-(1H-1.2.3-triazol)propoxi)etoxi)etoxi)propanamina-estradiol (**L2-Boc**)

Método 1.

A una solución de **5** (64 mg – 0.11 mmol) en DCM (4 mL) se agregó HBTU (50 mg – 0.13 mmol) bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  gaseoso y en baño de hielo hasta disolución total. Seguidamente se agregó DIPEA (42 mg – 0.32 mmol) y DMAP en cantidades catalíticas. La mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos a  $0^\circ\text{C}$  y se agregó una solución de **9** (70 mg – 0.13 mmol) disuelto en DCM. Se llevó a temperatura ambiente y se dejó reaccionar hasta desaparición del material de partida (aproximadamente 3 horas). Una vez culminada la reacción el disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (FM: DCM:  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 2: 8). Se obtuvo **L2-Boc** como un sólido color amarillo (0.090 g, 64%).

$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.86 – 7.81 (m, 1H), 7.24 – 7.18 (m, 1H), 6.75 – 6.81 (m, 2H), 4.53 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 1.48 – 1.47 (m, 27H), 1.07 (s, 3H). MS( EI, 10 eV)  $m/z$ : ( $\text{M}^+$ ) 1084, 1050.

Método 2.

A una solución de **10** (65 mg – 0.08 mmol) en *tert*-butanol (1 mL) se agregó etinilestradiol (25 mg – 0.08 mmol), ácido ascórbico (3.4 mg – 0.017 mmol) y acetato de cobre (7.2 mg – 0.036 mmol) disuelto en agua (1 mL). La mezcla de reacción se agitó hasta desaparición del material de partida (aproximadamente 3 días) a temperatura ambiente, protegida de la luz y bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  gaseoso. Una vez culminada la reacción se evaporaron los solventes a presión reducida, se acidificó y se extrajo de la fase acuosa con  $\text{AcOEt}$  (4 x 10 mL) o hasta que por cromatografía en capa fina no se detectó producto de reacción. Se secaron las fases orgánicas combinadas con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporaron a presión reducida. Se obtuvo **L2-Boc** como un sólido color amarillo (0.12 g, 133%).

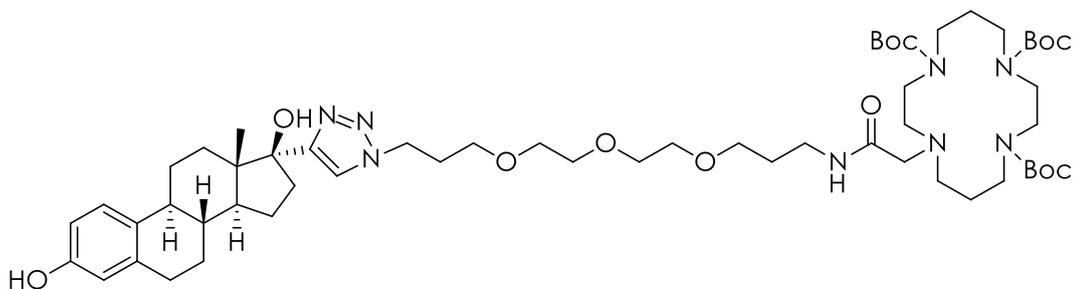


Figura 91: Estructura de **L2-Boc**.

$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.85 (s, 1H), 7.01 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 6.52 (dd,  $J$  = 2.6, 8.4 Hz, 2H), 4.53 (t,  $J$  = 6.8 MHz, 2H), 1.49 – 1.48 (m, 27H), 1.31 (s, 3H).

4. Síntesis del Cyclam-3-(2-(2-(3-(1H-1,2,3-triazol)propoxi)etoxi)etoxi)propanamina-estradiol (**L2**).

Se disolvió **L2-Boc** (119 mg – 0.11 mmol) en una mezcla de MeCN: Agua (3.6: 6.4, 0.25 mL) y se agregó  $\text{K}_2\text{CO}_3$  16 (punta de espátula). Se calentó por microondas (MW) a  $100^\circ\text{C}$  y 75W de potencia hasta desaparición del material de partida (aproximadamente 45 minutos). Se evaporó el disolvente de la mezcla a presión reducida, eliminando el agua azeotrópicamente con MeCN. Se obtuvo el ligando **L2** como un sólido color amarillo (0.40 g, 461%).

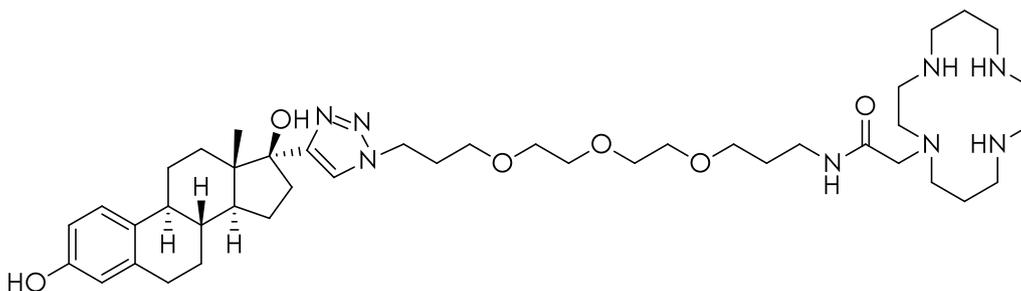


Figura 92: Estructura del ligando **L2**.

$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.85 (s, 1H), 7.01 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 6.52 (dd,  $J$  = 2.6, 8.4 Hz, 2H), 4.53 (t,  $J$  = 6.8 MHz, 2H).

### 5.2.2.1.3. Síntesis de **L3**

#### 1. Síntesis del ácido 2-amino-3-azidopropanoico (**11**)

A una solución de N-Boc-Azidoalanina (200mg – 0.49 mmol) en DCM anhidro (8 mL) se agregó TFA (1.8 mL) (536 mg – 47 mmol). La mezcla de reacción se agitó hasta desaparición del material de partida (aproximadamente 48 horas) a temperatura ambiente, protegida de la luz y bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  gaseoso. Una vez completada la reacción se evaporó el disolvente a presión reducida. Se eliminó el TFA azeotrópicamente con tolueno (10 x 10 mL). Se obtuvo **11** como un sólido color amarillo (0.29 g, 195%).

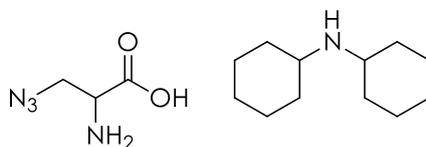


Figura 93: Estructura de **11**.

$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.84 (d,  $J$  = 5.4 Hz, 2H), 3.69 (t,  $J$  = 5.04 Hz, 1H), 3.22 – 3.15 (m, 1H), 2.11 – 2.00 (m, 2H), 1.92 – 1.82 (m, 2H), 1.76 – 1.68 (m, 2H), 1.44 – 1.15 (m, 5H).

#### 2. Síntesis del 4-((2-azido-1-carboxietil)amino)-N-metilidino-4-oxobutan-1-aminio (**12**)

A una solución de **11** (184 mg – 0.95 mmol) en THF (6.0mL) se agregó 4-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-N-metilidino-4-oxobutan-1-aminio (200mg – 0.95 mmol) y TEA (una gota). La mezcla de reacción se agitó hasta desaparición del material de partida (aproximadamente 48 horas) a temperatura ambiente, protegida de la luz y bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  gaseoso. Se obtuvo **12** como un sólido color amarillo-marrón (0.21 g, 400%).

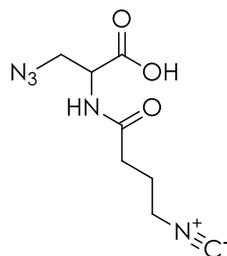


Figura 94: Estructura de **12**.

### 3. Síntesis del 17[4-((2-azido-1-carboxietil)amino)-N-metilidino-4-oxobutano-1-aminio)-1H-1.2.3-triazol-1-il] estradiol (**L3**)

A una solución de etinilestradiol (144 mg - 0.48 mmol) en *tert*-butanol (6 mL) se le agregó **12** (200 mg - 0.49 mmol), ácido ascórbico (19 mg - 0.096 mmol) y acetato de cobre (38.4 mg - 0.21 mmol) disuelto en agua (4 mL). La reacción se agitó hasta desaparición del material de partida (aproximadamente 6 días) a temperatura ambiente, protegida de la luz y bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  gaseoso. Una vez transcurrida la reacción, se evaporó el disolvente a presión reducida, se acidificó y se extrajo de la fase acuosa con AcOEt (4 x 10 mL) o hasta que por cromatografía en capa fina no se detectó producto de reacción. Las fases orgánicas combinadas se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporaron a presión reducida. Se obtuvo el ligando **L3** como un sólido color amarillo (0.33 g, 128%).

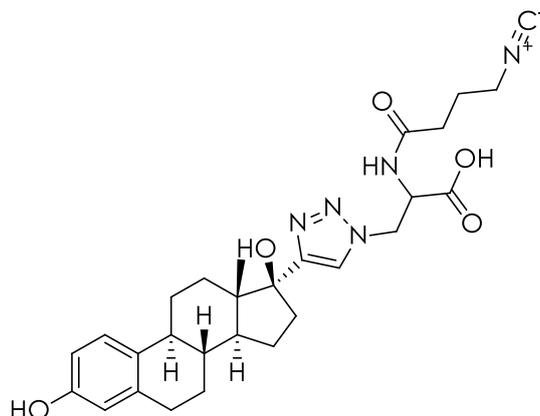


Figura 95: Estructura del ligando **L3**.

## 5.2.2.2. Síntesis de los complejos de $^{99m}\text{Tc}$

### 5.2.2.2.1. Síntesis de **C2**

#### a) Método 1.

A diferentes soluciones de **L2-Boc** en MeOH (200  $\mu\text{L}$ ) se añadieron cantidades variables de TFA. La mezcla de reacción se dejó durante 60 minutos a diferentes temperaturas. Transcurrido el tiempo de reacción, en algunos ensayos se neutralizó el ácido con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  260 mg/mL y NaOH 0.5 M. Para la etapa de marcación, se transfirieron cantidades variables del hidrolizado a un vial de vidrio, se agregó buffer fosfato pH= 11.5 (50  $\mu\text{L}$ ), solución etanólica de  $\text{SnCl}_2$  2 mg/mL, solución de  $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$  (1 – 5 mCi,

1.0 – 1.5 mL) y en algunos ensayos se agregó citrato de sodio 0.1 M (5  $\mu\text{L}$ ). La mezcla de reacción se dejó durante 30 minutos a diferentes temperaturas.

En la tabla 12 se muestran los parámetros que se variaron durante la optimización de la reacción de hidrólisis y marcación.

Etapa	Parámetro	Cantidades/condición ensayadas
Hidrólisis	Masa de <b>L2-Boc</b>	1.0 mg, 2.0 mg
	Volumen TFA	6 $\mu\text{L}$ , 27 $\mu\text{L}$
	Temperatura	Ambiente, 75°C
Marcación	Volumen del hidrolizado	2.0 $\mu\text{L}$ , 100 $\mu\text{L}$ , 200 $\mu\text{L}$
	Volumen $\text{SnCl}_2$	15 $\mu\text{L}$ , 30 $\mu\text{L}$ , 50 $\mu\text{L}$ , 100 $\mu\text{L}$
	Temperatura	Ambiente, 50°C, 100°C

Tabla 12: Parámetros que se variaron durante las etapas de hidrólisis y marcación.

La purificación del crudo de reacción se realizó mediante HPLC. Se ensayaron dos columnas diferentes (Waters C18 de 10  $\mu\text{m}$  300 mm o Phenomenex Luna C18 de 5  $\mu\text{m}$  100A de 250 x 4.6 mm) utilizando como fase móvil un gradiente en donde se varió la concentración de fase móvil orgánica (Solución B: TFA 0.1% en MeCN) en relación a la fase móvil acuosa (Solución A: TFA 0.1% en agua) a flujo 1.0 mL/min.

#### b) Método 2.

A un vial de vidrio se agregó **L2** (18  $\mu\text{L}$  de una solución 1.0 mg/mL en MeOH), buffer fosfato 0.5 M pH=11.5 (50  $\mu\text{L}$ ), citrato de sodio 0.1M (5  $\mu\text{L}$ ),  $\text{SnCl}_2$  (25  $\mu\text{L}$  de una solución 2 mg/mL en EtOH) y la solución de  $^{99m}\text{Tc}[\text{NaTcO}_4]$  (1 – 5 mCi, 1.0 – 1.5 mL). La mezcla de reacción se incubó a diferentes tiempos (15 minutos, 30 minutos) y temperaturas variables (ambiente, 50°C, 100°C).

#### 5.2.2.2.1.1. Determinación de la PRQ de **C2**

La PRQ fue evaluada mediante HPLC y se empleó en cada caso el mismo sistema HPLC utilizado para la purificación del crudo de reacción descrito en el punto 5.2.2.2.1.

#### 5.2.2.2.2. Síntesis de **C3**

##### 5.2.2.2.2.1. Síntesis del precursor de $^{99m}\text{Tc}[\text{Tc(III)}\text{-EDTA}$

En un vial de vidrio se disolvió manitol ( $1.1 \times 10^{-5}$  mol) y EDTA ( $1.4 \times 10^{-5}$  mol) en agua (0.5 mL) en la cual previamente se removió el oxígeno disuelto mediante barboteo con  $\text{N}_2$  gaseoso (Vial A). En un segundo vial se disolvió  $\text{SnCl}_2$  (5.0 mg) en de agua destilada nitrogenada (5.0 mL) (Vial B). Se agregó 0.1 mL del vial B al vial A. Sobre el mismo vial se agregó la solución de  $^{99m}\text{Tc}[\text{NaTcO}_4]$  (5 – 50 mCi, 0.5 – 1.0 mL). Transcurridos 5 minutos se realizó el control de PRQ mediante cromatografía en papel Watman 1 empleando como fase móvil acetona y NaCl 0.9% (ver tabla 13).

FM	Rf coloide	Rf [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-EDTA	Rf $^{99m}\text{TcO}_4^-$
Acetona	0	0	1
NaCl 0.9%	0	1	1

Tabla 13: Sistema de TLC para el control de PRQ del precursor [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-EDTA.

#### 5.2.2.2.2. Reacción de sustitución

En un vial de vidrio se disolvió diferentes cantidades de **L3** (0.2 mg, 1.0 mg) y  $\text{NS}_3(\text{COOH})_3$  (1.0, 2.0, 3.0 mg) en MeOH (200  $\mu\text{L}$ ). Se agregó el precursor [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-EDTA (0.1 mL, 0.2 mL) y se incubó la mezcla de reacción a diferentes temperaturas (70°C, 60°C, temperatura ambiente) durante tiempos variables (15 minutos, 30 minutos).

El seguimiento de la reacción de marcación y la purificación del crudo de reacción se realizó mediante HPLC analítico. Se utilizó una columna Waters C18 de 10  $\mu\text{m}$  300 mm, temperatura ambiente y como fase móvil un gradiente en donde se varió la concentración de fase móvil orgánica (Solución B: TFA 0.1% en MeCN) en relación a la fase móvil acuosa (Solución A: TFA 0.1% en agua) a flujo 1.0 mL/min.

Para los estudios *in vitro* se evaporó el MeCN con corriente de  $\text{N}_2$  gaseoso durante 15 minutos y se formuló con NaCl 0.9%.

#### 5.2.2.2.3. Control de PRQ de **C3**

La PRQ fue evaluada mediante HPLC y se empleó en cada caso el mismo sistema HPLC utilizado para la purificación del crudo de reacción.

#### 5.2.2.3. Estudios *in vitro* de **C3**

##### 5.2.2.3.1. Estudios fisicoquímicos

##### 5.2.2.3.1.1. Estabilidad en el medio de reacción

La estabilidad en medio de reacción se evaluó determinando la variación de la PRQ mediante HPLC analítico hasta 4 horas postmarcado empleando el método descrito en el punto 3.2.2.3.3.

##### 5.2.2.3.1.2. Lipofilicidad

La lipofilicidad se estudió a pH 7.0 a través de la determinación del coeficiente de partición ( $\log P_{o/w}$ ) octanol/buffer fosfato 0.1M. Para ello se mezclaron en un tubo de centrifuga octanol (2 mL) y buffer fosfato 0.1M pH=7.0 (1.9 mL). Se agregó el complejo (100  $\mu\text{L}$ ), la mezcla se agitó en vortex durante 2 minutos y se centrifugó a temperatura ambiente por 5 minutos a una velocidad de 5000 rpm. Luego de la separación de ambas fases, se tomaron 2 muestras (100  $\mu\text{L}$ ) de cada fase y se midió la actividad de cada una de ellas en contador de centelleo sólido. La lipofilicidad se calculó como:

$$\text{Log } P_{o/w} = \log_{10} \left( \frac{\text{actividad en fase octanol}}{\text{actividad en fase acuosa}} \right)$$

#### 5.2.2.2.3.1.3. Estabilidad en plasma

Se incubó el complejo (100  $\mu\text{L}$ ) en plasma humano (1000  $\mu\text{L}$ ) a 37° C y se tomaron muestras (200  $\mu\text{L}$ ) a diferentes tiempos: 1 hora, 2 horas, 3 horas y 4 horas. Una vez extraída la muestra, se precipitaron las proteínas con EtOH absoluto frío (200  $\mu\text{l}$ , -15°C), se agitó en vortex y se colocó en el freezer durante 5 minutos. Se centrifugaron las muestras a 100 g y 0°C durante 5 minutos. Finalmente se controló la PRQ del sobrenadante mediante HPLC analítico utilizando las condiciones descritas en 3.2.2.2.3.3.

#### 5.2.2.2.3.1.4. Unión a proteínas plasmáticas (UPP)

Se emplearon columnas de exclusión molecular Microspin G50, las cuales fueron previamente centrifugadas a 4000 rpm y a temperatura ambiente durante 2 minutos, con la finalidad de extraer el buffer de conservación.

En un baño de agua a 37°C se incubaron un blanco (475  $\mu\text{L}$  de agua destilada + 25  $\mu\text{L}$  del complejo) y una muestra (475  $\mu\text{L}$  de plasma + 25  $\mu\text{L}$  del complejo). Transcurridos 30 y 60 minutos, se tomaron muestras del complejo (25  $\mu\text{L}$ ) o blanco (25  $\mu\text{L}$ ) y se sembraron en las columnas, se centrifugó durante 1 minuto a 716 g a temperatura ambiente y se colectaron los respectivos eluidos. Se midió la actividad libre y retenida en la columna en un contador de centelleo sólido. La unión a proteínas plasmáticas se calculó como:

$$\text{UPP} = \text{UPP muestra} - \text{UPP blanco.}$$

$$\text{UPP muestra} = \left( \frac{\text{actividad retenida muestra}}{\text{actividad libre muestra} + \text{actividad retenida muestra}} \right) \times 100$$

$$\text{UPP blanco} = \left( \frac{\text{actividad retenida blanco}}{\text{actividad libre blanco} + \text{actividad retenida blanco}} \right) \times 100$$

#### 5.2.2.2.3.2. Estudios en células MCF-7

Se reprodujo el método descrito en el punto 4.2.2.3.1 y 4.2.2.3.2.



Se comenzó asignando los protones aromáticos. De tablas espectroscópicas para elucidación estructural es sabido que su rango de desplazamiento es de 6.50 a 8.00 ppm. Como se observa en la figura 98, son tres los protones aromáticos  $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_2$  y  $\text{H}_3$ .

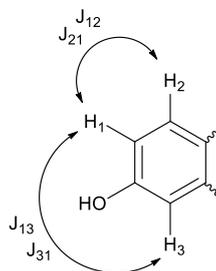


Figura 98: Protones aromáticos del etinilestradiol.

Los valores de las  $J$  calculados permitieron asignar a cada señal su correspondiente protón y además  $\text{H}_1$  fue identificado fácilmente al ser el único doblete de doblete presente (acopla a la vez con dos protones distintos).  $\text{H}_1$  acopla con  $\text{H}_2$  con un valor de  $J$  grande,  $J_{12} = 8,4$  (acoplamiento orto), mismo valor con el que  $\text{H}_2$  acopla con  $\text{H}_1$ ,  $J_{21} = 8,4$ . Por otro lado,  $\text{H}_1$  acopla con  $\text{H}_3$  con un valor de  $J$  mediano,  $J_{13} = 2,7$  (acoplamiento meta), del mismo modo  $\text{H}_3$  acopla con  $\text{H}_1$  con igual  $J$ ,  $J_{31} = 2,7$ . El protón  $\text{H}_2$  aparece a 7.10 ppm como un doblete,  $\text{H}_1$  a 6.53 ppm como un doblete de doblete y  $\text{H}_3$  a 6.49 ppm como otro doblete.

Los protones del grupo metilo,  $\text{H}_{19}$ ,  $\text{H}_{20}$  y  $\text{H}_{21}$ , aparecen como un singulete con el menor desplazamiento químico, 0.88 ppm, como es de esperar para protones metílicos del tipo  $\text{CH}_3\text{-C}$ . Por otro lado, el protón correspondiente al grupo alquino terminal se observa como un singulete a 2.90 ppm. Por último, también fue posible asignar  $\text{H}_4$  y  $\text{H}_5$  a sus correspondientes señales. Mediante cálculos de tablas, el desplazamiento teórico de los mismos es 2.74 ppm, por lo que se asumió corresponden a la señal multiplete a 2.79 ppm. En la figura 99 se muestra el espectro HSQC que permitió asignar a los carbonos unidos a los protones asignados anteriormente.

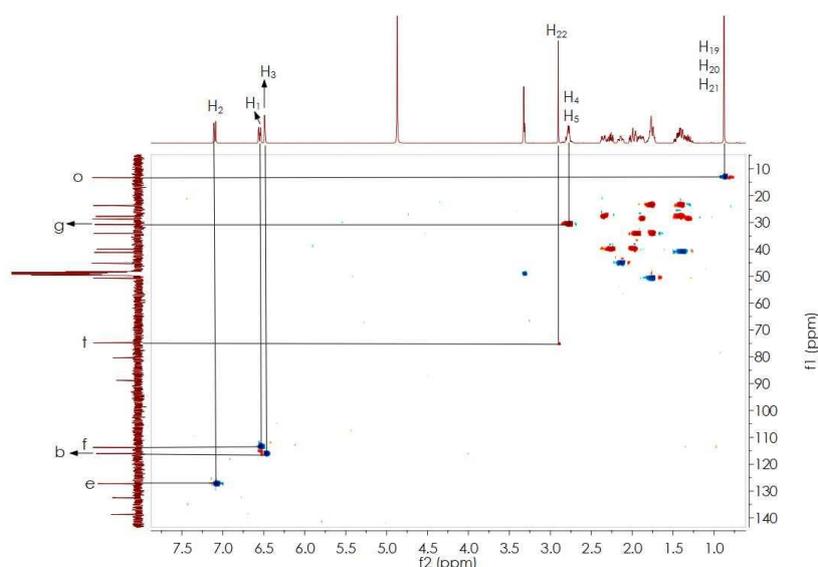


Figura 99: Espectro HSQC del etinilestradiol. Se muestra la asignación de los carbonos  $\text{Ce}$ ,  $\text{Cb}$ ,  $\text{Cf}$ ,  $\text{Ct}$ ,  $\text{Cg}$  y  $\text{Co}$ .

En la figura 100 se muestra el espectro correspondiente al experimento COSY.

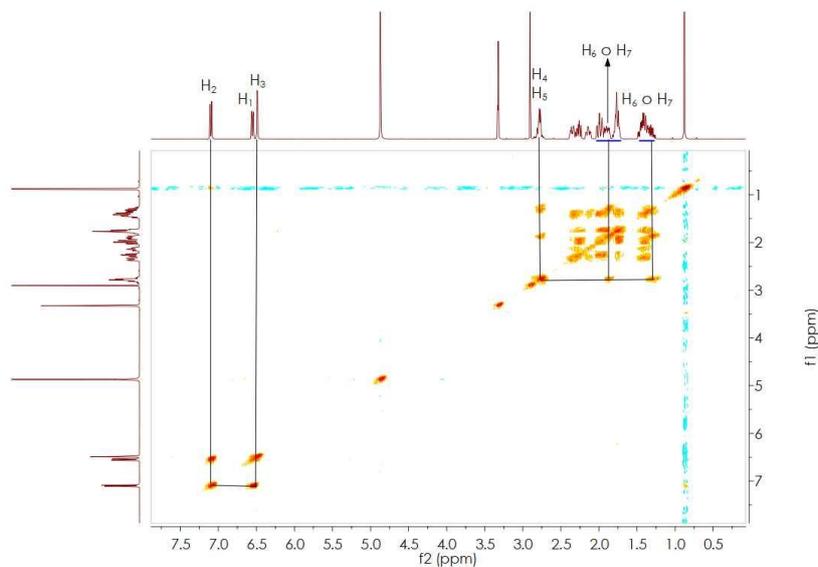


Figura 100: Espectro COSY del etinilestradiol. Se muestran los acoplamientos vecinales entre los protones aromáticos y los protones H<sub>4</sub> H<sub>5</sub>.

Se puede observar el acoplamiento entre H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> así como también el acoplamiento de H<sub>4</sub> y H<sub>5</sub> con sus protones vecinos H<sub>6</sub> y H<sub>7</sub>. No fue posible discernir cual señal corresponde a H<sub>6</sub> y cual a H<sub>7</sub>. Es importante aclarar que la hipótesis de la señal de H<sub>4</sub> y H<sub>5</sub> asignada a 2.79 ppm fue posteriormente confirmada con el espectro HMBC.

En la figura 101 se muestra el espectro correspondiente al experimento HMBC, en donde se muestra el acoplamiento de los protones aromáticos con los carbonos ubicado a dos o tres enlaces de distancia de dichos protones.

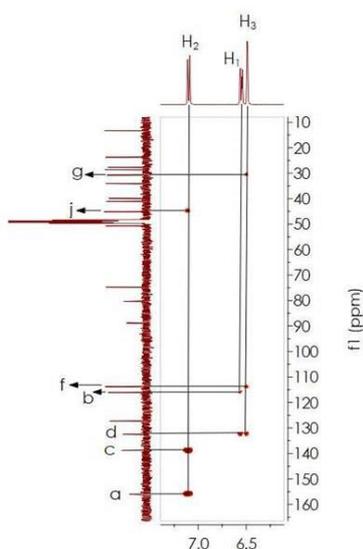


Figura 101: Zona de acoplamiento de protones aromáticos del espectro correspondiente al experimento HMBC del etinilestradiol.

Los carbonos aromáticos presentan un rango de desplazamiento entre 110.00 a 175.00 ppm. El etinilestradiol presenta seis carbonos aromáticos, los cuales integran al anillo

fenol. De dichos carbonos, el más desblindado y por lo tanto con mayor desplazamiento químico corresponde al carbono unido al grupo alcohol, Ca. H<sub>2</sub> acopla a 3 enlaces de distancia con Ca y Cc, siendo Ca el de mayor desplazamiento a 155.94 ppm y Cc a 138.79 ppm. Se puede observar que H<sub>1</sub> y H<sub>3</sub> presentan acoplamiento con un mismo carbono, el mismo corresponde a Cd a 132.47 ppm. Por lo tanto, el restante acople en la zona de carbono sp<sup>2</sup> de H<sub>1</sub> corresponde a Cb y el restante de H<sub>3</sub> corresponde a Cf. Se presentan dos últimos acoples entre H<sub>2</sub> y H<sub>3</sub> en la zona de carbonos sp<sup>3</sup>-C; H<sub>2</sub> acopla a tres enlaces de distancia con Cj y H<sub>3</sub> con Cg.

En la figura 102 se muestra el espectro HMBC que muestra los acoples de los protones correspondientes al grupo metilo.

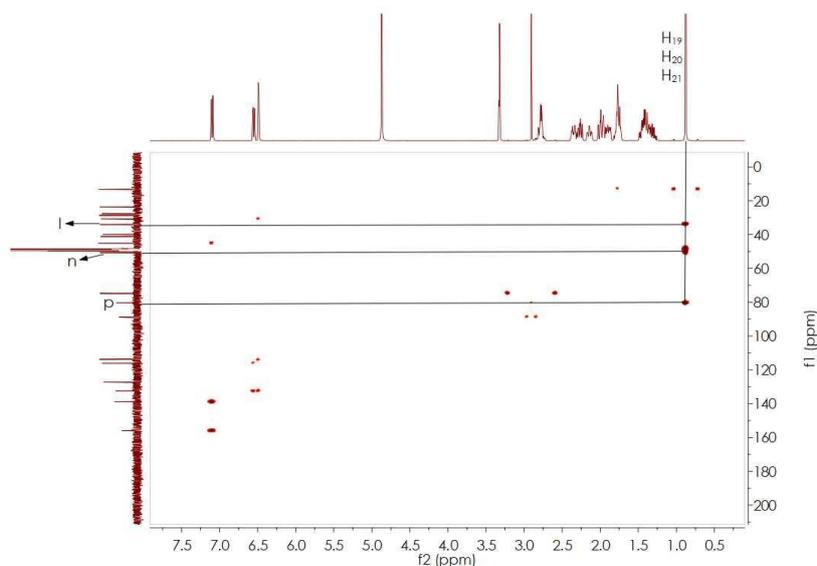


Figura 102: Espectro correspondiente al experimento HMBC del etinilestradiol, se indican los acoplamientos de los protones correspondientes al grupo metilo CH<sub>3</sub>.

Los protones H<sub>19</sub>, H<sub>20</sub> y H<sub>21</sub> del grupo metilo acoplan con un carbono que se encuentra en la zona de Csp<sup>2</sup>-heteroátomo, por lo que dicho carbono corresponde a Cp. Los restantes dos carbonos se encuentran en la zona de Csp<sup>2</sup>-C y podrían corresponder a Ci o Cl. El experimento HSQC muestra que el carbono a 50.73 ppm presenta acoplamiento con un solo protón, mientras que el carbono a 34.05 ppm presenta acoplamiento con dos protones. Por lo tanto Cn corresponde al carbono a 50.73 ppm y Cl al carbono a 34.05 ppm. Con los carbonos y protones anteriormente mencionados, se logró asignar los faltantes trabajando en conjunto con los espectros correspondientes al experimento HSQC y HMBC (ver figura 103, 104, 105 y 106) y así concluir el análisis de las señales espectroscópicas correspondientes al etinilestradiol.

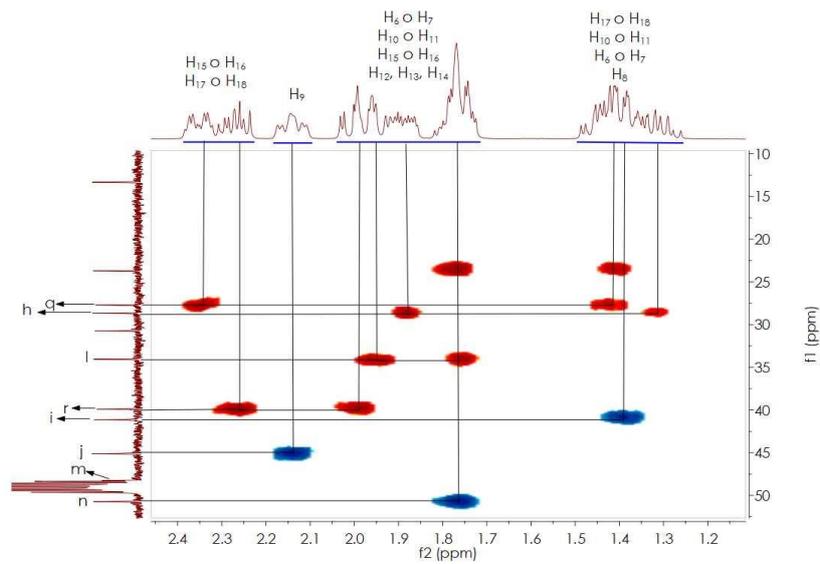


Figura 103: Espectro correspondiente al experimento HSQC del etinilestradiol.

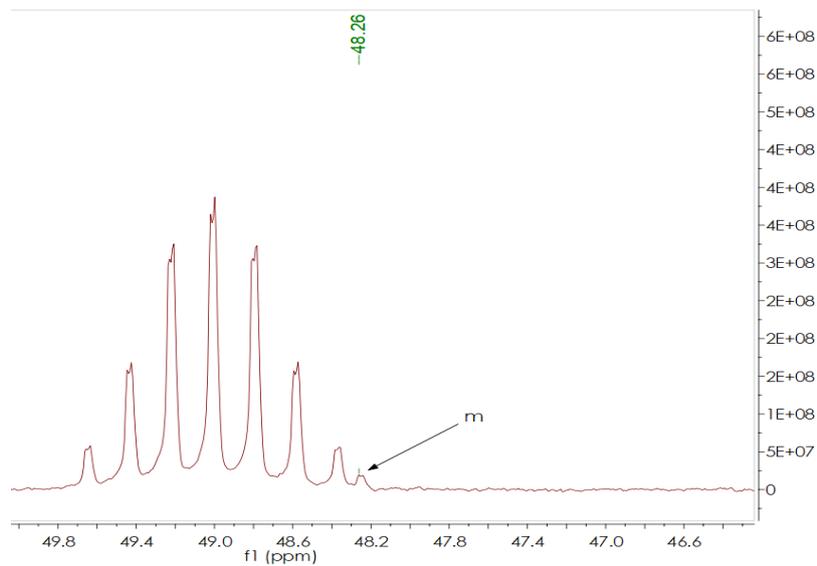


Figura 104: Zona del espectro correspondiente al experimento HSQC del etinilestradiol en donde se muestra la señal del carbono Cm (carbono cuaternario).

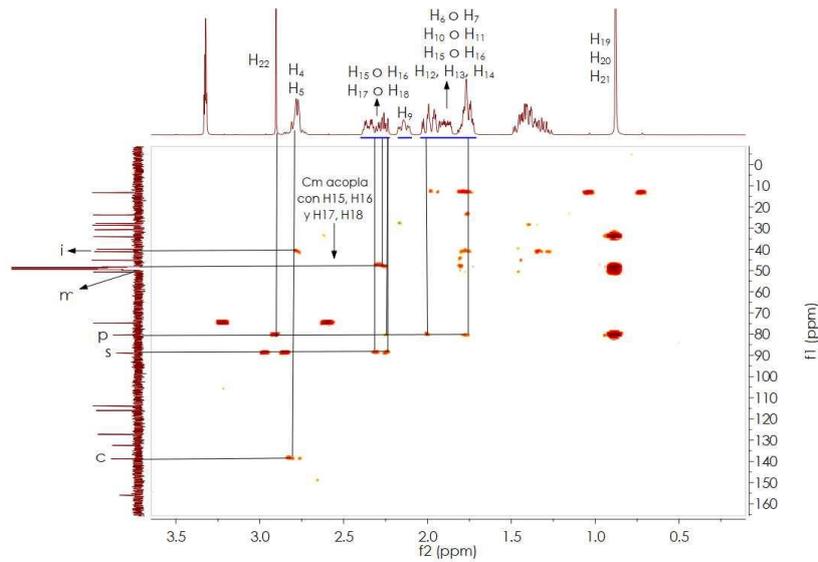


Figura 105: Espectro correspondiente al experimento HMBC del etinilestradiol. Se muestran los acoplamientos que confirman la asignación a protones y carbonos.

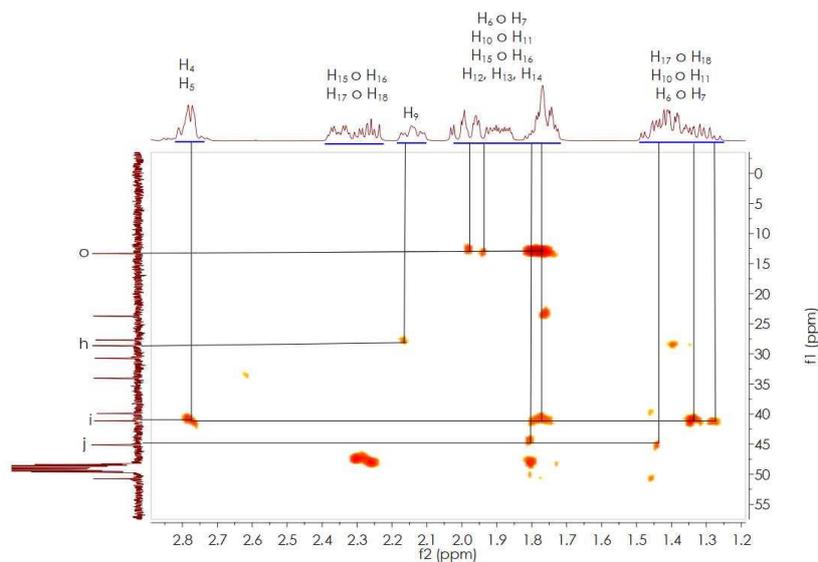
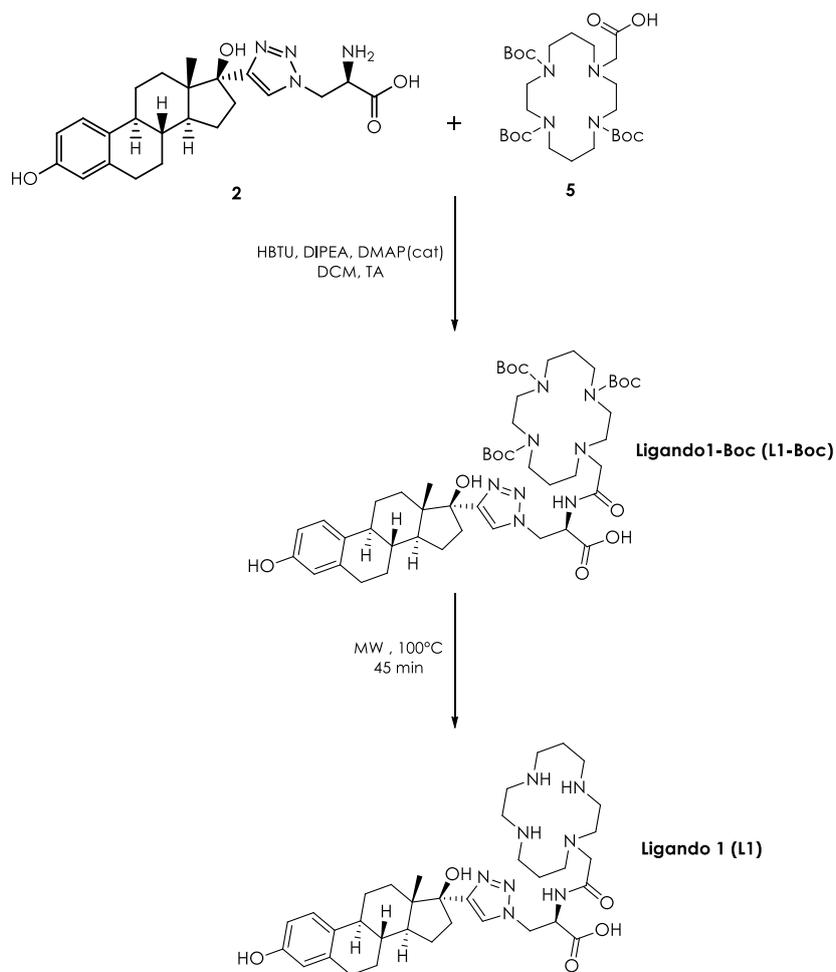


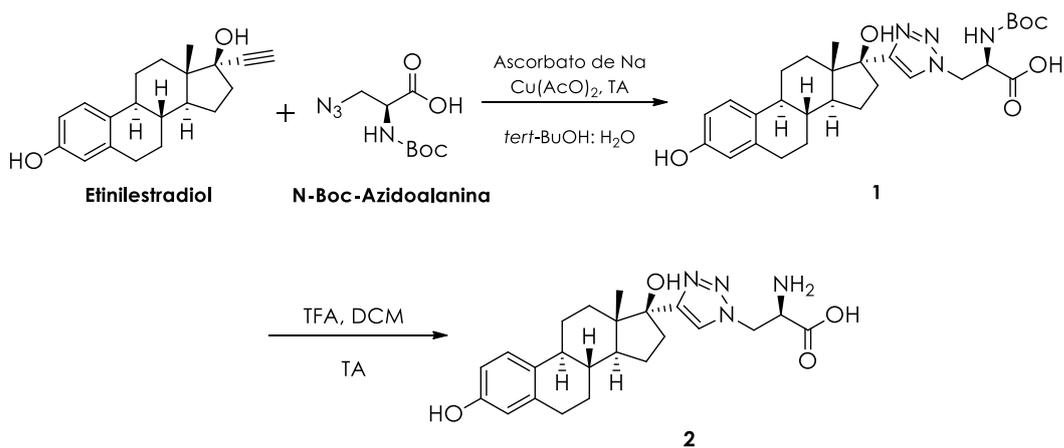
Figura 106: Espectro correspondiente al experimento HMBC del etinilestradiol. Se muestran los acoplamientos que confirman la asignación a protones y carbonos.

La secuencia sintética que se propuso para la síntesis de **L1** se muestra en el esquema 4.



Esquema 4: Secuencia sintética de **L1**.

En primer lugar se procedió a obtener **2** y **5**. La síntesis de **2** se llevó a cabo según una metodología sintética en dos pasos reportada por Tejería *et al.* [86] (ver esquema 5).



Esquema 5: Secuencia de la síntesis de **2**.

El primer paso de síntesis se efectuó mediante una cicloadición [3+2] de Huisgen, catalizada por Cu (I) que se genera *in situ* por reducción del Cu (II) en presencia de ascorbato de sodio. Dicha reacción ocurre entre el grupo funcional etinil del

etinilestradiol y azida de la N-Boc-Azidoalanina (Boc= *t*-Butiloxicarbonilo), para dar lugar a **1** quien contiene en su estructura un anillo de triazol 1.4-disustituído. Esta reacción es la más representativa y aplicada del concepto *Click Chemistry*, que involucra a un conjunto de reacciones rápidas, simples de usar, sencillas de purificar, versátiles, regioespecíficas y con altos rendimientos de reacción. Fue descrita por primera vez por Huisgen en 1960 y constituye la ruta más eficiente para sintetizar 1.2.3-triazoles [162]. La química *click* ha generado un gran interés en muchos campos de la investigación y ha sido utilizada en la microelectrónica, marcación de virus y hasta en tratamientos del cáncer. En el marco del presente trabajo, la aplicación de la misma es de bioconjugación. Los triazoles 1.2.3 son un *linker* ideal. Son extremadamente solubles en agua, haciendo que la administración *in vivo* sea más fácil. De hecho, sus propiedades electrónicas son muy similares a los enlaces amida, sin embargo no está sujeto a las mismas reacciones de hidrólisis. También son estables en las típicas condiciones biológicas, que tienden a ser de naturaleza acuosa y ligeramente reductora. Otra propiedad ventajosa es que son extremadamente rígidos, lo que asegura que las dos partes enlazadas no interaccionan entre sí. Si el *linker* fuera flexible ambas partes podrían fácilmente agregarse y/o reaccionar entre sí. Además, el hecho de que las azidas y los alquinos son relativamente poco reactivos a la mayoría de los grupos funcionales hace que la reacción *click* sea muy deseada; esto asegura que la bioconjugación ocurra sólo en las ubicaciones deseadas [163].

**1** se obtuvo con un rendimiento mayor al 100% debido a que no se purificó el crudo de reacción una vez finalizada la reacción, la presencia de sales hizo que el rendimiento haya sido del 128%. La caracterización estructural de **1** se realizó mediante espectroscopía de masas (MS) y  $^1\text{H}$ -RMN. En la figura 107 se muestra el espectro de masa obtenido mediante ESI-EM en modo negativo. De los resultados obtenidos se apreció una relación  $m/z$  de 525 que corresponde al  $[\text{M}-\text{H}]^-$ . Además, se pudo identificar un fragmento de  $m/z= 427$  que podría corresponder a la pérdida del grupo protector Boc.

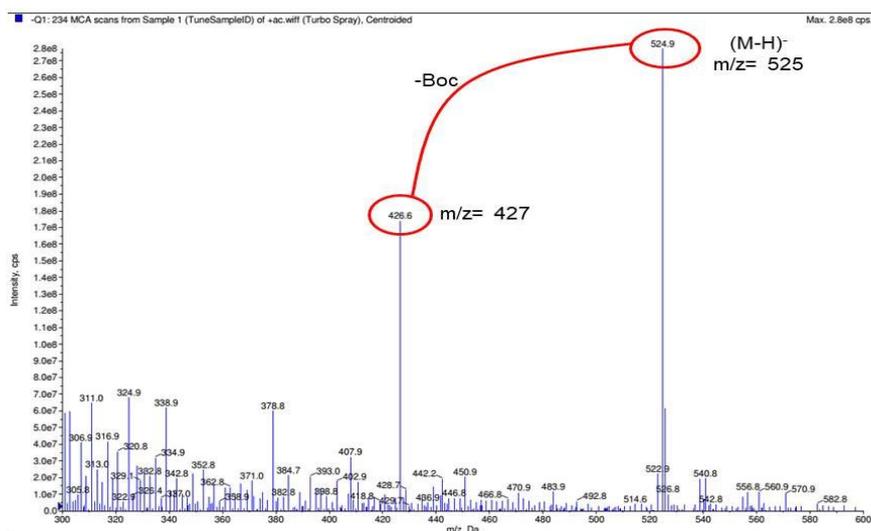


Figura 107: Espectro de masa de **1**.

En la figura 108 se muestra el espectro  $^1\text{H}$ -RMN de **1** en  $\text{CD}_3\text{OD}$ . La señal que se tomó como referencia para la integración fue el singulete correspondiente a  $\text{H}_{14}$  a  $\delta= 7.79$  ppm. Es importante destacar que  $\text{H}_{14}$  es el protón característico de este tipo de

reacciones, ya que corresponde a la señal del nuevo enlace C-C formado, permitiendo confirmar que la reacción efectivamente tuvo lugar y el anillo de triazol fue formado. Además presenta la ventaja de tener un gran desplazamiento químico, por lo que normalmente es una señal fácil de distinguir. Se identifican únicamente los protones relevantes, los cuales son H<sub>14</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>1</sub>, H<sub>15</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>16</sub>, H<sub>17</sub> y H<sub>18</sub>. En la figura 109 se observa el espectro COSY que muestra los acoplamientos vecinales correspondientes. Se puede observar que H<sub>14</sub> no presenta acoplamiento, lo que concuerda con lo esperado. Los restantes protones metílicos (C-CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-Ar) y metilénicos (C-CH<sub>2</sub>-C) de la estructura se encuentran a  $\delta$  menores, comprendidos entre 1.00 y 3.30 ppm.

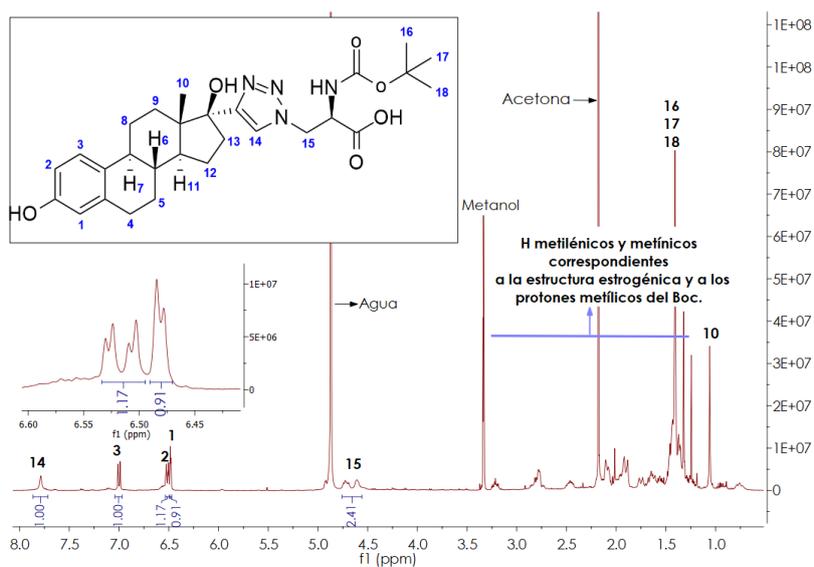


Figura 108: Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de **1** obtenido en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

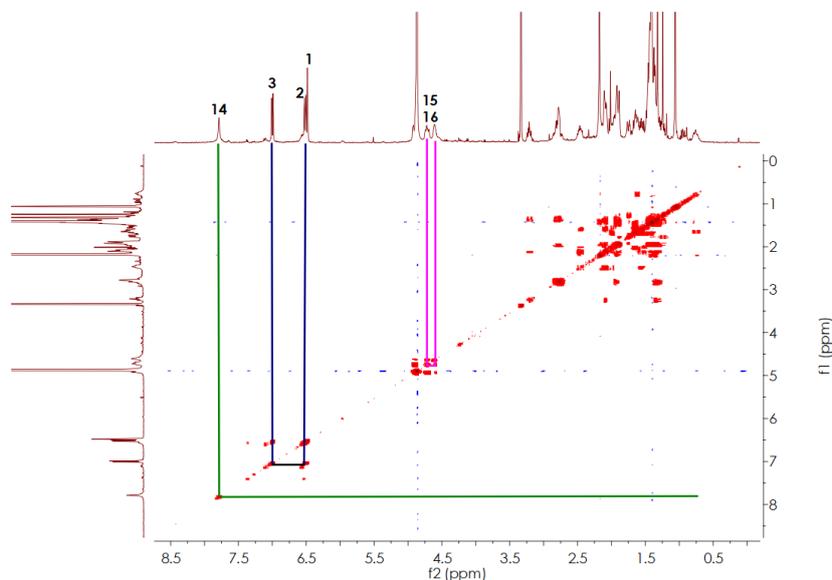
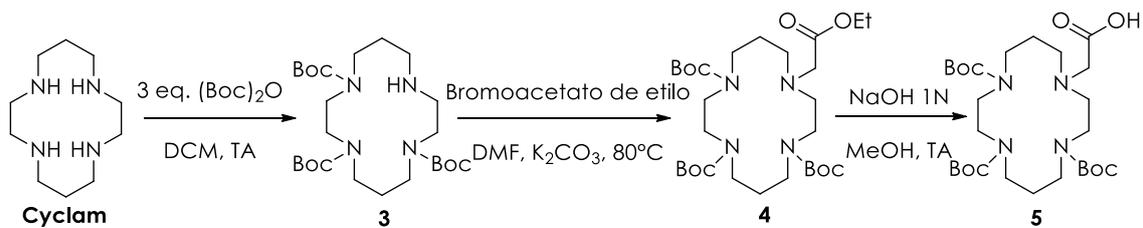


Figura 109: Espectro bidimensional COSY de **1**.

Una vez obtenido **2**, se continuó con la síntesis de **5** según una metodología sintética reportada por Yang *et al.* y Zhang *et al.* (ver esquema 6) [164, 165].



Esquema 6: Secuencia síntesis de **5**.

En primer lugar se realizó la protección con Boc de tres de los cuatro grupos aminos presentes en la estructura cyclam, mediante una reacción de  $\text{S}_{\text{N}}2$ . Los átomos de N con sus pares de electrones libres actúan como nucleófilos, atacando la posición electrofílica del dicarbonato de di-*t*-butilo, la cual corresponde al átomo de C de alguno de los dos grupos carbonilos presentes en la estructura (ver figura 110).

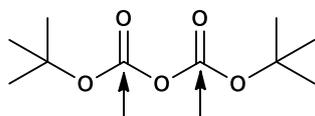


Figura 110: Estructura del dicarbonato de di-*t*-butilo. Se indican las posiciones electrofílicas.

Se logró proteger a tres de los cuatros grupos aminos presentes controlando la cantidad de equivalentes de dicarbonato de di-*t*-butilo agregados, se añadieron 3 equivalentes por cada equivalente de cyclam. Seguidamente se incorporó una molécula de acetato de etilo mediante  $\text{S}_{\text{N}}2$  que dio lugar a **4**. Seguidamente se llevó a cabo la hidrólisis básica para generar el ácido carboxílico en **5** necesario para el acople con **2**.

Se realizó la caracterización de cada compuesto mediante  $^1\text{H}$ -RMN y COSY. En la figura 111 se muestra el espectro  $^1\text{H}$ -RMN obtenido para **3** en  $\text{CDCl}_3$ . Es importante mencionar que los protones fueron asignados teniendo en cuenta los análisis realizados previamente por Teixeira del grupo de investigación de Zhang *et al.* [166]. Los protones de los metilos del grupo protector Boc se pueden ver claramente en una señal con desplazamiento característico a 1.45 ppm, la cual se integró como 27 protones (referencia). Los siguientes protones en aparecer corresponden a los C- $\text{CH}_2$ -C (protones metilénicos) siendo en cada caso, los dos pares de protones equivalentes:  $\text{H}_3$  y  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_{13}$  y  $\text{H}_{14}$ . Estos dos pares de protones están unidos de forma simétrica (a dos enlaces de distancia) a dos heteroátomos de N de aminas terciarias.  $\text{H}_{13}$  y  $\text{H}_{14}$  se encuentran más desblindados por lo que su desplazamiento en ppm es mayor. Los grupos Boc ( $\text{C}=\text{O}-\text{O}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ) son por efecto tanto inductivo como resonante electrón atrayentes,  $\text{H}_3$  y  $\text{H}_4$  sienten dicho efecto de un solo grupo Boc, mientras que  $\text{H}_{13}$  y  $\text{H}_{14}$  sienten el efecto de dos grupos Boc, lo que hace se encuentren más desblindados y su desplazamiento sea mayor. La señal para  $\text{H}_3$  y  $\text{H}_4$  se encuentra a 1.67 - 1.74 ppm y la de  $\text{H}_{13}$  y  $\text{H}_{14}$  a 1.86 - 1.93 ppm, ambas integran 2 protones. Esta asignación fue confirmada en el espectro COSY (Figura 110). A estos protones le continúan en desplazamiento los  $\text{CH}_2-\text{NR}_2$ :  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_7$ ,  $\text{H}_8$ ,  $\text{H}_9$ ,  $\text{H}_{10}$ ,  $\text{H}_{11}$ ,  $\text{H}_{12}$ ,  $\text{H}_{15}$ ,  $\text{H}_{16}$ ,  $\text{H}_{17}$ ,  $\text{H}_{18}$ ,  $\text{H}_{19}$ ,  $\text{H}_{20}$ ,  $\text{H}_1$  y  $\text{H}_2$ . Dentro de este grupo de protones, los más blindados son los que se encuentran unidos al carbono unido al heteroátomo de N de la amina secundaria:  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_7$  y  $\text{H}_8$ . El espectro COSY (figura 112) permitió confirmar dicha asignación. Los restantes protones se encuentran unidos a un carbono que está unido a un heteroátomo de N de una

amina terciaria, la cual tiene entre sus sustituyentes un grupo éster que resulta ser electrón atrayente, lo que hace que los protones se encuentren más desblindados y por lo tanto a desplazamientos mayores. De los protones H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub> y H<sub>8</sub> los más desblindados son: H<sub>7</sub> y H<sub>8</sub> dado que se encuentran a dos enlaces de distancia (en comparación a H<sub>5</sub> y H<sub>6</sub> que se encuentran a tres enlaces de distancia) del grupo protector Boc electrón atrayente unido al heteroátomo de N de la amina. H<sub>7</sub> y H<sub>8</sub> se observan a 2.77 ppm mientras que H<sub>5</sub> y H<sub>6</sub> a 2.57 - 2.64 ppm. De acuerdo a la simetría de la molécula los protones H<sub>19</sub>, H<sub>20</sub>, H<sub>17</sub> y H<sub>18</sub> serían equivalentes entre sí, así como también los protones H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>15</sub>, H<sub>16</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub>. Todos ellos son protones unidos a carbono unido a un heteroátomo de N que tiene entre los sustituyentes un grupo protector Boc, por lo que en el espectro se observa una única señal que corresponde a un multiplete con desplazamiento 3.20 - 3.49 ppm y que integra 12 protones.

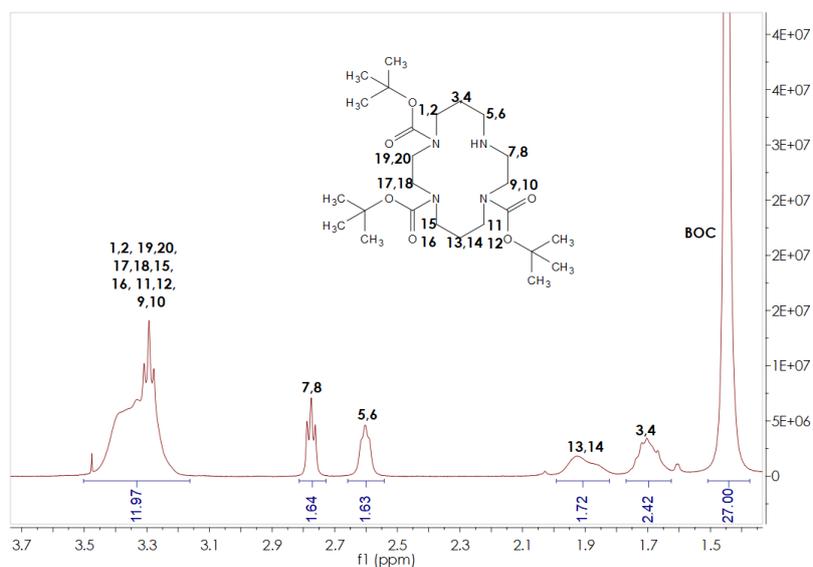


Figura 111: Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de **3**.

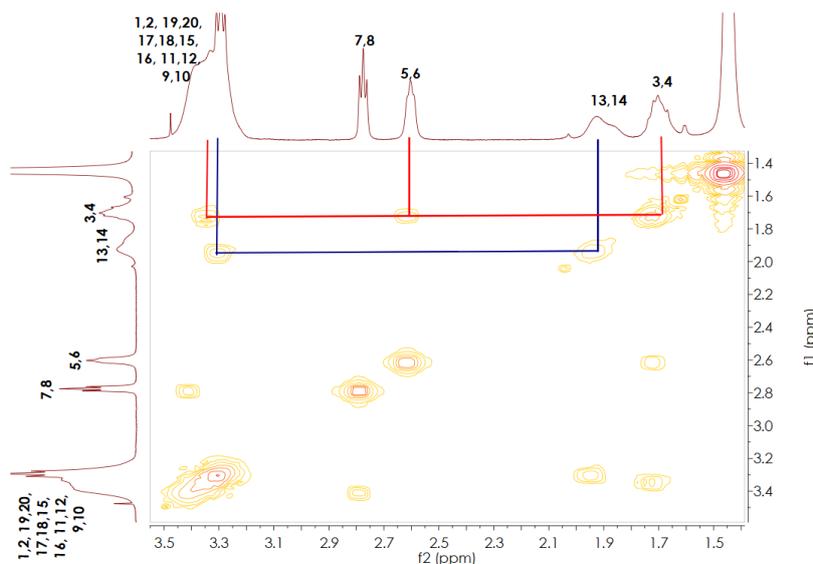


Figura 112: Experimento COSY de **3**. Se observa el acoplamiento vecinal esperado para cada grupo de protones: H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub>, H<sub>13</sub> y H<sub>14</sub>.

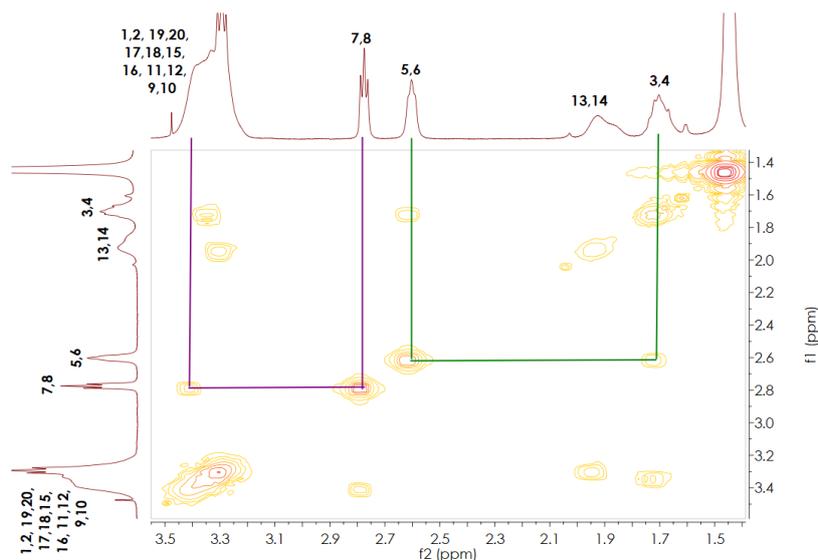


Figura 113: Experimento COSY de **3**. Se observa el acoplamiento vecinal esperado para H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>5</sub> y H<sub>6</sub>.

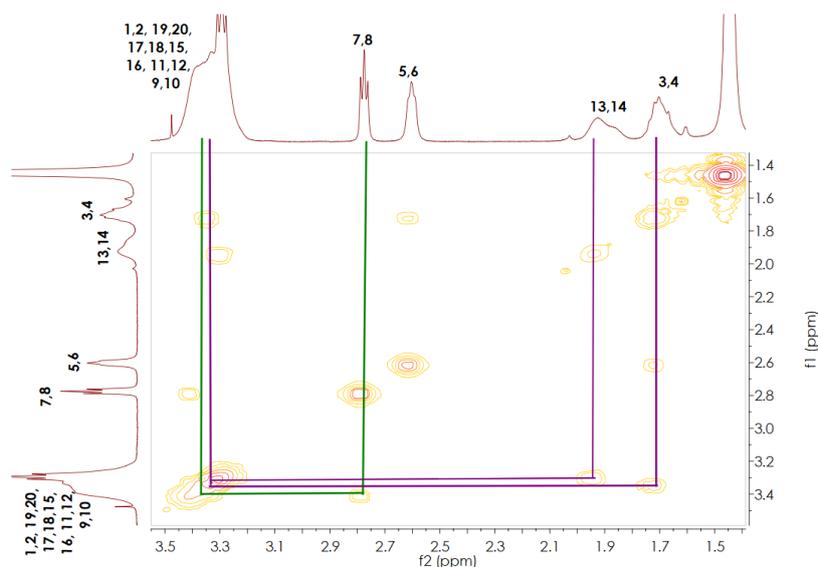


Figura 114: Experimento COSY de **3**. Se muestra el recíproco de la figura 110 y 111.

El siguiente paso de síntesis consistió en la obtención de **4** a partir de **3** mediante una reacción de S<sub>N</sub>2, en donde ocurre el ataque nucleofílico de la amina secundaria al carbono electrofílico del bromoacetato de etilo, siendo el átomo de bromo el grupo que actúa como saliente. Se realizó la caracterización del producto obtenido mediante <sup>1</sup>H-RMN y COSY. En la figura 115 se muestra el espectro obtenido para **4** en CDCl<sub>3</sub>. Se observa un corrimiento en el desplazamiento de las señales que también están presentes en **3**, lo que demostró un cambio estructural en **3**. A las señales ya existentes en el espectro de **3** se suman las correspondientes a la estructura acetato de etilo. Una vez finalizada la reacción de síntesis, el producto obtenido se purificó por columna utilizando como fase móvil Hex: AcOEt (7:3). Los protones metílicos, H<sub>25</sub>-H<sub>26</sub>-H<sub>27</sub> aparecen como un triplete a δ= 1.25 ppm que integra un total de 5 protones. Los protones metilénicos H<sub>23</sub> y H<sub>24</sub> aparecen como un multiplete a δ= 4.16 – 4.09 ppm que integra un total de 3 protones. La señal correspondiente a los protones metilénicos

$\text{CH}_2\text{-C=O}$ ,  $\text{H}_{21}\text{-H}_{22}$ , salen junto con el multiplete que incluye a los protones  $\text{CH}_2\text{-NR}_2$  del resto de la molécula. Las señales mencionadas deberían integrar 3 y 2 protones respectivamente. Sin embargo integra 5 y 3 protones debido a la presencia de AcOEt ( $\text{CH}_2\text{-C=O}$ : s,  $\delta$ = 2.05 ppm;  $\text{CH}_2\text{-C}$ : q,  $\delta$ = 4.12 ppm;  $\text{CH}_3\text{-C}$ : t,  $\delta$ = 1.26 ppm) residual que se utilizó para preparar la fase móvil de la columna cromatográfica en la purificación del producto.

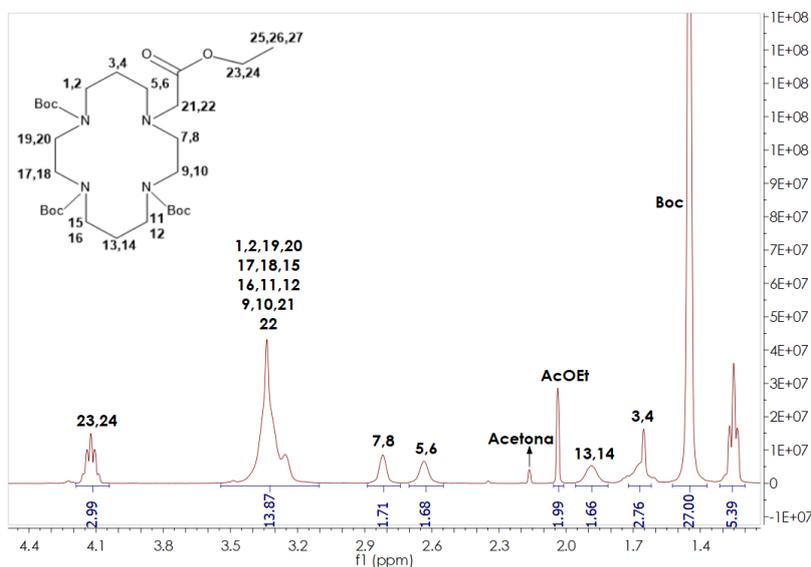


Figura 115: Espectro  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CDCl}_3$  de **4**.

En la última etapa de síntesis, que permitió obtener a **5**, se realizó la hidrólisis básica del grupo acetilo para generar el grupo ácido carboxílico. En la figura 116 se muestra el espectro  $^1\text{H}$ -RMN obtenido para **5** en  $\text{CDCl}_3$ .

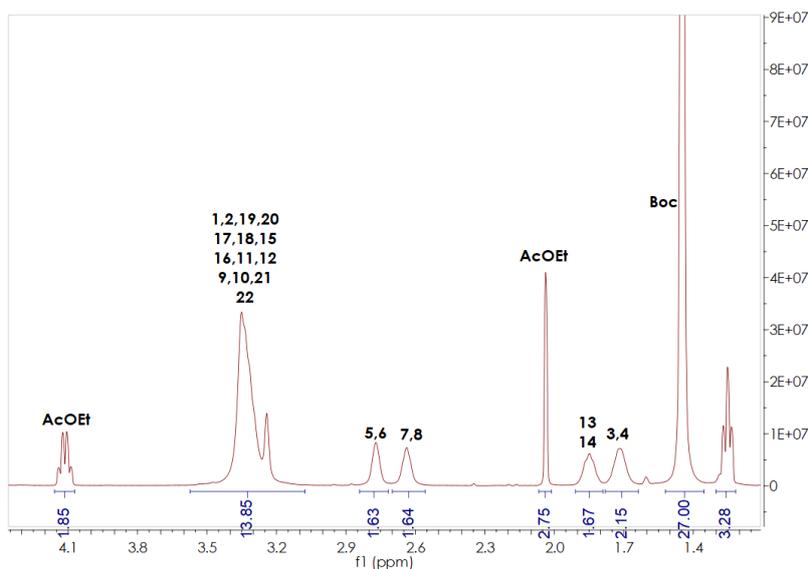


Figura 116: Espectro  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CDCl}_3$  de **5**.

En el momento que se procedió a realizar la reacción de acoplamiento entre **2** y **5** se planteó el inconveniente de dos posibles reacciones secundarias, no previstas previamente:

1. Ataque del grupo amino de **5** al grupo carbonilo del ácido carboxílico de otra molécula de **5** generando un enlace amida, lo que daría lugar a la formación de la impureza A.

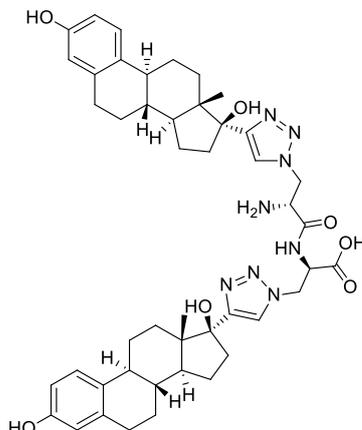


Figura 117: Estructura de la impureza A.

2. Formación de un enlace éster a partir del grupo fenol y el grupo carbonilo presentes en **2** que daría lugar a la impureza B.

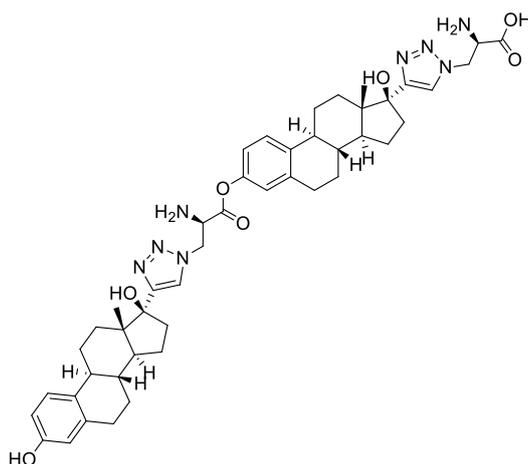


Figura 118: Estructura de la impureza B.

Para evitar la posible formación de las impurezas A y B, se planteó realizar la protección de los grupos ácido carboxílico y fenol de **2** con t-butilo, mediante la formación del éster de t-butilo y t-butoxibencilo respectivamente. Con tal fin se sintetizó **6**. La reacción de protección que se planteó correspondió a una reacción de sustitución nucleofílica de tipo unimolecular ( $\text{S}_{\text{N}}1$ ), donde el anión carboxilato y fenolato atacan al carbocatión terciario formado a partir de **6** para dar lugar a **7** (ver figura 119).

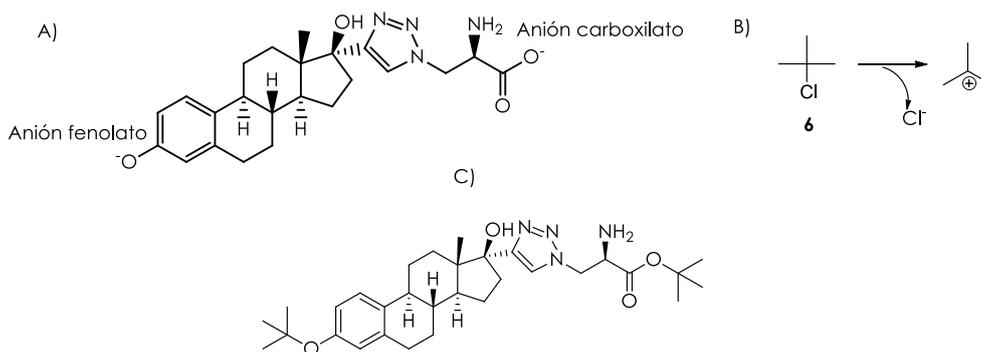


Figura 119: A) Aniones carboxilato y fenolato en la estructura de **7**. B) Formación del carbocatión terciario a partir de **6**. C) Estructura de **7**.

Se realizó la reacción de protección a temperatura ambiente y a 50°C, sin embargo, el producto obtenido no pudo ser confirmado mediante técnicas espectroscópicas. Las señales obtenidas en los espectros  $^1\text{H}$ -RMN no se correspondieron a las esperadas para el producto. En algunos casos la señal de  $\text{H}_{14}$  desapareció indicando que posiblemente ocurrió la descomposición de **2** bajo las condiciones de reacción utilizadas. Por tales razones no fue posible confirmar la obtención de **7**.

Se diseñó una segunda estrategia de síntesis que consistió en proteger el grupo ácido carboxílico de la N-Boc-Azidoalanina, mediante la formación de un éster de etilo, dando lugar a **8** (ver figura 120), para luego realizar la "cicloadición 3+2".

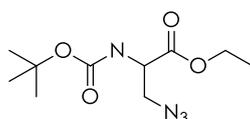


Figura 120: Estructura de **8** conteniendo al grupo éster de etilo (grupo protector del ácido carboxílico).

Para la reacción de esterificación se activó al ácido carboxílico de la N-Boc-Azidoalanina (ver figura 121). Se utilizó cloruro de tionilo con el fin de formar el cloruro de ácido correspondiente, especie más reactiva para sufrir el ataque del átomo de oxígeno del EtOH debido a que el ión  $\text{Cl}^-$  es mejor grupo saliente que el  $\text{OH}^-$ , favoreciendo la reacción de  $\text{S}_{\text{N}}2$ .

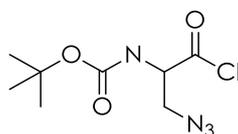


Figura 121: Estructura del cloruro de ácido, especie activada para la reacción de  $\text{S}_{\text{N}}1$ .

El producto obtenido no pudo ser dilucidado mediante análisis espectroscópico  $^1\text{H}$ -RMN. En el correspondiente espectro no se observó la señal correspondiente a los protones  $\text{CH}_2\text{-O}$  del grupo éster, por lo cual no se logró demostrar la síntesis de **8**.

### 5.3.1.2. Síntesis de **L2**

Debido a que no fue posible la síntesis de **L1**, se realizó un nuevo diseño de síntesis que derivó a un cambio en la estructura del ligando dando lugar al ligando 2, **L2**.

Para su síntesis se utilizó 1-Amino-11-azido-3.6.9-trioxodecano (ver figura 122), reactivo que contiene los grupos funcionales: azida y amino. El grupo azida permitió realizar la reacción de "cicloadición 3+2" con el grupo etinilo del etinilestradiol, mientras que el grupo amino posibilitó el acople a **5** mediante la formación de un enlace amida.

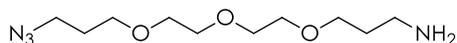
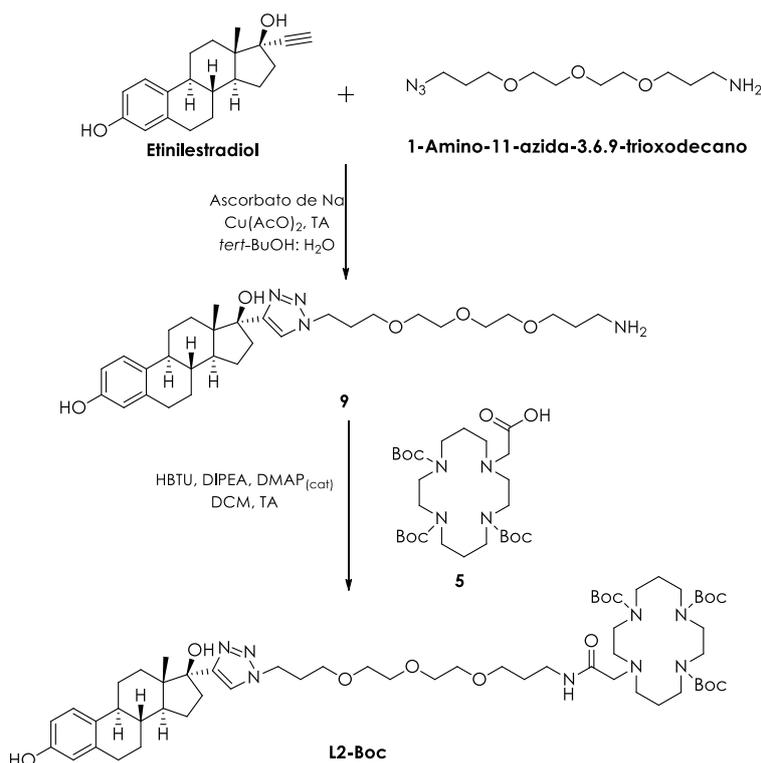


Figura 122: Estructura del 1-Amino-11-azido-3.6.9-trioxodecano.

Para la síntesis de **L2-Boc** dos estrategias fueron ensayadas: Método 1 y Método 2. En ambos métodos fueron utilizados los mismos reactivos, variando el orden de los mismos en la secuencia sintética.

En el esquema 7 se muestra el esquema de síntesis del Método 1. La síntesis se efectuó realizando en primer lugar la reacción de "cicloadición 3+2" entre el etinilestradiol y el 1-Amino-11-azido-3.6.9-trioxodecano, para dar lugar a **9** quien luego se acopló a **5** y así generar al **L2-Boc**.



Esquema 7: Secuencia síntesis de **L2-Boc** según Método 1.

En la figura 123 se muestra el espectro  $^1\text{H}$ -RMN de **9** en  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Las señales fueron asignadas teniendo en cuenta los correspondientes espectros del etinilestradiol y de 1-Amino-11-azido-3.6.9-trioxodecano. La presencia del protón  $\text{H}_{14}$  demostró que la reacción de "cicloadición 3+2" efectivamente tuvo lugar y el triazol fue formado. Sin embargo la señal de dicho protón resultó no ser un singlete como era de esperarse. Esto demostró que el producto no fue obtenido libre de impurezas, a pesar de haber sido purificado por columna una vez sintetizado.

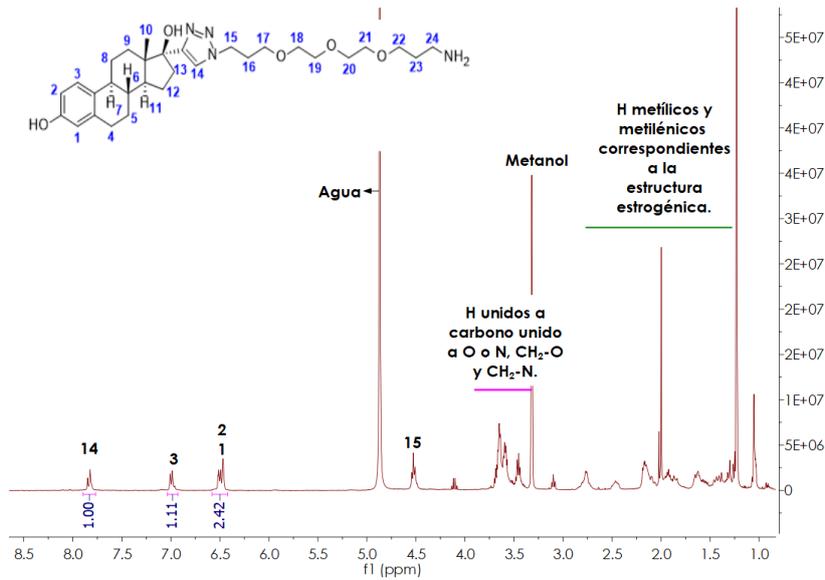


Figura 123: Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de **9**.

No obstante haber obtenido a **9** impuro se realizó el acople con **5**. En la figura 124 se muestra el espectro  $^1\text{H}$ -RMN que se obtuvo para **L2-Boc**. Al igual que en el espectro de **9**, la señal correspondiente a  $\text{H}_{14}$  resultó no ser un singlete, indicando la presencia de impurezas arrastradas desde la anterior reacción.

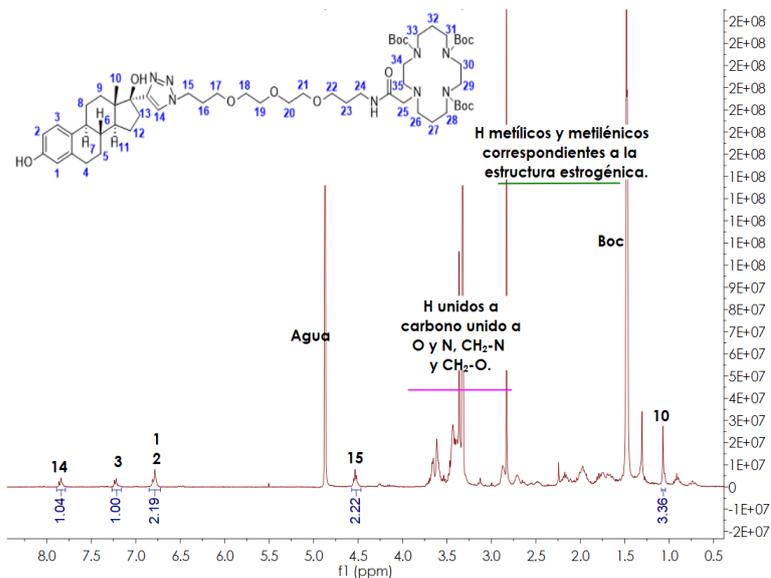
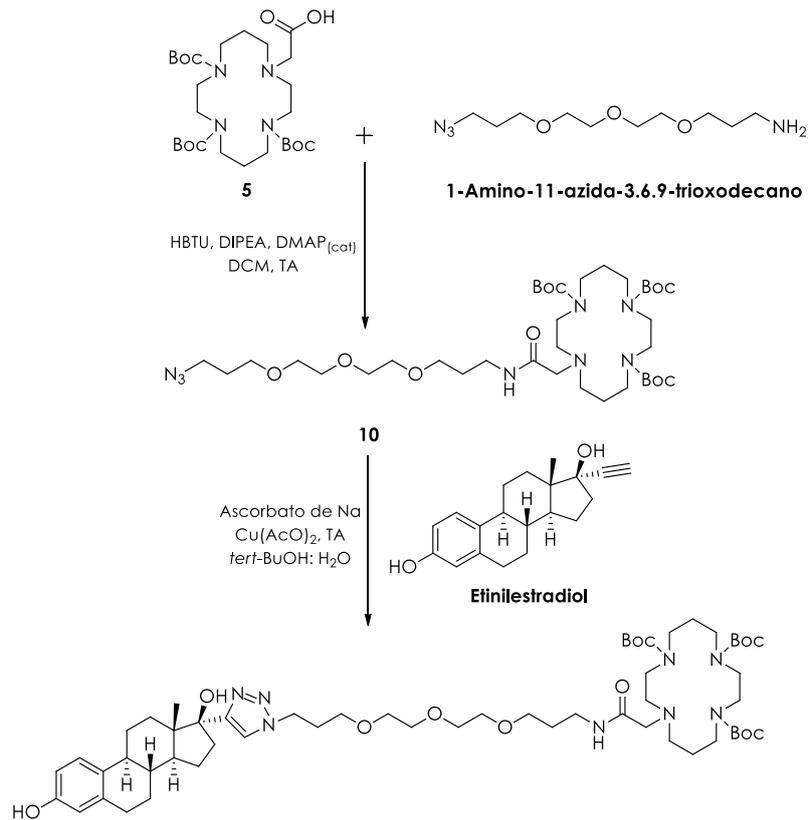


Figura 124: Espectro  $^1\text{H}$ -RMN obtenido en  $\text{CD}_3\text{OD}$  del **L2-Boc** sintetizado a partir del Método 1.

En el esquema 8 se muestra el esquema de síntesis según Método 2. En primer lugar se realizó la formación del enlace amida entre **5** y 1-Amino-11-azida-3.6.9-trioxodecano que dio lugar a **10**. Seguidamente se realizó la reacción de "cicloadición 3+2" entre el etinilestradiol y **10** que permitió obtener a **L2-Boc**.



Esquema 8: Secuencia de la síntesis de **L2-Boc** según Método 2.

En la figura 125 se muestra el espectro  $^1\text{H}$ -RMN de **10** en  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Las señales fueron asignadas teniendo en cuenta los análisis de RMN de **5** y de 1-Amino-11-azida-3.6.9-trioxodecano.

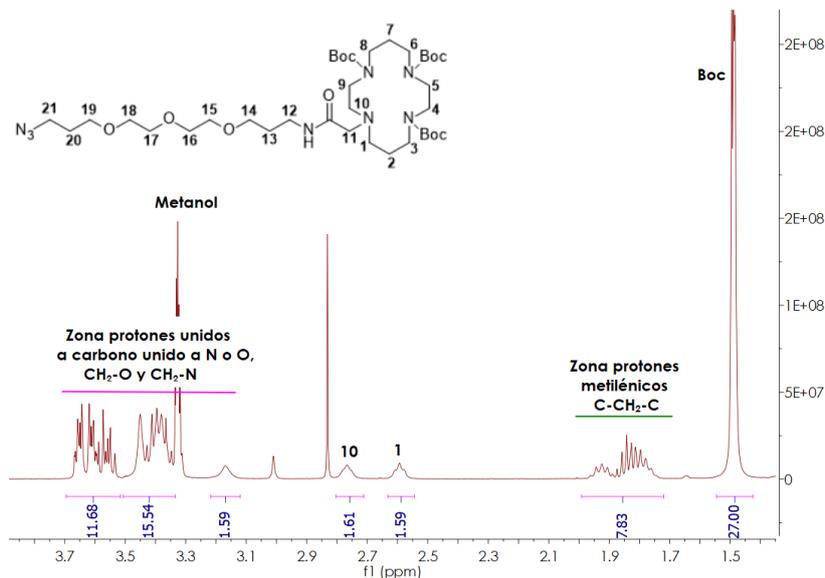


Figura 125: Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de **10**.

En la figura 126 se muestra el espectro  $^1\text{H}$ -RMN para **L2-Boc** en  $\text{CD}_3\text{OD}$ . En éste caso fue posible su síntesis con una mayor pureza en comparación al obtenido mediante el Método 1. Se puede observar en el espectro la señal correspondiente al protón del

triazol, H<sub>14</sub>, que como era de esperarse corresponde a un singlete sin acople en espectro COSY.

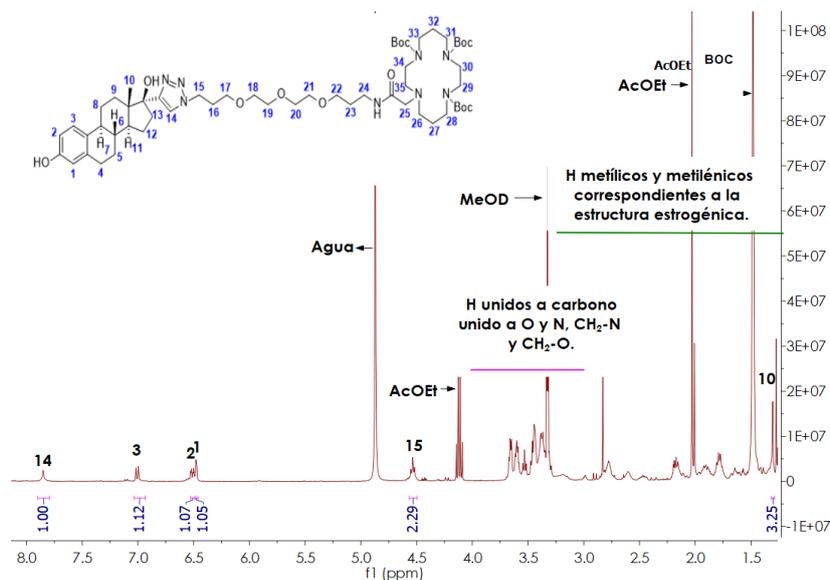


Figura 126: Espectro  $^1\text{H}$ -RMN obtenido **L2-Boc** sintetizado según Método 2.

En la figura 127 se presenta el espectro de masa para el **L2-Boc** obtenido mediante ESI-EM en modo positivo. De los resultados obtenidos se apreció una relación  $m/z$  de 1084 que corresponde al  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Se identificaron dos fragmentos que podrían proceder de la pérdida de uno y dos grupos alcoholes, fragmentos  $m/z=1065$  y  $m/z=1049$ .

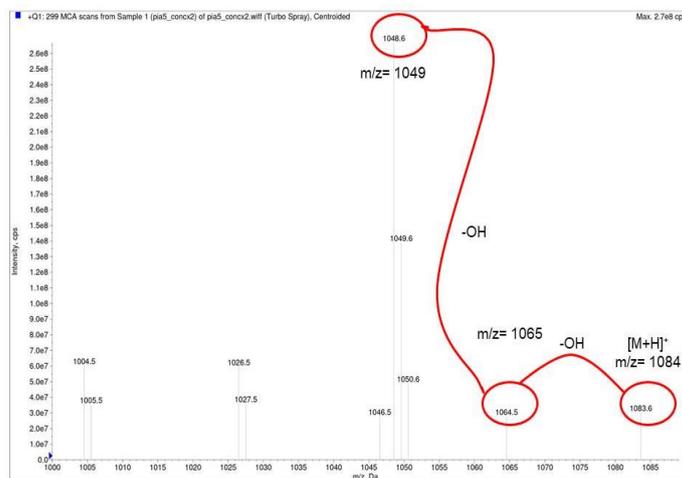
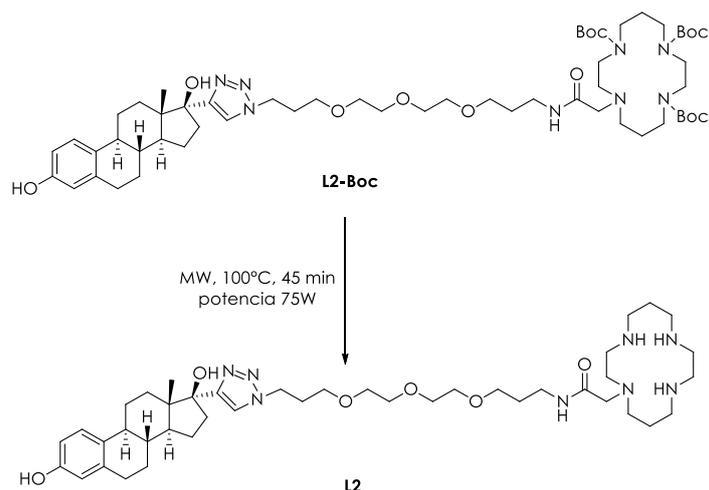


Figura 127: Espectro de masa de **L2-Boc**.

Independientemente de haberse sintetizado el **L2-Boc** por el Método 1 o Método 2, fue necesario un último paso de síntesis para dar lugar al **L2** (ver esquema 9).



Esquema 9: Secuencia de síntesis de **L2**.

La hidrólisis de los grupos Boc de **L2-Boc** se realizó mediante microondas. Ésta técnica reportada por Wang *et al.* propone el uso de agua como catalizador en reacciones de eliminación del grupo protector Boc, ya sea en aminas aromáticas como alifáticas [167]. Los iones hidronio formados por la disociación del agua podrían ser los responsables de la catálisis de la reacción de hidrólisis. Es importante tener en cuenta que una vez realizada la desprotección de las aminas el crudo de reacción no fue purificado, debido a que las posibles especies presentes no afectan a la reacción de marcación. El análisis  $^1\text{H}$ -RMN de **L2** mostró la presencia de señales correspondientes a aminas libres que permitió confirmar la desprotección de las mismas (ver figura 128). Es importante mencionar que los protones sobre átomos electronegativos son ácidos y por lo tanto lábiles, motivo por el cual suelen intercambiarse con los protones o deuterios de los disolventes, si éstos son también ácidos. Debido a esto las señales de aminas en un espectro  $^1\text{H}$ -RMN pueden no estar presentes o integrar un número de protones menor al esperado.

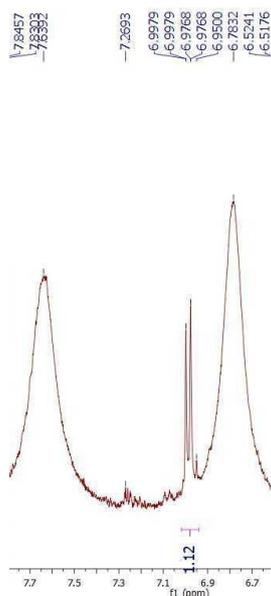
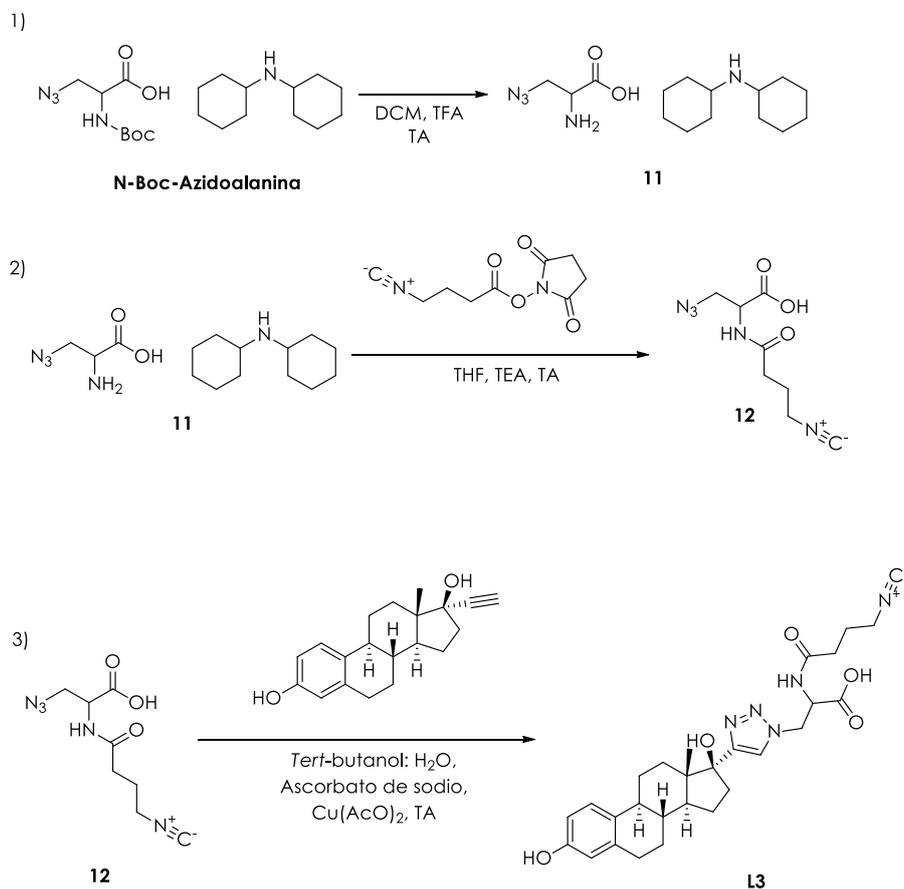


Figura 128: Señales de aminas libres presentes en el espectro  $^1\text{H}$ -RMN de **L2**.

### 5.3.1.3. Síntesis **L3**

La estrategia propuesta para la síntesis de **L3** consistió en una secuencia de tres reacciones (ver esquema 10).



Esquema 10: Secuencia de síntesis de **L3**.

La N-Boc-Azidoalanina se adquirió comercialmente bajo forma de sal, siendo el correspondiente contraión la dicitclohexilamina (ver figura 129).

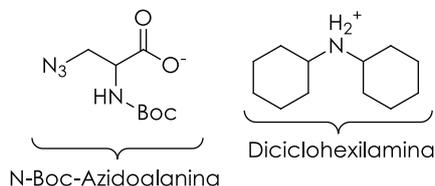


Figura 129: N-Boc-Azidoalanina con su contraión dicitclohexilamina.

Es importante dejar en claro que una vez finalizada las correspondientes reacciones de la secuencia de síntesis los productos obtenidos no fueron purificados, provocando que los rendimientos de síntesis hayan sido mayor al 100%. La presencia de sales y posibles reactivos sin reaccionar traen como consecuencia rendimientos mayores al teórico (100%).

La reacción 1) consistió en la clásica desprotección de aminas N-Boc protegidas, con ácido trifluoroacético en diclorometano a temperatura ambiente. El ácido trifluoroacético es luego eliminado del crudo de reacción mediante el agregado de tolueno y posterior evaporación a presión reducida, logrando así su eliminación mediante destilación azeotrópica [168]. En la figura 130 se muestra el espectro de **11** en  $\text{CD}_3\text{OD}$  con las señales integradas y asignadas a sus correspondientes protones.

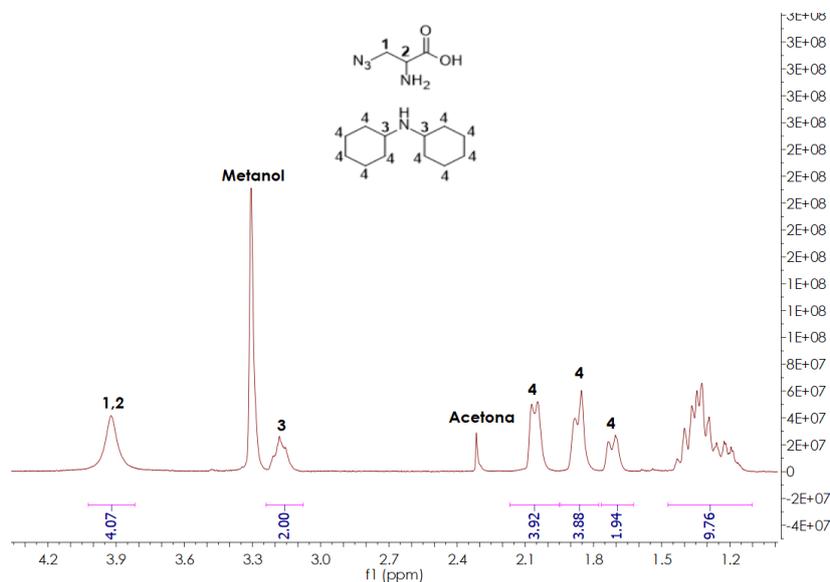


Figura 130: Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de **11**.

Para realizar la integración se tomó como referencia la señal correspondiente al multiplete a  $\delta = 3.23$  ppm, señal que se asignó a  $\text{H}_3$  debido a que se encuentra dentro del rango de desplazamiento típico de protones unidos a  $\text{C-NHR}$  (siendo  $\text{R} = \text{H}$  o  $\text{R} =$  cadena carbonada), además en el espectro COSY se pudo observar el acoplamiento con los  $\text{H}_4$  correspondientes a los protones metilénicos de la misma estructura (ver figura 131). Con un desplazamiento mayor,  $\delta = 3.92$  ppm, se encuentran  $\text{H}_1$  y  $\text{H}_2$ . Como se puede observar la integración correspondió a 4 protones y no a 3. Esto podría ser causa de la presencia de algún protón del grupo amino. En el espectro COSY se puede ver que dicha señal no presenta acoplamiento, lo cual correspondió con lo esperado. Los protones metilénicos de la dicitclohexilamina son los que presentan menor desplazamiento, encontrándose en el rango de ppm esperado para los mismos (0.5 – 2.0 ppm). La ausencia de la señal correspondiente a los protones del grupo protector Boc permitió confirmar que la reacción de desprotección ocurrió de forma efectiva.

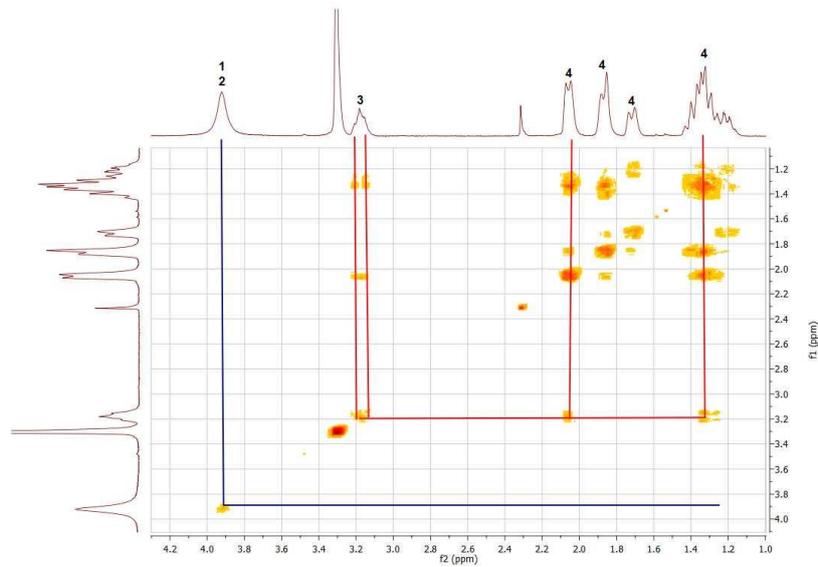


Figura 131: Espectro bidimensional COSY en donde se muestran los acoplamientos de  $\text{H}_3$  con  $\text{H}_4$ , así como también la ausencia de acoplamiento de la señal correspondiente a  $\text{H}_1$  y  $\text{H}_2$ .

Una vez que se confirmó la síntesis de **11**, se procedió a efectuar el paso sintético 2). Para evitar la presencia del contraíón dicitclohexilamina, quien al ser una amina también podría reaccionar con el ácido carboxílico activado, se procedió a la purificación de **11** mediante cromatografía en columna. En la figura 132 se muestra el espectro  $^1\text{H}$ -RMN de **11** una vez que se realizó la purificación. Se pudieron observar las señales correspondientes al contraíón, con la diferencia de que integraron un total de 11 protones y no 22. Además, a diferencia de lo que mostró el espectro  $^1\text{H}$ -RMN de **11**, las señales de  $\text{H}_1$  y  $\text{H}_2$  correspondieron a un triplete y doblete, lo que demostró que el reactivo se logró purificar en cierto grado. Se calcularon los valores de  $J$ , resultando en un acoplamiento de  $\text{H}_1$  con  $\text{H}_2$  con una  $J = 5.0$ , de la misma forma  $\text{H}_2$  acopló con  $\text{H}_1$  con una  $J = 5.0$ .

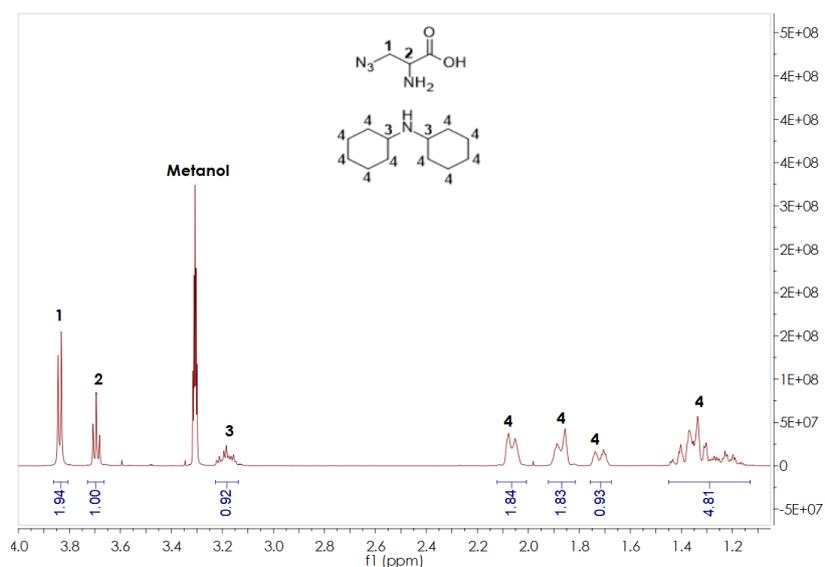


Figura 132: Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de **6** luego de purificado.

La reacción 2) consistió en la formación de un enlace amida a partir del grupo amina de la N-Boc-Azidoalanina y el grupo carbonilo activado del 4-((2.5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-N-metilidino-4-oxobutan-1-aminio. Éste tipo de reacciones fue previamente implementada por nuestro grupo de trabajo, por lo que una vez finalizada la misma se decidió continuar con la reacción 3). Ésta última reacción incorporó al estradiol como biomolécula mediante una reacción de cicloadición [3+2] de Huisgen previamente descrita. Experiencias previas del grupo de trabajo en cicloadiciones [3+2] sin purificar demostraron no afectar la marcación, por lo tanto se realizó un análisis de  $^1\text{H-NMR}$  del crudo de reacción y al mismo tiempo se comenzó a trabajar en la síntesis de **C3**.

### 5.3.2. Síntesis de los complejos de $^{99m}\text{Tc}$

#### 5.3.2.1. Síntesis de **C2**

##### a) Método 1

El primer paso en la preparación del complejo de  $^{99m}\text{Tc}$ , **C2**, consistió en la hidrólisis de los grupos Boc protectores de aminas, dando lugar a las aminas secundarias de la estructura cyclam capaces de coordinar con el átomo de  $^{99m}\text{Tc}$  bajo la forma de core dioxo.

Tomando como referencia condiciones de hidrólisis desarrolladas previamente por el grupo de investigación, las aminas del **L2-Boc** se desprotegieron *in situ* mediante hidrólisis ácida con ácido trifluoroacético [169]. Finalizada la reacción se neutralizó la mezcla con NaOH 2M y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  260 mg/mL o se dejó en condiciones ácidas. Seguidamente se realizó la reacción de marcación en donde se ensayaron condiciones estudiadas por Nock *et al.*, Zhang *et al.*, Maina *et al.* y Abiraj *et al.* [142, 147, 154, 155, 156, 165,]. En dichos trabajos la formación del core  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{V})\text{O}_2]^+$  se da en un único paso de síntesis, por lo que todos los reactivos fueron incubados en un único vial. Las marcaciones se realizaron con una cantidad de ligando en el orden de los 8 a 20 nmoles, a temperatura ambiente durante 30 minutos y a 75 °C durante 40 minutos. En algunos casos se agregó citrato de sodio, el cual actuaría como ligando intermedio. La formación del complejo  $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -citrato ocurre de forma rápida y con baja estabilidad termodinámica, lo cual permite que una vez agregado el ligando de interés, ocurra la reacción de sustitución para dar lugar al complejo final que en el presente trabajo sería la coordinación con los cuatro átomos de nitrógeno del cyclam. De esta forma se evita generar impurezas a partir de reacciones competitivas, así como también, se permite seleccionar y controlar el estado de oxidación del complejo final.

Para el estudio de la reacción de marcación mediante HPLC se comenzó trabajando con una columna waters C18 a flujo 1.0 mL/min, temperatura ambiente y utilizando el gradiente de fase móvil que se muestra en la tabla 14.

Sistema 1	Tiempo (min)		% Solución B	
	3		0	
	10		100	
	22		100	
	24		0	

Tabla 14: Condiciones gradiente de fase móvil sistema 1 empleado inicialmente para el estudio de la reacción de marcación.

Con el fin de conocer los tr en el sistema 1 se comenzó inyectando las soluciones de las posibles principales impurezas en el crudo de reacción:  $^{99m}\text{Tc}$ TCO<sub>4</sub><sup>-</sup> y  $^{99m}\text{Tc}$ Tc-citrato, cuyos tr fueron de 3.2 minutos en ambos casos (ver figura 133).

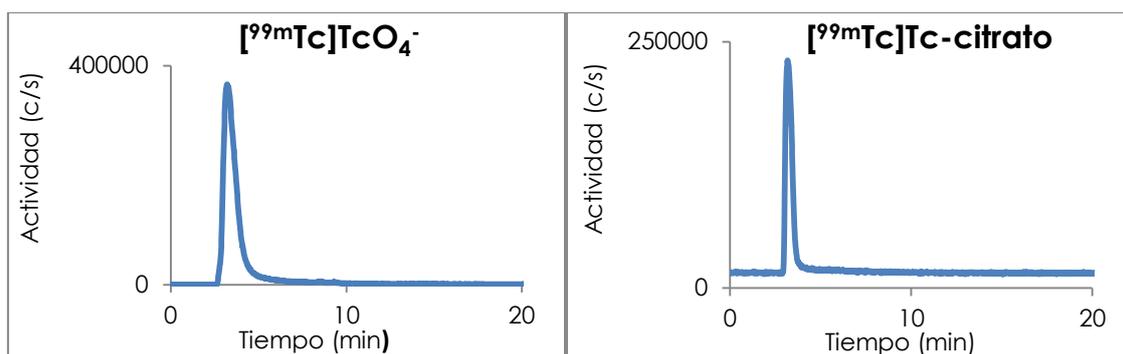


Figura 133: Perfil cromatográfico del  $^{99m}\text{Tc}$ TCO<sub>4</sub><sup>-</sup> y  $^{99m}\text{Tc}$ Tc-citrato.

Una vez conocidos los tr de las principales impurezas se procedió a trabajar en la hidrólisis del **L2-Boc** y posterior marcación de **L2**. En la tabla 15 se resumen las variables ensayadas para ambos casos y los correspondientes resultados de PRQ.

Condición	HIDRÓLISIS			MARCACIÓN					
	Masa L2-Boc (mg)	Temp. (°C)	Volumen TFA (μL)	Volumen Hidrolizado (μL)	Temp. (°C)	Masa SnCl <sub>2</sub> (mg)	Citrato	Tiempo (min)	PRQ (%)
1	2	75	6	200	50	0.10	Sí	30	0
2	2	75	6	200	50	0.10	Sí	60	0
3	2	75	6	200	50	0.10	No	30	0
4	2	Ambiente	6	200	Ambiente	0.10	Sí	30	0
5	2	Ambiente	6	200	50	0.10	Sí	30	0
6	2	75	6	100	Ambiente	0.10	Sí	30	0
7	2	75	6	100	50	0.10	Sí	30	0
8	2	75	6	100	Ambiente	0.20	Sí	30	0
9	2	75	6	100	Ambiente	0.20	Sí	30	0
10	1	75	6	200	50	0.060	Sí	30	10
11	1	75	6	2.0	50	0.060	Sí	30	13
<b>12</b>	<b>1</b>	<b>Ambiente</b>	<b>27</b>	<b>2.0</b>	<b>100</b>	<b>0.030</b>	<b>Sí</b>	<b>30</b>	<b>36</b>

Tabla 15: Condiciones ensayadas de hidrólisis *in situ* y posterior marcación con su correspondiente resultado de PRQ (%). La PRQ (%) se informa como porcentaje de la mayor especie radiactiva cuyo tr difiere al del  $^{99m}\text{Tc}$ TCO<sub>4</sub><sup>-</sup> y  $^{99m}\text{Tc}$ Tc-citrato.

El análisis por HPLC de la mezcla de reacción mostró en algunos casos ausencia de reacción y en otros la presencia de varios productos. Considerando las diferentes variables estudiadas en la hidrólisis y marcación con sus correspondientes valores de

PRQ, se seleccionó a la condición 12 como condición final, bajo la cual se observó una especie principal con un tr de 11.5 min y una PRQ del 36% que correspondería a **C2**. El cromatograma mostró también la presencia de una tercera especie radiactiva con tr de 11.7 min. Con el objetivo de aislar y purificar la especie con tr= 11.5 min, se procedió a optimizar el sistema cromatográfico en busca de una mejor resolución entre picos. En la tabla 16 se indican los gradientes de fase móvil ensayados.

	Sistema 2				Sistema 3		
	Tiempo (min)	Solución B (%)	Solución A (%)		Tiempo (min)	Solución B (%)	Solución A (%)
	0	0	100		0	0	100
	3	0	100		3	0	100
	15	100	0		10	50	50
	20	100	0		15	50	50
	22	0	100		20	100	0
					22	0	100

	Sistema 4				Sistema 5		
	Tiempo (min)	Solución B (%)	Solución A (%)		Tiempo (min)	Solución B (%)	Solución A (%)
	0	0	100		0	0	100
	3	0	100		3	0	100
	20	100	0		40	100	0
	22	0	100		42	0	100

Tabla 16: Gradientes de HPLC ensayados para mejorar la resolución cromatográfica entre picos.

Debido a que ninguno de los gradientes ensayados permitió obtener un pico con una resolución adecuada, se decidió retomar los ensayos en la hidrólisis y marcación utilizando el sistema 1. Como primer cambio a realizar se experimentó no neutralizar la solución una vez finalizada la hidrólisis manteniendo el pH ácido, condición 13 (ver tabla 17).

Condición	HIDRÓLISIS				MARCACIÓN			
	Masa L2-Boc (mg)	Temp. (°C)	Volumen TFA (µL)	Volumen hidrolizado (µL)	Temp. (°C)	Masa SnCl <sub>2</sub> (mg)	Tiempo (min)	PRQ (%)
13	1	Ambiente	27	2.0	100	0.030	30	62

Tabla 17: Condición 13 sin neutralización de la solución una vez finalizada la etapa de hidrólisis.

El perfil cromatográfico obtenido mostró la presencia de una única especie radiactiva con tr de 10.9 min que representó un 62% de la actividad total, resultado que fue muy alentador (ver figura 134).

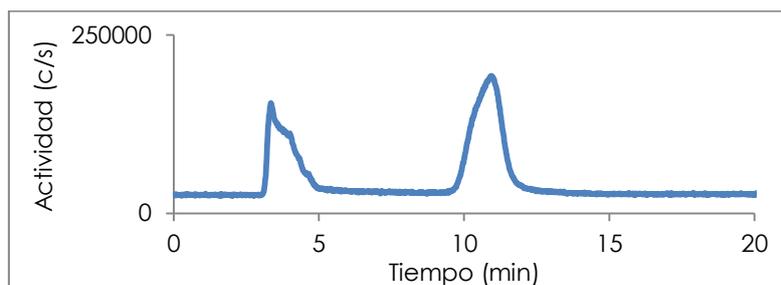


Figura 134: Perfil cromatográfico obtenido al no neutralizar la solución una vez finalizada la etapa de hidrólisis.

En las posteriores marcaciones realizadas, no fue posible reproducir el perfil cromatográfico de la figura 134. En todos los casos el pico cromatográfico se desdobló en dos picos no resueltos cuyos  $t_r$  fueron de 10.5 y 11.2 min (ver figura 135).

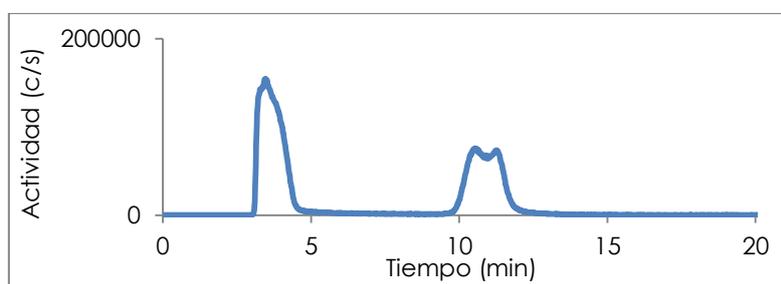


Figura 135: Perfil cromatográfico que muestra el desdoblamiento del pico del compuesto marcado.

Una de las posibles causas del desdoblamiento de los picos cromatográficos podría ser un daño en el empaquetamiento de la columna, lo que da lugar a diferentes vías por las cuales puede eluir la muestra. Por lo tanto, se ensayó cambiar la columna waters C18 por una Phenomenex Luna<sup>®</sup> C18 sin uso previo (ver figura 136).

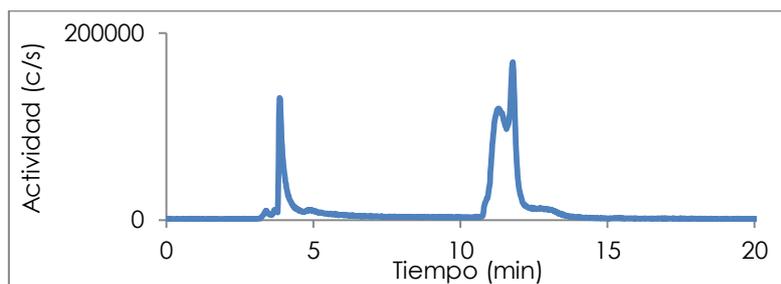


Figura 136: Perfil cromatográfico obtenido utilizando una columna Phenomenex Luna<sup>®</sup> C18.

El cambio de columna cromatográfica demostró que la misma no fue la causa del desdoblamiento de pico. Otra posible razón podría ser la formación de isómeros estructurales a pesar de que no existe en la literatura reportes de formación de especies isoméricas del core dioxo. Una de las formas de corroborar la existencia de isómeros estructurales es aislar uno de los dos picos y reinyectarlo en el sistema cromatográfico. Si el resultado es un perfil cromatográfico que muestra nuevamente desdoblamiento de pico, se podrían tratar de especies isoméricas en equilibrio, en

cambio si el cromatograma de la reinyección muestra únicamente el pico aislado, se estaría ante la presencia de especies químicas diferentes. Por dicha razón, se aisló el primer pico cromatográfico quien seguidamente se reinyectó en el sistema HPLC (inyección 2) y luego de 30 minutos de aislado (inyección 3). En la figura 137 se muestran los perfiles cromatográficos que se obtuvieron.

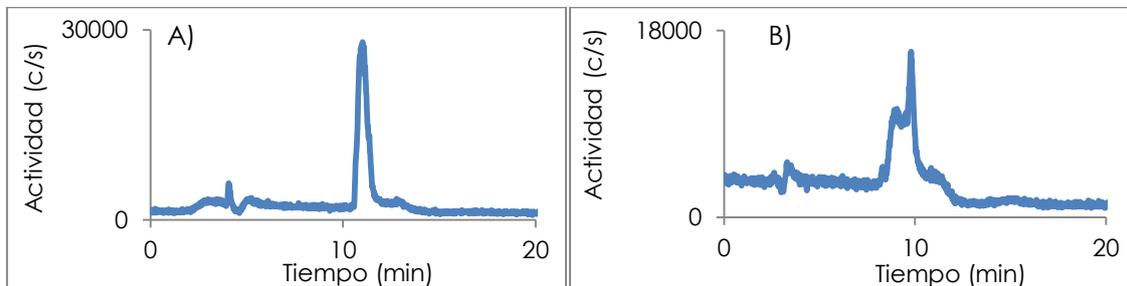


Figura 137: A) Perfil cromatográfico inmediatamente luego de la purificación por HPLC analítico (inyección 2), B) Perfil cromatográfico luego de 30 minutos (inyección 3).

Como muestra el perfil cromatográfico de la inyección 3, el pico nuevamente se desdobló en dos, indicando que podría tratarse de dos especies químicas en equilibrio.

En los posteriores ensayos de hidrólisis y marcación no se obtuvo pico de marcado, sólo  $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$  y/o  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-citrato}$ . Esto podría deberse a la inestabilidad del ligando. Por tal motivo se decidió ensayar una nueva estrategia de síntesis del complejo, lo que dio lugar al método 2.

#### b) Método 2

Como consecuencia de los resultados anteriormente discutidos, se resolvió no realizar la marcación inmediatamente después de la etapa de hidrólisis del **L2-Boc** *in situ*, por el contrario partir de **L2** desprotegido previamente.

El control de la reacción de marcación se realizó mediante HPLC utilizando el sistema 1. En primer lugar se realizó un blanco de reacción, reproduciendo el método de marcación tal cual fue descrito en el punto 5.2.2.2.1 parte b) pero sin agregado de ligando (ver figura 138).

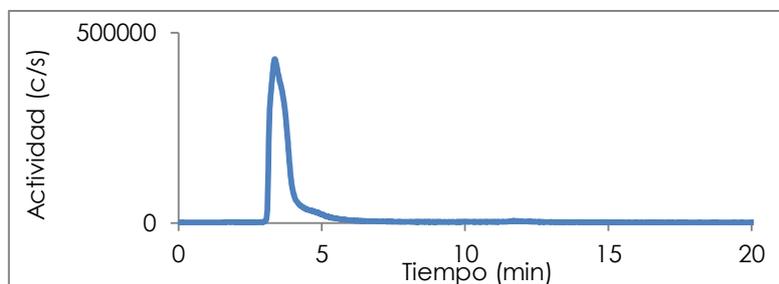


Figura 138: Perfil cromatográfico del blanco de reacción.

En la tabla 18 se indican las variables ensayadas y los respectivos resultados de PRQ obtenidos en cada caso.

Condición	Temp. (°C)	Tiempo (min)	PRQ (%)
1	Ambiente	30	0
2	100	15	0
3	50	30	0
4	100	30	Pico desdoblado

Tabla 18: Condiciones variables ensayadas en la marcación según procedimiento método 2.

En la figura 139 se muestra el perfil cromatográfico obtenido según la condición 4.

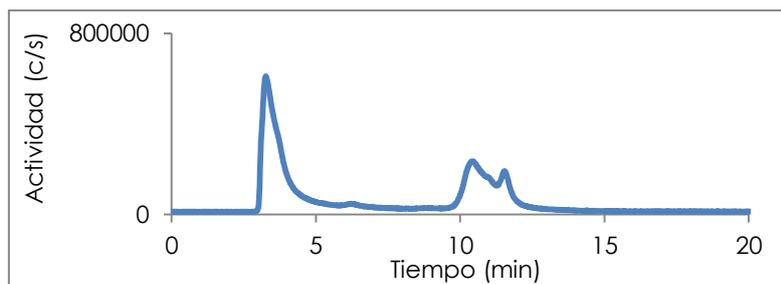


Figura 139: Perfil cromatográfico para la condición 4.

Nuevamente el pico se desdobló en dos picos que representaron el 29% y 12% de la actividad inyectada total. En las siguientes marcaciones realizadas no se observó pico de marcado. Esto reafirma la hipótesis de inestabilidad del ligando como causa de los fracasos en la marcación.

Debido a que no se contaba con más cyclam para realizar una nueva síntesis orgánica del ligando y continuar realizando ensayos de marcación, se decidió comenzar a trabajar en la síntesis orgánica de **L3** para posteriormente trabajar en la formación de **C3**.

### 5.3.2.2. Síntesis de **C3**

La síntesis del complejo de  $^{99m}\text{Tc}$  (III) "4+1" se realizó a partir del ligando monodentado **L3** y el coligando tetradentado  $\text{NS}_3(\text{COOH})_3$  mediante sustitución del precursor  $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-EDTA}$ .

**L3** contiene en su estructura a la biomolécula estradiol y al grupo isonitrilo que permite su coordinación al  $^{99m}\text{Tc}$ . Por otro lado, el coligando tetradentado  $\text{NS}_3(\text{COOH})_3$  coordina al metal a través del átomo de N y de los tres átomos de S (se representa como  $\text{NS}_3(\text{COOH})_3$  en alusión a los átomos donores y grupos sustituyentes). El complejo final es neutro, debido a que la desprotonación de los tres protones de los grupos tiol compensa las tres cargas positivas del metal.

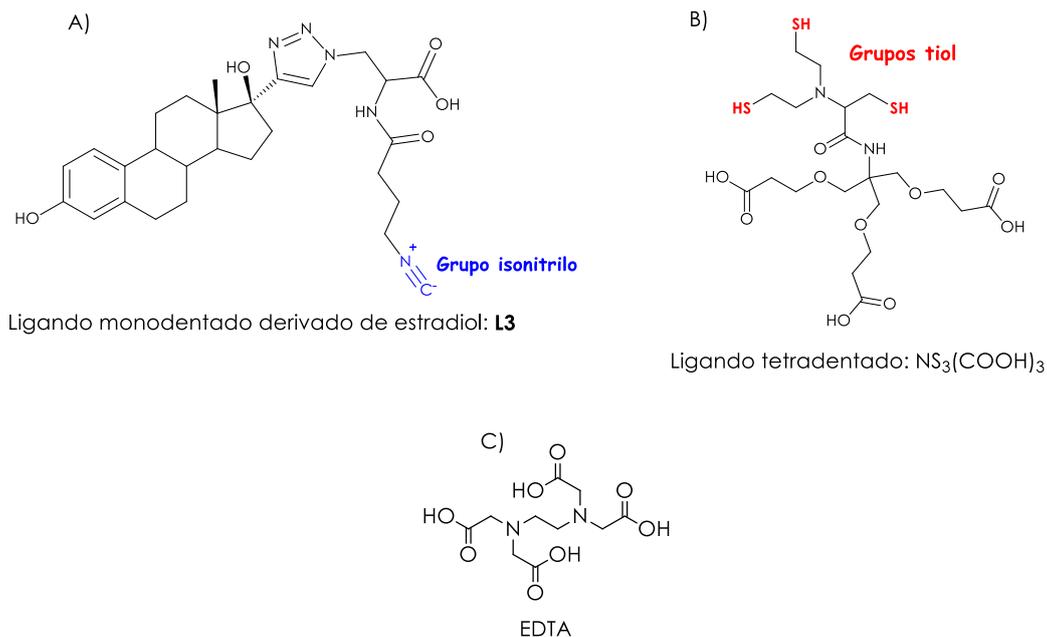


Figura 140: A) Estructura del ligando monodentado, B) Estructura del coligando tetradentado y C) Estructura EDTA.

#### 5.3.2.2.1. Síntesis del precursor $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc(III)-EDTA

Para la síntesis del precursor de  $^{99m}\text{Tc}$  (III) se partió de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , se empleó EDTA como ligando intermedio y  $\text{SnCl}_2$  como agente reductor. La preparación se realizó de forma sencilla colocando en un mismo vial EDTA, manitol como diluyente, el reductor  $\text{SnCl}_2$  y finalmente  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ . La reacción es rápida y luego de 5 minutos a temperatura ambiente se realizó el control de PRQ empleando dos sistemas de cromatografía en papel en forma simultánea, con acetona y  $\text{NaCl}$  0.9% como fases móviles (ver tabla 19).

Sistema	$R_f = 0$	$R_f = 1$
Acetona	Coloide + $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-EDTA	$^{99m}\text{Tc}$ ]TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
NaCl 0.9%	Coloide	$^{99m}\text{Tc}$ ]TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> + $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-EDTA

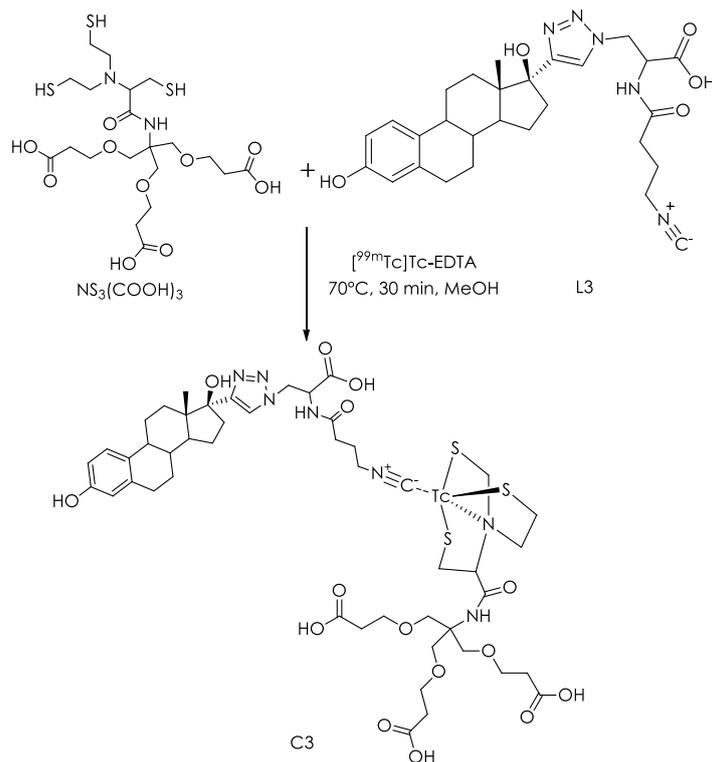
Tabla 19: Sistema de cromatografías que se utilizó para determinar la PRQ del precursor  $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-EDTA.  $R_f$ = Factor de retención.

La marcación resultó ser muy sencilla y rápida.

Es importante destacar que no fue necesaria la optimización del método dado que es un método general de síntesis previamente establecido y utilizado por el grupo de trabajo.

#### 5.3.2.2.2. Reacción de sustitución

Una vez que se sintetizó el precursor  $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-EDTA y controló su PRQ, se procedió a realizar la reacción de sustitución por el ligando monodentado y tetradentado (ver esquema 11).



Esquema 11: Síntesis del complejo de  $^{99m}\text{Tc}$ (III) "4+1".

El sistema HPLC que inicialmente se utilizó (sistema 1) para el seguimiento de la reacción de marcación empleó como fase móvil el gradiente establecido en la tabla 20.

Tiempo (min)	% Solución B
3	0
10	100
22	100
24	0

Tabla 20: Gradiente inicial de fase móvil para el control de la reacción de marcación.

Previo a comenzar con los ensayos de síntesis del complejo y con el objetivo de conocer los tr de las posibles principales impurezas presentes en la reacción de marcación, se inyectó en el sistema 1  $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$  y precursor  $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-EDTA}$  (ver figura 141).

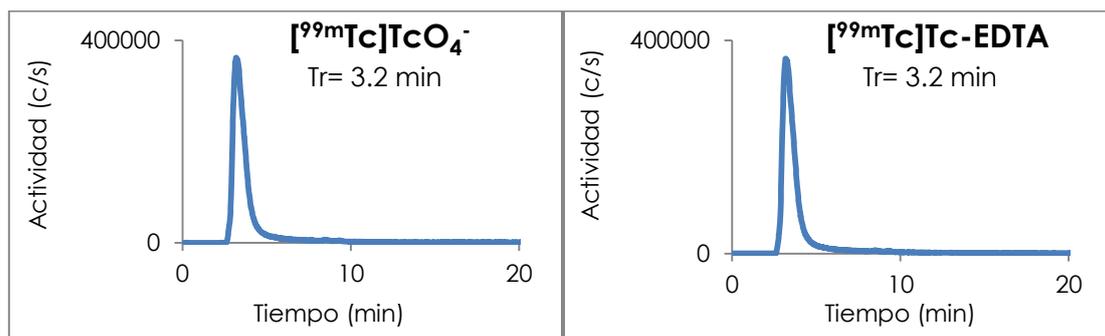


Figura 141: A) Perfil cromatográfico del  $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$  y B) Perfil cromatográfico del  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-EDTA}$ , ambos obtenidos bajo el sistema 1.

Para la etapa de marcación se tomaron como referencia los trabajos de Drews *et al.* [170] y Giglio *et al.* [171]. En ellos la formación del complejo de  $^{99m}\text{Tc(III)}$  “4+1” se realizó en dos etapas, que consistieron en la formación del precursor  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-EDTA}$  seguido de la reacción de sustitución simultánea por el correspondiente ligando monodentado y tetradentado. La reacción de sustitución es descrita a 70 °C durante 30 minutos y a 50 °C durante 15 minutos, en ambos casos fue necesaria una etapa de purificación mediante HPLC analítico. La relación molar coligando/ligando varió desde 2.5 a 50.

Debido a que no se realizó una purificación final luego de la etapa 3) de síntesis, no fue posible calcular con exactitud la cantidad de moles de **L3**. Por lo tanto, la masa que se empleó en cada marcado no es exactamente la cantidad de **L3** presente. Se comenzó ensayando dos condiciones, las cuales se muestran en la tabla 21.

MARCACIÓN						
Condición	Masa ligando (mg)	Masa coligando (mg)	Volumen precursor $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-EDTA}$ (mL)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	PRQ (%)
1	0.2	1.0	0.2	70	30	0
2	1.0	2.0	0.1	70	30	61

Tabla 21: Primeras dos condiciones de síntesis para **C3**.

La condición 2 dio lugar a un perfil cromatográfico que mostró la presencia de una especie principal con una PRQ del 61%, siendo necesario un paso adicional de purificación lo cual es común en la preparación de este tipo de complejos (ver figura 142). El perfil que se obtuvo es el típico de un marcado de  $^{99m}\text{Tc(III)}$  “4+1”.

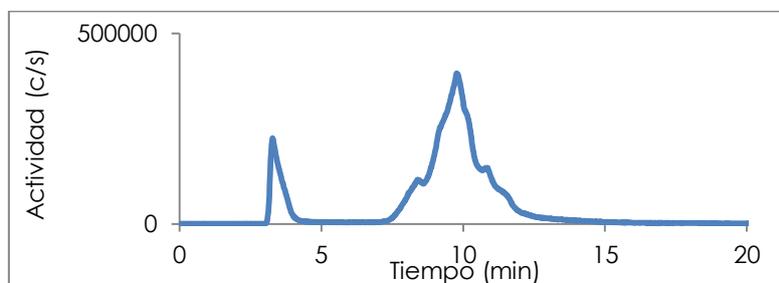


Figura 142: Perfil cromatográfico crudo de reacción según condición de marcación 2 (ver tabla 21).

Con el objetivo de purificar la especie principal, se trabajó en el sistema 1 buscando mejorar la resolución entre los picos cromatográficos. Se ensayaron tres nuevos gradientes de HPLC, variando la composición de la solución B en relación a la solución A con el tiempo. En la tabla 22 se muestran los gradientes ensayados y se resalta el seleccionado (sistema 3).

Sistema 1	Tiempo (min)	Solución B (%)	Solución A (%)	Sistema 2	Tiempo (min)	Solución B (%)	Solución A (%)
	0	0	100		0	0	0
	20	100	0		30	100	0
	22	0	100		32	0	100

Sistema 3	Tiempo	Solución A (%)	Solución B (%)
	0	0	100
	40	100	0
	42	100	0

Tabla 22: Gradientes de HPLC ensayados para mejorar la resolución entre picos. Se resalta el gradiente seleccionado, sistema 3.

En la figura 143 se muestra el perfil cromatográfico que se obtuvo con el sistema 3. Se logró mejorar la  $R_s$  entre los picos, lo que permitió aislar al pico principal y así obtener una PRQ mayor al 90% (ver figura 144).

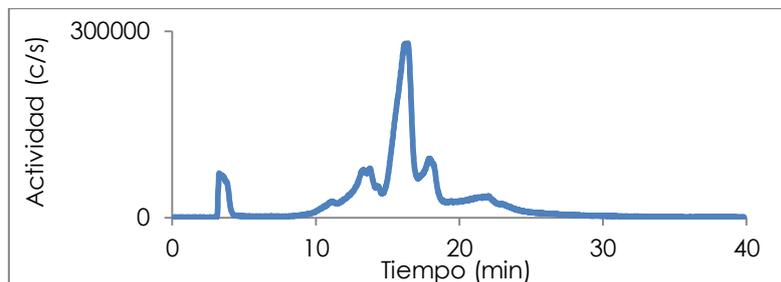


Figura 143: Perfil cromatográfico obtenido con el sistema 2.

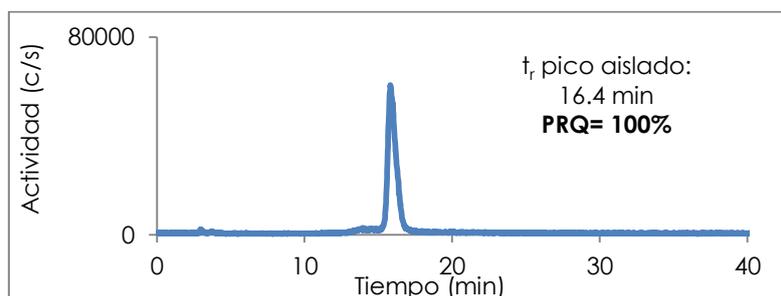


Figura 144: Perfil cromatográfico del pico aislado.

Con el fin de asegurar que el pico aislado no correspondió al coligando o ligando marcados con  $^{99m}\text{Tc}$ , se realizaron dos reacciones de marcación de ambos compuestos por separado. En las figuras 145 y 146 se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos que permitieron confirmar que el pico aislado no se trató de las especies mencionadas, resultado muy alentador.

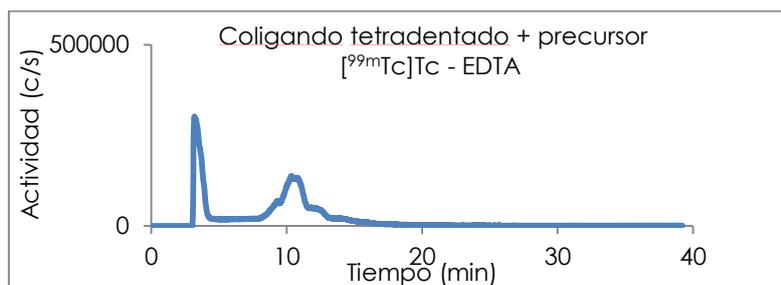


Figura 145: Perfil cromatográfico de la inyección del coligando tetradentado +  $^{99m}\text{Tc}$ -EDTA.

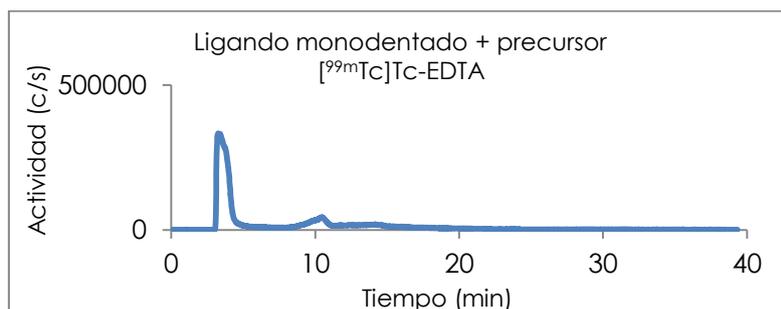


Figura 146: Perfil cromatográfico inyección del ligando monodentado +  $^{99m}\text{Tc}$ -EDTA.

Una vez establecido el sistema HPLC para la purificación y control de PRQ y establecidos los tr de las posibles impurezas conocidas, se procedió a optimizar el marcado buscando aumentar la PRQ del pico principal en el crudo de reacción. En la tabla 23 se resumen las condiciones ensayadas.

Condición	MARCACIÓN					
	Masa ligando (mg)	Masa coligando (mg)	Volumen precursor $^{99m}\text{Tc}$ -EDTA (mL)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	PRQ (%)
3	1.0	2.0	0.10	70	15	3
4	1.0	2.0	0.10	60	15	0
5	2.0	2.0	0.10	70	30	20
6	1.0	3.0	0.10	70	30	41

Tabla 23: Resumen condiciones de marcación ensayadas.

No fue posible mejorar la PRQ del pico principal, las condiciones óptimas resultaron las ensayadas según la condición 2.

Para los ensayos *in vitro* se eliminó el acetonitrilo de la fase móvil cromatográfica (tóxico para las células) y se diluyó con NaCl 0.9%. Se ensayaron dos métodos de purificación: 1) adsorción en un cartucho de extracción en fase sólida Sep-Pak® C18 y posterior elución con EtOH y 2) evaporación mediante corriente de  $\text{N}_2$  gaseoso durante 15 minutos. Ambos métodos resultaron ser eficaces y redujeron la concentración de MeCN por debajo de 0.05%. Por razones económicas se decidió utilizar el método 2), el cual no tiene el costo de la columna en fase sólida que es de un único uso.

### 5.3.3. Estudios *in vitro* C3

Los ensayos *in vitro* son estudios que se deben realizar previo a la evaluación *in vivo* de todo potencial radiofármaco, debido a que se usan para predecir el comportamiento del mismo en el respectivo medio biológico.

#### 5.3.3.1. Estudios fisicoquímicos

La estabilidad del complejo en el tiempo se determinó en el medio de reacción y en plasma.

La estabilidad del complejo en el medio de reacción se estudió para verificar que el compuesto es estable durante el tiempo en la formulación final, asegurando la PRQ del complejo en los estudios realizados luego de su obtención (por ejemplo lipofilicidad, UPP). El complejo resultó ser estable luego de purificado mediante HPLC analítico durante al menos 4 horas (ver tabla 24). Se decidió realizar el estudio hasta 4 horas luego de aislar el pico debido a que es el mayor tiempo empleado en los estudios posteriores en células MCF-7.

Estabilidad en el tiempo	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas
PRQ (%)	98 ± 3	100 ± 0	99 ± 2	100 ± 1

Tabla 24: Estabilidad en el medio de reacción. Los resultados se informan como (promedio ±  $\sigma_{n-1}$  (n= 2)).

La estabilidad del complejo en plasma permite predecir la estabilidad del potencial radiotrazador frente al medio biológico, el cual es altamente competitivo. En el plasma se encuentran muchas proteínas que contienen grupos funcionales capaces de unirse al  $^{99m}\text{Tc}$  y por lo tanto podrían desestabilizar al complejo. Es deseable que el compuesto sea estable durante el período de tiempo del estudio *in vivo*. El método implicó la incubación de la muestra con un pool de plasma humano a 37°C y el control de la PRQ hasta 4 horas post-incubación. Seguidamente se precipitaron las proteínas plasmáticas mediante su desnaturalización con EtOH absoluto frío, por lo que solamente se determinó la estabilidad de la fracción del complejo libre. Finalmente se centrifugó la muestra y se inyectó el sobrenadante en el HPLC analítico. El complejo resultó ser estable en plasma a 37°C al menos durante 4 horas luego de purificado (ver tabla 25).

Estabilidad en plasma	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas
PRQ (%)	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0

Tabla 25: Estabilidad en plasma a 37°C. Los resultados se informan como (promedio ±  $\sigma_{n-1}$  (n= 2)).

La lipofilicidad es un parámetro fundamental en un fármaco ya que la misma es el resultado de la interacción de los diferentes átomos con el medio y condiciona muchos parámetros de interés biológico, como la absorción del compuesto, distribución en el cuerpo, penetración a través de membranas biológicas y barreras biológicas, metabolismo y excreción. El complejo debe tener una lipofilia adecuada para que se permita su ingreso a la célula. La lipofilicidad se expresa como el coeficiente de partición del complejo entre un buffer fosfato 0.1M pH= 7.4 y octanol (Log  $P_{o/w}$ ). El pasaje a través de una membrana está determinado por la Ley de Fick de difusión, donde K es el coeficiente de partición octanol/buffer, D es la difusión, A es

el área,  $h$  es el espesor de la membrana y  $C$  son las concentraciones ( $C_i$ : interior,  $C_e$ : exterior) :

$$dQ/dt = -DAK/h (C_i - C_e)$$

No es aconsejable que la lipofilia de un compuesto sea excesivamente alta, porque en ese caso tendría una baja eliminación renal y una alta eliminación hepatobiliar. Además presentará una lenta depuración de los tejidos no blanco. En general, los valores de  $\log P$  entre -0.5 y 2 a  $\text{pH}=7.4$  se consideran óptimos para un buen pasaje a través de una membrana biológica [172]. El valor de  $\text{Log } P_{o/w}$  que se obtuvo fue de  $-2.05 \pm 0.20$  ( $n=5$ ). El resultado obtenido es concordante con lo esperado de acuerdo a la estructura del coligando, lo que da lugar a un complejo con características hidrofílicas. Si bien el valor de lipofilicidad obtenido podría predecir que dicho complejo no atravesará adecuadamente las membranas biológicas, dicho parámetro no es el único que está involucrado en el proceso y se debe tener presente que su influencia deberá determinarse con los datos biológicos.

La UPP es un parámetro muy importante que determina no sólo la farmacocinética del potencial radiofármaco, sino también su capacidad para penetrar en las membranas biológicas. La mayoría de los fármacos se une a las proteínas plasmáticas, por lo general a la albúmina y algunas veces a globulinas. En general es deseable que los valores de UPP sean moderados. Si el valor es muy elevado, la fracción libre del complejo que será capaz de atravesar las membranas y permear hacia las células será muy pequeña y además la depuración sanguínea será muy lenta, dando como resultado imágenes de baja calidad. Por el contrario, si el valor es muy bajo la depuración sanguínea será muy rápida, lo cual no permitiría la redistribución del radiofármaco a los tejidos blanco [173]. Sin embargo, la elevada UPP puede ser debida a dos causas bien diferentes. La primera es que simplemente el complejo presente unión así como lo presentan el resto de los fármacos. La otra posibilidad es que la unión a proteínas implique una baja estabilidad del complejo, ya que si el complejo experimenta una transquelación y como consecuencia el tecnecio queda unido a las proteínas, se estará evaluando como una elevada unión, cuando en realidad es una descomposición del complejo. En el presente trabajo esta segunda hipótesis es poco probable debido a que no se observó un aumento de la UPP con el paso del tiempo.

La UPP se determinó por cromatografía de exclusión molecular utilizando columnas MicroSpin G-50, procedimiento rápido y reproducible. Este tipo de columnas contiene una resina Shephadex™ G50 ADN grado F (tamaño de partícula fino), lo que significa que está diseñada para una eficiente separación y purificación de biomoléculas de mayor tamaño a una molécula de ADN que contenga al menos 20 pares de bases. Moléculas más grandes que el tamaño de poro de la resina, son excluidas del gel y eluyen primero. Moléculas intermedias penetran en la matriz dependiendo de su tamaño. La penetración en la matriz retarda el progreso a través de la columna, por lo que moléculas muy pequeñas eluyen por último [174]. Al ser las proteínas en comparación al ADN de mayor tamaño, con este tipo de columnas se asegura la completa elución de las proteínas plasmáticas, razón por la cual se consideró que la actividad en la fracción eluida correspondió a la fracción del complejo unida a proteínas. Por el contrario, la actividad retenida en la columna correspondió a la fracción del complejo libre. Se observó una unión a proteínas de  $32 \pm 7\%$  ( $n=9$ ). Este

valor correspondió a la media de todos los datos experimentales, ya que la unión a proteínas no varió significativamente con el tiempo.

### 5.3.3.2. Estudio en células MCF-7

Se realizaron estudios *in vitro* utilizando la línea celular MCF-7, con el mismo propósito y de la misma forma a lo explicado en el punto 2.3.3.

Se estudió la unión de **C3** a células en función de la actividad utilizada en el experimento. Como se muestra en la figura 147, teniendo en cuenta los errores experimentales, el porcentaje de unión no presentó variación con la actividad de **C3**. Por lo tanto, se decidió realizar el siguiente ensayo estudiando la variación de la unión con respecto al tiempo con la actividad más baja: 10  $\mu\text{Ci}$ .

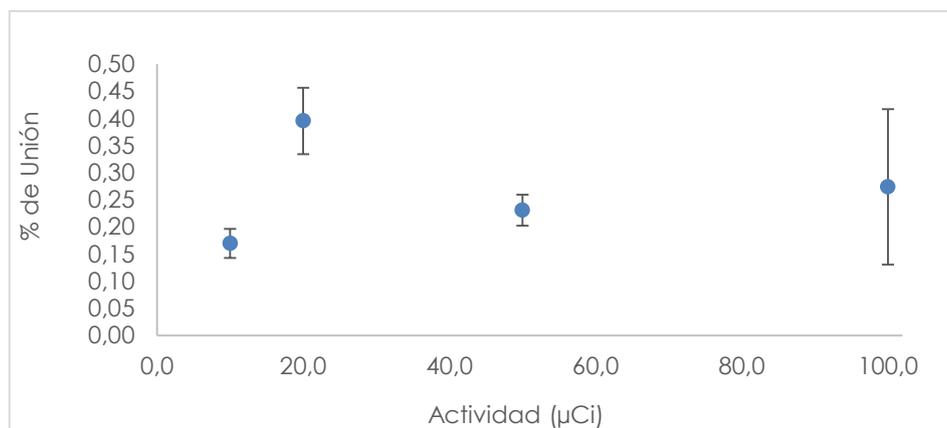


Figura 147: Gráfico de actividad de **C3** vs. % de unión luego de una hora de incubación. Resultados expresados como promedio de % de unión con respecto a la actividad de **C3** incubada para  $n=3$  excepto para 20  $\mu\text{Ci}$  en donde  $n=2$ .

En el ensayo de unión dependiente del tiempo se estudió si la unión a células es constante con el paso del tiempo. Como se muestra en la figura 148 el porcentaje de unión de **C3** no varió con respecto al tiempo, por lo que promediaron todos los valores obtenidos, resultando el % de unión en  $0,10 \pm 0,02$ . El valor obtenido resultó ser marcadamente menor al obtenido con el estándar  $^{18}\text{F}$ FES ( $6,3 \pm 0,4$  %), permitiendo concluir que el complejo **C3** no presentó unión a células MCF-7.

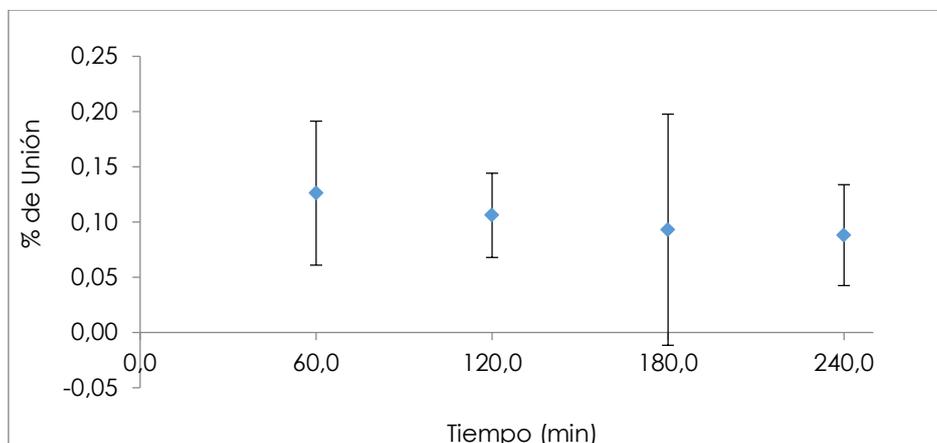


Figura 148: Gráfico de % de unión vs. tiempo de incubación. Resultados expresados como promedio de % de unión con respecto a la actividad de **C3** incubada para  $n=3$ .

Se plantea como posible hipótesis que la lipofilidad del complejo fue la causa de la ausencia de captación en células, ya se encuentra por fuera del rango óptimo para atravesar membranas biológicas. Es importante dejar en claro que el estradiol interacciona con el RE dentro de la célula y no en su superficie, por lo que el complejo necesariamente debe atravesar la membrana de la célula para unirse al RE. Sin embargo, otra posible causa de la baja captación podría ser resultado de la formación del complejo  $^{99m}\text{Tc}$  "4+1" hace que el farmacóforo pierda la afinidad por el RE. Para corroborar esto último se podrían realizar en un futuro ensayos en RE aislados.

Con el objetivo de modificar el comportamiento fisicoquímico y biológico del complejo de Tc(III) "4+1", se planteó la opción de variar el coligando utilizado buscando optimizar dicho comportamiento y así eventualmente aumentar la captación en células. En el presente trabajo se empleó un coligando tetradentado que contenía tres grupos ácidos carboxílicos (grupos funcionales hidrofílicos), por lo que era de esperarse el resultado de baja lipofilidad obtenido. El uso de un coligando con características más apolares podría aumentar el valor de  $\log P_{o/w}$  del complejo, logrando que el mismo se encuentre en el rango establecido para poder atravesar barreras biológicas y así mejorar la captación en células MCF-7. En la figura 149 se muestran las estructuras de posibles coligandos más apolares en comparación al  $\text{NS}_3(\text{COOH})_3$  que podrían ser empleados. Es importante destacar que el uso de un coligando tetradentado muy apolar podría traer como consecuencia un valor de  $\log P_{o/w}$  del complejo muy elevado, generando problemas con la depuración sanguínea y eliminación del trazador.

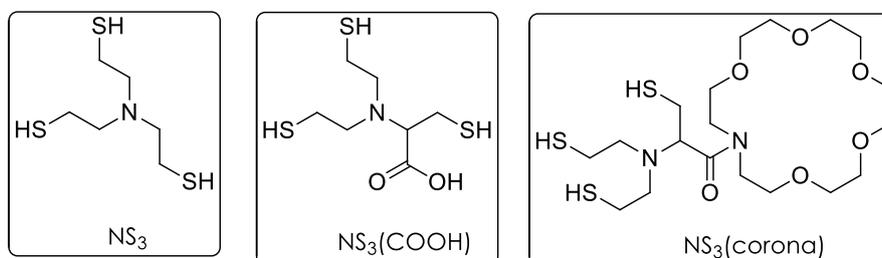


Figura 149: Estructura de algunos posibles coligandos con menor polaridad que el  $\text{NS}_3(\text{COOH})_3$ .

Por otro lado, es sabido que la metodología de marcación utilizada para combinar el Tc con el ligando de interés tiene gran influencia sobre el comportamiento fisicoquímico y biológico del compuesto resultante [175, 176]. Por lo tanto y en búsqueda de mejorar la captación celular, se podría utilizar el mismo ligando monodentado para la formación de un complejo tricarbónico de Tc(I)  $[\text{Tc}(\text{CO})_3\text{L}]$ . El ligando monodentado derivado de estradiol ocuparía una de las tres posiciones lábiles, las restantes dos posiciones pueden ser simultáneamente ocupadas por un ligando bidentado. Una opción podría ser el uso de acetilacetona como ligando bidentado para formar un complejo tricarbónico de tipo "2+1" como se muestra en la figura 150 [177].

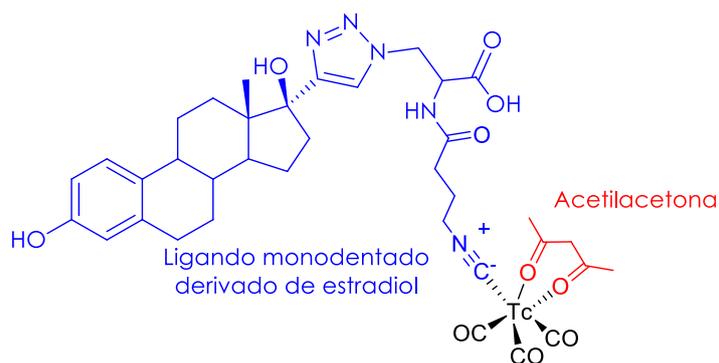


Figura 150: Estructura propuesta para un complejo tricarbónico de tipo "2+1" a ensayar a futuro.

Como resultado de la baja captación en células, se decidió no continuar con los ensayos *in vivo* en animales de experimentación, quedando demostrada la importancia de realizar en primer lugar los estudios *in vitro* de un potencial radiotrazador.

## 6) CONCLUSIONES

---

En el marco de la Maestría se logró optimizar la síntesis, purificación y formulación de [ $^{18}\text{F}$ ]FES, radiofármaco considerado referencia para diagnóstico de cáncer de mama RE+, en un módulo automatizado de síntesis Synthra RNplus Research. Se obtuvo [ $^{18}\text{F}$ ]FES con una excelente pureza radioquímica y un muy buen rendimiento de síntesis, que cumplió las especificaciones del control de calidad correspondientes a un radiofármaco inyectable, resultando ser estable en la formulación final durante al menos 4 horas. Este resultado se considera un aporte relevante, tanto para el grupo de investigación en cáncer de mama del Área de Radioquímica de la Facultad de Química como para CUDIM. Se permitió que el grupo de investigación cuente con dicho radiofármaco para poder realizar comparaciones contra potenciales radiotrazadores, que fueron investigados y serán desarrollados a futuro. Por otro lado, para CUDIM se posibilitó su posible uso futuro a nivel clínico, lo que constituye un gran aporte en el diagnóstico de cáncer de mama RE+ para nuestro país.

También se determinó la unión a células de tumor de mama RE+ utilizando un método desarrollado por nuestro grupo de trabajo, logrando así validar el mismo para su uso como método de evaluación de potenciales radiotrazadores para Imagenología Molecular en cáncer de mama RE+. El resultado obtenido fue concordante con estudios previos bajo las mismas condiciones utilizando al ligando natural del RE marcado con tritio (estradiol tritado).

Asimismo, en el presente trabajo se estudió un potencial radiotrazador de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  para diagnóstico de cáncer de mama RE+. La marcación del ligando monodentado derivado de estradiol se realizó mediante la formación de un complejo de  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{III})$  "4+1", en donde se utilizó al  $\text{NS}_3(\text{COOH})_3$  como ligando tetradentado para completar la esfera de coordinación del metal. Se obtuvo un complejo con una alta pureza radioquímica luego de la purificación por HPLC analítico. El complejo resultó ser estable en el medio de marcación y en plasma humano durante al menos 4 horas. Presentó moderada unión a proteínas plasmáticas y una lipofilicidad muy baja, por fuera del rango adecuado para atravesar barreras biológicas. La unión a células tumorales RE+ fue muy baja en comparación al estándar [ $^{18}\text{F}$ ]FES, lo cual se atribuye con el resultado de lipofilicidad obtenido. Se planteó como hipótesis que la gran hidrofiliicidad del complejo no permitió su ingreso a la célula, resultando en los bajos valores de unión obtenidos. Con el objetivo de confirmar esta hipótesis se propone variar el coligando tetradentado, lo que permitiría moderar la lipofilicidad del complejo, hasta llegar a un valor que se encuentre dentro del rango aceptado para atravesar barreras biológicas. Al mismo tiempo, sería muy enriquecedor trabajar en la formación de otro tipo de complejos que contengan a **L3** como ligando monodentado en su estructura. Esto permitiría modular el comportamiento tanto *in vitro* como *in vivo* del complejo y posiblemente se lograra mejorar las características fisicoquímicas y su correspondiente captación celular.

A excepción de los estudios *in vivo*, en el presente trabajo se llevaron a cabo todas las etapas básicas del desarrollo de un radiofármaco, desde la selección del farmacóforo y síntesis de ligandos, selección del radionucleido, procesos de marcación y estudios *in vitro*.

## 7) BIBLIOGRAFÍA

---

- [1] Aecc.es. Asociación Española Contra el Cáncer. ¿Qué es el cáncer? [consulta: 04/04/2020]. Disponible en: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/que-es-cancer>.
- [2] Cancer.org. American Cancer Society. ¿Qué es el cancer? [consulta: 04/04/2020]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>.
- [3] Cancer.gov. National Cancer Institute. ¿What is cáncer? [consulta: 04/04/2020]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#related-diseases>.
- [4] Pierce, B. A. Genética / Genetics: Un Enfoque Conceptual / A Conceptual Approach, 3a. ed.; Editorial Médica Panamericana, D.L.: Buenos Aires, Madrid., 2009.
- [5] Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A., Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians 68, 394-424 (2018).
- [6] Who.int. World Heart Organization. Cancer. [consulta: 08/04/2020]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- [7] Cancer.org. Global Cancer. [consulta: 08/04/2020]. Disponible en: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/global-cancer-facts-and-figures/global-cancer-facts-and-figures-4th-edition.pdf>
- [8] Gco.iarc. World Heart Organization. Cancer today. [consulta: 09/04/20]. Disponible en: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=population&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=7&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0&population\\_group\\_id=](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_id=).
- [9] Gub.uy. Ministerio de Salud Pública. 4 de febrero Día Mundial contra el Cáncer. [consulta: 09/04/2020]. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/noticias/4-de-febrero-dia-mundial-contra-el-cancer>.
- [10] Fernández J., Ugalde C. La glándula mamaria, embriología, histología, anatomía y una de sus principales patologías, el cáncer de mama. Revista Médica de Costa Rica y Centroamerica LXIX (602) 317-320 (2012).
- [11] Geicam.org. Grupo Geicam de Investigación en Cáncer de Mama. [consulta: 09/04/2020]. Disponible en: <https://www.geicam.org/cancer-de-mama/tengo-cancer-de-mama/conoce-mejor-tu-enfermedad/tipos-de-tumores>.
- [12] Breastcancer.org. ¿Qué es el cáncer de mama?. [consulta: 12/04/2020]. Disponible en:

[https://www.breastcancer.org/es/sintomas/cancer\\_de\\_mama/que\\_es\\_cancer\\_mama#Estadios](https://www.breastcancer.org/es/sintomas/cancer_de_mama/que_es_cancer_mama#Estadios).

[13] Pollán M. Epidemiology of breast cancer in young women. *Breast Cancer Res Treat* 123, 3-6 (2010).

[14] Benz C. Impact of aging on the biology of breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 66, 65-74 (2008).

[15] Samphao S., Wheeler A.J., Rafferty E., Michaelson J.S., Specht M.C., Gadd M.A., Hughes K.S., Smith B. Diagnosis of breast cancer in women age 40 and younger: delays in diagnosis result from underuse of genetic testing and breast imaging. *The American Journal of Surgery* 198, 538-543 (2009).

[16] Dai X., Xiang L., Li T., Bai Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *Journal of Cancer* 7 (10), 1281-1294 (2016).

[17] Wcrf.org. World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. Breast Cancer Statistics. [consulta: 10/06/2020]. Disponible en: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/breast-cancer-statistics>.

[18] Paho.org. Organización Panamericana de la Salud. Situación del Control del Cáncer de Mama en Uruguay. [consulta: 10/06/2020]. Disponible en: [https://www.paho.org/uru/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1338:situacion-del-control-del-cancer-de-mama-en-uruguay&Itemid=451](https://www.paho.org/uru/index.php?option=com_content&view=article&id=1338:situacion-del-control-del-cancer-de-mama-en-uruguay&Itemid=451).

[19] Comisión contra el Cáncer. CANCER DE MAMA (C50) – Mujeres EN URUGUAY. Disponible en: <https://www.comisioncancer.org.uy>

[20] Cuerda F.C. Factores de riesgo en Ginecología Oncológica. *Progresos de Obstetricia y Ginecología* 42 (90), 9065-9088 (1999).

[21] Cancer.gov. Instituto Nacional del Cáncer. Factores de riesgo del cáncer de seno relacionados con el estilo de vida. [consulta: 22/04/2020]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/riesgos-y-prevencion/factores-de-riesgo-para-el-cancer-de-seno-relacionados-con-el-estilo-de-vida.html>.

[22] Cdc.gov. Centros para el Control y Prevención de enfermedades. ¿Cuáles son los factores de riesgo para el cáncer de mama?. [consulta: 24/04/2020]. Disponible en: [https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic\\_info/risk\\_factors.htm](https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/risk_factors.htm).

[23] Cancer.gov. Instituto Nacional del Cancer. Cáncer de mama invasivo. [consulta: 26/04/2020]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/cancer-de-mama-invasivo>.

[24] Romero A., Osuna J.F., Candanedo F, Ramirez M., Peñuelas J.E. Cáncer de mama: Entidad Patológica de Biología Heterogénea. *Arch. Salud Sin* 8 (3), 109-116 (2014).

- [25] Breastcancer.org. Cáncer de mama invasivo o no invasivo. [consulta: 28/04/2020]. Disponible en: <https://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostico/invasivo>.
- [26] Fragomeni S.M., Sciallis A., Jeruss J.S. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 27, 95-120 (2018).
- [27] ScienceDirect.com. Immunohistochemistry. [consulta: 26/03/2020]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/immunohistochemistry>.
- [28] Cancer.org. American Cancer Society. Pruebas para la expresión genética del cáncer de seno. [consulta: 30/04/2020]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/pruebas-para-la-expresion-genetica-del-cancer-de-seno>.
- [29] Arrechea M.A., García F., Iturriagagoitia A., Ibáñez B., Santamaría M., Guillén F. Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas. *An. Sist. Sanit. Navar.* 34 (2), 219-233 (2011).
- [30] Rakha E. A., Reis-Filho J. S., Ellis I. O. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 120, 293-308 (2010).
- [31] Breastcancer.org. Los receptores de hormonas y su función. [consulta: 02/05/2020]. Disponible en: [https://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostico/estado\\_hormonal/receptores](https://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostico/estado_hormonal/receptores).
- [32] Demayo F. J., Zhao B., Takamoto N., Tsai S. Y. Mechanisms of Action of Estrogen and Progesterone.
- [33] Espinoza I. R., Garza C., León O. A., Álvarez L. A., Cruz J. C., Bernal E. Cáncer de mama con receptores hormonales positivos: tratamiento adyuvante, primera línea en cáncer metastásico y nuevas estrategias (inhibición de mTOR). *Sociedad Mexicana de Oncología* (2015).
- [34] Dero B.J., Korach K.S. Estrogen receptor and human disease. *The Journal of Clinical Investigation* 116, 561-570 (2006).
- [35] Noriega-Reyes Y., McCarron E. L. Correguladores del receptor de estrógenos y su implicación en el cáncer de mamario. *Noriega y Langley, Cancerología* 3, 29-40 (2008).
- [36] Cópola F., Nader J., Aguirre R. Metabolismo de los estrógenos endógenos y cáncer de mama. *Rev. Med. Urug.* Vol 21, versión On-line ISSN 1688-0390 (2005).
- [37] Coba N.D. Técnicas analíticas utilizadas para la detección y confirmación de esteroides anabólicos androgénicos en dopaje deportivo. México, Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza. Disponible en: [https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis\\_nicolas\\_coba.pdf](https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_nicolas_coba.pdf).

- [38] Efectos del estradiol y otros compuestos estrogénicos sobre la expresión de genes asociados a la longevidad. Juan Gambini Buchon. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10803/9912>.
- [39] Ranney R. E. Comparative metabolism of 17 $\alpha$ -ethynyl steroids used in oral contraceptives. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 3, 1-2 (2009).
- [40] Jensen E. V., Jacobson H. I., Walf A. A., Frye C. A. Estrogen Action: A historic perspective on the implications of considering alternative approaches. *Physiology & Behavior* 99, 151-162 (2010).
- [41] Green S., Walter P., Kumar V., Krust A., Bornert J. M., Argos P., Chambon P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature Publishing Group* 320, 134-139 (1986).
- [42] Mosselman S., Polman J., Dijkema R. Er $\beta$ : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters* 392, 49-53 (1996).
- [43] Brzozowski A. M., Pike A. C. W., Dauter Z., Hubbard R. E., Bonn T., Engström O., Öhman L., Greene G., Gustafsson J., Carlquist M. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753-758 (1997).
- [44] Paterni I., Granchi C., Katzenellenbogen J. A., Minutolo F. Estrogen receptors alpha (ER $\alpha$ ) and beta (ER $\beta$ ): Subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids* (2014).
- [45] Clarke R. B., Anderson E., Howell A. Steroid receptors in human breast Cancer. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* Vol.15 No.7, 316-323 (2004).
- [46] Bardin A., Boulle N., Lazennec G., Vignon F., Pujol P. Loss of ER $\beta$  expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocrine Related Cancer* 11, 537-551 (2004).
- [47] Paruthiyil S., Parmar H., Kerekatte V., Cunha G. R., Firestone G. L., Leitman D. C. Estrogen Receptor Inhibits Human Breast Cancer Cell Proliferation and Tumor Formation by Causing a G2 Cell Cycle Arrest. *Cancer Research* 64, 423-428 (2004).
- [48] Dero B.J., Korach K.S. Estrogen receptor and human disease. *The Journal of Clinical Investigation* 116, 561-570 (2006).
- [49] Thomas P., Pang Y., Filardo E.J., Dong J. Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. *Endocrinology* 146, 624-632 (2004).
- [50] Sheridan R.P., Ramaswamy N., Rusinko A., Bauman N., Haraki K.S., Venkataraghavan R. A System for Three-Dimensional Substructure Searching. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 29, 255-260 (1989).

- [51] Keasling H. H., Schueler F. W. The Relationship between Estrogenic Action and Chemical Constitution in a Group of Azomethine Derivatives. Journal of the American Pharmaceutical Association.
- [52] Oliveira M.C., Neto C., Morais R., Thiemann T. Steroid Receptor Ligands for Breast Cancer Targeting: An Insight into Their Potencial Role As Pet Imaging Agents. Current Medical Chemistry 20 (2013), 222 - 245.
- [53] Cancer.org. American Cancer Society. Detección temprana y diagnóstico del cáncer de seno. [consulta: 22/04/2020]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/pruebas-de-deteccion-y-deteccion-temprana-del-cancer-de-seno.html>.
- [54] Radiologyinfo.org. Cáncer de seno. [consulta: 22/04/2020]. Disponible en: <https://www.radiologyinfo.org/sp/info.cfm?pg=breast-cancer>.
- [55] Cancer.org. American Cancer Society. Mamogramas [consulta: 22/04/2020]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/pruebas-de-deteccion-y-deteccion-temprana-del-cancer-de-seno/mamogramas>.
- [56] Cancer.org. American Cancer Society. Ecografía de Seno. [consulta: 22/04/2020]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/pruebas-de-deteccion-y-deteccion-temprana-del-cancer-de-seno/ecografia-del-seno>.
- [57] Cancer.org. American Cancer Society. Ecografía de Seno. [consulta: 22/04/2020]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/pruebas-de-deteccion-y-deteccion-temprana-del-cancer-de-seno/imagenes-por-resonancia-magnetica-de-los-senos>.
- [58] Cancer.org. American Cancer Society. Ecografía de Seno. [consulta: 22/04/2020]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/pruebas-de-deteccion-y-deteccion-temprana-del-cancer-de-seno/biopsia-del-seno>.
- [59] Badawi Ramsey D. Nuclear medicine. Physics Education, 452 – 459 (2001).
- [60] Saha Gopal B. Radiopharmaceuticals and Instruments. Fundamentals of Nuclear Pharmacy Second Edition. 67 – 86.
- [61] Verdera E. Silvia, Gomez de Castiglia. Radiofármacos Terapéuticos. Asociación Latinoamericana de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear (2007).
- [62] Navarro Gallego R. Radiofármacos como Agentes Terapéuticos. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (2018).
- [63] Chain Y., Illanes L. Radiofármacos en medicina nuclear, Fundamentos y aplicación clínica. Editorial de la Universidad de la Plata (2015).
- [64] Liu S., Edwards S. <sup>99m</sup>Tc-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals. Chem. Rev. 99, 2235-2268 (1999).

- [65] Liu S. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. *Chemical Society Reviews* 33, 445-446 (2004).
- [66] Rey Ana M. Estrategias de marcación. Repartido teórico correspondiente al curso de Radiofarmacia, Facultad de Química, Udelar (2007).
- [67] Rey Ana M. Radiofarmacos de Diagnóstico. Repartido teórico correspondiente al curso de Radiofarmacia, Facultad de Química, Udelar.
- [68] Saleh, T. B. Radiopharmacy: Basics. In *Basic Sciences of Nuclear Medicine*; pp 25–39, (2011).
- [69] Kiesewetter D.O., Kilbourn M.R., Landvatter S.W., Heiman D.F., Katzenellenbogen J.A., Welch M.J. Preparation of four fluorine-18-labeled estrogens and their selective uptakes in target tissues of immature rats. *J. Nucl. Med.* 25, 1212-1221 (1984).
- [70] Kiesewetter D.O., Katzenellenbogen J.A., Kilbourn M.R., Welch M.J. Synthesis of 16-Fluoroestrogens by Unusually Facile Fluoride Ion Displacement Reactions: Prospects for the Preparation of Fluorine-18 Labeled Estrogens. *J. Org. Chem.* 49, 4900-4905 (1984).
- [71] Jonson S.D., Bonasera T.A., Dehdashti F., Cristel M.E., Katzenellenbogen J.A., Welch M.J. Comparative Breast Tumor Imaging and Comparative in Vitro Metabolism of 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]Fluoroestradiol-17 $\beta$  and 16 $\beta$ -[<sup>18</sup>F]Fluoromoxestrol in Isolated Hepatocytes. *Nuclear Medicine & Biology* Vol. 26, 123-130 (1999).
- [72] Seimbille Y., Rousseau J., Bénard F., Morin C., Ali H., Avvakumov G., Hammond G.L., van Lier J.E. <sup>18</sup>F-Labeled difluoroestradiols: preparation and preclinical evaluation as estrogen receptor-binding radiopharmaceuticals. *Steroids* 67, 765-775 (2002).
- [73] Paquette M., Lavallée E., Phoenix S., Ouellet R., Senta H., van Lier J.E., Guérin B., Lecomte R., Turcotte E.E. Radiotracer 4FMFES in ER+ Breast Cancer Patients: an Ongoing Phase II Clinical Trial. *Journal of Nuclear Medicine* (2017).
- [74] Heesch A., Maurer J., Stickeler E., Beheshti M., Mottaghy F.M., Morgenroth A. Development of Radiotracers for Breast Cancer – The Tumor Microenvironment as an Emerging Target. *Cells* 9, 2334 (2020).
- [75] Seimbille Y., Bénard F., Rousseau J., Pepin E., Aliaga A., Tessier G., van Lier J.E. Impact on estrogen receptor binding and target tissue uptake of [<sup>18</sup>F]fluorine substitution at the 16 $\alpha$ -position of fulvestrant (Faslodex; ICI 182,780). *Nuclear Medicine & Biology* Vol. 31, 691-698 (2004).
- [76] Yang D., Timothy T., Tansey W., Kuang L., Reger G., Cherif A., Wright K.C., Moul R.G., Tilbury R.S., Chu K., Kim E.E., Wallace S. Halogenated Analogues of Tamoxifen: Synthesis, Receptor Assay, and Inhibition of MCF-7 Cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences* Vol. 81 No. 7, 622-625 (1992).

- [77] Yang D., Kuang L., Cherif A., Tansey W., Li C., Lin W., Liu C., Kim E., Wallace S. Synthesis of [<sup>18</sup>F]Fluoroalanine and [<sup>18</sup>F]FluoroTamoxifen for Imaging Breast Tumors. *Journal of Drug Targeting* Vol. 1, 259-267 (1993).
- [78] Inoue T., Kim E., Wallace S., Yang D.J., Wong F., Bassa P., Cherif A., Delpassand E., Buzdar A., Podoloff D.A. Positron Emission Tomography using [<sup>18</sup>F]fluorotamoxifen to Evaluate Therapeutic Responses in Patients with Breast Cancer: Preliminary Study. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* Vol. 11 No.4, 235-245 (1996).
- [79] Sugano S., Katzenellenbogen J.A. Synthesis of tetradentate bisamino-bisthiol complexes of oxorhenium(V) as structural mimics of steroids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 6, No. 4, 361-366 (1996).
- [80] Skaddan M.B, Katzenellenbogen J.A. Integrated "3+1" Oxorhenium(V) Complexes as Estrogen Mimics. *Bioconjugate Chem.* 10, 119-129 (1999).
- [81] Wüst F.R., Carlson K.E., Katzenellenbogen J.A., Spies H., Johannsen B. Synthesis and binding affinities of new 17 $\alpha$ -substituted estradiol-rhenium "n+1" mixed-ligand and thioether-carbonyl complexes. *Steroids* 63, 665-671 (1998).
- [82] Skaddan M.B, Wüst F.R., Katzenellenbogen J.A. Synthesis and Binding Affinities of Novel-Re-Containing 7 $\alpha$ -Substituted Estradiol Complexes: Models for Breast Cancer Imaging Agents. *J. Org. Chem.* 64, 8108-8121 (1999).
- [83] Xia X., Feng H., Li C., Qin C., Song Y., Zhang Y., Lan X. <sup>99m</sup>Tc-labeled estradiol as an estrogen receptor probe: Preparation and preclinical evaluation. *Nuclear Medicine and Biology* 43, 89-96 (2016).
- [84] Jaouen G., Top S., Vessières A., Pigeon P., Leclercq G., Laios I. First anti-oestrogen in the cyclopentadienylrhenium tricarbonyl series. Synthesis and study of antiproliferative effects. *The Royal Society of Chemistry*, 383-384 (2001).
- [85] Bigott H. M., Parent E., Luyt L., Katzenellenbogen J.A, Welch M.J. Design and synthesis of Functionalized Cyclopentadienyl Tricarbonylmetal Complexes for Technetium-94m PET Imaging of Estrogen Receptors. *Bioconjugate Chem.* 16, 255-264 (2005).
- [86] Tejería M.E., Giglio J., Dematteis S., Rey A. <sup>99m</sup>Tc-Development and characterization of a tricarbonyl-labelled estradiol derivative obtained by "Click Chemistry" with potential application in estrogen receptors imaging. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 1-7 (2017).
- [87] Tejería M.E., Giglio J., Fernández L., Rey A. Development and evaluation of a <sup>99m</sup>Tc(V)-nitrido complex derived from estradiol for breast cancer imaging. *Applied Radiation and Isotopes* 154, 108854 (2019).
- [88] Product Sheet MCF7 (ATCC® HTB-22®). Disponible en: [www.atcc.org](http://www.atcc.org)

- [89] Bejot R., Fowler T., Carroll L., Boldon S., Moore J.E., Declerck J., Gouverneur V., Fluorous Synthesis of  $^{18}\text{F}$  Radiotracers with the  $[\text{18F}]\text{Fluoride}$  Ion: Nucleophilic Fluorination as the Detagging Process, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 586-589.
- [90] Alauddin M. M. Positron emission tomography (PET) imaging with  $^{18}\text{F}$ -based radiotracers. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2 (1), 55-76 (2012).
- [91] Jacobson O., Kiesewetter D. O., Chen X. Fluorine- $^{18}$  Radiochemistry, Labeling Strategies and Synthetic Routes. *Bioconjugate Chem.* 26, 1-18 (2015).
- [92] Peterson L. M., Mankoff D. A., Lawton T., Yagle K., Schubert E. K., Stekhova S., Gown A., Link J. M., Tewson T., Krohn K. A. Quantitative Imaging of Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer with PET and  $^{18}\text{F}$ -Fluoroestradiol. *jnm.snmjournals.org*, March 23, (2020).
- [93] Eckelman W. The Application of Receptor Theory to Receptor-binding and Enzyme-binding Oncologic Radiopharmaceuticals. *Nucl. Med. Biol.* Vol 21 No. 5, 759-769 (1994).
- [94] Giglio J. Teórico Marcación con  $^{18}\text{F}$ , Curso de Radiofarmacia de la Facultad de Química, UdelaR (2017).
- [95] Coenen H, Elsinga P, Iwata, R. Fluorine-18 radiopharmaceuticals beyond [FDG] for use in oncology and neurosciences. *Nuclear Medicine and Biology*; 37: 727-740 (2010).
- [96] Alauddin M. M. Positron emission tomography (PET) imaging with  $^{18}\text{F}$ -based radiotracers. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2 (1), 55-76 (2012).
- [97] Coenen H., Ermert J.  $^{18}\text{F}$ -Labelling innovations and their potential for clinical application. Disponible en: [https://juser.fz-juelich.de/record/848310/files/18F-Labelling%20innovations%20revised%20version%202018.04.16\\_final.pdf](https://juser.fz-juelich.de/record/848310/files/18F-Labelling%20innovations%20revised%20version%202018.04.16_final.pdf) (2018).
- [98] Jacobson O., Kiesewetter D. O., Chen X. Fluorine- $^{18}$  Radiochemistry, Labeling Strategies and Synthetic Routes. *Bioconjugate Chem.* 26, 1-18 (2015).
- [99] Munnink T.H., Nagengast W.B., Brouwers A.H., Schröder C.P., Hospers G.A., Hooge M.N., van der Wall E., van Diest P.J., Vries E.G.E. Molecular Imaging of breast cancer. *The Breast* 18 S3, 66-73 (2009).
- [100] Scott Peter J.H., Hockley Brian G. *Radiochemical Syntheses: Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography*, Volume 1. Wiley. 69-80.
- [101] Signore A., Lauri C., Auletta S., Varani M., Onofrio L., Glaudemans A., Panzuto F., Marchetti P. Radiopharmaceuticals for Breast Cancer and Neuroendocrine Tumors: Two Examples of How Tissue Characterization May Influence the Choice of Therapy. *Cancers* 2020, 12, 78, 1-19 (2020).
- [102] Peterson L. M., Mankoff D. A., Lawton T., Yagle K., Schubert E. K., Stekhova S., Gown A., Link J. M., Tewson T., Krohn K. A. Quantitative Imaging of Estrogen Receptor

Expression in Breast Cancer with PET and  $^{18}\text{F}$ -Fluoroestradiol. *jnm.snmjournals.org* by on March 23, (2020).

[103] Dehdashti F., Mortimer J. E., Trinkaus K., Naughton M. J., Ellis M., Katzenellenbogen J.A., Welch M.J., Siegel B. A. PET-based estradiol challenge as a predictive biomarker of response to endocrine therapy in women with estrogen-receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 113: 509–517 (2009).

[104] Liao G. J., Clark A. S., Schubert E. K., Mankoff D. A. [ $^{18}\text{F}$ ]-Fluoroestradiol PET: Current Status and Potential Future Clinical Applications. *Journal of Nuclear Medicine*, published on June 15, (2016).

[105] Eckelman W. The Application of Receptor Theory to Receptor-binding and Enzyme-binding Oncologic Radiopharmaceuticals. *Nucl. Med. Biol.* Vol 21 No. 5, 759-769 (1994).

[106] Heesch A., Maurer J., Stickeler E., Beheshti M., Mottaghy F. M., Morgenroth A. Development of Radiotracers for Breast Cancer – The Tumor Microenvironment as an Emerging Target. *Cells* 9, 2334.

[107] ZIONEXA. Zionexa USA and PETNET solutions announce FDA approval of CERIANNA™ (Fluoroestradiol  $^{18}\text{F}$ ). [consulta: 15/01/2021]. Disponible en: <https://www.zionexa.com/2020/05/27/zionexa-usa-and-petnet-solutions-announce-fda-approval-of-cerianna-fluoroestradiol-f18/>.

[108] Fda.gov. CERIANNA (fluoroestradiol F 18). [consulta: 15/01/2021]. Disponible en: <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/drug-trial-snapshot-cerianna>.

[109] Zhou D, Lin M, Yasui N, Al-Qahtani MH, Dence CS, Schwarz S, et al. Optimization of the preparation of fluorine-18-labeled steroid receptor ligands 16 $\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroestradiol (FES), [ $^{18}\text{F}$ ]fluorofuranyl norprogesterone (FFNP), and 16 $\beta$ -[ $^{18}\text{F}$ ]fluoro-5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (FDHT) as radiopharmaceuticals. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 57; 371-377 (2014).

[110] Brodack J. W., Kilbourn M. R., Welch M. J., Katzenellenbogen J. A. Automated Production of Several Positron-Emitting Radiopharmaceuticals Using a Single Laboratory Robot. *Applied Radiation Isotopes* Vol. 39 No. 7, 689-698 (1988).

[111] Brodack J. W., Kilbourn M. R., Welch M. J., Katzenellenbogen J. A. Application of Robotics to Radiopharmaceutical Preparation: Controlled Synthesis of Fluorine-18 16 $\alpha$ -Fluoroestradiol-17 $\beta$ . *The Journal of Nuclear Medicine* 27, 714-721 (1986).

[112] Lim J. L., Zheng L., Berridge M. S., Tewson T. J. The Use of 3-Methoxymethyl-16 $\beta$ , 17 $\beta$ -Epiestriol-O-Cyclic Sulfone as the Precursor in the Synthesis of F18 16 $\alpha$ -Fluoroestradiol. *Nuclear Medicine & Biology*, Vol.23, 911-915 (1996).

- [113] Römer J., Füchtner F., Steinbach J., Johannsen B. Automated Production of 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]Fluoroestradiol for Breast Cancer Imaging. *Nuclear Medicine & Biology* Vol. 26, 473–479, (1999).
- [114] Sasaki M., Fukumura T., Kuwabara Y., Yoshida T., Nakagawa M., Ichiya Y., Masuda K. Biodistribution and breast tumor uptake of 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]-fluoro-17 $\beta$ -estradiol in rat. *Annals of Nuclear Medicine* Vol. 14 No. 2, 127-130 (2000).
- [115] Tewson T.J., Mankoff D.A., Peterson L.M., Woo I., Petra P. Interactions of 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]-Fluoroestradiol (FES) with Sex Steroid Binding Protein (SBP). *Nuclear Medicine & Biology*, vol. 26, 905-913 (1999).
- [116] Katzenellenbogen J.A., Mathias C.J., Vanbrocklin H.F., Brodack J.W., Welch M.J. *Nucl. Med. Biol.* Vol. 20 No. 6, 735-745 (1993).
- [117] Kumar P., Mercer J., Doerksin C., Tonkin K., McEwan A.J.B. Clinical production, stability studies and PET imaging with 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]fluoroestradiol ([<sup>18</sup>F]FES) in ER-positive breast cancer. *J. Pharm Pharmaceut Sci* 10 (2), 256s-265s (2007).
- [118] Dixit M., Shi J., Wei L., Afari G., Bhattacharyya S. Synthesis of Clinical-Grade [<sup>18</sup>F]-Fluoroestradiol as a Surrogate PET Biomarker for the Evaluation of Estrogen Receptor-Targeting Therapeutic Drug. *International Journal of Molecular Imaging* Vol. 13, 1-10 (2013).
- [119] Mankoff D.A., Peterson L.M., Tewson T.J., Link J.M., Gralow J.R., Graham M.M., Krohn K. [<sup>18</sup>F]Fluoroestradiol Radiation Dosimetry in Human PET Studies. *The Journal of Nuclear Medicine* Vol. 42 No. 4, 679-684 (2001).
- [120] Boschi S., Lodi F., Malizia C., Cicoria G., Marengo M. Automation synthesis modules review. *Apply .Radiat. Isotopes* (2012).
- [121] Aerts J., Ballinger J. R., Behe M., Decristoforo C., Elsinga P. H., Faivre-Chauvet A., Mindt T. L., Peitl P. K., Todoblete de doletee S. C., Koziorowski J. Guidance on current good radiopharmacy practice for the small-scale preparation of radiopharmaceuticals using automated modules: a European perspective. *J. Label Compd. Radiopharm* 57, 615–620 (2014).
- [122] Specification of RNplus Research radiosynthesizer. Disponible en: <http://www.synthra.com/products/RNplus-Research.html>.
- [123] U.S. Pharmacopeia-National Formulary [USP 42 NF 37], Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, Inc; 2019. <467> General chapter Residual Solvents; 2019, Volume 1.
- [124] U.S. Pharmacopeia-National Formulary [USP 42 NF 37], Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, Inc; 2019. <71> Sterility Tests; 2019, Volume 1.
- [125] U.S. Pharmacopeia-National Formulary [USP 42 NF 37], Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, Inc; 2019. <85> Bacterial Endotoxins Test; 2019, Volume 1.

- [126] Perdomo R. Ensayo del lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL). *Rev Cubana Farm.* 38(1), (2004).
- [127] Mason N. S., Mathis C. A. Radiohalogens for PET Imaging. Chapter reproduced from Valk PE, Bailey DL, Townsend DW, Maisey MN. *Positron Emission Tomography: Basic Science and Clinical Practice*. Springer-Verlag, 217–236 (2003).
- [128] Knott K.E., Grätz D., Hübner S., Jütler S., Zankl C., Müller M. Simplified and automatic one-pot synthesis of 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]fluoroestradiol without high-performance liquid chromatography purification, *J. Label Compd. Radiopharm*, 54 749-753 (2011).
- [129] Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, Joseph L. Glajch. *Practical HPLC Method Development*. Second Edition. John Wiley & Son (1997).
- [130] Wang M., Glick-Wilson B.E., Zheng Q. Fully automated radiosynthesis and quality control of estrogen receptor targeting radiopharmaceutical 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]fluoroestradiol ([<sup>18</sup>F]FES) for human breast cancer imaging. *Applied Radiation and Isotopes* 160 (2020).
- [131] Jun Oh S., Chi D.Y., Mosdzianowski C., Kil H.S., Ryu J.S., Moon D.H. The automatic production of 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]fluoroestradiol using a conventional [<sup>18</sup>F]FDG module with a disposable cassette system. *Applied Radiation and Isotopes* 65, 676-681 (2005).
- [132] Shi J., Afari G., Bhattacharyya S. Rapid synthesis of [<sup>18</sup>F]-fluoroestradiol: remarkable advantage of microwaving over conventional heating. *J. Labelled Comp. Radiopharm* Vol. 57 No. 14, 730-736 (2014).
- [133] Fedorova O., Nikolaeva V., Krasikova R. Automated SPE-based synthesis of 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]fluoroestradiol without HPLC purification step. *Applied Radiation and Isotopes* (2018).
- [134] Oasis® WAX SPE Products for Strongly Acidic Compounds. Disponible en: [www.waters.com/oasis](http://www.waters.com/oasis).
- [135] Waters.com. Sep-Pak C18 Plus Light Cartridge. [consulta: 17/12/2020]. Disponible en: <https://www.waters.com/nextgen/xg/es/shop/sample-preparation--filtration/wat023501-sep-pak-c18-plus-light-cartridge-130-mg-sorbent-per-cartridge-55.html>.
- [136] Waters.com. Oasis HLB cartridges. Cares and use manual. Disponible en: [www.waters.com](http://www.waters.com).
- [137] Lee A.V., Oesterreich S., Davidson N.E. MCF-7 Cells-Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *JNCI J Natl Cancer Inst* 107 (7), (2015).
- [138] Banerjee S., Pillai M. R., Ramamoorthy N. Evolution of Tc-99m in Diagnostic Radiopharmaceuticals. *Seminars in Nuclear Medicine* No 4, 266-277 (2001).

- [139] Tucker W., Greene M. W., Weiss A. J, Murrenhoff A. Methods of Preparation of Some Carrier-Free Radioisotopes Involving Sorption on Alumina. Amer. Nuclear Soc. (1958).
- [140] Zolle I. Performance and quality control of the  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  Generator. Technetium-99m Pharmaceuticals, 77-93.
- [141] Dantas A. L., Ribeiro B. S., Souza R. S., Lucena E. A., Dantas B. Optimization of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  measurement in  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  eluate samples using a scintillation detection system. Health Physics Volume 99 Number 4, 453-456 (2010).
- [142] Nock B., Maina T.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tetraamine-Coupled Peptides and Resulting Tc-Radioligands: An Effective Route for Receptor-Targeted Diagnostic Imaging of Human Tumors. Current Topics in Medicinal Chemistry 12, 2655-2666 (2012).
- [143]  $^{99\text{m}}\text{TcNCl}_4$ : Baldas J., Bonnyman J. Substitution reactions of a new route to a new  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  class of  $\gamma$ -radiopharmaceuticals. International Journal Applied Radiation Isotopes 36, 133-139 (1985).
- [144] Boschi A., Duatti A., Uccelli L. Development of technetium-99m and rhenium-188 radiopharmaceuticals containing a terminal metal-nitrido multiple bond of diagnosis and therapy. Topics in Current Chemistry 252, 85-115 (2005).
- [145] Braband H., Zahn T. I., Abram U. Synthesis and Structural Characterization of Cationic Rhenium(V) and Technetium(V) Dioxo Complexes Containing Four N-Heterocyclic Carbene Ligands. Inorg. Chem. 42, 6160-6162 (2003).
- [146] Goomer N. C., Kulkarni P. V., Constantinescu A., Antich P., Parkey R. W., Corbett J. R. Synthesis and Evaluation of a New Class of Technetium-99m Monocationic Radiotracers from Dithienyldiazalkanes. Nucl. Med. Biol. Vol. 21 No. 4, 657-662 (1994).
- [147] Abiraj K., Mansi R., Tamma M.L., Forrer F., Cescato R., Reubi J.C., Akyel K.G., Maecke H.R. Tetraamine-Derived Bifunctional Chelators for Technetium-99m Labelling: Synthesis, Bioconjugation and Evaluation as Targeted SPECT Imaging Probes for GRP-Receptor-Positive Tumours. Chem. Eur. J. 16, 2115-2124 (2010).
- [148] Kastner, M.E., Lindsay, M.J., Clarke, J. Synthesis and Structure of  $\text{trans-[}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{en})_2\text{]}^+$ . Inorg. Chem., 21: 2037-2040 (1982).
- [149] Parker, D., Roy, P.S. Synthesis and Characterization of Stable Rhenium(V) Dioxo Complexes with Acyclic Tetraamine Ligands,  $[\text{ReO}_2]^+$ . Inorg. Chem., 27(23): 4128-4131 (1988).
- [150] Murugesan S., Shetty S.J., Noronha O.P.D., Samuel A.M., Srivastava T.S., Nair CK.K., Kothari L. Technetium-99m-cyclam AK 2123: a novel marker for tumor hypoxia. Applied Radiation and Isotopes 54, 81-88 (2001).

- [151] Liu S., Edwards D.S., Harris A.R., Heminway S.J., Barrett J.A. Technetium Complexes of a Hydrazinonicotinamide-Conjugated Cyclic Peptide and 2-Hydrazinopyridine: Synthesis and Characterization. *Inorg. Chem.* 38, 1326-1335 (1999).
- [152] Nock., Nikolopoulou A., Chiotellis E., Loudos G., Maintas D., Reubi J. C., Maina T. [<sup>99m</sup>Tc]Demobesin 1, a novel potent bombesin analogue for GRP receptor-targeted tumour imaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* Vol. 30, No. 2, 247-258 (2003).
- [153] Dra. Ana M. Rey. Aplicación de nuevos cores de Tecnecio al diseño de Radiofármacos. Área de Radioquímica, Facultad de Química, Udelar. Consulta personal.
- [154] Maina T., Nock B., Nikolopoulou A., Sotiriou P., Loudos G., Maintas D., Cordopatis P., Chiotellis E. [<sup>99m</sup>Tc]Demotate, a new <sup>99m</sup>Tc-based [Tyr<sup>3</sup>]octreotate analogue for the detection of somatostatin receptor-positive tumours: synthesis and preclinical results. *European Journal of Nuclear Medicine* Vol. 29 No. 6, 742-753 (2002).
- [155] Nock., Nikolopoulou A., Chiotellis E., Reubi J. C., Maes V., Conrath P., Tourwé D., Maina T. Toward Stable N4-Modified Neurotensins for NTS1-Receptor-Targeted Tumor Imaging with <sup>99m</sup>Tc. *Journal of Medicinal Chemistry* Vol. 49 No. 15, 4767-4776 (2006).
- [156] Decristoforo C., Maina T., Nock B., Gabriel M., Cordopatis P., Moncayo R. <sup>99m</sup>Tc-Demotate 1: first data in tumour patients-results of a pilot/phase I study. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* Vol. 30 No. 9, 1211-1219 (2003).
- [157] Kunstler J., Seidel G., Pietzsch H. Efficient preparation of <sup>99m</sup>Tc(III)'4+1' mixed-ligand complexes for peptide labeling with high specific activity. *Applied Radiation and Isotopes* 68, 1728-1733 (2010).
- [158] Kunstler J., Seidel G., Bergmann R., Gniazdowska E., Walther M., Schiller E., Decristoforo C., Stephan H., Haubner R., Steinbach J., Pietzsch H. Novel <sup>99m</sup>Tc '4+1' peptide conjugates: Tuning the biodistribution by variation of coligands. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45, 3645-3655 (2010).
- [159] Pietzsch H., Gupta A., Syhre R., Leibnitz P., Spies H. Mixed-Ligand Technetium(III) Complexes with Tetradendate/Monodendate NS3/Isocyanide Coordination: A New Nonpolar Technetium Chelate System for the Design of Neutral and Lipophilic Complexes Stable in Vivo. *Bioconjugate Chem.* 12, 538-544 (2001).
- [160] Giglio, J., León, E., Rey, A., Künstler, J-U., Gniazdowska, E., Decristoforo, C., Pietzsch, H-J. <sup>99m</sup>Tc-labelled RGD-Peptides using the "4+1" mixed-ligand approach. En: "Technetium, rhenium and other metals in chemistry and Nuclear Medicine 7 p. 331". SGEEditoriali, Padova (2006).
- [161] Alberto R., Schibli R., Egli A., Schubiger A.P. A Novel Organometallic aqua complex of Technetium for the labeling of biomoléculas. Synthesis of [<sup>99m</sup>Tc(OH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> from [<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>]<sup>-</sup> in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand. *Journal of American Chemical Society* 120, 7987-7988 (1998).

- [162] Huisgen R. 1,3-Dipolare Cycloadditionen. *Angew. Chem.* 75, 604-637 (1996).
- [163] Hein C., Liu X., Wang D. Click Chemistry, A Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. *Pharmaceutical Research*, Vol. 25 No. 10, 2216-2230 (2008).
- [164] Tsao N., Chanda M., Dong-Fang Yu, Kurihara H., Zhang Y., Mendez R., J. Yang D.,  $^{99m}\text{Tc}$ -N4amG: Synthesis biodistribution and imaging in breast tumor-bearing rodents, *Applied Radiation and Isotopes* 72,105-113 (2013).
- [165] Zhang X., Teixeira V., Porcal W., Cabral P., Gambini J.P., Fernandez M., Gallazzi F., Quinn T.P. [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ] $^+$  and [ $^{99m}\text{TcO}_2$ ] $^+$  Radiolabeled Cyclic Melanotropin Peptides for Melanoma SPECT Imaging. *Current Radiopharmaceuticals* 7, 63-74 (2014).
- [166] Q.F. Teixeira V. Tesis Doctorado en Química. Desarrollo y Evaluación de nuevos  $^{99\text{Tc}}$ -Análogos de la hormona melanocito estimulante (alfa-MSH) como agentes de Imagenología Molecular en melanoma. Laboratorio de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias.
- [167] Wang G., Li C., Li J., Jia X. Catalyst-free water-mediated N-Boc deprotection. *Tetrahedron Letters* 50, 1438-1440 (2009).
- [168] Chau J., Ciufolini M.A. Bimolecular Oxidative Amidation of Phenols: 1-(Acetylamino)-4-oxo-2,5-cyclohexadiene-1-acetic acid, Methyl Ester. *Org. Synth.* 90, 190-199 (2013).
- [169] Tejería E. Informe PEDECIBA Marzo 2015 – Abril 2017, "Desarrollo y evaluación de complejos de metales de transición y ligandos derivados del estradiol con potencial aplicación en Medicina Nuclear". Consulta personal.
- [170] Drews A., Pietzsch H.J., Syhre R., Seifert S., Varnäs K., Hall H., Halldin C., Kraus W., Karlsson P., Johnsson C., Spies H., Johannsen B. Synthesis and biological evaluation of technetium(III) mixed-ligand complexes with high affinity for the cerebral 5-HT<sub>1A</sub> receptor and the alpha1-adrenergic receptor. *Nuclear Medicine and Biology* 29 389-398 (2002).
- [171] Giglio J., Fernández S., Pietzsch H., Dematties S., Moreno M., Pacheco J.P., Cerecetto H., Rey A. Synthesis, in vitro and in vivo characterization of novel  $^{99m}\text{Tc}$ - $^{4+1}$ -labeled 5-nitroimidazole derivatives as potential agents for imaging hypoxia. *Nuclear Medicine and Biology* 39, 679-686 (2012).
- [172] Aulton E. *Farmacología: Ciencia y diseño de formas farmacéuticas*. Ed. ELSEVIER, Madrid, España. 2004.
- [173] Schmidt S., Gonzalez D., Derendorf H. Significance of Protein Binding in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Journal of pharmaceutical sciences*, Vol. 99 No. 3, 1107-1122 (2010).

[174] yumpu.com. ilustra MicroSpin G-50 Columns. Product booklet GE Healthcare. Disponible en: <https://www.yumpu.com/en/document/read/41266956/illustra-microspin-g-50-columns-ge-healthcare-life-sciences>.

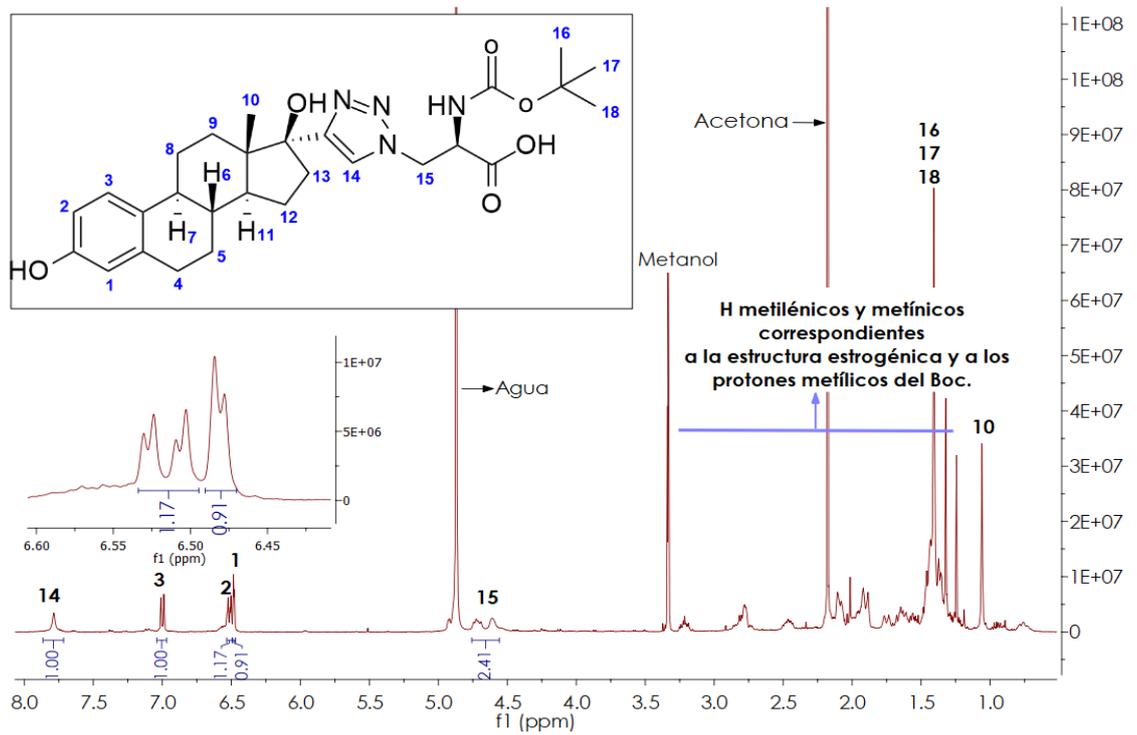
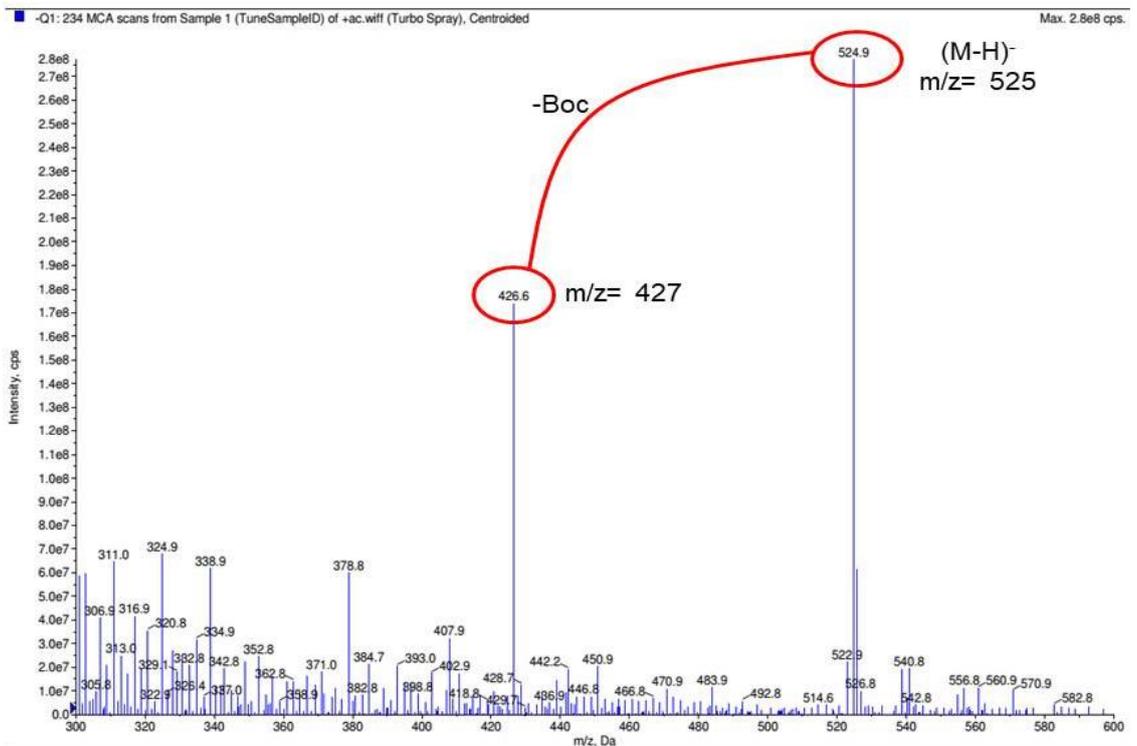
[175] Decristoforo C, Santos I, Pietzsch HJ, Duatti A, Smith CJ, Rey A, et al. Comparison of in vitro and in vivo properties of  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD peptides labelled using different novel Tc-cores. Q J Nucl Med Mol Imaging 51, 33-41 (2007).

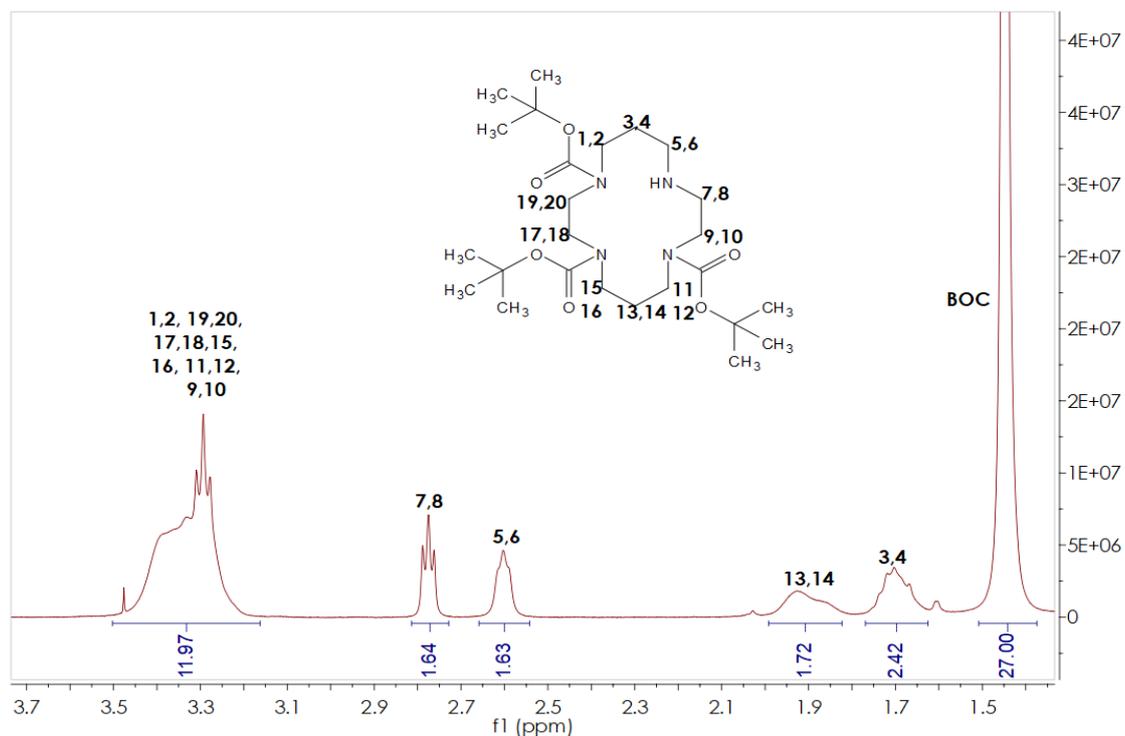
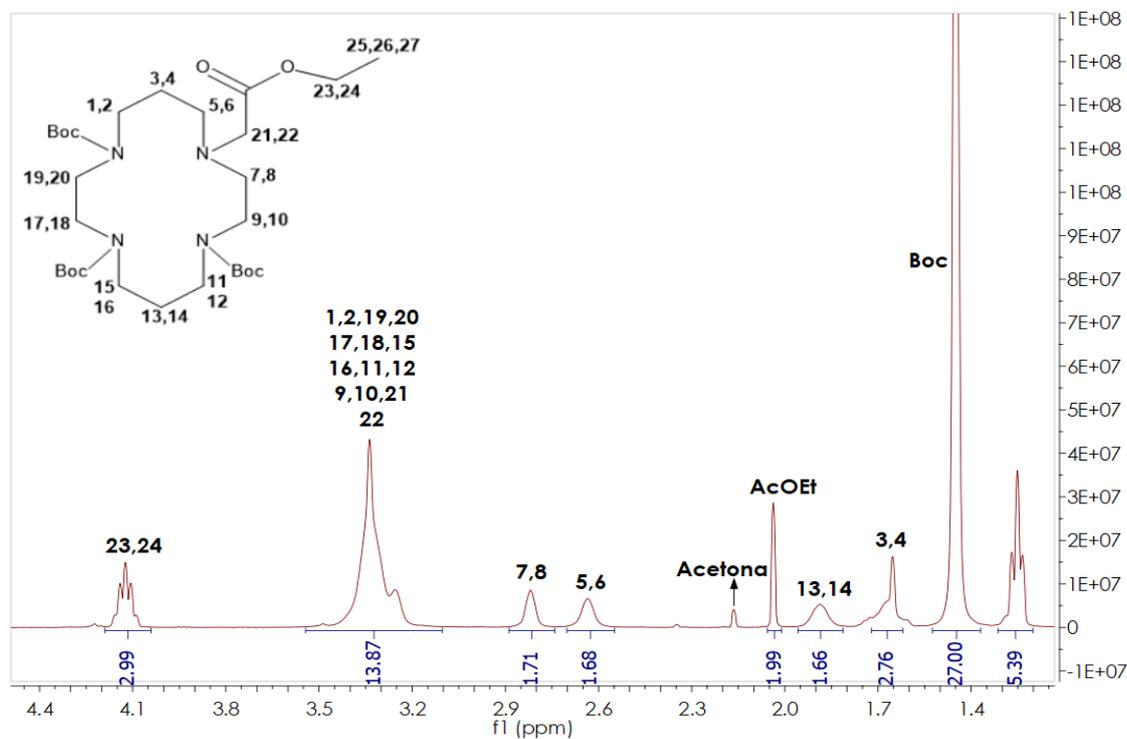
[176] Labelling of small biomolecules using novel Technetium-99m cores. IAEA Technical Report Series 458, IAEA, Vienna, 2007. Disponible en: ([http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/trs459\\_web.pdf](http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/trs459_web.pdf)).

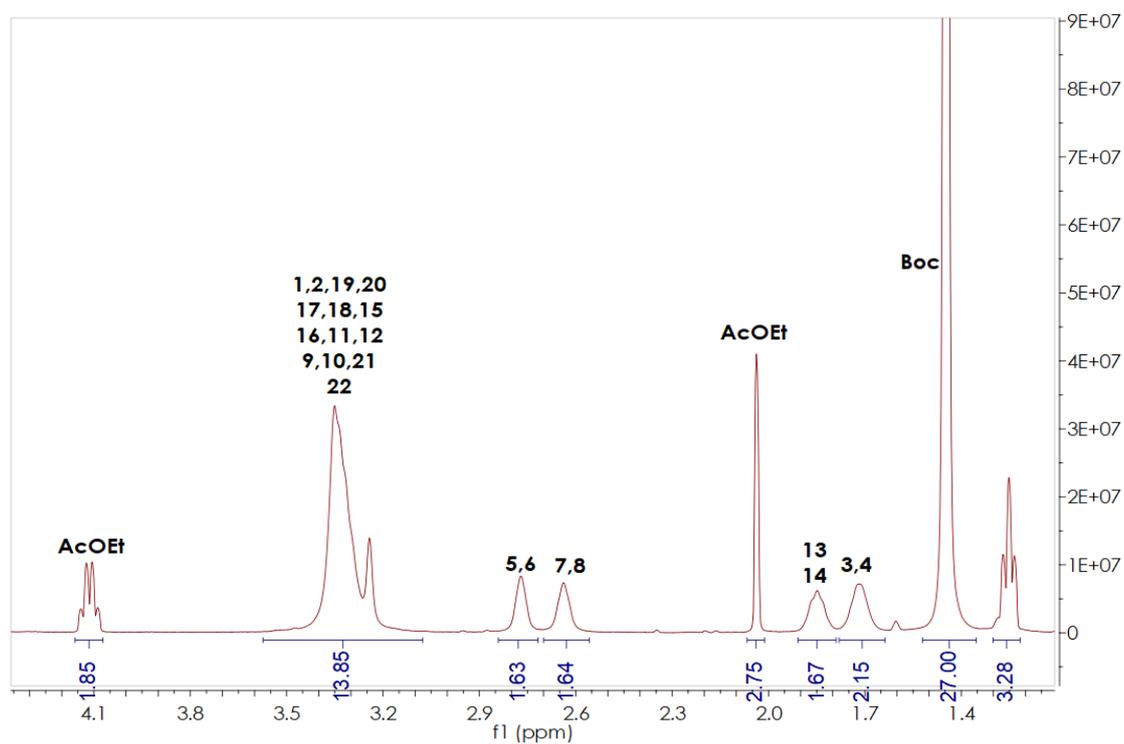
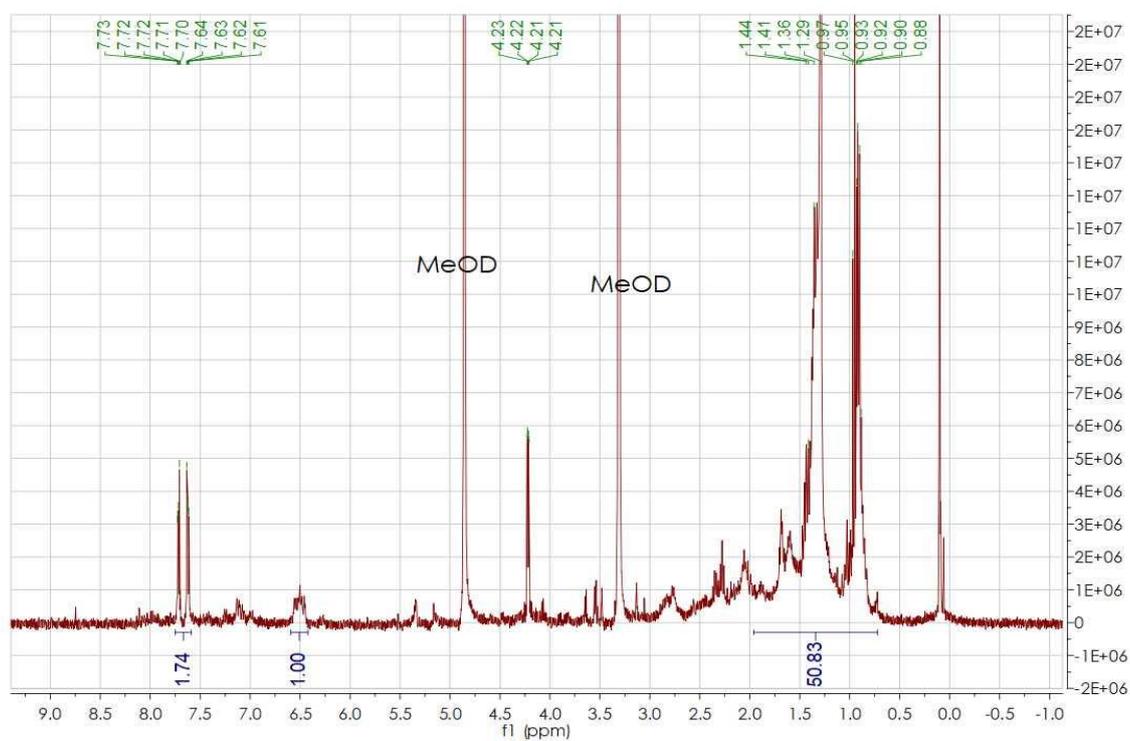
[177] Mundwiler S, Kundig M, Ortner K, et al. A new [2+1] mixed ligand concept based on  $^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3^+$ : a basic study. Dalton Trans; 7:1320-8 (2014).

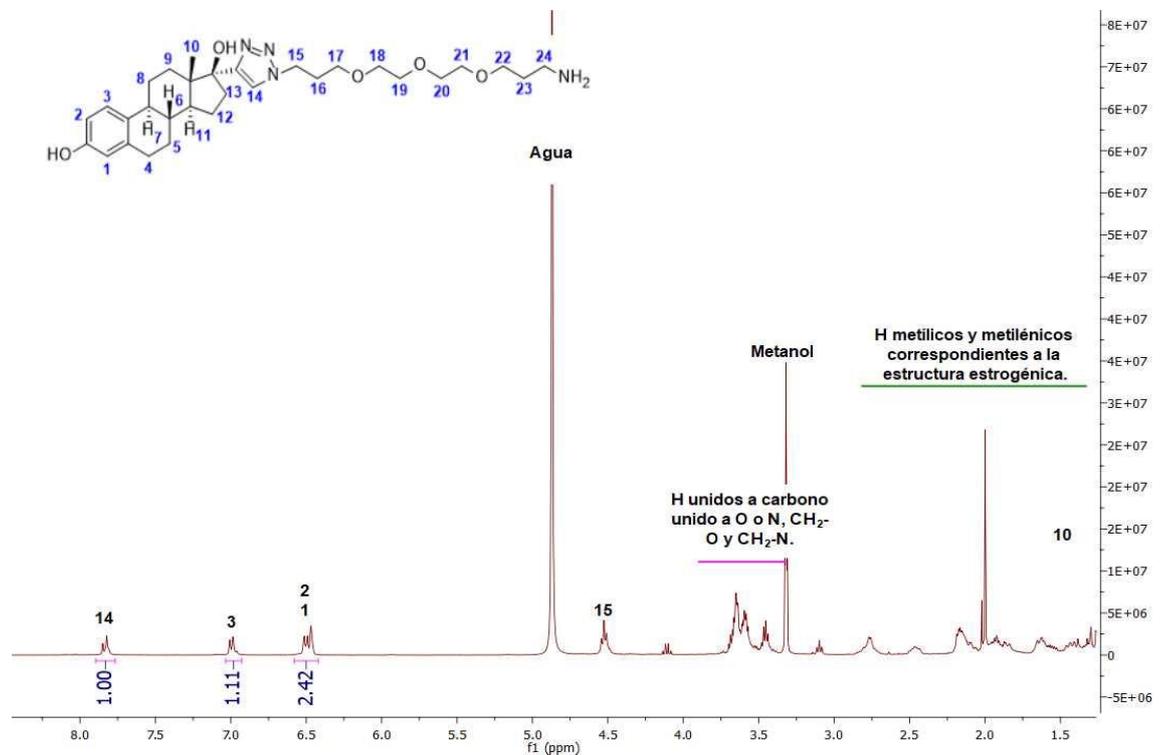
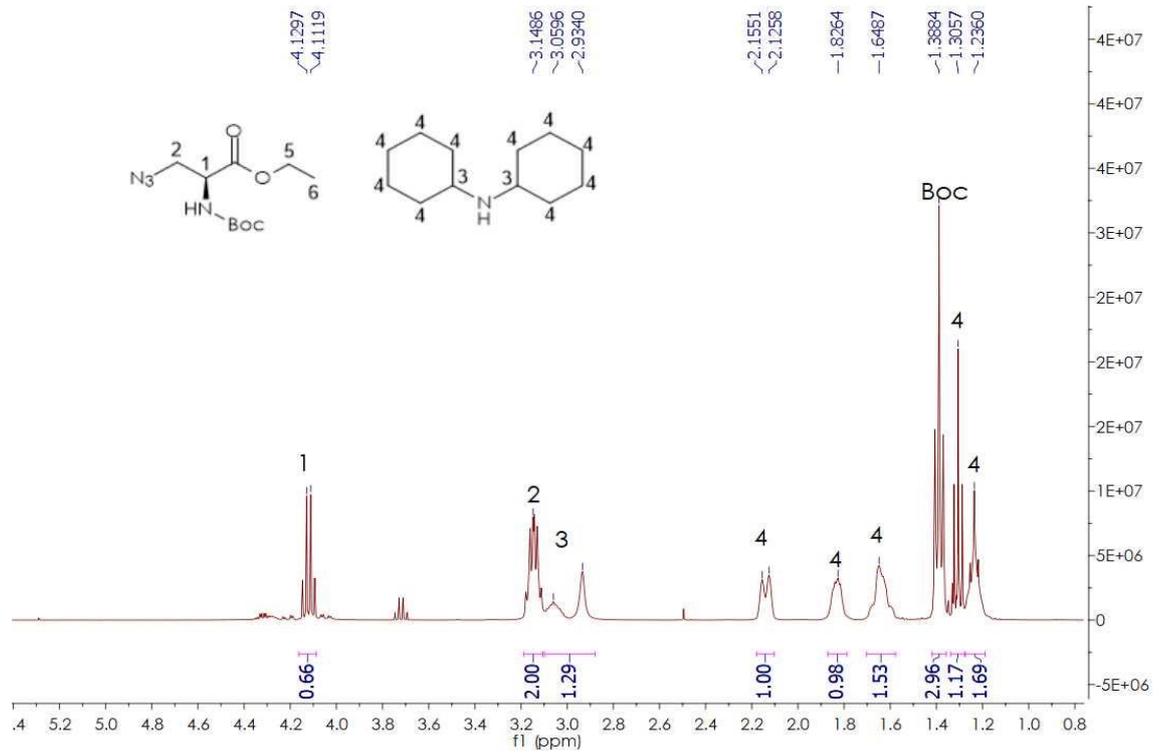
## 8) ANEXOS

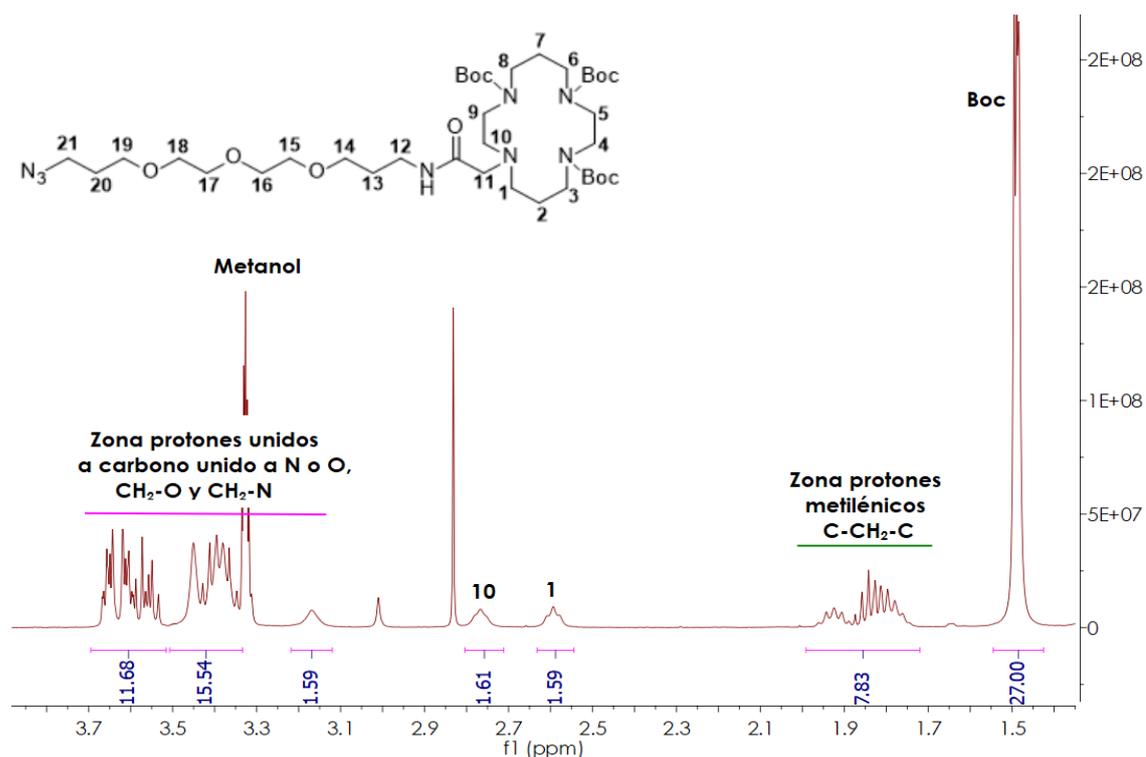
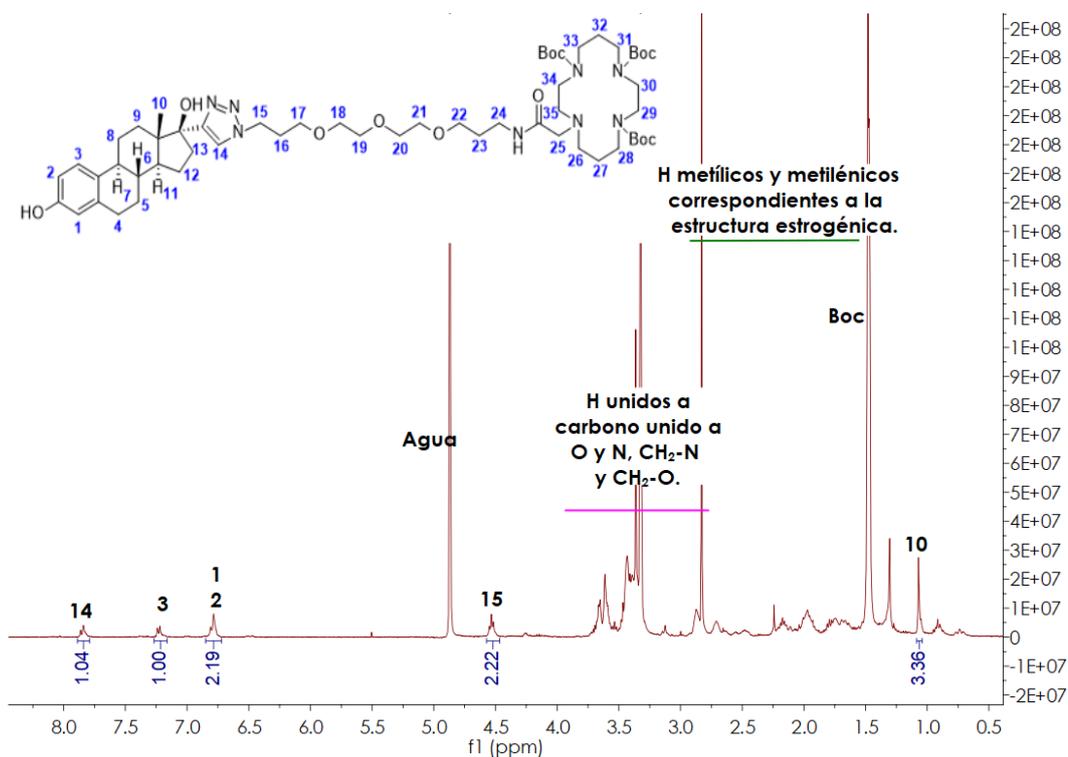
---

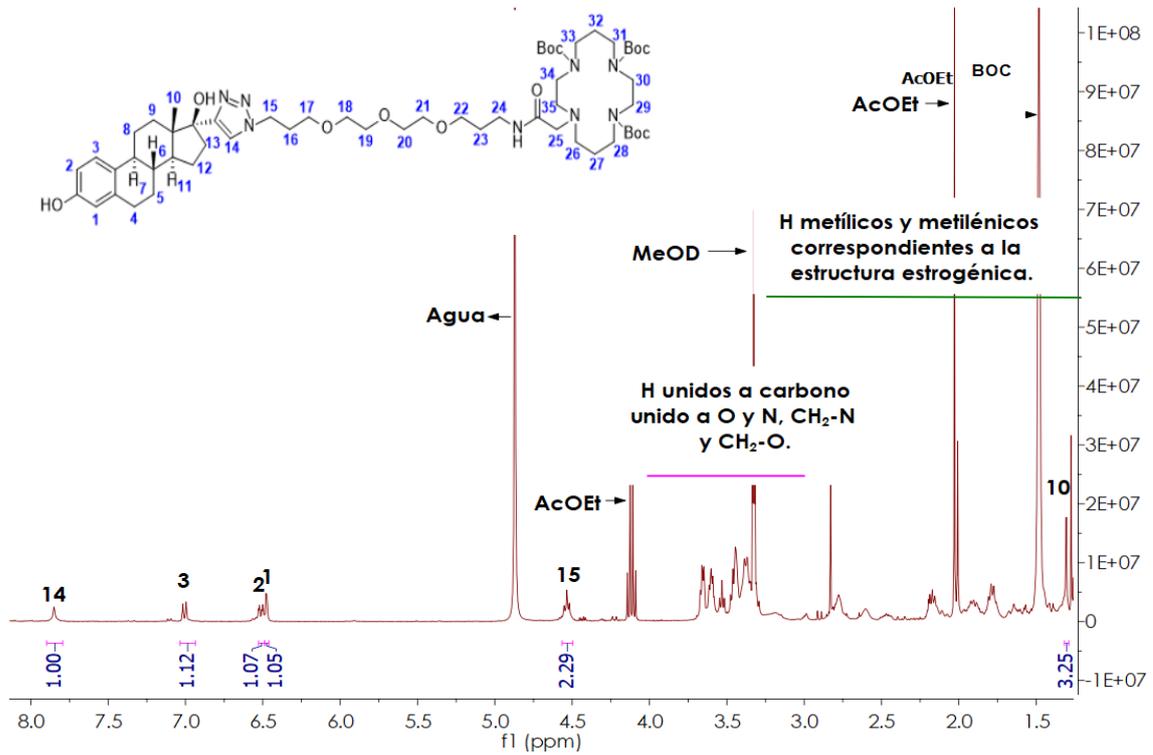
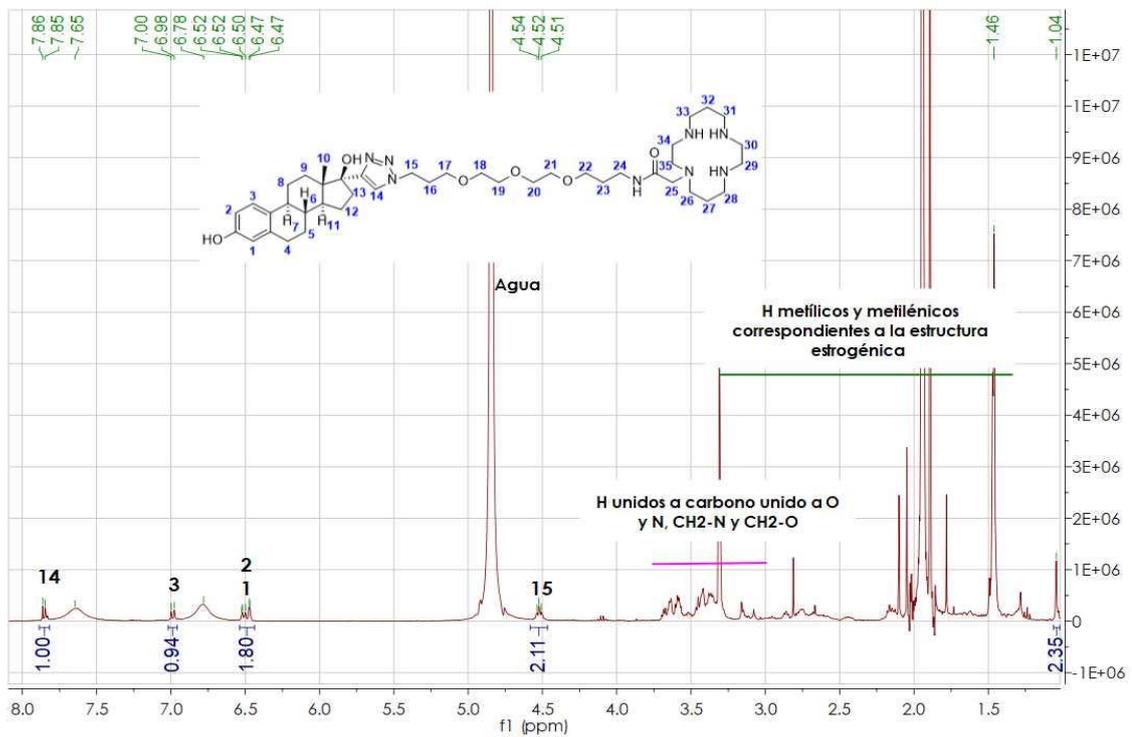
8.1. ESPECTRO DE  $^1\text{H}$ -RMN DE **1** EN MEOD.8.2. ESPECTRO DE MASAS DE **1**.

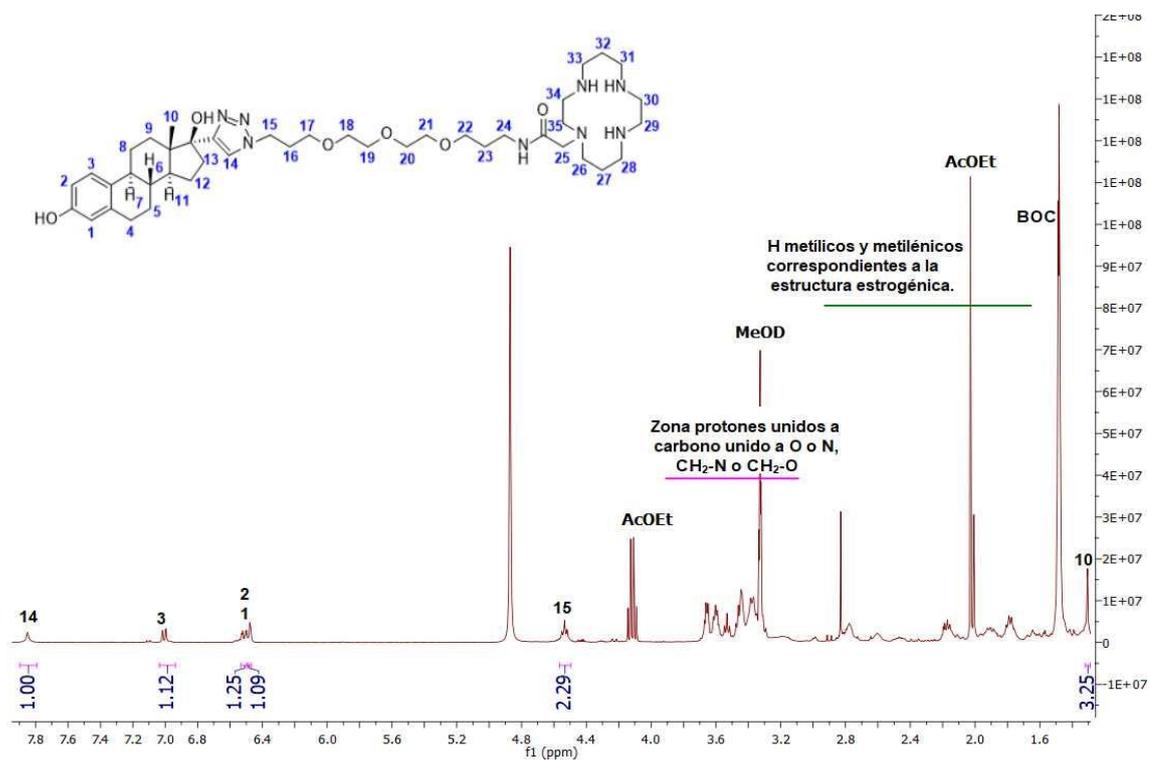
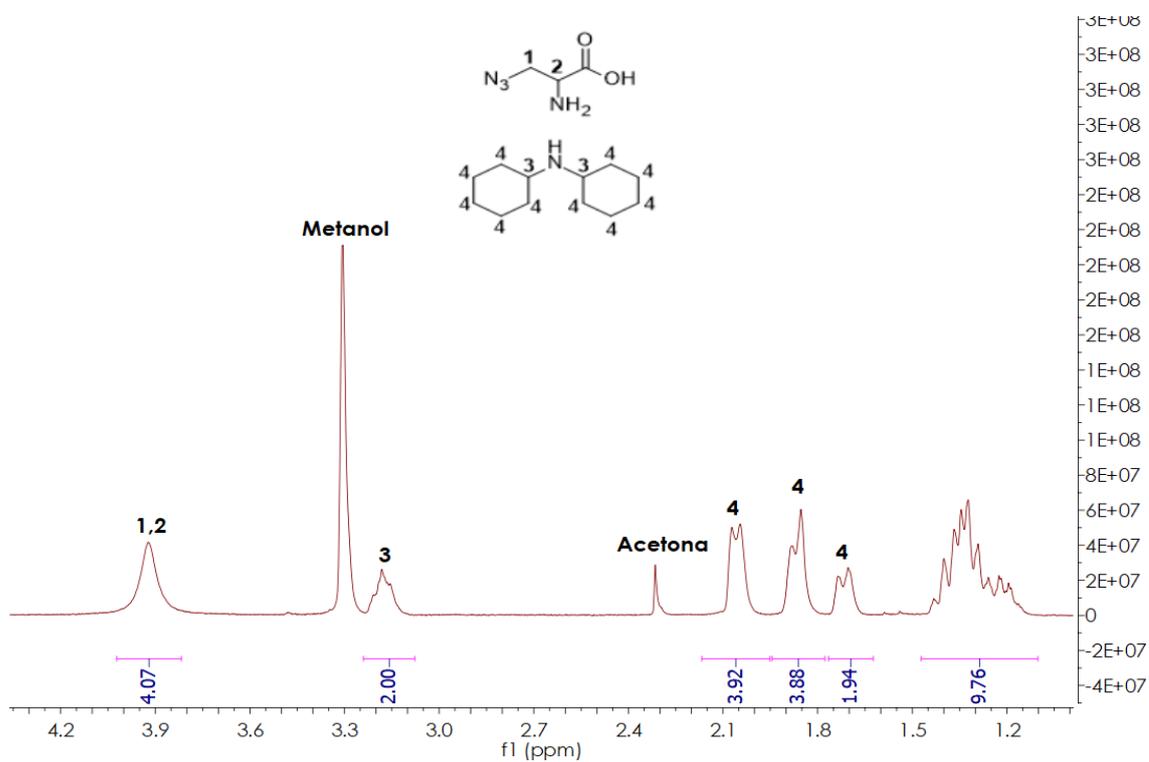
8.3. ESPECTRO DE  $^1\text{H}$ -RMN DE **3** EN  $\text{CDCl}_3$ .8.4. ESPECTRO DE  $^1\text{H}$ -RMN DE **4** EN  $\text{CDCl}_3$ .

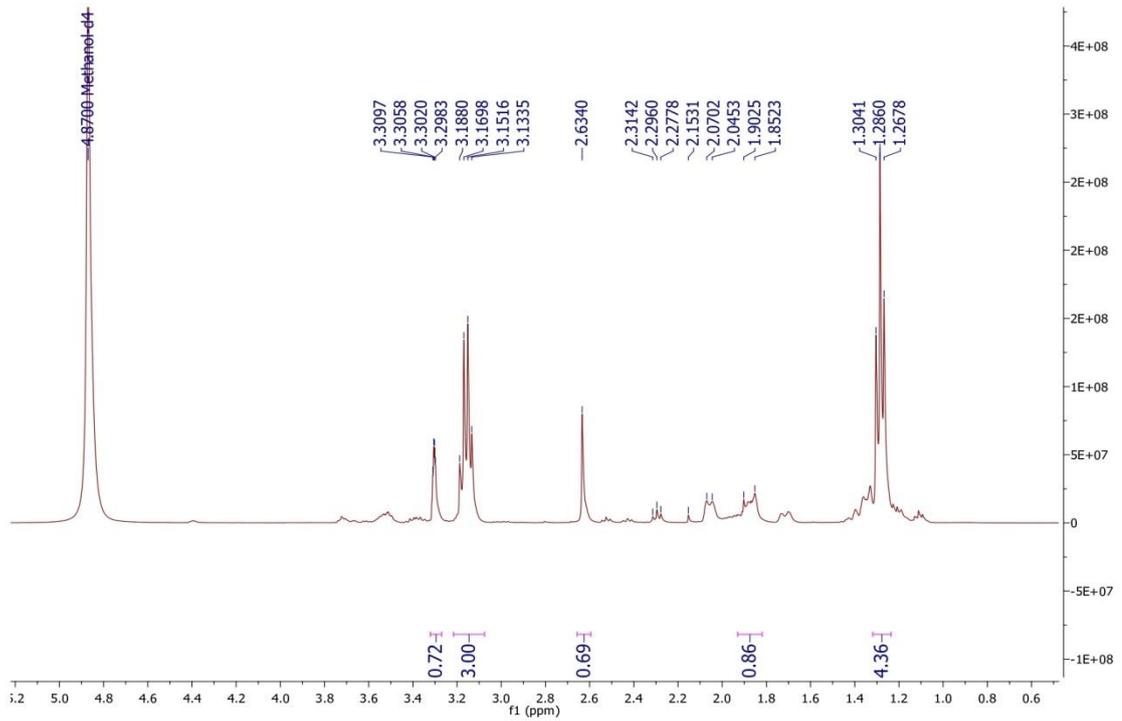
8.5. ESPECTRO DE  $^1\text{H}$ -RMN DE **5** EN  $\text{CDCl}_3$ .8.6. ESPECTRO DE  $^1\text{H}$ -RMN DE **7** EN MEOD.8.7. ESPECTRO DE  $^1\text{H}$ -RMN DE **8** EN MEOD.



8.10. ESPECTRO DE <sup>1</sup>H-RMN DE **L2-Boc** EN MEOD – MÉTODO 1.8.11. ESPECTRO DE <sup>1</sup>H-RMN DE **L2-Boc** EN MEOD – MÉTODO 2.

8.12. ESPECTRO DE <sup>1</sup>H-RMN DE L2 EN MEOD.

8.13. ESPECTRO DE <sup>1</sup>H-RMN DE **11** EN MEOD.8.14. ESPECTRO DE <sup>1</sup>H-RMN DE **12** EN MEOD.



### 8.15. ESPECTRO DE $^1\text{H}$ -RMN DE **L3** EN MEOD.

