



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA – FACULTAD DE QUÍMICA
PEDECIBA QUÍMICA**

TESIS DE MAESTRÍA EN QUÍMICA

“Desarrollo y evaluación de antifúngicos radiomarcados como potenciales agentes de detección de infecciones en Medicina Nuclear”

B.C. Ana Laura Reyes Veiga.

**Directores de tesis:
Dra. Mariella Terán.
Dra. Ana María Rey.**

Abril, 2016

**A mi madre y a mi hermana,
sin las cuales no podría haber llegado hasta aquí,
no solo académicamente sino en la vida.**

ÍNDICE

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	8
3. OBJETIVOS	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1. Síntesis de ligandos	26
4.1.1. Derivatización de anidulafungina	26
4.2. Síntesis de los complejos	26
4.2.1. Síntesis del precursor tricarbonílico $fac-[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$	26
4.2.2. Síntesis del precursor tricarbonílico $fac-[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$ a partir de kit comercial	27
4.2.3. Síntesis del complejo $[^{99m}Tc]((CO)_3\text{-voriconazol/fluconazol})$	27
4.2.4. Síntesis del complejo $[^{99m}Tc]((CO)_3\text{-AcAc-voriconazol/fluconazol})$	27
4.2.5. Síntesis del complejo $[^{99m}Tc]((CO)_3\text{-caspofungina})$	27
4.2.6. Síntesis del complejo $[^{99m}Tc]((CO)_3\text{-anidulafungina})$	28
4.2.7. Marcación de anidulafungina con pirofosfato de sodio como ligando intermediario	28
4.2.8. Marcación de anidulafungina con glucoheptonato como ligando intermediario	29
4.2.9. Marcación directa de anidulafungina	29
4.3. Caracterización fisicoquímica de los complejos	30
4.3.1. Determinación de la estabilidad en el medio de reacción	30
4.3.2. Determinación de la lipofilicidad	30
4.3.3. Determinación del porcentaje de unión a proteínas plasmáticas	30
4.3.4. Determinación de la estabilidad frente a plasma	31
4.3.5. Determinación de la estabilidad frente a histidina y cisteína	31
4.3.6. Determinación de la unión a levaduras	31

4.4. Caracterización biológica de los complejos	32
4.4.1. Biodistribución en animales control (G1)	32
4.4.2. Biodistribución en modelo animal de inflamación (G2) e infección (G3) y (G4)	32
4.4.3. Imágenes en modelo control (G1), inflamación (G2) e infección (G3) y (G4)	33
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
5.1. Síntesis de ligandos	34
5.1.1. Derivatización de anidulafungina	34
5.2. Síntesis de los complejos	38
5.2.1. Síntesis del precursor tricarbónico $fac-[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$	38
5.2.2. Síntesis del precursor tricarbónico $fac-[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$ a partir de kit comercial	39
5.2.3. Síntesis del complejo $[^{99m}Tc]((CO)_3\text{-voriconazol/fluconazol})$	39
5.2.4. Síntesis del complejo $[^{99m}Tc]((CO)_3\text{-AcAc-voriconazol/fluconazol})$	41
5.2.5. Síntesis del complejo $[^{99m}Tc]((CO)_3\text{-caspofungina})$	43
5.2.6. Síntesis del complejo $[^{99m}Tc]((CO)_3\text{-anidulafungina})$	44
5.2.7. Marcación de anidulafungina con pirofosfato de sodio como ligando intermediario	46
5.2.8. Marcación de anidulafungina con glucoheptonato como ligando intermediario	47
5.2.9. Marcación directa de anidulafungina	49
5.3. Caracterización fisicoquímica de los complejos	49
5.3.1. Determinación de la estabilidad en el medio de reacción	49
5.3.2. Determinación de la lipofilidad	50
5.3.3. Determinación del porcentaje de unión a proteínas plasmáticas	51
5.3.4. Determinación de la estabilidad frente a plasma	52
5.3.5. Determinación de la estabilidad frente a histidina y cisteína	53
5.3.6. Determinación de la unión a levaduras	54

5.4. Caracterización biológica de los complejos	56
5.4.1. Biodistribución en modelo animal control (G1)	56
5.4.1.1. Complejos de fluconazol/voriconazol	56
5.4.1.2. Complejo de caspofungina	58
5.4.2. Biodistribución en modelo animal de inflamación (G2)	59
5.4.2.1. Complejos de fluconazol/voriconazol	59
5.4.2.2. Complejo de caspofungina	61
5.4.3. Biodistribución en modelo animal de infección por <i>C.albicans</i> (G3)	63
5.4.3.1. Complejos de fluconazol/voriconazol	63
5.4.3.2. Complejo de caspofungina	66
5.4.4. Biodistribución en modelo animal de infección por <i>C.albicans</i> (G4)	67
5.4.4.1. Complejos de fluconazol/voriconazol	67
5.4.4.2. Complejo de caspofungina	70
5.4.5. Imágenes en modelo control (G1), inflamación (G2) e infección (G3) y (G4)	73
6. CONCLUSIONES	76
7. REFERENCIAS	79
8. AGRADECIMIENTOS	84

1. RESUMEN

La Medicina Nuclear es una especialidad médica que utiliza compuestos radiactivos conocidos como radiofármacos, para fines diagnósticos o terapéuticos. Los radiofármacos de diagnóstico emplean radionucleidos emisores γ , cuya radiación de alto poder de penetración es detectada externamente y permiten la obtención de imágenes.

Entre las opciones más utilizadas para el diagnóstico de infecciones mediante imágenes se encuentran radiografías, ultra sonido, CT, MRI complementados con marcado de leucocitos u otros radiofármacos que proporcionan información anatómica y funcional para localizar los focos. Sin embargo no siempre conducen a una interpretación clínica sencilla y fiable debido a una baja especificidad y sensibilidad. El objetivo de este trabajo fue el desarrollo, síntesis y evaluación de un potencial radiofármaco que permita un diagnóstico rápido y preciso mediante imágenes centellográficas de infección fúngicas. Para ello se han desarrollado con éxito cinco complejos, dos conteniendo voriconazol como ligando, dos con fluconazol y uno con caspofungina; utilizando en todos los casos el radionucleido, ^{99m}Tc , emisor γ . La estrategia elegida para unir el tecnecio al ligando conteniendo el farmacóforo es a través de la formación del acuocomplejo tricarbonílico de Tc (I) $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$, el que es utilizado como precursor. En éste el metal se encuentra coordinado por tres grupos carbonilo que estabilizan el estado de oxidación +1, quedando tres posiciones de coordinación libres para completar con el ligando seleccionado.

Para las marcaciones se siguieron dos metodologías bien definidas. La sustitución directa de las moléculas de agua por los diferentes ligandos de interés; la otra posibilidad planteada es la preparación de complejos tricarbonílicos mixtos de tipo 2+1, en los cuales las 3 moléculas de agua del precursor son sustituidas por la acción simultánea de un ligando bidentado (acetilacetona (AcAc), como coligando) y uno monodentado en nuestro caso los diferentes antifúngicos utilizados.

Los complejos se evaluaron respecto a su estabilidad *in vitro* determinando su estabilidad frente al medio de reacción, lipofilicidad, porcentaje de unión a proteínas plasmáticas, estabilidad del plasma, ensayos de competencia frente a histidina y cisteína y unión a levaduras. La evaluación biológica se llevó a cabo en cuatro grupos de ratones hembra CD1, siendo los modelos utilizados: Animales sanos (G1), animales con inflamación estéril inducida con aceite de trementina (G2) y animales infectados con *Candida albicans* y *Aspergillus niger* (G3 y G4 respectivamente) A todos los grupos se les realizó imagen centellográfica y posterior biodistribución.

Todos los complejos se obtuvieron con una pureza radioquímica superior al 95%, siendo estables en los tiempos estudiados, tanto en el medio de reacción como en plasma.

El desafío con agentes competitivos no mostró intercambio significativo de los ligandos. La unión a proteínas plasmáticas es elevada para los complejos en los cuales la sustitución fue directa por el antifúngico de interés y moderada para los complejos de fluconazol y voriconazol de tipo 2+1; estos valores pueden explicarse por el hecho que en las proteínas plasmáticas existen grupos funcionales de los aminoácidos con buena capacidad donadora de electrones, con potencial para desplazar al ligando de su unión con el metal si ésta no es suficientemente fuerte.

Respecto a la unión a levaduras, el comportamiento fue similar, los complejos en los que la sustitución fue solo con el ligando de interés, presentaron una unión entre 10-14% en las pruebas *in vitro* mientras que los complejos de tipo 2+1 tuvieron solamente una unión de un 3-7%. Se observó en todos los casos una alta excreción renal y hepatobiliar principalmente en el complejo con caspofungina.

Con respecto al comportamiento *in vivo*, las relaciones T/NT en los complejos de tipo 2+1 tanto para fluconazol como voriconazol no logran diferenciar las infecciones de las inflamaciones así como del tejido sano, hecho que se confirma con las imágenes. Sin embargo para los complejos de fluconazol y voriconazol, sin coligando, existe una buena especificidad para detectar infección por *C.albicans* con respecto a la inflamación estéril, aunque con una baja sensibilidad. Para la infección de *A.niger* el complejo de fluconazol tiene mayor sensibilidad de detección que el de voriconazol. A pesar de la baja captación de los complejos en sangre, la relación tejido blanco/sangre es <1 , lo cual indica que no sería posible distinguir mediante imágenes en forma clara los sitios de captación con respecto al fondo. Las imágenes centellográficas confirman estos resultados, pues las lesiones revelan diferencias apreciables entre inflamación estéril y *C.albicans*, pero no así en el caso de la infección con *A.niger*.

Por su parte el compuesto que presenta los mejores resultados *in vivo* es el complejo de caspofungina el cual presenta una alta sensibilidad y especificidad para los procesos infecciosos por *C.albicans* y *A.niger*, diferenciándolos claramente de los procesos inflamatorios, este complejo se describe como un agente potencial para el diagnóstico rápido y específico de las infecciones causadas por levaduras patógenas. A pesar de ello el complejo de caspofungina debe ser estudiado en otras fases preclínicas que completen su caracterización biológica.

2. INTRODUCCIÓN

La Medicina Nuclear es la rama de la medicina que emplea compuestos radiactivos con fines diagnósticos o terapéuticos. Para diagnóstico, se emplean radionucleidos emisores γ , cuya radiación de alto poder de penetración es detectada externamente, así como también emisores de positrones, de los cuales se aprovecha la radiación de aniquilación de 0.51MeV de alto poder de penetración y baja transferencia lineal de energía (LET). En el caso de terapia, se emplean las radiaciones de poco poder de penetración como son las α y β^- , con el fin de destruir en forma selectiva y localizada el tejido a ser tratado. [1] A continuación se muestran los principales radionucleidos utilizados en Medicina Nuclear y sus propiedades nucleares. (Tabla 1)

Tabla 1. Propiedades nucleares de algunos radionucleidos utilizados para diagnóstico y terapia en Medicina Nuclear. EC: decaimiento por captura electrónica. NA: No Aplicable.

Radionucleido	T _{1/2}	Modo de decaimiento	Aplicación	Modo de Imagen	Método de producción
^{99m} Tc	6.0 hs	γ	Diagnóstico	SPECT	Generador
¹²³ I	13.3 hs	EC	Diagnóstico	SPECT	Acelerador
⁶⁷ Ga	3.24 días	EC	Diagnóstico	SPECT	Ciclotron
¹¹¹ In	2.83 días	EC	Diagnóstico	SPECT	Acelerador
¹³¹ I	8 días	β^- , γ	Diagnóstico y terapia	SPECT	Reactor
¹⁸⁸ Re	16.98 hs	β^- , γ	Diagnóstico y terapia	SPECT	Generador
⁶⁴ Cu	12.7 hs	β^+ (19%) EC (41%) β^- (40%)	Diagnóstico y terapia	PET	Reactor
¹¹ C	20.4 min	β^+	Diagnóstico	PET	Ciclotron
¹³ N	10 min	β^+	Diagnóstico	PET	Ciclotron
¹⁵ O	2.03 min	β^+	Diagnóstico	PET	Ciclotron
¹⁸ F	110 min	β^+ (97%) EC (3%)	Diagnóstico	PET	Ciclotron
⁶⁸ Ga	68.3 min	β^+ (90%) EC (10%)	Diagnóstico	PET	Generador
¹⁷⁷ Lu	6.71 días	β^- , γ	Terapia	NA	Reactor
⁹⁰ Y	2.66 días	β^-	Terapia	NA	Generador
¹⁵³ Sm	1.95 días	β^- , γ	Terapia	NA	Reactor

(Esquema adaptado de Liu S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target specific delivery of metallic radionuclides. Adv Drug Deliv Rev 2008; 60:1347-70.)

A diferencia de otras técnicas que utilizan radiaciones ionizantes, un estudio básico mediante imágenes centellográficas de Medicina Nuclear involucra la administración al paciente de trazadores radiactivos. Un radiofármaco es una sustancia química definida, que contiene al menos un átomo radiactivo en su estructura, siendo apto para ser administrado en seres humanos con fines diagnósticos o terapéuticos; este término a diferencia del de fármaco, no

implica la existencia de un efecto farmacológico en el sentido estricto de la palabra. A pesar de esto, la OMS incluye a los radiofármacos dentro de la categoría de fármacos y por lo tanto, se encuentran incluidos en las farmacopeas oficiales. [2]

En contraposición a otras metodologías imagenológicas como la Tomografía Computada o la Resonancia Magnética Nuclear, una de las mayores ventajas comparativas de la Medicina Nuclear diagnóstica es que permite diferenciar una anatomía, fisiología o bioquímica normal de la anormal pero a partir de imágenes funcionales, basándose en el patrón de distribución de los radiotrazadores en los organismos. En los estudios mediante imágenes centellográficas se administra, en forma intravenosa (es la vía de administración más empleada, pero no la única), un radiofármaco y transcurrido un tiempo de biodistribución apropiado para que éste se distribuya y se concentre en el sitio blanco de interés, se realiza la adquisición de la imagen mediante un detector externo. La posibilidad de estudiar procesos bioquímicos “*in vivo*” y de realizar imágenes moleculares es una nueva brecha en la especialidad que ha comenzado a ser explorada en los últimos años. [3] Para ello es necesario contar con moléculas que imiten a biomoléculas en su interacción con sistemas altamente selectivos y específicos como receptores, enzimas, sistemas transportadores, etc. La utilidad clínica de este tipo de radiofármacos ha sido demostrada utilizando radionucleidos emisores de positrones como ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O y ^{18}F o emisores γ como el, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I y el ^{131}I . A excepción del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ que requiere la formación de complejos de coordinación con el metal, que se unan a la biomolécula de interés lo que genera ciertos cambios en su estructura y función; los restantes radionucleidos mencionados pueden ser fácilmente combinados con una gran variedad de compuestos orgánicos con mínima alteración de su estructura, así como de sus propiedades físicas, químicas y biológicas. [4-6] Dependiendo del tipo de emisor utilizado para estos estudios diagnósticos, la tecnología utilizada para adquirir la imagen puede ser SPECT o PET.

La modalidad SPECT, o single photon emission computed tomography, es utilizada a nivel mundial y en Uruguay desde hace años para obtener imágenes mediante el uso de radiofármacos que poseen emisores γ , mientras que la modalidad PET, o positron emission tomography, ha ganado cada vez más terreno y permite la utilización de radionucleidos emisores de positrones. Uruguay cuenta con SPECT desde el año 1982, cuando el Centro de Medicina Nuclear del Hospital de Clínicas 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 2010, Uruguay también cuenta con la

tecnología PET en el Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM), hecho que ha representado otro gran avance.

En cualquiera de los dos casos, una adecuada selección del radionucleido a utilizar y la molécula que lo vehiculiza es fundamental para lograr la máxima eficiencia de la detección de la radiación emitida con una mínima dosis de radiación absorbida por el cuerpo del paciente. [7]

El ^{99m}Tc es el radionucleido más utilizado en la preparación de radiofármacos de diagnóstico debido a sus propiedades nucleares ideales para la obtención de imágenes: emisión γ pura con alto rendimiento de fotones, energía de 140 keV capaz de detectarse externamente mediante SPECT, y período de semi-desintegración de 6 horas, compatible con el tiempo requerido para la preparación de los radiofármacos y el tiempo necesario para realizar el estudio de Medicina Nuclear. A las propiedades nucleares favorables se debe agregar la fácil disponibilidad a partir de generadores de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. [8]

Desde el punto de vista químico, el tecnecio es un metal de la segunda serie de transición y puede presentar estados de oxidación entre -1 y +7, por lo que la marcación de las moléculas de interés implica generalmente la formación de un compuesto de coordinación. Dichos compuestos pueden adoptar diversas configuraciones en su primera esfera de coordinación, formando los llamados “cores” o núcleos, alrededor de los cuales se acomodan un número variable de átomos donores de electrones de los ligandos que se desean marcar. A continuación se muestran algunos de los “cores” más comunes en los complejos de tecnecio. (Figura 1) Esta diversidad estructural ofrece grandes posibilidades para el diseño de potenciales radiofármacos que superen las limitaciones que supone la presencia de un metal no fisiológico como el Tc en la marcación de biomoléculas. [9]

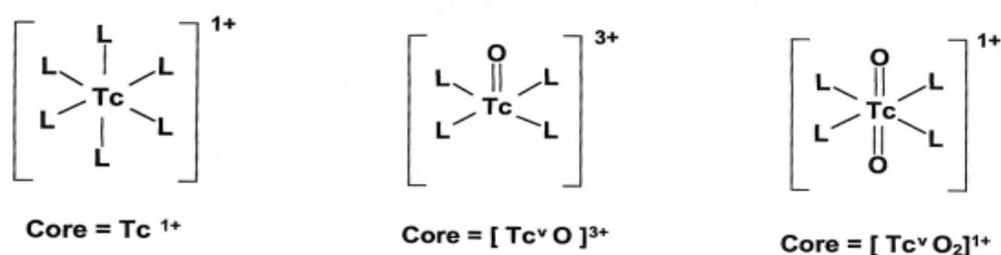


Figura 1. Cores más comunes en los complejos de ^{99m}Tc .

La forma química bajo la cual se obtiene el ^{99m}Tc a partir de su generador es el ion pertechnetato, $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$, donde el metal se encuentra con estado de oxidación VII. [10] El primer paso para la formación de un potencial radiofármaco es la reducción del Tc(VII) que se realiza, en la mayoría de los casos, con agentes reductores químicos, como el cloruro de estaño II y el borohidruro de sodio, entre otros. [11,12]

Las formas reducidas del tecnecio 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. El estado de oxidación final en el complejo depende de diversos factores, entre los que se destacan el pH, la temperatura, la naturaleza del agente reductor y el ligando, siendo este último uno de los factores de mayor influencia.

Los ligandos, que actúan como bases de Lewis en la formación del complejo, se clasifican según los criterios de Pearson, de acuerdo a su dureza. Ligandos duros son aquellos que presentan grupos donores de electrones de pequeño tamaño, y en general, retienen carga negativa sobre ellos. Por el contrario, ligandos blandos presentan mayor tamaño y menor densidad electrónica. Los mismos criterios pueden aplicarse 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. [13]

Una de las estrategias más utilizadas en las últimas décadas para la formación de radiofármacos con metales implica la utilización de agentes quelantes bifuncionales (*BFCA*, *bi functional chelates agent*), también llamado “pendent approach”. Dicha estrategia consiste en añadir a la molécula biológica mediante síntesis una serie de grupos donores de electrones capaces de coordinar al metal, la llamada unidad quelante, que no sólo enlaza al radiometal, sino que también pueden unirse covalentemente por otro extremo a una biomolécula de interés. Esta unidad quelante se separa de la parte activa de la biomolécula mediante una cadena hidrocarbonada o espaciador cuya longitud debe optimizarse para asegurar que la actividad biológica se mantenga. [14,15] (Figura 2)

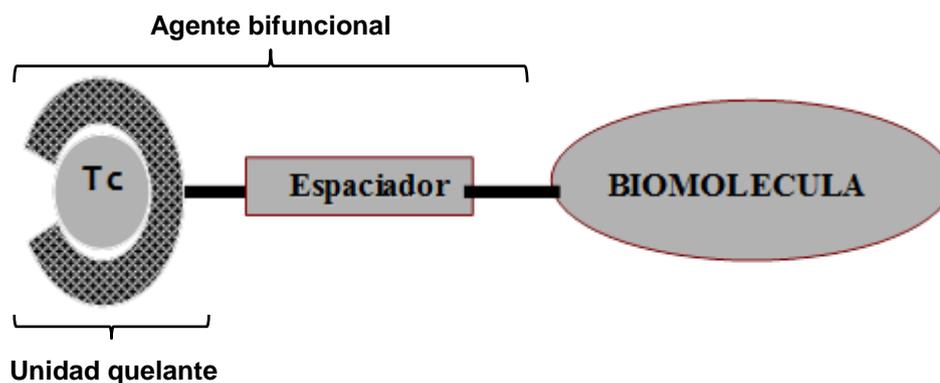


Figura 2. Esquema de un agente bifuncional en el desarrollo de un radiofármaco.

La implementación de este tipo de estrategias fue muy utilizada en los radiofármacos diagnósticos y terapéuticos de última generación los cuales se utilizan en Medicina Nuclear para obtener imágenes de blancos moleculares específicos, y son únicos en su capacidad para detectar *in vivo* sitios bioquímicos determinados tales como receptores y enzimas. El fragmento bioactivo sirve como un transportador que lleva al radionucleido al sitio receptor en las células o moléculas blanco. Las moléculas bioactivas específicas de los receptores pueden ser fracciones de anticuerpos, péptidos, péptido-miméticos, análogos de ADN, oligonucleótidos antisentido (antisense) y ligantes no peptídicos. [16]

La elección del agente bifuncional está determinada por la naturaleza y el estado de oxidación del radiometal, así como la posibilidad de conjugación al farmacóforo. Actualmente, existen varios ejemplos de aplicación exitosa de este concepto de marcación fundamentalmente en el caso de biomoléculas grandes de tipo proteico.

Para citar un ejemplo representativo de agente quelante bifuncional, uno de los nuevos "cores" del Tc desarrollado básicamente para la marcación de biomoléculas proteicas es el Tc (HYNIC) (hidrazido-nicotinamida). (Figura 3)

El Tc se encuentra en estado de oxidación +5 y un grupo nitreno se une directamente al metal constituyendo el core. El grupo amino terminal del HYNIC se puede conjugar con el extremo carboxi-terminal de una proteína o péptido.

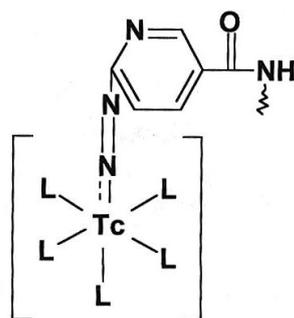


Figura 3. Core Tc-HYNIC (hidrazido-nicotinamida)

La marcación de biomoléculas pequeñas presenta mayores dificultades, ya que la introducción de la unidad quelante provoca cambios sustanciales en sus propiedades fisicoquímicas pudiendo perderse parcial o totalmente la bioactividad. Además, la biodistribución y farmacocinética del producto resultante dependerán en alto grado de las características del complejo metal-ligando. [17-19]

Dentro de las posibles estrategias de marcación, una de las que ha tenido más relevancia en los últimos años debido a sus ventajas de fácil preparación y elevada estabilidad química, ha sido la formación del core Tc(I)-tricarbonílico o $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$. En 1998, Alberto et. al. [20-22], han propuesto la formación a baja presión del acuocomplejo tricarbonílico de Tc (I) *fac*- $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ (Figura 4), el que puede ser utilizado como precursor para obtener una gran variedad de potenciales radiofármacos.

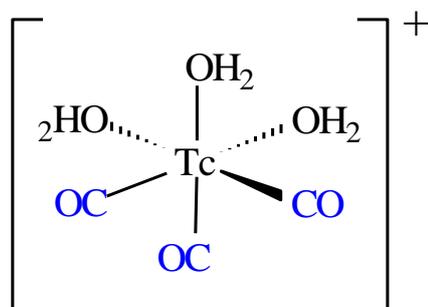


Figura 4. Estructura del *fac*- $^{99\text{m}}\text{Tc}[(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$

Este complejo cuenta con tres posiciones de coordinación ocupadas por moléculas de CO unido fuertemente al metal. El intenso campo resultante, debido a la configuración electrónica d^6 de bajo spin del metal, favorece la estabilización del estado de oxidación +1 lo que evita que pueda someterse a otras reacciones de oxidación-reducción. Las otras posiciones de coordinación disponibles están ocupadas por tres moléculas de agua débilmente unidas, las cuales, pueden ser reemplazadas por átomos donores con alta afinidad por el metal. Existe una amplia gama de posibles grupos donores para completar la esfera de coordinación de este “core”, desde grupos duros e hidrofílicos basados en ácidos carboxílicos y aminas alifáticas, hasta otros blandos y lipofílicos, preferentemente aminas aromáticas. (Figura 5) También los grupos tiol, tioéter o fosfina se coordinan adecuadamente con el precursor tricarbonílico. Los estudios demuestran, sin embargo que los N-heterociclos aromáticos en combinación con ácidos carboxílicos generan los complejos más estables. Los ligandos conteniendo este tipo de grupos no solamente son simples de sintetizar sino que también

aparecen en muchas moléculas biológicamente activas, en particular en el aminoácido histidina presente en muchas proteínas y péptidos. [23-24]

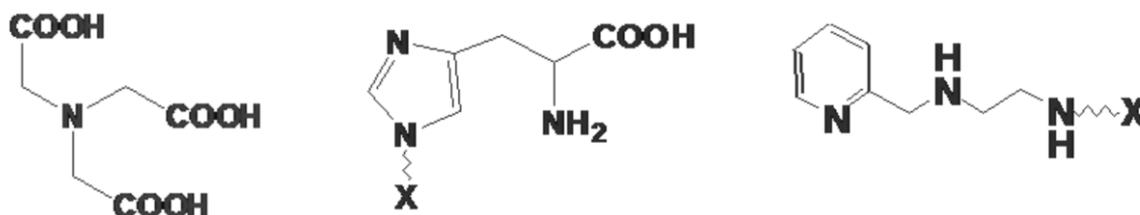


Figura 5. Posibles grupos donores tridentados para completar la esfera de coordinación del complejo $fac-[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$

Un estudio sistemático sobre la influencia de la cantidad de grupos quelantes de los ligandos sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los compuestos resultantes ha demostrado que el uso de ligandos bidentados no es del todo adecuado para la preparación de compuestos estables ya que la presencia de una molécula de agua lábil en el compuesto final favorece la inestabilidad “*in vivo*” por intercambio de ligandos presentes en la sangre fundamentalmente en las proteínas. El resultado es una depuración más lenta y un aumento de la actividad retenida e riñones o hígado. Una posibilidad planteada es la preparación de complejos tricarbónicos mixtos de tipo 2+1, en los cuales las 3 moléculas de agua del precursor son sustituidas por la acción simultánea de un ligando bidentado (por ejemplo etilendiamina, histamina, 2-picolilamina o acetilacetona (AcAc)) y uno monodentado (isonitrilo, imidazol, etc). [25-28]

Una vez establecidas las posibles metodologías de trabajo es necesario abordar el por qué del estudio de los antifúngicos y su importancia como blanco diagnóstico.

Un hecho importante en la actualidad ha sido el incremento de la población cuyo sistema inmune se encuentra debilitado, lo que ha tenido como consecuencia un aumento de las infecciones de carácter oportunista. La inmunodeficiencia puede surgir en pacientes con condiciones tales como leucemia y linfoma; de agentes infecciosos tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); a partir de la administración de fármacos, como agentes de quimioterapia, fármacos anti-rechazo, esteroides o como resultado de enfermedades metabólicas, tales como la insuficiencia renal y la diabetes. Las condiciones ambientales, como la desnutrición también pueden jugar un papel importante. En este contexto, las infecciones fúngicas invasivas (IFI) han adquirido gran relevancia debido a varios factores, incluyendo la dificultad en diagnosticar micosis profundas, el empeoramiento de la función

inmune de los pacientes, la poca expresividad clínica de los cuadros infecciosos alta tasa de incidencia y falla terapéutica, así como su elevada tasa de morbi-mortalidad, contribuyen al pobre pronóstico de las IFI. [29-33]

Las opciones de tratamiento han sido limitadas a formulaciones de antifúngicos como anfotericina B, itraconazol, fluconazol y voriconazol hasta el reciente surgimiento de nuevas moléculas como las equinocandinas.

Se considera IFI aquella que afecta al torrente sanguíneo o tejidos profundos normalmente estériles, exceptuando el tracto urinario bajo. La mayoría son producidas por *Cándida*, aunque ha incrementado en forma progresiva la incidencia de infecciones por hongos filamentosos como *Aspergillus*. Hay que tener en cuenta que los factores clínicos de riesgo de IFI pueden conducir a confusión, ya que, por ser una enfermedad sin sintomatología específica evidente, muchos de sus síntomas coinciden con los propios de cualquier tipo de infección o enfermedad grave en pacientes críticos. [34]

El principal obstáculo para conocer la dimensión exacta de la infección radica en su diagnóstico. En el año 2008 los grupos de trabajo de la European Organization for Research and Treatment of Cancer y el Mycoses Study Group revisaron las definiciones IFI y reconocieron la limitación que supone el diagnóstico, admitiendo solamente el diagnóstico de certeza para la estratificación en estudios clínicos, aunque lógicamente consideran la posibilidad de IFI en casos que no puedan probarse. La dificultad diagnóstica se debe a la diversidad y espectro cambiante de los microorganismos que pueden causar la enfermedad, así como los límites en las técnicas disponibles en la actualidad. Las limitaciones inherentes y la escasa sensibilidad de los métodos de diagnóstico microbiológico tradicionales como la observación al microscopio de las muestras clínicas, su cultivo en medios artificiales y la posterior identificación de los hongos aislados en dichos medios mediante diversas técnicas, implican un retraso diagnóstico que muchas veces posterga la instauración del tratamiento antifúngico más apropiado para la patología que padece el enfermo y además favorecen la aparición de daños orgánicos irreversibles. [35-38]

Hasta el momento ninguno de los métodos descritos es capaz de responder a la pregunta más importante del médico frente a un paciente que presenta signos clínicos de inflamación o infección, es decir si estos signos son indicativos de infección o simplemente de inflamación. La inflamación sólo requiere un tratamiento conservador, mientras que la infección necesita más que una simple intervención. La localización y delimitación anatómica

de los sitios ocultos de una infección son pasos importantes con frecuencia en el manejo terapéutico de los pacientes críticos. Los procedimientos de imagen actuales, tales como la tomografía computada (TC) de rayos X, ecografía, radiografía convencional, y la resonancia magnética nuclear (RMN), se basan principalmente en los cambios focales en la densidad del tejido o la composición para definir las lesiones. Estas modalidades pueden localizar la zona de afectación cuando un proceso inflamatorio ha progresado a la necrosis tisular y formación de abscesos. Sin embargo, en el curso temprano de este proceso, cuando aún no se han producido los cambios en los tejidos asociados con la necrosis, la localización de la lesión puede ser extremadamente difícil. Esto es particularmente cierto si puntos de referencia anatómicos normales han sido oscurecidos por una cirugía previa o enfermedad. La implantación de materiales protésicos también a veces impide el acceso radiológico y por lo tanto dificulta el diagnóstico. [39]

Una variedad de radionucleidos se ha usado en la formación de radiotrazadores para diagnóstico por imágenes de inflamación e infección. Los trazadores incluyen agentes inespecíficos de inflamación y de infección, tales como ^{67}Ga , ^{18}F -FDG (2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa), inmunoglobulinas no específicas, liposomas, y trazadores más específicos como glóbulos blancos marcados directamente, anticuerpos antigranulocito, o fragmentos de anticuerpos, así como inmunoglobulinas específicas dirigidas contra un organismo o citoquinas, por ejemplo, el factor de necrosis antitumoral, anticuerpos específicos o péptidos contra integrina $\alpha_v\beta_3$, o péptidos quimiotácticos. También se han radiomarcado anticuerpos específicos desarrollados contra ciertas infecciones, tales como *Pneumocystis jirovecii*, así como antibióticos marcados para localizar la infección, tales como ciprofloxacina, sin embargo, con excepción de ésta última, ninguno de ellos se ha utilizado en la práctica habitual. [40]

El citrato de galio-67 (^{67}Ga) es un trazador conocido de larga data, se une a la transferrina/lactoferrina a cambio de hierro. Por lo tanto, ^{67}Ga reconoce sitios de inflamación así como de infección, pero también reconoce tumores a través de receptores de transferrina. ^{67}Ga se utiliza ampliamente en la sarcoidosis y enfermedades inflamatorias crónicas, pero por su excreción hepato-biliar, no es muy útil en la zona abdominal. Debido a su largo tiempo de semi-desintegración y los picos de alta energía, el ^{67}Ga -citrato no representa un radiofármaco de elección para la detección de lesiones pequeñas y delicadas. [41]

Durante muchos años, el estándar de oro para el diagnóstico de infecciones en Medicina Nuclear ha sido la marcación de leucocitos autólogos. Después del marcado *in vitro*, los leucocitos se reinyectan y migran por quimiotaxis al foco inflamatorio. El radiomarcado con ^{111}In fue una de las primeras técnicas, pero la alta energía gamma relativa del ^{111}In llevó a sensibilidades bajas y pequeñas lesiones inflamatorias. El $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO como marcador radiactivo trajo algunas ventajas, pero ningún avance real. El marcado *in vitro* de leucocitos autólogos está bien establecido, pero tiene inconvenientes debido que las técnicas de marcado *in vitro* requieren instalaciones exclusivas, es una técnica trabajosa y larga y tiene asociados riesgos de contaminación cruzada. Por esos motivos no se ha extendido su uso. [42-45]

Durante la última década, la ^{18}F -FDG utilizada en imagenología PET/CT se ha convertido en una herramienta en rápida evolución para el diagnóstico en enfermedades infecciosas; no obstante la indicación fundamental de la ^{18}F -FDG sigue siendo la oncológica. Las células tumorales muestran una captación aumentada de ^{18}F -FDG debido a una elevada tasa de glucólisis y a una sobreexpresión del número de transportadores de membrana de glucosa. Sin embargo, esta captación no es específica de tumor ya que está presente en procesos inflamatorios e infecciosos, siendo la principal causa de falsos positivos en oncología, lo que a su vez posibilita su uso en estas patologías.

Como consecuencia de las regulaciones de los Estados Unidos sobre el uso de ^{18}F -FDG, a partir del 2009 la Unión Europea, a través de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y el Comité de Productos Médicos para uso Humano (CHMP) llegaron a la conclusión de que los beneficios de la ^{18}F -FDG son mayores que sus riesgos, en el diagnóstico de enfermedades infecciosas e inflamatorias, y por lo tanto, debe estar autorizado como un radiofármaco de diagnóstico indicado para su uso en procesos infecciosos o inflamatorios de distinta etiología. La ^{18}F -FDG PET/CT ha demostrado ser una técnica útil en el estudio de diferentes procesos inflamatorios y está en clara expansión. Las principales indicaciones son en las vasculitis de grandes vasos son el diagnóstico, la evaluación del grado de actividad y su extensión y monitorización del tratamiento, fiebre de origen desconocido (FOD), sospecha de infección crónica de hueso y / o estructuras adyacentes incluida la presencia de implantes metálicos, prótesis de cadera dolorosa, prótesis vascular, y fiebre en el SIDA. La ^{18}F -FDG ha mostrado resultados claramente superiores al ^{67}Ga en el estudio de la sarcoidosis, con una mayor sensibilidad para la valoración de la extensión de la enfermedad y del grado de actividad inflamatoria y la detección de afectación en sitios insospechados. En otras

patologías inflamatorias como la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal, la ^{18}F -FDG aún no es considerada de primera elección.

Sin embargo, la ^{18}F -FDG no siempre es el mejor radiotrazador para elegir en presencia enfermedades infecciosas. En muchas condiciones inflamatorias también hay una urgente necesidad de establecer criterios claros para la interpretación de los resultados con ^{18}F -FDG. [46,47]

Con el fin de combinar las fortalezas de ambas técnicas se marcaron leucocitos con ^{18}F -FDG. Sin embargo en los resultados preliminares obtenidos, aunque prometedores, se encontró que la ^{18}F -FDG era liberada rápidamente de los leucocitos marcados. Otros inconvenientes más importantes aún fueron el tiempo de marcación, el corto tiempo de semi-desintegración del trazador, los costos y la necesidad de conocimientos específicos para su realización. [48]

En nuestro país, desde la apertura del Centro Uruguayo de Imagenología Molecular en 2010, se cuenta con ^{18}F -FDG para el diagnóstico de estas patologías. Sin embargo dado los inconvenientes antes mencionados como son la poca especificidad diagnóstica y los elevados costos, esta técnica no es la de primera elección para diagnóstico de inflamación e infección en nuestro país.

Otros intentos para introducir anticuerpos policlonales inespecíficos marcados han sido realizados, como la Inmunoglobulina humana (Ig H) marcada con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o ^{111}In para formación de imágenes. Los mecanismos de acumulación del trazador incluyen extravasación local en infecciones con una posterior unión no específica a los receptores Fc de los macrófagos, pero los resultados globales no fueron convincentes. [49]

Otro gran avance en tecnología de imagen era el marcado en vivo de granulocitos utilizando anticuerpos monoclonales. Esta técnica de marcación es una forma rápida, segura y preserva el procedimiento de marcación de leucocitos vitales. El uso del anticuerpo tiene el inconveniente de reconocer granulocitos y sus precursores, por lo que también se visualiza la médula ósea roja común. [50,51] La gama de moléculas evaluadas contra la inflamación y la infección está aumentando, pero, para fines de diagnóstico, en la actualidad hay muy pocos que se utilizan en la práctica clínica.

Hasta el momento se han marcado por métodos directos con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, fluconazol y péptidos antifúngicos como la lactoferrina pero sin éxito ya que el diagnóstico diferencial no abarca el espectro necesario. [52-54]

FLUCONAZOL y VORICONAZOL

El fluconazol es el compuesto triazólico más conocido, es un agente ampliamente utilizado y constituye una alternativa terapéutica habitual en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas específicas. [55] El fluconazol, es una base muy débil (pKa 3,7) y no ionizable a pH fisiológico. Como otros triazoles tiene dos anillos conteniendo tres átomos de nitrógeno y el anillo bencénico tiene dos átomos de flúor. Su estructura simétrica y polar favorece su buena solubilidad en agua lo que lo hace apto para administración endovenosa. (Figura 6). Su biodisponibilidad es del 90%, el tiempo en alcanzar la dosis máxima es de 1.5hs, presenta una unión a proteínas plasmáticas del 10%, una semivida de eliminación de 40hs y una fracción de fármaco incambiado en orina del 80%.

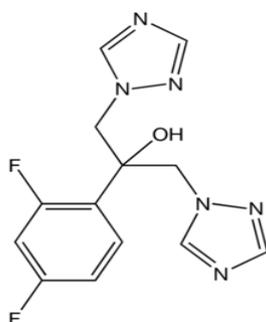


Figura 6. Estructura química del fluconazol

El voriconazol (Figura 7), es un antifúngico de amplio espectro generalmente utilizado para el tratamiento de infecciones invasivas graves en pacientes inmunocomprometidos. Es un triazol de segunda generación, derivado sintético del fluconazol. La sustitución de uno de los grupos triazólicos en el fluconazol por una pirimidina, a la cual se le había añadido un átomo de flúor en la posición 5 sumado a la metilación en la posición C3 aumentó la potencia de voriconazol frente a su predecesor. Su biodisponibilidad es del 80%, el tiempo en alcanzar la dosis máxima es de 2hs, presenta una unión a proteínas plasmáticas del 60%, una semivida de eliminación de 10hs y una fracción de fármaco incambiado en orina menor al 1%.

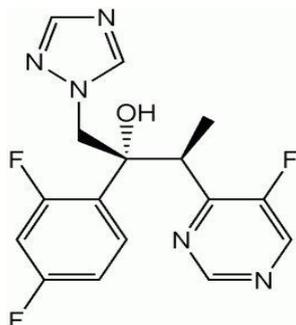


Figura 7. Estructura química del voriconazol

En ambos casos su mecanismo de acción es a través de la inhibición de la enzima lanosterol 14- α demetilasa en el complejo citocromo P-450 de los hongos, requerida para la síntesis del ergosterol. El resultado es la inhibición de la conversión de lanosterol a ergosterol, bloqueando su desmetilación, con la consecuente depleción de ergosterol, acumulación de precursores y una pérdida de la integridad de la membrana fúngica. El ergosterol es un compuesto esencial de la membrana celular de los hongos que regula la fluidez y permeabilidad de la misma, así como la actividad de las enzimas unidas a ella.

CASPOFUNGINA y ANIDULAFUNGINA

Hasta hace unos años, el manejo de las infecciones micóticas sistémicas se sostenía en tres grupos de antifúngicos; polienos (anfotericina B), azoles (fluconazol, voriconazol, itraconazol, etc.) y la fluocitosina. Sin embargo estos antifúngicos presentaban índices de fracasos elevados, efectos adversos significativos y una creciente resistencia intrínseca o secundaria por parte de algunos hongos. De aquí surgió la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos y por consiguiente la aparición de las equinocandinas. Los representantes de este grupo son lipopéptidos sintéticamente modificados, derivados originalmente de la fermentación de caldos de diferentes hongos. Presentan una estructura formada por un núcleo peptídico unido a un grupo hidrofóbico por medio de un átomo de nitrógeno en el extremo amino-terminal, que integra a una gran cantidad de moléculas debido a la posibilidad de introducir distintos ácidos grasos (equinocandinas, mulundocandinas, neumocandinas, aureobasidina, etc). Entre las dificultades para encontrar nuevos antifúngicos destaca el hecho de que tanto las células fúngicas como las del huésped son eucariotas, con características bioquímicas similares, con lo cual hay una gran probabilidad de provocar efectos adversos sobre el huésped. Por tanto la diana debe ser lo más selectiva y lesiva posible para el crecimiento de la célula fúngica. Los primeros antifúngicos tenían como diana la membrana plasmática, bien mediante la unión a ergosterol, como la anfotericina B, o bien mediante la inhibición de la síntesis, como los triazoles. Además de la membrana plasmática, la pared celular de los hongos posee algunos compuestos exclusivos que no están presentes en ningún otro organismo. Estos compuestos son polímeros carbohidratados, formados por alfa y beta glucano, quitina y manano, que desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de la integridad estructural de la célula fúngica, de manera análoga al peptidoglicano en la pared bacteriana. Dentro de estos compuestos se encuentra el grupo de los inhibidores de la β -

(1,3)-D-glucanosintasa, en la cual se incluyen tres tipos de compuestos químicos: las papulocandina, los lipopéptidos y los terpenoides. [56-57]

Tanto las equinocandinas como las neumocandinas actúan inhibiendo selectiva, no competitiva e irreversiblemente la enzima β -(1,3)-D-glucanosintasa, complejo enzimático esencial para la síntesis de la pared celular fúngica. Esta inhibición causa en consecuencia depleción de glucano de la pared fúngica llevando a un colapso osmótico, balonamiento y por consiguiente la lisis y muerte celular. [33] (Figura 8)

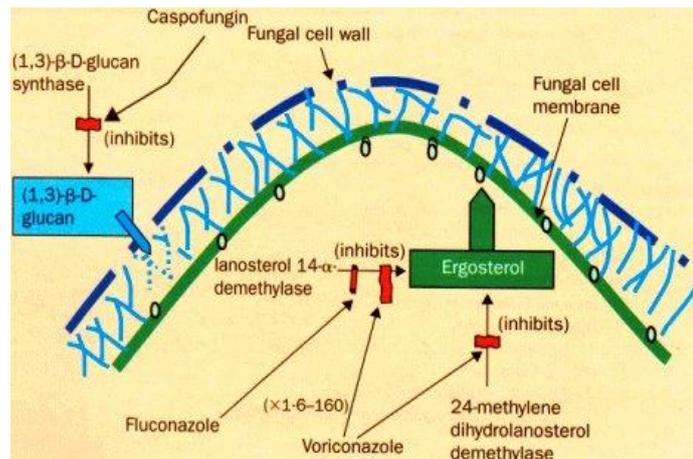


Figura 8. Esquema de los distintos sitios de acción de los antifúngicos conocidos.

(Bidarth T. Rol de voriconazol y caspofungina en terapia antifúngica. Rev Chil Infect 2004; 21(1):S13-9)

De la amplia variedad de familias de fármacos lipopeptídicos ha prosperado la investigación sobre las neumocandinas, entre las cuales se destaca la caspofungina (MK-991 ó L-743872) (Figura 9), es un aminoderivado hidrosoluble perteneciente a una amplia familia de sustancias relacionadas con las equinocandinas. Es fácilmente soluble en agua y metanol y levemente soluble en etanol. Su biodisponibilidad oral es muy baja por lo que es administrada únicamente en forma endovenosa por perfusión lenta, presenta una unión a proteínas plasmáticas del 97%, una semivida de eliminación de 11hs, su metabolización es principalmente hepática y una fracción de fármaco incambiado en orina menor al 1.4%. [58]

Las moléculas actualmente en uso son hexapéptidos cíclicos anfifílicos con una cadena lateral aminoacil-lipídica y un peso molecular de casi 1200 daltons.

La caspofungina en particular tiene un ácido graso como cadena lateral, dicha cadena se introduce en la bicapa lipídica de la membrana celular fúngica constituyendo una parte fundamental desde el punto de vista molecular para su acción farmacológica. [56]

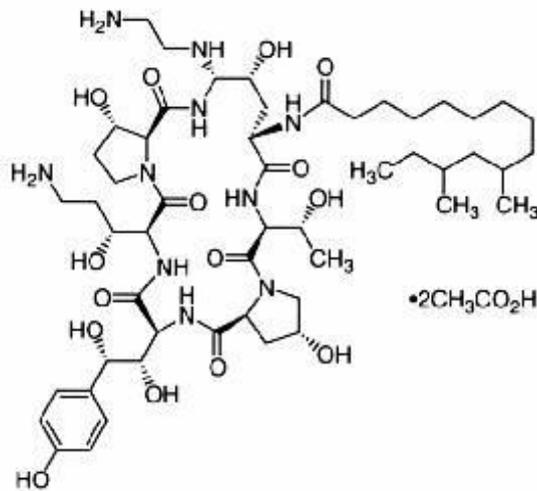


Figura 9. Estructura química de la caspofungina

La anidulafungina, (LY303366) (Figura 10), es el primer representante de las equinocandinas, derivado semisintético del núcleo de la equinocandina B, con una cabeza terfenilo y una cola de cinco átomos de carbono, la cual se intercala en la bicapa fosfolipídica de la membrana celular. [56] No es soluble en agua y levemente soluble en etanol. Su biodisponibilidad oral es muy baja por lo que es administrada únicamente en forma endovenosa por perfusión lenta, presenta una unión a proteínas plasmáticas del 99% y una semivida de eliminación de 26hs.

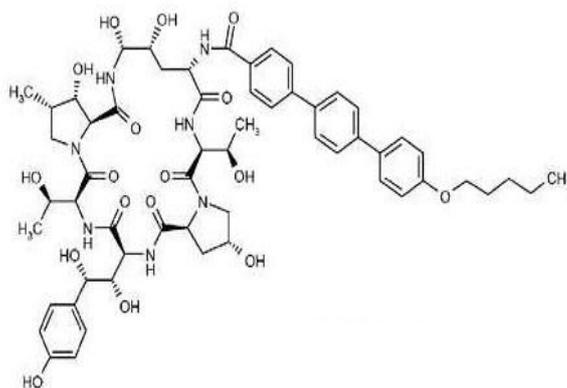


Figura 10. Estructura química de la anidulafungina.

La anidulafungina, a diferencia de otras equinocandinas, como caspofungina y micafungina, no es metabolizada en el hígado, sino degradada en más del 90% lentamente en el plasma mediante un proceso de biotransformación por peptidasas no específicas que abren el anillo de la molécula formando un sustrato que es degradado terciariamente por proteasas plasmáticas. La eliminación de estos productos, junto con un 10% de anidulafungina sin

metabolizar, se realiza por las heces, a través de la bilis, después de pasar por el hígado. Ni la anidulafungina ni sus metabolitos se detectan en la orina. [58]

Como se desprende de lo expuesto anteriormente, al día de hoy existen varios trabajos científicos con ^{99m}Tc relativos a infecciones. Sin embargo, aún no se cuenta con un compuesto adecuado para detección de infecciones fúngicas. Es por ello que resulta fundamental continuar avanzando en el desarrollo de nuevas estructuras.

El objetivo de esta tesis de maestría involucra el diseño, síntesis y evaluación de compuestos de coordinación de tecnecio conteniendo como ligandos diferentes agentes antifúngicos comerciales (fluconazol, voriconazol, caspofungina y anidulafungina) o derivados de estos, como potenciales radiofármacos con selectividad hacia éste tipo de infecciones específicamente. Dicha opción es válida, ya que se trata de moléculas cuyo blanco de acción específico son los agentes causantes de la patología que se quiere diagnosticar.

En todos los casos los antifúngicos estudiados presentan al menos un posible grupo donador para completar la esfera de coordinación del metal haciendo uso de las estrategias de marcación, anteriormente descritas. Fluconazol cuenta con dos anillos triazólicos, voriconazol con un anillo triazólico y una pirimidina, mientras que casofungina y anidulafungina con aminas alifáticas, todos ellos posibles grupos donadores que actúen de acuerdo al caso como ligandos tridentados o en combinación con monodentados y/o bidentados. Más adelante se describirá con detalle, las diferentes etapas que constituyen un diseño racional de un nuevo radiotrazador.

3. OBJETIVOS

En la cátedra de Radioquímica se desarrolla una línea de investigación en el área de agentes de diagnóstico de focos de infección de origen desconocido particularmente dirigida a pacientes inmunocomprometidos. En el marco de esta área de trabajo se busca profundizar en el desarrollo de antifúngicos radiomarcados, como: fluconazol, voriconazol, caspofungina y anidulafungina con grupos quelantes para el ^{99m}Tc . Las etapas correspondientes a este proceso abarcan desde el diseño y la síntesis de los ligandos hasta la evaluación biológica de los radiofármacos obtenidos para diagnóstico.

Los objetivos específicos de este trabajo abarcan los siguientes puntos:

- **Preparación de complejos de ^{99m}Tc .**

Optimización y síntesis de los diferentes complejos utilizando los distintos antifúngicos como ligandos en la formación de complejos $^{99m}\text{Tc(I)-tricarbonílicos}$. Las marcaciones de este tipo implican la sustitución del precursor $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ con los ligandos de interés conteniendo grupos donores adecuados.

- **Caracterización fisicoquímica de los complejos.**

Se estudia el comportamiento fisicoquímico de los complejos previamente sintetizados, estableciendo para cada uno de ellos su lipofilicidad, estabilidad en el medio de reacción, en plasma, frente a Histidina y Cisteína y unión a proteínas plasmáticas

- **Caracterización biológica de los complejos.**

Abarca la evaluación de los complejos desde el punto de vista de su comportamiento biológico, para ello se utilizan modelos animales de infección e inflamación estéril en ratones CD1. Se dará especial atención no sólo al nivel de captación en los focos de infección, sino también a su comportamiento farmacocinético, vías de eliminación y órganos de acumulación.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El [^{99m}Tc]TcO₄⁻ empleado en todas las marcaciones fue eluido de un generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ Tecnonuclear, Industria Argentina, gentilmente donado por el Servicio de Medicina Nuclear de Médica Uruguaya.

Para las determinaciones de actividad se empleó una cámara de ionización CAPINTEC CRC5 o ALFANUCLEAR ACT-15P. También se utilizó detectores de centelleo sólido con cristal de NaI(Tl) de 2x2 pulgadas, de pozo, acoplado a una tarjeta multicanal ORTEC y otro con cristal de NaI(Tl) de 3x3 pulgadas, plano, acoplado a un sistema analizador monocanal ORTEC.

Todos los reactivos y disolventes utilizados fueron de calidad analítica, los solventes orgánicos fueron de grado HPLC. Las soluciones acuosas se prepararon con agua destilada, se filtraron a través de membranas Millipore 0.22 μm y se desgasificaron en baño de ultrasonido.

Se realizó el control del avance de las reacciones de derivatización mediante cromatografía en capa fina (TLC), utilizando sílica-gel o alúmina, con indicador UV en placas de poliéster. El revelado de dichas cromatografías se realizó mediante exposición a luz ultravioleta a 254 nm, exposición a vapores de yodo o sumergiendo la misma en una solución de ácido fosfomolibdico al 10% en etanol. Posteriormente la cromatografía se calentó 1-2 min a 80 °C hasta su revelado.

Los espectros de resonancia magnética nuclear, ^1H -RMN se adquirieron en un equipo Bruker DRX-400 (400 MHz), utilizando los disolventes deuterados que se detallan en cada caso.

Los kits IsolinkTM, Mallinckrodt Medical B.V. empleados en la preparación del precursor tricarbónico fueron proporcionados por Covidien Inc, USA. El monóxido de carbono gaseoso fue de alta pureza de AGA-Speciality Gas, Cleveland, EEUU.

Los ligandos empleados en la síntesis de los complejos, tanto voriconazol, fluconazol como anidulafungina (Anidulafungin Fructose Lot 070264-QCS) fueron adquiridos, bajo la forma de estándares por la Cátedra de Radioquímica de Facultad de Química, mientras que caspofungina fue donada gentilmente por Merck & Co. Inc., bajo la forma de acetato de caspofungina; CANCIDAS-Lot#WEK0050.

Los estudios imagenológicos de todos los compuestos se realizaron en un equipo trimodal PET/SPECT/CT TriumphTM, TriFoil-Imaging, perteneciente al Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM).

4.1. Síntesis de ligandos

4.1.1. Derivatización de anidulafungina

La derivatización se realiza por dos procedimientos diferentes a fin de evaluar en cual de ellos se obtiene el mayor rendimiento de síntesis.

- Método I: se hacen reaccionar, 100mg de anidulafungina, 6.6mg de Br(CH₂)₄Br (1:1 equimolar) y 31mg de K₂CO₃(1,1:1 equimolar) en 5mL de DMF (1/50 m/v) a t.amb.
- Método II: se hacen reaccionar, 200mg de anidulafungina, 13.2mg de Br(CH₂)₄Br (1:1 equimolar) y 11mg de KOH (1,1:1 equimolar) en 5-30mL de MeOH(1/50 m/v y 1/300 m/v) a t.amb.

Ambas reacciones se siguen por control cromatográfico ITLC/AcOEt:MeOH (6:1) durante 24hs. Una vez finalizada la reacción se procede a filtrar y evaporar el disolvente a presión reducida para el posterior análisis de la muestra por RMN.

4.2. Síntesis de los complejos

4.2.1. Síntesis del precursor tricarbonílico *fac*-[^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺

Se pesan 4.0mg de Na₂CO₃, 7.0mg de NaBH₄ y 20.0mg de C₄H₄O₆NaK, se colocan en un vial sellado y se purgan con CO durante 15min. Se agregan entre 20-30mCi (740-1110MBq) de ^{99m}TcO₄⁻ en 1mL de solución salina. La preparación se incuba en baño de agua a 60-70°C durante 20min. Una vez finalizado el calentamiento, se deja enfriar y se neutraliza (pH = 7) con NaH₂PO₄ 390mg/mL en una relación (4:1) carbonilo:fosfato. La pureza radioquímica es determinada por HPLC empleando un cromatógrafo líquido Shimadzu LC-10 AS, acoplado a un detector γ Parken con una columna Macherey-Nagel C18 5u 25cm, flujo 1.0mL/min, fase móvil (A) Buffer fosfato trietilamina (2.86mL de H₃PO₄ por litro) pH: 2.5. (B) Metanol, gradiente, 0 a 3 min 100% A, 3 a 6 min de 100% a 75% de A, 6 a 9 min de 75% a 66% de A, 9 a 20 min de 66% a 0% de A, 20 a 27 min 0% de A, 27 a 30 min de 0% a 100% de A.*

* En adelante mencionaremos este sistema de HPLC como sistema (I).

4.2.2. Síntesis del precursor tricarbónico $fac-[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$ a partir de kit comercial.

Sobre un kit liofilizado Isolink™, que contiene tetraborato de sodio (2.85mg), carbonato de sodio (7.15mg), tartrato de sodio (8.50mg) y boranocarbonato de sodio (2.85mg), se agrega $[^{99m}Tc]TcO_4^-$ (5-50mCi (185-1850MBq), 0.5-1.0mL) eluído a partir de un generador de $^{99}Mo/^{99m}Tc$. A continuación, el vial se calienta en un baño de agua a ebullición durante 20 minutos. El producto obtenido es controlado por HPLC utilizando el sistema (I); antes de realizar la sustitución con los ligandos, se neutraliza como se describe en el punto 4.2.1.

4.2.3. Formación del complejo $[^{99m}Tc][(CO)_3\text{-voriconazol/fluconazol}]$.

Se adicionan 250µL del precursor neutralizado, 550µL de agua y 5mg del ligando que corresponda, previamente disuelto en 200µL de EtOH. Se incuba en baño de agua en las mismas condiciones que el precursor. La pureza radioquímica se controla por HPLC utilizando el sistema (I).

4.2.4. Formación del complejo $[^{99m}Tc][(CO)_3\text{-AcAc-voriconazol/fluconazol}]$.

Se obtiene mediante una reacción en dos etapas:

- **Formación del complejo $[^{99m}Tc][(H_2O)(CO)_3\text{-AcAc}]$.**

Se adicionan 250µL del precursor neutralizado y 300µL de acetilacetona (AcAc) 0.2M. Se incuba en baño de agua a (65-67)°C durante 30 minutos. La pureza radioquímica se controla por HPLC utilizando el sistema (I).

- **Sustitución del complejo $[^{99m}Tc][(H_2O)(CO)_3\text{-AcAc}]$ con voriconazol/fluconazol.**

Se adicionan 300µL del complejo, 10mg del ligando (voriconazol o fluconazol) en 200µL de EtOH absoluto. Se incuba en baño de agua a (65-67)°C durante 30 minutos. La pureza radioquímica se controla por HPLC utilizando el sistema (I).

4.2.5. Formación del complejo $[^{99m}Tc][(CO)_3\text{-caspofungina}]$.

Se adicionan 250µL del precursor sin neutralizar, 3mg de caspofungina (estándar de caspofungina, en forma de acetato (CANCIDAS-Lot#WEK0050), MERCK) previamente disuelto en 200µL de EtOH. Se incuba en baño de agua a 70°C durante 30 min. La pureza radioquímica se controla por HPLC utilizando el sistema (I).

4.2.6. Formación del complejo [^{99m}Tc][**(CO)₃-anidulafungina**].

Se adicionan 250µL del precursor neutralizado, 350µL de agua y 1-5mg de anidulafungina disuelta en 400µL de EtOH. Se incubó en baño de agua en las mismas condiciones que el precursor. La pureza radioquímica se controla por HPLC utilizando el sistema (I). Además en este caso en particular se realizan los controles de pureza radioquímica utilizando el siguiente sistema de HPLC: columna Waters C18, flujo 1.0mL/min, fase móvil (A) Ác. Trifluoroacético 0.1% (v/v) en H₂O, (B) Ác. Trifluoroacético 0.1% (v/v) en CH₃CN, gradiente 0-10min de 100% a 0% A, 10-20min de 0% a 100% de A, 20-30min 100% de A.**

**

En adelante mencionaremos este sistema de HPLC como sistema (II).

4.2.7. Marcación de anidulafungina con pirofosfato de sodio como ligando intermediario.

Se toman 50µL de un kit de pirofosfato conteniendo 58mg de pirofosfato y 2.6mg de SnCl₂ en 1mL de agua, los cuales se adicionaron a 5mg de anidulafungina disuelta en 1mL de EtOH:H₂O (6:4). A la mezcla de reacción se le adicionan 0.5-1mL de ^{99m}TcO₄⁻ con una actividad entre 5-10mCi (185-370MBq). La pureza radioquímica del kit de ^{99m}Tc-pirofosfato se controla por cromatografía en capa fina utilizando los sistemas descritos a continuación. (Tabla 2)

Tabla 2. Sistemas cromatográficos en capa fina utilizados para analizar la pureza radioquímica del kit de ^{99m}Tc-pirofosfato.

Acetona/Whatman 3	
(Rf: 0)	[^{99m} Tc]Tc-pirofosfato/[^{99m} Tc]TcO ₂
(Rf: 0,9 -1,0)	[^{99m} Tc]TcO ₄ ⁻
NaCl 0,9%/ITLC-SG	
(Rf: 0)	[^{99m} Tc]TcO ₂
(Rf: 0,9 -1,0)	[^{99m} Tc]Tc-pirofosfato/[^{99m} Tc]TcO ₄ ⁻

La pureza radioquímica de la anidulafungina marcada se realiza utilizando el siguiente sistema de HPLC: columna de intercambio aniónico PRP-X100 HAMILTON, flujo 1.0mL/min, fase móvil (A) Tris 20mM pH 8-9, (B) NaCl 1M en Buffer A, gradiente 0-5min 100% A, 5-10min de 100% a 0% de A, 10-30min 0% de A.*** El kit de ^{99m}Tc -pirofosfato también es controlado por el sistema (III) de HPLC para tenerlo como referencia respecto a la anidulafungina marcada a fin de poder diferenciarla.

En adelante mencionaremos este sistema de cromatografía en capa fina y HPLC como sistema (III).

4.2.8. Marcación de anidulafungina con glucoheptonato como ligando intermediario.

Se toman 50 μL de un kit de glucoheptonato conteniendo 51mg de glucoheptonato y 1mg de SnCl_2 en 1mL de agua, los cuales se adicionaron a 5mg de anidulafungina disuelta en 1mL de $\text{EtOH:H}_2\text{O}$ (6:4). A la mezcla de reacción se le adicionan 0.5-1mL de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ con una actividad entre 5-10mCi (185-370MBq). Los controles de pureza radioquímica tanto del kit de ^{99m}Tc -glucoheptonato como del marcado de anidulafungina se realizan utilizando el sistema (III)

4.2.9. Marcación directa de anidulafungina

Se hacen reaccionar 5mg de anidulafungina en 1mL de $\text{EtOH:H}_2\text{O}$ (6:4) con 10-20 μg de SnCl_2 y 0.5-1mL de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ con una actividad entre 5-6mCi (185-222MBq). Los controles de pureza radioquímica se realizan utilizando los siguientes sistemas cromatográficos. (Tabla 3).

Tabla 3. Sistemas cromatográficos en capa fina utilizados para analizar la pureza radioquímica de la marcación directa de anidulafungina.

Acetona/Whatman 3	
(Rf: 0)	$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-anidulafungina}/[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_2$
(Rf: 0,9 -1,0)	$[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$
EtOH/NH₃/H₂O (2:1:5)/ITLC-SG(0.5% BSA)	
(Rf: 0)	$[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_2$
(Rf: 0,9 -1,0)	$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-anidulafungina}/[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$

4.3. Caracterización fisicoquímica de los complejos.

4.3.1. Determinación de la estabilidad en el medio de reacción.

La estabilidad de los complejos sintetizados es evaluada a distintos tiempos de reacción mediante incubación de la mezcla a temperatura ambiente, en el medio de reacción. La pureza radioquímica del complejo es controlada mediante el sistema de HPLC descrito para cada caso.

4.3.2. Determinación de la lipofilicidad.

La lipofilicidad de los complejos sintetizados es evaluada a pH=7.4 mediante la determinación del coeficiente de partición octanol/buffer fosfato 0.1M. Para ello, se colocan en un tubo de centrifuga la fase orgánica (octanol, 2mL) y la fase acuosa (buffer fosfato 0.1M, pH=7.4, 2.0mL). A continuación, se agrega la solución conteniendo el complejo (100µL), la mezcla es agitada mediante agitador vórtex durante 2 minutos. Posteriormente, se centrifuga durante 5 minutos a una velocidad de 5000rpm en una centrifuga EVA III, una vez que ambas fases están separadas, se realizan 2 tomas de cada fase (entre 2-50µL) y se mide su actividad en un contador de centelleo sólido. El procedimiento completo se realiza por triplicado. La lipofilicidad se calcula como:

$$L = \log P, \text{ siendo } P = \frac{Act_{\text{octanol}}}{Act_{\text{buffer}}}$$

4.3.3. Determinación del porcentaje de unión a proteínas plasmáticas.

La unión a proteínas plasmáticas se determina mediante exclusión molecular, en columnas *GE Health care illustra Micro Spin G-50*. Se incuban a 37°C, 50µL del compuesto radiomarcado con 950µL de plasma humano. El buffer de conservación de las columnas es extraído mediante centrifugación de las mismas durante 2 minutos a 2000rpm (centrifuga EVA III). A tiempos de 30, 60 y 90 minutos de incubación se toman alícuotas de 50µL que se siembran en las micro columnas, luego de 2 minutos las columnas son centrifugadas nuevamente durante 2 minutos a 2000rpm. Finalizada esta etapa, se mide la actividad eluída de la columna y la retenida en ella en un equipo de centelleo sólido. Se calcula la unión a proteínas en términos de porcentaje de actividad eluída de la columna.

4.3.4. Determinación de la estabilidad frente a plasma.

La estabilidad en plasma es evaluada mediante la incubación de los complejos (100 μ L) con un pool de plasma humano (1000 μ L) a 37°C. A las 0.5, 1, 2, 3 y 4 horas de incubación, se realiza una toma de muestra (200 μ L) y, una vez extraída, se precipitan las proteínas plasmáticas con etanol absoluto frío (-15°C, 200 μ L) seguido de incubación durante 5 minutos a -18°C. Una vez completada la precipitación, las muestras son centrifugadas a 15000rpm durante 5 minutos a 0°C. La pureza radioquímica del complejo es controlada mediante el sistema de HPLC descripto para cada caso.

4.3.5. Determinación de la estabilidad frente a histidina y cisteína.

La estabilidad frente a histidina y cisteína es evaluada para determinar el nivel de intercambio de los ligandos. En una solución del aminoácido correspondiente de 0,8mg/mL, se adiciona el complejo en estudio en relación de volumen 2:1 (complejo:solución del aminoácido). Se incuba en baño de agua a 37°C, a las 0.5, 1, 2, 3 y 4 horas de incubación, se realiza una toma de muestra (200 μ L) y se analiza la pureza radioquímica por HPLC bajo las mismas condiciones en las que fue evaluada la reacción de marcación.

4.3.6. Determinación de la unión a levaduras.

Se preparan las siguientes soluciones: A, Buffer fosfato 14mM pH 7,5; B, suspensión de *C.albicans*, 15x10⁶ufc/mL (Mc Farlan 5) en A; C, Tween 80 al 0,01% en buffer A (v/v); D, Ácido acético al 0,1% (v/v); E, mezcla v/v de soluciones C y D, preparar inmediatamente antes de su uso. Se realizan 7 diluciones al medio seriadas de B en NaCl 0,9% en tubos Eppendorf y un blanco conteniendo solamente NaCl 0,9%. A cada tubo se adicionan 0,8mL de solución E, se incuban 15min, 4°C y se agrega 0,1mL del marcado diluido 1/10 en buffer A. Se incuba 1h a 4°C. Se mide la actividad total a toda la serie. Se centrifuga a 2500rpm, 5min, 4°C, se descarta el sobrenadante, se resuspende el pellet en 1mL de E y se vuelve a centrifugar a 2500rpm, 5min, 4°C. Se descarta cuidadosamente el sobrenadante, se mide la actividad final del pellet. Todo el procedimiento se realiza por duplicado.

4.4. Caracterización biológica de los complejos

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo al protocolo aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA N° 07-05-10) (Universidad de la República, Uruguay). El modelo animal consistió en ratones CD1, hembras de 8-10 semanas de edad y un peso entre 22 ± 2 gramos ($n=3$ por grupo). Los ratones fueron mantenidos en condiciones de alojamiento higiénicas, con ciclos de 12:12 horas de luz-oscuridad y temperatura de $22\pm 2^\circ\text{C}$, con comida y agua *ad libitum*.

4.4.1. Biodistribución en animales control

La evaluación biológica se realizó en cuatro grupos, el grupo 1 (G1) fue con animales normales para determinar la distribución biológica de los complejos, con especial atención en sangre, comportamiento farmacocinético, vías de eliminación y sitios de captación específicos y no específicos como referencia.

4.4.2. Biodistribución en modelo animal de inflamación e infección

El grupo 2 (G2) consistió en animales a los que se indujo inflamación estéril por inyección de 0.1 mL de aceite de trementina diluida en suero fisiológico (1:5 v/v) por vía intramuscular en la pata trasera izquierda. A los grupos de ratones tercero (G3) y cuarto (G4) se indujo la infección con 0.1 mL (9×10^8 ufc) de *Candida albicans* (N° catálogo 0443 Lote 443-183 ATCC (R) 10231TM) y *Aspergillus niger* (N° catálogo 0392 Lote 392-87 ATCC (R) 16404TM) respectivamente, inoculado por vía intramuscular en la pata trasera izquierda.

Los complejos diluidos en suero fisiológico se administraron por vía i.v. en la vena de la cola, 0.1 mL, 1 mCi (37 MBq). Los tiempos de biodistribución fueron de 1 y 3 horas para [^{99m}Tc][$(\text{CO})_3$ -voriconazol/fluconazol] y [^{99m}Tc][$(\text{CO})_3$ -AcAc-voriconazol/fluconazol] mientras que para [^{99m}Tc][$(\text{CO})_3$ -caspofungina] los tiempos fueron de 3 y 12 horas. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y los órganos extraídos en forma individual a fin de medir la actividad acumulada en cada uno de ellos. Los órganos, tejidos y muestras de interés, así como una muestra de la lesión (infección/inflamación) fueron extraídos, pesados y su actividad medida en un contador de centelleo sólido, se realizaron las correcciones por geometría y decaimiento correspondientes para cada caso. Se determinaron los porcentajes de dosis por órgano para establecer el comportamiento del fármaco.

4.4.3. Imágenes en modelo animal de inflamación, infección y control

Para la obtención de imágenes los animales fueron anestesiados con isofluorano 2,5% en flujo de 1,5mL/min de O₂. La adquisición se realizó a un tiempo de 3 horas post inyección para [^{99m}Tc][₃-(CO)-voriconazol/fluconazol] y a 12 horas post inyección para [^{99m}Tc][₃-(CO)-caspofungina]. Se utilizó un equipo para pequeños animales TriumphTM PET / SPECT / CT (Gamma Medica, Inc.), las condiciones de adquisición se mencionan a continuación: tiempo del estudio 60 minutos, ROR (radius of rotation) de 40mm, colimador 5 pinhole, matriz de 80x80. En el caso de [^{99m}Tc][₃-(CO)-voriconazol/fluconazol] se realizaron imágenes gama planares mientras que para [^{99m}Tc][₃-(CO)-caspofungina] se realizaron imágenes SPECT. La tomografía computada (CT) se realizó en las siguientes condiciones para todos los casos: 512 proyecciones, 6.4 min, magnificación 1.4, 3 frames. Se utiliza un animal por grupo en el tiempo óptimo de biodistribución, el procesamiento de imágenes se realiza seleccionando ROIs/VOIs (Region of Interest/Volume of Interest), según el caso, en el músculo infectado (pata trasera izquierda) y en la misma región del miembro contralateral (pata trasera derecha). Para el análisis y cuantificación de imágenes se utiliza el programa PMOD especialmente diseñado para el uso en pequeños animales.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

5.1. Síntesis de ligandos

5.1.1. Derivatización de anidulafungina

La derivatización de anidulafungina tiene como propósito permitir la conjugación de la misma con un grupo altamente versátil (1,2,3-triazol-1,4-disustituido) que proporcione los átomos necesarios para la coordinación en los complejos Tc(I)-*tricarbonílicos*. Para ello la estrategia utilizada ha sido la cicloadición [4+2] de Huisgen entre azidas y alquinos terminales catalizada por Cu^+ , dicha reacción es la más representativa del concepto “*Click Chemistry*”. [59-62] (Figura 11).

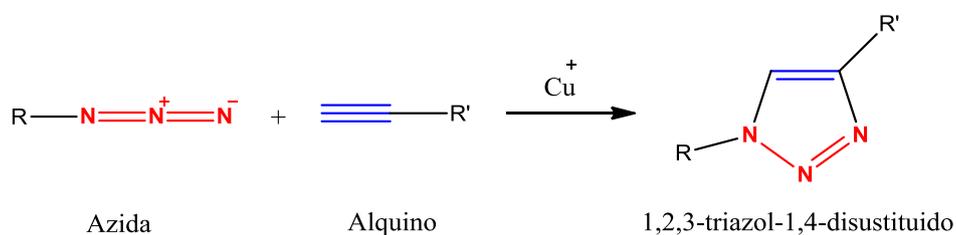


Figura 11. Cicloadición [4+2] de Huisgen.

Para ello, en una primera instancia se incorpora a la molécula en estudio, a través de un conector, un grupo azida y posteriormente, se realiza la cicloadición con un alquino que contenga otras funciones ricas en electrones que también actúen como átomos donores en el complejo final. [7] El nitrógeno 3 del 1,2,3-triazol, así como los átomos presentes en la sustitución 4 (R'), pueden proporcionar dos átomos donores más para la coordinación, convirtiéndolo en un ligando tridentado de excelentes propiedades.

En particular para la preparación de este ligando, la estrategia fue aprovechar la mayor reactividad del alcohol bencílico presente en la anidulafungina. Para ello se intentó derivatizar la misma con $\text{Br}(\text{CH}_2)_4\text{Br}$ para la posterior sustitución del bromo por la azida y su posterior cicloadición a una molécula de propargilglicina. De esta manera, se estarían incorporando tres posibles átomos donores: un N del triazol, el N de la amina primaria y el O del ácido carboxílico, lo que conduciría a un ligando del tipo tridentado. [60] (Figura 12)

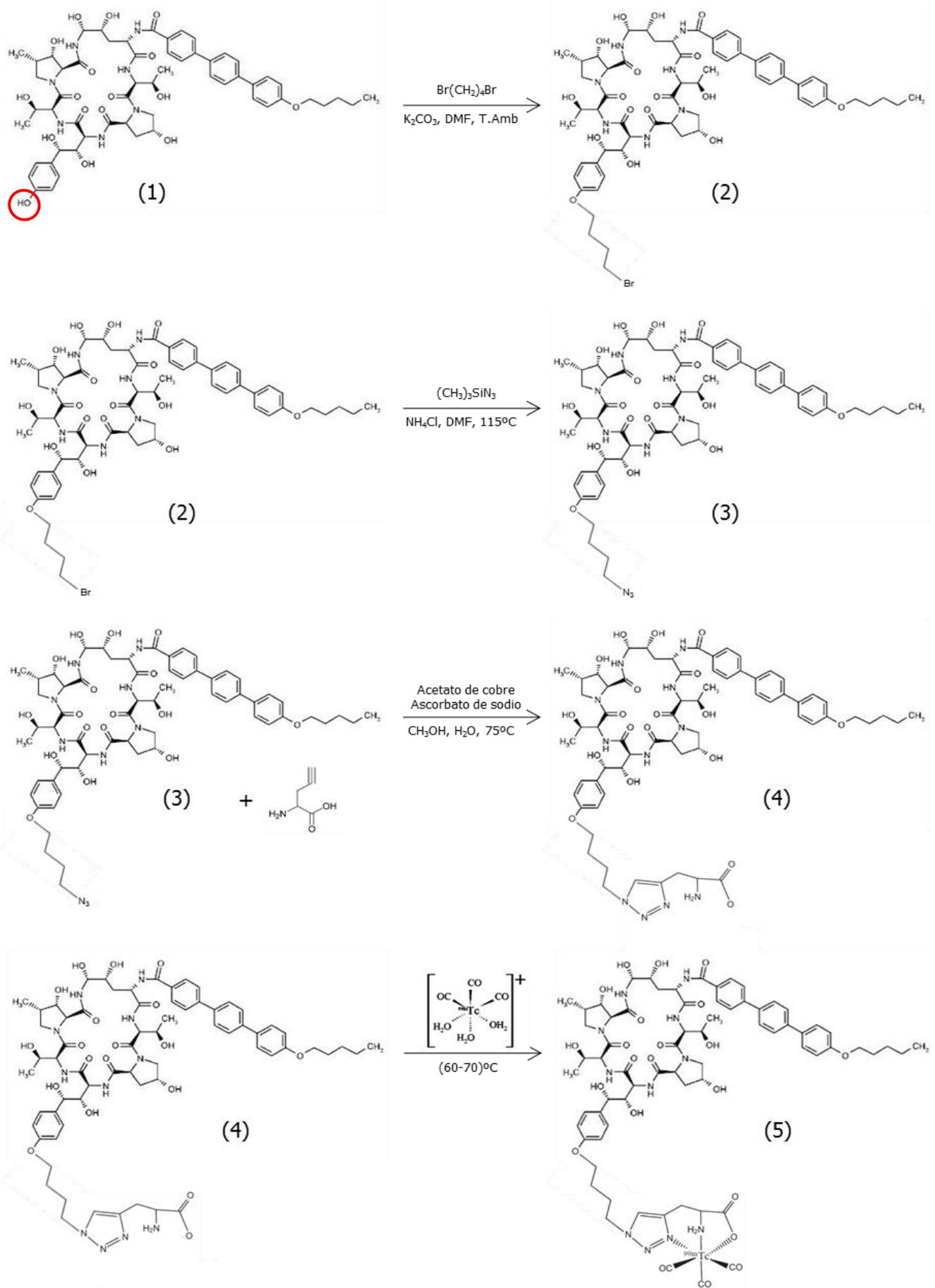


Figura 12. Ruta de síntesis de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-anidulafungina}]$ derivatizada.

La principal ventaja de esta reacción es su alto rendimiento ya que la selectividad entre azidas y alquinos es muy elevada, lo cual minimiza las reacciones cruzadas. Sin embargo los sistemas cromatográficos utilizados (ITLC) no lograron discriminar el avance de reacción. No se logró observar el $\text{Br}(\text{CH}_2)_4\text{Br}$ de partida, dada su baja concentración, ni tampoco se observó claramente la aparición de producto de reacción. De todas maneras se realizó el ^1H -RMN del producto de reacción para ser comparado con el ^1H -RMN de la anidulafungina como patrón. En el espectro de ^1H -RMN para la anidulafungina patrón se pueden observar las señales asignadas a la mayoría de los grupos de protones de la molécula. (Figura 13) El grupo de protones metilénicos de la cola de cinco átomos de carbono $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ aparecen, como es esperable, en la región de δ bajos (1-2,5 ppm), la señal a 2,5 ppm y 3,18-3,42 ppm corresponden al protón del DMSO y a los protones del H_2O de los solventes respectivamente, las señales entre 3,5-5,5 ppm son asignadas a los protones del macrociclo y las señales entre 6,5-8,5 ppm corresponden a los protones de la cabeza terfenilo y a los del anillo fenólico.

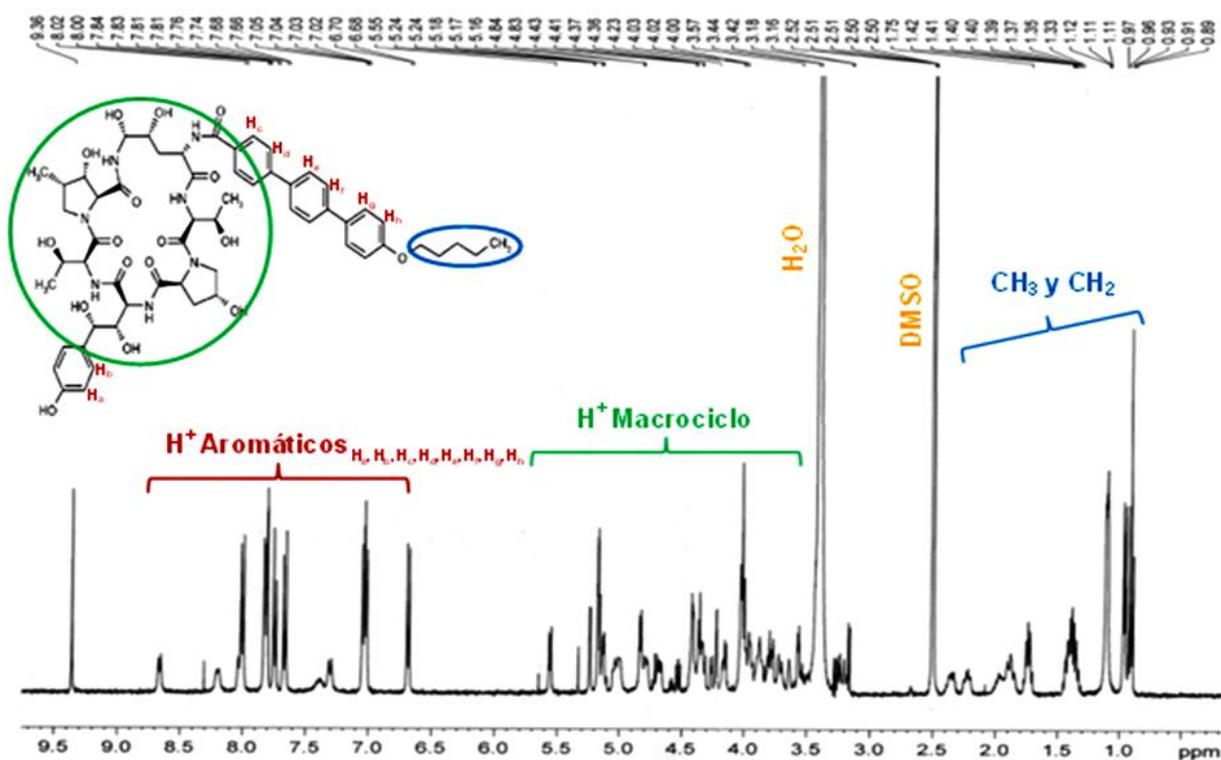


Figura 13. Espectro de ^1H -RMN para anidulafungina (patrón).

Sin embargo en el espectro ^1H -RMN del producto de reacción, podemos observar solamente el pico característico del protón del CHCl_3 a 7,28 ppm junto con sus satélites a 7,54 y 7,02 ppm. En 1,5 ppm se observa la señal correspondiente a los protones del H_2O de los solventes. No observándose las demás señales mencionadas en el espectro de ^1H -RMN para la anidulafungina patrón, las cuales han desaparecido lo que evidencia claramente la descomposición de la anidulafungina ya que las señales del macrociclo, de la cabeza terfenilo y la cola de cinco átomos de carbono (farmacóforo de anidulafungina) deberían mantenerse si solamente se hubiera sustituido el protón del OH fenólico por el $(\text{CH}_2)_4\text{Br}$. (Figura 14)

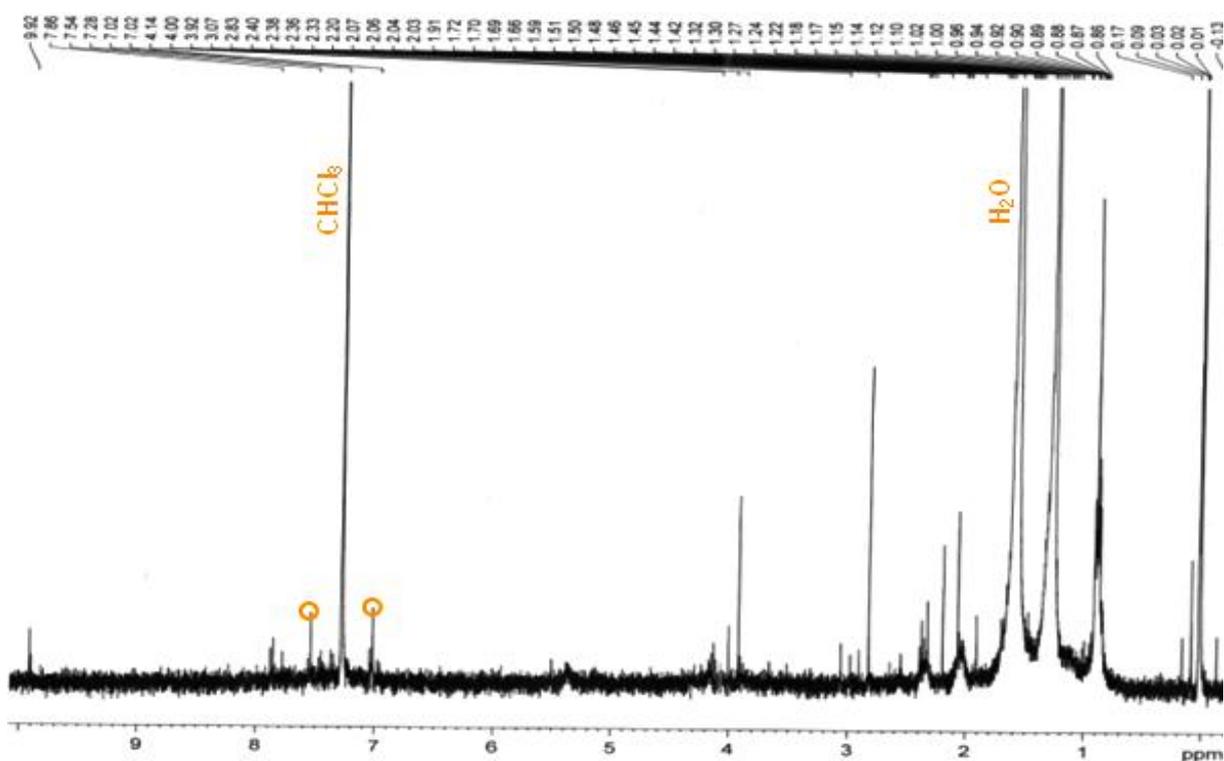


Figura 14. Espectro de ^1H -RMN para el producto de reacción de anidulafungina.

Dada la imposibilidad de hacer reaccionar la anidulafungina, en las diferentes condiciones de reacción estudiadas, sin que esta se degrade perdiendo su estructura, se decide continuar con la marcación de la misma por diferentes metodologías y dejar para futuros estudios el intento de derivatización. Las metodologías utilizadas se describen más adelante en los puntos 5.2.6 al 5.2.9 de la presente tesis.

5.2. Síntesis de los complejos

5.2.1. Síntesis del precursor tricarbonílico $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$

La primera etapa en la síntesis de los complejos tricarbonílicos de ^{99m}Tc consiste en la preparación del acuo-complejo conteniendo el core tricarbonílico con el metal en el estado de oxidación +1, el $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$. Éste se utiliza como complejo precursor o intermediario dado que las tres moléculas de agua coordinan al metal a través de enlaces lábiles, lo cual permite una sencilla sustitución por ligandos que contengan grupos adecuados para coordinar al metal en ese estado de oxidación.

La síntesis del mismo puede realizarse de dos maneras diferentes. Una de ellas parte de monóxido de carbono gaseoso en presencia de un reductor, borohidruro de sodio, en un medio de reacción fuertemente alcalino dado por tartrato de sodio y potasio y carbonato de sodio. La segunda posibilidad emplea un kit comercial que contiene boranocarbonato de sodio que actúa como dador de CO *in situ* y como reductor al mismo tiempo. El kit liofilizado contiene carbonato de sodio para generar el medio alcalino. Ambas alternativas se basan en el mismo principio, únicamente se modifica el reductor y la fuente de CO y han resultado de gran utilidad ya que son capaces de dar una reacción cuantitativa a presión atmosférica, a diferencia del procedimiento tradicional de preparación de estos complejos que requiere altas presiones y altas temperaturas. Por el contrario, en estos casos, la reacción ocurre a presión atmosférica y a temperaturas entre 60 y 80 °C, debido a la baja concentración del metal y la alta afinidad del centro metálico para capturar tres moléculas de monóxido de carbono como forma de estabilizar el estado de oxidación +1. [7]

Dicho precursor fue sintetizado obteniéndose una pureza radioquímica superior al 98%, con un tiempo de retención de (2,5-3,5)min, la cual fue controlada a través de un sistema de HPLC de fase reversa, sistema (I). (Figura 15).

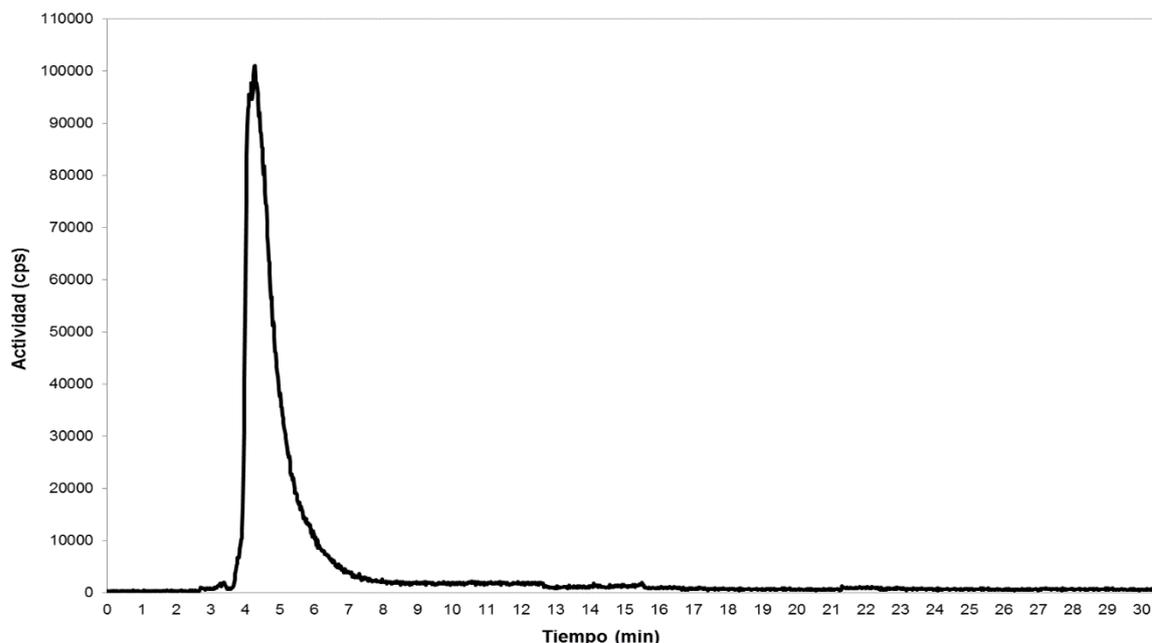


Figura 15. Perfil cromatográfico (HPLC) para el precursor tricarbonílico $fac-[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$

5.2.2. Síntesis del precursor tricarbonílico $fac-[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$ a partir de kit comercial

En el punto anterior se describe el contenido y función de cada uno de los reactivos presentes en el kit comercial así como las ventajas del mismo frente al procedimiento tradicional de preparación de estos complejos.

Dicho precursor fue sintetizado obteniéndose una pureza radioquímica superior al 98%, en todos los casos y fue controlado por HPLC como se describe en el punto 5.2.1. (Figura 15).

5.2.3. Síntesis del complejo $[^{99m}Tc][(CO)_3\text{-voriconazol/fluconazol}]$.

La marcación fue realizada por sustitución del precursor con los ligandos fluconazol y voriconazol respectivamente. Los perfiles cromatográficos de ambos complejos $[^{99m}Tc][(CO)_3\text{-fluconazol/voriconazol}]$ mostraron la presencia de dos especies mayoritarias.

En el caso del complejo $[^{99m}Tc][(CO)_3\text{-voriconazol}]$ dichas especies mayoritarias presentan tiempos de retención de 23,1min (35%) y 23,5min (56%) en una relación 1:1.6 en el sistema de HPLC descrito previamente. (Figura 16).

Cuando se purifica la especie mayoritaria ($t_R=23,5\text{min}$) por aislamiento del pico cromatográfico de HPLC, los controles de estabilidad en el tiempo demuestran la aparición nuevamente de la especie minoritaria ($t_R=23,1\text{min}$). Estos resultados indican que la especie mayoritaria se inter-convierte en la especie minoritaria, y éstas podrían corresponder a diferentes maneras de coordinación del ligando. Los estudios de estabilidad en el tiempo muestran que el perfil se mantiene por 4 horas, lo que supone un estado de equilibrio para las especies formadas. Toda la caracterización fisicoquímica y biológica del complejo se ha realizado tomando el total de la actividad, sin purificar los picos.

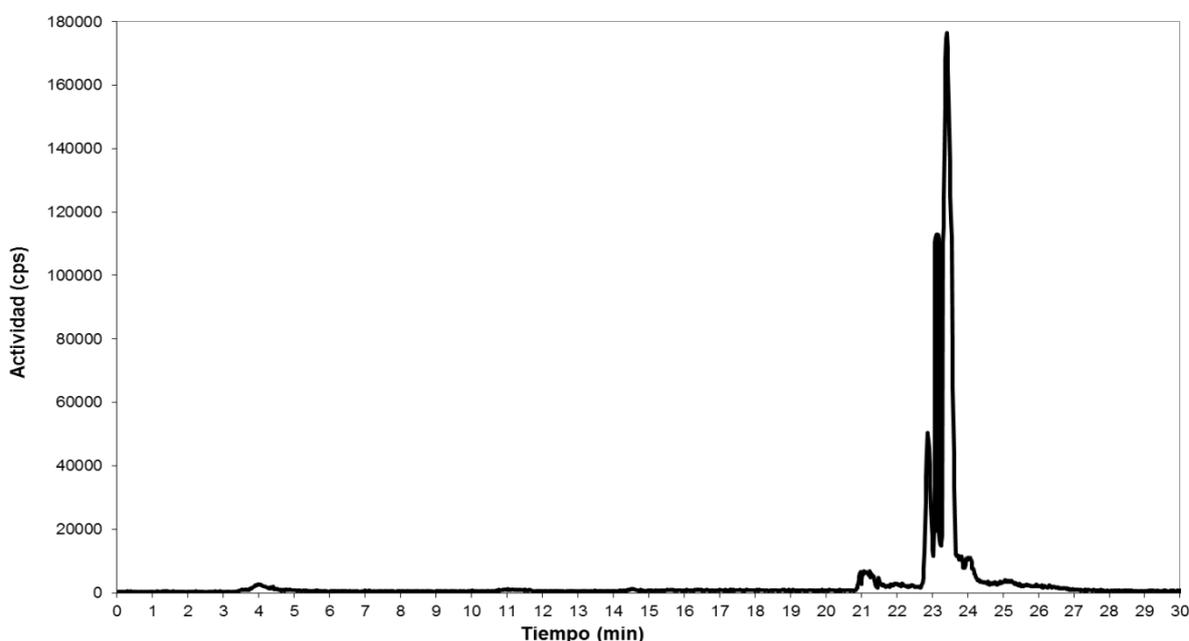


Figura 16. Perfil cromatográfico (HPLC) para el complejo $[^{99\text{m}}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-voriconazol}]$

Para el complejo $[^{99\text{m}}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-fluconazol}]$ las dos especies mayoritarias presentan tiempos de retención de 18,1min (30%) y 19,5min (63%), en una relación de 1:2

Al igual que para el complejo anterior, la especie minoritaria es generada a partir de la especie mayoritaria, hecho que se ha puesto de manifiesto al intentar separarlas mediante extracción del pico por HPLC. Por lo tanto, toda la caracterización fisicoquímica y biológica del complejo se ha llevado a cabo con ambos picos sin purificar. (Figura 17).

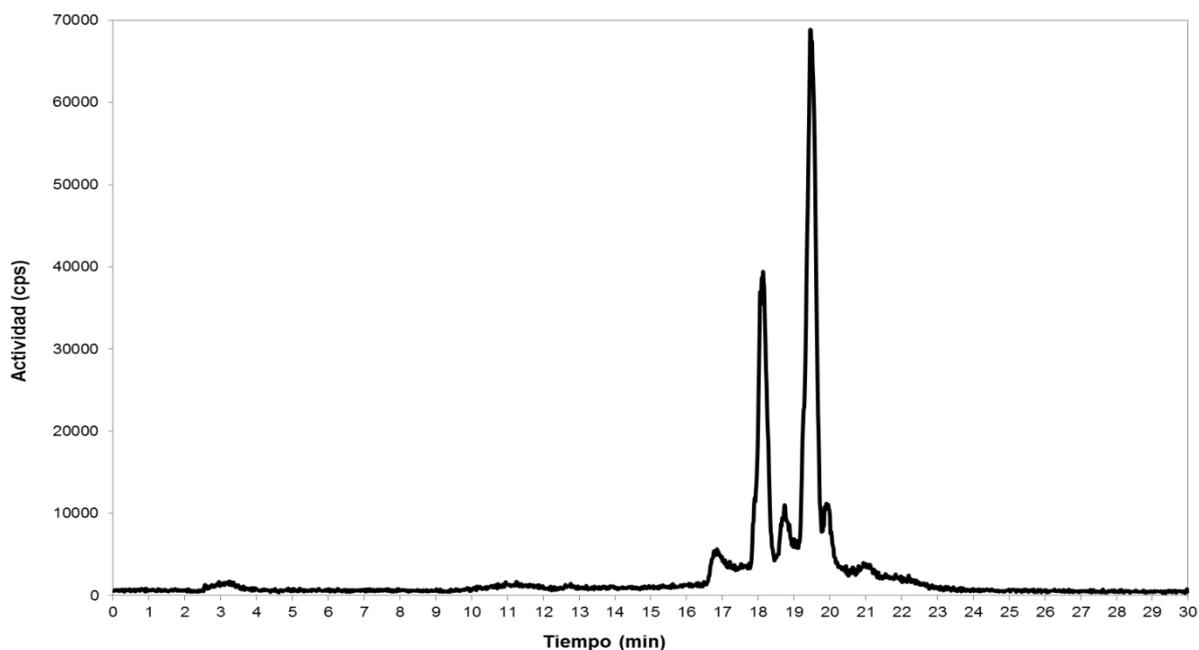


Figura 17. Perfil cromatográfico (HPLC) para el complejo $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-fluconazol}]$

5.2.4. Síntesis del complejo $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-voriconazol/fluconazol}]$.

Como se ha descrito en los puntos anteriores, los cromatogramas de los complejos $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-voriconazol/fluconazol}]$ presentaron más de un pico de interés correspondientes a isómeros en equilibrio de los mencionados complejos. Con el fin de intentar obtener especies únicas en las síntesis, y ante la imposibilidad de separación de las mismas; la estrategia de elección fue la preparación de complejos tricarbónicos mixtos de tipo 2+1, en los cuales dos moléculas de agua del precursor son sustituidas por un ligando bidentado, acetilacetona (AcAc) (Figura 18). Posteriormente, en un segundo paso de síntesis, se procede a la sustitución de la última molécula de agua del complejo por otro ligando actuando como monodentado, en nuestro caso voriconazol o fluconazol.

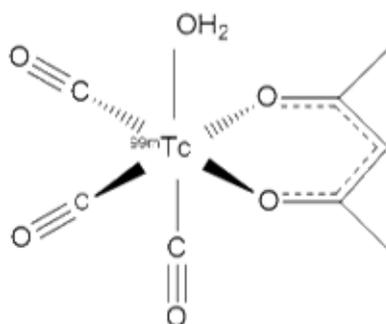


Figura 18. Estructura del complejo $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})\text{-AcAc}]$, primer paso en la síntesis de los complejos tricarbónicos de tipo 2+1.

De esta manera se minimizan las conformaciones posibles para los mencionados isómeros. El complejo $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})\text{-AcAc}]$ se obtuvo en todos los casos con una pureza radioquímica superior al 90%; en la segunda etapa, la incorporación al complejo del ligando de interés, se obtuvo para ambos complejos $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-voriconazol/fluconazol}]$ un rendimiento promedio mayor al 90%. (Figuras 19 y 20).

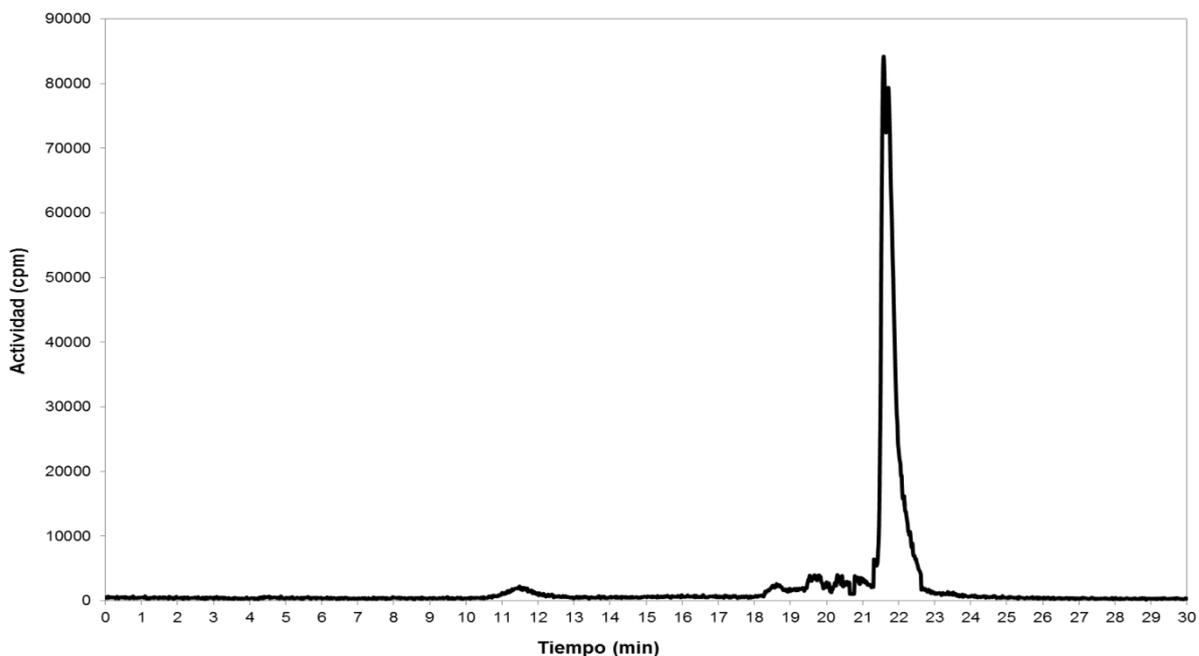


Figura 19.Perfil cromatográfico (HPLC) para el complejo $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-voriconazol}]$.

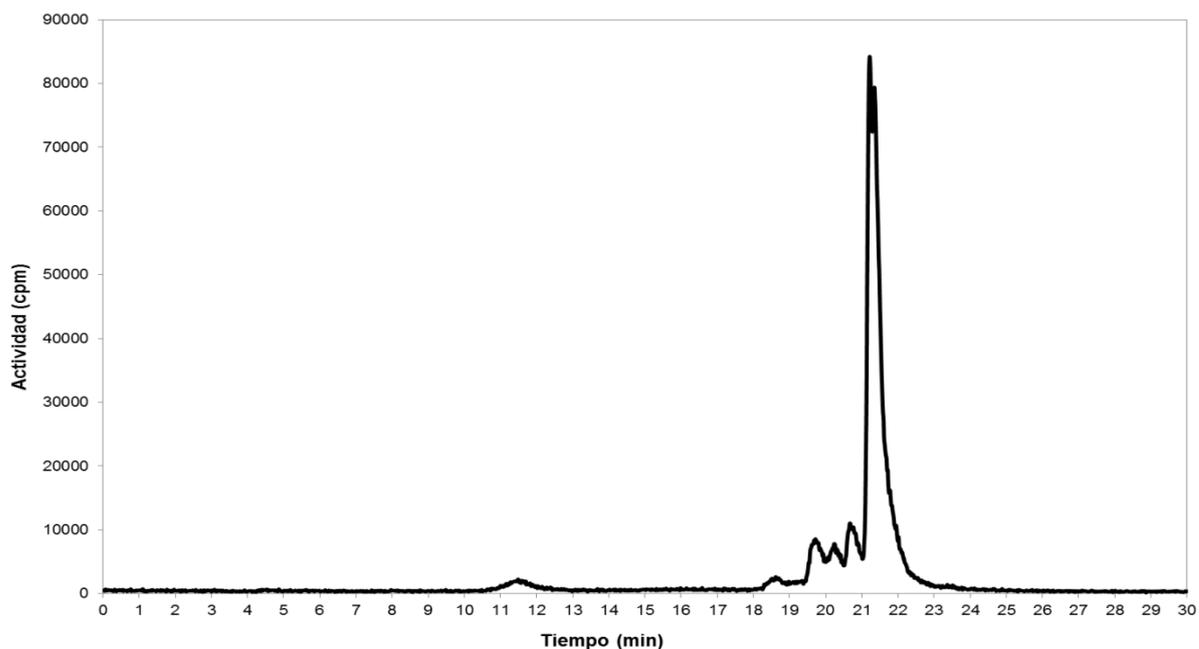


Figura 20.Perfil cromatográfico (HPLC) para el complejo $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-fluconazol}]$.

5.2.5. Síntesis del complejo [^{99m}Tc][$(\text{CO})_3$ -caspofungina].

La caspofungina tiene restos amino e hidroxilo terminales, en su núcleo peptídico que puede actuar como grupos donores para unirse al metal en el precursor tricarbonílico $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ Alberto et al [20-23].

A continuación se muestra la estructura química propuesta del precursor tricarbonilo unido a grupos amino e hidroxilo de caspofungina. (Figura 21) Esta configuración molecular plantea un complejo tridentado que, no afecta el acilo lateral de caspofungina por lo que, la unión al complejo no debería interferir con las propiedades de unión de la molécula a su sitio de acción en la pared del hongo. [63]

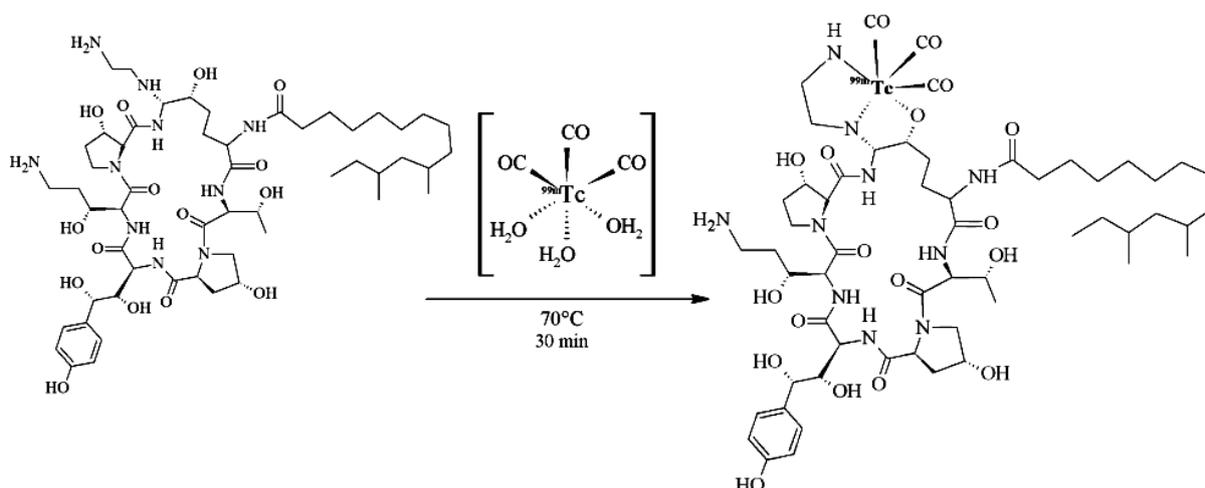


Figura 21. Estructura propuesta para el complejo [^{99m}Tc][$(\text{CO})_3$ -caspofungina].

Partiendo de un precursor tricarbonilo de pureza superior a 95%, se obtiene el complejo [^{99m}Tc][$(\text{CO})_3$ -caspofungina] con una pureza radioquímica superior al 90%. En los casos en que la pureza radioquímica no supera dicho porcentaje se procede al aislamiento del pico, el cual es controlado por HPLC, resultando en una separación satisfactoria, con una pureza radioquímica mayor a 95% y estable en el tiempo. (Figura 22).

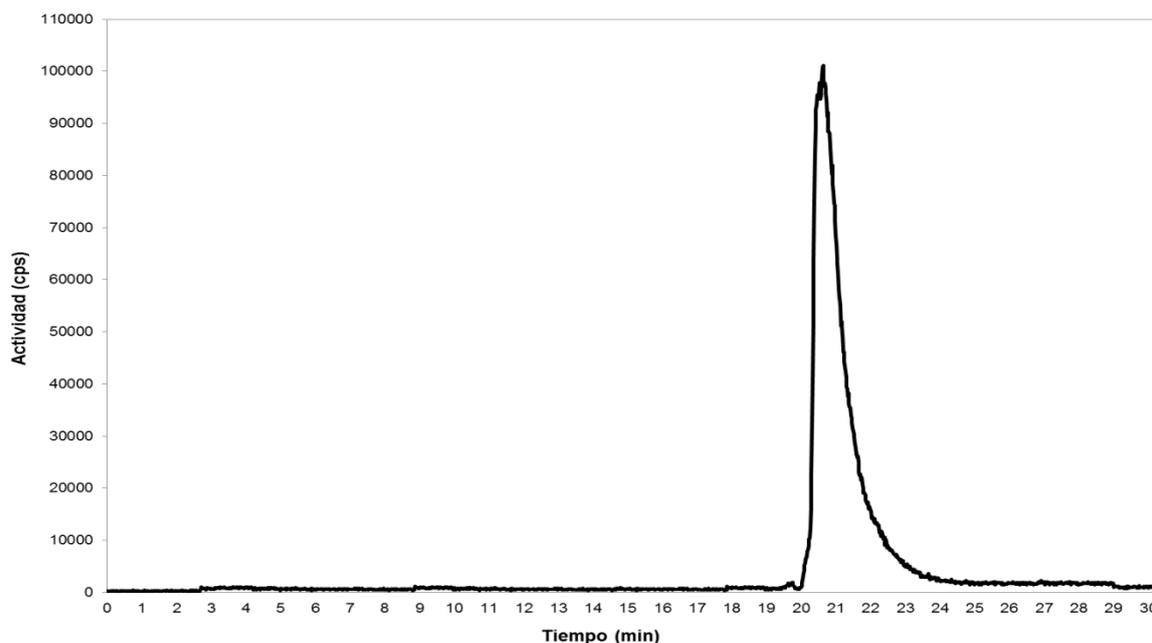


Figura 22. Perfil cromatográfico (HPLC) para el complejo $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-caspofungina}]$.

5.2.6. Síntesis del complejo $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-anidulafungina}]$.

La sustitución del precursor con anidulafungina dio lugar a dos especies mayoritarias, con tiempos de retención de 1,9min (20%) y 2,9min (80%) en el sistema (I) de HPLC. (Figura 23). Debido a que los tiempos de retención son muy similares y además uno de ellos coincide con el del precursor tricarbonilo se hace imposible saber, en estas condiciones, si la sustitución fue realizada con éxito. Se decidió utilizar el sistema (II) de HPLC antes descrito con el propósito de ver si este nuevo sistema logra separar más eficientemente las dos especies presentes. (Figura 24). Sin embargo en este nuevo sistema se observa un pico único a 2,9min (98%), que coincide nuevamente con el tiempo de retención del precursor tricarbonilo, lo cual no permite resolver las especies existentes.

Con el fin de descartar si la anidulafungina estaba quedando retenida en la columna y a su vez poder tener una idea aproximada del tiempo de retención que debería tener el complejo $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-anidulafungina}]$, se realizó HPLC-UV a 250nm de anidulafungina (5mg). Las condiciones de corrida fueron las del sistema (I), la preparación de muestra se realizó en las mismas proporciones de EtOH:H₂O que para la sustitución del precursor y se analiza un blanco de muestra (EtOH:H₂O). El tiempo de retención obtenido para anidulafungina fue de 23,2min. (Figura 25). Este estudio revela no solo que la misma no queda retenida en la columna, sí no que además no está logrando incorporarse al precursor tricarbonílico ya que la diferencia en los tiempos de retención entre el HPLC-UV y el HPLC-gamma son significativas.

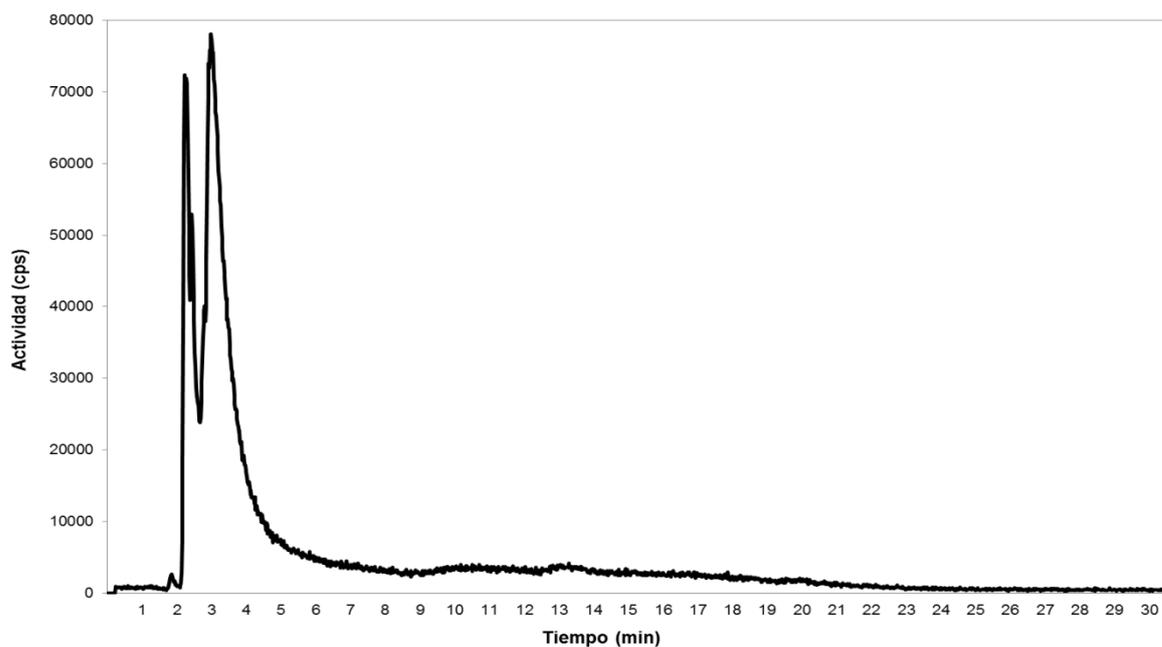


Figura 23. Perfil cromatográfico (HPLC) para el complejo $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-anidulafungina}]$ en el sistema (I)

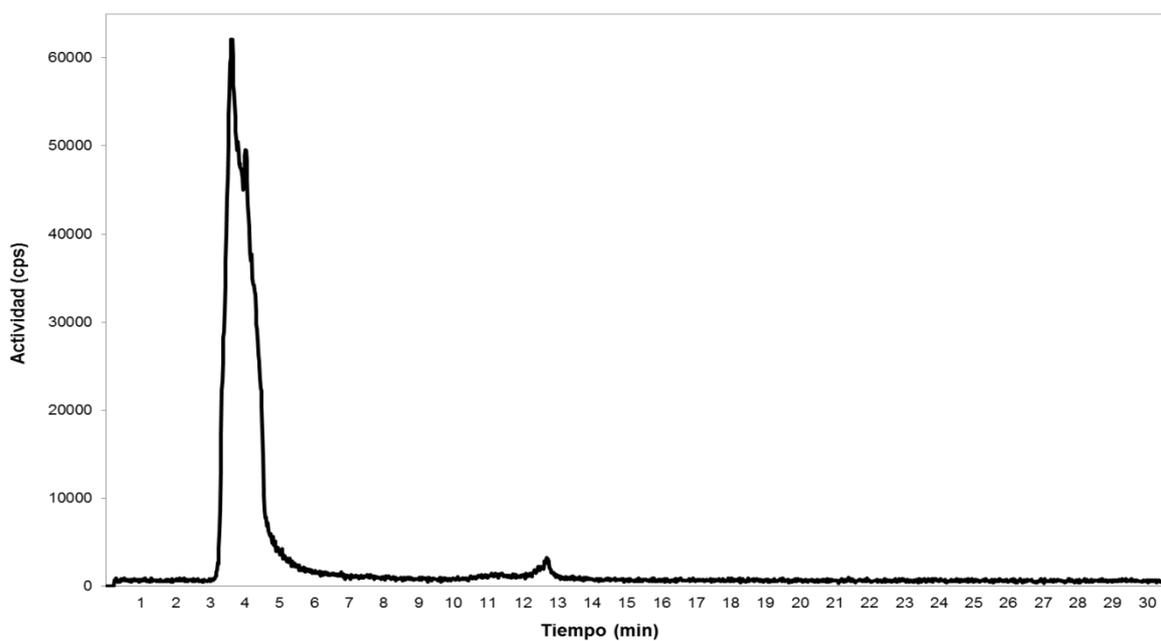


Figura 24. Perfil cromatográfico (HPLC) para el complejo $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-anidulafungina}]$ en el sistema (II)

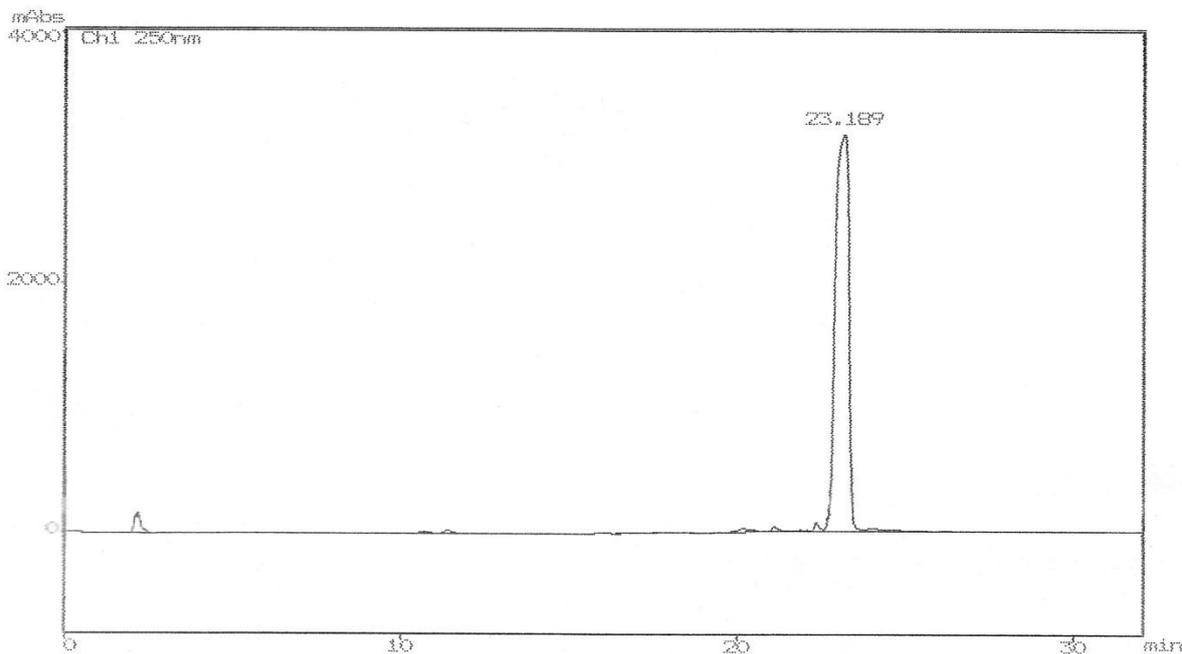


Figura 25. Perfil cromatográfico (HPLC-UV) para anidulafungina en el sistema (I)

5.2.7. Marcación de anidulafungina con pirofosfato de sodio como ligando intermediario.

Se preparó el precursor por agregado de pertecneciato a un kit de pirofosfato”. Se realizó el control de la pureza radioquímica del kit de pirofosfato por cromatografía en capa fina obteniéndose una pureza de 95-98% en todos los casos. Así mismo se verificaron sus tiempos de retención en el sistema de HPLC (III) para poder analizar el/los picos correspondientes al marcado del kit, obteniéndose en el cromatograma dos picos bien definidos a 2.3min (46%) y 10.9min (53%). (Figura 26). Una vez obtenidos estos resultados se procedió a la sustitución por reacción del precursor con la anidulafungina, se observó un cromatograma con tres picos, 2.3min (42%), 4.0min (57%) y 11.1min (1%). (Figura 27), la pureza radioquímica para anidulafungina fue de 50-60% no cumpliendo con los porcentajes requeridos para continuar con las pruebas fisicoquímicas y biológicas.

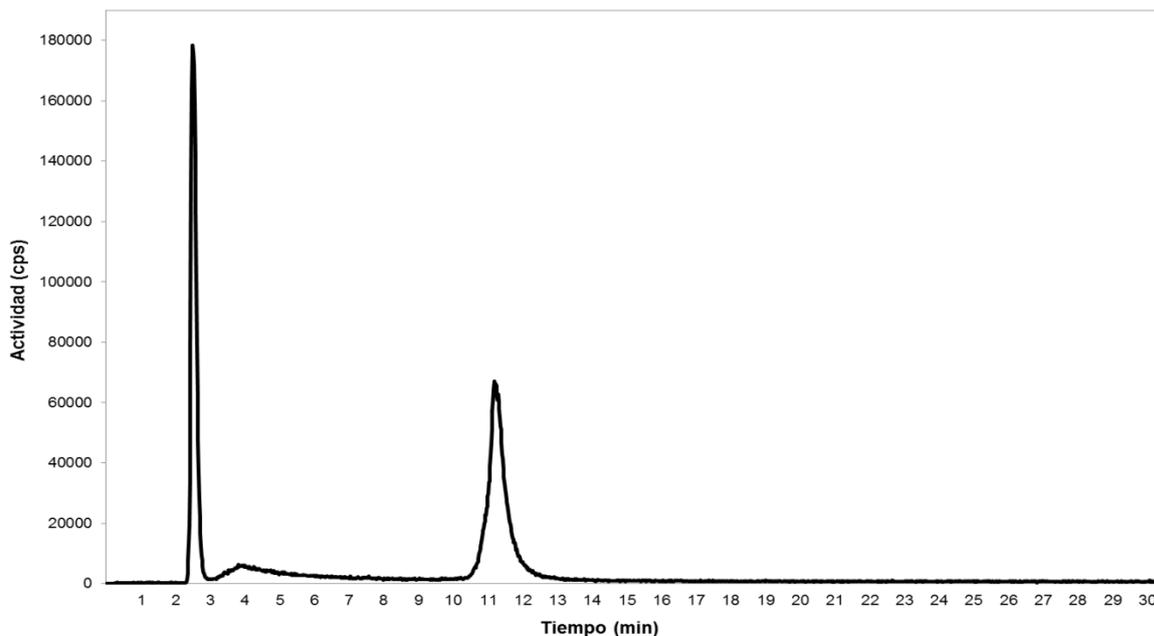


Figura 26.Perfil cromatográfico (HPLC) para el kit de ^{99m}Tc -pirofosfato en el sistema (III)

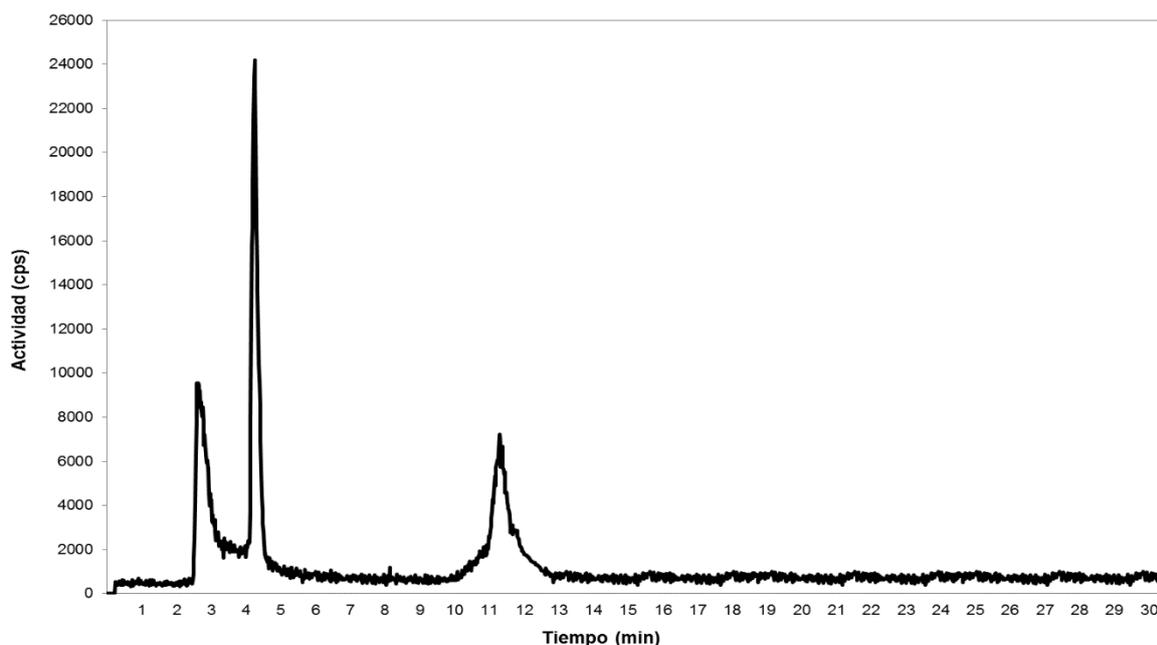


Figura 27.Perfil cromatográfico (HPLC) para el marcado ^{99m}Tc -anidulafungina-pirofosfato en el sistema (III)

5.2.8. Marcación de anidulafungina con glucoheptonato como ligando intermediario.

Se preparó el precursor por agregado de pertecneciato a un kit de glucoheptonato. Se realizó el control de la pureza radioquímica del kit de glucoheptonato por cromatografía en capa fina obteniéndose una pureza de 95-98% en todos los casos. Así mismo se verificó el tiempo de retención en el sistema de HPLC (III) para tener referencia del marcado del kit y de la anidulafungina marcada. En el marcado de

glucoheptonato se obtiene un cromatograma con un pico único a los 11.1min (100%). (Figura 28). Una vez obtenidos estos resultados se procedió a la marcación de anidulafungina con glucoheptonato como ligando intermediario, se observó un cromatograma con tres picos 2.5min (47%), 3.1min (19%)y 10.5min (34%). (Figura 29). Se obtuvo en todos los casos una pureza radioquímica para anidulafungina de 65-70% (sumando los picos de 2,5min y 3,1min) no cumpliendo con los porcentajes requeridos para continuar con las pruebas fisicoquímicas y biológicas.

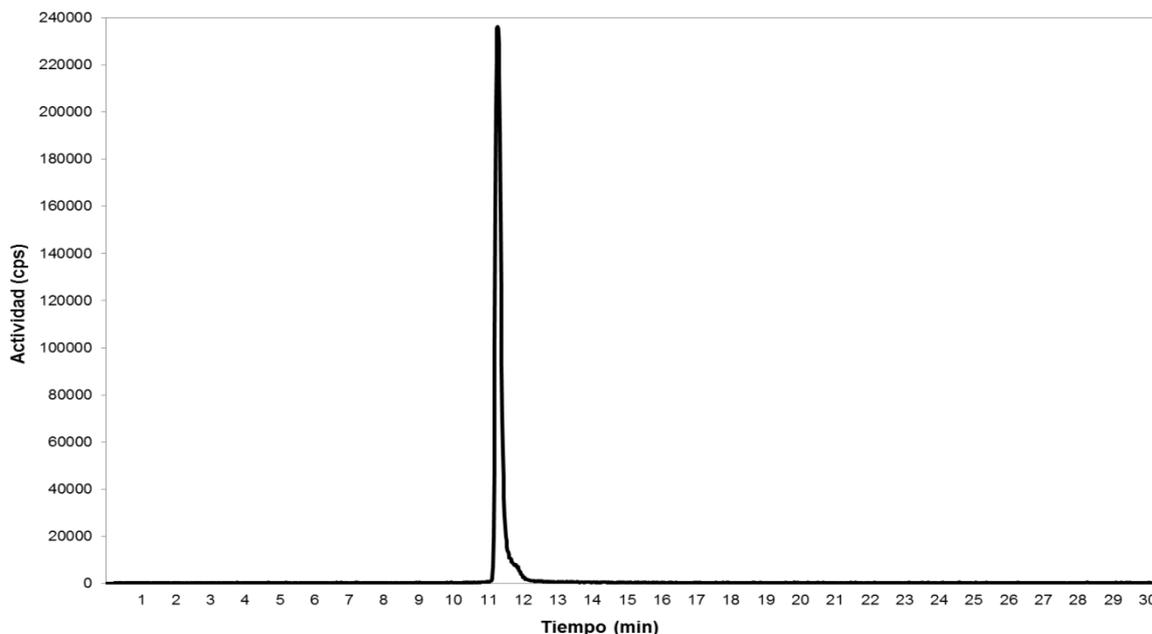


Figura 28.Perfil cromatográfico (HPLC) para el kit de ^{99m}Tc -glucoheptonato en el sistema (III)

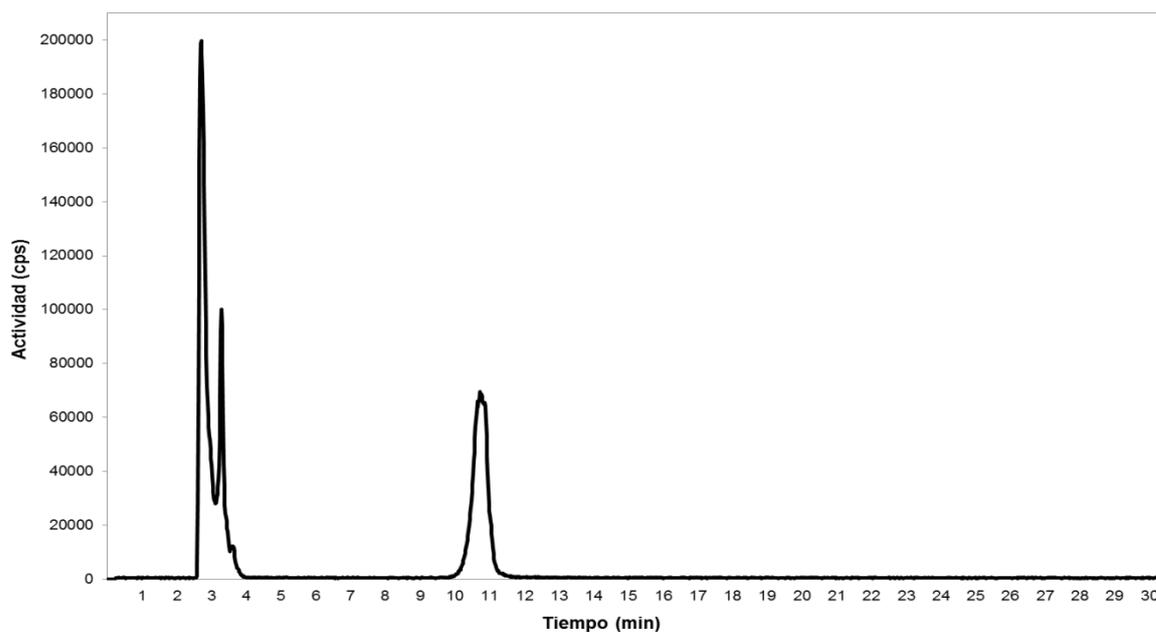


Figura 29.Perfil cromatográfico (HPLC) para el marcado ^{99m}Tc -anidulafungina-glucoheptonato en el sistema (III)

5.2.9. Marcación directa de anidulafungina

Se realizaron marcaciones con diferentes cantidades, de SnCl₂ como reductor 10-20µg con el fin de optimizar el rendimiento del marcado. Las cantidades de anidulafungina, 5mg y las actividades 5.5-6.5mCi, se mantuvieron constantes. Los resultados obtenidos en lo referente a la pureza radioquímica del marcado se muestran a continuación. (Tabla 4).

Tabla 4. Pureza radioquímica en la marcación directa de anidulafungina.

10µg SnCl₂	
[^{99m} Tc]TcO ₂	9.6%
[^{99m} Tc]TcO ₄ ⁻	2.8%
[^{99m} Tc]Tc-anidulafungina	87.6%
20µg SnCl₂	
[^{99m} Tc]TcO ₂	14.9%
[^{99m} Tc]TcO ₄ ⁻	11.5%
[^{99m} Tc]Tc-anidulafungina	73.6%

La marcación directa de anidulafungina presentó los mejores rendimientos de pureza radioquímica de las técnicas utilizadas, sin embargo no se llega a los mínimos requeridos de más del 90% por lo que se decide discontinuar el estudio de anidulafungina y no seguir adelante en las pruebas fisicoquímicas y biológicas.

5.3. Caracterización fisicoquímica e los complejos

5.3.1. Determinación de la estabilidad en el medio de reacción

La estabilidad de los complejos en el medio de reacción fue evaluada hasta 4 horas post-marcación, para los complejos de fluconazol y voriconazol y hasta 20 horas para el complejo de caspofungina, resultando ser mayor a 90% en todos los casos. Los cromatogramas no muestran formación de ninguna impureza debida a degradación o reaparición del pico precursor que significase reversión de la reacción.

5.3.2. Determinación de la lipofilicidad

La lipofilicidad (logP) es un parámetro muy importante 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; permite predecir experimentalmente el comportamiento de determinada sustancia en el organismo. Estos complejos de coordinación no poseen un transportador que les posibilite atravesar la membrana celular, por lo que su llegada al citoplasma es mediante la difusión pasiva a través de la membrana. En particular los complejos estudiados requieren la llegada al sitio de acción y su inserción en la membrana del hongo de forma de reconocerlo y ubicar el sitio preciso de infección. Para ello, el complejo debe tener una lipofilicidad adecuada de modo de favorecer ese pasaje, el cual está determinado por la ley de Fick:

$$dQ/dt = -D.A.K/h (C_i - C_e)$$

en donde la cantidad del complejo que atraviesa la membrana depende de factores como el coeficiente de partición octanol/buffer (K), la difusión (D), el área (A), el espesor de la membrana (h) y las concentraciones hacia ambos lados de la misma (C_i: interior, C_e: exterior). No es aconsejable que la lipofilicidad de un complejo 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 logP entre -0.5 y 2 a pH = 7.4 se consideran óptimos para un buen pasaje a través de una membrana biológica [10]

En todos los casos los complejos estudiados presentan una lipofilicidad adecuada para su interacción con la membrana celular del hongo sin embargo los complejos de tipo [^{99m}Tc][(CO)₃-voriconazol/fluconazol] presentan una leve afinidad por la fase acuosa. Sin embargo los complejos de tricarbonilo con acetilacetona o 2+1 [^{99m}Tc][(CO)₃-AcAc-voriconazol/fluconazol] así como [^{99m}Tc][(CO)₃-caspofungina] presentan una lipofilicidad más elevada siendo adecuada para insertarse en la membrana del hongo. (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de lipofilicidad para los distintos complejos en estudio.

log P	
[^{99m} Tc][(CO) ₃ -voriconazol]	(-0.03±0.01)
[^{99m} Tc][(CO) ₃ -fluconazol]	(-0.31±0.03)
[^{99m} Tc][(CO) ₃ -AcAc-voriconazol]	(0.49±0.01)
[^{99m} Tc][(CO) ₃ -AcAc-fluconazol]	(0.45±0.01)
[^{99m} Tc][(CO) ₃ -caspofungina]	(0.64±0.05)

5.3.3. Determinación del porcentaje de unión a proteínas plasmáticas

En general son deseables valores de unión a proteínas bajos, ya que es la fracción libre del radiofármaco la que se encuentra disponible para permear los capilares y así llegar al sitio de infección a fin de reconocerlo. Además un complejo fuertemente unido a proteínas presentará una depuración muy lenta. Los valores de unión a proteínas reportados en la literatura para voriconazol y fluconazol son de 58% y 11% respectivamente. Para los complejos de voriconazol y fluconazol estudiados se establece que la unión a proteínas llega al 66-78% en las sustituciones directas y al 42-55% en el caso de los complejos de tipo 2+1.

Para el complejo con caspofungina los resultados obtenidos muestran una tendencia a la disminución de la fracción unida a proteínas en el transcurso del tiempo. Esto podría atribuirse a una interacción no específica, lábil y/o reversible que implicase que con el paso del tiempo el radiofármaco pasara a plasma con la consecuente disminución del porcentaje de unión; otra posible causa podría ser la descomposición del radiofármaco, por acción enzimática, lo que llevaría también a la misma disminución del porcentaje de unión. (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de unión a proteínas plasmáticas para los complejos en estudio.

%UPP (Unión a Proteínas Plasmáticas)			
Tiempo	30min	60min	90min
$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-voriconazol}]$	49	65	66
$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-fluconazol}]$	70	74	78
$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-voriconazol}]$	32	33	42
$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-fluconazol}]$	39	44	55
$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-caspofungina}]$	75	71	65

Es importante considerar que la UPP puede originarse por dos fenómenos. Uno de ellos sucede cuando el complejo simplemente presenta una elevada afinidad por las proteínas plasmáticas, así como lo presentan el resto de los fármacos.

El otro fenómeno implica que esta UPP esté dada por una baja estabilidad del complejo, lo cual lleva a una transquelación del metal. Esto significa que el ligando es desplazado por grupos donores de electrones de las proteínas. Como consecuencia, el radionucleido queda unido a ellas y el complejo se descompone.

Si bien existen varios ejemplos en la bibliografía en los que se destacan complejos estables de $^{99m}\text{Tc(I)-tricarbonílicos}$ con ligandos bidentados, también está citado que en algunos casos pueden ser inestables debido a la permanencia de una molécula de agua en la esfera de coordinación. [7] Dado que ésta continúa siendo un ligando lábil para el metal, la elevada UPP podría deberse a su desplazamiento por grupos donores presentes en las proteínas, como por ejemplo, histidina (excelente ligando para complejos tricarbónicos) y cisteína. Esta es la principal desventaja que presenta el uso de ligandos bidentados en algunos casos y es lo que explicaría los resultados obtenidos de UPP.

5.3.4. Determinación de la estabilidad frente a plasma

Los estudios en plasma son predictivos de la estabilidad del complejo en un medio altamente competitivo como el biológico. El método implica la incubación de la muestra con un pool de plasma humano a 37°C y el control de la pureza radioquímica a diferentes tiempos utilizando el sistema de HPLC asociado a cada complejo. Para esto, es necesario precipitar las proteínas plasmáticas y por lo tanto, solamente se determina la estabilidad de la fracción libre del complejo.

Los ensayos realizados evalúan la estabilidad de los complejos de tipo 2+1 hasta 3.5 horas frente a este medio. Para ambos complejos los respectivos cromatogramas muestran formación de nuevas especies, así como formación del precursor tricarbonilo, manteniéndose una estabilidad del 61-64%. Los restantes complejos son evaluados a 4hs, siendo el menos estable $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-fluconazol}]$ manteniéndose estable solo un 49%. Respecto a los complejos $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-voriconazol}]$ y $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-caspofungina}]$ ambos cromatogramas no muestran formación de nuevas especies, obteniéndose siempre un pico una pureza radioquímica superior al 90%, siendo estables frente a los agentes competitivos del plasma en los tiempos estudiados. (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de estabilidad en plasma a 3,5hs para los complejos de tipo 2+1 y a 4hs para los restantes.

Estabilidad en plasma	
$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-voriconazol}]$	95%
$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-fluconazol}]$	49%
$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-voriconazol}]$	61%
$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-fluconazol}]$	64%
$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-caspofungina}]$	98%

5.3.5. Determinación de la estabilidad frente a histidina y cisteína

La estabilidad frente a histidina y cisteína, es un estudio en condiciones forzadas complementario a la estabilidad en plasma y unión a proteínas plasmáticas donde se enfrenta al radiofármaco a una concentración tanto de histidina como de cisteína, muy superiores a las que comúnmente se encuentran en el plasma. La elección de los aminoácidos se fundamenta en que éstos presentan grupos de átomos en una configuración tal que los hacen excelentes coordinantes de tecnecio motivo por el que podrían competir con nuestro ligando. Los complejos de tipo $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-fluconazol/voriconazol}]$ son menos estables, y se descomponen a un 10-50% respectivamente en un lapso de 2,5-4hs; sin embargo los complejos $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-voriconazol/fluconazol}]$ son mucho más estables, descomponiéndose a un 69-90% en el mismo período.

El complejo $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-caspofungina}]$ presenta una estabilidad entre el 89-93% durante el tiempo de incubación evaluado, 7,5hs. (Tabla 8).

Tabla 8. Estabilidad frente a cisteína e histidina para todos los complejos en estudio.

Estabilidad frente	CISTEINA		HISTIDINA	
$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-voriconazol}]$	55%	2,5hs	49%	4hs
$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-fluconazol}]$	26%	3,5hs	10%	2,5hs
$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-voriconazol}]$	74%	2,5hs	69%	2,5hs
$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-fluconazol}]$	90%	2hs	88%	4hs
$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-caspofungina}]$	93%	7,5hs	89%	7,5hs

5.3.6. Determinación de la unión a levaduras

La unión a levaduras es un estudio biológico *in vitro* que permite evaluar la capacidad del radiofármaco de permanecer unido a la pared del hongo o de ser internalizado por el mismo. Este ensayo es un estudio predictivo que permite evaluar el porcentaje del radiofármaco que podrá marcar específicamente el sitio blanco. El ensayo se realizó utilizando *Candida albicans*, ya que esta levadura conduce a las micosis invasivas más comunes en pacientes que subyacen a enfermedades graves. Los estudios realizados muestran niveles en el entorno del 12-14% para los complejos de tipo $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-voriconazol/fluconazol}]$ y del 3-7% para los $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-fluconazol/voriconazol}]$, mientras que para el complejo $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-caspofungina}]$ se llega a valores en el entorno del 10%. En todos los casos se observa un claro incremento en la actividad retenida en el sedimento con el aumento de la concentración, lo que es indicativo de una interacción entre el complejo y la levadura. (Figuras 30, 31 y 32).

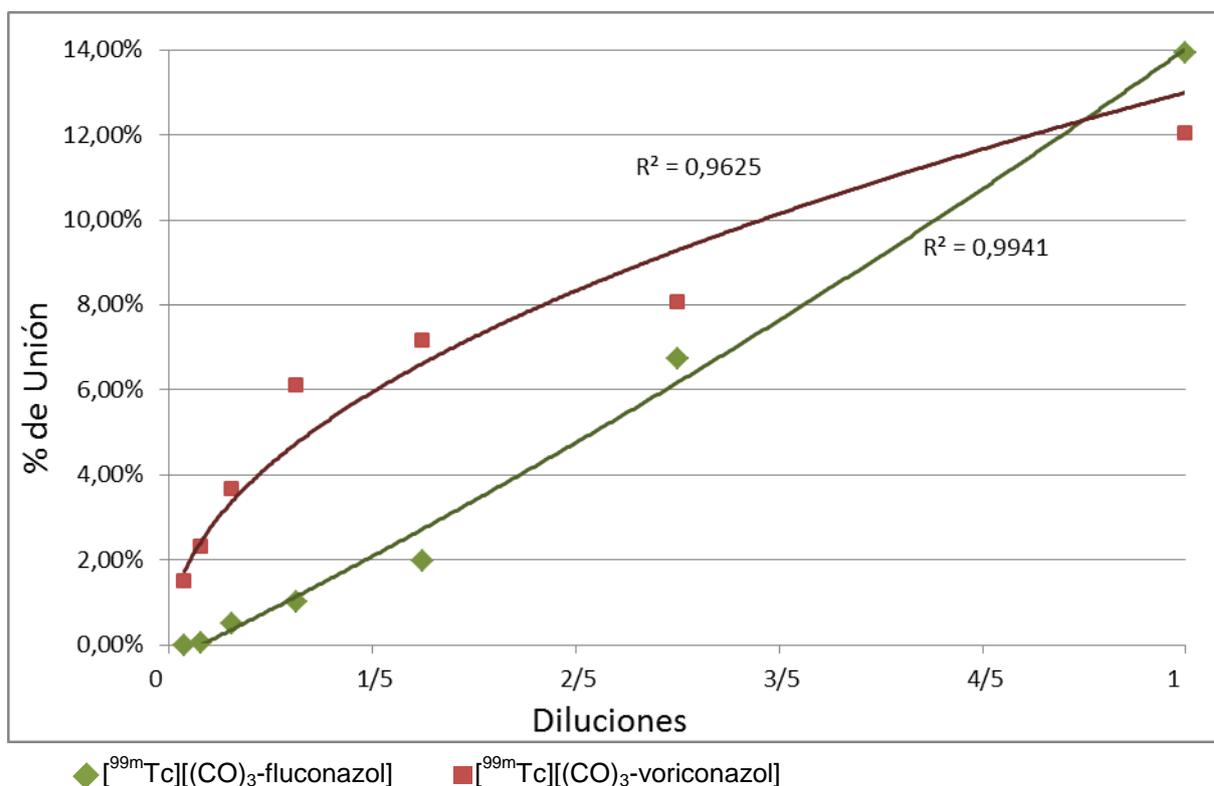
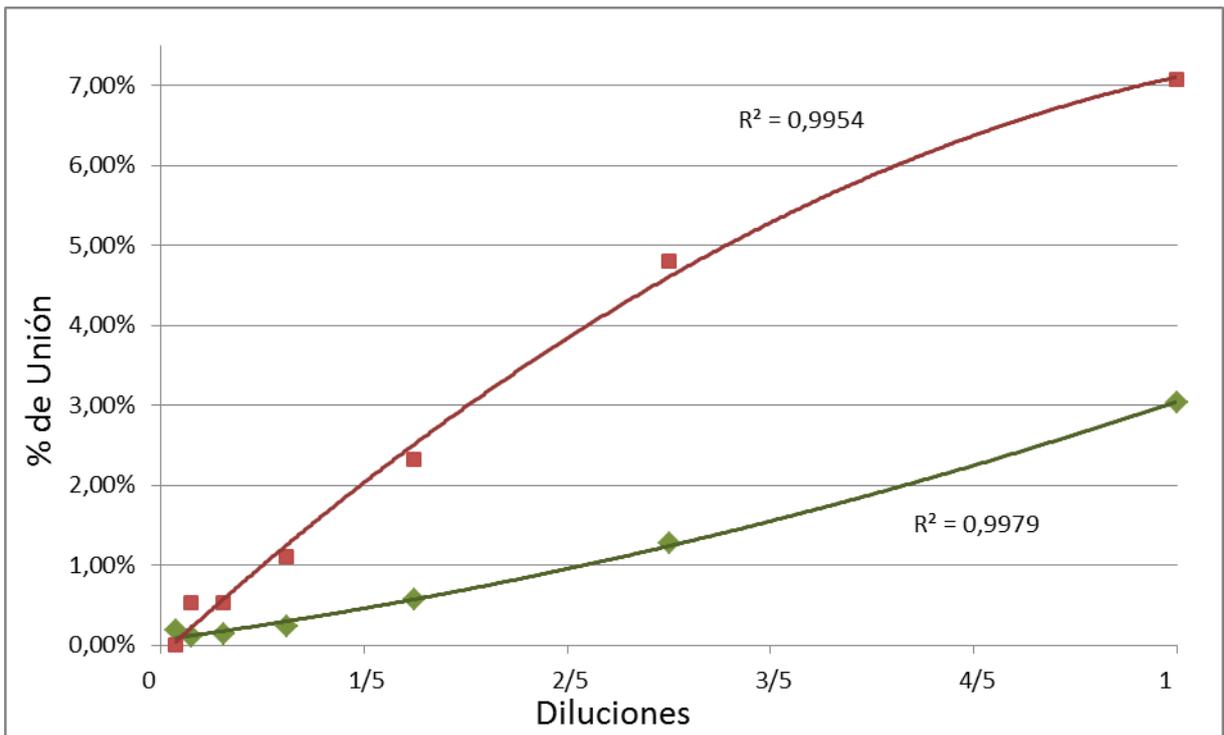
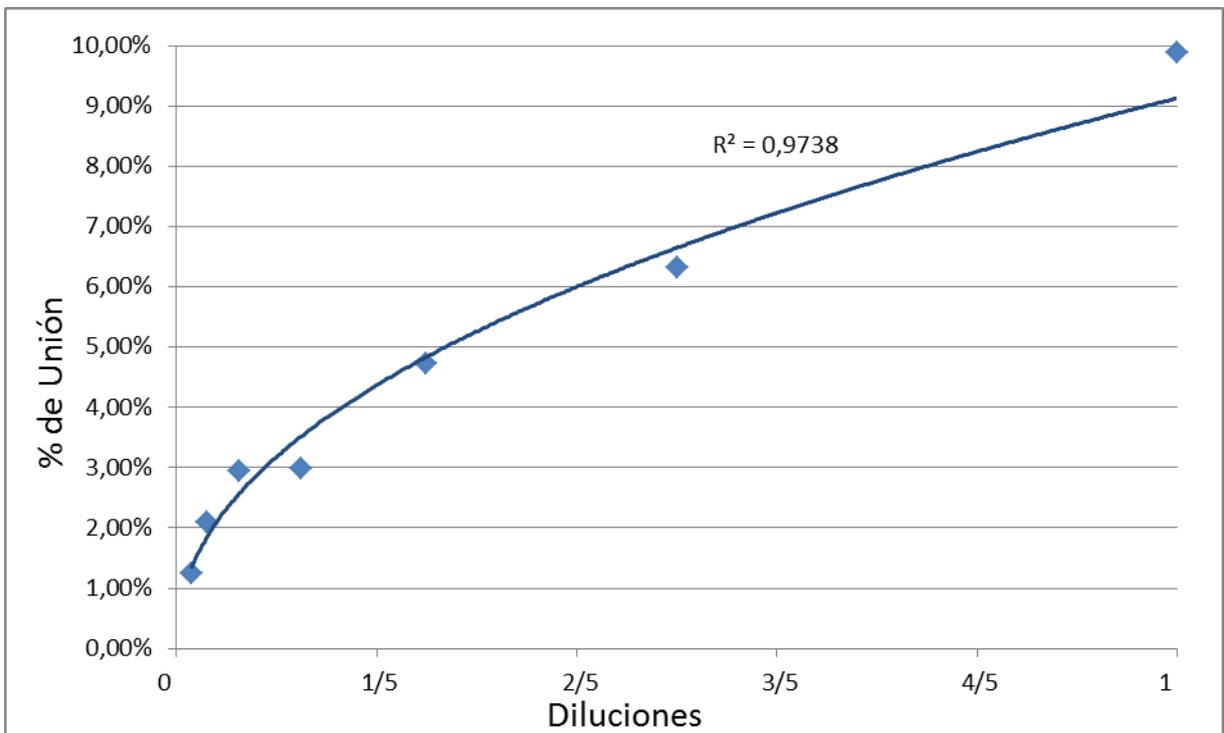


Figura 30. Porcentaje de unión a levaduras para los complejos $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-fluconazol/voriconazol}]$



◆ [99mTc]((CO)₃-AcAc-fluconazol) ■ [99mTc]((CO)₃-AcAc-voriconazol]

Figura 31. Porcentaje de unión a levaduras para los complejos [99mTc]((CO)₃-AcAc-fluconazol/voriconazol]



◆ [99mTc]((CO)₃-caspofungina]

Figura 32. Porcentaje de unión a levaduras para el complejo [99mTc]((CO)₃-caspofungina]

5.4. Caracterización biológica de los complejos

Las biodistribuciones en todos los casos fueron realizadas en ratones CD1 sanos e inoculados, vía intramuscular con aceite de trementina o una suspensión de *C.albicans/A.niger* según el caso y siguiendo la técnica descrita en el punto 4.4.2 de ésta tesis. Los tiempos de biodistribución post-inyección, vía intravascular fueron 1 y 3 horas para los complejos de fluconazol y voriconazol y 3 y 12 horas para el complejo de caspofungina. A continuación se presentan los resultados obtenidos para todos los complejos. En cada uno de ellos, se informa el porcentaje de dosis captada en cada órgano, así como el porcentaje de dosis por gramo respecto a la dosis inyectada. Asimismo se muestran las relaciones inflamación/músculo o infección/músculo así como inflamación/sangre o infección/sangre ($\bar{x} \pm \sigma_{n-1}$, n=4).

5.4.1. Biodistribución en modelo animal control (G1)

Inicialmente se realiza una evaluación de los complejos en ratones normales para definir las vías de eliminación principales, la eventual captación por algún órgano y también signos de descomposición. Este estudio asegura la estabilidad de los complejos frente a una posible reoxidación por comparación con el perfil de distribución para el pertecneciato, el cual por datos bibliográficos sabemos que presenta alta captación en tiroides y estómago.

NOTA: En el anexo 1 se encuentran en forma complementaria las tablas (1-3) con los valores de porcentaje de dosis captada en cada órgano.

5.4.1.1. Complejos de fluconazol/voriconazol

En todos los casos los complejos presentan baja captación en tiroides y estómago, confirmándose que no existe una re oxidación a Tc(VII), manteniéndose estables en el medio biológico durante todo el periodo de estudio. De las figuras 33 y 34 se desprende que tanto los complejos de [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -fluconazol/voriconazol] como los de tipo 2+1, [$^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc}$ -fluconazol/voriconazol], presentan una eliminación de manera combinada por vía hepatobiliar (15-20% a las 3 horas) y urinaria (6-21% a las 3 horas), así como una elevada captación hepática (29-53% a las 3 horas) lo cual concuerda con un comportamiento característico de complejos con alto porcentaje de unión a proteínas plasmáticas (42-78%). Si observamos comparativamente, los complejos [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -fluconazol/voriconazol] presentan mayor captación sanguínea (11,3-17,7% a las 3 horas) y eliminación por vía urinaria, más rápida (14-21% a las 3 horas), que los complejos

$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-fluconazol/voriconazol}]$ (2,1-2,4% de captación sanguínea y 6-13% de eliminación urinaria a las 3 horas respectivamente). Estos hechos concuerdan con una menor lipofilicidad. La captación en el resto de los órganos es baja (menos del 5%), salvo en músculo en el cual la captación es moderada (8-11% a las 3 horas) y de lenta depuración.

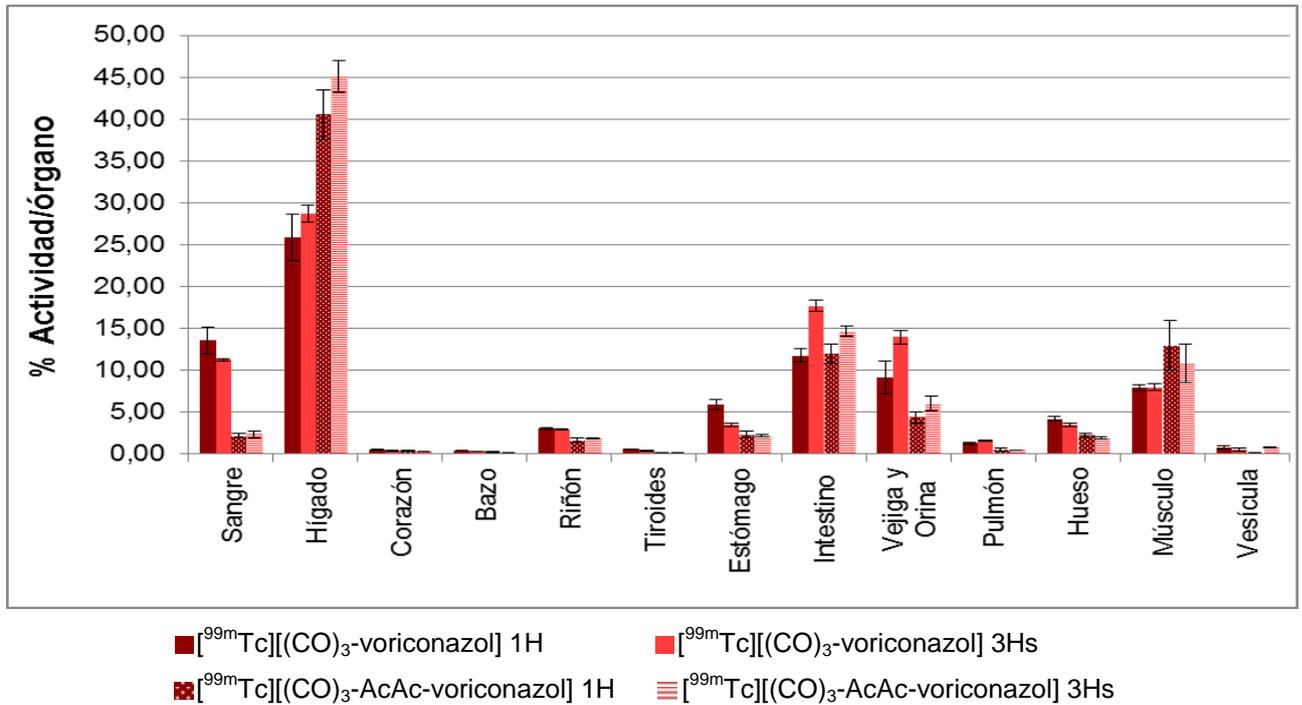


Figura 33. Biodistribución en ratones normales para los complejos de voriconazol.

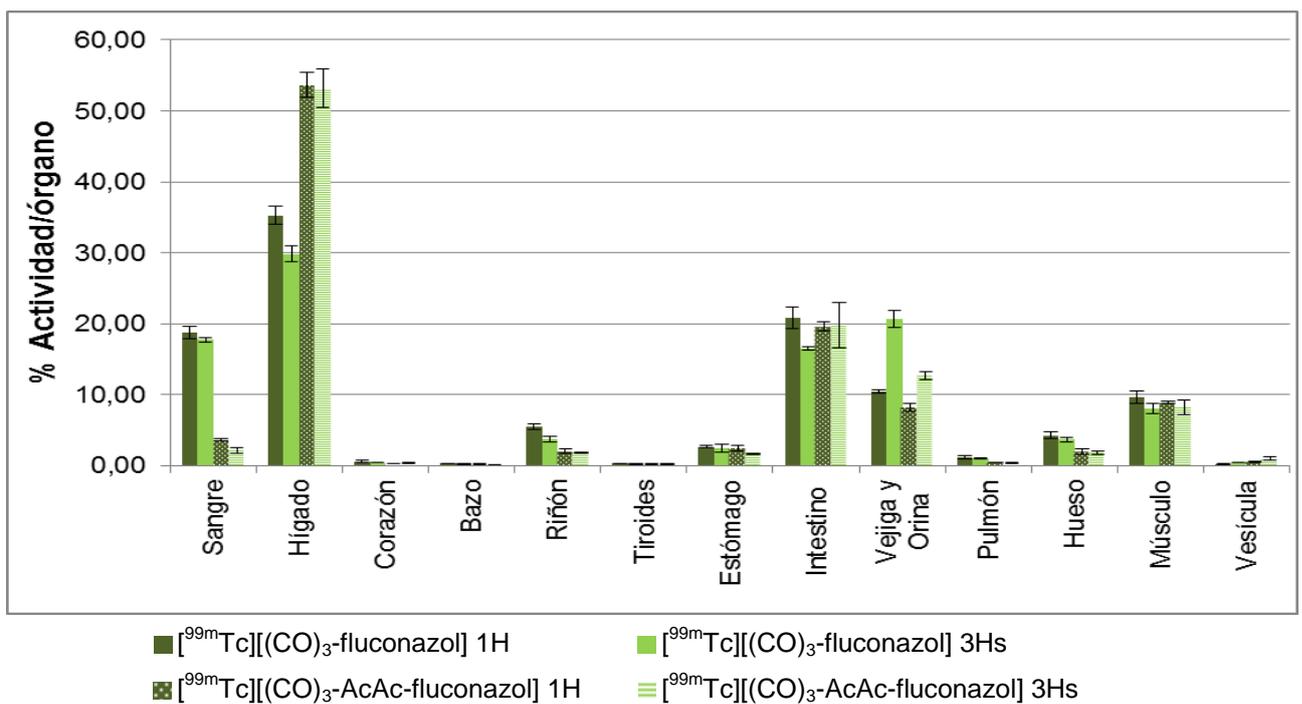


Figura 34. Biodistribución en ratones normales para los complejos de fluconazol.

5.4.1.2. Complejo de caspofungina

De la figura 35 se desprende que el complejo [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-caspofungina}$] presenta una eliminación combinada por vía hepatobiliar ($11\pm 2\%$) y urinaria ($24\pm 2\%$) a las 12 horas, así como una elevada captación hepática ($30\pm 1\%$) lo cual concuerda con un comportamiento característico de complejos con alto porcentaje de unión a proteínas plasmáticas (65%).

El complejo presenta baja captación en tiroides y estómago, confirmándose que no existe una re oxidación a Tc(VII) . En músculo la captación es elevada ($19\pm 1\%$ a las 3 horas), lo mismo sucede en sangre ($13\pm 1\%$ a las 3 horas) sin embargo en ambos casos la depuración es elevada ($10,0\pm 0,3\%$ en músculo y $8\pm 1\%$ en sangre) a las 12 horas. Por vía urinaria se observa un notorio aumento en la eliminación en función del tiempo ($1,7\pm 0,1\%$ a las 3 horas y $24\pm 2\%$ a las 12 horas), hecho que apuntan a una metabolización hepática del complejo volviéndolo más hidrofílico.

La captación en el resto de los órganos es baja (menos del 5%).

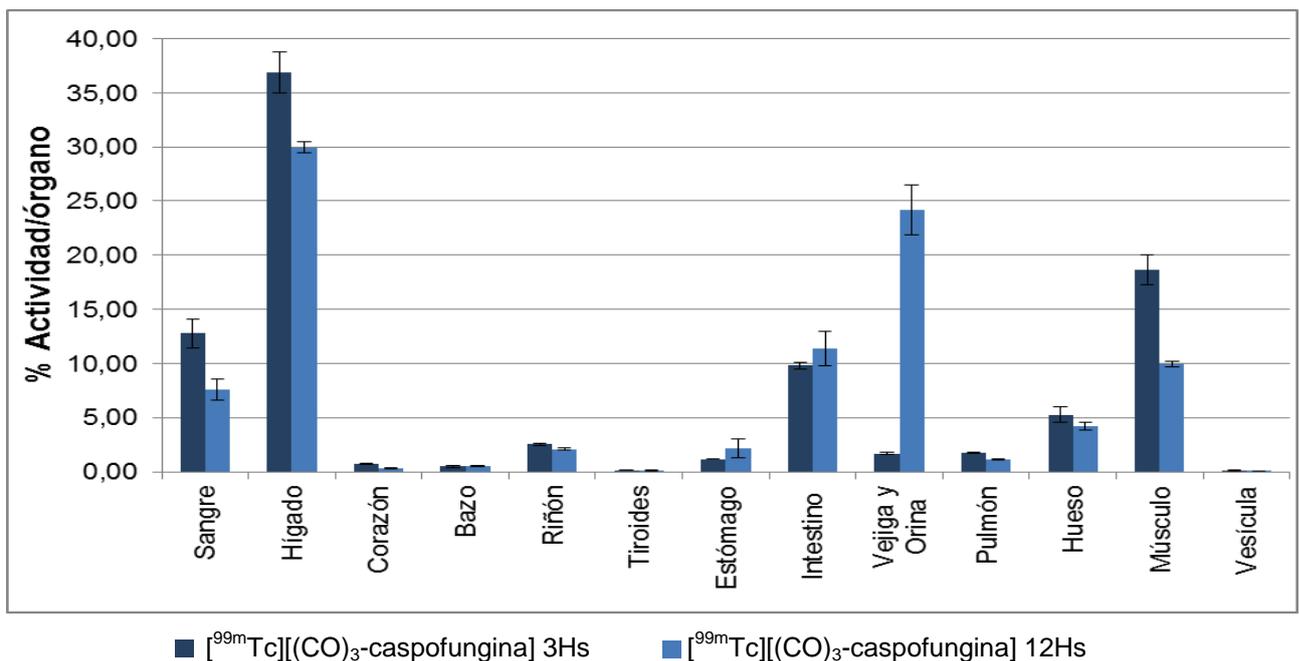


Figura 35. Biodistribución en ratones normales para el complejo de caspofungina.

5.4.2. Biodistribución en modelo animal de inflamación (G2)

Se realiza una evaluación de los complejos en ratones con inflamación estéril para determinar cuál de los complejos es capaz de diferenciar las infecciones fúngicas de la inflamación por causas inespecíficas.

NOTA: En el anexo 1 y 2 se encuentran en forma complementaria los gráficos (1-3) de porcentaje de dosis por gramo y las tablas (4-6) con los valores de porcentaje de dosis captada en cada órgano.

5.4.2.1. Complejos de fluconazol/voriconazol

De las figuras 36 y 37 se desprende que, durante todo el periodo de estudio, los complejos de $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-fluconazol/voriconazol}]$ así como los de tipo 2+1, $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-fluconazol/voriconazol}]$, mantienen las mismas rutas metabólicas principales así como las vías de eliminación preferenciales estudiadas en la distribución biológica de ratones normales. Este hecho es de esperarse, en todos los casos, ya que en principio no debería la inflamación localizada variar las rutas de distribución y eliminación biológicas.

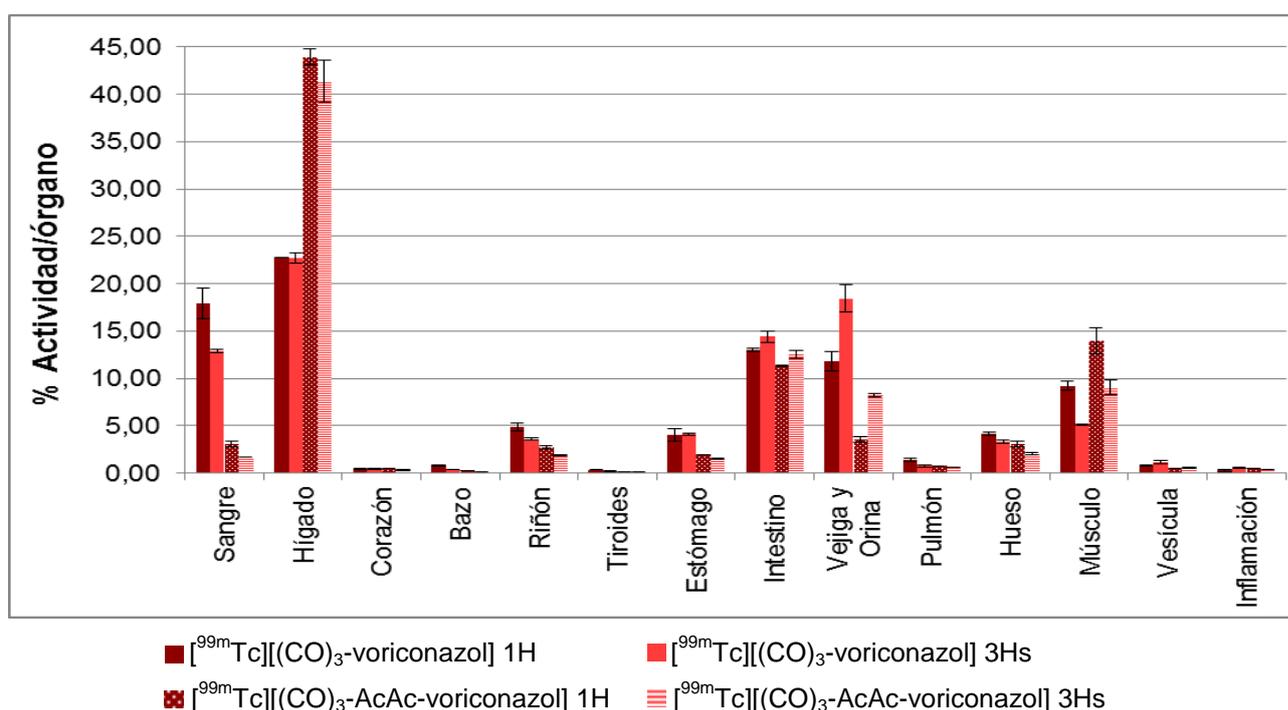


Figura 36. Biodistribución en ratones con inflamación para los complejos de voriconazol.

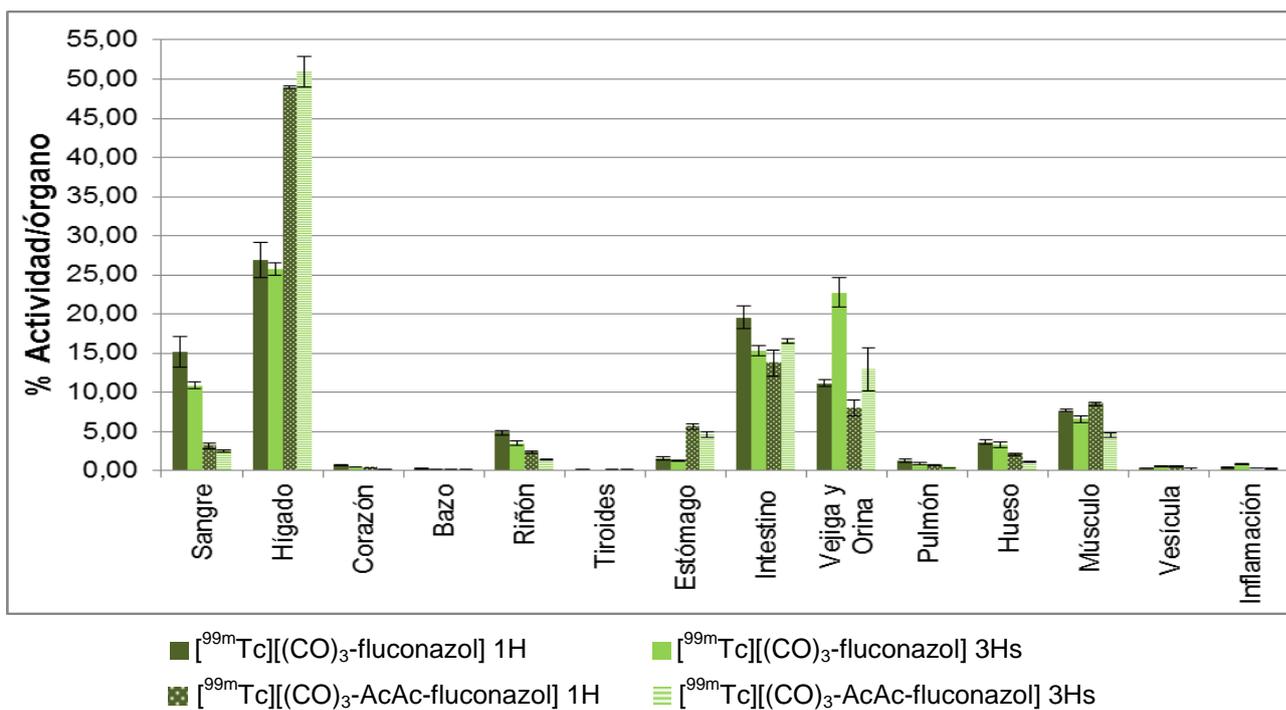


Figura 37. Biodistribución en ratones con inflamación para los complejos de fluconazol.

De la tabla 9 se desprende que tanto en los complejos [^{99m}Tc(CO)₃-fluconazol/voriconazol] como los de tipo 2+1, [^{99m}Tc]((CO)₃-AcAc-fluconazol/voriconazol], la captación en el modelo de inflamación (G2) fue baja para todos los tiempos, siendo mínima a las 3 horas post-inyección. Los complejos de tipo [^{99m}Tc(CO)₃-fluconazol/voriconazol] presentaron una captación de (1,2±0,1 y 0,9±0,1) %Actividad/gramo respectivamente en el modelo antes mencionado. Un proceso muy similar se observó para los complejos de tipo [^{99m}Tc]((CO)₃-AcAc-fluconazol/voriconazol] siendo (0,6±0,1 y 1,0±0,1) %Actividad/gramo respectivamente. La captación en músculo sano resultó ser baja en todos los casos (0,8-1,5) %Actividad/gramo a 1 hora y (0,5-0,8) %Actividad/gramo a 3 horas para ambos grupos de complejos. Las relaciones inflamación/músculo son favorables para todos los tiempos estudiados, siendo a las 3 horas de (1,7-1,4) para los complejos [^{99m}Tc(CO)₃-fluconazol/voriconazol] y de (1,3-1,2) para los complejos de tipo 2+1, [^{99m}Tc]((CO)₃-AcAc-fluconazol/voriconazol] respectivamente. A su vez, la relación inflamación/sangre es muy favorable para todo el período evaluado (0,1-0,7 a 1 hora y 0,1-1,0 a 3 horas) debido a que la actividad en sangre es de baja a moderada (1,02±0,04 a 9±1) %Actividad/gramo y no hay depuración significativa durante el período en estudio. Hay que tener presente que para el modelo inflamatorio se busca que el radiotrazador no diferencie inflamación estéril de músculo sano.

Tabla 9. Porcentaje de actividad por gramo y relación entre tejido afectado y sano para los complejos de fluconazol y voriconazol en ratones con inflamación.

% Actividad/gramo				
Órgano	$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-fluconazol}]$		$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-voriconazol}]$	
	1 H	3 Hs	1 H	3 Hs
Sangre	8 ± 1	6 ± 1	9 ± 1	7 ± 1
Músculo	0,76 ± 0,04	0,70 ± 0,03	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Inflamación	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,57 ± 0,04	0,9 ± 0,1

Relación Blanco/No Blanco				
Relación	$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-fluconazol}]$		$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-voriconazol}]$	
	1 H	3 Hs	1 H	3 Hs
Inflamación/Sangre	0,2	0,2	0,1	0,1
Inflamación/Músculo	1,6	1,7	0,7	1,4

% Actividad/gramo				
Órgano	$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-fluconazol}]$		$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-voriconazol}]$	
	1 H	3 Hs	1 H	3 Hs
Sangre	1,8 ± 0,1	1,64 ± 0,01	1,8 ± 0,5	1,02 ± 0,04
Músculo	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	0,83 ± 0,01
Inflamación	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,14 ± 0,02	1,0 ± 0,1

Relación Blanco/No Blanco				
Relación	$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-fluconazol}]$		$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-voriconazol}]$	
	1 H	3 Hs	1 H	3 Hs
Inflamación/Sangre	0,5	0,4	0,7	1,0
Inflamación/Músculo	1,1	1,3	0,8	1,2

5.4.2.2. Complejo de caspofungina

De la figura 38 se desprende que el complejo $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-caspofungina}]$ presentan una eliminación combinada por vía hepatobiliar (14 ± 1) %actividad/órgano y urinaria (21 ± 2) %actividad/órgano a las 12 horas, así como una elevada captación hepática (31 ± 1) %actividad/órgano. En músculo sano la captación es elevada (14 ± 1 %actividad/órgano a las 3 horas), lo mismo sucede en sangre (17 ± 1 %actividad/órgano a las 3 horas) sin embargo en ambos casos la depuración es elevada (9 ± 1 %actividad/órgano en músculo y 8 ± 1 %actividad/órgano en sangre) a las 12 horas. Por lo antes expuesto se decidió realizar todos los estudios biológicos a las 12hs post inyección. Por vía urinaria se observa un notorio aumento en la eliminación en función del tiempo ($5,5 \pm 0,3$ %actividad/órgano a las 3 horas y 21 ± 2 %actividad/órgano a las 12 horas), hallazgo que se mantiene en el grupo control. La captación en el resto de los órganos es baja (menos del 5%).

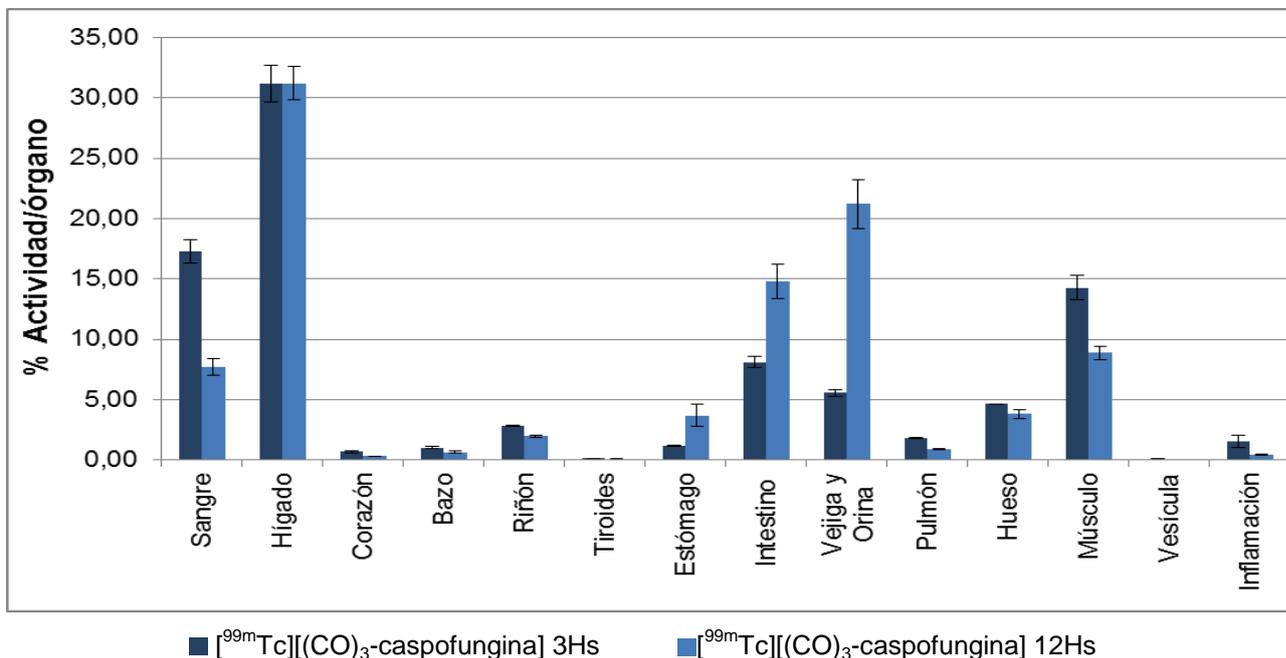


Figura 38. Biodistribución en ratones con inflamación para el complejo de caspofungina.

De la tabla 10 se desprende que para el complejo [^{99m}Tc(CO)₃-caspofungina], la captación en el modelo de inflamación (G2) fue de baja a moderada (4,7±0,2) %Actividad/gramo a las 3 horas, siendo mínima a las 12 horas post-inyección (1,6±0,1) %Actividad/gramo. La captación en músculo sano resultó ser baja en todos los casos (1,8±0,1) %Actividad/gramo a 3 horas y (1,5±0.1) %Actividad/gramo a 12. Las relaciones inflamación/músculo son de 2,6 a las 3 horas y de 1,1 a las 12 horas lo que hace más favorable este último tiempo para los ensayos biológicos. A su vez, la relación inflamación/sangre es muy favorable para todo el período evaluado 0,4 a las 3 horas y 0,3 a las 12 horas, debido a que la actividad en sangre es de levemente alta a moderada (13-6 %Actividad/gramo a 3 y 12 horas respectivamente) existiendo depuración significativa durante el período en estudio. Esta depuración es favorable al momento de continuar con los estudios *in vivo* a 12 horas.

Tabla 10. Porcentaje de actividad por gramo y relación entre tejido afectado y sano para el complejo de caspofungina en ratones con inflamación.

% Actividad/gramo		
Órgano	[^{99m}Tc][(CO)₃-caspofungina]	
	3 Hs	12 Hs
Sangre	12,6 ± 0,1	6 ± 1
Músculo	1,8 ± 0,1	1,5 ± 0,1
Inflamación	4,7 ± 0,2	1,6 ± 0,1

Relación Blanco/No Blanco		
Relación	[^{99m}Tc][(CO)₃-caspofungina]	
	3 Hs	12 Hs
Inflamación/Sangre	0,4	0,3
Inflamación/Músculo	2,6	1,1

5.4.3. Biodistribución en modelo animal de infección por *C.albicans* (G3)

Se realiza una evaluación de los complejos en ratones con infección por *C.albicans* para determinar cuál de los complejos es capaz de diferenciar la infección fúngica por este agente etiológico del músculo normal y de la inflamación por causas inespecíficas.

NOTA: En el anexo 1 y 2 se encuentran en forma complementaria los gráficos (4-6) de porcentaje de dosis por gramo y las tablas (7-9) con los valores de porcentaje de dosis captada en cada órgano.

5.4.3.1. Complejos de fluconazol/voriconazol

De las figuras 39 y 40 se desprende que, durante todo el periodo de estudio, los complejos de [^{99m}Tc(CO)₃-fluconazol/voriconazol] así como los de tipo 2+1, [^{99m}Tc][(CO)₃-AcAc-fluconazol/voriconazol], mantienen las mismas rutas metabólicas principales así como las vías de eliminación preferenciales estudiadas en la distribución biológica de ratones normales. Este hecho es de esperarse, en todos los casos, ya que en principio no debería la infección localizada variar las rutas de distribución y eliminación biológicas.

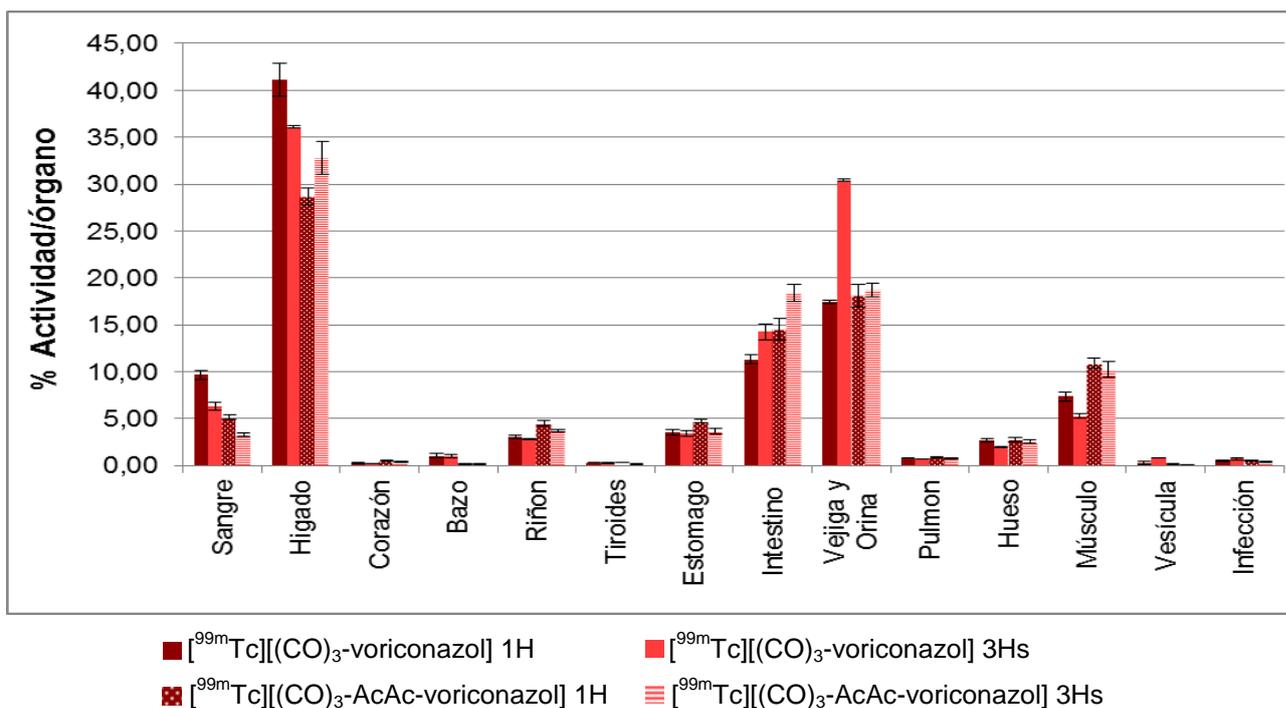


Figura 39. Biodistribución en ratones con infección por *C.albicans* para los complejos de voriconazol.

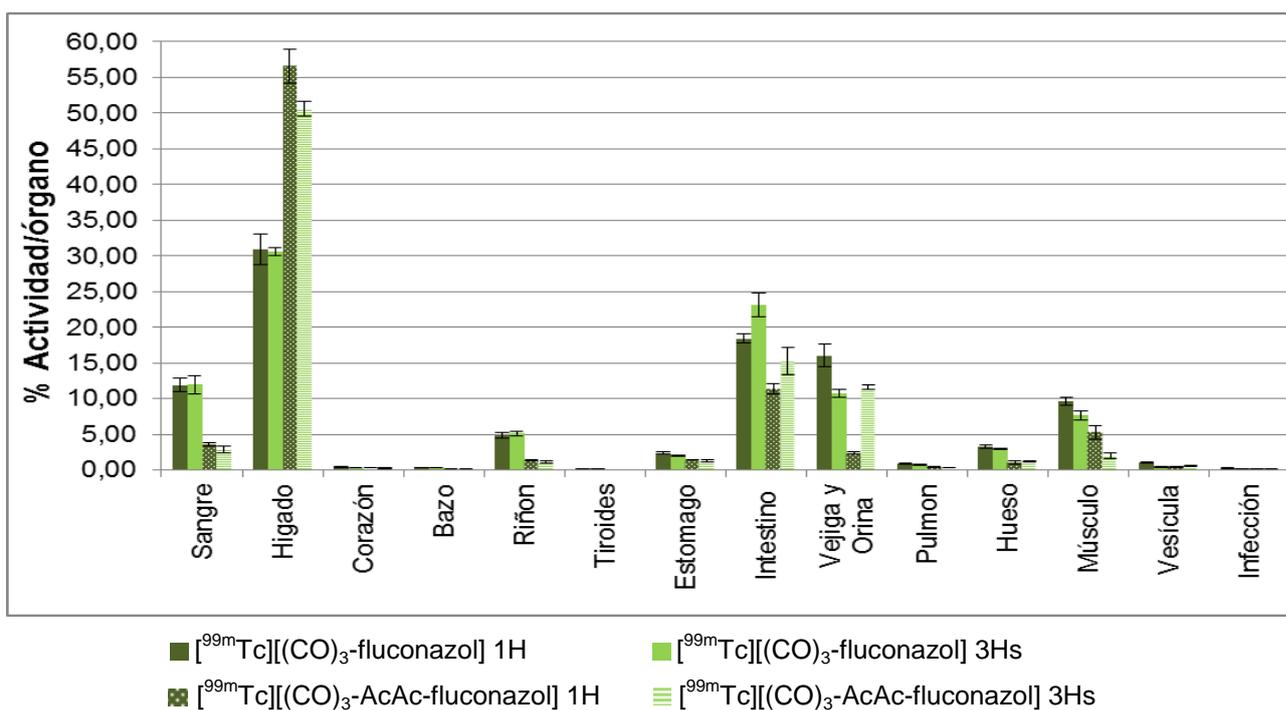


Figura 40. Biodistribución en ratones con infección por *C.albicans* para los complejos de fluconazol.

De la tabla 11 se desprende que tanto en los complejos [^{99m}Tc(CO)₃-fluconazol/voriconazol] como los de tipo 2+1, [^{99m}Tc][(CO)₃-AcAc-fluconazol/voriconazol], la captación en el modelo de infección por *C.albicans* (G3) fue baja para todos los tiempos. Los complejos de tipo [^{99m}Tc(CO)₃-fluconazol/voriconazol]

presentaron una captación de (1,6±0,2 y 1,2±0,1) %Actividad/gramo respectivamente en el modelo antes mencionado. Un proceso muy similar se observó para los complejos de tipo [^{99m}Tc][₃(CO)-AcAc-fluconazol/voriconazol] siendo (0,2±0,1 y 1,2±0,1) %Actividad/gramo respectivamente. La captación en músculo sano resultó ser baja en todos los casos (0,5-1,2) %Actividad/gramo a 1 hora y (0,2-1,1) %Actividad/gramo a 3 horas para ambos grupos de complejos. Las relaciones infección/músculo son favorables para todos los tiempos estudiados, principalmente para los complejos [^{99m}Tc(CO)₃-fluconazol/voriconazol], siendo a las 3 horas de (2,3-2,6). No ocurre lo mismo para los complejos de tipo 2+1, [^{99m}Tc][₃(CO)-AcAc-fluconazol/voriconazol] donde la relación apenas llega a ser de (1,1) para ambos complejos. Además la relación infección/sangre es muy desfavorable para todo el período evaluado (0,2-0,4 a 1 hora y 0,1-0,6 a 3 horas) debido a que la actividad en sangre es de baja a moderada (1,8±0,3 a 7,3±0,4) %Actividad/gramo y no hay depuración significativa durante el período en estudio.

Tabla 11. Porcentaje de actividad por gramo y relación entre tejido afectado y sano para los complejos de fluconazol y voriconazol en ratones con infección por *C.albicans*.

% Actividad/gramo				
Órgano	[^{99m}Tc][₃(CO)-fluconazol]		[^{99m}Tc][₃(CO)-voriconazol]	
	1 H	3 Hs	1 H	3 Hs
Sangre	7,3 ± 0,4	7 ± 1	5,0 ± 0,3	3,4 ± 0,4
Músculo	0,93 ± 0,02	0,67 ± 0,03	0,7 ± 0,1	0,46 ± 0,01
Infección <i>C.albicans</i>	1,08 ± 0,02	1,6 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1

Relación Blanco/No Blanco				
Relación	[^{99m}Tc][₃(CO)-fluconazol]		[^{99m}Tc][₃(CO)-voriconazol]	
	1 H	3 Hs	1 H	3 Hs
Infección/Sangre	0,2	0,2	0,3	0,4
Infección/Músculo	1,2	2,3	1,9	2,6

% Actividad/gramo				
Órgano	[^{99m}Tc][₃(CO)-AcAc-fluconazol]		[^{99m}Tc][₃(CO)-AcAc-voriconazol]	
	1 H	3 Hs	1 H	3 Hs
Sangre	1,8 ± 0,3	1,9 ± 0,2	3,1 ± 0,5	2,0 ± 0,2
Músculo	0,52 ± 0,02	0,19 ± 0,03	1,2 ± 0,1	1,14 ± 0,01
Infección <i>C.albicans</i>	0,68 ± 0,01	0,20 ± 0,05	1,31 ± 0,04	1,2 ± 0,1

Relación Blanco/No Blanco				
Relación	[^{99m}Tc][₃(CO)-AcAc-fluconazol]		[^{99m}Tc][₃(CO)-AcAc-voriconazol]	
	1 H	3 Hs	1 H	3 Hs
Infección/Sangre	0,4	0,1	0,4	0,6
Infección/Músculo	1,3	1,1	1,1	1,1

5.4.3.2. Complejo de caspofungina

De la figura 41 se desprende que el complejo [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-caspofungina}$] presentan una eliminación combinada por vía hepatobiliar (15 ± 1) %actividad/órgano y urinaria (22 ± 1) %actividad/órgano a las 12 horas, así como una elevada captación hepática (29 ± 1) %actividad/órgano. En músculo sano la captación es elevada (15 ± 1 %actividad/órgano a las 3 horas), lo mismo sucede en sangre (17 ± 2 %actividad/órgano a las 3 horas) sin embargo en ambos casos la depuración es elevada ($9,0\pm 0,4$ %actividad/órgano en músculo y 6 ± 2 %actividad/órgano en sangre) a las 12 horas. La captación en el resto de los órganos es concordante con los grupos antes analizados.

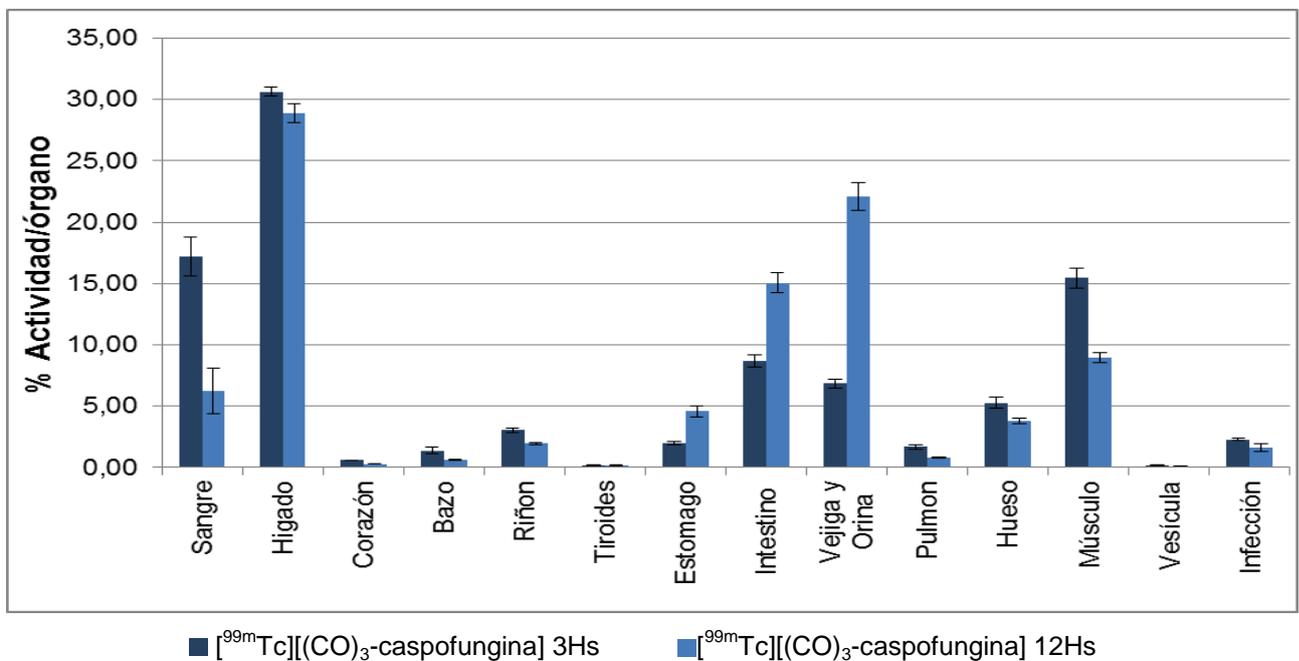


Figura 41. Biodistribución en ratones con infección por *C.albicans* para el complejo de caspofungina.

De la tabla 12 se desprende que para el complejo [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-caspofungina}$], la captación en el modelo de infección por *C.albicans* (G3) fue de baja a moderada ($5,7\pm 0,3$) %Actividad/gramo a las 3 horas y ($5,6\pm 0,2$) %Actividad/gramo a las 12 horas post-inyección. La captación en músculo sano resultó ser baja en todos los casos ($1,7\pm 0,1$) %Actividad/gramo a 3 horas y ($1,1\pm 0,0$) %Actividad/gramo a 12 horas. Las relaciones infección/músculo son de 3.4 a las 3 horas y de 5.4 a las 12 horas lo que hace más favorable este último tiempo para los ensayos biológicos. A su vez, la relación inflamación/sangre no es favorable a las 3 horas, siendo de 0,5

sin embargo a 12 horas, esta relación aumenta a 1,5 debido a que la depuración sanguínea durante el período en estudio es muy elevada. En sangre el %Actividad/gramo a 3 horas es de (11,4±0,1) mientras que a 12 horas el %Actividad/gramo de sangre baja a (3,8±0,2). Este hecho es muy favorable al momento de continuar con los estudios *in vivo* a 12 horas.

Tabla 12. Porcentaje de actividad por gramo y relación entre tejido afectado y sano para el complejo de caspofungina en ratones con infección por *C.albicans*.

% Actividad/gramo		
Órgano	^{99m} Tc][(CO) ₃ -caspofungina]	
	3 Hs	12 Hs
Sangre	11,4 ± 0,1	3,8 ± 0,2
Músculo	1,7 ± 0,1	1,05 ± 0,03
Infección <i>C.albicans</i>	5,7 ± 0,3	5,6 ± 0,2

Relación Blanco/No Blanco		
Relación	^{99m} Tc][(CO) ₃ -caspofungina]	
	3 Hs	12 Hs
Infección/Sangre	0,5	1,5
Infección/Músculo	3,4	5,4

5.4.4. Biodistribución en modelo animal de infección por *A.niger* (G4)

Se realiza una evaluación de los complejos en ratones con infección por *A.niger* para determinar cuál de los complejos es capaz de diferenciar las infección fúngica por este agente etiológico del músculo normal y de la inflamación por causas inespecíficas.

5.4.4.1. Complejos de fluconazol/voriconazol

Al igual que en los grupos anteriores de las figuras 42 y 43 se desprende que, durante todo el periodo de estudio, los complejos de [^{99m}Tc(CO)₃-fluconazol/voriconazol] así como los de tipo 2+1, [^{99m}Tc][(CO)₃-AcAc-fluconazol/voriconazol], mantienen las mismas rutas metabólicas principales así como las vías de eliminación preferenciales estudiadas en la distribución biológica de ratones normales.

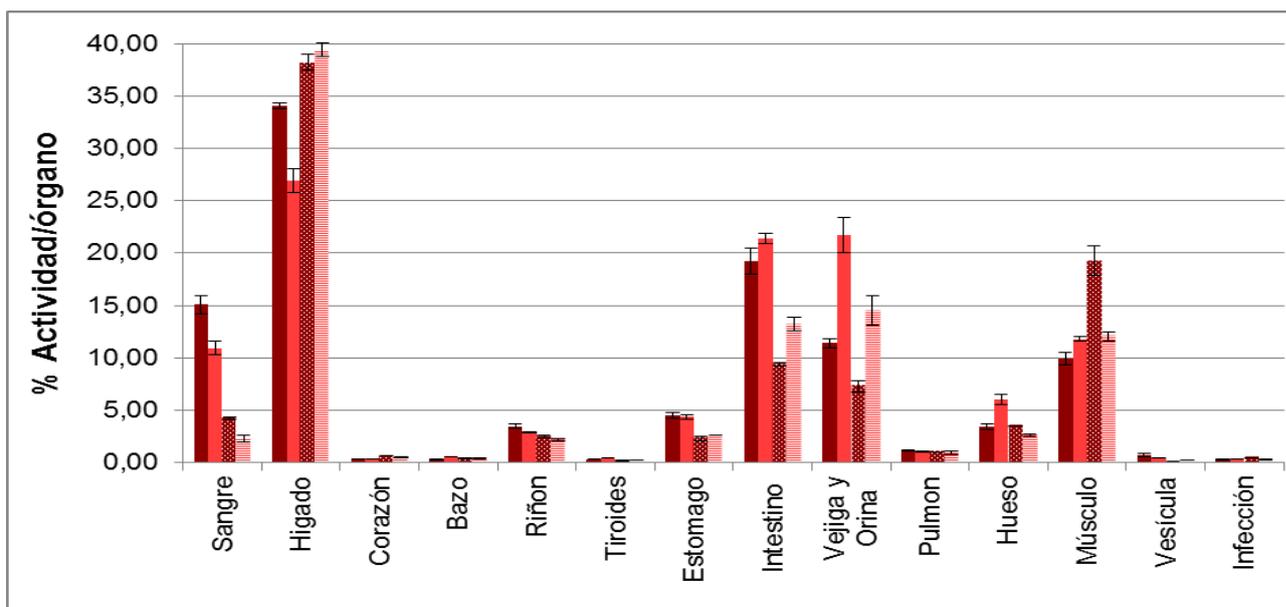


Figura 42. Biodistribución en ratones con infección por *A.niger* para los complejos de voriconazol.

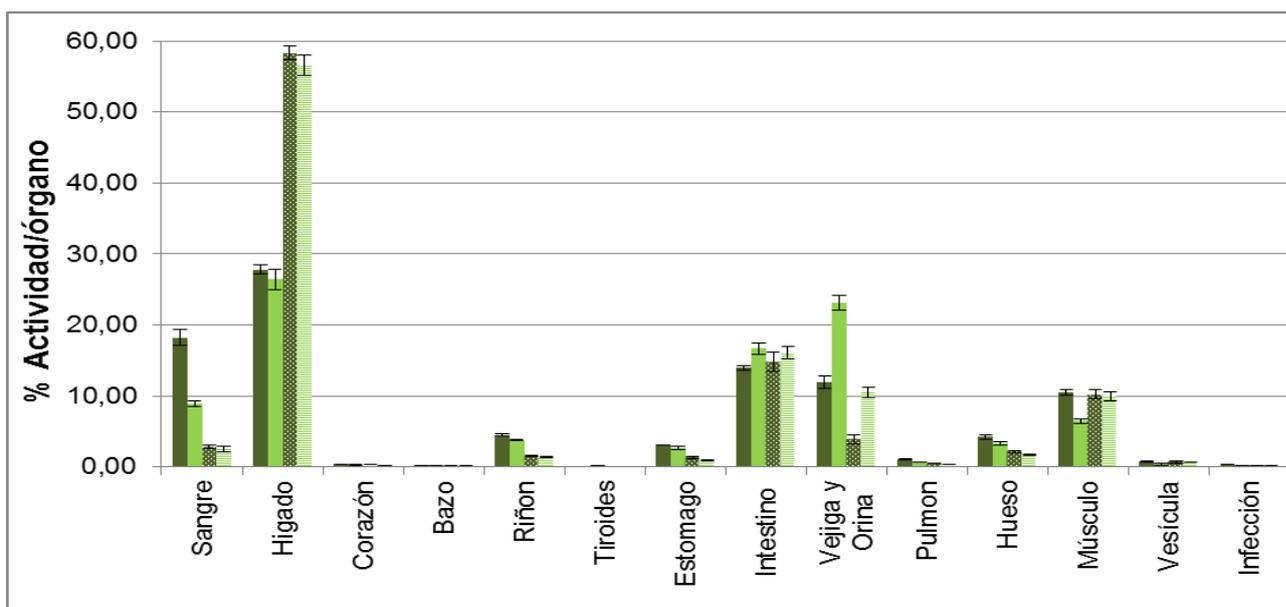


Figura 43. Biodistribución en ratones con infección por *A.niger* para los complejos de fluconazol.

En la tabla 13 se puede observar que tanto en los complejos [^{99m}Tc(CO)₃-fluconazol/voriconazol] como para los de tipo 2+1, [^{99m}Tc][(CO)₃-AcAc-fluconazol/voriconazol], la captación en el modelo de infección por *A.niger* (G4) fue baja, siendo muy similar para ambos tiempos estudiados. Sin embargo con el fin de comparar los resultados con los grupos restantes, se centrará el análisis de resultados

principalmente a 3 horas de biodistribución. Los complejos de tipo $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-fluconazol/voriconazol}]$ presentaron una captación de $(1,5\pm 0,1$ y $1,4\pm 0,1)$ %Actividad/gramo respectivamente. Mientras que los complejos de tipo $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-fluconazol/voriconazol}]$ presentaron una captación en el tejido infectado de $(0,7\pm 0,0$ y $1,3\pm 0,1)$ %Actividad/gramo respectivamente. La captación en músculo sano resultó ser baja en todos los casos $(0,8\text{-}1,3)$ %Actividad/gramo a 1 hora y $(0,5\text{-}1,1)$ %Actividad/gramo a 3 horas para ambos grupos de complejos. Las relaciones infección/músculo son favorables para todos los tiempos estudiados, siendo a las 3 horas de $(2,8\text{-}1,2)$ para los complejos $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-fluconazol/voriconazol}]$ y de $(1,0\text{-}1,3)$ para los complejos de tipo 2+1, $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-fluconazol/voriconazol}]$ respectivamente. A su vez, la relación infección/sangre no es favorable para ninguno de los complejos en todos los tiempos estudiados. Esto se debe a que en todos los casos los %Actividad/gramo en sangre son superiores que para el tejido infectado.

Tabla 13. Porcentaje de actividad por gramo y relación entre tejido afectado y sano para los complejos de fluconazol y voriconazol en ratones con infección por *A.niger*.

% Actividad/gramo				
Órgano	$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-fluconazol}]$		$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-voriconazol}]$	
	1 H	3 Hs	1 H	3 Hs
Sangre	$9,2 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,4$	9 ± 1	6 ± 1
Músculo	$0,81 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,02$	$1,0 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$
Infección <i>A.niger</i>	$1,5 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$

Relación Blanco/No Blanco				
Relación	$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-fluconazol}]$		$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-voriconazol}]$	
	1 H	3 Hs	1 H	3 Hs
Infección/Sangre	0,2	0,4	0,1	0,2
Infección/Músculo	1,8	2,8	1,2	1,2

% Actividad/gramo				
Órgano	$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-fluconazol}]$		$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-voriconazol}]$	
	1 H	3 Hs	1 H	3 Hs
Sangre	$1,4 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,5$	$1,8 \pm 0,3$
Músculo	$0,82 \pm 0,02$	$0,74 \pm 0,01$	$1,3 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$
Infección <i>A.niger</i>	$0,77 \pm 0,03$	$0,74 \pm 0,03$	$1,8 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$

Relación Blanco/No Blanco				
Relación	$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-fluconazol}]$		$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-voriconazol}]$	
	1 H	3 Hs	1 H	3 Hs
Infección/Sangre	0,5	0,6	0,7	0,7
Infección/Músculo	0,9	1,0	1,4	1,3

5.4.4.2. Complejo de caspofungina

De la figura 44 se desprende que el complejo [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-caspofungina}$] presentan una eliminación combinada por vía hepatobiliar (11 ± 1) %actividad/órgano y urinaria ($8,1\pm 0,5$) %actividad/órgano a las 12 horas, así como una elevada captación hepática (36 ± 2) %actividad/órgano. En músculo sano la captación es alta ($12,5\pm 0,5$ %actividad/órgano a las 3 horas), lo mismo sucede en sangre (21 ± 2 %actividad/órgano a las 3 horas) sin embargo en ambos casos se observa una leve depuración a las 12 horas. La captación en el resto de los órganos es baja (menos del 5%).

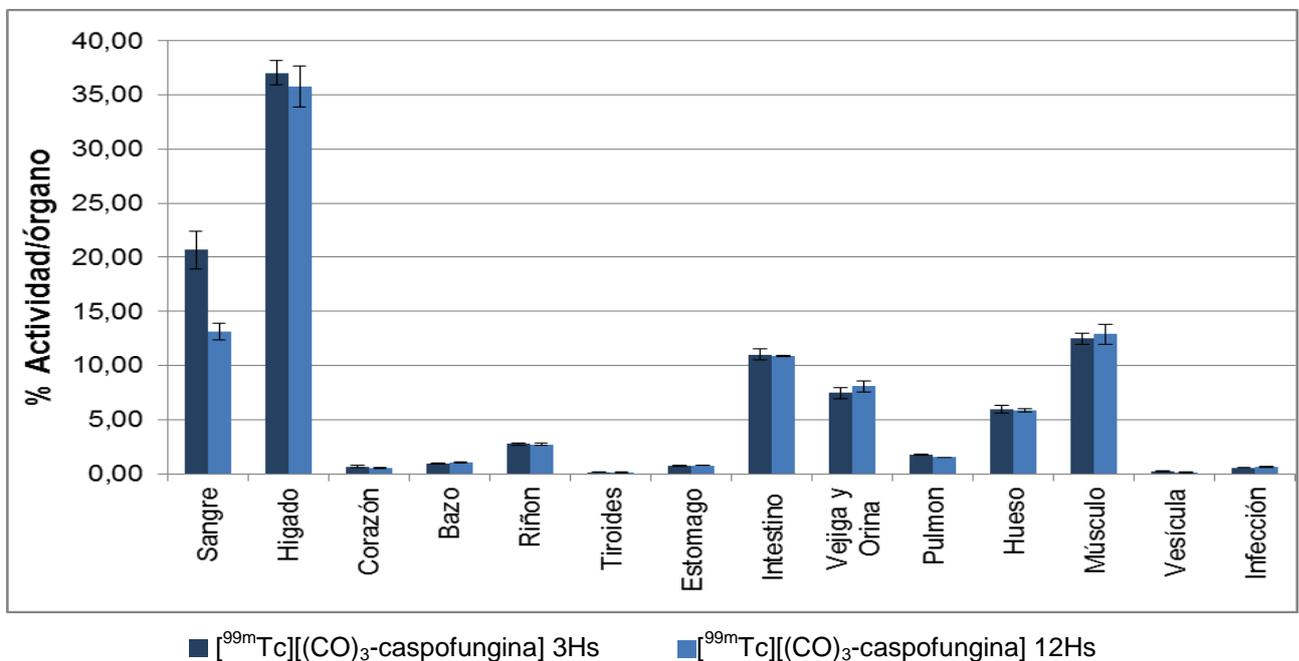


Figura 44. Biodistribución en ratones con infección por *A.niger* para el complejo de caspofungina.

De la tabla 14 se desprende que para el complejo [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-caspofungina}$], la captación en el modelo de infección por *A.niger* (G4) fue de baja a moderada ($1,9\pm 0,0$) %Actividad/gramo a las 3 horas, siendo máxima a las 12 horas post-inyección ($2,9\pm 0,3$) %Actividad/gramo. La captación en músculo sano resultó ser baja en todos los casos ($1,3\pm 0,0$) %Actividad/gramo a 3 horas y ($0,8\pm 0,0$) %Actividad/gramo a 12. Las relaciones infección/músculo son de 1,4 a las 3 horas y de 3,7 a las 12 horas lo que hace más favorable este último tiempo para los ensayos biológicos. A su vez, la relación infección/sangre no es favorable para todo el período evaluado. Esto se debe a que la actividad en sangre es levemente

alta a moderada (11,8-4,8 %Actividad/gramo a 3 y 12 horas respectivamente) existiendo depuración significativa durante el período en estudio. Esta depuración es favorable al momento de continuar con los estudios *in vivo* a 12 horas.

Tabla 14. Porcentaje de actividad por gramo y relación entre tejido afectado y sano para el complejo de caspofungina en ratones con infección por *A.niger*.

% Actividad/gramo		
Órgano	$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-caspofungina}]$	
	3 Hs	12 Hs
Sangre	11,8 ± 0,3	4,8 ± 0,1
Músculo	1,32 ± 0,03	0,79 ± 0,02
Infección <i>A.niger</i>	1,89 ± 0,01	2,9 ± 0,3

Relación Blanco/No Blanco		
Relación	$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-caspofungina}]$	
	3 Hs	12 Hs
Infección/Sangre	0,2	0,6
Infección/Músculo	1,4	3,7

A modo de resumen, para los complejos de fluconazol y voriconazol, los mejores resultados se obtuvieron a 3hs post inyección. El comportamiento biológico de todos los compuestos se caracterizó por baja a moderada actividad en sangre y riñones; la depuración es principalmente hepatobiliar, mientras que la actividad en el resto de los órganos y tejidos es depreciable. Según se observa en la Tabla 15, las relaciones Blanco (inflamación o infección) / No Blanco (músculo sano) presentan una mejor diferenciación entre inflamación e infección para los complejos de tipo $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-fluconazol/voriconazol}]$ para los cuales obtenemos relaciones B/NB en los animales infectados en el entorno de 2, no así para los complejos de tipo $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-fluconazol/voriconazol}]$ en los que las relaciones rondan valores próximos a 1. Respecto a la especificidad entre infección vs inflamación el complejo $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-voriconazol}]$ logra diferenciar la infección por *C.albicans* (2,6) pero no así por *A.niger* (1,2) sin embargo el complejo $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-fluconazol}]$ presenta relaciones B/NB mayores a dos para cualquiera de los patógenos estudiados, (2,3) para *C.albicans* y (2,8) para *A.niger*. En todos los casos la captación sanguínea es de baja a moderada por lo que todos los complejos presentan bajas relaciones inflamación o infección/sangre, por debajo de 1 en cualquiera de los modelos animales utilizados.

Tabla 15. Relación entre tejido afectado y sano para los complejos de fluconazol y voriconazol en los modelos G2, G3 y G4

Relación Blanco/ No Blanco				
		Inflamación	<i>C.albicans</i>	<i>A.niger</i>
$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-fluconazol}]$	1 h	1.1	1.3	0.9
	3 hs	1.3	1.1	1.0
$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-fluconazol}]$	1 h	1.6	1.2	1.8
	3 hs	1.7	2.3	2.8
$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-AcAc-voriconazol}]$	1 h	0.8	1.1	1.4
	3 hs	1.2	1.1	1.3
$[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-voriconazol}]$	1 h	0.7	1.9	1.2
	3 hs	1.4	2.6	1.2

El complejo de caspofungina presenta baja captación en tiroides y estómago, confirmándose su estabilidad en el medio biológico durante todo el periodo de estudio. Los mejores resultados se obtienen a 12hs post inyección. Su comportamiento biológico es característico de un complejo que presenta alto porcentaje de unión a proteínas plasmáticas, como lo es su elevada depuración hepática, en combinación con eliminación por vía renal y lenta depuración sanguínea. Según se observa en la Tabla 16, la especificidad entre infección vs inflamación es mayor a 12hs ya que la relación B/NB disminuye en la inflamación (2,6 a 3hs y 1,1 a 12hs) y a su vez aumenta en los procesos infecciosos para ambos patógenos estudiados, (3,4 a 5,4) para *C.albicans* y (1,4 a 3,7) para *A.niger*. En todos los casos la captación sanguínea es de baja a moderada por lo que los complejos presentan bajas relaciones inflamación o infección/sangre, por debajo de 1, para los modelos animales de inflamación (G1) e infección por *A.niger* (G4). Sin embargo en el modelo de infección por *C.albicans*, en el cual la captación en el tejido infectado es mayor, la relación infección/sangre es de 1,5.

Tabla 16. Relación entre tejido afectado y sano para el complejo de caspofungina en los modelos G2, G3 y G4

Relación Blanco/ No Blanco			
	Inflamados	<i>C.albicans</i>	<i>A.niger</i>
3 horas	2,6	3,4	1,4
12 horas	1,1	5,4	3,7

5.4.5. Imágenes en modelo control (G1), inflamación (G2) e infección (G3) y (G4)

Para los complejos de fluconazol y voriconazol se realizan imágenes a 3hs de biodistribución ya que a este tiempo es en el que presentan mejores resultados preliminares. Se ha dado prioridad, en los estudios por imagen, a los complejos y ya que presentan mejores resultados en las biodistribuciones, con el fin de realizar un uso racional de animales de experimentación. Sin embargo el complejo [^{99m}Tc][(CO) $_3$ -fluconazol] no presenta buenos resultados desde el punto de vista imagenológico no pudiendo diferenciarse los procesos inflamatorios de los infecciosos. A continuación se muestran las imágenes centellográficas de los tres modelos de lesiones para [^{99m}Tc][(CO) $_3$ -voriconazol] por ser éste el que presenta resultados más relevantes desde el punto de vista biológico. (Figura 45).

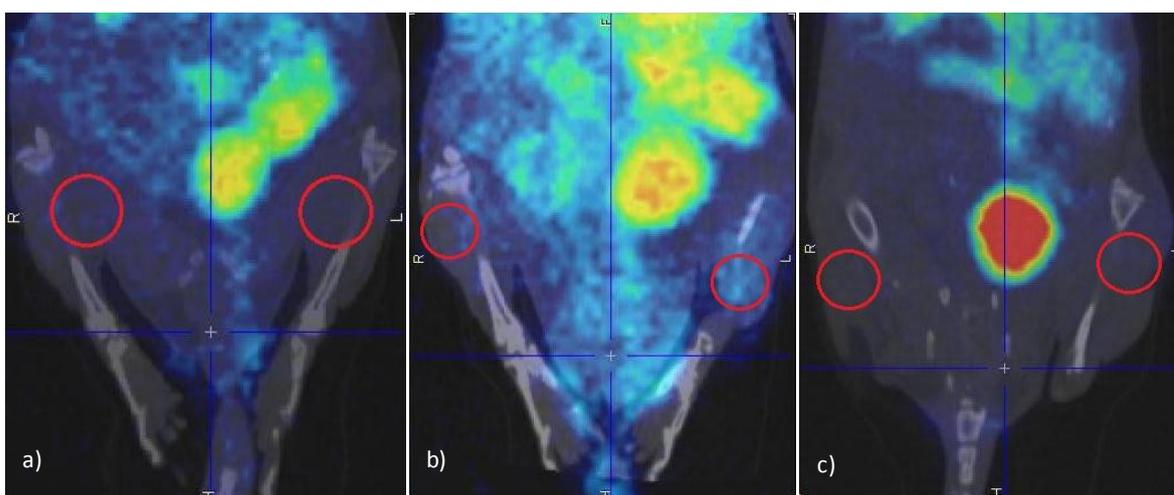


Figura 45. Imágenes centellográficas coronales de [^{99m}Tc][(CO) $_3$ -voriconazol] en lesiones en la pata trasera izquierda a) *Aspergillus niger*; b) *Candida albicans*; c) Inflamación estéril.

Los valores de los cocientes B/NB de las imágenes fueron 1,3 para inflamación estéril (G2), 2,4 para infección por *C.albicans* (G3) y 1,1 para *A.niger* (G4). El perfil de los valores obtenidos por imagen ratifica los datos recabados en las distribuciones biológicas. El complejo [^{99m}Tc][(CO) $_3$ -voriconazol] logra diferenciar significativamente el proceso inflamatorio del infeccioso producido por *C.albicans* tanto en las biodistribuciones como en las imágenes. (Tabla 17.)

Tabla 17. Relación entre tejido afectado y sano para el complejo de [^{99m}Tc][$(\text{CO})_3$ -voriconazol] en las biodistribuciones e imágenes a 3 horas post-inyección

Relación Blanco/No Blanco		
[^{99m} Tc][$(\text{CO})_3$ -voriconazol]	Imágenes	Biodistribuciones
G2	1,3	1,4
G3	2,4*	2,6*
G4	1,1	1,2

* indica diferencias significativas entre inflamación estéril y grupos infectados ($p < 0.05$, test-t, dos colas, no apareado).

En relación al complejo [^{99m}Tc][$(\text{CO})_3$ -caspofungina] se realizan imágenes a 12hs de biodistribución para los grupos inflamación estéril (G2), *C.albicans* (G3) y *A.niger* (G4) ya que éste es el tiempo óptimo de captación estudiado según los resultados de las biodistribuciones. (Figuras 46-48).

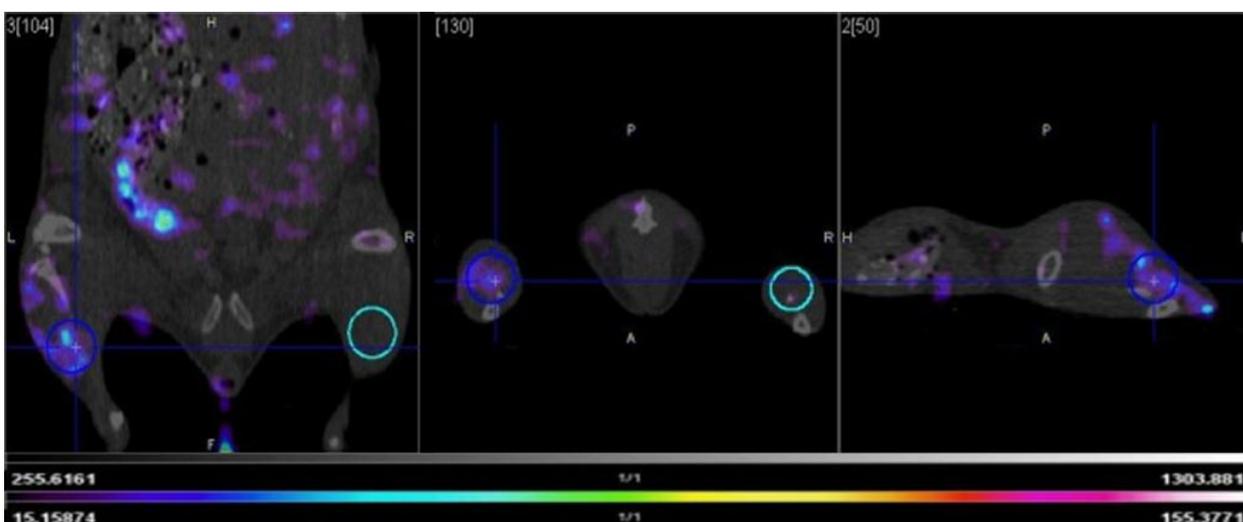


Figura 46. Imagen centellográfica coronal, axial y sagital respectivamente, de [^{99m}Tc][$(\text{CO})_3$ -caspofungina] en lesión provocada, en la pata trasera izquierda, por Inflamación estéril (G2).

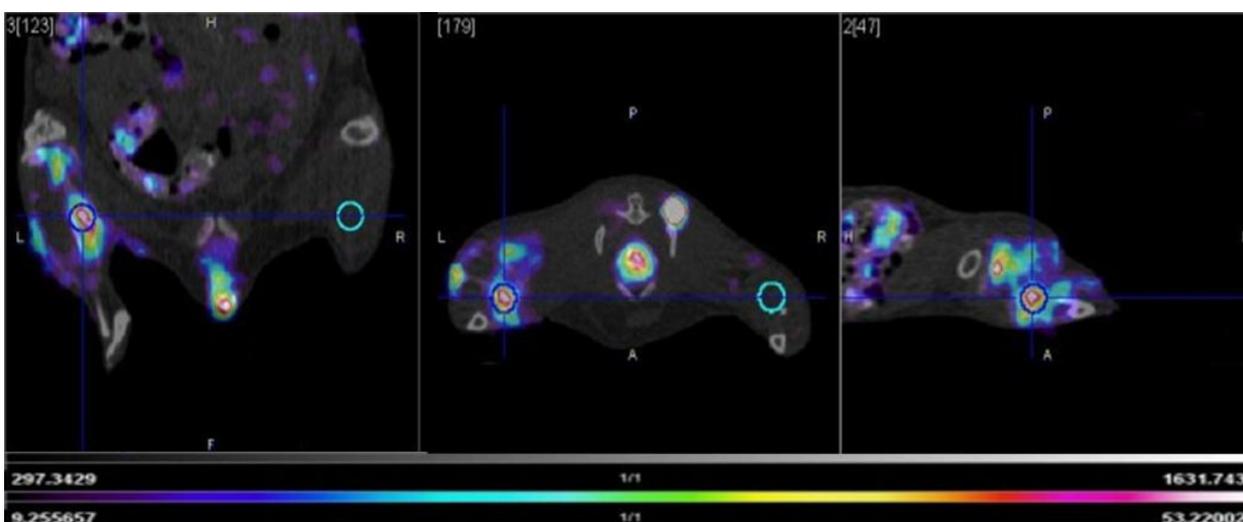


Figura 47. Imagen centellográfica coronal, axial y sagital respectivamente, de [^{99m}Tc][$(\text{CO})_3$ -caspofungina] en lesión provocada, en la pata trasera izquierda, por *Candida albicans* (G3).

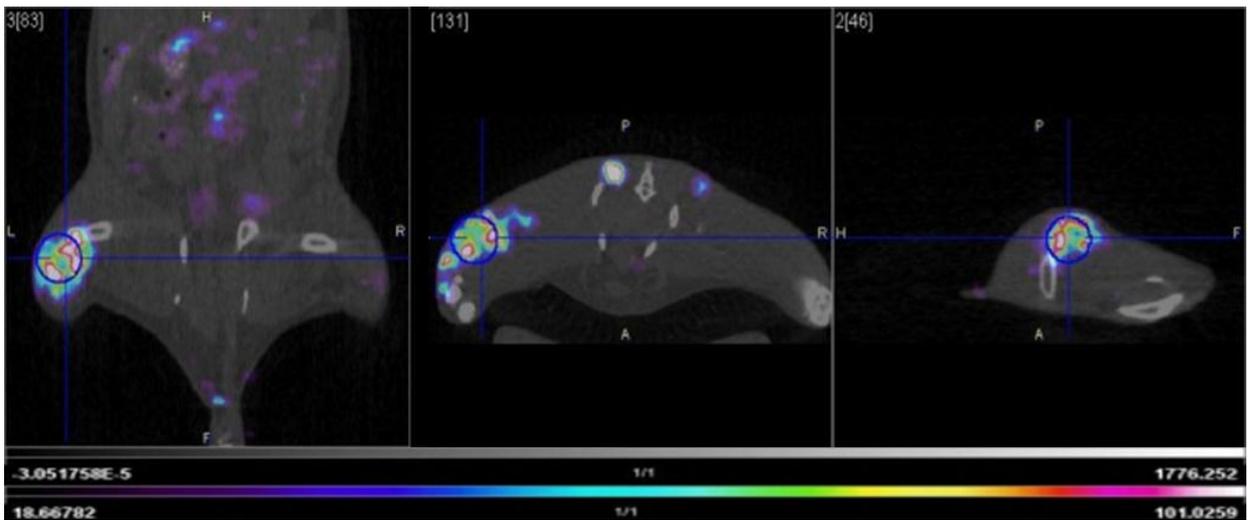


Figura 48. Imagen centellográfica coronal, axial y sagital respectivamente, de [^{99m}Tc][₃(CO)-caspofungina] en lesión provocada, en la pata trasera izquierda, por *Aspergillus niger* (G4).

Los valores B/NB de las imágenes fueron 4,4 para inflamación estéril (G2), 9,5 para infección por *C.albicans* (G3) y 13,0 para *A.niger* (G4). Las imágenes centellográficas obtenidas establecieron una clara diferenciación de los 3 procesos, lo que confirma los perfiles obtenidos en las biodistribuciones. No obstante las relaciones B/NB de las imágenes son más altas que los valores obtenidos en las biodistribuciones como se muestra en la (Tabla 18) Este fenómeno se observó consistentemente en todos los grupos. La explicación más razonable es que durante la extracción de la muestra (lesión), se intenta asegurar la eliminación de toda la lesión por lo que se produce un menor porcentaje de actividad por gramo, al extraer también músculo sano con menor conteo de actividad por gramo. Además, en las imágenes centellográficas al delinear los VOIs de la lesión, se trata de ser lo más preciso posible lo que conduce a una actividad / relación de volumen mayor que la obtenida en las biodistribuciones.

Tabla 18. Relación entre tejido afectado y sano para el complejo de [^{99m}Tc][₃(CO)-caspofungina] en las biodistribuciones e imágenes a 12 horas post-inyección

Relación Blanco/No Blanco		
[^{99m} Tc][₃ (CO)-caspofungina]	Imágenes	Biodistribuciones
G2	4,4	1,1
G3	9,5*	5,4*
G4	13,0*	3,7*

* indica diferencias significativas entre inflamación estéril y grupos infectados (p <0.05, test-t, dos colas, no apareado).

6. CONCLUSIONES

En el marco de la presente maestría se han sintetizado con éxito cinco nuevos complejos de coordinación con ^{99m}Tc utilizando como ligandos tres de los cuatro diferentes antifúngicos comerciales disponibles, fluconazol, voriconazol y caspofungina. El cuarto antifúngico disponible fue anidulafungina, con la cual no se logró una marcación exitosa.

Para anidulafungina inicialmente se intentó derivatizar la molécula con el fin proporcionar grupos quelantes adecuados para la posterior marcación de la misma con ^{99m}Tc , formación de complejos tricarbónicos. Posteriormente y ante la imposibilidad de derivatizar la molécula, se utilizaron técnicas alternativas más convencionales como ser: marcación utilizando glucoheptonato y pirofosfato como ligandos intermediarios y marcación directa. Sin embargo, ninguna de las técnicas utilizadas fue exitosa, no pudiéndose obtener un producto con la pureza radioquímica, superior al 90%, necesaria para seguir adelante en los estudios fisicoquímicos y biológicos. Dado que la anidulafungina no se consigue en plaza y los costos de importación son muy elevados se decidió continuar trabajando con los demás antifúngicos fácilmente asequibles.

Las marcaciones de fluconazol y voriconazol se realizaron mediante la formación de complejos $^{99m}\text{Tc(I)-tricarbónicos}$ por dos técnicas diferentes. Para el caso de los complejos, $[\text{}^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-fluconazol}]$ y $[\text{}^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-voriconazol}]$ los resultados mostraron la formación de dos especies que se encuentran en equilibrio en solución y que juntas poseen una elevada pureza radioquímica. Para los complejos $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-AcAc-fluconazol}]$, $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-AcAc-voriconazol}]$ y $[\text{}^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-caspofungina}]$ se obtuvo una única especie con elevada pureza radioquímica. La estabilidad para todos los casos resultó ser mayor al 90% por al menos 4 horas para los complejos de fluconazol y voriconazol y 20 horas para caspofungina. En cuanto a la UPP, los valores son de medios a altos (42-78)%, lo que puede explicarse por dos fenómenos. Uno de ellos sucede cuando el complejo simplemente presenta una elevada afinidad por las proteínas plasmáticas, así como lo presentan el resto de los fármacos o por el hecho que en las proteínas plasmáticas existen grupos funcionales de los aminoácidos con buena capacidad donadora de electrones, con potencial para desplazar al ligando de su unión con el metal si ésta no es suficientemente fuerte. Complementariamente los ensayos de estabilidad en plasma y estabilidad frente a histidina o cisteína, ayudan a dilucidar la posible causa de los valores altos de UPP. Los complejos $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-voriconazol}]$ y $[\text{}^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-caspofungina}]$ son los que presentan mayor estabilidad en plasma (95-98)%. Además el complejo de caspofungina es el que obtuvo mejores resultados en el ensayo de

competencia frente a histidina y cisteína (89-93)%. Esta elevada estabilidad frente a plasma y a los agentes competitivos puede explicar el buen desempeño de estos complejos en los modelos animales estudiados.

En los estudios *in vivo*, todos los complejos estudiados presentan elevada captación hepática, hecho que es desfavorable desde el punto de vista de un posible radiotrazador para uso clínico. Sin embargo hay que tener en cuenta otra serie de parámetros a evaluar.

Respecto a los complejos [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-AcAc-fluconazol}$] y [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-AcAc-voriconazol}$] en ningún caso las relaciones blanco / no blanco fueron favorables, en las biodistribuciones, por lo que los estudios por imagen se descartan.

Por su parte [$^{99m}\text{Tc}[(\text{CO})_3\text{-fluconazol}]$] presenta una buena sensibilidad para detectar infección por *C.albicans* (B/NB=2.3) y *A.niger* (B/NB=2.8) aunque no presenta una buena especificidad respecto a la inflamación estéril (B/NB=1.7) . Esto sumado a una baja relación lesión/sangre (<1) hacen que desde el punto imagenológico, este complejo no presente buenas relaciones blanco/no blanco ya que no es posible distinguir claramente los sitios de captación con respecto al fondo.

Las relaciones blanco / no blanco más relevantes, evidencian que [$^{99m}\text{Tc}[(\text{CO})_3\text{-voriconazol}]$] presenta una buena especificidad para detectar infección por *C.albicans* (B/NB=2.6) con respecto a la inflamación estéril (B/NB=1.4) . Por otra parte la infección por *A.niger* el [$^{99m}\text{Tc}[(\text{CO})_3\text{-voriconazol}]$] presenta una la relación (B/NB=1.2) baja . Lo mismo sucede con el complejo [$^{99m}\text{Tc}[(\text{CO})_3\text{-caspofungina}]$] el cual presenta la mayor sensibilidad y especificidad de detección tanto para infecciones de *C.albicans* (B/NB=5.4) como de *A.niger* (B/NB= 3.7) así como una clara diferenciación con la inflamación estéril (B/NB=1.1). Sin embargo para [$^{99m}\text{Tc}[(\text{CO})_3\text{-voriconazol}]$] la relación lesión/sangre es baja, no así para [$^{99m}\text{Tc}[(\text{CO})_3\text{-caspofungina}]$] que es el único complejo con valores altos para esta relación (1,5); lo que lo convierte en el complejo más relevante desde el punto de vista imagenológico.

De acuerdo a las características buscadas en un radiofármaco para diagnóstico de infecciones, tanto los complejos de fluconazol como de voriconazol fueron fácilmente marcados pero su comportamiento *in vivo* no cumplió con los requisitos necesarios, por lo que se desestiman como agentes para diagnóstico por centellografía. Sin embargo, es deseable explorar otras estrategias de marcado. Deberían introducirse cambios químicos que permitan modular las propiedades fisicoquímicas y el comportamiento biológico; de manera de disminuir la captación hepática, favorecer la depuración sanguínea y no perder su funcionalidad desde el punto de vista farmacológico.

Por todo lo expuesto anteriormente, desde el punto de vista fisicoquímico y biológico, $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-caspofungina}]$ se esboza como un agente potencial para el diagnóstico rápido y específico de infecciones fúngicas causadas por agentes patógenos como son *C.albicans* y *A.niger*. Sin embargo debe ser estudiado más profundamente desde el punto de vista preclínico con el fin de poder llevarlo a la clínica así como realizar la elucidación estructural del complejo con Re estable.

7. REFERENCIAS

- [1] Early P., Sodee D. "Principles and practice of Nuclear Medicine". Mosby-Year book. (1995).
- [2] Radiopharmaceuticals. Final Text for addition to the international Pharmacopoeia. November (2008).
- [3] Chen J, Cheng Z, Miao Y, Jurisson SS, Quinn TP. Cancer. 94(4 Suppl):1196-201, (2002).
- [4] Tokita N, Hasegawa S, Maruyama K, Izumi T, Blankenberg FG, Tait JF, Strauss HW, Nishimura T. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 30(2): 232-8 (2003).
- [5] Tang Y, Scollard D, Chen P, Wang J, Holloway C, Reilly RM. Nucl Med Commun. 26(5):427-32 (2005).
- [6] Annovazzi A, D'Alessandria C, Bonanno E, Mather SJ, Cornelissen B, van de Wiele C, Dierckx RA, Mattei M, Palmieri G, Scopinaro F, Signore A. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 33(4):474-82 (2006).
- [7] Fernández S. Tesis de Maestría en Química: Desarrollo y evaluación de complejos de metales de transición y ligandos nitroimidazólicos con potencial aplicación en Medicina Nuclear. (2011).
- [8] Wilkinson G., Gillard R., Mc Cleverty J. Comprehensive Coordination Chemistry, 1987, 6, 963.
- [9] Rey A. Aplicaciones de nuevos cores de Tc al diseño de radiofármacos. Material complementario, Cátedra de Radioquímica, Facultad de Química UdeLaR.
- [10] Arano Y. "Recent advances in ^{99m}Tc radiopharmaceuticals" Ann Nucl Med. 16(2): 79-93 (2002).
- [11] Ginj M., Chen J., Walter M., Eltschinger V., Reubi J., Maecke H. Preclinical evaluation of new and highly potent analogues of octreotide for predictive imaging and targeted radiotherapy. Clinical Cancer Research 11, 1136-1140 (2005).
- [12] Liu S. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. Chemical Society Review 33, 445-446 (2004).
- [13] Rey A. Estrategias de marcación. Repartido teórico correspondiente al curso de Radiofarmacia, dictado por la Cátedra de Radioquímica, Facultad de Química, UdeLaR (2010).
- [14] Kowalski R., Falen S. "Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine". 2º Edición. American Pharmacists Association. (2004).

- [15] Mahmood, A.; Jones, A. G.; in Handbook of Radiopharmaceuticals; Welch, M. J.; Redvanly, C. S. eds.; John Wiley & Sons; England, 2003; pp. 323-362.
- [16] Ferro Flores G., Arteaga de Murphy C. Radiofármacos de tercera generación. Radiofármacos Terapéuticos. Comité de Radiofarmacia. ALASBIMN. Diciembre 2007.
- [17] Leon A, Rey A, Mallo L, Pirmettis I, Papadopoulos M, Leon E, Pagano M, Manta E, Incerti M, Raptopoulou C, Terzis A, Chiotellis E. Nucl Med Biol. 29(2):217-26 (2002).
- [18] Biber F., Unak P., Ertay T., Medine E., Zihnioglu F., Tascý C., Durak H. Applied Radiation and Isotopes 64 778–788 (2006).
- [19] Liu S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target specific delivery of metallic radionuclides. Adv Drug Deliv Rev 2008;60:1347-70.
- [20] Alberto R, Schibili R, Waibel R, Abram U, Schubiger AP. Basic aqueous chemistry of $[M(OH_2)_3(CO)_3]^+$ (M= Re, Tc) directed towards radiopharmaceutical application. Coordination Chemistry Reviews 1999;190-192:901-19.
- [21] Schibli R., Schubiger A. "Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals" Eur. J. Nucl. Med 29:1529-1542 (2002).
- [22] Alberto R, Schibli R, Egli A, Schubiger AP. A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: Synthesis of $[^{99m}Tc(OH_2)_3(CO)_3]^+$ from $[^{99m}TcO_4]^-$ in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand. J Am Chem Soc 1998;120:7987-8.
- [23] Alberto R. "Advances and perspectives of aqueous organometallic rhenium and technetium chemistry". In: Technetium, rhenium and other metals in chemistry and Nuclear Medicine p.3-14 SG Editorial, Padova. 2002.
- [24] Alberto R., et al. "Potential of the $[M(CO)_3]^+$ (M=Re, Tc) moiety for the labeling of biomolecules". Radiochim. Acta, 87: 99-103 (1997).
- [25] Mundwiler S, Kundig M, Ortner K, et al. "A new [2+1] mixed ligand concept based on $[^{99m}Tc(OH_2)_3(CO)_3]^+$: a basic study". Dalton Trans. 7;(9):1320-1328(2004).
- [26] Zobi F, Spingler B, Alberto R. "Structure, reactivity and solution behavior of $[Re(ser)(7-MeG)(CO)_3]$ and $[Re(ser)(3-pic)(CO)_3]$: "nucleoside-mimicking" complexes based on the *fac*- $[Re(CO)_3]^+$ moiety". Dalton Trans. 7;(17):2859-65 (2005).
- [27] Paul D. Benny, Glenn A. Furgate, Tanushree Ganguly et al. *Inorg. Chimica Acta*. 365 (2011) 356-362.
- [28] Kuijpers B, Groothuys S, Keereweer A. Synthesis of Triazole-linked glycosyl amino acids and peptides. Org Lett 2004;6:3123-6.

- [29] Terán M; Paolino A; Vilar J; Kapitan M; Hermida JC, Andruskevicius P, et al. Evaluación clínica y dosimétrica de ^{99m}Tc -Hynic-IgG como agente de diagnóstico de focos de infección en pacientes HIV positivos. *Rev Panam Infectol* 2010; 12:12-7.
- [30] Welling A, Lupetti M, Balter H, Lanzzeri S, Souto B, Rey A, et al. ^{99m}Tc -labeled antimicrobial peptides for detection of bacterial and *Candida albicans* infections. *J Nucl Med* 2001; 42,5:788-94.
- [31] Shaha SQ, Rafiullah Khanb M. Radiosynthesis and biological evaluation of the ^{99m}Tc -tricarbonyl moxifloxacin dithiocarbamate complex as a potential *Staphylococcus aureus* infection radiotracer. *Appl Radiat Isot* 2011; 69:686–90.
- [32] Signore A, D'Alessandria A, Lazzeri A, Dierckx R. Can we produce an image of bacteria with radiopharmaceuticals? *Eur. J Med Mol Imaging* 2008; 35:1051-5.
- [33] Lupetti M, Welling A, Mazzi U, Nibbering P, Pauwels E. Technetium-99m labelled fluconazole and antimicrobial peptides for imaging of *Candida albicans*. *J Nucl Biol Med* 2002; 29:674-9.
- [34] Michael J. O'Doherty, Sally F. Barrington, John L. Klein. Opportunistic Infection and Nuclear Medicine. *Seminar in Nuclear Medicine* 2009; 39,2:88-102.
- [35] Juan Carlos Pozo-Laderas. Utilidad clínica de la micafungina en el tratamiento de las candidiasis invasoras en el paciente crítico. *Revista Iberoamericana de Micología* 2009; 26,1:69-74.
- [36] De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008; 46:1813-1821.
- [37] Christina A. Truluck. *Nuclear Medicine Technology: Inflammation and Infection Imaging* Original. *Journal of Radiology Nursing.* 2007; 26,3:77-85.
- [38] Guillermo Quindós, Elena Eraso, Leyre M. López-Soria y Guillermo Ezpeleta. Enfermedad fúngica invasora: ¿diagnóstico micológico convencional o molecular? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012; 30,9:560–571.
- [39] Kasim Ocakoglu, Elif Bayrak, Mehmet Onursal, Osman Yilmaz, Fatma Yurt Lambrecht, Alfred R. Holzwarth. Evaluation of ^{99m}Tc -Pheophorbide-a use in infection imaging: A rat model. *Applied Radiation and Isotopes.* 2011; 69,9:1165-1168.
- [40] W Becker, J Meller. The role of nuclear medicine in infection and inflammation. *The Lancet Infectious Diseases.* 2001; 1,5:326-333.

- [41] Hoffer P. *Gallium: mechanis*. J Nucl Med 1980; 21:282-85.
- [42] Thakur ML, Lavender JP, Arnot RN, Silvester DJ, Segal AW. Indium-111-labeled autologous leukocytes in man. J Nucl Med. 1977; 18:1012-21.
- [43] Spector WG, Lykke WJ, Willoubhgy PA. A quantitative study of leukocyte emigration in chronic inflammatory granulomata. J Pathol Bacteriol.1967; 93:101-07.
- [44] Saverymuttu SH, Crofton ME, Peters AM, Lavender JP. Indium-111 tropolonate leukocyte scanning in the detection of intra-abdominal abscesses. Clin Radiol 1983; 34:593-96.
- [45] McCarthy K, Velchik MG, Alavi A, Mandell GA, Esterhai JL, Goll S. In-111-labelled white blood cells in the detection of osteomyelitis complicated by a pre-existing condition. J Nucl Med 1988; 29:1015-21.
- [46] Andor W. J. M. Glaudemans & Alberto Signore. FDG-PET/CT in infections: the imaging method of choice ? Eur. J Nucl Med Mol Imaging 2010; 37:1986-91.
- [47] Martínez-Rodríguez I. y Carril J.M. Actualización del uso de radiotrazadores PET en patología inflamatoria. Rev Esp Med Nucl Imagen Mol. 2013; 32(6):378–86.
- [48] Signore A, Soroa VA, De Vries EF. Radiobelled white blood cells or FDG for imaging on inflammation and infection? Q J Nucl Med Mol Imaging. 2009; 53(1):23–5.
- [49] Fischbach W, Becker W. Clinical relevance of activity parameters in Crohn's disease estimated by fecal excretion of In-111-labeled granulocytes. Digestion 1991; 50:149–52.
- [50] Pring DJ, Henderson RG, Keshavarzian A, et al. Indium granulocyte scanning in painful prosthetic joint. Radiology 1991; 179:645–47.
- [51] Golden DW, Cline MJ. Production, distribution and fate of granulocytes. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, et al, eds. Hematology, 2nd edn. New York: McGraw Hill; 1977: 699–706.
- [52] Lupetti A, Welling MM, Pauwels EK, Nibbering PH. Detection of fungal infections using radiolabeled antifungal agents. Curr Drug Targets. 2005 Dec; 6(8):945-54.
- [53] Lupetti A., Pauwels E. K. J., Nibbering P. H., Welling M. M. Use Of Radiolabelled Peptides For Scintigraphy In Non-Oncologic Diseases ^{99m}Tc-Antimicrobial peptides: promising candidates for infection imaging. The Quarterly Journal of Nuclear Medicine 2003 December; 47(4):238-45
- [54] Reyes L., Martinez E., Giglio J., Terán M. Evaluación biológica de ^{99m}Tc-Voriconazol como potencial agente de diagnóstico de infecciones fúngicas por centellografía gama. Alasbimn Journal Year 14, N° 54, October 2011; ISSN: 0717-4055.

- [55] Ghannoum M. A., Kuhn D. M. Voriconazole. Better chances for patients with invasive mycosis. *Eur J Med Res* 2002; 7: 242-56.
- [56] Alexis Diomedi P. Nuevos Antifúngicos: Las equinocandinas. *Rev. Chil. Infect.* 2004; 21 (2): 89-101.
- [57] Romero M., Cantón E., Permán J., Gobernado M. Antifúngicos inhibidores de la síntesis de glucano. *Rev. Esp. Quimioterap.* Diciembre 2005; Vol. 18 (Nº 4): 281-299.
- [58] Gobernado M., Cantón E. Anidulafungina. *Rev. Esp. Quimioterap.* 2008; Vol.21(Nº 2): 99-114.
- [59] Fernández S, Crócamo N, Incerti M, Giglio J, Scarone L, Rey A. Preparation and preliminary bioevaluation of a $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -glucose derivative prepared by a click chemistry route. *J. Label Compd. Radiopharm* 55, 274–280 (2012).
- [60] Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical. Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* 40, 2004-2021 (2001).
- [61] Hein C.D., Liu X.M., Wang D. Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. *Pharmaceutical Research* 25, 2216-2230 (2008).
- [62] Mindt T.L., Struthers H., Brans L., Anguelov T., Schweinsberg C., Maes V., Tourwe D., Schibli R. "Click to chelate": Synthesis and Installation of Metal
- [63] Klein LK, Li L. Design and preparation of cyclopeptamine antifungal agents. *Curr Pharm Des.*, 1999, 5, 57-71

8. AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas e instituciones involucradas directa e indirectamente en el desarrollo de esta tesis y a las cuales les debo un profundo agradecimiento

Las instituciones:

A Pedeciba-Química, por el apoyo económico a través de las alícuotas de dinero que me han permitido llevar a cabo parte de la fase experimental.

A la empresa Merck & Co. Inc., por la donación de caspofungina.

A los Centros de Medicina Nuclear del Hospital de Clínicas, Impasa y Hospital Italiano, por la donación de pertecneciato.

Al Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM), por el uso de la cámara trimodal PET/SPECT/CT Triumph™, Tri-Foil-Imaging.

En el plano personal:

En primer lugar, me siento muy agradecida con mis directores de tesis, Mariella y Ana, quienes me han apoyado en todo momento, desde el punto de vista laboral, siempre dispuestas a ayudar a enseñar y siempre pacientes, muy pacientes. En lo personal dos grandes mujeres que me alegra mucho haber cruzado en la vida. Espero seguir trabajando con ustedes muchos años más.

A todos mis compañeros de la Cátedra de Radioquímica, los que están y los que estuvieron a lo largo de estos años, en especial a Javier que me enseñó y aguantó mis manías; a Mariella, por estar siempre presente en los buenos y malos momentos, por siempre entenderme y apoyarme; a Elena Martínez con la cual iniciamos juntas nuestro trabajo en el tema. Un agradecimiento muy especial a alguien que ya no está con nosotros, a Sole a la cual siempre recordare como una gran compañera y amiga con la que compartí no solo gran parte de este trabajo sino que también de mi carrera de grado. Por último a otra persona muy especial, a Leticia quien es una compañera y amiga incondicional que me ayudó en innumerables tareas durante toda la tesis.

Gracias a todos mis amigos, a toda mi familia, a mis compañeros de CUDIM, en especial a Pablo que me ayudó con los RMN.

Gracias a todas las personas que supieron entender mis locuras, mis faltas a eventos sociales importantes, mis llegadas tarde, mi despiste, mi mal humor, etc, etc.

A Andrea y a Tania que estos últimos tiempos han sido un apoyo emocional muy importante.

Y por último, nuevamente a mi madre y a mi hermana, a ellas les debo ser quien soy, la fuerza para salir adelante, las ganas de vivir y de superar las adversidades..... siempre con buena cara.

“LOS QUIERO”