



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA - FACULTAD DE QUÍMICA
PEDECIBA - QUÍMICA

TESIS DE DOCTORADO EN QUÍMICA

**“DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE
COMPLEJOS DE ^{99m}Tc CONTENIENDO LIGANDOS
NITROIMIDAZÓLICOS, COMO POTENCIALES
RADIOFÁRMACOS CON SELECTIVIDAD HACIA TEJIDO
HIPÓXICO.”**

JAVIER GIGLIO BAROSSO

Directores de Tesis Dra. Ana Rey y Dr. Hugo Cerecetto

Diciembre de 2010

“A NOEL Y A POROTITO, POR TODO”

“A MI FAMILIA Y AMIGOS POR SU APOYO”

“Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia, no podrá comprender su tiranía.”

Dr. Frankenstein. Mary Shelley

INDICE

	Página
RESUMEN	8
1- Introducción	10
2 - Objetivo	37
2.1 - Objetivo general	37
2.2 - Objetivos específicos	39
<u>2.2.1 - Diseño y síntesis de ligandos nitroimidazólicos conteniendo grupos quelantes adecuados para la preparación de complejos de ^{99m}Tc.</u>	39
<u>2.2.2- Preparación de complejos de ^{99m}Tc.</u>	39
<u>2.2.3- Estudios fisicoquímicos</u>	39
<u>2.2.4- Estudios in vitro.</u>	39
<u>2.2.5- Estudios in vivo.</u>	39
3 – Esquema de ligandos sintetizados y estructuras propuestas de los complejos.	40
4 – Parte Experimental	41
4.1 – Materiales	41
4.2 - Métodos	42
<u>4.2.1 - Síntesis de ligandos.</u>	42
4.2.1.1 – Síntesis de 1-(2-Azidoetil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol (PRELIGANDO 1)	42
4.2.1.2 – Síntesis del 2-amino-3-{1-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil]-1H-triazol-4-il}propanoico (LIGANDO 1)	43
4.2.1.3 – Síntesis de ácido 2-amino-3-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etiltio]propanoico (LIGANDO 2)	44
<u>4.2.1.3.1 – Síntesis de 1-(2-iodoetil)-2-metil-5-nitro-1H-imidazol</u>	44
<u>4.2.1.3.2 – Síntesis del LIGANDO 2</u>	44
4.2.1.4 – Síntesis de la sal sódica del ácido [2-(2-metil-5-nitro-1H-	45

imidazol-1-il)etil]ditiocarbámico (LIGANDO 3)	
<u>4.2.1.4.1 – Hidrobromuro de 2-(2-metil-5-nitro-1<i>H</i>-imidazol-1-il)etilamina</u>	45
<u>4.2.1.4.2 – Síntesis del LIGANDO 3</u>	46
4.2.1.5 – Síntesis de la sal sódica del ácido 4-[2-(2-metil-5-nitro-1<i>H</i>-imidazol-1-il)etil]piperacina-1-ilmetanoditioico (LIGANDO 4)	46
<u>4.2.1.5.1 – 1-(<i>t</i>-Butiloxicarbonil)piperacina</u>	46
<u>4.2.1.5.2 – 1-(<i>t</i>-Butiloxicarbonil)-4-[2-(2-metil-5-nitro-1<i>H</i>-imidazol-1-il)etil]piperacina</u>	47
<u>4.2.1.5.3 – Síntesis del LIGANDO 4</u>	47
4.2.1.6 – Síntesis de 4-isociano-<i>N</i>-[2-(2-metil-5-nitro-1<i>H</i>-imidazol-1-il)etil]butanamida (LIGANDO 5)	48
4.2.1.7 – Síntesis de 1-(4-isocianobutanoil)-4-[2-(2-metil-5-nitro-1<i>H</i>-imidazol-1-il)etil]piperacina (LIGANDO 6)	49
<u>4.2.2 – Preparación de los complejos de ^{99m}Tc</u>	50
4.2.2.1 – Síntesis de los complejos de ^{99m}Tc(I)tricarbonílicos. Complejos con los ligandos 1 y 2	50
<u>4.2.2.1.1 – Síntesis del precursor tricarbonílico a partir de CO_g</u>	50
<u>4.2.2.1.2– Síntesis del precursor tricarbonílico a partir del Kit comercial</u>	51
<u>4.2.2.1.3– Síntesis del complejo 1</u>	51
<u>4.2.2.1.4. Síntesis del complejo 2</u>	51
4.2.2.1 – Síntesis de los complejos de ^{99m}Tc(V)nitrido. Complejos con los ligandos 3 y 4	52
<u>4.2.2.2.1 – Síntesis del precursor ^{99m}Tc(V)nitrido empleando KIT comercial</u>	52
<u>4.2.2.2.2 – Síntesis del precursor ^{99m}Tc(V)nitrido empleando dihidracida succínica.</u>	52
<u>4.2.2.2.3– Síntesis de los complejos 3 y 4</u>	53
4.2.2.3 – Síntesis de los complejos de ^{99m}Tc(III). Complejos con los ligandos 5 y 6	53
<u>4.2.2.3.1 – Síntesis del precursor ^{99m}Tc(III)-EDTA</u>	53
<u>4.2.2.3.2– Síntesis de los complejo 5 y 6</u>	54
<u>4.2.3 – Evaluación in vitro de los complejos de ^{99m}Tc</u>	54
4.2.3.1 – Lipofilicidad	54
4.2.3.2 – Estabilidad frente a plasma	55

4.2.3.3 – Determinación del porcentaje de unión a proteínas plasmáticas mediante gel filtración	55
4.2.3.4 – Determinación de la captación por células en cultivo en estado de hipoxia y de oxia	55
<u>4.2.4 – Evaluación in vivo de los complejos de ^{99m}Tc</u>	56
4.2.4.1 – Biodistribución en animales normales	56
4.2.4.2 – Biodistribución en animales portadores de tumores inducidos	57
<u>4.2.5 – Estudios estructurales de los complejos con Re estable</u>	58
4.2.5.1 – Síntesis de los complejos de Re	58
4.2.5.1.1 - <u>Síntesis de los complejos de Re(I)-tricarbonílico</u>	58
4.2.5.1.1.1 – Síntesis del [Net ₄] ₂ [Re(CO) ₃ Br ₃].	59
4.2.5.1.1.2 – Síntesis de los COMPLEJOS 1 y 2	59
4.2.5.1.2 - <u>Síntesis de los complejos de Re(V)-nitrido.</u>	60
4.2.5.1.2.1 – Síntesis del ReOCl ₃ (PPh ₃) ₂	60
4.2.5.1.2.2 – Síntesis del ReNOCl ₃ (PPh ₃) ₂	60
4.2.5.1.2.3 – Síntesis de los COMPLEJOS 3 y 4	60
4.2.5.1.3 - <u>Síntesis de los complejos de Re(III) 4+1</u>	61
4.2.5.1 – Estudios estructurales mediante espectrometría de masas	61
5 – Resultados y discusión	62
5.1 - Síntesis de los ligandos	62
<u>5.1.1 – Síntesis de 1-(2-azidoetil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol (PRELIGANDO 1).</u>	62
<u>5.1.2 – Síntesis de ácido 2-amino-3-{1-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil]-1H-triazol-4-il}propanoico (LIGANDO 1)</u>	66
<u>5.1.3 – Síntesis de ácido 2-amino-3-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etiltio]propanoico (LIGANDO 2)</u>	68
<u>5.1.4 – Síntesis de la sal sódica del ácido N-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil]ditiocarbámico (LIGANDO 3)</u>	69
<u>5.1.5 – Síntesis de la sal sódica del ácido 4-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil]piperacín-1-ilmetanoditioico (LIGANDO 4)</u>	72
<u>5.1.6 – Síntesis de 4-isociano-N-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil]butanamida (LIGANDO 5)</u>	76
<u>5.1.7 – Síntesis de 1-(4-isocianobutanoil)-4-[2-(2-metil-5-nitro-1H-</u>	78

<u>imidazol-1-il)etil]piperacina (LIGANDO 6)</u>	
5.2 – Preparación de los complejos de ^{99m}Tc	80
<u>5.2.1 – Síntesis de los complejos de ^{99m}Tc(I)tricarbonílicos. Complejos con los LIGANDOS 1 y 2</u>	80
5.2.1.1 – Síntesis del precursor tricarbonílico	80
5.2.1.2– Síntesis del COMPLEJO 1	82
5.2.1.3. - Síntesis del COMPLEJO 2	85
<u>5.2.2 – Síntesis de los complejos de ^{99m}Tc(V)nitrido. Complejos con los LIGANDOS 3 y 4</u>	86
5.2.2.1 – Síntesis del precursor ^{99m} Tc(V)nitrido	86
5.2.2.2– Síntesis de los COMPLEJOS 3 y 4	88
<u>5.2.3 – Síntesis de los complejos de ^{99m}Tc(III). Complejos con los LIGANDOS 5 y 6</u>	90
5.2.3.1 – Síntesis del precursor ^{99m} Tc(III)	91
5.2.3.2– Síntesis de los complejos 5 y 6	92
<u>5.2.4 – Estudios <i>in vitro</i> de los complejos de ^{99m}Tc</u>	95
5.2.4.1 – Lipofilicidad	95
5.2.4.2 – Estabilidad frente a plasma	97
5.2.4.3 – Unión a proteínas plasmáticas	98
5.2.4.4 – Determinación de la captación por células en estado de hipoxia	99
<u>5.2.5 – Evaluación <i>in vivo</i> de los complejos de ^{99m}Tc</u>	105
5.2.5.1 – Biodistribución en animales normales	105
5.2.5.2 – Estudio de la correlación entre parámetros fisicoquímicos y biológicos	114
5.2.5.3 – Biodistribución en animales portadores de tumores inducidos	117
5.3 – Estudios estructurales de los complejos con Re estable	123
<u>5.3.1 – COMPLEJOS 1 y 2 de Re estable</u>	125
<u>5.3.2 – COMPLEJOS 3 y 4 de Re estable</u>	129
<u>5.3.3 – COMPLEJOS 5 y 6 de Re estable</u>	132
6 – Conclusiones	134
7 – Bibliografía	137
AGRADECIMIENTOS	148

RESUMEN

Con el objetivo de desarrollar potenciales radiofármacos de ^{99m}Tc para imágenes de zonas de hipoxia, se han diseñado, sintetizado y evaluado una serie de complejos de ^{99m}Tc conteniendo ligandos nitroimidazólicos. Dicho farmacóforo en condiciones de hipoxia es capaz de sufrir una reducción irreversible, transformándose en grupos citotóxicos, que quedarían atrapados dentro de la célula.

Para la síntesis de los ligandos se seleccionó el grupo 5-nitroimidazol como farmacóforo y a partir del fármaco comercial Metronidazol[®] (1-(2-metil-5-nitroimidazol-1-il)etanol), el que se puede obtener en cantidad y calidad necesaria, se realizaron las modificaciones químicas necesarias para acoplarle las distintas unidades quelantes necesarias para coordinar el metal, así como modificar la distancia a través de una cadena espaciadora (linker).

Para unir al Tc se seleccionaron los complejos tricarbónicos de Tc(I) (COMPLEJOS 1 y 2), complejos Tc(V) nitrado (COMPLEJOS 3 y 4) y los complejos Tc(III) 4+1 (COMPLEJOS 5 y 6) a fin de poder evaluar la influencia del core empleado en las propiedades finales de los complejos obtenidos. Para ello se prepararon 6 ligandos, 2 por cada sistema de unión al metal utilizado, variando en cada caso la cadena espaciadora y la unidad quelante.

Todos los complejos son preparados por sustitución utilizando el precursor adecuado en cada caso, el cual contiene al metal en el estado de oxidación requerido que puede ser fácilmente sustituido por el ligando final.

Los estudios fisicoquímicos revelan que los complejos preparados presentan variada lipofilia, siendo los más hidrofílicos los complejos tricarbónicos de Tc(I), presentando un logP de -0.44 ± 0.04 para el COMPLEJO 1 y -0.75 ± 0.08 para el COMPLEJO 2. Los compuestos más lipofílicos fueron los complejos 4+1 de Tc(III) con logP de 0.7 ± 0.1 y 1.2 ± 0.3 para el COMPLEJO 5 y 6 respectivamente. Los complejos de Tc(V) nitrado presentan una lipofilia similar a los complejos 4+1 de Tc(III). También cabe destacar que, como era esperado, los COMPLEJOS 4 y 6 que contienen en la cadena espaciadora un anillo piperacina presentan la mayor lipofilia dentro de la serie.

Todos los complejos presentan una muy buena estabilidad en plasma, siendo la pureza radioquímica en todos los casos superior al 85% a las 4 horas de incubación a 37 °C.

La unión a proteínas determinada por exclusión molecular resultó adecuada para los complejos 1, 2, 3 y 5, estando en valores del 12 al 30 %. Los complejos que presentan el anillo piperacina (complejos 4 y 6), en cambio presentaron una elevada unión ($69\pm 3\%$ y $75\pm 4\%$ respectivamente).

Se desarrolló una metodología que permitió realizar la evaluación de los complejos en células tumorales humanas (HCT-15) en condiciones de hipoxia, obteniéndose para todos los complejos relaciones de captación entre hipoxia e oxia superiores a 1, siendo la mayor para el COMPLEJO 1 (2.2 ± 0.3).

Los estudios de biodistribución en ratones CD1 normales, realizados entre 30 min. y 4 horas post-inyección, mostraron una buena correlación con las propiedades fisicoquímicas. El complejo de mejor perfil es el COMPLEJO 1, ya que presenta una baja actividad sanguínea, rápida depuración de tejidos blandos y eliminación combinada por vía urinaria y hepatobiliar ($64.86\pm 4.95\%$ y $46.86\pm 2.39\%$ respectivamente a las 4 horas). Los complejos 4 y 6 (como era de esperar) mostraron una muy alta captación en hígado (54-55% a las 4h) y una muy baja eliminación (10-12 % a las 4h).

La captación en tumor evaluada en animales portadores de sarcoma de Lewis murino (células 3LL), demostró la captación y retención de los complejos en el tumor. Todos los complejos presentan una relación de % Dosis/g en Tumor/Músculo mayor a 1 a las 4 h post inyección debido a la retención de la actividad en el tumor y a la depuración de los demás tejidos. La mayor relación la presentó el COMPLEJO 1 con un valor de 4.22 ± 0.07 a las 4 h.

Los estudios estructurales empleando Re estable indicarían que es correcta la estructura propuesta para los complejos 5 y 6, siendo necesarios más estudios a fin de poder confirmar o descartar la estructura propuesta en los otros casos.

Se pudieron realizar en la tesis todas las etapas involucradas en el desarrollo de un nuevo radiofármaco, desde la selección del farmacóforo, síntesis orgánica, marcación, estudios fisicoquímicos hasta la evaluación biológica.

1- Introducción

La hipoxia se produce cuando la demanda metabólica de oxígeno de un determinado tejido supera a la cantidad aportada por la sangre. Esto ocurre como consecuencia de condiciones patológicas que disminuyen el flujo sanguíneo en la zona. La presión parcial de oxígeno en un tejido normal está situada alrededor de 70-80 mmHg para los riñones y 20 mmHg para el cerebro. Hay variaciones normales de la presión parcial de O₂, pero si ésta llega a alrededor de 5 mm Hg se considera que el tejido es hipóxico. (1)

En los tejidos hipóxicos ocurren cambios metabólicos, decrece la fosforilación oxidativa y aumenta la glicólisis como forma de obtención de energía; asimismo, a causa del aumento de la glicólisis también se producen cambios en el pH intracelular. El principal regulador del pH intracelular es la concentración de CO₂, lo cual se debe a que en un tejido normal al aumentar la concentración de CO₂ se produce una acidosis que provoca una vasodilatación, difundiendo el CO₂ difunde y restableciéndose el pH normal. Un tejido en condiciones de hipoxia presenta un flujo de sangre disminuido y no uniforme, por lo que las células presentarán un variado rango de pH debido a los ácidos formados en la glicólisis y a la modificación en la difusión del CO₂, los cuales varían dependiendo del flujo de la zona. (2)

En los tumores, un aumento de la masa celular requiere suministros adicionales de oxígeno para mantener las células vivas. Para satisfacer esta demanda se producen una serie de factores que estimulan el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en la lesión. A menudo, sin embargo, la mayor demanda de oxígeno supera el suministro, lo que hace que una parte de la masa tumoral quede en estado hipóxico. (3,4)

Las investigaciones clínicas llevadas a cabo durante las últimas décadas han demostrado que la prevalencia de zonas de tejido hipóxico [es decir, áreas con tensiones de O₂ ($pO_2 \leq 2.5$ mmHg)] es una propiedad característica de los tumores sólidos localmente avanzados. Estas zonas se han encontrado en una amplia gama de tumores malignos: cáncer de mama, cuello de útero, próstata, recto, páncreas, pulmón, tumores cerebrales, sarcomas de tejido blando, linfomas no-Hodgkin, melanomas malignos, tumores metastásicos del hígado,

cáncer de células renales, etc. (5,6,7,8,9) La evidencia acumulada muestra que hasta un 50-60% de tumores sólidos localmente avanzados pueden presentar hipoxia y / o zonas anóxicas.

La hipoxia dentro de un tumor se puede deber principalmente a dos efectos, el primero es el deterioro en la difusión del oxígeno por cambios en la permeabilidad de la membrana celular o en la permeabilidad de los vasos, la segunda causa es un aumento de la distancia de difusión. Distancias mayores a 70 micras del vaso sanguíneo reciben menos nutrientes y oxígeno sin la necesidad de que haya alteraciones en la membrana. (10)

Las células expuestas a un estado de hipoxia responden alterando su metabolismo a fin de poder adaptarse a las nuevas condiciones. La hipoxia puede alterar o incluso inhibir completamente el ciclo de proliferación celular.

En los mamíferos superiores, la respuesta a la hipoxia es compleja. Estas respuestas se manifiestan en cambios de mediadores y de actividad enzimática e implican variaciones en la expresión de una serie de genes. La regulación transcripcional de estos genes en condiciones de hipoxia está mediada por la unión de un factor de transcripción específico. (1) Este factor de transcripción específico es el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1). El HIF-1 es un heterodímero compuesto por dos sub-unidades (HIF-1 α y HIF-1 β) con pesos moleculares aparentes de 120-130 kD y 91-94 kD, respectivamente. El extremo COOH-terminal de la sub-unidad α contiene dos dominios de transactivación (responsable de la acción) y un dominio de degradación dependiente de oxígeno (actúa como sensor). Estos factores de transcripción se están formando continuamente, pero en presencia de oxígeno, la subunidad α del HIF-1 (HIF-1 α) sufre una modificación mediada por hidroxilasas, que provocan una cascada de acontecimientos que finaliza con la degradación del mismo por el proteosoma, constituyendo el punto central del mecanismo sensor. (11,12,13) Por el contrario, en ausencia de oxígeno el HIF-1 α es fosforilado y translocado al núcleo, donde dimeriza con HIF-1 β y se acopla a un co-activador, permitiendo la activación e inducción de genes, como se muestra en la Figura 1.

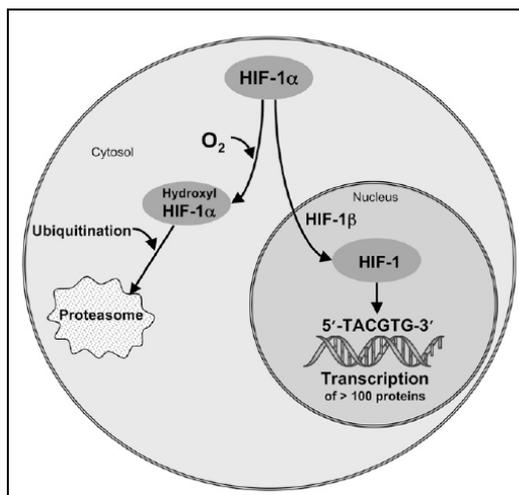


Figura 1 – Esquema de degradación y activación del HIF-1 (Esquema extraído de “The journal of Nuclear Medicine, vol. 49, N°6 (Suppl), Junio 2008.)

Estos genes activados regulan la síntesis de una amplia serie de proteínas, que abarcan desde enzimas respiratorias y transportadores hasta hormonas involucradas en la regulación de la circulación y la eritropoyesis. El papel del HIF-1 no se restringe a la mera inducción de una respuesta adaptativa a la falta de oxígeno, sino que participa significativamente en los mecanismos de reparación celular. Una simple lista de algunas alteraciones de importancia fisiopatológica, tanto estimuladoras como inhibitorias, que involucran al sistema de HIF-1, incluiría: enfermedad pulmonar crónica, adaptación al humo de tabaco, anemia, hemorragia, isquemia/reperfusión, crecimiento, vascularización y resistencia celular de los tumores, preeclampsia y crecimiento intrauterino retardado, hiper o hipovascularización retiniana, sobredosis de fármacos, enfermedad inflamatoria intestinal y curación de heridas. (14)

Además, la hipoxia puede inducir la muerte celular programada (apoptosis) en condiciones normales y en células neoplásicas. El factor p53 se acumula en condiciones de hipoxia a través del mecanismo dependiente del HIF-1 e induce la apoptosis. Sin embargo, la hipoxia también puede iniciar vías apoptóticas independientes del HIF-1.

A menudo, los tumores se vuelven más malignos con el tiempo, en un proceso denominado "la progresión del tumor." Los datos sugieren que la hipoxia y el sistema de HIF están intensamente involucrados en los procesos

de conferir una ventaja de crecimiento a las células tumorales y en el desarrollo de un fenotipo más maligno. Esto es debido a que además de promover la muerte programada, la hipoxia en los tumores puede inducir cambios que permitan a las células superar la privación nutritiva, lo que les permite escapar del ambiente hostil y favorecer el crecimiento sin restricciones. (15,16,17,18, 19,20,21)

La resistencia adquirida al tratamiento debido a la hipoxia del tumor es clásicamente asociado con la resistencia a la radioterapia, ya que la menor presión parcial de oxígeno provoca que se formen menos cantidad de radicales libres del oxígeno, los que son los causantes de la muerte celular. También se ha demostrado que en condiciones de hipoxia disminuye la eficacia de la quimioterapia y de la inmunoterapia. Esto no es solamente debido a los problemas de difusión de estas drogas desde los vasos a causa de la menor irrigación como se pensaba en un principio, sino también es debida a los cambios en el fenotipo celular a causa de la activación de genes. (22,23)

En 1955, Nakamura y Urezwana descubrieron que un nitroimidazol (Azomycin®) era activo frente a las infecciones asociadas con condiciones anaeróbicas. A lo largo de 55 años se han desarrollado muchos análogos nitroimidazólicos como metronidazol, tinidazol, nimorazole y ornidazole que son eficaces contra las bacterias y protozoos que prosperan en un ambiente hipóxico. Este comportamiento particular de los nitroimidazoles en un medio ambiente con poco oxígeno ha dado lugar a investigaciones de utilidad como sensibilizadores del tejido hipóxico, de forma de aumentar la respuesta de estos tejidos a la radiación o a la terapia química. (24,25)

Los nitroimidazoles actúan reduciéndose intracelularmente en todas las células, pero en aquellas que presenta condiciones de hipoxia forman productos reactivos que se unen a los componentes de la célula o quedan retenidos debidos a los cambios de pH que ocurren en el medio intercelular. La formación de estos productos se inicia por una reducción mediada por un solo electrón, que provoca la reducción del grupo nitro a un radical libre que es un anión a un pH neutro. La vía de la reducción puede proceder por etapas sucesivas más allá de la hidroxilamina para terminar en la amina derivada como se muestra en el siguiente esquema:



Figura 2 - Esquema de reducción del grupo nitro a amina

Como ya se mencionó, el amino derivado quedaría retenido por unión covalente con las macromoléculas (enzimas, proteínas, etc) o por formación de estructuras polares, ya que al formar un compuesto cargado no puede volver a atravesar la membrana. (26)

El nitroimidazol entra en las células por difusión pasiva, por lo tanto la lipofilia de la molécula es uno de los factores determinantes de su penetración en el medio intracelular. Luego de la penetración, la enzima responsable de la primera reducción en las bacterias es en general el complejo piruvato ferredoxina oxidoreductasa presente en todos los organismos anaerobios, cuyo esquema se muestra en la Figura 3.

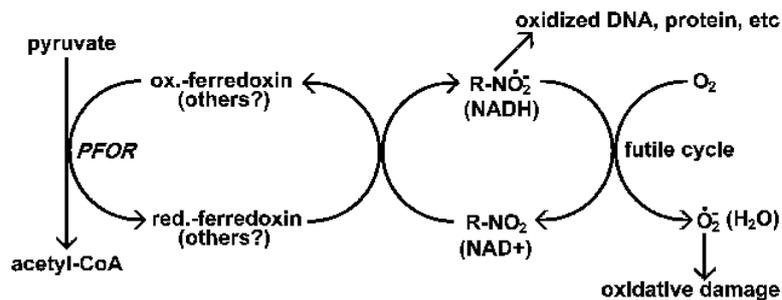


Figura 3: Enzimas responsables de la reducción de los nitroimidazoles en las bacterias. (Tulane University, <http://tulane.edu>)

Una enzima específica responsable de esta reducción no ha sido identificada hasta el momento en células de mamífero, pero varias enzimas pueden ser capaces de esta reducción. Una de ellas es la xantina oxidasa, la que se encuentra en muchas células de mamíferos y es la que se emplea más a menudo como un sistema de prueba en estudios de laboratorio. (27,28)

La reducción inicial del grupo nitro al anión radical libre es una reacción reversible. Esto es debido a que el oxígeno intracelular (potencial de reducción -155 mV) tiene una mayor afinidad electrónica por el grupo nitro y provoca su reoxidación. De esta manera, el primer paso en la reducción es el que le da a

estas moléculas su sensibilidad frente al oxígeno, debido a que en condiciones de oxia el nitroimidazol se reduce, pero casi instantáneamente ocurre la reoxidación no habiendo tiempo para que actúen las siguientes enzimas reductoras sobre el metabolito reducido. En cambio, al no haber oxígeno no ocurre la reoxidación, pudiendo el grupo nitro continuar su reducción hasta amina. De esta forma, los siguientes pasos son los que producen la retención de este tipo de moléculas en el tejido hipóxico. (29)

A modo de resumen, la reducción ocurre en todos los tejidos con procesos enzimáticos viables, pero la retención sólo se produciría en aquellos tejidos con baja tensión de oxígeno. Esto se debe a que la reoxidación del compuesto original no ocurre, lo que permite que puedan tener lugar las subsiguientes reacciones de reducción. Este proceso se muestra en el siguiente esquema.

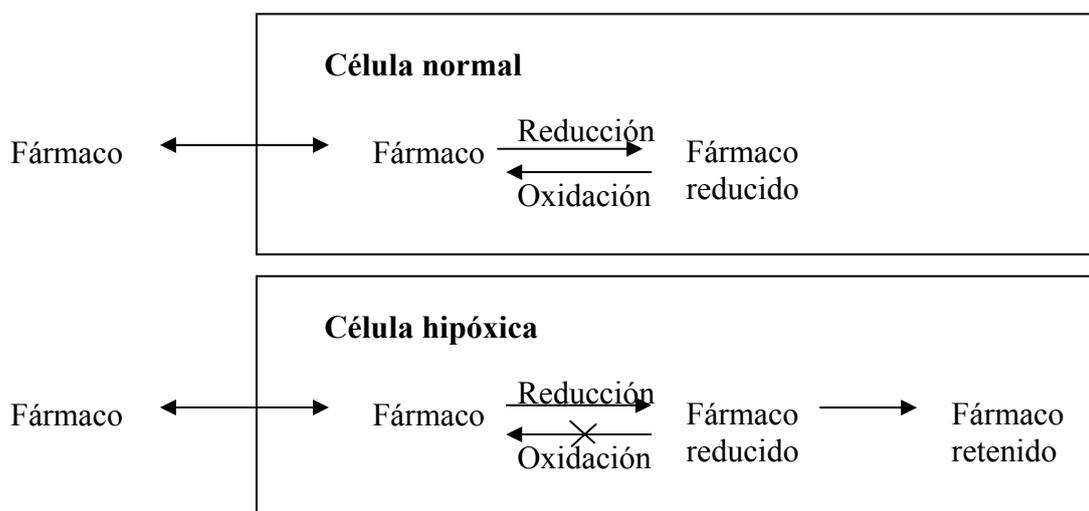


Figura 4 - Esquema de Retención en células hipóxicas. (30)

Los nitroimidazoles como el metronidazol, mizonidazol y otros han sido muy estudiados como radiosensibilizadores. Un radiosensibilizador según el National Cancer Institute de EEUU es un “Medicamento que hace que las células tumorales se vuelvan más sensibles a la radioterapia.”. Los radiosensibilizadores son moléculas que se acumulan en el tejido hipóxico y aprovechan su característica de citotoxicidad para aumentar la sensibilidad a la radiación de los tumores cancerígenos. Las estructuras de este tipo de compuestos se muestran en la siguiente figura. (31)

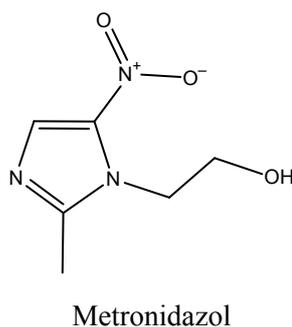
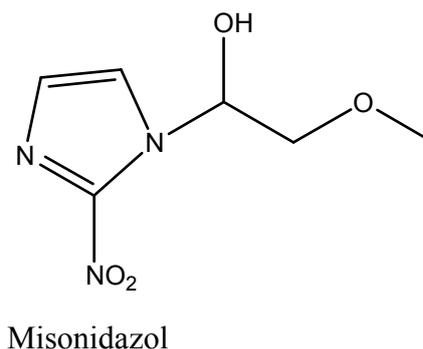
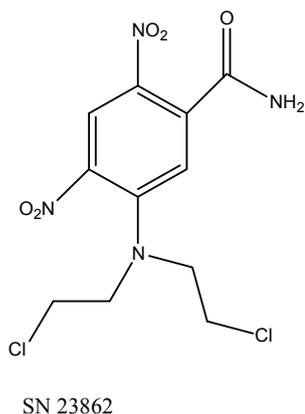


Figura 5 - Estructura de compuestos empleados como radiosensibilizadores

Para el diagnóstico de las condiciones de hipoxia se pueden emplear técnicas directas e indirectas. Para evaluar correctamente el tejido es necesario poder contar con un método para determinar directamente la pO_2 dentro del tejido. Como esto no es posible actualmente, es necesario emplear algún tipo de marcador. Un indicador indirecto que podría ser utilizado para estimar los niveles de oxígeno en un determinado tejido es la acidosis (debido a los cambios de pH que ocurren dentro de la célula hipóxica), pero este marcador no es adecuado porque hay varias causas que pueden llevar a la misma. Otra alternativa es emplear un marcador directo de disminución intracelular pO_2 , como un marcador de hipoxia. (27,33)

Una posibilidad es utilizar compuestos biorreducibles unidos a un átomo radiactivo para permitir la visualización del tejido hipóxico "in vivo". El empleo de marcadores radiactivos en seres humanos forma parte de la rama de la medicina conocida como Medicina Nuclear.

La Medicina Nuclear es la rama de la Medicina que emplea compuestos radiactivos para fines de diagnóstico o terapia. Para diagnóstico se emplean radionucleidos emisores γ , cuya radiación de alto poder de penetración es detectada externamente, mientras que 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. (34)

La Medicina Nuclear diagnóstica permite diferenciar una anatomía, fisiología o bioquímica anormal de la normal basándose en el patrón de distribución en el organismo de trazadores radiactivos, los radiofármacos.

Un radiofármaco es una sustancia química definida, que contiene átomos radiactivos en su estructura, siendo aptos para ser administrados en seres humanos con fines de diagnóstico o terapia. (32)

“Los radiofármacos de diagnóstico, son considerados trazadores radiactivos que son administrados con el fin de visualizar la anatomía de un órgano o sistema, evaluar el comportamiento fisiopatológico a nivel de los tejidos, analizar a través de su metabolismo el comportamiento bioquímico o determinar cuantitativamente sus parámetros farmacocinéticos, comparando estos resultados con los obtenidos de una población de seres humanos normales voluntarios.” (35)

El término radiofármaco a diferencia del de fármaco, no implica la existencia de un efecto farmacológico en el sentido estricto de la palabra. Se utilizan simplemente como trazadores radiactivos para seguir procesos in vivo. A pesar de esto, la O.M.S. los incluye dentro de la categoría de fármacos y por lo tanto están incluidos en las farmacopeas oficiales. (36)

La principal ventaja de la Medicina Nuclear frente a otras modalidades de obtención de imágenes, como la Tomografía Computada o la Resonancia Magnética Nuclear, es la posibilidad de estudiar la funcionalidad de los órganos y no solamente su anatomía, ya que el mecanismo de captación y retención de la mayoría de los radiofármacos depende de dicha funcionalidad.

Un estudio básico de Medicina Nuclear consiste en la administración de un radiofármaco en forma intravenosa (es la vía de administración más empleada, aunque no la única), luego dejar transcurrir un tiempo apropiado para que dicho radiofármaco se distribuya en el organismo y se concentre en el blanco de

interés para posteriormente realizar la adquisición de la imagen mediante un detector externo. Este procedimiento se esquematiza en la siguiente figura.

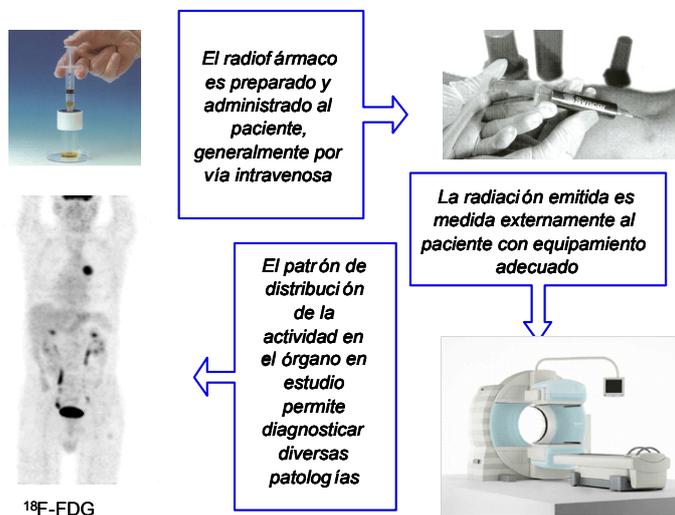


Figura 6 – Obtención de imágenes en Medicina Nuclear

El $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es el radionucleído más utilizado en la preparación de radiofármacos de diagnóstico debido a sus propiedades nucleares ideales para la obtención de imágenes: (37,38,38,40)

- emisión γ pura, con alto rendimiento de fotones
- energía de 140 KeV
- $t_{1/2}$ de 6 horas

A las propiedades nucleares favorables se debe agregar la fácil disponibilidad a partir de generadores $^{99}\text{Mo} / ^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Desde el punto de vista químico, el tecnecio es un metal de transición cuya configuración electrónica del átomo neutro es $(\text{Kr})4d^65s^1$, el cual puede presentar estados de oxidación entre -1 y +7. Las formas reducidas del Tc presentan niveles d incompletos y forman fácilmente complejos de coordinación, en los que el metal deficiente en electrones se enlaza a átomos o grupos de átomos capaces de donar electrones. Su combinación con las moléculas de interés (marcación) implica generalmente la formación de un compuesto de coordinación. Por este motivo, la marcación con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ de moléculas biológicamente activas enfrenta una dificultad intrínseca, ya que es

necesario desarrollar métodos que permitan la unión de este metal no fisiológico al ligando de interés sin que la coordinación del Tc altere la actividad biológica. El método más comúnmente empleado, es el llamado “pendant approach” el cual se muestra en la Figura 7. 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. Esta unidad quelante se separa de la parte activa de la biomolécula mediante una cadena o espaciador cuya longitud debe optimizarse para asegurar que la actividad biológica se mantenga, o sea que la unidad quelante no interfiera en el reconocimiento. (41,42)

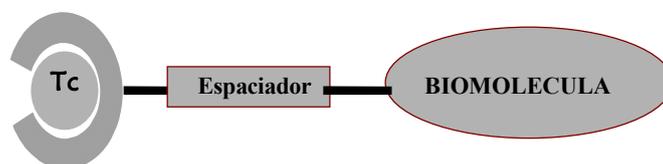


Figura 7 – Concepto “pendant approach”

Existen varios ejemplos de aplicación exitosa de este concepto de marcación, fundamentalmente en el caso de biomoléculas grandes, de tipo proteico.

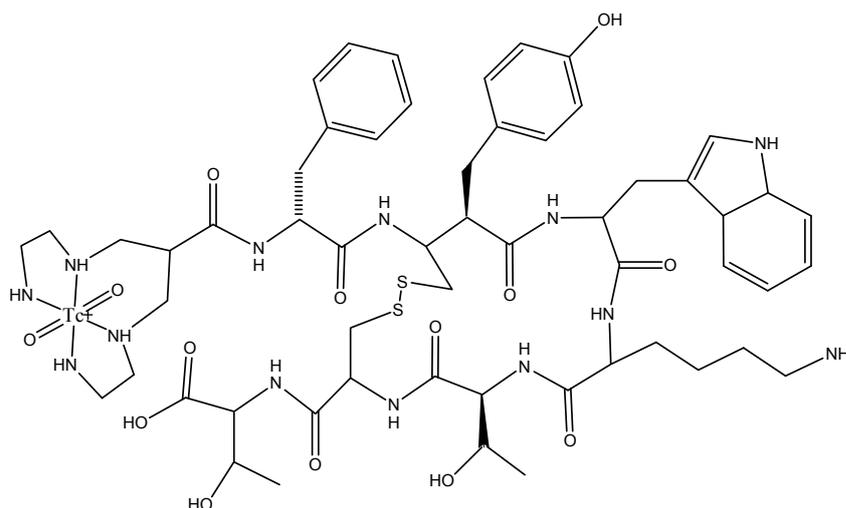


Figura 8 – Ejemplo de aplicación del concepto “pendant approach” sobre un péptido - ^{99m}Tc-OCTREOSCAN (43)

Para la radiofarmacia los estados de oxidación más relevantes son el +7, +5, +4, +3 y +1. El estado de oxidación +7 esta representado por el ión TcO_4^- , forma química obtenida de los generadores y material de partida para la síntesis de los radiofármacos. (44)

El primer paso en la obtención de los complejos es la reducción del Tc (+7), la misma puede realizarse a través de reductores químicos o por electrólisis. Los reductores más empleados son el cloruro de estaño II ($SnCl_2$) y el borohidruro de sodio ($NaBH_4$), entre otros. (45,46)

El estado de oxidación final alcanzado por el centro metálico depende de varios factores como pH, temperatura, naturaleza del reductor, ligando, etc.

Sin lugar a dudas el factor de mayor influencia en el estado de oxidación final del centro metálico es el ligando (los grupos donores presentes en la molécula que actúa como ligando). En estados de oxidación altos (como por ejemplo el V), la alta carga del centro metálico lo convierte en un ácido duro (según definición de Pearson), consecuentemente, la estabilidad se logrará al interactuar con bases duras como grupos oxo, nitruro o nitreno. De esta manera se forman los “cores” di y mono oxo, los cuales presentan una elevada estabilidad, dejando 4 posiciones libres para la coordinación de los ligandos. Numerosos radiofármacos utilizados actualmente en clínica emplean al Tc en estado de oxidación +5, como el ^{99m}Tc -HMPAO, radiofármaco de perfusión cerebral mostrado en la siguiente figura. (47)

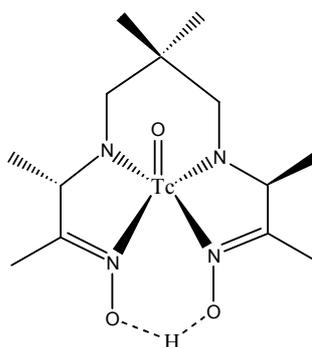


Figura 9 – $^{99m}Tc(V)$ -HMPAO (HMPAO= Hexametilpropilenamina oxima)

Estados de oxidación más bajos, por ejemplo el I, son estabilizados por ligandos con capacidad π aceptora en la esfera de coordinación, como los

carbonilos, fosfinas, isonitrilos, etc. Un ejemplo de un radiofármaco empleando en clínica que emplea al Tc en estado de oxidación +1 lo constituye el ^{99m}Tc -Sestamibi utilizado para imágenes de perfusión miocárdica, en el cual el centro metálico está coordinado con 6 moléculas del ligando 2-metoxi-isobutilisonitrilo (MIBI), el cual se muestra en la Figura 10. (48)

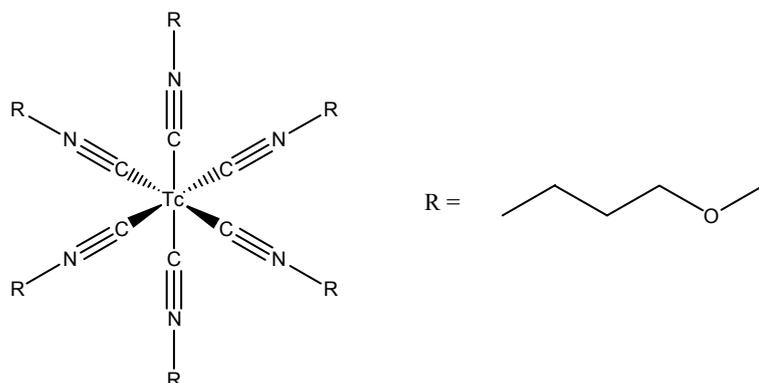


Figura 10 - ^{99m}Tc -MIBI

Existen diferentes tipos de radiofármacos para el diagnóstico de diferentes patologías. Para la realización de imágenes “in vivo” en hipoxia se requiere que el marcador se localice en zonas de bajo flujo, en la cantidad suficiente para permitir la detección en un intervalo de tiempo aceptable, y además debe proporcionar suficiente contraste entre el tejido normal y el tejido blanco a fin de permitir la detección de las disminuciones sutiles de oxígeno en los tejidos. La sensibilidad de las imágenes de hipoxia (al igual que en todos los radiofármacos) esta determinada principalmente por cuatro etapas:

- La cantidad de radiofármaco entregado al sitio de hipoxia.
- La fracción que pasa de la reacción inicial reversible (cantidad retenida).
- La rapidez de la depuración de la radiactividad de los tejidos normóxicos (contraste).
- La duración de la retención en las células hipóxicas (a fin de poder registrar imágenes de alta calidad).

En la literatura existen ejemplos de varios derivados derivados de compuestos radiosensibilizadores que se han empleado con diferente éxito en el intento de conseguir un radiofármaco adecuado para la localización de las

zonas hipoxicas. Los primeros en describir un posible radiofármaco para hipoxia marcado con ^{99m}Tc fue el grupo de Linder et al., en 1993, que trabajó con nitroimidazoles unidos al tecnecio en estado de oxidación 5. Entre ellos este grupo preparó el primer complejo de ^{99m}Tc que presentó captación dependiente del oxígeno y retención selectiva en tejidos hipóxicos vivos. Este complejo es el BMS-181321 y su estructura se muestra a continuación. El farmacóforo empleado es el 2-nitroimidazol y el sistema quelante es del tipo N_4 , el cual forma complejos con el Tc en estado de oxidación 5. (26)

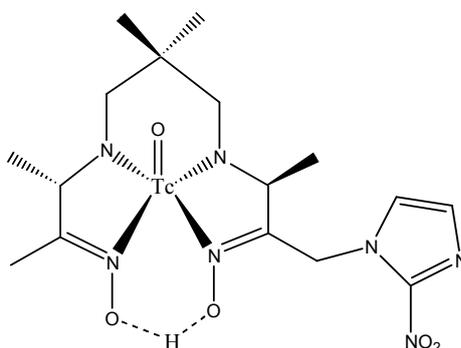


Figura 11 - BMS-181321

Bajo condiciones de hipoxia el BMS-181321 se metaboliza formando especies polares. Algunos de los metabolitos producidos presentan la capacidad de unión a las proteínas intracelulares, lo que corresponde con los postulados sobre el mecanismo de captura de los nitroimidazoles. Sin embargo, la mayoría de los metabolitos que resultaron ser productos hidrofílicos de bajo peso molecular se retienen solamente por no poder atravesar nuevamente la membrana, lo que corresponde con el otro mecanismo postulado para la retención de este tipo de compuestos. Este complejo si bien presentó una captación selectiva en tejido hipóxico resultó muy lipofílico, con una alta captación en sangre, hígado y eliminación gastrointestinal, que lo hacía inadecuado para imágenes de tumores abdominales. El mismo grupo posteriormente desarrolló una segunda generación de radiofármacos tratando de aumentar el clearance sin perder captación. El complejo obtenido fue el BRU 59-21, derivado del anterior en el que se emplea el mismo sistema quelante y el mismo farmacóforo. (49)

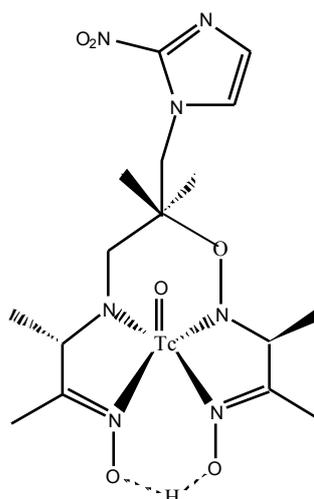


Figura 12 - ^{99m}Tc -BRU59-21

Este complejo presentó un comportamiento similar al anterior, como era de esperar, debido a que solo presenta dos cambios: la posición de unión del nitroimidazol al ligando y la inclusión de un puente eter. Si bien estos complejos presentaron una captación selectiva en hipoxia, la misma no resultó muy elevada.

También se han empleado nitro-triazoles en el desarrollo de radiofármacos para hipoxia. Un ejemplo de este tipo de estructuras es el empleo de una estructura derivada del radiosensibilizador AK 2123 unida a una unidad quelante "Cyclam" para dar el ligando 4AK 2123, el cual se muestra en la Figura 13. (50)

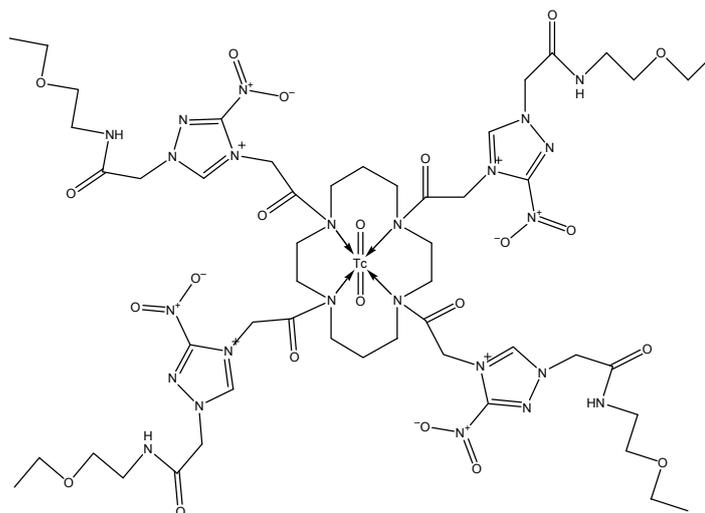


Figura 13 – ^{99m}Tc -Cyclam-AK2123

El complejo resultante de ^{99m}Tc , presentó carga positiva y un coeficiente de reparto de 0.1. Este complejo muestra una eliminación renal elevada y la relación tumor/músculo presentó valores altos: 8.5 a las 5 horas después de la inyección en ratas portadoras de tumores de mama. Si bien estos resultados son muy buenos, pareciendo salvar las dificultades obtenidas con los complejos anteriores, presentó el problema de una muy baja captación en los tumores debido a que no penetra en la concentración adecuada en las células blanco, imposibilitando su empleo en imágenes.

Un agente óptimo de localización de tejido hipóxico debería dar una relación tumor/blanco > 3 , pero además debe proporcionar suficiente captación como para permitir imágenes de alta calidad, así como una rápida depuración en un corto período de tiempo (a una dosis aceptable para el paciente).

Como se puede apreciar, la marcación en todos los ejemplos antes citados se realiza a través de unidades quelantes tetradentadas unidas, ya sea al core $[\text{Tc}(\text{V})\text{O}]^{+3}$ o al $[\text{Tc}(\text{V})\text{O}_2]^+$. Este tipo de complejos han presentado, en muchos casos, serios problemas de inestabilidad “in vivo”, derivados fundamentalmente de la alta reactividad del grupo oxo. Se ha observado también un comportamiento biológico del complejo diferente del esperado y a menudo impredecible. Las mayores dificultades encontradas se relacionan con escasa penetración de membranas biológicas, falta de captación específica y ausencia de depuración de los sitios no blanco. La respuesta de la comunidad científica

a estos fracasos iniciales fue el desarrollo y aplicación de nuevos “cores” para el Tc que multiplicaron las posibilidades para la marcación de biomoléculas pequeñas.

Dentro de las posibles estrategias de marcación, las que han tenido más relevancia en los últimos años han sido la formación de nitrurocomplejos de Tc(V), complejos de Tc(III) y complejos Tc(I) tricarbónicos.

Los nitruro complejos de Tc(V) fueron desarrollados en primera instancia por Baldas et al. (51) Estos complejos poseen un nitrógeno unido por triple enlace al centro metálico y dejan 4 posiciones de coordinación libres. Cuando las 4 posiciones libres de coordinación son ocupadas por dos ligandos bidentados iguales, como un ditiocarbamato o fosfo-tioles, formando una estructura de pirámide de base cuadrada o bipiramide trigonal (como las mostradas en la Figura 14 se dice que se está frente a complejos simétricos.

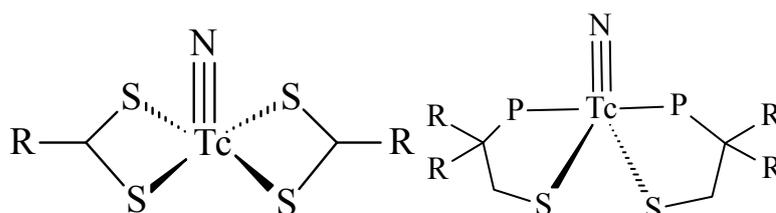


Figura 14 - Posibles estructuras de complejos simétricos de ^{99m}Tc -nitrido

Un ejemplo del empleo de esta estrategia de marcación aplicada a la síntesis de un radiofármaco se muestra en la siguiente figura. En ella se muestra un complejo simétrico con el core nitrido, en el que se emplean dos ligandos bidentados del tipo ditiocarbamato para formar el complejo simétrico.

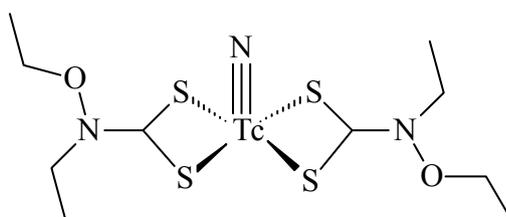


Figura 15 – ^{99m}Tc -N-(NOEt)₂ (52)

Existe también la posibilidad de utilizar 2 ligandos distintos y formar complejos mixtos asimétricos. En este caso se emplea una difosfina (tipo PNP) como ligando tridentado más otro ligando adecuado, como por ejemplo un ditiocarbamato o un aminotiol, cuya estructura se muestra en la siguiente figura.

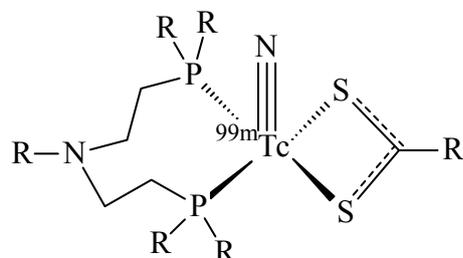


Figura 16 – Complejo asimétrico de ^{99m}Tc -nitrido

A modo de ejemplo de éste tipo de estructuras se muestra en la Figura 17, un complejo preparado por A. Duatti et al., como radiofármaco para el diagnóstico del sistema nervioso central. (53, 54)

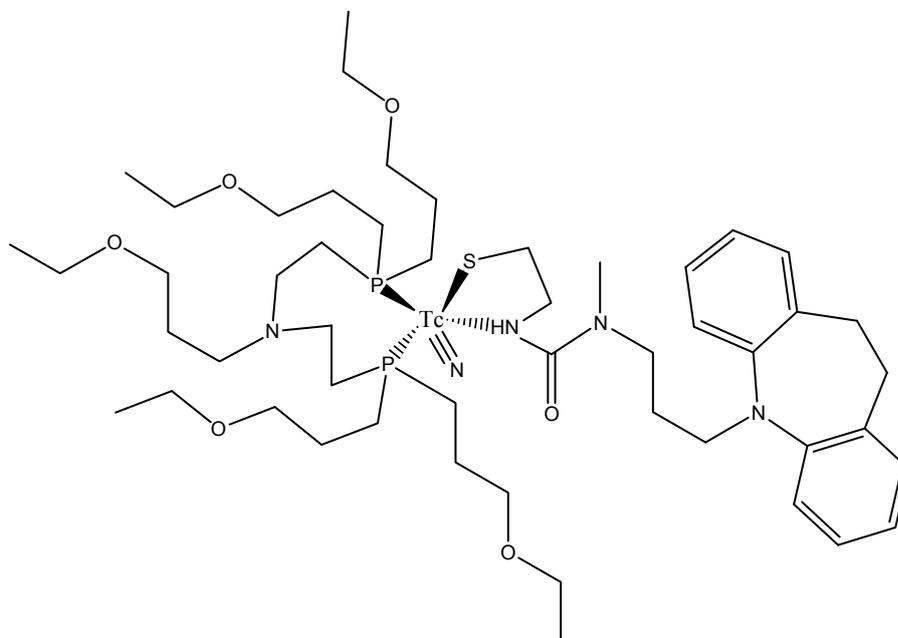


Figura 17 – Complejo mixto asimétrico conteniendo el corenitrido(55)

Recientemente también se ha reportado la síntesis de complejos 3+1 con el core nitrído, los cuales emplean un ligando tridentado del tipo SNS y un ligando monodentado aceptor π , como un isonitrilo o una fosfina. La ventaja de estos últimos radica en la posibilidad de utilizar como coligandos monofosfinas disponibles comercialmente, ya que las mencionadas anteriormente requieren una compleja síntesis y presentan una elevada inestabilidad. Un ejemplo de este tipo de complejos se muestra en la Figura 18.

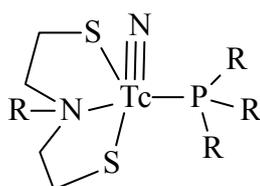


Figura 18 – Complejo 3+1 de Tc(V) nitrído

En la práctica los nitrído complejos puede ser obtenidos en dos pasos. El primero consiste en la reducción del Tc(VII) empleando SnCl_2 en presencia de dihidracida succínica (SDH), que actúa como donador del átomo de N para formar el intermediario con el core requerido. El segundo paso consiste en la sustitución del core por el o los ligandos finales.

Otro de los sistemas muy estudiados en los últimos tiempos son los complejos de Tc(III). El estado de oxidación +3 es estabilizado por la inclusión de aceptores π en la esfera de coordinación del metal como fosfinas, tioles, aminas, isonitrilos, etc. (bases blandas). (50) En este estado de oxidación las estructuras formadas son penta o hexacoordinadas, dependiendo de los ligandos empleados. (56)

Los complejos de Tc (III) no contienen grupos oxo o nitrído en su estructura, lo que confiere una menor polaridad a la molécula final. En estos complejos, el centro metálico quedaría más protegido por los grupos donores sufriendo una menor sustitución in vivo y por lo tanto presentando en teoría una mayor estabilidad. (57)

Dentro de los complejos de Tc(III) se ha explorado el concepto de complejos mixtos 3+1+1 o 3+2 cuyos estructuras se muestran en la siguiente figura.

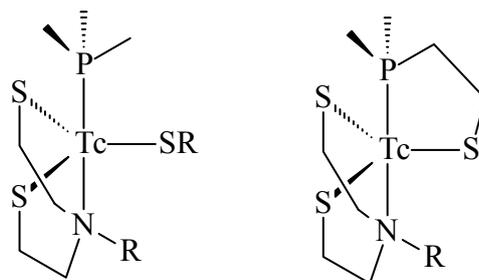


Figura 19 – complejos de Tc (III) 3+1+1 y 3+2

Los primeros complejos mixtos de Tc(III) que se estudiaron fueron los 3+1+1. Estos están formados por un ligando tridentado del tipo NS_2 (coordina por un nitrógeno alifático y dos tioles), una fosfina monodentada y un tiol monodentado. Si bien en la teoría la idea es muy buena, desde la posibilidad de acoplar la biomolécula a uno de los ligandos monodentados y emplear el otro para modificar las propiedades fisicoquímicas del complejo final, éstos resultaron inestables in vivo debido a la presencia de dos ligandos monodentados. La solución planteada a este problema entonces fue pasar al empleo de los complejos 3+2. La estructura formada en este caso resultó más estable, pero dificultades aparecieron al momento de realizar la funcionalización de los ligandos polidentados, lo que resultaba bastante difícil de realizar en el laboratorio. Por este motivo recientemente ha cobrado gran importancia la alternativa de emplear complejos 4+1, con el fin de darle estabilidad a la molécula por el efecto quelato del ligando tetradentado y la posibilidad de funcionalizar la biomolécula a través del ligando monodentado. Este tipo de complejos se forma por combinación del ligando tetradentado 2,2',2'' nitrilotris-etanotiol junto con un isonitrilo o fosfina monodentada, y se caracterizan por ser no polares y sumamente estables frente a la transquelación "in vivo". Es destacable también que la disposición espacial de ligando y coligando es tal que actúa como blindaje estérico para el metal, evitando su interferencia en las propiedades biológicas del ligando (58,59,60,61) como se muestra en la Figura 20.

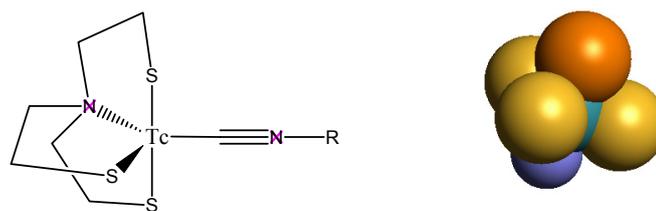


Figura 20 – Estructura de los complejos 4+1 de Tc(III)

Existen numerosos estudios de utilización de ésta estrategia de marcación para la unión de biomoléculas. Estos complejos debido a las características de los ligandos empleados por lo general presentan una elevada lipofilidad, la cual puede ser modificada, por ejemplo con la adición de grupos carbonilos en el ligando tetradentado, como se muestra en la siguiente figura. (62)

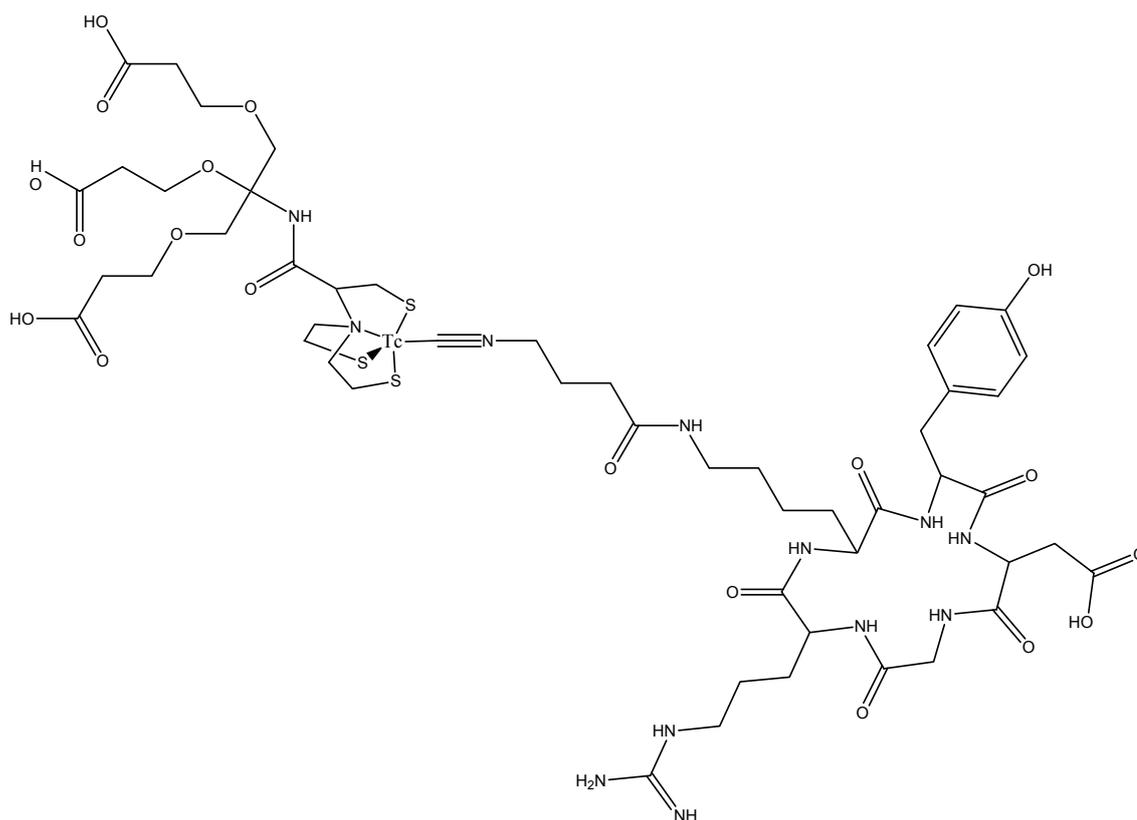


Figura 21 – Complejo de $^{99m}\text{Tc(III)}$ 4+1 conteniendo un péptido RGD en el cual se funcionalizó al ligando tetradentado con grupos carboxilos a fin de disminuir la lipofilidad del complejo.(63)

El otro core de gran importancia en la actualidad es sin lugar a dudas el tricarbónico, propuesto por Alberto et al. Con este tipo de core se logra la síntesis a baja presión del complejo tricarbónico de Tc(I) [*fac*-^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺, el que puede ser usado como precursor para obtener una gran variedad de potenciales radiofármacos. (64,65,66) Se trata de un complejo en el cuál tres de las posiciones de coordinación son ocupadas por moléculas de CO fuertemente unidas al metal como se muestra en la Figura 22.

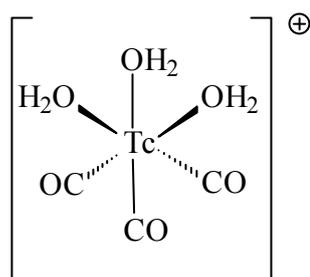


Figura 22 – Acuo complejo tricarbónico

El intenso campo de los ligandos provoca que el valor de desdoblamiento del campo cristalino sea mayor que la energía de apareamiento de los electrones, resultando en complejos de bajo spin. La configuración electrónica d⁶ de bajo spin del metal, provoca la estabilización del estado de oxidación +1 y evita que éste pueda sufrir nuevas reacciones de óxido-reducción. El resto de las posiciones de coordinación disponibles están ocupadas por tres moléculas de agua débilmente unidas, las cuales pueden ser reemplazadas por ligandos que posean una combinación de átomos donores con alta afinidad por el metal. Existe una gama amplia de posibilidades, desde grupos duros e hidrofílicos basados en ácidos carboxílicos y aminas alifáticas, hasta otros blandos y lipofílicos, preferentemente aminas aromáticas. En la Figura 23 se muestran ejemplos de posibles ligandos para complejos tricarbónicos. (67)

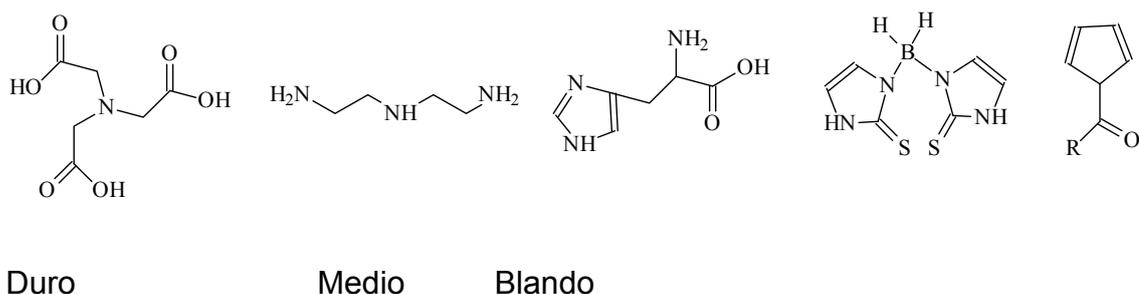


Figura 23 -Algunos tipos de ligandos empleados en complejos tricarbonilos

Hoy en día en la literatura existen numerosas aplicaciones propuestas de este core para la marcación de diferentes farmacóforos como nucleótidos, péptidos, etc.

En la siguiente figura se muestra un ejemplo de este tipo de complejos.

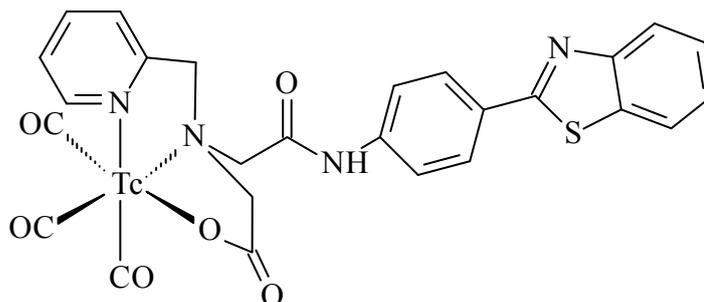


Figura 24 - 2-(4-Aminofenil)bezotiazol como potencial radiofármaco para cáncer cerebral (68)

Este complejo sustenta la especie ácido 2-(piridin-2-ilmetilamino)acético como ligando, el cual actúa como tridentado para formar complejos neutros al ionizarse el OH del ácido carboxílico. Éste es un sistema donador muy utilizado para unir farmacóforos al core tricarbónico. Este complejo presenta el farmacóforo 2-(4-aminofenil)benzotiazol, el cual está reportado como agente antitumoral.

Otra de las posibilidades estudiadas en los últimos años es la formación de complejos con ciclopentadienilos (Cp), en los que las tres posiciones lábiles del core tricarbónico son ocupadas por la nube electrónica de un anillo aromático de 5 miembros como en el complejo mostrado en la siguiente figura.

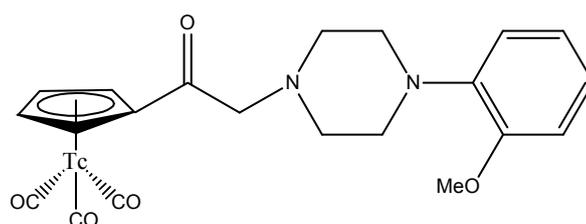


Figura 25 – Complejo WAY1-Cp para receptores de serotonina. (65)

Otra posibilidad con los complejos de Tc(I) es el intercambio de uno de los grupos CO del core, por un grupo NO. El mismo le daría mayor estabilidad a la molécula dado que el cambio resultaría en una mayor estabilidad del estado de oxidación de bajo spin por una mayor estabilidad del campo cristalino. (69,70)

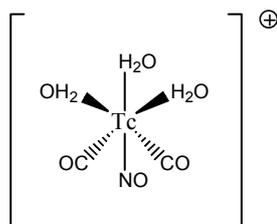


Figura 26 – Complejo Tc(CO)₂(NO)

Estos nuevos conceptos de marcación han sido empleados también en la preparación de potenciales radiofármacos para el diagnóstico de hipoxia utilizando derivados nitroimidazolicos, los que se muestran en las siguientes figuras.

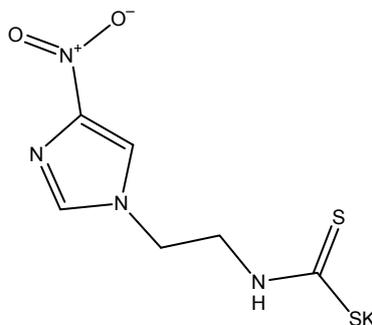


Figura 27 - NIET [2-(4-nitro-1H-imidazol-il)etil ditiocarbamato de potasio]

Esta molécula es un derivado 4-nitroimidazol utilizado en la preparación de un nitrido complejo simétrico por Taiwei Chu et al. (71) Para la formación del complejo se emplea el grupo ditiocarbamato como donador de electrones. Según los datos publicados presenta una biodistribución similar al BMS181321, con lo cual si bien logra una captación por el tumor, la lipofilia de esta molécula hace que el complejo presente una lenta depuración de sangre y tejidos blandos.

Otro ejemplo reciente del empleo de este core en diagnóstico de hipoxia lo es el trabajo publicado por Madhava B. Mallia et al. (72) En el se prepara un derivado de un 5-nitroimidazol conteniendo el grupo xantato como grupo quelante para formar también un complejo simétrico con el Tc(V)-nitrido.

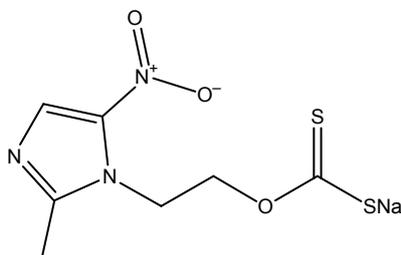


Figura 28 – Metronidazol-xantato

En este trabajo el autor compara este complejo con otros radiofármacos anteriormente publicados, como el BMS181321 y el BRU5921, obteniendo resultados similares como lo muestra en la Figura 29.

<i>M. B. Mallia et al. / Bioorg. Med. Chem. Lett. 15 (2005) 3398–3401</i>			
3401			
Table 3. Comparison of biological characteristics of ^{99m} TcN-metronidazole derivative with earlier reported agents			
Complex	^{99m} Tc-BMS181321	^{99m} Tc-BRU59-21	^{99m} Tc-MNZ-xanthate
Animal	C3H mice	C3H mice	Swiss mice
Tumor type	Fibrosarcoma	Fibrosarcoma	Fibrosarcoma
Time pi (h)	2	2	3
Tumor (%ID/g)	0.55 ± 0.08	0.37 ± 0.14	1.36 ± 0.29
Tumor/blood	0.31	0.86	0.62
Tumor/muscle	2.63	3.84	3.32
Reference	14	15	Present study

Figura: 29 – Tabla de resultados de biodistribución del nuevo complejo.

Al igual que en los radiofármacos anteriores se logra obtener una relación tumor/músculo en animales portadores de tumores cercana a 3. Sin embargo

se observa una baja relación tumor/sangre debido a la lenta depuración de la misma debido a la elevada lipofilicidad.

Existen algunos ejemplos de aplicación del core Tc-tricarbonilo para el desarrollo de nuevos radiofármacos de hipoxia. El siguiente ejemplo es la aplicación de éste publicado por Tapas Das et al. (73), el cual se muestra en la Figura 30

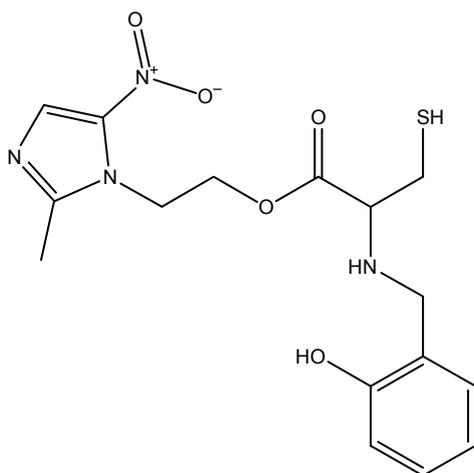


Figura 30 – Ligando MNZCAA para formar complejos tricarbónicos de Tc(I).

En este ejemplo se emplea un 5-nitroimidazol unido a una estructura adecuada para la formación de complejos con el core tricarbónico a través del grupo tiol terminal, el NH y el OH fenólico, que si bien no es un muy buen grupo aceptor π , los autores proponen que el mismo participa en la coordinación para dar un ligando tridentado. La tabla de valores obtenidos de la biodistribución del mismo se muestra en la siguiente figura.

Table 3
Comparison of tumor-to-background ratios of some ^{99m}Tc -labeled 2-nitroimidazole derivatives

Complex	^{99m}Tc -BMS181321	^{99m}Tc -BRU59-21	^{99m}Tc -MNZCAA
Tumor	0.55 ± 0.08	0.37 ± 0.14	0.88 ± 0.08
Blood	1.75 ± 0.27	0.43 ± 0.07	1.07 ± 0.25
Muscles	0.19 ± 0.05	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.04
Liver	8.79 ± 3.05	8.37 ± 0.87	8.18 ± 1.03
Tumor/Blood	0.31	0.86	0.82
Tumor/Muscles	2.63	3.84	14.67
Time post-injection	2 h	2 h	3 h
Animal strain	C3H mice	C3H/HeJ mice	Swiss mice
Tumor model	KHT-C tumor	KHT-C tumor	'barcl-95' tumor
Reference No.	1	17	Present study

Figura 31 – Biodistribución del $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{MNZCAA}$

Se observa una relación tumor/músculo muy superior a los radiofármacos anteriormente mencionados, llegando a ser de más de 14 a las 3h post inyección. Este valor es un resultado muy elevado en comparación con valores obtenidos con estructuras similares, ya que presenta una relación 6 a 7 veces superior a otras publicaciones. La diferencia para obtener estos muy buenos valores parece estar en la baja captación en músculo 0.06 ± 0.04 , 3h post inyección y una buena captación en tumor de 0.88 ± 0.08 , 3h post inyección, sin embargo la relación tumor/sangre es menor a 1, siendo llamativa la captación bastante alta en sangre y muy baja en músculo.

Otros ejemplo de la preparación de un complejo con el core tricarbonilo utilizando un 5-nitroimidazol como ligando para hipoxia es el publicado por Madhava B. Mallia et al. (74), en el que emplea un sistema ligando duro para complejear al metal. En este caso la unión al centro metálico es a través de los dos ácidos carboxílicos y el N terciario de la cadena alifática. La estructura se muestra en la siguiente figura.

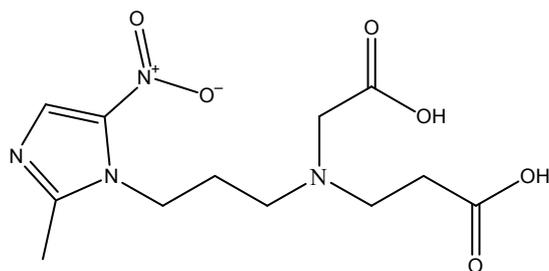


Figura 32 – Ligando para complejos tricarbonilicos derivado del 5-nitroimidazol

Los resultados obtenidos por el autor en estos ejemplos muestran una captación similar a las obtenidas por otras publicaciones, siendo la relación tumor/músculo cercana a 2.5.

Como se desprende de los ejemplos anteriores, a pesar de la gran cantidad de trabajos recientes relativos a este tema aún hoy no se cuenta con un compuesto adecuado para la detección de zonas hipóxicas en tumores. Por lo tanto el tema continúa siendo de gran actualidad y es vital poder continuar avanzando en los conocimientos de la química de coordinación y de su interacción con los sistemas biológicos desde un punto de vista racional a fin de poder, en un futuro cercano, contar con agente de diagnóstico de hipoxía marcado con ^{99m}Tc a fin de mejorar el tratamiento a los pacientes que sufren este tipo de enfermedad.

2 - Objetivo

2.1 - Objetivo general:

El objetivo de este trabajo es el diseño, síntesis y evaluación de complejos de Tc conteniendo ligandos nitroimidazólicos, como potenciales radiofármacos con selectividad hacia tejido hipóxico.

Para ello se plantea la síntesis de una familia de ligandos conteniendo un radical nitroimidazólico en su estructura, la posterior preparación de los complejos de ^{99m}Tc y su evaluación como potenciales radiofármacos de diagnóstico de hipoxia, tanto in vitro como in vivo.

El farmacóforo seleccionado es el grupo nitroimidazol, de reconocida capacidad biorreductiva por ser sustrato de enzimas in vivo, las que en condiciones de hipoxia lo transforman irreversiblemente en aminas que quedan retenidas dentro de la célula.

Se tomará como reactivo de partida al metronidazol® (ver Figura 33), fármaco utilizado como antiparasitario, ya que se puede obtener en grandes cantidades y en la calidad adecuada de la industria farmacéutica. Mediante síntesis orgánica se le unirán grupos donores de electrones adecuados para coordinar al Tc (unidad quelante) mediante la formación de distintos tipos de complejos. También se modificará la cadena espaciadora (o linker) que separa el farmacóforo de la unidad quelante.

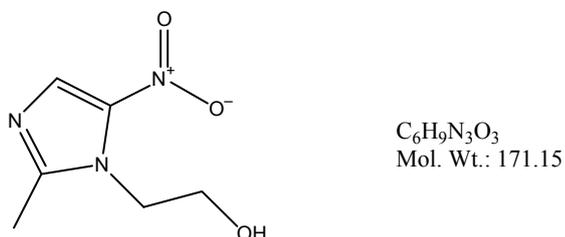


Figura 33 – Estructura del Metronidazol®

Las estrategias de marcación seleccionadas para este trabajo, implican la formación de complejos Tc(V)nitridos, Tc(I)tricarbonilos, TC(III)complejos 4+1.

De esta manera se estudiarán distintos estados de oxidación del metal y su influencia en el comportamiento del producto resultante.

El desarrollo actual de nuevos radiofármacos se basa en el diseño racional de las estructuras e implica la realización de un estudio sistemático de la relación estructura – comportamiento biológico.

Por este motivo este trabajo incluyó todas las etapas mostradas en el siguiente esquema.

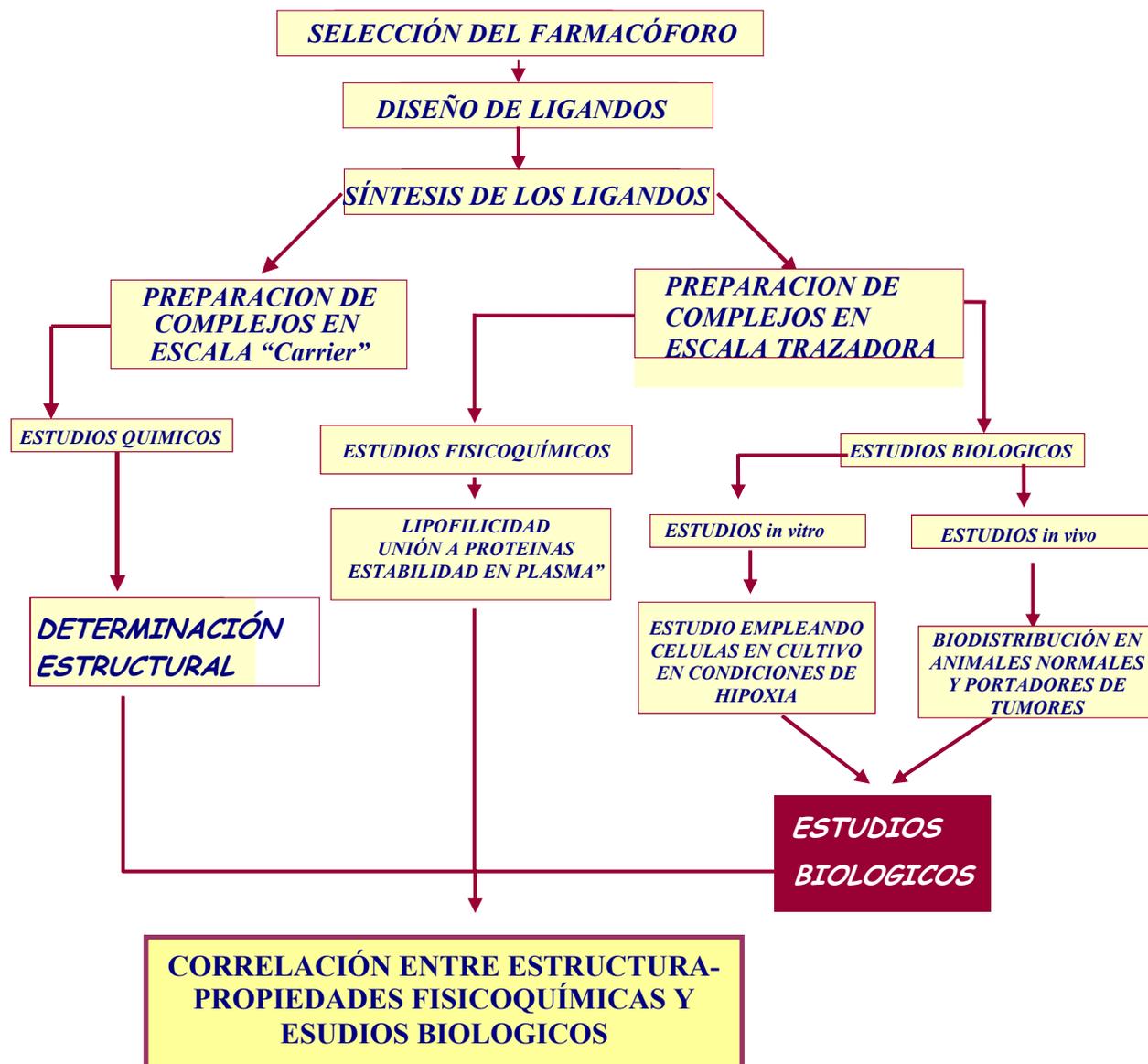


Figura 34 - Esquema conteniendo las etapas de trabajo

En este marco, en el presente trabajo se propone una profundización en aspectos de la química de coordinación del Tc, relevantes para el diseño de

radiofármacos para hipoxia. El mismo se llevará a cabo a través del estudio de las propiedades químicas y biológicas de un grupo de complejos.

2.2 - Objetivos específicos:

2.2.1 - Diseño y síntesis de ligandos nitroimidazólicos conteniendo grupos quelantes adecuados para la preparación de complejos de ^{99m}Tc .

Se propone partir del metronidazol 2-(2-metil-5-nitroimidazol-1-il) etanol, nitroimidazol comercialmente disponible como fármaco, desarrollar y optimizar métodos de síntesis que permitan preparar ligandos conteniendo distintos grupos quelantes para Tc .

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

La etapa de marcación implicará la utilización de las estrategias más novedosas en el campo de la Radiofarmacia. Se prepararán complejos de tipo Tc(V)nitruro, Tc(I) tricarbonilo y Tc(III) 4 +1.

2.2.3 - Estudios fisicoquímicos

Caracterizar fisicoquímicamente a los complejos obtenidos, determinando su lipofilicidad, unión a proteínas plasmáticas, estabilidad frente a plasma humano.

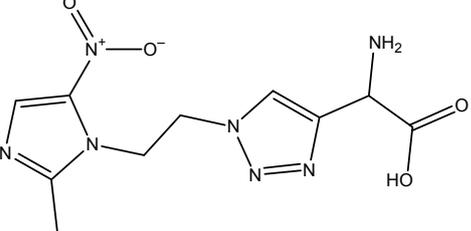
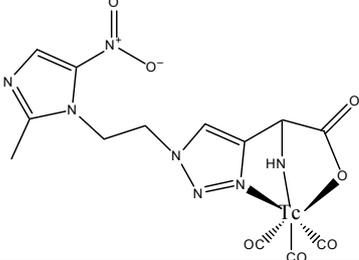
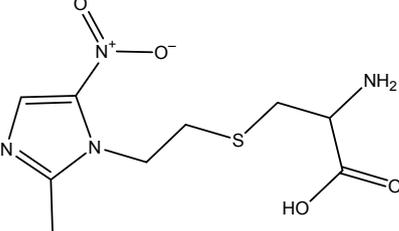
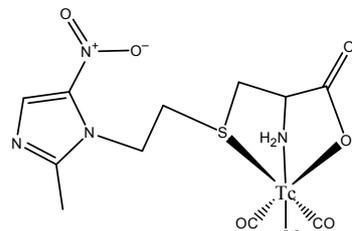
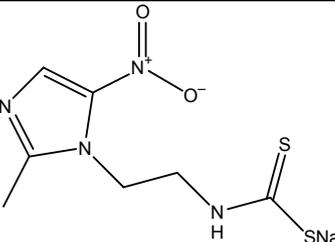
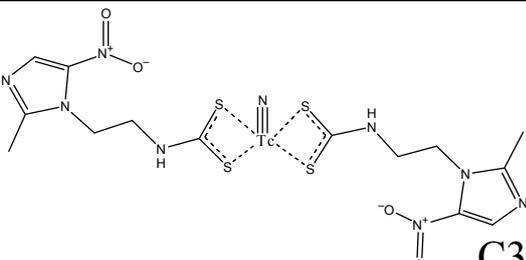
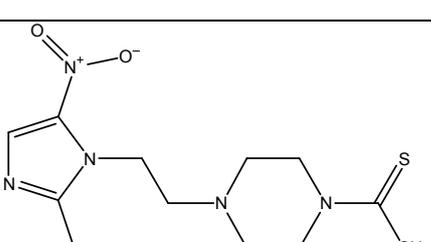
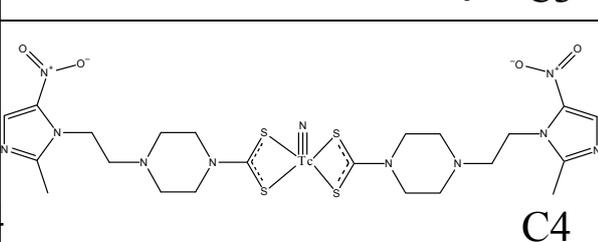
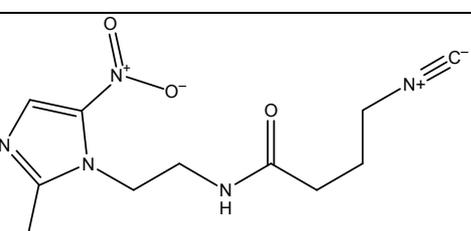
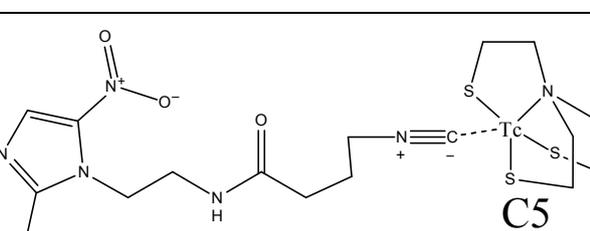
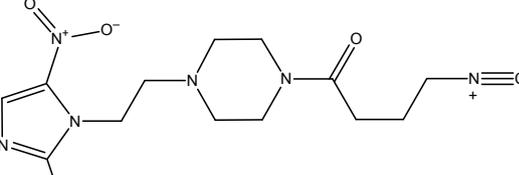
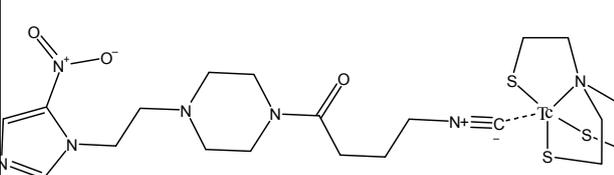
2.2.4 - Estudios in vitro.

Se pretende desarrollar y poner a punto una metodología que permita la evaluación in vitro de los complejos desarrollados determinando la captación en condiciones de hipoxia y de oxia del radiofármaco en una línea de tumor humano en cultivo.

2.2.5 - Estudios in vivo.

En esta etapa se realizará la evaluación de los complejos primero en animales normales con el fin de caracterizar su comportamiento biológico y sus principales vías de eliminación. Posteriormente se evaluarán también en un modelo animal portador de tumores inducidos.

3 – Esquema de ligandos sintetizados y estructuras propuestas de los complejos. (Figura 35)

Estructura Ligando (L=Ligando)	Estructura propuesta para el complejo (C=Complejo)
 <p style="text-align: right;">L1</p>	 <p style="text-align: right;">C1</p>
 <p style="text-align: right;">L2</p>	 <p style="text-align: right;">C2</p>
 <p style="text-align: right;">L3</p>	 <p style="text-align: right;">C3</p>
 <p style="text-align: right;">L4</p>	 <p style="text-align: right;">C4</p>
 <p style="text-align: right;">L5</p>	 <p style="text-align: right;">C5</p>
 <p style="text-align: right;">L6</p>	 <p style="text-align: right;">C6</p>

4 – Parte Experimental

El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio de la Cátedra de Radioquímica, Facultad de Química y en el laboratorio de Química Orgánica-Grupo de Química Medicinal, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

4.1 – Materiales.

Los disolventes se destilaron previo a su uso. Se utilizaron reactivos comerciales: ALDRICH, JANSSEN, MERCK, FLUKA, entre otros. El avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinaron por cromatografía en capa fina (TLC). Se utilizó silicagel con indicador UV. en placas de poliéster. Los cromatogramas se revelaron por alguno de los siguientes métodos: exposición a la luz ultravioleta a 254 nm, revelado con reactivo de Brady o asperjado con una mezcla de etanol:ácido sulfúrico:anisaldehído (95:1:4) (v/v/v) y posterior quemado. Para las cromatografías en columna se utilizó silicagel (Merck, 60-230 mesh) o alúmina neutra (Merck, 70-230 mesh) Los espectros de resonancia magnética nuclear, ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, se realizaron en un equipo BRUKER DRX-400 (400 MHz), utilizando los disolventes deuterados que se indican en cada caso y empleando tetrametilsilano como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm). Las multiplicidades se designan como: s singulete, d doblete, t triplete, c cuarteto, m multiplete, sa señal ancha. Las secuencias de pulsos de los experimentos HSQC y HMBC utilizadas son las disponibles en el software del equipo. Los espectros de masa (MS) se realizaron en un espectrómetro de masa HEWLETT PACKARD MSD 5973 o LC/MSD-Serie 100 utilizando impacto electrónico (IE) o electrospray (ESI), respectivamente. Los espectros IR fueron obtenidos en el rango $4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$ en pastillas de KBr al 1% en un espectrómetro Bomen MB – 102 FT-IR.

El metronidazol empleado en la síntesis de todos los derivados fue de calidad USP (Farmacopea de los Estados Unidos de América), el mismo fue donado por Laboratorios Gramón-Bagó del Uruguay S.A.

Los “Kits” para formación del precursor nitrado empleado fueron donados por Cis Bio International.

Los *kits* Isolink™, Mallinckodt Medical B.V. empleados en la preparación del precursor tricarbónico fueron donados por Covidien..

El gas CO utilizado fue de alta pureza de AGA – SPECIALTY GAS, Cleveland, EEUU.

El [^{99m}Tc]NaTcO₄ empleado en todas las marcaciones fue eluído de un generador Tecnonuclear, Industria Argentina.

Para las determinaciones de actividad se empleó una cámara de ionización CAPINTEC CRC5 o ALFANUCLEAR ACT-15P.. También se utilizaron espectrómetros de centelleo sólido con cristal de NaI (TI) de 3 x 3 pulgadas de pozo acoplado a una tarjeta multicanal ORTEC y con cristal de NaI (TI) 3 x 3 pulgadas plano acoplado a un sistema analizador monocanal ORTEC.

4.2 - Métodos.

4.2.1 - Síntesis de ligandos.

4.2.1.1 – Síntesis de 1-(2-Azidoetil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol (PRELIGANDO 1)

Se coloca en agitación 0.5 g de metronidazol (3.57×10^{-3} moles), 1.4 g de trifenilfosfina (5.34×10^{-3} moles) en 25 mL de tetrahidrofurano (THF) seco. Posteriormente se agregan 1.40 mL de trimetilsililazida (5.38×10^{-3} moles) y se enfría la reacción en baño de hielo. Luego se agrega lentamente 1.1 g de Diisopropil azodicarboxilato (DIAD) disuelto en THF mediante embudo con ecualizador. Luego de terminado el agregado, se retira el baño de hielo y se deja que la reacción alcance temperatura ambiente. La misma se controla mediante TLC hasta desaparición del metronidazol (aproximadamente 12 h) (SiO₂, diclorometano:metanol 95:5). El disolvente se evapora a vacío. Del residuo se purifica el producto de interés mediante cromatografía en columna de sílica empleando como fase móvil diclorometano:metanol (95:5). Sólido blanco; P.F.= 122-124 °C. 50 % (75, 76).

^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm): 2.56 (s, 3H, CH_3), 3.79 (t, 2H, $J=5.4$ Hz, CH_2), 4.46 (t, 2H, $J=5.4$ Hz, CH_2), 8.00 (s, 1H, CH).

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 14.9 (CH_3), 46.0 (CH_2), 51.4 (CH_2), 129.0 (CNO_2), 133.9 (CH), 151.7 (C).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 1386 (NO_2), 1528 (NO_2), 2064-2128 (N_3).

MS (EI, 70 eV), m/z : 196 (M^+); 151 ($\text{M}^+ - \text{NO}_2 - \text{OH}$); 122 ($\text{M} - \text{NO}_2 - \text{OH} - \text{NO}$).

4.2.1.2 – Síntesis del 2-amino-3-{1-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil]-1H-triazol-4-il}propanoico (LIGANDO 1)

Se colocan 262.9 mg de 1-(2-Azidoetil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol (PRELIGANDO 1) (1.32×10^{-3} moles), 150 mg de D,L propargilglicina (1.32×10^{-3} moles), 84.7 mg de sulfato de cobre(II) (0.53×10^{-3} moles) y 52.6 mg de ascorbato de sodio (0.26×10^{-3} moles) en terbutanol:agua (4:1). La reacción se controla mediante TLC hasta la desaparición de la azida (aproximadamente 24 h). Una vez finalizada la reacción se agregan 0.5 g de resina de intercambio cationico (CHELEX 100 – Biorad) y se deja agitando hasta desaparición del color de la reacción (aproximadamente 2 h) y finalmente se filtra. El resultante es una solución marrón, la que se evapora el solvente a presión reducida hasta reducir el volumen. Luego se agregan 10 mL de eter etílico:acetona (1:1) y se deja precipitando en la heladera por 12 horas. Luego se filtra el sólido obtenido y finalmente se lava con etanol frío. Sólido blanco; P.F.= 134-137 °C. 57 % (77,78)

^1H RMN (D_2O) δ (ppm): 1.83 (s, 3H, CH_3), 3.16 (s, 2H, CH_2), 3.89 (s, H, CH), 4.77 (sa, 4H, 2 CH_2), 7.65 (s, H, CH), 8.01 (s, 1H, CH).

^{13}C RMN (D_2O) δ (ppm): 12.5 (CH_3), 26.1 (CH_2), 33.9 (CH_2), 46.3 (CH), 49.45 (CH_2), 62.2 (CH), 125.2 (CH), 129.0 (CNO_2), 146.6, 151.7 (C), 177.1 (COOH)

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 1366 (NO_2), 1527 (NO_2), 1603 (COOH), 3149 (NH_2).

4.2.1.3 – Síntesis de ácido 2-amino-3-[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil]propanoico (LIGANDO 2)

4.2.1.3.1 – Síntesis de 1-(2-iodoetil)-2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol

Se colocan 0.896 g de trifenilfosfina (3.42×10^{-3} moles), 0.233 g de imidazol (3.42×10^{-3} moles) y se disuelven en 10 mL de diclorometano seco. Posteriormente se agrega lentamente 0.869 g de yodo (3.42×10^{-3} moles) y se deja agitando durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se adicionan 0.4 g de metronidazol disuelto en diclorometano. La reacción se controla mediante TLC hasta desaparición del metronidazol (aproximadamente 24 h) (SiO_2 , diclorometano:metanol 95:5). El disolvente se evapora a vacío. Del residuo se purifica el producto de interés mediante cromatografía en columna de sílica empleando como fase móvil diclorometano:metanol (85:15). Sólido amarronado; P.F.= 78 °C. 47 % (79)

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 2.60 (s, 3H, CH_3), 3.48 (t, 2H, $J=6.0$ Hz, CH_2); 4.65 (t, 2H, $J=6.0$ Hz, CH_2), 8.00 (s, 1H, CH).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 1355 (C-N), 1368 (NO_2), 1545 (NO_2), 505 (C-I).

4.2.1.3.2 – Síntesis del LIGANDO 2

A una solución de 0.2 g del iodo derivado descrito en la sección anterior (0.71×10^{-3} moles), en 10 mL de THF, se agregan 0.125 g de clorhidrato de cisteína (0.71×10^{-3} moles) y 0.10 mL de trietilamina (0.71×10^{-3} moles). La reacción se controla mediante TLC hasta desaparición del iododerivado (aproximadamente 24 h) (SiO_2 , diclorometano:metanol 9:1). Luego de transcurrido el tiempo de reacción aparece un precipitado blanco que corresponde al clorhidrato de trietilamina, el cual se retira mediante filtración. Al sobrenadante se le elimina el disolvente a presión reducida para obtener el producto final. Sólido blanco; P.F.= 90-94 °C. 70 %. (80)

^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm): 1.33(m, 2H, S- CH_2), 2.57 (s, 3H, CH_3), 3.27 (m, 1H, CH_2 -CH- NH_2), 3.57 (t, 2H, $J=7.1$ Hz, CH_2), 4.46 (t, 2H, $J=7.1$ Hz, CH_2), 7.98 (s, 1H, CH).

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 14.9 (CH_3), 36.5 (CH_2), 46.0 (CH_2), 51.4 (CH_2), 62.4 (CH), 129.0 (CNO_2), 133.9 (CH), 151.7 (C), 182 (COOH).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 1386 (NO_2), 1528 (NO_2), 1732 (C=O), 3622 (NH_3)

MS (EI, 70 eV), m/z : 275 ($\text{M}^+ + \text{H}$); 244 ($\text{M}^+ - \text{NO}$); 199 ($\text{M} - \text{NO} - \text{CO}_2\text{H}$).

4.2.1.4 – Síntesis de la sal sódica del ácido [2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil]ditiocarbámico (LIGANDO 3)

4.2.1.4.1 – Hidrobromuro de 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etilamina

Se colocan 3.59 g de metronidazol (0.021 moles), 5.59 g de ftalimida (0.032 moles) y 8.42 g de trifetilfosfina (0.032 moles) en 20 mL de THF con agitación. La solución se enfría a 0 °C y se agregan gota a gota 13.85 g de DIAD (0.069 moles) disueltos en 10 mL de THF seco. Una vez finalizado el agregado se procede a la eliminación del disolvente a vacío obteniéndose un aceite el cual es tratado con éter etílico. El precipitado obtenido es filtrado y recristalizado de 2-propanol, obteniéndose un sólido blanco.

^1H NMR (DMSO-d_6) δ (ppm): 2.57 (s, 3H, CH_3), 3.26 (t, 2H, $J=9.1$ Hz, CH_2), 4.58 (t, 2H, $J=9.1$ Hz, CH_2), 7.89 (d, 2H, $J=6.3$ Hz, CH), 8.07 (d, 2H, $J=6.3$ Hz, CH), 8.31 (s, 1H, CH).

El derivado ftalimido obtenido se calienta a reflujo en 200 mL de HBr (30 %) por 17 horas. Luego de transcurrido el tiempo de reacción el disolvente se evapora a vacío y el residuo es tratado con 50 mL de etanol absoluto y se evapora a vacío, se repite el proceso con una nueva porción de 50 mL de etanol absoluto. El sólido amarillo obtenido es triturado y lavado con 4 fracciones de 30 mL de éter etílico y luego se recristaliza de etanol 95°. Sólido amarillo. 75 % (76).

^1H NMR (acetone- d_6 : D_2O , 9:1) δ (ppm): 2.47 (s, 3H, CH_3), 3.51 (t, 2H, $J=6.0$ Hz, CH_2), 4.42 (t, 2H, $J=6.0$ Hz, CH_2), 7.88 (s, 1H, CH).

^{13}C NMR (acetone- d_6 : D_2O , 9:1) δ (ppm): 14.9 (CH_3), 45.9 (CH_2), 51.4 (CH_2), 130.0 (C), 133.9 (CH), 151.7 (C).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 1349 (C-N), 1373 (NO_2), 1538 (NO_2), 3520 (NH_2).

4.2.1.4.2 – Síntesis del LIGANDO 3

Primeramente se disuelve el bromohidrato obtenido en el paso anterior en agua y se lleva a pH 12 con una solución acuosa de NaOH (10%). Luego se realizan 20 extracciones con 20 mL de diclorometano a fin de obtener la amina neutra para la reacción. Rendimiento de la extracción: 55 %.

Se colocan 85 mg de la amina neutra (0.68×10^{-3} moles) en 20 mL de THF seco y se enfría la solución a 0 °C. Se agregan 0.1 mL de disulfuro de carbono (1.02×10^{-3} moles) y 35 mg de una dispersión de NaH (55%) (0.815×10^{-3} moles). Una vez finalizado el agregado de los reactivos se retira la reacción del baño de hielo y se coloca a 65 °C. La reacción se controla mediante TLC hasta desaparición del amino derivado (1 hora). Finalizado el tiempo de reacción se evapora el disolvente a vacío y el producto se emplea sin posterior purificación. Sólido negro. 100 % (81)

^1H RMN (DMSO- d_6 :D $_2$ O, 9:1) δ (ppm): 2.57 (s, 3H, CH $_3$), 3.80 (t, 2H, J=5.4 Hz, CH $_2$), 4.46 (t, 2H, J=5.4 Hz, CH $_2$), 8.00 (s, 1H, CH).

^{13}C RMN (DMSO- d_6 :D $_2$ O, 9:1) δ (ppm): 14.9 (CH $_3$), 45.9 (CH $_2$), 51.4 (CH $_2$), 130.0 (CH), 133.9 (CNO $_2$), 151.7 (C), 190.4 (CS $_2$).

IR (KBr) ν (cm $^{-1}$): 1001 (NH-CS $_2$), 1118 (-(C=S)-NH), 1373 (CH), 1374 (NO $_2$), 1576 (NO $_2$), 3520 (NH).

MS (EI, 70 eV), m/z : 246 ($M^+ + H - Na$); 200 ($M^+ + H - Na - NO_2$); 165 ($M^+ - NaS - NO_2$).

4.2.1.5 – Síntesis de la sal sódica del ácido 4-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil]piperacina-1-ilmetanoditioico (LIGANDO 4)

4.2.1.5.1 – 1-(*t*-Butiloxicarbonil)piperacina

Se disuelven 2.44 g de piperacina hexahidratada (12.59×10^{-3} moles) en 25 mL de diclorometano y se enfría a 0 °C. Posteriormente se agregan gota a gota 0.273 g de dicarbonato de di-*t*-butilo disueltos en 10 mL de diclorometano. Una vez concluido el agregado se deja que la reacción alcance temperatura ambiente. Se lava la fase orgánica con 8 porciones de 250 mL de agua. La fase

orgánica se seca con sulfato de sodio y se evapora el disolvente a vacío. Sólido blanco. 65 % (82)

^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm): 1.46 (s, 9H, CH_3), 2.02 (s, 1H, NH), 2.81 (t, 2H, $\text{J}=5.0$ Hz, CH_2), 3.39 (t, 2H, $\text{J}=5.0$ Hz, CH_2).

4.2.1.5.2 – 1-(*t*-Butiloxicarbonil)-4-[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil]piperacina

Se colocan 161 mg de 1-(*t*-butiloxicarbonil)piperacina (0.80×10^{-3} moles) en 15 mL de diclorometano y se agregan 0.12 mL de trietilamina (0.88×10^{-3} moles) a 0 °C. Luego se agregan 247 mg del iododerivado descrito en la sección 4.2.1.3.1 (0.88×10^{-3} moles) y la solución se agita a temperatura ambiente durante 16 h. La solución resultante se lava con 5 mL de una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y 5 mL de agua. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio y el disolvente se remueve a vacío. Del residuo se purifica el producto de interés por cromatografía en columna de sílica empleando acetato de etilo: hexano (1:1) como fase móvil. Sólido marrón. 60%. (83)

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 1.47 (s, 9H, CH_3), 2.45 (bt, 4H, $\text{J}=6.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$), 2.53 (s, 3H, CH_3), 2.69 (bt, 4H, $\text{J}=6.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.40 (t, 2H, $\text{J}=6.0$ Hz, CH_2), 4.42 (t, 2H, $\text{J}=6.0$ Hz, CH_2), 7.95 (s, 1H, CH).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 1352 (C-N), 1365 (NO_2), 1549 (NO_2).

4.2.1.5.3 – Síntesis del LIGANDO 4.

Se colocan 120 mg del producto obtenido en el apartado anterior (0.36×10^{-3} moles) con 40 mg de ácido trifluoroacético (0.36×10^{-3} moles). Se agita durante una hora a temperatura ambiente para obtener el derivado de piperacina desprotegido. Se disuelven 100 mg de dicho intermedio (0.42×10^{-3} moles) en 20 mL de THF y se enfría a 0 °C. Posteriormente se agregan 0.04 mL de disulfuro de carbono (0.63×10^{-3} moles) y 20 mg de dispersión de NaH (60%) (0.50×10^{-3} moles). Una vez finalizado el agregado de los reactivos se retira la reacción del baño de hielo y se coloca a 65 °C. La reacción se controla mediante TLC hasta desaparición del amino derivado (1 hora). Finalizado el

tiempo de reacción se evapora el disolvente a vacío y el producto se emplea sin posterior purificación. Sólido negro. 100 % (83)

^1H RMN (CD_3OD) δ (ppm): 2.55 (bt, 4H, $J=6.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$), 2.58 (s, 3H, CH_3), 2.73(bt, 4H, $J=6.2$ Hz, N-CH_2), 3.33 (t, 2H, $J=6.0$ Hz, CH_2), 4.54 (t, 2H, $J=6.0$ Hz, CH_2), 7.93 (s, 1H, CH).

^{13}C RMN (CD_3OD) δ (ppm): 15.3 (CH_3), 39.9 (CH_2), 51.4 (CH_2), 54.3 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 58.5 (N-CH_2), 133.0 (C), 142.9 (CNO_2), 158.7 (C), 206.3 (CS_2).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 1005 (NH-CS_2), 1124 (-(C=S)-NH), 1370 (CH), 1380 (NO_2), 1579 (NO_2), 3528 (NH).

MS (EI, 70 eV), m/z : 315 ($\text{M}^+ + \text{H} - \text{Na}$); 283 ($\text{M}^+ + \text{H} - \text{Na} - \text{C}_2\text{H}_4$); 267 ($\text{M}^+ + \text{H} - \text{Na} - \text{NO}_2$); 252 ($\text{M}^+ + \text{H} - \text{NaS} - \text{NO}_2$).

4.2.1.6 – Síntesis de 4-isociano-*N*-[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil]butanamida (LIGANDO 5)

Se colocan 150 mg de 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etilamina preparada como se indica en el apartado 4.2.1.4.1_ (0.88×10^{-3} moles) en 20 mL de THF seco. Se agrega 1 gota de trietilamina y 124 mg de (0.59×10^{-3} moles) *N*-(4-isocianobutanoiloxi)succinimida y se deja en agitación hasta consumo total del reactivo (aproximadamente 12 h). La reacción se controla mediante TLC (SiO_2 , diclorometano:metanol 95:5). El disolvente se evapora a vacío. Del residuo se purifica el producto de interés por cromatografía en columna de alumina empleando como fase móvil hexano:acetato de etilo (3:7). Sólido amarillento; P.F.= 88-89 °C. 42 % (84)

^1H RMN (acetona- d_6) δ (ppm): 1.91 (m, 2H, CH_2), 2.07 (m, 2H, CH_2), 2.49(s, 3H, CH_3), 3.52 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CN}$), 3.64 (t, 2H, $J=6.0$ Hz, CH_2), 4.49 (t, 2H, $J=6.0$ Hz, CH_2), 7.89 (s, 1H, CH).

^{13}C RMN (CD_3OD) δ (ppm): 13.4 (CH_3), 24.8 (CH_2), 31.5 (CH_2), 38.3 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 40.6 (N-CH_2), 45.5 ($\text{CH}_2\text{-CN}$), 132.6 (C), 138.9 (CNO_2), 151.2 (C), 157.7 (NC), 171.5 (CO).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 1382 (NO_2), 1547 (NO_2), 1658 (CO), 2151(NC), 3333 (NH).

MS (EI, 70 eV), m/z : 238 ($M^+ - \text{HCN}$); 222 ($M^+ - \text{HCN} - \text{CH}_4$); 206 ($M^+ - \text{HCN} - \text{CH}_4 - \text{O}$); 191 ($M^+ - \text{HCN} - \text{CH}_4 - \text{HNO}$).

4.2.1.7 – Síntesis de 1-(4-isocianobutanoil)-4-[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil]piperacina (LIGANDO 6)

Se colocan 10 mg de 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etilamina preparada como se indica en el apartado 4.2.1.4.1 (0.42×10^{-3} moles) en 20 mL de THF seco. Se agrega 1 gota de trietilamina y 132 mg de (0.50×10^{-3} moles) *N*-(4-isocianobutanoiloxi)succinimida y se deja en agitación hasta consumo total del reactivo (aproximadamente 12 h). La reacción se controla mediante TLC (SiO_2 , diclorometano:metanol 95:5). Una vez completada la reacción, el disolvente se evapora a vacío. Del residuo obtenido se purifica el producto de interés por cromatografía en columna de alumina empleando como fase móvil hexano:acetato de etilo (4:6). Aceite oscuro. 72 %. (84)

^1H RMN (acetona- d_6) δ (ppm): 1.92 (m, 2H, CH_2), 2.08 (m, 2H, CH_2), 2.32 (s, 3H, CH_3), 2.62 (t, 4H, $J = 5.0$ Hz, CH_2), 3.50 (t, 4H, $J = 5.0$ Hz, CH_2), 3.64 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz, CH_2), 4.49 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz, CH_2), 7.89 (s, 1H, CH).

^{13}C RMN (CD_3OD) δ (ppm): 13.4 (CH_3), 24.8 (CH_2), 31.5 (CH_2), 38.3 ($\text{CH}_2 - \text{N}$), 40.6 ($\text{N}-\text{CH}_2$), 45.5 ($\text{CH}_2 - \text{CN}$), 49.4 ($\text{N}-\text{CH}_2$), 55.1 ($\text{CH}_2 - \text{N}$), 132.6 (C), 138.9 (CNO_2), 151.2 (C), 157.7 (NC), 171.5 (CO).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 1384 (NO_2), 1534 (NO_2), 1658 (CO), 2151 (NC), 3408 (NH).

MS (EI, 70 eV), m/z : 289 ($M^+ - \text{HNO}_2$); 248; 219; 191 ($M^+ - \text{HCN} - \text{CH}_4 - \text{HNO}$).

4.2.2 – Preparación de los complejos de ^{99m}Tc .

4.2.2.1 – Síntesis de los complejos de $^{99m}\text{Tc(I)}$ tricarbonílicos. Complejos con los ligandos 1 y 2

Los complejos de ^{99m}Tc con los ligandos 1 y 2 se preparan por sustitución empleando $^{99m}\text{Tc}-[(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ como precursor, el cual puede ser obtenido por 2 métodos: utilizando borohidruro de sodio como reductor en presencia de $(\text{CO})_g$ de acuerdo con la técnica descrita por Alberto et al. (85), o a partir de un kit comercial (Isolink™, Mallinckrodt Medical B.V. (Actual Covidean).

4.2.2.1.1 – Síntesis del precursor tricarbonílico a partir de CO_g

Se colocan en un vial de 1 mL 4,0 mg de Na_2CO_3 , 5,0 – 7.0 mg de NaBH_4 y 20 mg de tartrato de sodio y potasio. A continuación se cierra el vial y se purga con CO_g durante 15 minutos. Posteriormente se agrega el $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (5 - 50 mCi = 185 - 1850 MBq, en 0,5 – 1 mL), obtenido de un generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ y se calienta a 75°C durante 30 minutos. (63) La pureza radioquímica es evaluada por HPLC empleando un cromatógrafo líquido Shimadzu LC- 10 AS, acoplado a un detector γ PARKEN. Se utiliza una columna Phenomenex Luna 5 C18 de 15cm a flujo de 1.0 mL/min. Los solventes empleados fueron Buffer fosfato con trietilamina pH=2,5 (A) y metanol (B) según el siguiente gradiente:

Tiempo (min)	% A	% B
0 – 3	100	0
3 – 6	100 – 75	0 – 25
6 – 9	75 – 66	25 – 34
9 – 20	66 – 0	34 – 100
20 – 27	0	100
27 – 30	0 – 100	100 – 0

4.2.2.1.2– Síntesis del precursor tricarbónico a partir del Kit comercial.

Se agrega $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (5 - 50 mCi = 185 - 1850 MBq, en 0,5 – 1 mL). sobre un kit liofilizado Isolink™, el cual contiene 2,85 mg de tetraborato de Na, 7,15 mg Na_2CO_3 , 2,85 mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ y 8,5 mg tartrato $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$. Luego se coloca en un baño a ebullición durante 20 min.

El producto obtenido es controlado por HPLC utilizando el sistema descrito en el punto anterior. (86)

4.2.2.1.3– Síntesis del complejo 1

Previo al paso de sustitución se realiza la síntesis “in situ” del ligando. Para ello se realiza la reacción de acoplamiento entre la azida (preligando 1) y la propargilglicina (aminoácido comercial) (“click chemistry”) para formar el ligando final el cual es capaz formar con el ^{99m}Tc un complejo con el core tricarbónico. Para ello se colocan 65 uL de azida (solución 10^{-2}M en metanol) con 50uL de propargilglicina (solución 10^{-2}M en agua) en presencia de 7.5 uL de acetato de cobre (solución 10^{-2}M en agua) y 15 uL ascorbato de sodio (solución 10^{-2}M en agua), en calentamiento a 75°C durante una hora.

Transcurrido el tiempo de reacción se ajusta el pH de la mezcla de reacción (pH = 10,5 – 11,0) hasta pH=7,0 por agregado de una solución de NaH_2PO_4 (530 mg/mL) en una relación 4:1 de precursor: NaH_2PO_4

La sustitución se realiza agregando 200 uL del precursor neutralizado en el vial donde se realizó previamente la reacción de “click chemistry”. La mezcla se calienta en baño de agua a 60 – 70 °C durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se controla la pureza radioquímica del complejo obtenido mediante HPLC empleando el sistema descrito en 4.2.2.1.1. (77)

4.2.2.1.4. Síntesis del complejo 2

Se ajusta el pH de la solución del precursor hasta pH=7,0 según lo indicado en 4.2.2.1.2.

La sustitución se realiza agregando 4 mg (1.5×10^{-5} moles) del ligando 2. Luego la mezcla se calienta en baño de agua a 60-70°C durante 30 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción se controla la pureza radioquímica del complejo obtenido mediante HPLC empleando el sistema descrito en 4.2.2.1.1.

4.2.2.1 – Síntesis de los complejos de $^{99m}\text{Tc(V)}$ nitrido. Complejos con los ligandos 3 y 4.

Los complejos de ^{99m}Tc con los ligandos 3 y 4 fueron preparados en 2 etapas: preparación del precursor $^{99m}\text{Tc(V)}$ nitrido y su posterior sustitución con el ligando de interés. El precursor puede ser preparado por 2 técnicas diferentes que se describen a continuación.(87)

4.2.2.2.1 – Síntesis del precursor $^{99m}\text{Tc(V)}$ nitrido empleando KIT comercial.

Se realiza agregando $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (5 - 50 mCi = 185 - 1850 MBq, en 0,5 – 1 mL). sobre un kit liofilizado (CIS-BIO), el cual contiene 5.0 mg de dihidrazina succínica (SDH), 0.10 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 5.0 mg de Na_2EDTA .

Luego de incubar 5 minutos a temperatura ambiente se realiza el control de la pureza radioquímica mediante TLC en papel Watman 1 empleando como fase móvil acetona.

Sistema	Rf coloide	Rf ^{99m}Tc -nitrido	Rf $^{99m}\text{TcO}_4^-$
1-Papel/acetona	0	0	1

4.2.2.2.2 – Síntesis del precursor $^{99m}\text{Tc(V)}$ nitrido empleando dihidracida succínica.

Se colocan en un vial de vidrio 5.0 mg de dihidracida succínica disueltos en 0.5 mL de NaCl 0.9%. Posteriormente se agregan 0.1 mL de una solución de SnCl_2 (1.25 mg/mL en H_2O). Finalmente se agrega el $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (5 - 50 mCi = 185 - 1850 MBq, en 0,5 – 1 mL).

Luego de incubar 5 minutos a temperatura ambiente se realiza el control de pureza radioquímica empleando el sistema descrito en el punto 4.2.2.2.1. (88)

4.2.2.2.3– Síntesis de los complejos 3 y 4

La sustitución se realiza agregando 4 mg de la sal sódica de los ligandos 3 o 4 (1.5×10^{-5} moles del ligando 3 y 1.2×10^{-5} moles del ligando 4) disuelta en DMSO. La mezcla se calienta en baño de agua a 60-70°C durante 30 minutos. (89) La pureza radioquímica es evaluada por HPLC empleando un cromatógrafo líquido Shimadzu LC- 10 AS, acoplado a un detector γ PARKEN. Se utiliza una columna Waters 10 μ m C18 de 30cm. Los solventes empleados fueron Ácido trifluoroacético 0.1 % en agua (A) y Ácido trifluoroacético 0.1 % en acetonitrilo (B) según el siguiente gradiente, a flujo de 1.0 mL/min:

Tiempo (min)	% A	% B
0 – 3	100 \rightarrow 0	0 \rightarrow 100
3 – 15	0	100

4.2.2.3 – Síntesis de los complejos de $^{99m}\text{Tc(III)}$. Complejos con los ligandos 5 y 6.

Los complejos de $^{99m}\text{Tc(III)}$ son preparados por sustitución empleando $^{99m}\text{Tc(III)}$ -EDTA como precursor.

4.2.2.3.1 – Síntesis del precursor $^{99m}\text{Tc(III)}$ -EDTA

Se realiza agregando $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (5 - 50 mCi = 185 - 1850 MBq, en 0,5 – 1 mL) sobre una solución conteniendo 5 mg de EDTA, 5mg Manitol y 0.1 mg de SnCl_2 a temperatura ambiente. Luego de 5 minutos se realiza el control de pureza radioquímica mediante cromatografía en papel Watman 1 empleando como fases móviles acetona y NaCl 0.9 %. (90)

Sistema	Rf coloide	Rf el $^{99m}\text{Tc-EDTA}$	Rf el $^{99m}\text{TcO}_4^-$
1-Papel/acetona	0	0	1
2-Papel/NaCl 0.9%	0	1	1

4.2.2.3.2– Síntesis de los complejo 5 y 6

La sustitución se realiza agregando 200 μL de $^{99m}\text{Tc(III)-EDTA}$ a un vial conteniendo 0.3 mg de 2-[Bis (2-mercaptoetil) amino] etanetriol (NS_3) y 0.2 mg del ligando 5 o 6 (7.5×10^{-7} moles del ligando 5 y 6.0×10^{-7} moles del ligando 6). La mezcla se calienta en baño de agua a $60-70^\circ\text{C}$ durante 30 minutos. (91) La pureza radioquímica es evaluada por HPLC empleando un cromatógrafo líquido Shimadzu LC- 10 AS, acoplado a un detector γ PARKEN. Se utiliza una columna Waters $10\mu\text{m}$ C18 de 30cm. Los solventes empleados son ácido trifluoroacético 0.1 % en agua (A) y ácido trifluoroacético 0.1 % en acetonitrilo (B) según el siguiente gradiente:

Tiempo (min)	% A	% B
0 – 10	100 \rightarrow 0	0 \rightarrow 100
10 – 20	0	100

4.2.3 – Evaluación in vitro de los complejos de ^{99m}Tc .

4.2.3.1 – Lipofilicidad

La lipofilicidad es estudiada a pH 7.0 a través de la determinación del coeficiente de partición octanol/buffer fosfato 0.1M. Para ello 2 mL de octanol se mezclan en un tubo de centrifuga con 2 mL de buffer fosfato 0.1 M pH=7.0. Se agregan 100 μL del complejo purificado por HPLC, agitándose en agitador vortex durante 2 minutos. La mezcla es centrifugada por 5 minutos a una velocidad de 5000 rpm en una centrifuga EVA III. Luego de esperar la separación de las 2 fases, se toman 3 muestras de 2 μL de cada fase y se mide la actividad de cada una de ellas en contador de centelleo sólido. Se realizan 3 repeticiones de cada experiencia. (92)

4.2.3.2 – Estabilidad frente a plasma

Se realiza la incubación a 37° C de 100 µL del complejo de ^{99m}Tc purificado por HPLC con 1000 µL de plasma humano y se retiraran muestras de 200 µL a los 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas y 4 horas. Una vez extraída la muestra se precipitan las proteínas empleando 200 µL de alcohol absoluto frío (-15°C) y tras agitar mediante vortex se deja precipitando en freezer durante 5 minutos. Una vez completada la precipitación se centrifuga la muestra a 15000 rpm durante 5 minutos a 0° C. Finalmente se extrae una muestra del sobrenadante y se analiza en HPLC en las mismas condiciones que las empleadas para el control de la pureza radioquímica correspondiente. (89-92)

4.2.3.3 – Determinación del porcentaje de unión a proteínas plasmáticas mediante gel filtración.

Se emplean columnas de exclusión molecular MIDI SELECT-D, G-50 de IBI conteniendo Sephadex® G-50. Primero se realiza la centrifugación de la columna 2 minutos a 3300 rpm para extraer el buffer de conservación de la misma. A continuación se siembran 50 µL del plasma incubado con el complejo de ^{99m}Tc y se incuba durante 2 minutos. Posteriormente se centrifuga a 3300 rpm durante 2 minutos. Finalmente se mide la actividad retenida en la columna y la actividad eluída de la misma en un equipo de centelleo sólido. (93)

4.2.3.4 – Determinación de la captación por células en cultivo en estado de hipoxia y de oxia.

Para ello se emplean células HCT-15, N° CCL-255™ -ATCC® de adenocarcinoma de colon humano, cultivadas en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich R6504) suplementado con 10 % suero fetal bovino (GIBCO), 100U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, glucosa 4500 mg/L, HEPES 10mM y bicarbonato de sodio 1500 mg/L. Las células se cultivan en en frascos de cultivo T75 hasta obtenerse una monocapa (aproximadamente 7.5x10⁶ células). Previo al ensayo se colocan en una cámara de N₂(g) durante una hora

a fin de retirar el oxígeno del medio y posteriormente se agrega el radiofármaco sobre el medio de cultivo. Se realiza el procedimiento en paralelo con las células en condiciones normales de cultivo (37 °C y 5% CO₂) y con las células incubadas con N₂ a fin de disponer de un comparativo para el ensayo.

Una vez transcurridos 60 minutos de incubación (bajo atmósfera de nitrógeno o en condiciones estándar) se retira el medio de cultivo y se lavan las células con PBS. Por último se mide la actividad del sobrenadante y de las células adheridas a la superficie del frasco de cultivo, en un equipo de centelleo sólido con cristal de 3"x3" plano monocanal ORTEC, tanto para las células incubadas en atmósfera de nitrógeno como para las incubadas en condiciones normales a fin de comparar la captación en ambas condiciones. El ensayo se realiza por duplicado.

Para calcular el incremento de captación se realiza la relación de captación entre las condiciones de hipoxia / oxia, el ensayo se realiza por duplicado.

Por otra parte, para la optimización del ensayo se analiza por citometría de flujo en un citómetro de flujo (FACScalibur, Beckton Dickinson) la viabilidad de las diferentes condiciones, empleando yoduro de propicio como marcador de muerte celular.

Este trabajo se realizó en la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Química en el Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina - UDELAR, bajo la dirección de la Dra. Sylvia Dematteis.

4.2.4 – Evaluación in vivo de los complejos de ^{99m}Tc.

4.2.4.1 – Biodistribución en animales normales.

La biodistribución de los complejos de ^{99m}Tc fue evaluada en ratones CD1 hembras de 2-3 meses de edad, normales. Los animales fueron adquiridos en el Bioterio del Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina. La manipulación de los mismos se realiza teniendo en cuenta las normas vigentes sobre manejo de animales de experimentación (Ordenanza sobre el uso de animales de experimentación, docencia e investigación universitaria).

Los complejos de ^{99m}Tc (2-10 μCi en 0.1 mL) purificados por HPLC y diluídos en suero fisiológico son inyectados por vía intravenosa (3 animales por grupo). Transcurrido el tiempo de biodistribución establecido (entre 30 minutos y 4 horas post-inyección) los animales son sacrificados por tracción cervical. Los órganos, tejidos y muestras de interés son extraídos, pesados y su actividad medida en un contador de centelleo sólido. (94)

4.2.4.2 – Biodistribución en animales portadores de tumores inducidos.

La biodistribución de los complejos de ^{99m}Tc fue evaluada en ratones C57BL/6 hembras de 2-3 meses de edad, portadores de tumores inducidos. Los animales fueron adquiridos en el Bioterio del DILAVE (Dirección de Laboratorios Veterinarios del MGAP). La manipulación de los mismos se realiza teniendo en cuenta las normas vigentes sobre manejo de animales de experimentación (Ordenanza sobre el uso de animales de experimentación, docencia e investigación universitaria).

Los tumores fueron inducidos por la inoculación de 3×10^6 células de Carcinoma de Lewis de pulmón Murino 3LL provistas por el Dr. Alejandro Chabalgoity y la Dra. María Moreno del Laboratorio de Vacunas recombinantes del Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina, UDELAR.

Las células fueron inoculadas en forma subcutánea en dorso sobre miembro posterior derecho, y las biodistribuciones se realizan entre 20 a 30 días post-inoculación, cuando el tumor alcanza un tamaño aproximado de 1.5 x 0.5 x 0.5 cm.

El modelo fue evaluado mediante estudios histopatológicos realizados por el Prof. Dr. Veterinario José Pacheco de la Cátedra de Anatomía Patológica, Facultad de Veterinaria, UDELAR.

MICROSCOPIA: Se aprecia crecimiento de células ovoideas, células atípicas con relación núcleo citoplásmicas elevada, 1/1, con zonas de disposición acinar. Zonas de infiltración de tejido adiposo y músculo estriado. Embolización tumoral con presencia de zonas hipoxicas. Áreas con células en mitosis, Binucleadas. Escasos focos de necrosis en los cortes estudiados.

ADENOCARCINOMA. CELULAS BINUCLEADAS CON INFILTRACIÓN DE GRASA Y MÚSCULO ESTRIADO. Ver Figura 36.

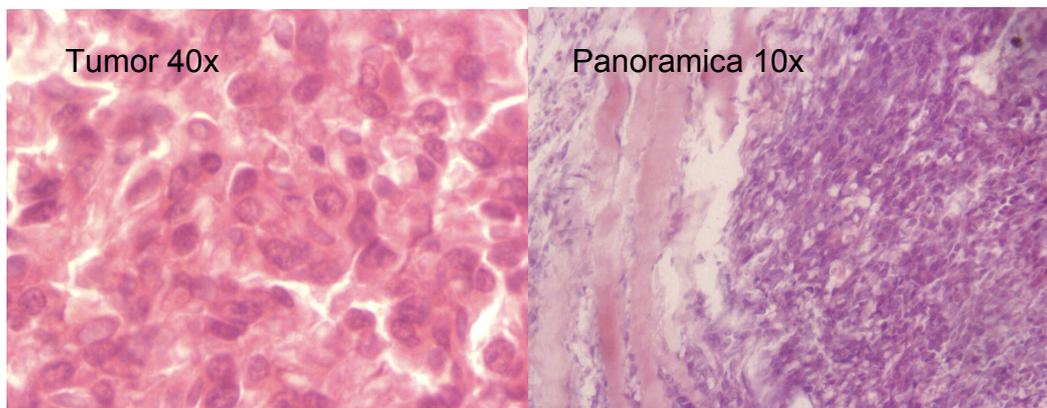


Figura 36 – Imágenes del estudio de anatomía patológica de los tumores.

Los estudios confirman la malignidad de los tumores, concordante con las características de las células inoculadas y la existencia de zonas hipóxicas.

Los complejos de ^{99m}Tc (2-10 μCi en 0.1 mL) purificados por HPLC y diluídos en suero fisiológico son inyectados por vía intravenosa (3 animales por grupo). Transcurrido el tiempo de biodistribución establecido (entre 30 minutos y 4 horas post-inyección) los animales fueron sacrificados por tracción cervical. Los órganos, tejidos y muestras de interés son extraídos, pesados y su actividad medida en un contador de centelleo. (94, 95)

4.2.5 – Estudios estructurales de los complejos con Re estable.

4.2.5.1 – Síntesis de los complejos de Re

4.2.5.1.1 - Síntesis de los complejos de Re(I)-tricarbonílico

Los complejos de Re fueron sintetizados por reacción de intercambio de ligandos utilizando $\text{fac-}[\text{Net}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$ como precursor.

4.2.5.1.1.1 – Síntesis del $[\text{Net}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$.

La primera etapa consistió en la síntesis del $\text{ReBr}(\text{CO})_5$, la cual se realizó siguiendo la reacción de Hawkes et al. (96)

En un balón de vidrio con agitación magnética y atmósfera de N_2 , se agregan 1.0 g de $\text{Re}_2(\text{CO})_{10}$ ($1,5 \times 10^{-3}$ moles) en 50 mL de hexano y 0.12 mL (0.26 g) de $\text{Br}_2(\text{l})$ (1.6×10^{-3} moles). Inmediatamente se formó el precipitado correspondiente al $\text{ReBr}(\text{CO})_5$. Se continúa la agitación a temperatura ambiente hasta desaparición del color del Br_2 . El hexano es removido por rotaevaporación a temperatura ambiente y el precipitado es purificado por sublimación a $90\text{ }^\circ\text{C}$ a presión reducida (aproximadamente de 10^{-5} atm.).

La síntesis del $[\text{Net}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$ se realiza según la técnica descrita por Alberto et al. (97)

Se suspende 1g de Net_4Br ($4,76 \times 10^{-3}$ moles) en 300 mL de 2,5,8-trioxanona (Diglima) bajo atmósfera de N_2 . Se calienta la suspensión a $80\text{ }^\circ\text{C}$ y se agregan 0.85 g de $\text{ReBr}(\text{CO})_5$ ($2,09 \times 10^{-3}$ moles) en 30 mL de diglima caliente. La mezcla se calienta a $115\text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 horas, observándose la formación de un precipitado blanco. El sólido es separado por filtración y lavado con etanol frío. El mismo se resuspende en etanol y se filtra nuevamente.

4.2.5.1.1.2 – Síntesis de los COMPLEJOS 1 y 2.

Para la preparación de los COMPLEJOS 1 y 2 se disuelven 49 mg del $[\text{Net}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$ (64×10^{-6} moles) en 20 mL de H_2O y se ajustó el pH a 7.0 con NaOH . Luego se agregaron 64×10^{-6} moles del ligando correspondiente (20mg Ligando 1 o 16 mg Ligando 2) y se deja reaccionar a reflujo durante 4 horas.

Luego de transcurrido el tiempo de reacción se realiza la inyección de los complejos en el HPLC a fin de realizar la separación del pico correspondiente al complejo, en las condiciones descritas en 4.2.2.1.1.

4.2.5.1.2 - Síntesis de los complejos de Re(V)-nitrido

4.2.5.1.2.1 – Síntesis del $\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2$.

El complejo precursor, oxotriclorobis(trifenilfosfina) $\text{Re}(\text{V})$, se prepara por reacción de trifenilfosfina con perrenato de sodio en medio clorhídrico de acuerdo con la técnica descrita por Chatt et al.(98)

Se disolvieron 9 g (0.03 moles) de trifenilfosfina en 50 mL de etanol previamente calentado y la solución se llevó a ebullición. A continuación se suspendieron 1.65 g (6×10^{-3} moles) de perrenato de sodio en 10 mL de ácido clorhídrico concentrado y se agregaron a la solución anterior. A esta mezcla se adicionaron 50 mL más de etanol. Se produjo inmediatamente la precipitación de un sólido verde. La mezcla fue calentada a reflujo durante otros 30 minutos a fin de completar la reacción. El producto obtenido fue separado por filtración, y lavado con etanol frío. Una vez seco se controló por espectroscopía IR y se utilizó en la sustitución sin purificación adicional.

4.2.5.1.2.2 – Síntesis del $\text{ReNOCl}_3(\text{PPh}_3)_2$

Se agregan 6.916 g (8.303 mmol) de tricloro-bis-(trifenilfosfina)-oxorhenium (V), 4.521 g (17.280×10^{-3} mol) de trifenilfosfina y 1.206 g (8.341×10^{-3} mol) de cloruro de fenilhidrazina en 150 mL de etanol absoluto, desgasificado con nitrógeno. La suspensión se agita durante dos horas bajo reflujo en atmósfera de nitrógeno. Después de enfriar a temperatura ambiente, el producto sólido se separa por filtración de la solución de reacción. El sólido se lava dos veces con 25 mL de agua, dos veces con 25 mL de etanol absoluto, tres veces con 25 mL de acetona, para finalmente lavar tres veces con 25 mL de éter. El producto es secado una hora bajo corriente de aire y luego se seca durante toda la noche en un desecador de vacío. (99)

4.2.5.1.2.3 – Síntesis de los COMPLEJOS 3 y 4

El precursor de $\text{Re}[(\text{N})\text{Cl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ es sustituido mediante una reacción de intercambio. (36). Se prepara una suspensión de 29.5 mg (0.037×10^{-3} moles) $[\text{Re}(\text{N})\text{Cl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ en 10 mL de diclorometano y se agrega una solución de 0.037×10^{-3} moles del ligando correspondiente (Ligando 1 - 9.9 mg y Ligando 2 - 12.4 mg) en 5 mL de metanol. Se agita la mezcla durante una hora a reflujo pasando de color amarillo a naranja. El disolvente se eliminó bajo corriente de nitrógeno, la trifenilfosfina se extrae con éter etílico. La fase de purificación final fue la separación por HPLC según las condiciones mencionadas en el punto 4.2.2.2.3.

4.2.5.1.3 - Síntesis de los complejos de Re(III) 4+1

Los complejos de Re(III) 4 + 1 fueron sintetizados mediante sustitución empleando como precursor al complejo [Re(NS₃)(PMe₂Ph)]. Para la sustitución se colocan 0.06x10⁻³ moles del ligando (Ligando 1 - 16 mg y Ligando 2 - 20 mg) disueltos en 3 ml de triclorometano, posteriormente se añaden a 0.06x10⁻³ moles de [Re(NS₃)(PMe₂Ph)] disuelto en 3 mL de diclorometano. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 h, se evapora el solvente a presión reducida, y los residuos se lavan con éter dietílico.

La fase de purificación final fue la separación por HPLC según las condiciones mencionadas en el punto 4.2.2.3.2.(100)

4.2.5.1 – Estudios estructurales mediante espectrometría de masas

Luego de sintetizados los complejos, los mismos son purificados mediante HPLC empleando las condiciones descritas anteriormente para cada tipo de complejos.

Para el estudio de espectrometría de masas únicamente se aísla del crudo de reacción el pico que se corresponde con el del tiempo de retención del complejo de ^{99m}Tc en idénticas condiciones. Luego se recoge el pico en un vial de vidrio limpio previamente pesado y se evapora el disolvente bajo presión reducida. Finalmente se redisuelven en el mismo solvente que fue empleado en la técnica de HPLC y se analizan en un espectrómetro de masas ESI mass spectrometry (MICROMASS, Triple Quattro).

5 – Resultados y discusión

5.1 - Síntesis de los ligandos

5.1.1 – Síntesis de 1-(2-azidoetil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol (PRELIGANDO 1)

Uno de los ligando diseñados para ser obtenido en este trabajo de tesis es aquel que sustenta, como sistema coordinante de Tc, a un nitrógeno de triazol, un nitrógeno de grupo amino y un oxígeno de grupo carboxilato. Este ligando será adecuado para su unión al Tc(I) a través del core tricarbonilo.

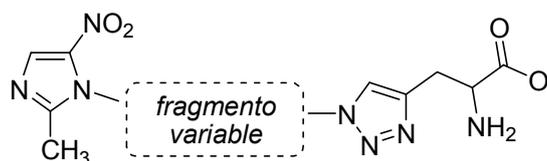


Figura 37 – Estructura de triazol conteniendo el farmacoforo nitroimidazol

La obtención del sistema coordinante triazol se planifica a través de una reacción pericíclica [3+1], entre un agrupamiento azida (dienófilo) y un triple enlace (1,3-dipolarófilo).

Dado que existen, comercialmente, aminoácidos portadores del agrupamiento alquino, específicamente propargilglicina, en el presente trabajo de tesis se prepara la azida con la que se realizará la reacción (LIGANDO 1, ver siguiente sección).

Para la síntesis de este compuesto se trabaja en la sustitución del grupo alcohol, de metronidazol, por un agrupamiento azida. Para dicho fin, primeramente se ensaya la transformación empleando una reacción de Mitsunobu, asistida por DIAD, y azida de sodio como nucleófilo, según las condiciones descritas en la literatura (101). Sin embargo, en éstas condiciones no se obtuvo reacción, quedando el reactivo incambiado.

Ante estos resultados negativos, se decide ensayar con el reactivo azidante trimetilsililazida, el cual es empleado en la preparación de azidas a partir de

derivados halogenados. Para ello, se repiten las condiciones indicadas anteriormente y que se muestran a continuación.



Figura 38 – Esquema de síntesis del PRELIGANDO 1

Esta reacción funciona con adecuado rendimiento (50 %), purificándose el producto deseado mediante cromatografía en columna. El producto obtenido se caracteriza empleando espectroscopia ^1H RMN, ^{13}C RMN, así como experimentos COSY, HSQC y HMBC. Como ejemplo en las siguientes figuras se muestran los experimentos de RMN realizados para el PRELIGANDO 1.

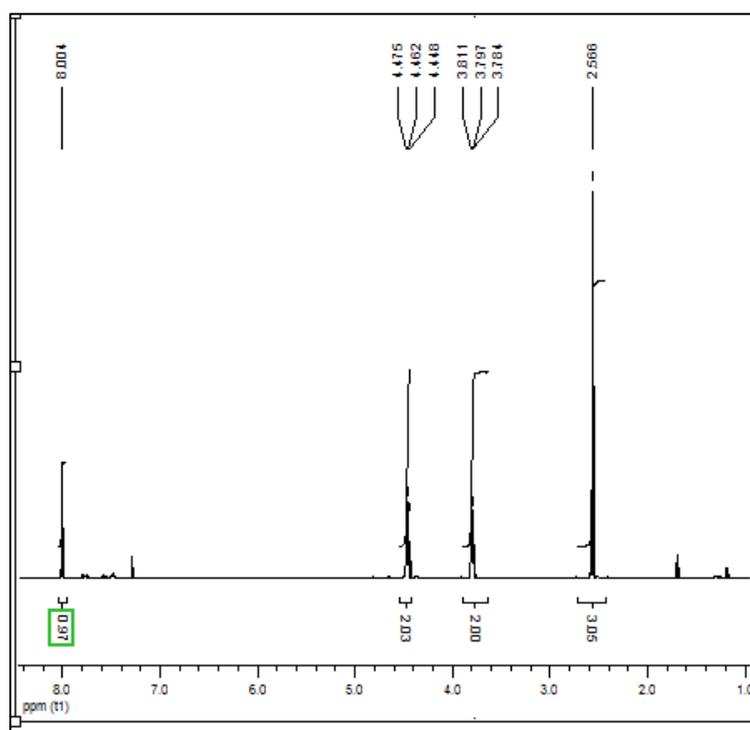


Figura 39 – Espectro de ^1H RMN para el PRELIGANDO 1 (CDCl_3 , 303 K)

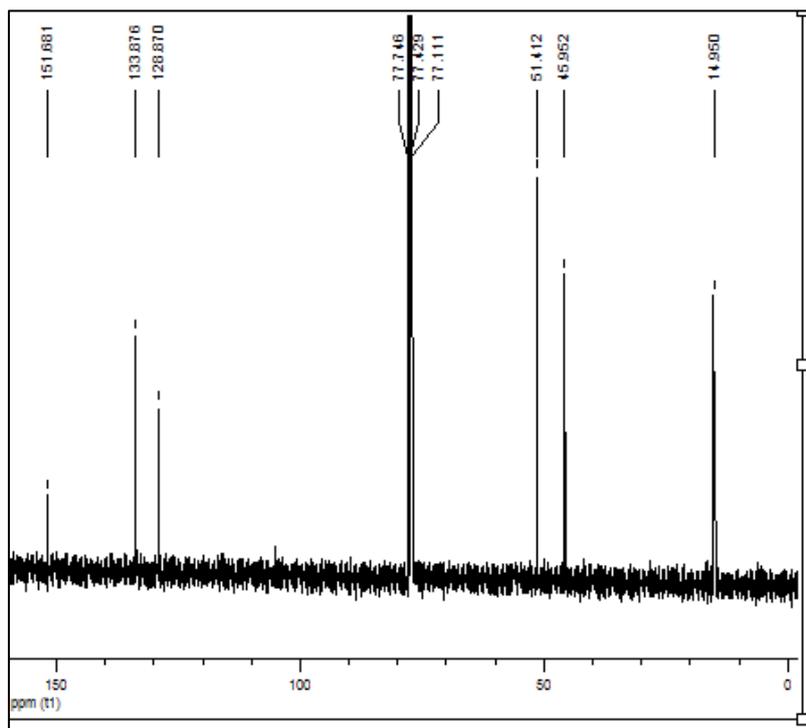


Figura 40 – Espectro de ^{13}C RMN para el PRELIGANDO 1 (CDCl_3 , 303 K)

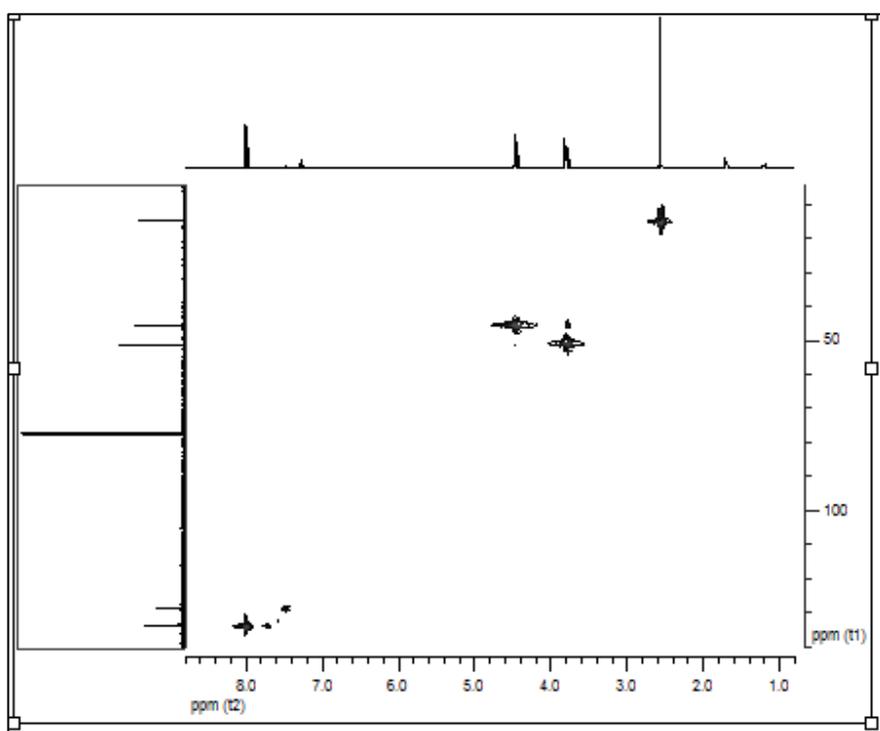


Figura 41 – Experimento de HSQC para el PRELIGANDO 1 (CDCl_3 , 303 K)

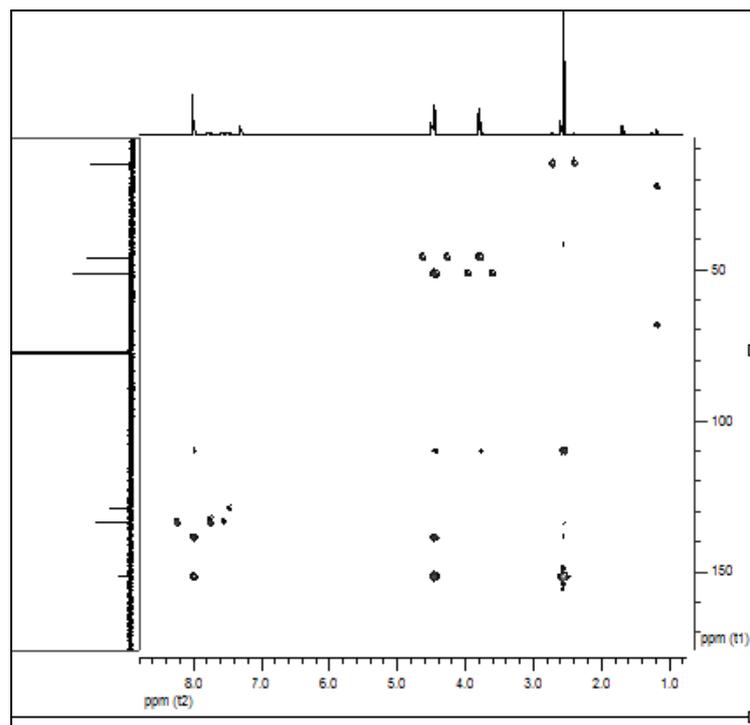


Figura 42 – Experimento de HMBC para el PRELIGANDO 1 (CDCl₃, 303 K)

El espectro de IR permite identificar claramente las bandas del grupo azida y las del grupo nitro, como se muestra a continuación.

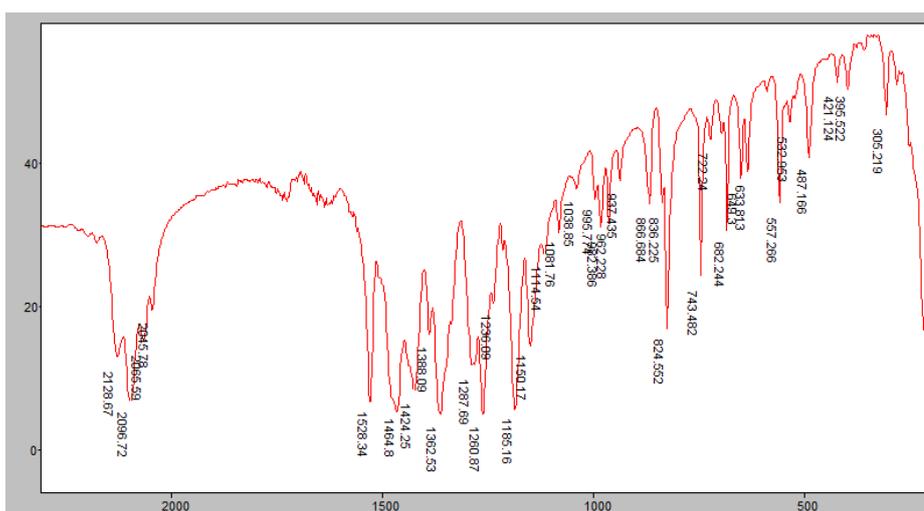


Figura 43 – IR para el PRELIGANDO 1 (KBr)

La espectrometría de masas confirma, con la presencia del ión de relación m/z correspondiente al ión molecular y otras fragmentaciones características, la presencia del producto.

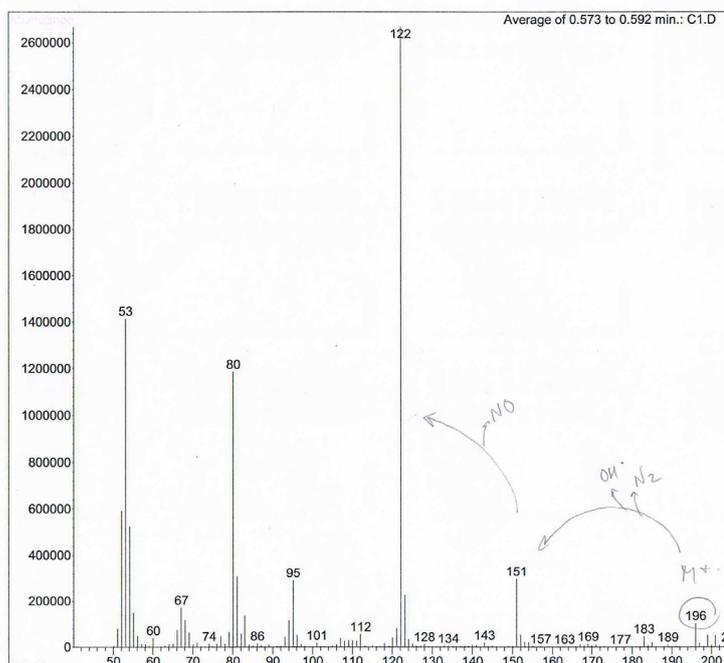


Figura 44 – Espectro de masas para el PRELIGANDO 1 (IE, 70 eV)

5.1.2 – Síntesis de ácido 2-amino-3-{1-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil]-1H-triazol-4-il}propanoico (LIGANDO 1)

Con el PRELIGANDO 1, se prepara el LIGANDO 1 mediante un procedimiento de cicloadición 1,3-dipolar, reacción de Huisgen, que pertenece al grupo de reacciones que Sharpless denominó “Click chemistry”.

Esta cicloadición puede ser realizada en diferentes condiciones, catalizada por metales o modificación térmica, pero en el caso de la catálisis por metales transcurre en forma regioselectiva dando lugar a un único triazol (de los dos posibles) en un porcentaje mayor al 90 %. La catálisis por Cu(I) genera el triazol 1,3-disustituido, que en el caso del presente trabajo de tesis, es el isómero apto para una correcta coordinación posterior con ^{99m}Tc . Por ello en radiofarmacia se emplea esta condición para preparar el LIGANDO 1, donde el

Cu(I) se genera *in situ* por acción de ácido ascórbico en presencia de Cu(II).(102)

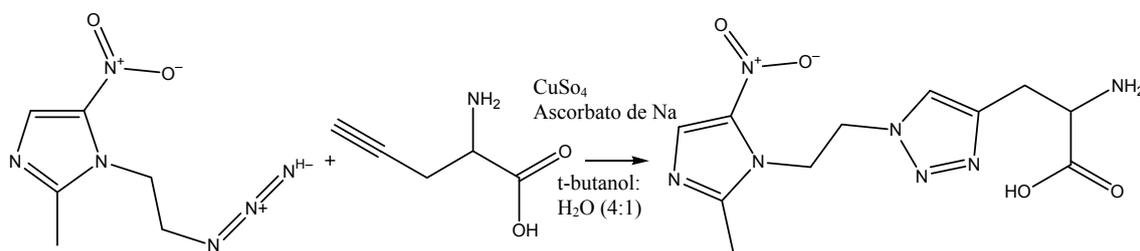


Figura 45 – Esquema de síntesis del LIGANDO 1

El producto, aislado por cromatografía en columna, se caracteriza utilizando técnicas espectroscópicas habituales (¹H RMN, ¹³C RMN, así como experimentos COSY, HSQC y HMBC, IR y MS). Como ejemplo, en la siguiente figura se puede ver el espectro de ¹H RMN en el que se pueden apreciar claramente la presencia de un único isómero, lo que confirma, junto con los otros resultados (marcación con ^{99m}Tc), la estructura propuesta.

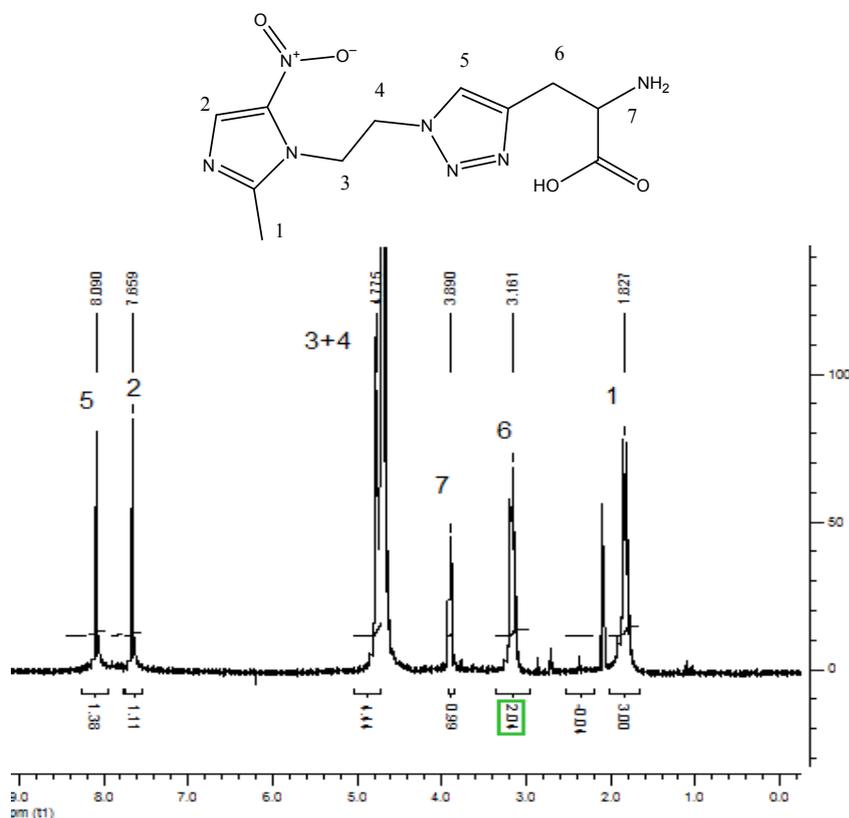


Figura 46 – Espectro ¹H RMN del LIGANDO 1 (D₂O, 303 K)

Este mismo ligando, LIGANDO 1, se prepara en el momento del marcado (ver más adelante) por reacción entre los reactivos mostrados más arriba, y sin aislamiento se marca con ^{99m}Tc . Rindiendo excelentes resultados sin la necesidad de una purificación, como se comenta más adelante en el punto 5.2.1.2. (77)

5.1.3 – Síntesis de ácido 2-amino-3-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)etil]propanoico (LIGANDO 2)

Con el fin de obtener un segundo ligando con el que realizar la coordinación con el Tc mediante el empleo del core tricarbónico se diseña un sistema que cuente con un sistema α -aminoácido dentro de sus grupos quelantes como el caso anterior, pero sin el sistema triazol resultado de la “click reaction”. Como se requiere de un tercer átomo coordinante se plantea la incorporación de un átomo de azufre en una posición adecuada. Para ello se plantea la reacción de sustitución de un halogenuro (Br o I) con cisteína. En este caso, según la bibliografía la molécula coordinaría al metal mediante el grupo amino, el grupo carboxilo y el azufre. Con lo cual sería un ligando tridentado que formaría complejos neutros al perder el protón del ácido para neutralizar la carga positiva del centro metálico.

El primer paso entonces, consiste en la obtención del halogenuro correspondiente, en este caso yoduro. Éste se obtuvo en un solo paso con un rendimiento cercano al 50%. La reacción se lleva a cabo según referencias previas (79) como se muestra a continuación:



Figura 47 – Esquema de síntesis del iododerivado

El producto intermedio, aislado por cromatografía en columna, se caracteriza utilizando técnicas espectroscópicas habituales (^1H RMN e IR).

Luego de obtenido el iododerivado, se procede a realizar el acoplamiento de la cisteína empleando agua como disolvente e hidróxido de sodio como base. En estas condiciones la reacción avanza correctamente, pero luego de completada fue difícil la separación del producto obtenido, sal sódica de un aminoácido en agua. Por este motivo se decide realizar el proceso en un medio orgánico y en presencia de una base orgánica en cantidad suficiente para neutralizar el aminoácido reactivo que se utiliza en su forma de hidrocloreto. De esta manera, como se muestra a continuación, se emplea THF como disolvente y trietilamina como base.

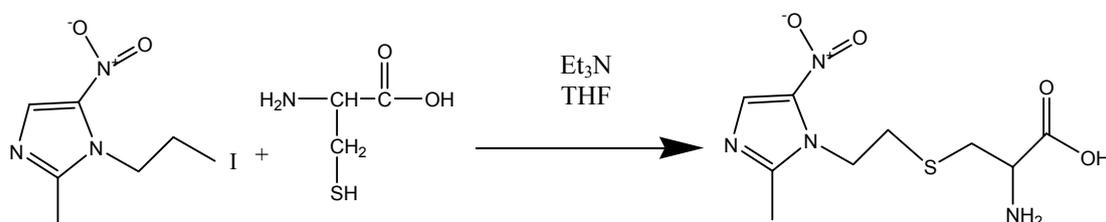


Figura 48 – Esquema de síntesis del LIGANDO 2

Una vez completada la reacción se obtiene un precipitado blanco que corresponde al hidrocloreto de trietilamina (comprobado mediante espectroscopia ^1H RMN) el cual se filtra y de la evaporación de las aguas madres, bajo presión reducida, se obtiene el LIGANDO 2 con un buen rendimiento (70 %).

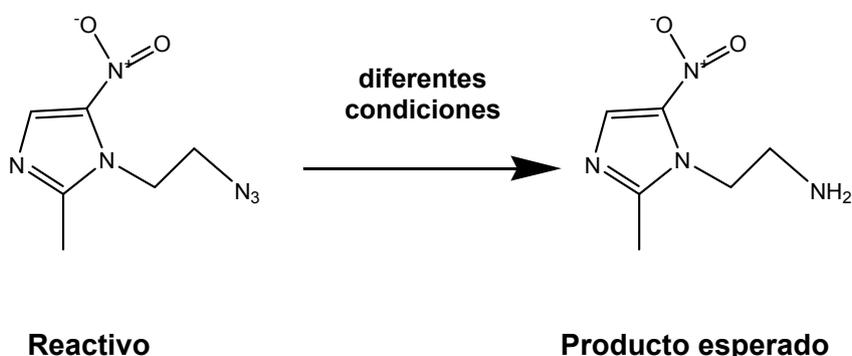
El producto se caracteriza utilizando técnicas espectroscópicas habituales (^1H RMN, ^{13}C RMN, así como experimentos COSY, HSQC y HMBC, IR y MS).

5.1.4 – Síntesis de la sal sódica del ácido *N*-[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil]ditiocarbámico (LIGANDO 3)

El LIGANDO 3 (sal sódico del ácido *N*-[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil]ditiocarbámico) contiene un grupo quelante capaz de formar complejos con el core nitruro, en el que el centro metálico se encuentra en estado de

oxidación 5. Como ya se mencionó en la introducción, con este tipo de core se puede formar complejos simétricos si se emplean dos moléculas de ligando por complejo. Para la obtención del ligando, la primera etapa es la obtención del derivado amina, y para ello es necesario la transformación del grupo alcohol del metronidazol por un grupo amina.

La primera aproximación para la obtención del aminoderivado es prepararlo a partir de la azida ya obtenida, PRELIGANDO 1, por ejemplo por reducción utilizando la reacción de Staudinger (103). En esta reacción, se emplea trifenilfosfina en medio ácido acético como reductor. De esta manera se lograría la reducción selectiva del grupo azida sin reducir el grupo nitro. Esta reacción, que es habitualmente utilizada en la obtención de aminas, se intenta bajo diferentes condiciones experimentales generando el producto deseado en muy bajo porcentaje (10 - 20 %). También se intenta el uso de CeCl_3 como ha sido previamente descrito (104). Si bien estas sales se han empleado para reducir diferentes azidas, para obtener aminas primarias aún en presencia de un grupo nitroaromático, en el caso del PRELIGANDO 1 no hubo avance de la reacción y permanece el reactivo incambiado.



Condiciones ensayadas	Observaciones
trifenilfosfina / AcOH	bajo rendimiento
CeCl_3 / NaI / CH_3CN	ausencia de reacción

Figura 49 – Esquema de reducción de la azida a amina

Finalmente se decide preparar la amina deseada por una vía alternativa como la descrita por Bertinaria y col. (76).

Por este procedimiento primero se obtiene un intermedio ftalimida, por reacción de Mitsunobu, que luego es hidrolizado en medio HBr para obtener el hidrobromuro correspondiente. El producto se caracteriza utilizando técnicas espectroscópicas habituales (^1H RMN, ^{13}C RMN, e IR).

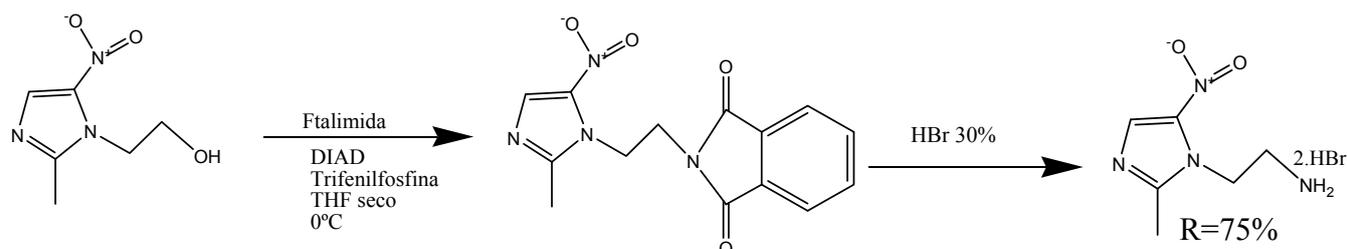


Figura 50 - Esquema de síntesis del aminoderivado (como bromohidrato)

Para la reacción posterior se trabaja con la amina en su forma neutra, la que se obtiene a partir del correspondiente hidrobromuro, por reparto entre una solución acuosa, pH=12, y diclorometano. Este procedimiento se debe realizar en el momento previo a la reacción de formación del ditiocarbamato ya que la amina en estado neutro es inestable, no siendo así en su forma de sal.

A partir de dicha amina se prepara el ligando ditiocarbamato, LIGANDO 3. Para esta reacción se procede según la técnica descrita por Goulbert y col. (81) cuyo esquema se muestra a continuación:

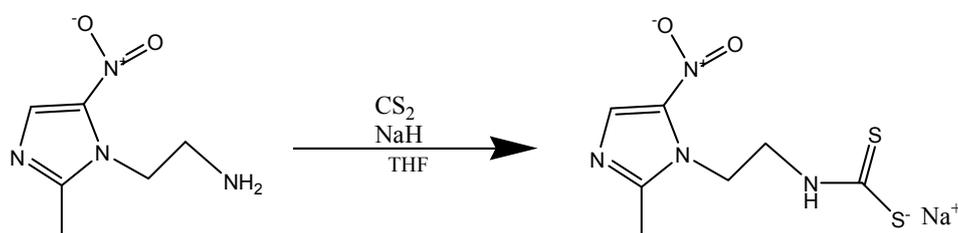


Figura 51 – Esquema de síntesis del LIGANDO 3

La mezcla de reacción, una vez completada la misma, se evapora a vacío para quitar el disolvente junto con el exceso de CS_2 , obteniéndose el producto

bajo la forma de un aceite viscoso de color oscuro. Este aceite se emplea de esta manera para las posteriores marcaciones con ^{99m}Tc . El producto se caracteriza utilizando técnicas espectroscópicas habituales (^1H RMN, ^{13}C RMN, así como experimentos COSY, HSQC y HMBC, IR y MS).

Cabe destacar, que al igual que el LIGANDO 4 (sección siguiente), la espectroscopía de ^{13}C RMN e IR permite, claramente, evidenciar la presencia de la nueva funcionalidad incorporada en la reacción con CS_2 . Así, en el espectro de ^{13}C RMN se evidencia una nueva señal a 190.4 ppm correspondiente al carbono-tiocarbonílico, mientras que en el espectro de IR la presencia del agrupamiento ditiocarbamato puede ser demostrada por las señales a 1001 (NH-CS_2) y a 1118 ($-(\text{C}=\text{S})-\text{NH}$) cm^{-1} .

5.1.5 – Síntesis de la sal sódica del ácido 4-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil]piperacín-1-ilmetanoditioico (LIGANDO 4)

Posteriormente, como otro de los objetivos del presente trabajo de tesis, se plantea el desarrollo de ligandos con cadena espaciadora (“linker”), entre la unidad quelante (ditiocarbamato) y el fármacoforo (nitroimidazol), de mayor longitud, y por ende, eventuales diferencias en el comportamiento biológico. Para ello se plantean diferentes estrategias.

Una de ellas, consistente en utilizar un proceso de olefinación de Wittig como forma de aumentar el número de átomos de carbono del linker, requiere de la oxidación del grupo alcohol del metronidazol a aldehído (agrupamiento electrófilo para dicha reacción). Así, inicialmente se ensaya el uso de PCC (clorocromato de piridinio), el cual es un oxidante suave que promueve oxidaciones selectivas de alcoholes primarios a aldehídos. Esta reacción se intenta en diferentes condiciones, llegando a utilizar irradiación por microondas como fuente de energía, con resultados negativos (ver tabla más adelante). En ninguno de los casos se obtiene el producto deseado, recuperándose en todos los casos el reactivo incambiado. (105)

Según los datos de Sidney y col. (106), que emplean KMnO_4 en medio ácido clorhídrico, se obtiene el aldehído deseado en un 30 % (cuantificado en la mezcla de reacción) que al intentar aislar se descompone rápidamente. Al reproducir estas condiciones en nuestro laboratorio no se observa oxidación del

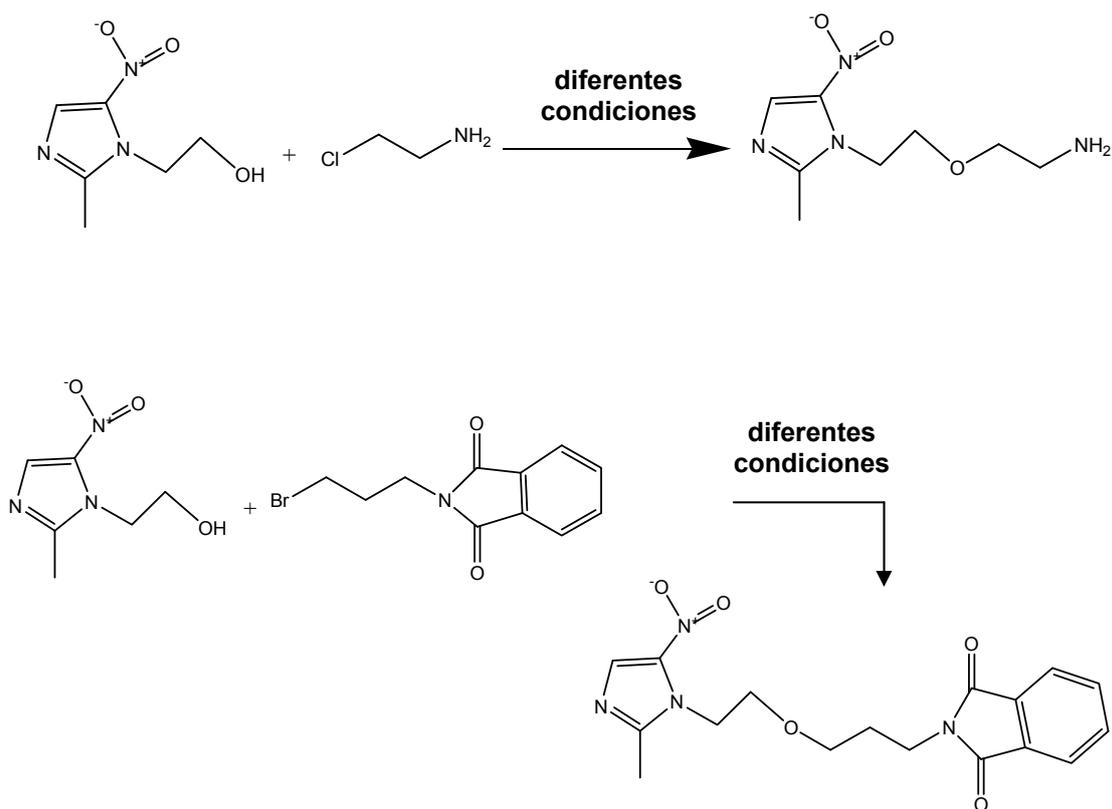
reactivo manteniéndose el metronidazol incambiado. Otros oxidantes fueron ensayados sin éxito (ver tabla a continuación):



Condiciones ensayadas	Observaciones
PCC / CH ₂ Cl ₂ / t.ambiente	ausencia de reacción
PCC / CH ₂ Cl ₂ / reflujo	
PCC / CH ₂ Cl ₂ / calentamiento con microondas (MW)	
KMnO ₄ -MnO ₂ / CH ₂ Cl ₂ / t.ambiente	
KMnO ₄ -MnO ₂ / CH ₂ Cl ₂ / reflujo	
KMnO ₄ -MnO ₂ / CH ₂ Cl ₂ / MW	
DMSO / reflujo	

Figura 52 – Condiciones ensayadas para la oxidación del OH de metronidazol a aldehído

Los resultados infructuosos por esta vía, llevan a una segunda aproximación, extender el linker utilizando el grupo alcohol como nucleófilo sobre haloalquilaminas. Para ello, se intenta hacer una sustitución sobre un halogenuro con el OH de metronidazol empleando una base fuerte (hidruro de sodio o sodio metálico). La reacción se ensaya empleando amina libre o en su forma protegida como ftalimida. En todas estas condiciones el metronidazol permanece sin reaccionar, no observándose reacción.



Condiciones ensayadas	Observaciones
NaH / DMF	ausencia de reacción
Na (metalico) / DMF	

Figura 53 – Esquema de ensayos realizados para la obtención de linkers tipo aminoalquiléteres

La tercera aproximación, para modificar el linker entre el farmacóforo y la unidad quelante, consiste en el uso de un linker piperacínilo. En esta aproximación, se plantea la reacción entre el iododerivado descrito en la sección 5.1.3 y piperacina adecuadamente protegida. El primer paso de este proceso implica mono-proteger selectivamente la piperacina, para lo que se utiliza dicarbonato de di-*t*-butilo, según:

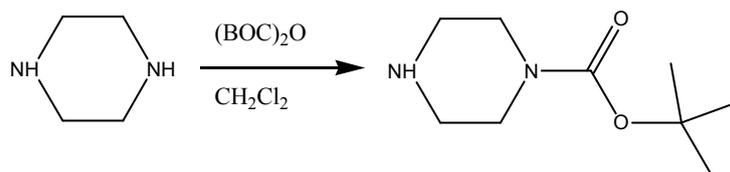


Figura 54 – Esquema de síntesis de la piperacina mono-protegida

Esta amina se hace reaccionar con el iododerivado, posteriormente se desprotege y se realiza la reacción con disulfuro de carbono en las condiciones descriptas anteriormente.

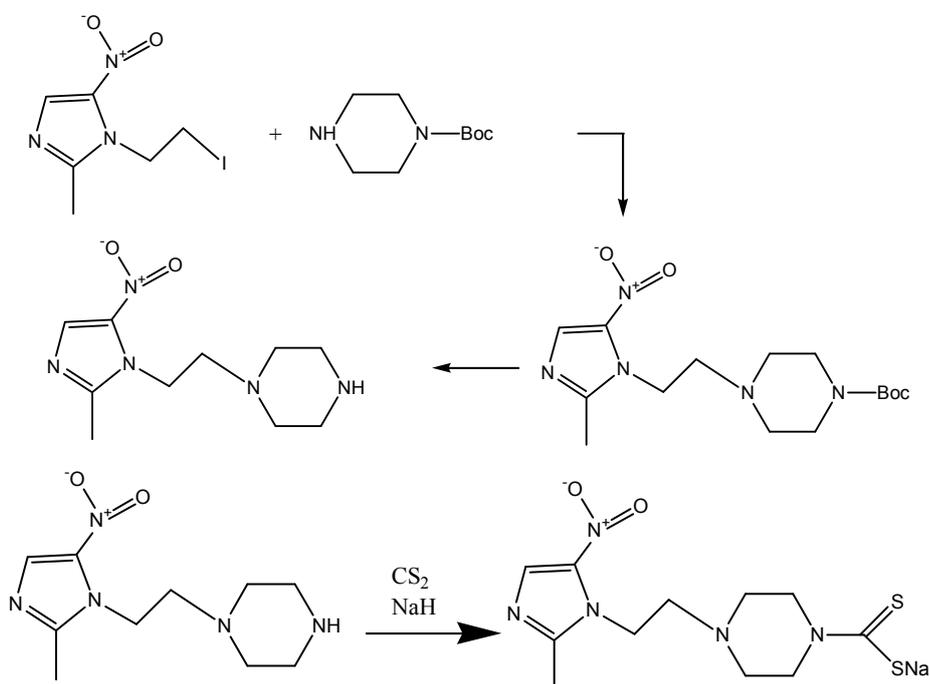


Figura 55 – Esquema de síntesis del LIGANDO 4

El producto, al igual que en el caso anterior se obtiene como sal sódica, y se emplea sin posterior purificación. El producto se caracteriza utilizando técnicas espectroscópicas habituales (^1H RMN, ^{13}C RMN, así como experimentos COSY, HSQC y HMBC, IR y MS).

5.1.6 – Síntesis de 4-isociano-N-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil]butanamida (LIGANDO 5)

Para la obtención de este ligando conteniendo un grupo isonitrilo (el cual es empleado para la formación de los complejos de Tc(III) 4+1) se parte del aminoderivado descrito en la sección 5.1.4. que se hace reaccionar con un derivado de ácido carboxílico que sustenta al agrupamiento isonitrilo.

Como derivado de ácido carboxílico se utiliza, en primera instancia, 4-isocianobutanoato de 2,3,5,6-tetrafluorofenilo según la técnica descrita por Pietzsch y col. (59) Al hacer reaccionar este reactivo con la amina correspondiente se genera el producto deseado, en un proceso muy lento y con crudo de reacción complejo que impide un correcto aislamiento del mismo.

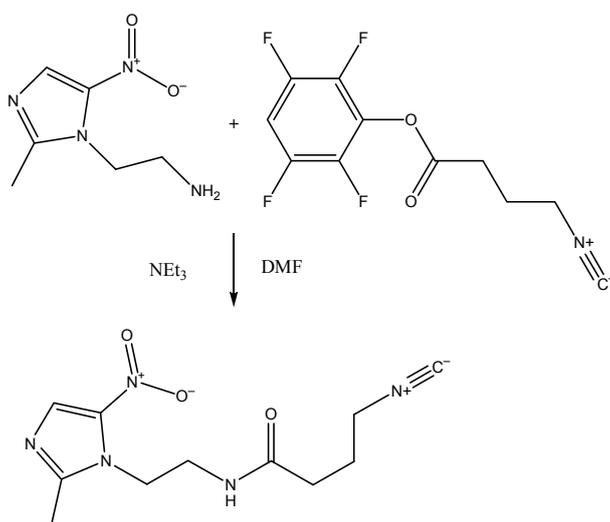


Figura 56 – Esquema de síntesis del LIGANDO 5

Por ello se utiliza otro derivado de ácido carboxílico (activado con hidroxisuccinimida) para llevar a cabo la reacción. Por esta vía, la reacción avanza rápidamente y se logra obtener el ligando de interés por aislamiento cromatográfico. El producto se caracteriza utilizando técnicas espectroscópicas habituales (¹H RMN, ¹³C RMN, así como experimentos COSY, HSQC y HMBC, IR y MS).

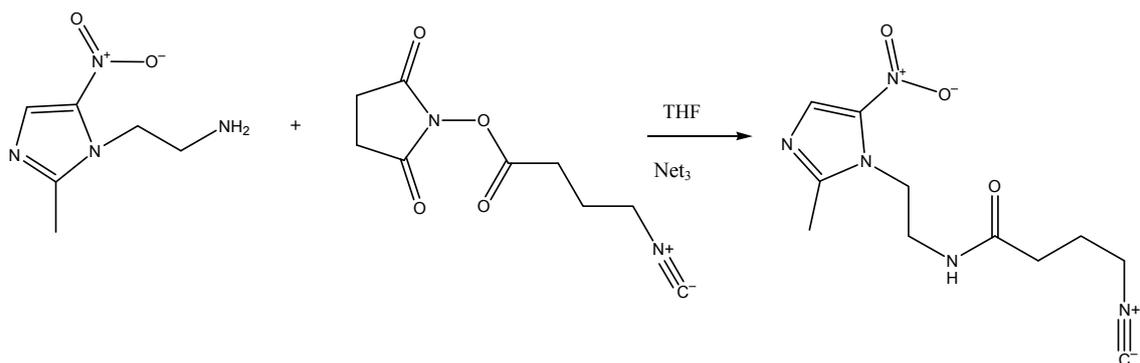


Figura 57 – Esquema de síntesis del LIGANDO 5

En este caso el espectro de masa muestra el ión de relación m/z correspondiente al ión molecular con muy baja abundancia (5 %). Esto puede deberse a que dicho compuesto es lábil en las condiciones del experimento (impacto electrónico, 70 eV). Asimismo, se observan otros iones de menores relaciones m/z , correspondientes a iones, resultantes de fragmentaciones características de este tipo de estructuras:

Estructura	m/z
M+ - HCN	238
	222
	206
	191

Figura 58 – Iones de mayor abundancia observados en el MS-IE del LIGANDO 5

Por lo tanto, todos los resultados permiten inferir la presencia del ligando requerido para el estudio con ^{99m}Tc .

5.1.7 – Síntesis de 1-(4-isocianobutanoil)-4-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil]piperacina (LIGANDO 6)

Se desarrolla otro ligando que contiene el sistema coordinante isonitrilo, en este caso conteniendo el linker piperacinilo, ver sección 5.1.5.. Para ello, en este caso, se realiza la condensación entre el derivado de metronidazol descrito en la sección 5.1.5. y el derivado de ácido carboxílico, portador del agrupamiento isonitrilo, activado con succinimida, según el esquema de reacción que se muestra a continuación.

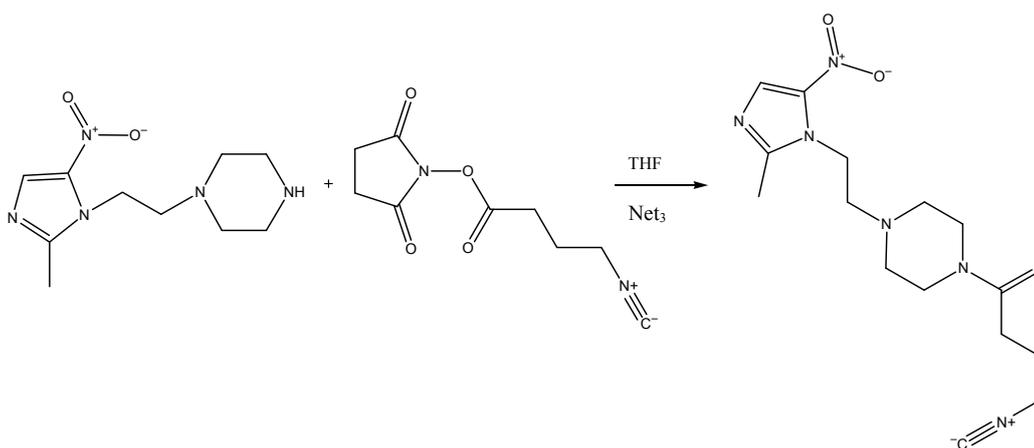


Figura 59 – Esquema de síntesis del LIGANDO 6

En este caso la reacción funciona correctamente y se obtiene el producto deseado en adecuado rendimiento. El producto, aislado por cromatografía en columna, se caracteriza utilizando técnicas espectroscópicas habituales (^1H RMN, ^{13}C RMN, así como experimentos COSY, HSQC y HMBC, IR y MS).

El comportamiento en espectrometría de masas del LIGANDO 6 es similar al del LIGANDO 5. No se observa el ión m/z correspondiente al ión molecular, pero se observan iones correspondientes a fragmentos del ligando, algunos de los cuales se muestran en la siguiente tabla:

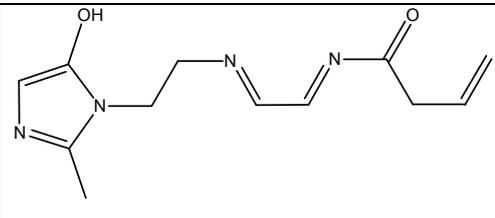
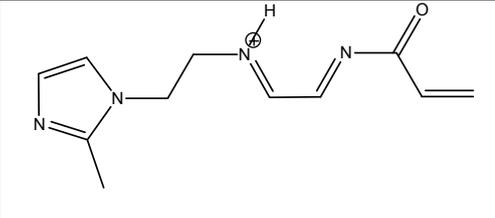
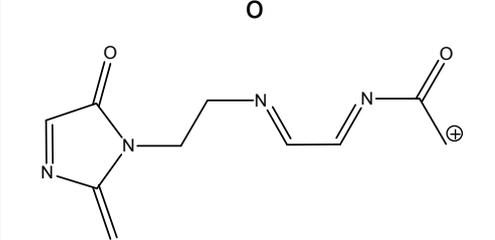
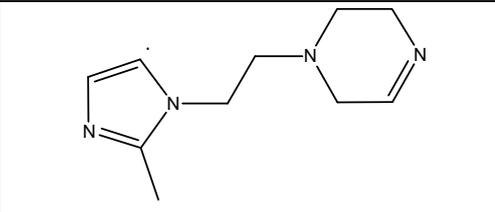
Estructura	<i>m/z</i>
M ⁺ - HNO ₂	289
	248
 ó 	219
	191

Figura 60 – Iones de mayor abundancia observados en el MS-IE del
LIGANDO 6

En consecuencia, al igual que en el caso anterior, estos resultados demuestran que se obtiene el ligando deseado.

5.2 – Preparación de los complejos de ^{99m}Tc .

5.2.1 – Síntesis de los complejos de $^{99m}\text{Tc(I)}$ tricarbonílicos. Complejos con los LIGANDOS 1 y 2

5.2.1.1 – Síntesis del precursor tricarbonílico

La primera etapa en la síntesis de los complejos tricarbonílicos de ^{99m}Tc consiste en la preparación del acu complejo conteniendo el core tricarbonílico con el metal en el estado de oxidación +1, el $\text{fac-}(^{99m}\text{Tc}-[(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+)$. El mismo se emplea como complejo intermedio ya que las 3 moléculas de agua pueden ser sustituidas por el ligando, este complejo precursor es el que se utiliza en todos los casos para la obtención de complejos tricarbonílicos de Tc(I) .

Dicha síntesis puede realizarse de 2 maneras diferentes, una de ellas es partiendo de CO (g) en presencia de un reductor (borohidruro de sodio, NaBH_4) en un medio fuertemente alcalino dado por tartrato de sodio y potasio y carbonato de sodio. La segunda es empleando el *kit* comercial de Mallinckrodt (actualmente Covidien) el cual contiene boranocarbonato de sodio ($\text{Na}_2\text{BH}_3\text{CO}_2$) el que actúa como dador de CO “in situ” y como reductor. Cabe aclarar que en este caso también se emplea carbonato de sodio para dar el medio alcalino. Ambas reacciones se basan en el mismo principio, solamente cambia la forma de suministrar el CO y el reductor, además ambas son capaces de dar una reacción cuantitativa a presión atmosférica. Los esquemas de reacción se muestran en la figura 61. Esto no es obvio, dado que el procedimiento tradicional de preparación de estos complejos requiere altas presiones y altas temperaturas. No obstante, en estos casos, la reacción ocurre a presión atmosférica y a temperaturas de entre 75 – 100 °C debido a la baja concentración del metal y a la alta afinidad del centro metálico para capturar 3 moléculas de CO , como forma de estabilizar el estado de oxidación +1. (64,65)

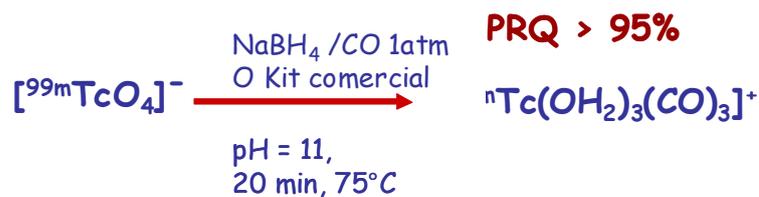


Figura 61 – Esquema de obtención del precursor tricarbónico mediante el kit comercial de Covidian y a partir de CO_g.

El perfil cromatográfico obtenido por ambos métodos es el mismo, el cual se muestra en la siguiente figura:

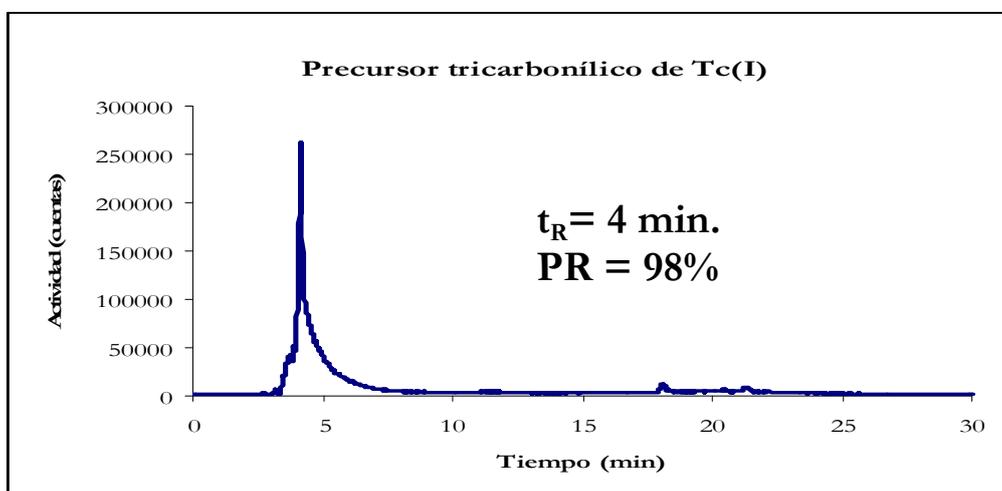


Figura 62 - Perfil cromatográfico (HPLC) del precursor tricarbónico ($[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$)

A partir del cromatograma se puede concluir que la reacción ocurre en forma casi cuantitativa, ya que se obtiene un pico principal con un tiempo de retención de 4 minutos, correspondiente al acuo complejo tricarbónico, evidenciándose ausencia de pertechnetato (potencial impureza) el cual tiene un $t_R = 12$ min (en idénticas condiciones cromatográficas), como se muestra en la siguiente figura.

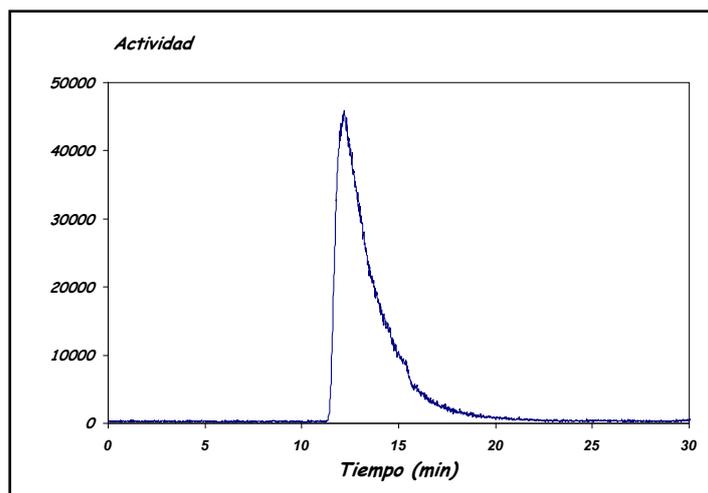


Figura 63 - Perfil cromatográfico (HPLC) de $^{99m}\text{TcO}_4^-$

La pureza radioquímica obtenida para el complejo intermedio es superior al 90 %, apareciendo algunas impurezas con tiempo de retenciones de 18 y 22 minutos que pueden corresponder a especies dimerizadas o reducidas.

5.2.1.2– Síntesis del COMPLEJO 1

La síntesis del COMPLEJO 1 se realiza partiendo del PRELIGANDO 1, obtenido por un proceso de “click chemistry” para formar el ligando final comose muestra en la siguiente figura.

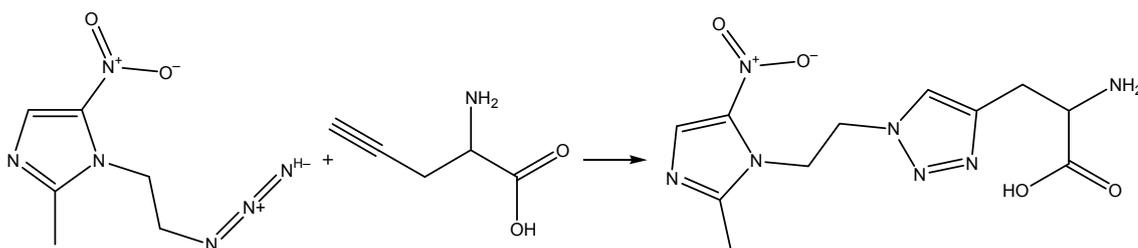


Figura 64 – Síntesis del LIGANDO 1 a partir del PRELIGANDO 1 mediante click chemistry

La reacción de cicloadición [3+2] entre un alquino y una azida es bien conocida en la química orgánica, y es muy empleada para la formación de nuevos enlaces carbono-carbono. La ventaja de su utilización en la

radiofarmacia radica en la posibilidad de formar un nuevo ligando, *in situ*, previo a la marcación, el cual no requiere una posterior purificación con todas las ventajas que esto conlleva. Esto es debido a que esta reacción es muy específica y por lo tanto no se obtienen reacciones secundarias que darían lugar a la aparición de impurezas. Además, el exceso de reactivo que queda en el medio de reacción no interfiere en el siguiente paso de sustitución.

Luego de realizar la reacción de click, se puede proceder directamente a la sustitución simplemente agregando sobre el vial de reacción el complejo tricarbónico previamente formado como se muestra en el siguiente esquema.

Con esta técnica se puede disponer de nuevos ligandos para su empleo en radiofarmacia, simplemente agregando un agrupamiento azida en la molécula de interés para luego hacerlo reaccionar con el alquino debidamente funcionalizado.

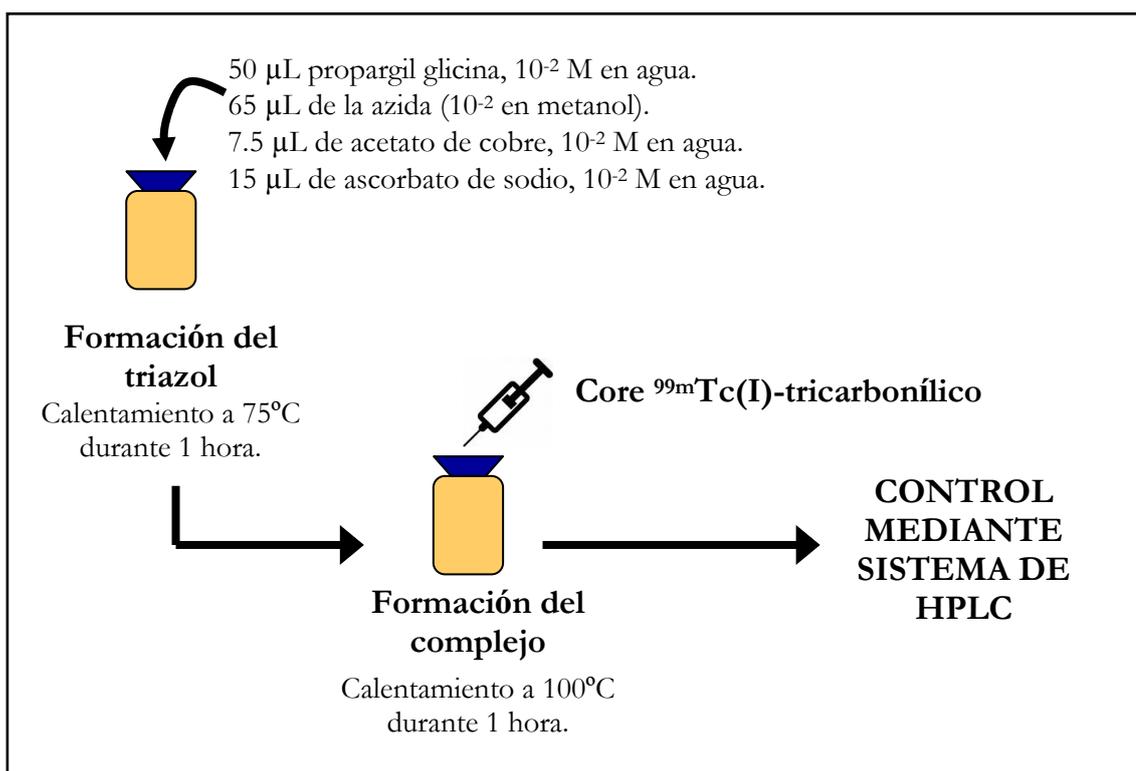


Figura 65 – Esquema de reacción de “Click Chemistry”

La coordinación del Tc se produce en este caso a través del N 1 del triazol, el NH_2 y el oxígeno del OH carboxilo dando lugar a un sistema donador “NNO”.

La pérdida por ionización del átomo de H del OH del ácido carboxílico durante la formación del complejo compensaría la carga positiva del centro metálico, obteniéndose un compuesto lipofílico y neutro con potencialidad como radiofármaco para hipoxia, cuya estructura propuesta se muestra en la siguiente figura.

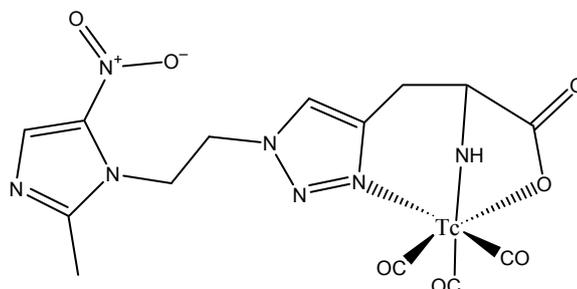


Figura 66 – Estructura propuesta para el COMPLEJO 1

El cromatograma de HPLC del COMPLEJO 1 obtenido en las condiciones antes mencionadas se muestra en la siguiente figura.

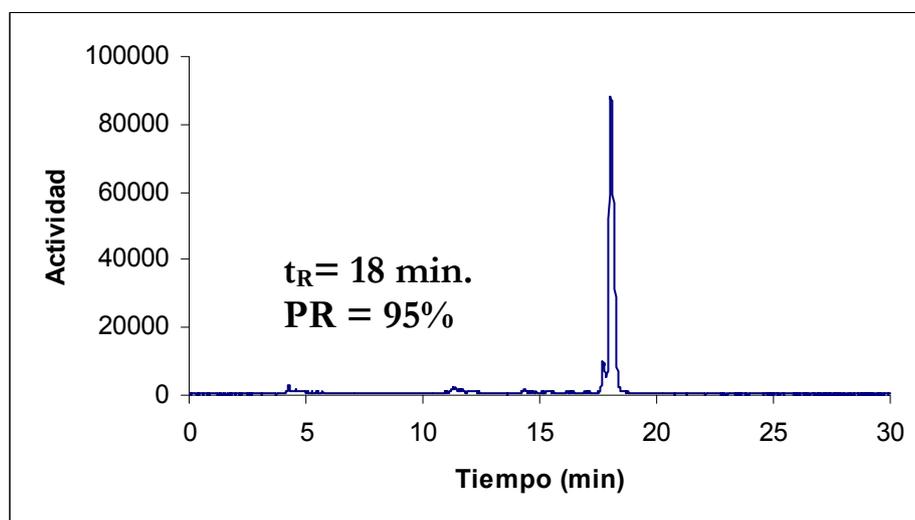


Figura 67 – HPLC del COMPLEJO 1

Se observa que en la síntesis del complejo con el LIGANDO 1 se obtiene una sustitución completa del precursor, la cual se confirma por la desaparición completa del precursor ($t_R = 4\text{min}$) y la formación de una especie mayoritaria con un $t_R = 18\text{min}$. La pureza radioquímica es superior al 90%, y se mantuvo

constante por al menos 4 horas post-marcación a temperatura ambiente, no evidenciándose descomposición.

Para corroborar la obtención del complejo deseado y que efectivamente se estuviera frente al producto de la “click chemistry” se procede a la realización de la marcación, mediante sustitución, empleando el LIGANDO 1 preparado según se indica en sección 5.1.2. En este caso, se obtuvo un perfil cromatográfico idéntico al obtenido con la reacción de “click” *in situ*, evidenciando que efectivamente la reacción se puede realizar sin etapa de purificación intermedia.

5.2.1.3. - Síntesis del COMPLEJO 2

Para la preparación del COMPLEJO 2 se emplea el LIGANDO 2, el cual de acuerdo con los antecedentes bibliográficos (80), se espera que actúe también como ligando tridentado frente al core tricarbónico. La coordinación del Tc se produciría a través del par de electrones no enlazados del átomo de azufre, el N de la amina, y el O del anión carboxilato. En este caso la sustitución se realiza directamente por el agregado del precursor tricarbónico sobre el vial conteniendo el ligando en solución. Al igual que en el caso anterior por la pérdida del protón se obtiene un complejo neutro. La estructura propuesta para este complejo se muestra en la Figura 68.

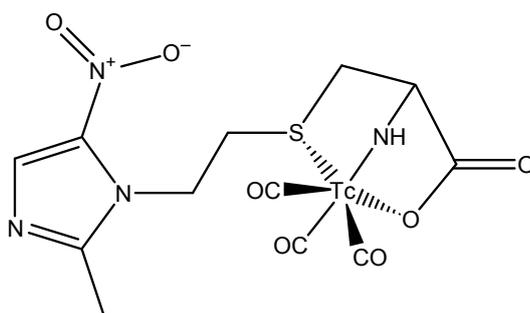


Figura 68 – Estructura propuesta para el COMPLEJO 2

El cromatograma de HPLC del COMPLEJO 2, obtenido en las condiciones antes mencionadas, se muestra a continuación.

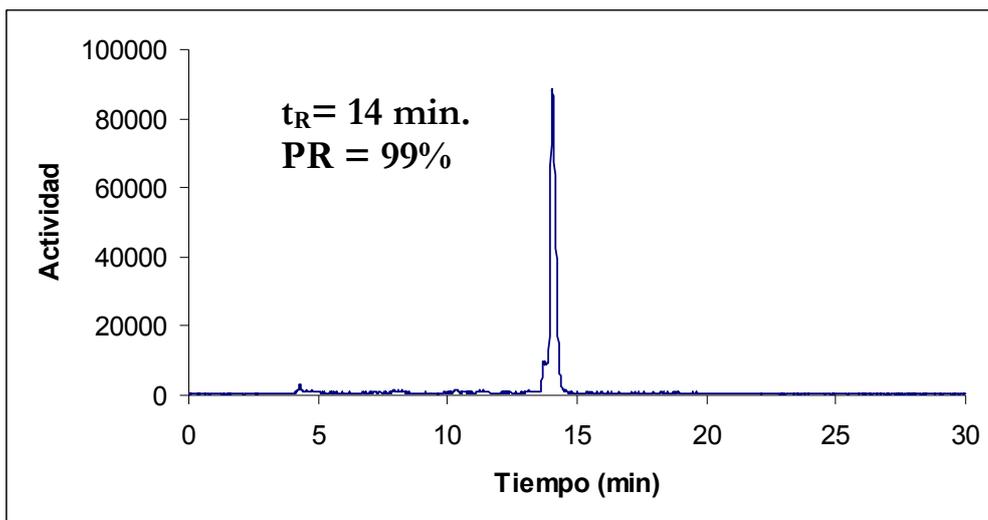


Figura 69 – Cromatograma del COMPLEJO 2

El cromatograma obtenido muestra al igual que en el complejo anterior que se produce la sustitución completa del precursor, la que se evidencia por la desaparición del mismo y la formación de una única especie con un tiempo de retención de 14 minutos y una pureza radioquímica superior al 99 %, al que se mantiene estable por al menos 4 horas a temperatura ambiente.

5.2.2 – Síntesis de los complejos de $^{99m}\text{Tc(V)}$ nitrido. Complejos con los LIGANDOS 3 y 4.

5.2.2.1 – Síntesis del precursor $^{99m}\text{Tc(V)}$ nitrido

Al igual que en el caso anterior, para la síntesis de los complejos de $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N (V)}$ también es necesario la preparación de un complejo intermedio. La preparación se realiza en medio acuoso (generalmente NaCl 0.9 %) empleando SnCl_2 como reductor y dihidracida succínica (SDH = $\text{H}_2\text{NNHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CONHNH}_2$) como fuente de N. Se emplea dihidracida succínica debido a que esta presenta una muy buena solubilidad en agua y una baja toxicidad. La reacción se puede llevar a cabo a temperatura ambiente y en agua, cuantitativamente, y en 5 o 10 minutos de incubación.

Lo curioso de esta técnica en particular es que el SnCl_2 se emplea en suspensión en agua y no disuelto en HCl 0.1 N como suele emplearse

habitualmente. En general, en los marcados la presencia de precipitado en la solución de Sn denota la formación de coloide de estaño ($\text{Sn}(\text{OH})_2$) y por lo tanto el marcado no da buenos rendimientos debido a que no se tiene el Sn bajo la forma química adecuada y en la cantidad suficiente (a pesar que se encuentra en gran exceso frente al metal). Sin embargo, en este tipo de marcado se emplea la solución conteniendo el Sn en suspensión y la reacción ocurre cuantitativamente. Esto es debido, probablemente, a que el reductor se encuentra en un gran exceso, por lo que la cantidad disuelta en solución es suficiente para reducir el $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{VII})$ a $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{V})$. El esquema de la síntesis se muestra en la siguiente figura:

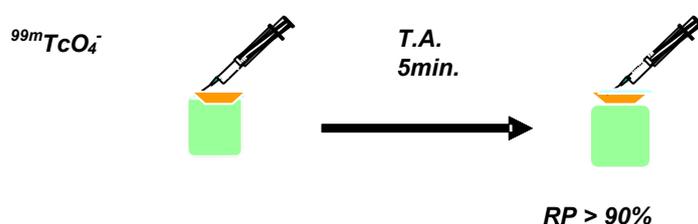


Figura 70 – Esquema de preparación del precursor de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -nitrído

En esta etapa se forman varios complejos intermedios conteniendo el core nitruro, los cuales a su vez pueden ir variando con el tiempo de incubación, por lo que los mismos no se encuentran caracterizados.

La formación de los complejos intermedios se controla mediante cromatografía en papel empleando acetona como fase móvil.

En este sistema tanto los complejos intermedios como el coloide presentan un R_f de 0, mientras que el $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ presenta un R_f de 1. Se exige una pureza radioquímica superior al 90 % para realizar el marcado del ligando.

También en este caso los complejos intermedios se pueden preparar a través de un kit comercial de CIS, el cual contiene dihidracida succínica, $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y Na_2EDTA . En el presente trabajo se obtienen idénticos resultados con este kit comercial.

5.2.2.2– Síntesis de los COMPLEJOS 3 y 4

La síntesis de estos complejos se realiza por sustitución del complejo precursor conteniendo el core nitruro. La misma se realiza disolviendo 4 mg del ligando correspondiente en DMSO y luego se agrega sobre ésta el precursor nitruro, según se muestra en la figura.

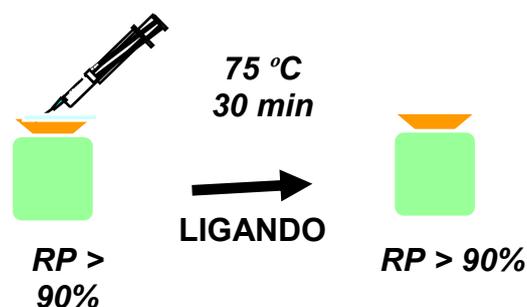


Figura 71 - Esquema de sustitución de los precursores de ^{99m}Tc -nitrado

Para esta etapa es necesario un calentamiento a 75 °C durante 20 minutos para darle energía al sistema y de esta manera facilitar el intercambio de ligandos.

En el core nitruro quedan cuatro posiciones libres de coordinación y, como se mencionó en la introducción, una de las posibilidades es la de generar complejos simétricos. Este tipo de complejos, presentan dos moléculas de ligando que se unen al centro metálico a través de los azufres del ditiocarbamato, el cual es un buen donador π . El complejo formado es totalmente simétrico ya que los e^- del doble enlace C=S y el enlace C-S (ambos grupos del ditiocarbamato) son equivalentes por deslocalización de sus electrones quedando ambos enlaces equivalentes. Las estructuras propuestas para estos complejos se muestran en las siguientes figuras:

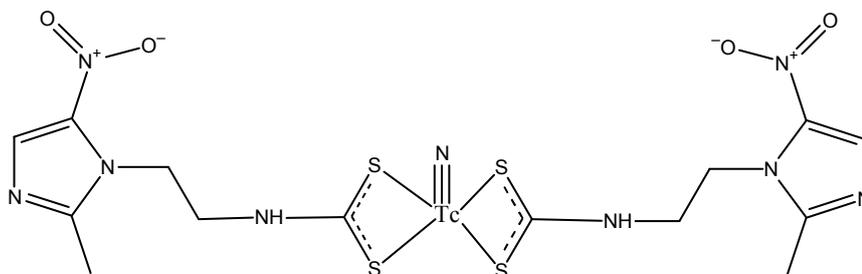


Figura 72 - Estructura propuesta para el COMPLEJO 3

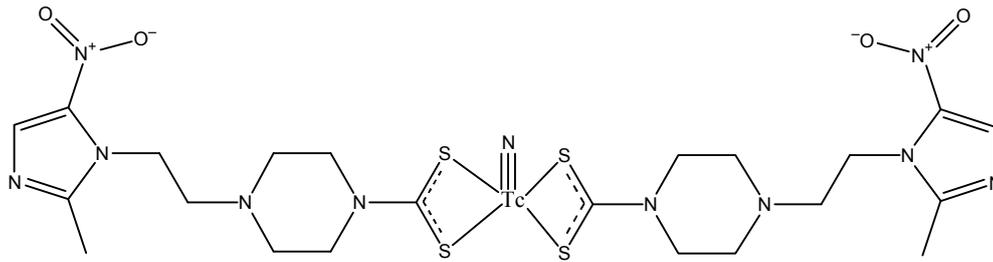


Figura 73 – Estructura propuesta para el COMPLEJO 4

Los cromatogramas de HPLC de los COMPLEJOS 3 y 4, preparados en las condiciones que se indicaron, se muestran en las siguientes figuras.

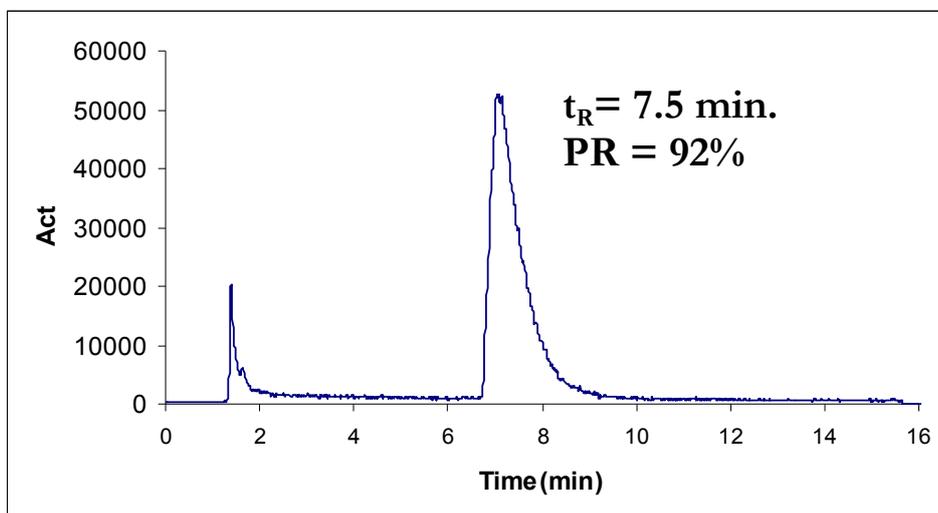


Figura 74 – Perfil cromatográfico del COMPLEJO 3

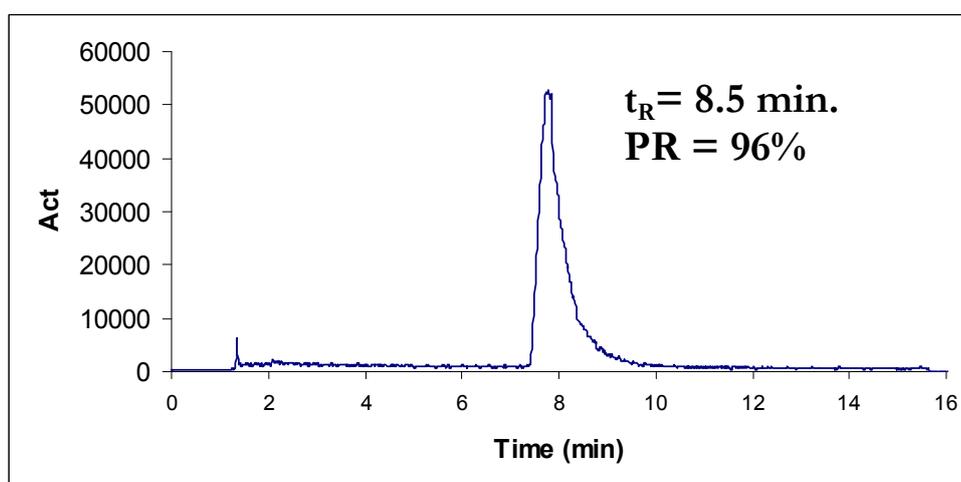


Figura 75 – Perfil cromatográfico del COMPLEJO 4

En el cromatograma del COMPLEJO 3 se observa un pico principal a los 7.5 minutos con una pureza radioquímica superior al 90 %. También se observa un pico menor que sale con el tiempo muerto de la columna (menos de 2 minutos), el cual corresponde con el tiempo de retención del precursor nitrado en estas condiciones. En todos los casos, la marcación con este ligando da un rendimiento mayor al 90%, el cual se mantiene estable por al menos 4 h a temperatura ambiente. La concentración de ligando se optimiza en 4 mg (se ensaya de 2 a 8 mg) con el fin de obtener el rendimiento adecuado con la mínima cantidad de ligando posible. En el HPLC el pico correspondiente al complejo presenta un gran cola, posiblemente debido a la interacción del mismo con la columna, ya que si bien se trata de un complejo neutro y lipofílico, éste presenta una importante distribución de cargas internas debidas al core conteniendo el centro metálico. En general los cromatogramas de complejos de coordinación que presentan distribución de cargas importantes, presentan mucha cola, siendo muy difícil su reducción sin la consecuente pérdida de la resolución.

El cromatograma del COMPLEJO 4 presenta un perfil similar al del COMPLEJO 3. En él también se observa una sustitución muy buena del precursor y el pico principal presenta un tiempo de retención de 8.5 minutos con una pureza radioquímica mayor al 90 %, la cual es estable por al menos 4 horas a temperatura ambiente. Para este ligando también se optimiza la concentración del ligando a 4 mg del mismo como en el caso anterior a pesar de ser un ligando de mayor peso molecular que el anterior.

Para ambos ligandos se obtienen complejos con muy buenos rendimientos en la marcación, los cuales son estables por al menos 4 h. La diferencia que presentan en el tiempo de retención es esperable debido a que el aumento del linker con un anillo de piperacina aumenta la lipofilidad de la molécula y por lo tanto su tiempo de retención en el cromatograma.

5.2.3 – Síntesis de los complejos de $^{99m}\text{Tc(III)}$. Complejos con los LIGANDOS 5 y 6.

Los complejos a desarrollar con este tipo de ligandos presentan un blindaje estérico del centro metálico por parte de los ligandos, ya que el centro metálico

queda en el interior de la esfera de coordinación. La ventaja de los mismos radica en presentar una menor distribución de cargas externas, y además una menor interacción del metal con los sistemas biológicos como se mencionó en el capítulo de introducción. Pero al igual que en los casos anteriores, los mismos no pueden ser preparados en un solo paso y se debe pasar por una etapa de formación de un complejo intermedio con el Tc en estado de oxidación III.

5.2.3.1 – Síntesis del precursor $^{99m}\text{Tc(III)}$

Para la síntesis del precursor de Tc (III) se parte de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y se emplea EDTA como ligando intermedio y SnCl_2 como agente reductor. La preparación del precursor puede ser realizada fácilmente colocando EDTA, manitol y el reductor en un vial y finalmente el pertechnetato. La reacción es muy rápida y simplemente, bastan muy pocos minutos a temperatura ambiente para la obtención del $^{99m}\text{Tc-EDTA}$ con una elevada pureza radioquímica.

El control de la pureza radioquímica del precursor se realiza por cromatografía en papel empleando 2 sistemas paralelamente, acetona y NaCl 0.9 % como fases móviles.

Sistema \ Rf	Rf = 0	Rf = 1
Acetona	$^{99m}\text{Tc-EDTA} + \text{Coloide}$	$^{99m}\text{TcO}_4^-$
NaCl 0.9 %	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{Coloide}$	$^{99m}\text{Tc-EDTA}$

Esta marcación es muy sencilla y en general salvo problemas en el estaño se obtiene un porcentaje de pureza radioquímica superior al 90%. A continuación se muestra el esquema de la preparación del complejo intermedio.

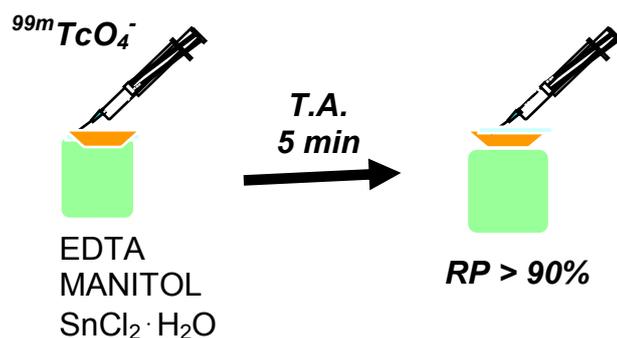


Figura 76 - Esquema de preparación del $^{99m}\text{Tc-EDTA}$

5.2.3.2– Síntesis de los complejos 5 y 6

Los LIGANDOS 5 y 6 fueron utilizados en la preparación de complejos 4+1 de Tc(III) mediante sustitución del precursor $^{99m}\text{Tc(III)-EDTA}$. Para ello se emplea un ligando tetradentado junto con el coligando conteniendo el grupo isonitrilo que actúa como monodentado, dando complejos neutros y en general muy lipofílicos.

En este estudio se emplea como ligando tetradentado a 2-[bis(2-mercaptoetil)amino]etanotiol, el cual coordina al metal a través del átomo de N y de los tres átomos de S (por lo que habitualmente se le llama simplemente NS_3 en alusión a los átomos donores). El complejo final es neutro debido a que la desprotonación de los tres H de los tioles compensa las tres cargas positivas del metal. El esquema de la marcación se muestra en la siguiente figura:

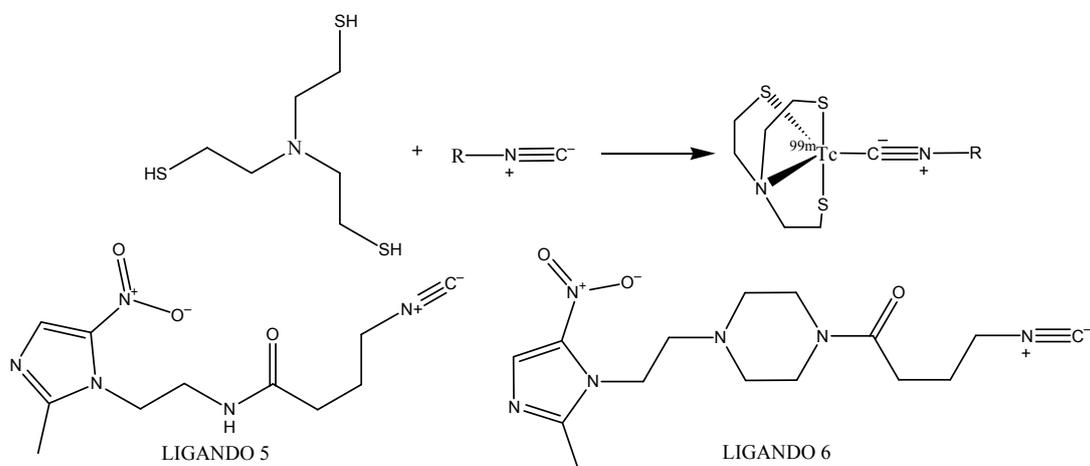


Figura 77 – Esquema de marcación de los COMPLEJOS 5 y 6

El análisis por HPLC de las mezclas de reacción muestra la presencia de varios productos. Para ambos ligandos el pico principal presenta una pureza radioquímica de alrededor del 50%. En ambas reacciones se obtienen resultados similares siendo necesaria una purificación por HPLC a fin de aislar las especies de interés previo al empleo de los complejos en posteriores estudios. A continuación se muestran los cromatogramas de los complejos antes y luego de la purificación por HPLC.

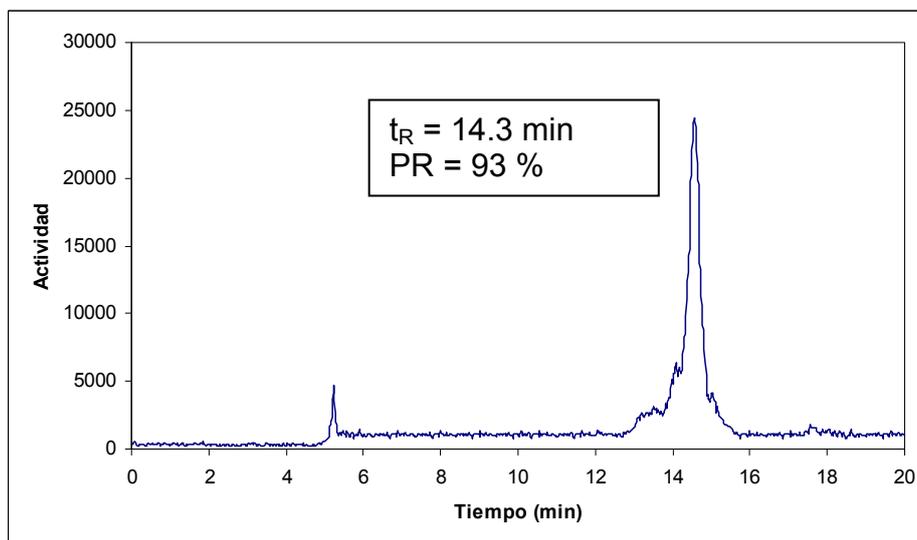
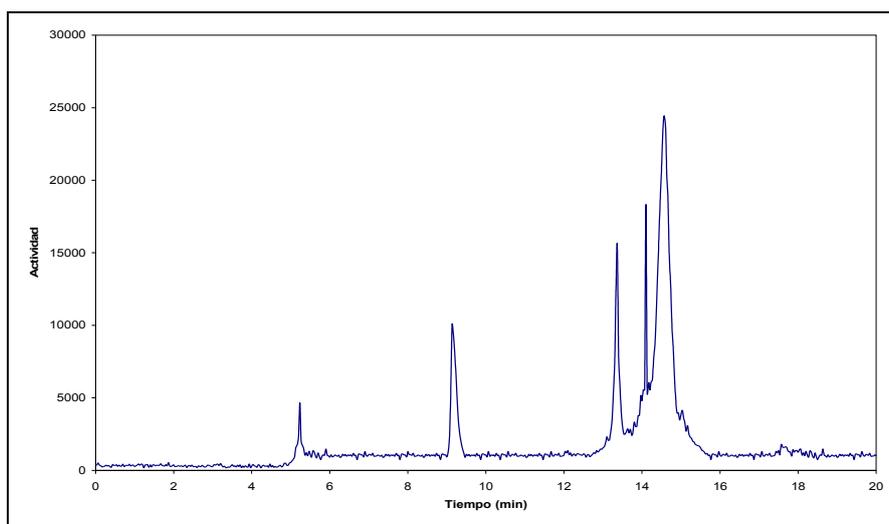


Figura 78 – HPLC del COMPLEJO 5 antes y luego de la purificación

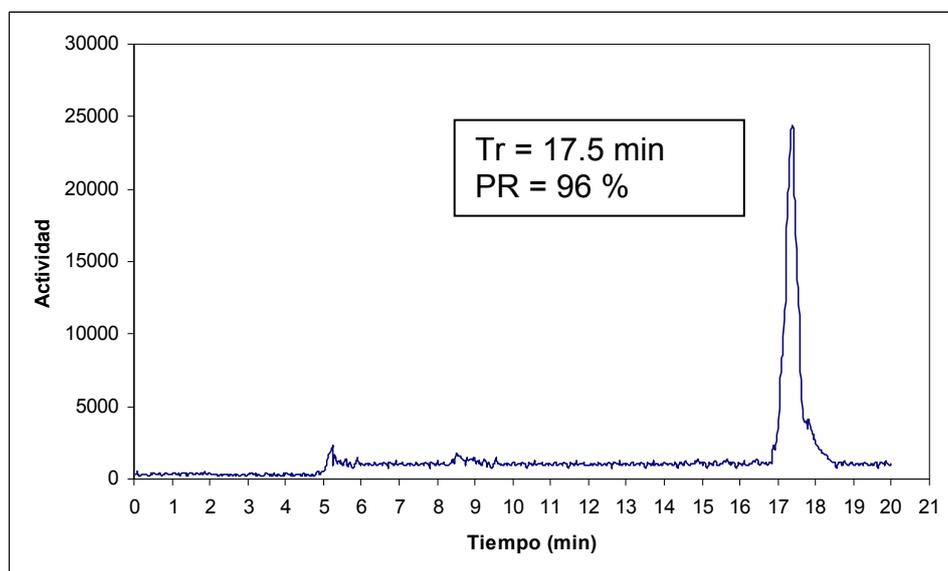
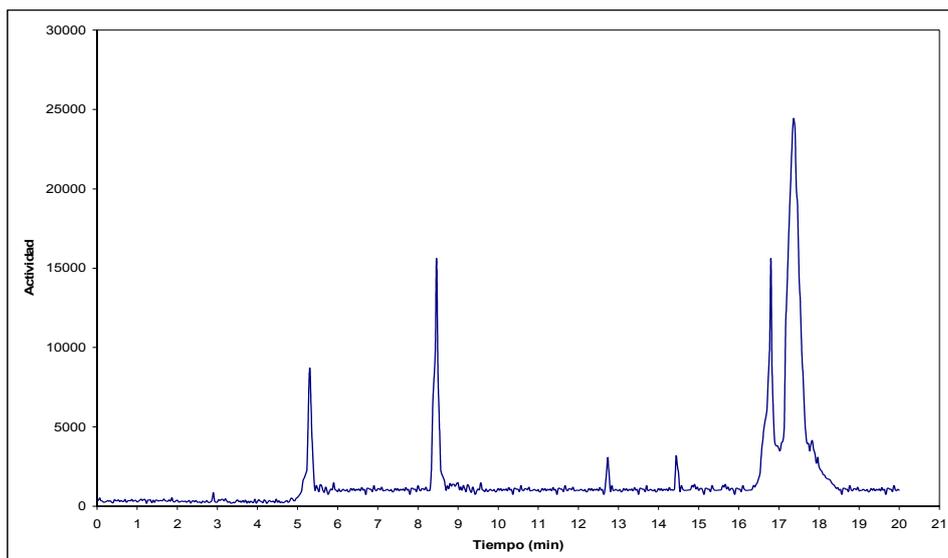


Figura 79 – HPLC del COMPLEJO 6 antes y luego de la purificación

En ambos cromatogramas se puede observar que luego de la purificación se obtiene una pureza radioquímica superior al 90 %, la radioactividad se mantiene por más de 4 horas a temperatura ambiente. Cabe destacar que al igual que en el resto de los complejos estudiados, una vez formados este tipo de complejos presenta una muy buena estabilidad a temperatura ambiente. En este caso se debe tener en cuenta que la estabilidad se estudia con el complejo purificado por HPLC, separado de los otros complejos de ^{99m}Tc formado y también del ligando. Por lo que, en este estudio de estabilidad el

complejo no está expuesto a un exceso de ligando. En los otros casos no se consideró necesario realizar una purificación de los complejos previo al estudio de la estabilidad del marcado a temperatura ambiente ya que en etapas posteriores se van a realizar estudios de estabilidad frente a plasma de los complejos aislados por HPLC.

5.2.4 – Estudios *in vitro* de los complejos de ^{99m}Tc.

5.2.4.1 – Lipofilicidad

La lipofilicidad se define como el coeficiente de partición del complejo entre un buffer pH=7, y octanol. Para la determinación, se emplea, en todos los casos, el complejo purificado por HPLC, aún en los casos que la pureza radioquímica fue superior al 90% de manera de realizar el estudio en iguales condiciones para todos los complejos de la serie. Los resultados obtenidos para los diferentes complejos se muestran en la siguiente figura:

	Lipofilicidad LogP
COMPLEJO 1	-0.44 ±0.04
COMPLEJO 2	-0.75 ±0.08
COMPLEJO 3	0.62 ±0.04
COMPLEJO 4	0.9 ±0.1
COMPLEJO 5	0.7 ±0.1
COMPLEJO 6	1.2 ±0.3

Figura 80 – Tabla de valores de lipofilicidad para los diferentes complejos.

La lipofilicidad 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. Estos complejos de

coordinación no poseen un transportador que les posibilite atravesar la membrana celular, por lo que su llegada al citoplasma es a través de la difusión pasiva por la membrana. Para ello el complejo debe tener una lipofilia adecuada de forma de permitir el pasaje. EL pasaje a través de una membrana esta determinado por la Ley de Fick, de difusión:

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

Donde K es el coeficiente de partición octanol/buffer, D es la difusión, A es el área, h el espesor de la membrana y C son la concentraciones.

No es bueno que la lipofilia de un complejo sea excesivamente alta, porque en ese caso tendría una baja eliminación renal y una alta eliminación hepatobiliar. Además presentará una lenta eliminación de los tejidos no blanco. En general los valores de LogP entre -0.5 y 2, a pH=7, se consideran óptimos para un buen pasaje por una membrana biológica. (107)

Observando los valores obtenidos para los complejos estudiados vemos que todos los complejos presentan una lipofilia adecuada, solo el COMPLEJO 2 no presenta un valor dentro de este rango, lo que implicará una baja lipofilia y dicho complejo presentara una menor penetración a través de la membranas y por lo tanto se espera una menor captación en los tejidos.

Las diferencias de los valores obtenidos de lipofilicidad para los diferentes complejos son consecuentes con lo esperado de acuerdo a sus estructuras.

Los complejos tricarbonílico presentan un core pequeño y para la serie de estudio son los que presentan la menor lipofilicidad (complejos 1 y 2). Mientras que en el otro extremo están los complejos 4+1 de Tc(III) (complejos 5 y 6), que a causa de la utilización del ligando tetradentado empleado para completar la esfera de coordinación (NS_3), se espera complejos finales mas lipofílicos que en otros casos. Existe la posibilidad de emplear un ligando tetradentado modificado, al cual se le agregan grupos polares en la estructura (grupos carboxilicos) para de esta manera modular la lipofilicidad de los complejos obtenidos, como el mostrado en la Figura 21. Los complejos con el core nitrado presentan una lipofilicidad similar a la de los complejos de Tc(III): sin embargo no hay que olvidar que este tipo de complejos presentan dos moléculas del ligando, lo que hace aumentar la lipofilicidad de los mismos.

Otro punto a observar es que los complejos con el linker conteniendo una piperacina presentan una mayor lipofilia que su análogo sin sistema cíclico, lo cual se correlaciona con lo esperado.

5.2.4.2 – Estabilidad frente a plasma

La estabilidad frente a plasma se realiza mediante la incubación del radiofármaco en plasma humano a 37 °C. Posteriormente se retiran muestras y se precipitan las proteínas del plasma mediante desnaturalización con alcohol absoluto a -15 °C. Finalmente se centrifuga la muestra y se inyecta el sobrenadante en el HPLC en las mismas condiciones que las empleadas para el control de la pureza radioquímica del complejo en estudio.

Esto se realiza con el fin de predecir la estabilidad de los complejos frente a un medio fuertemente competitivo como el biológico. En el plasma se encuentran muchas proteínas conteniendo grupos funcionales que pueden unirse al Tc desplazando a los ligandos de interés.

Los resultados de la estabilidad se muestran en la siguiente tabla:

Estabilidad en plasma a 37 °C Promedio $\pm \sigma_{n-1}$ (n=2)	% 0.5 h	% 1 h	% 2 h	% 4 h
COMPLEJO 1	99 \pm 2	95 \pm 3	92 \pm 2	88 \pm 2
COMPLEJO 2	98 \pm 1	95 \pm 1	94 \pm 3	91 \pm 2
COMPLEJO 3	99 \pm 2	98 \pm 3	98 \pm 1	95 \pm 1
COMPLEJO 4	99 \pm 3	93 \pm 2	88 \pm 3	87 \pm 3
COMPLEJO 5	97 \pm 2	96 \pm 2	96 \pm 2	95 \pm 4
COMPLEJO 6	94 \pm 2	90 \pm 2	89 \pm 4	85 \pm 2

Figura 81 -Tabla de estabilidad en plasma

En todos los casos se observa una muy buena estabilidad de los complejos frente a plasma humano. El COMPLEJO 6 muestra la menor estabilidad, con una pureza radioquímica de 85 % a las 4 horas de incubación. Corresponde aclarar que debido al método seleccionado para realizar este estudio, éste por si solo no es un indicador completo de la estabilidad del sistema. En este estudio se determina la fracción soluble, ya que las proteínas se desnaturalizan y se precipitan. Si existiera una transquelación del metal y el radionucleído quedara unido a las proteínas plasmáticas no sería determinado por este método ya que solo se analiza la fracción soluble.

Por ello, ésta determinación hay que analizarla conjuntamente con la capacidad de los complejos de unirse a proteínas plasmáticas, información que se comenta el siguiente punto.

5.2.4.3 – Unión a proteínas plasmáticas

Para la determinación de la unión a proteínas plasmáticas se escoge el método de gel filtración, por ser un método rápido y reproducible. Se incuba el plasma con el radiofármaco a 37 °C y se extraen muestras cada 30 minutos entre los 30 minutos y 4 horas de incubación a las que se separa la fracción unida de la libre por exclusión molecular. En todos los casos estudiados no se observa variación de los valores con el tiempo de incubación, por lo que se presentan los valores como el promedio de las determinaciones efectuadas a los distintos tiempos de incubación.

En general es deseable obtener valores bajos de unión a proteínas plasmáticas. Esto es debido a que la fracción que puede atravesar las membranas y penetrar a las células es la fracción libre. (107) Por lo que, si el complejo permanece fuertemente unido a las proteínas plasmáticas, no se encontrará disponible para permear hacia las células y además presentará una muy lenta depuración.

Sin embargo, la unión a proteínas plasmáticas puede ser debida a dos causas bien diferentes. La primera es que simplemente el radiofármaco presente una alta afinidad de unión a las proteínas plasmáticas y utilice este fenómeno para permanecer en el torrente sanguíneo. La otra posibilidad, es que la unión a proteínas implique una baja estabilidad, ya que si el complejo experimenta una

transquelación y como consecuencia el metal (radionucleido a detectar) queda unido a las proteínas se estará evaluando como una alta unión, cuando en realidad es una descomposición del complejo.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 82.

	Porcentaje de unión a proteínas plasmáticas (%) (n=5)
COMPLEJO 1	13 ±3
COMPLEJO 2	15 ±5
COMPLEJO 3	31 ±3
COMPLEJO 4	75 ±4
COMPLEJO 5	12 ±1
COMPLEJO 6	69 ±3

Figura 82 -Tabla indicando el % de unión a proteínas plasmáticas

En esta tabla podemos apreciar que los complejos conteniendo el core tricarbonílico (complejos 1 y 2) son los que presentan una menor unión a proteínas plasmáticas, siendo su valor máximo de 15 %, resultado que ratifica la alta estabilidad de este tipo de core frente al medio biológico.

Para los complejos conteniendo el core nitrado y los 4+1 de Tc(III) se observa que, aquellos compuestos que contienen el anillo de piperacina en la estructura presentan una elevada unión a proteínas plasmáticas. Esto indica que los complejos con estos ligandos o bien son inestables o presentan una elevada afinidad a las proteínas. Cabe aclarar que cualquiera sea el motivo, con estos valores obtenidos se espera que los mismos presenten una lenta depuración sanguínea y una alta captación hepatobiliar.

Como ejemplo, se pueden analizar los resultados extremos con los COMPLEJOS 5 y 6 que son estructuralmente idénticos y su única diferencia radica en la existencia del linker heterocíclico, conllevando a un aumento de unión a proteínas de 12 % y 69 %. Dicho fenómeno también se aprecia

claramente en los complejos con el core nitrado donde la unión a proteínas es de 31 % y 75 %, en el complejo conteniendo el ligando sin y con el linker de piperacina, respectivamente.

5.2.4.4 – Determinación de la captación por células en estado de hipoxia

Para la determinación de la captación por células en estado de hipoxia en cultivo, se coloca el radiofármaco en el medio de cultivo de células en estado de hipoxia (por remoción del oxígeno del medio), las cuales se incuban un tiempo determinado y luego se retira el medio de cultivo y se determina la actividad retenida. Este valor se compara con un cultivo en condiciones de oxia realizado en paralelo.

Con el fin de evaluar *in vitro* la capacidad de los complejos de ser retenidos preferencialmente en un tejido con bajo contenido de oxígeno se trabaja en el desarrollo y puesta a punto de un ensayo con una línea celular tumoral humana en cultivo. Los antecedentes bibliográficos (108,109) plantean realizar ensayos con células en cultivo en una atmósfera de nitrógeno, preincubadas un tiempo determinado, y posteriormente expuesta al radiofármaco directamente incorporado al medio de cultivo. Este ensayo en general se realiza sobre células tumorales murinas y se elimina el oxígeno del medio mediante burbujeo de nitrógeno en el mismo.

Dado que en el presente trabajo de tesis se emplean células humanas, un sistema de burbujeo de nitrógeno en el medio no garantiza las condiciones de bioseguridad necesarias. Para realizar este ensayo en condiciones seguras sería necesario una cámara hermética en la que se colocan las células en cultivo y se genera una atmósfera de CO₂ y N₂ en todo el recinto a 37 °C.

Como este tipo de dispositivos no está disponible en nuestro país se diseña y construye una cámara de cultivo a 37 °C en la cual poder mantener las células en atmósfera de N₂ durante el experimento.



Figura 83 - Estufa de cultivo construida para ensayo en hipoxia.

Para confirmar la ausencia de oxígeno se empleó un Oxímetro (YSI Modelo 58 con electrodo de oro y óxido de plata), el cual se coloca en el medio de cultivo con el fin de determinar el tiempo necesario para eliminar el oxígeno del medio en el frasco de cultivo. Los datos se muestran en la siguiente figura.

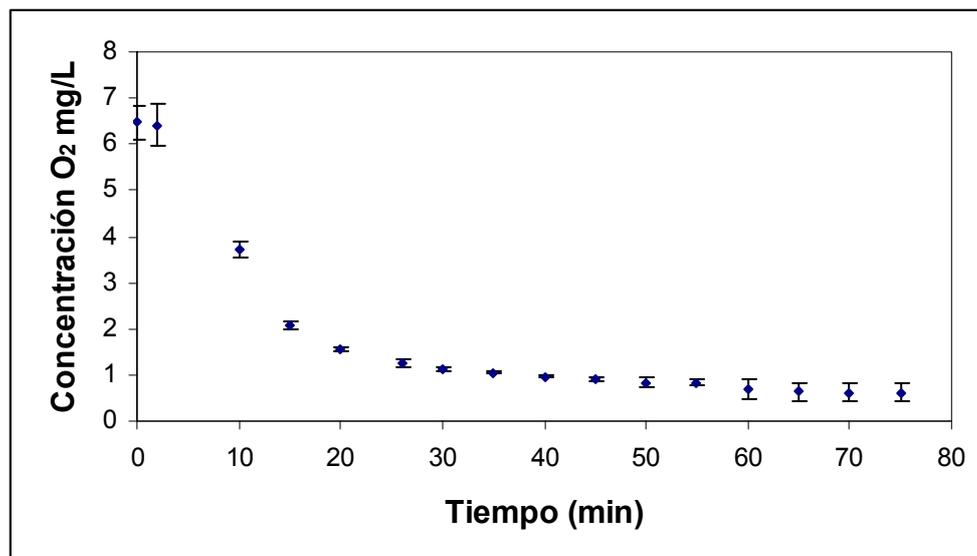


Figura 84 – Estudio de eliminación del oxígeno del medio de cultivo

En este estudio se determinó que la concentración de oxígeno del medio baja rápidamente como se ve en la Figura 84, y solo se necesitan 20 minutos con el fin de eliminar el mismo del medio, ya que valores menores a 2 mg/L de oxígeno se consideran condiciones de hipoxia (108,109) Además como en el momento de la inoculación es necesaria la apertura de la cámara para el

agregado del radiofármaco, es necesario alcanzar valores de oxígeno por debajo de 1 mg/L para que en la apertura no se supere el valor de 2 mg/L de oxígeno. Se decidió que, previo a la inoculación del radiofármaco en el medio se dejaron las células 60 minutos en la cámara con N₂ a fin mantener el oxígeno en niveles de hipoxia durante todo el ensayo.

El siguiente paso en la puesta a punto del ensayo consistió en determinar la viabilidad de las células expuestas a N₂. Para ello se realizó el estudio mediante citometría de flujo empleando yoduro de propidicio (IP) como marcador. La membrana plasmática de células vivas es impermeable al IP, pero puede ingresar a la célula cuando ésta ha perdido su integridad de membrana. Por tal motivo se utiliza para identificar las células muertas en una población celular (110), obteniendo los siguientes resultados:

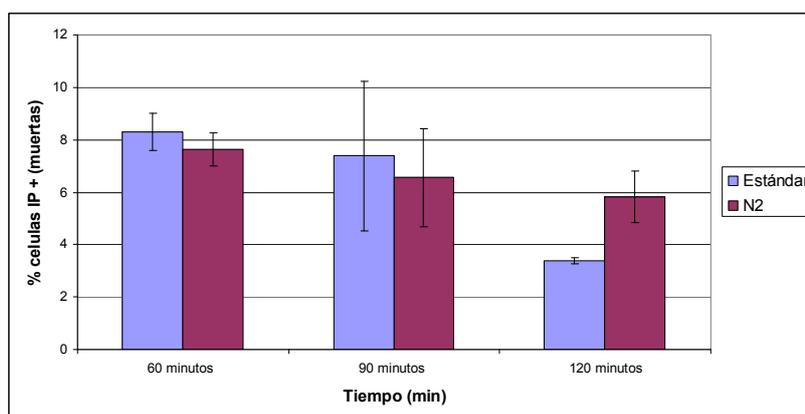


Figura 85 – Determinación del porcentaje de células no viables por citometría de flujo.

La figura muestra que el porcentaje de células muertas (células positivas al yoduro de propidicio) es de aproximadamente 8% a los 60 minutos (contados luego de los 60 minutos necesarios para eliminar el oxígeno). Asimismo, dicho porcentaje no presenta diferencia significativa entre los 60 y 90 minutos de exposición al N₂. Sin embargo, a los 120 minutos de incubación en condiciones de hipoxia se observa un aumento significativo ($p=0.05$, test t de comparación de medias) de células no viables comparado con el grupo control. Como conclusión, el estudio de la captación de los complejos de ^{99m}Tc por las

células en estado de hipoxia podría realizarse entre 60 y 90 minutos luego de eliminado el oxígeno sin que exista diferencia significativa de células muertas.

También se determinó el tiempo óptimo de incubación utilizando el COMPLEJO 1, obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 86.

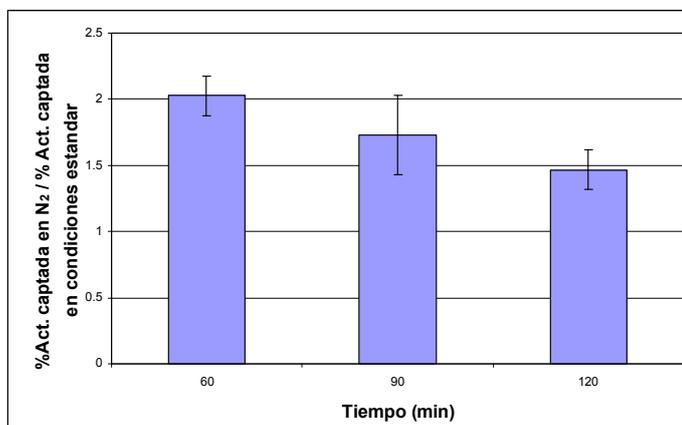


Figura 86 - Captación de las células en Nitrógeno / captación de las células en condiciones de cultivo estándar.

En la Figura 86 se observa que la relación de captación para el COMPLEJO 1 entre el cultivo en N₂ y el cultivo en condiciones normales no es significativamente diferente ($P=0.05$) entre los 60 y los 90 minutos, disminuyendo a los 120 minutos por el aumento de las células muertas. Por ello se decide emplear un tiempo de incubación de 60 minutos con el radiofármaco a fin de no alargar injustificadamente el tiempo total del ensayo.

También se estudia la reproducibilidad del ensayo con el COMPLEJO 1, obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 87.

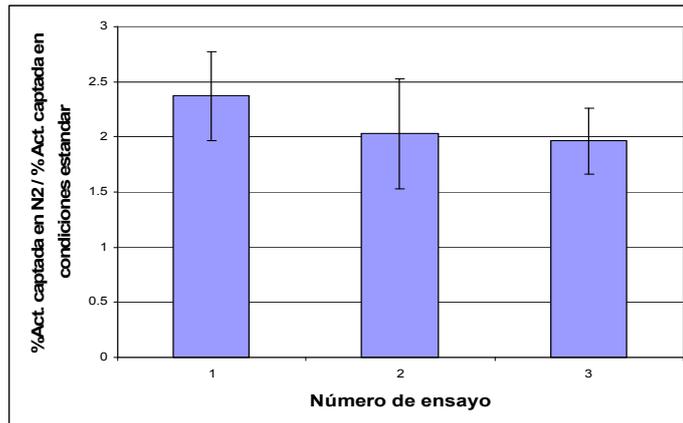


Figura 87 - Captación de las células en Nitrógeno / captación de las células en condiciones estándar para diferentes ensayos con el COMPLEJO 1.

Dados los resultados obtenidos en el este experimento anterior, en el que se demuestra que no existe diferencia significativa entre los diferentes ensayos realizados diferentes días ($P=0.05$, test t de comparación de medias), se concluye la puesta a punto del ensayo.

Apartir de todos los resultados, las condiciones seleccionadas para este estudio serán:

60 minutos de eliminación del oxígeno del medio, posterior agregado del radiofármaco e incubación durante 60 minutos adicionales.

Los resultados obtenidos para la serie de complejos en estudio en las condiciones seleccionadas se muestran en la Figura 88.

COMPLEJO	Relación % Actividad de células en hipoxia / % Actividad en células en oxa. (promedio \pm desviación estándar, n=3)
1	2.2 ± 0.3
2	1.6 ± 0.4
3	1.3 ± 0.2
4	1.5 ± 0.3
5	1.5 ± 0.2
6	1.4 ± 0.3

Figura 88 - Relaciones de la captación de células en cultivo.

Estos resultados muestran que, para todos los complejos, la captación y retención intracelular, en condiciones de hipoxia es superior a la captación y retención celular en condiciones estándar de cultivo, llevando a relaciones superiores a 1 en todos los casos. La mayor relación se obtuvo para el COMPLEJO 1, siendo este de 2.2 ± 0.3 .

No se observa correlación entre la estructura de los complejos, su lipofilia o su unión a proteínas plasmáticas y la relación de captación en hipoxia en células en cultivo.

5.2.5 – Evaluación in vivo de los complejos de ^{99m}Tc .

5.2.5.1 – Biodistribución en animales normales.

La biodistribución de los COMPLEJOS 1 al 6 es evaluada primeramente en ratones normales a fin de caracterizar el comportamiento de los mismos y determinar las vías preferenciales de eliminación.

Los complejos de ^{99m}Tc purificados por HPLC y diluídos en suero fisiológico fueron inyectados en ratones CD1 por vía intravenosa.

Para todos los complejos se observa que los mismos no experimentan reoxidación in vivo debido a la baja captación encontrada en tiroides y estómago durante todo el período.

Las siguientes figuras muestran las tablas de los resultados obtenidos, expresados en porcentaje de dosis inyectada / órgano. ($X \pm \sigma_{n-1}$ con $n = 3$) y el gráfico con los órganos más relevantes.

COMPLEJO 1

Orgáno\Tiempo	0.5 h	2 h	4 h
Sangre	0.90 ± 0.25	0.47 ± 0.04	0.24 ± 0.15
Hígado	9.42 ± 2.30	5.56 ± 1.14	4.84 ± 0.25
Corazón	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.01
Pulmón	0.08 ± 0.03	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Bazo	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Riñón	1.12 ± 0.27	0.24 ± 0.04	0.15 ± 0.02
Tiroides	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01
Músculo	1.84 ± 0.22	0.33 ± 0.04	1.09 ± 0.61
Ves. biliar	0.13 ± 0.05	1.36 ± 0.45	0.14 ± 0.08
Estómago	0.68 ± 0.12	0.10 ± 0.06	0.99 ± 0.09
Intestino	35.25 ± 5.80	28.07 ± 9.13	46.86 ± 2.39
Vejiga + orina	48.29 ± 8.36	63.15 ± 9.16	64.86 ± 4.95

Figura 89 –Tabla de datos de biodistribución normal del COMPLEJO 1

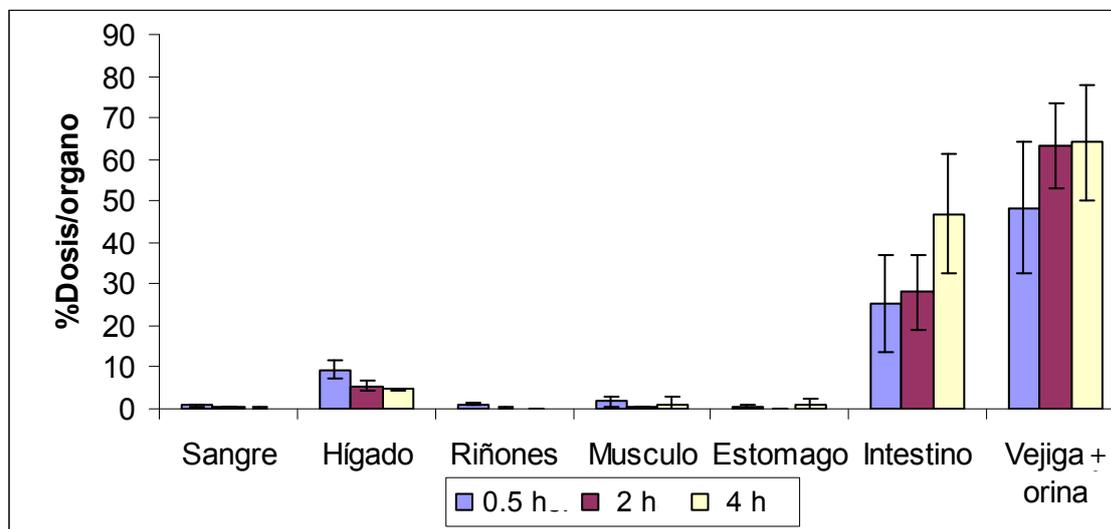


Figura 90 –Gráfico de biodistribución normal del COMPLEJO 1 con los órganos más significativos

En el gráfico de este complejo se observa el comportamiento característico de un complejo de una lipofilia baja: Baja actividad en sangre y rápida

depuración, eliminación combinada por vía hepatobiliar (46.86 ± 2.39 4 h) y urinaria (64.86 ± 4.95 4 h), así como una baja actividad en el resto de los órganos. Este complejo presenta un muy buen perfil de biodistribución para un radiofármaco.

COMPLEJO 2

Órgano\Tiempo	0.5 h	2 h	4 h
Sangre	8.20 ± 0.98	2.07 ± 0.03	2.00 ± 0.18
Hígado	35.52 ± 4.06	19.67 ± 2.31	21.92 ± 4.31
Corazón	0.40 ± 0.09	0.09 ± 0.03	0.09 ± 0.08
Pulmón	0.61 ± 0.09	0.16 ± 0.03	0.13 ± 0.09
Bazo	0.54 ± 0.31	0.08 ± 0.04	0.15 ± 0.03
Riñón	11.82 ± 2.99	5.42 ± 1.06	5.16 ± 0.44
Tiroides	0.13 ± 0.05	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01
Musculo	5.42 ± 2.66	2.26 ± 0.80	1.80 ± 0.28
V. biliar	1.40 ± 0.09	0.97 ± 0.62	0.66 ± 0.13
Estómago	1.68 ± 0.58	0.61 ± 0.12	0.39 ± 0.21
Intestino	23.04 ± 6.01	27.59 ± 2.74	32.09 ± 7.78
Vejiga + orina	26.69 ± 5.37	39.85 ± 6.78	35.02 ± 5.34

Figura 91 –Tabla de datos de biodistribución normal del COMPLEJO 2

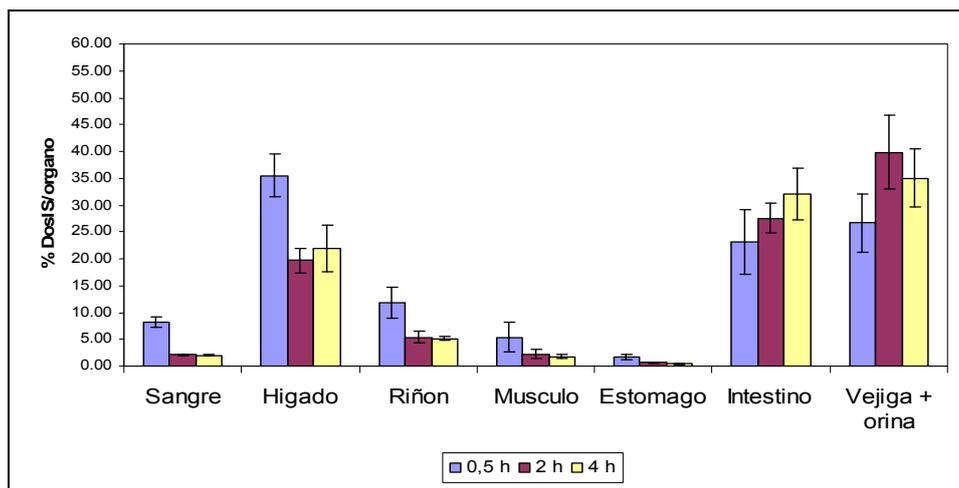


Figura 92 - Gráfico de biodistribución normal del COMPLEJO 2 con los órganos más significativos

Para el COMPLEJO 2 se observa que el mismo también presenta una alta eliminación combinada, siendo la urinaria del 35.02 ± 5.34 a las 4 horas y la hepatobiliar de 35.02 ± 5.34 a las 4 horas. La actividad en sangre para este complejo es 10 veces superior a la del complejo 1 y además presenta una elevada actividad en hígado (21.92 ± 4.31 4 h) y alta actividad en riñón (5.16 ± 0.44 4 h), pudiendo deberse la misma a una degradación enzimática. Si bien este complejo presenta una estructura similar a la del COMPLEJO 1, en este caso presenta en su estructura al aminoácido cisteína, el cual puede favorecer el ataque de las enzimas sobre el mismo.

COMPLEJO 3

Órgano\Tiempo	0.5 h	2 h	4 h
Sangre	4.53 ± 1.40	1.91 ± 0.11	1.98 ± 1.69
Hígado	10.82 ± 0.95	5.89 ± 1.63	9.36 ± 0.70
Corazón	0.21 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.05
Pulmón	0.72 ± 0.10	0.37 ± 0.04	0.48 ± 0.02
Bazo	0.24 ± 0.03	0.11 ± 0.08	0.22 ± 0.04
Riñón	4.93 ± 0.17	4.42 ± 0.06	6.57 ± 2.81
Tiroides	0.06 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Musculo	6.60 ± 1.11	2.40 ± 0.56	3.21 ± 1.58
V. Biliar	2.98 ± 1.01	3.36 ± 1.02	2.57 ± 1.24
Estomago	1.11 ± 0.12	0.82 ± 0.30	0.56 ± 0.11
Intestino	22.72 ± 1.57	28.59 ± 2.22	26.55 ± 4.41
Vejiga + Orina	25.75 ± 3.93	41.10 ± 3.37	39.03 ± 7.24

Figura 93 –Tabla de datos de biodistribución normal del COMPLEJO 3

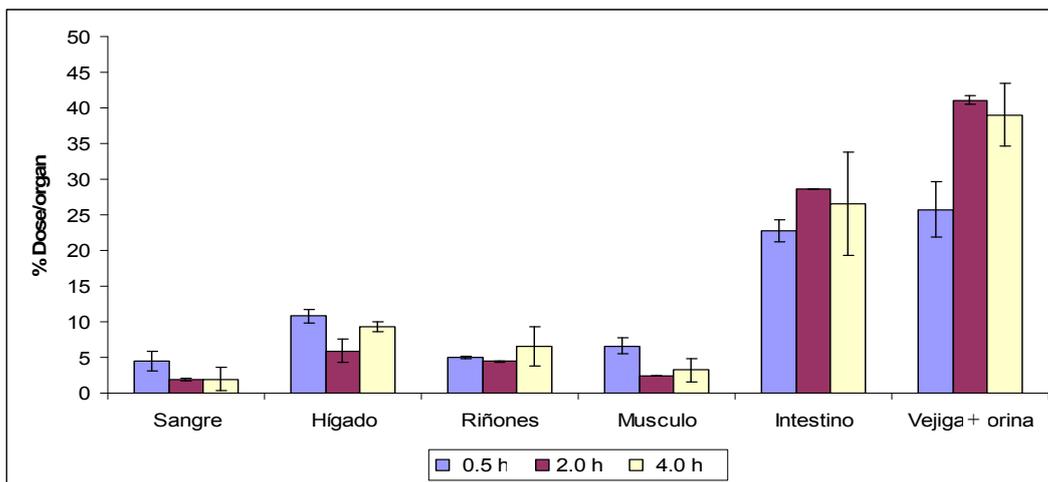


Figura 94 – Gráfico de biodistribución normal del COMPLEJO 3 con los órganos más significativos

El COMPLEJO 3 presenta una biodistribución consistente con su lipofilidad y su unión a proteínas plasmáticas. La eliminación es menor que la del COMPLEJO 1, pero igualmente muestra un buen perfil para un radiofármaco de diagnóstico. Se observa una baja actividad en sangre (menor al 5% en todos los tiempos), una baja actividad en hígado (alrededor del 10%) y una eliminación combinada por vía urinaria (35% a las 4 horas) y hepatobiliar (26.55 ± 4.41 4 h).

COMPLEJO 4

Orgáno\Tiempo	0.5 h	4 h
Sangre	0.77 ± 0.19	1.07 ± 0.30
Hígado	52.74 ± 0.65	55.13 ± 9.07
Corazón	0.42 ± 0.08	0.35 ± 0.07
Pulmón	18.09 ± 1.20	13.27 ± 3.46
Bazo	6.94 ± 1.36	7.49 ± 0.67
Riñon	1.88 ± 0.13	1.74 ± 0.28
Tiroides	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Musculo	1.55 ± 1.04	2.94 ± 1.35
Ves. biliar	0.16 ± 0.17	0.21 ± 0.09
Estómago	0.48 ± 0.18	0.60 ± 0.21
Intestino	7.11 ± 0.84	7.45 ± 1.47
Vejiga + orina	4.87 ± 1.07	5.96 ± 3.29

Figura 95 –Tabla de datos de biodistribución normal del COMPLEJO 4

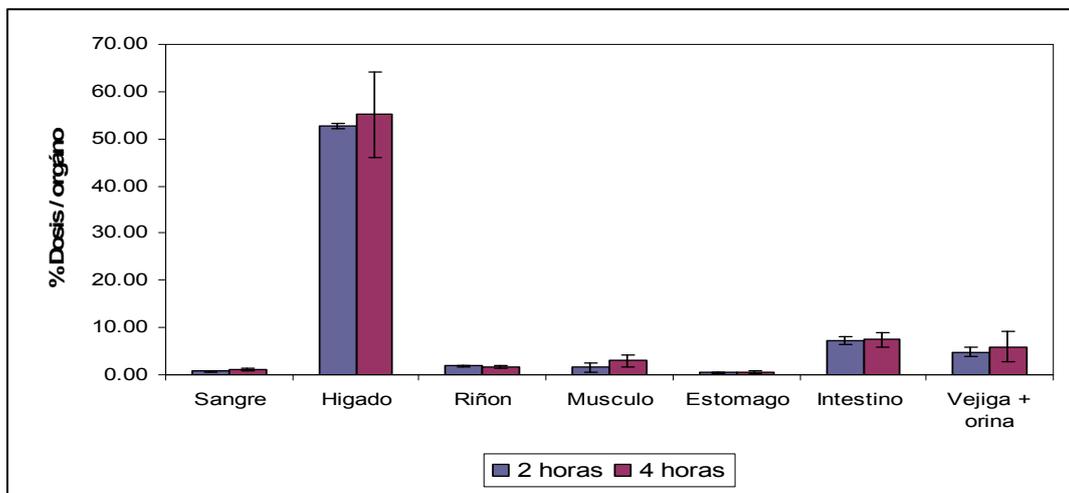


Figura 96 – Gráfico de biodistribución normal del COMPLEJO 4 con los órganos más significativos

Debido a la alta unión a proteínas plasmáticas que presentan los COMPLEJOS 4 y 6, los mismos serían inadecuados como radiofármacos de diagnóstico. Por dicho motivo, teniendo en consideración los conceptos de ética en el manejo de animales de experimentación no sería razonable realizar la biodistribución de estos complejos. Sin embargo, igual se decide realizar la biodistribución a 2 tiempos (2 y 4 h) para ambos COMPLEJOS a fin de realizar una correlación entre los valores de los estudios in vitro y los de la biodistribuciones.

El COMPLEJO 4 muestra un inadecuado perfil de biodistribución, el cual está relacionado con la alta unión a proteínas plasmáticas que conlleva a una alta actividad en hígado (55.13 ± 9.07 % a las 4 h) y una baja eliminación.

COMPLEJO 5

Órgano\Tiempo	0.5 h	2 h	4 h
Sangre	6.20 ± 1.54	2.24 ± 0.66	1.31 ± 0.54
Hígado	12.82 ± 0.95	5.03 ± 0.90	9.26 ± 1.61
Corazón	0.38 ± 0.05	0.22 ± 0.12	0.09 ± 0.03
Pulmón	0.61 ± 0.21	0.34 ± 0.08	0.28 ± 0.09
Bazo	0.34 ± 0.04	0.26 ± 0.11	0.12 ± 0.02
Riñon	4.53 ± 0.19	3.08 ± 1.05	6.27 ± 2.27
Tiroides	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01
Musculo	6.65 ± 1.37	2.30 ± 0.66	3.11 ± 1.98
Ves. biliar	2.78 ± 0.99	3.12 ± 1.23	2.43 ± 0.86
Estómago	1.07 ± 0.10	0.80 ± 0.44	0.61 ± 0.15
Intestino	25.05 ± 3.32	32.26 ± 3.92	29.88 ± 3.20
Vejiga + Orina	22.42 ± 3.57	37.76 ± 3.55	35.69 ± 3.93

Figura 97 –Tabla de datos de biodistribución normal del COMPLEJO 5

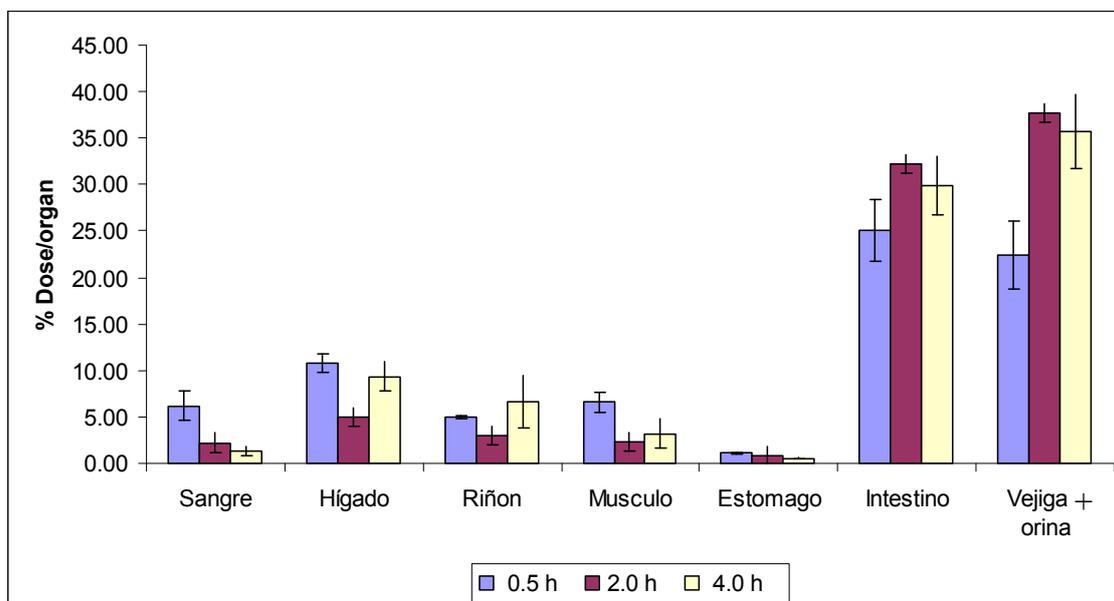


Figura 98 – Gráfico de biodistribución normal del COMPLEJO 5 con los órganos más significativos

El COMPLEJO 5 presenta una biodistribución similar a la del COMPLEJO 3, una buena eliminación combinada por vía urinaria (35.69 ± 3.93 % a las 4 h) y hepatobiliar (29.88 ± 3.20 4 h), una baja actividad en sangre (1.31 ± 0.54 4 h) y en hígado (9.36 ± 1.61 4 h). Estos valores son consistentes con los datos de lipofilicidad y de unión a proteínas plasmáticas obtenidos y hacen que este complejo también presente un perfil adecuado para su empleo como radiofármaco de diagnóstico.

COMPLEJO 6

Orgáno\Tiempo	2 h	4 h
Sangre	3.57 ± 0.56	1.31 ± 0.54
Hígado	50.00 ± 1.91	54.00 ± 1.61
Corazón	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.05
Pulmón	0.37 ± 0.04	0.48 ± 0.02
Bazo	0.11 ± 0.08	0.22 ± 0.04
Riñon	4.76 ± 0.61	6.57 ± 2.81
Tiroides	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Musculo	1.75 ± 0.72	3.21 ± 1.58
Ves. biliar	1.12 ± 0.18	1.61 ± 0.47
Estómago	3.36 ± 1.02	2.57 ± 1.24
Intestino	0.82 ± 4.34	0.56 ± 0.11
Vejiga + Orina	9.00 ± 3.92	10.00 ± 2.69

Figura 99 - Biodistribución normal del COMPLEJO 6

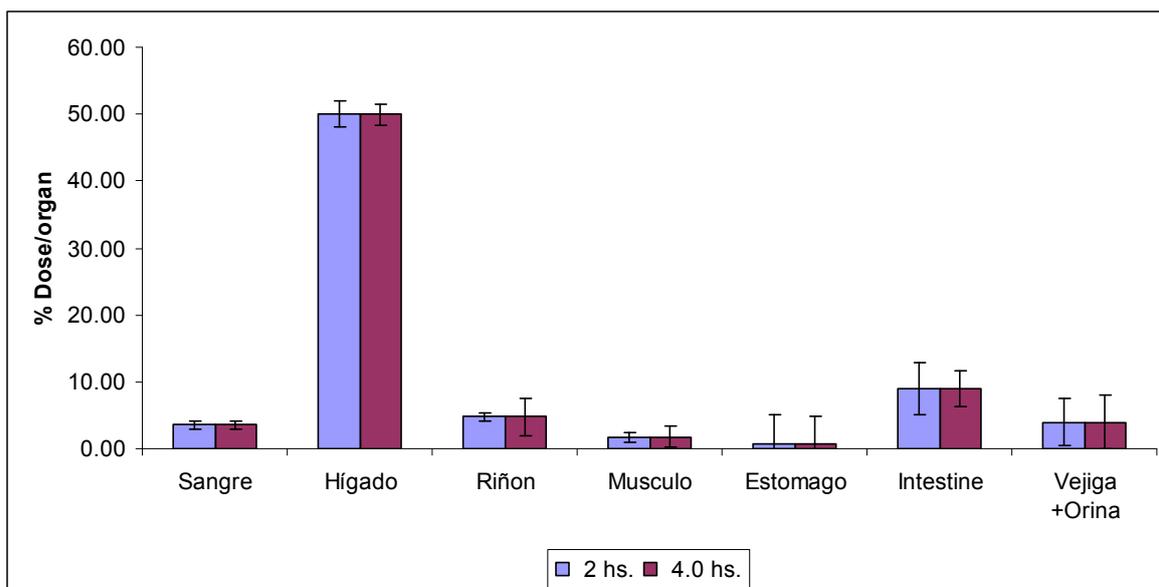


Figura 100 – Gráfico de biodistribución normal del COMPLEJO 6 con los órganos más significativos

El COMPLEJO 6 presenta un perfil similar al del COMPLEJO 4, con una alta captación en hígado ($54.00 \pm 1.61\%$ a las 4 h) y una pobre eliminación urinaria ($10.00 \pm 2.69\%$ a las 4 h). Con este perfil de biodistribución, al igual que el COMPLEJO 4, este complejo no es adecuado como radiofármaco de diagnóstico. Este complejo confirma que la inclusión de un anillo de piperacina en la molécula estaría determinando una alta unión a proteínas y por lo tanto un mal perfil de biodistribución con alta captación en hígado.

5.2.5.2 – Estudio de la correlación entre parámetros fisicoquímicos y biológicos

Complejo	1	2	3	4	5	6
% Actividad en Intestino a las 2 h	30 ±8	28 ±3	28 ±2	7 ±1	31 ±4	9 ±4
% Actividad en Vejiga + Orina a las 2 h	60 ±5	40 ±6	41 ±3	5 ±1	38 ±4	4 ±1

Figura 101 – Tabla de eliminación de los diferentes complejos a las 2 horas post inyección

En la Figura 101 se muestran los porcentajes de eliminación por las dos vías (urinaria y hepatobiliar) para todos los complejos a las 2 horas post inyección. En ella se aprecia como se comentó antes que la mayor eliminación se da para el Complejo1.

A continuación se muestran las graficas que correlacionan el porcentaje de eliminación vs. la lipofilia y el porcentaje de eliminación vs. la unión a proteínas plasmáticas para los diferentes complejos.

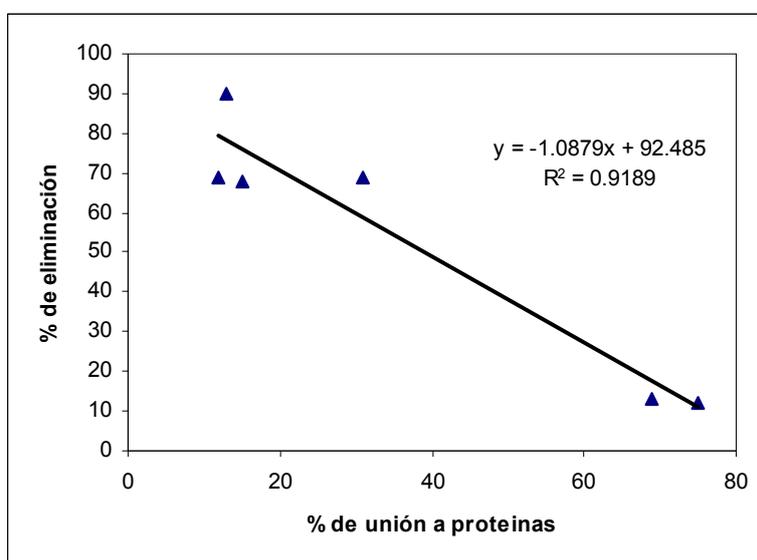


Figura 102 - Correlación entre la eliminación y la unión a proteínas plasmáticas.

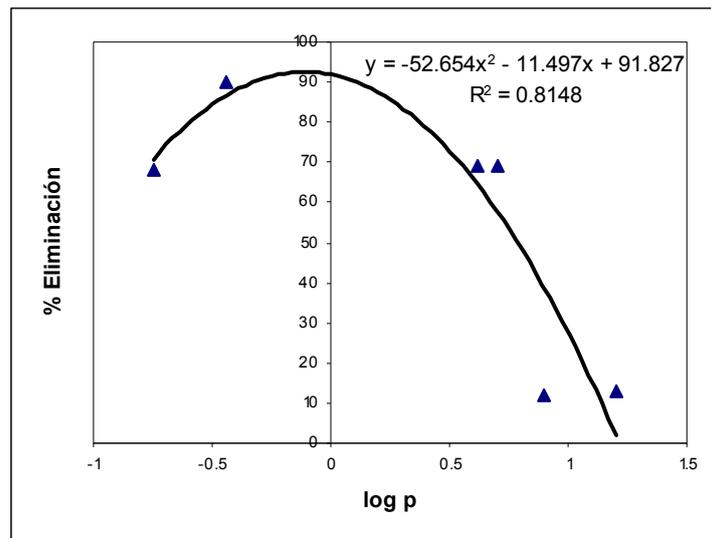


Figura 103 - Correlación entre la eliminación y el Log P

Como se observa en estos gráficos efectivamente existe una correlación entre los datos de eliminación obtenidos en la biodistribución y los parámetros fisicoquímicos obtenidos para los diferentes complejos. Entre la unión a proteínas plasmáticas y el porcentaje de eliminación (Figura 102) se observa una buena correlación lineal, ya que a medida que aumenta el porcentaje de unión a proteínas plasmáticas existe menos cantidad del radiofármaco libre capaz de filtrar por el glomérulo.

En el gráfico de eliminación vs lipofilidad (Figura 103) se observa un comportamiento cuadrático típico de los parámetros dependientes de la lipofilia. Esto es debido a que una muy alta lipofilidad no es adecuada ya que el radiofármaco presentara una alta eliminación hepatobiliar y una lenta depuración en general, por el contrario si la lipofilidad es muy baja el radiofármaco tendrá una baja penetración a las células tumorales. En el gráfico anterior se observa un rango de lipofilidad intermedio ($\log P = -0.2 \pm 0.1$), para el cual se maximiza la eliminación. Esto es un factor importante a tener en cuenta en el desarrollo de futuros radiofármacos para hipoxia, dado que si requiere aumentar la eliminación han de buscarse fármacos que presenten una lipofilidad de -0.3 a 0.2 y baja unión a proteínas plasmáticas.

5.2.5.3 – Biodistribución en animales portadores de tumores inducidos.

La biodistribución en animales portadores de tumores se realiza en ratones C57B16 inoculados subcutáneamente con células 3LL (carcinoma de Lewis murino), en condiciones de biodistribución similares a las realizadas para las normales, empleando tiempos de 0.5, 1, 2 y 4 horas. Se emplean estas células debido a que se necesitaba para este ensayo una línea celular que generase tumores sólidos con zonas de hipoxia. De las líneas murinas accesibles ésta es la que cumplía con las condiciones, las cuales son confirmadas mediante el estudio de anatomía patológica.

En las siguientes tablas se presentan los resultados obtenidos, expresados en porcentaje de dosis inyectada / g órgano. ($X \pm \sigma_{n-1}$ con $n = 3$) para tumor, músculo y sangre. Los demás órganos no se presentan porque sus valores son comparables a los obtenidos para la biodistribuciones normales.

COMPLEJO 1

	% Dosis inyectada / g órgano			
	30 minutos	1 horas	2 horas	4 horas
% Tumor/g (T)	0.63 ± 0.06	0.22 ± 0.07	0.28 ± 0.07	0.19 ± 0.05
% Sangre/g (S)	1.2 ± 0.6	0.29 ± 0.04	0.15 ± 0.04	0.10 ± 0.02
% Músculo/g (M)	0.19 ± 0.05	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.05 ± 0.02
Rel T/M	3.3 ± 0.1	2.4 ± 0.1	3.11 ± 0.09	4.22 ± 0.07
Rel T/S	0.5 ± 0.1	0.76 ± 0.1	1.86 ± 0.09	1.90 ± 0.07

Figura 104 – Biodistribución en animales portadores de tumores para el COMPLEJO 1.

La captación en el tumor fue moderada para todos los tiempos (0.6 %/g a los 30 min a 0.2 %/g de 1 a 4h), pero las relaciones T/M resultaron favorables entre las 0.5 y 4h (4.2 % Dosis inyectada / g órgano a las 4h) debida a una

rápida depuración de tejidos blandos como músculo y a la rápida depuración de sangre (1.2 a los 30 minutos a 0.1 a las 4 horas). La rápida depuración sanguínea lleva a una relación tumor/sangre favorable luego de las 2 horas post inyección.

Para la determinación de la significación de la diferencia encontrada entre la captación en el tumor y el en el músculo se realiza el test t de student con un nivel de significación del 99.95% para todo los complejos evaluados. (111)

La captación en el tumor se mantiene prácticamente constante, luego del rápido descenso inicial al tercio del valor entre las 0.5 y 1 hora. Existiendo una diferencia significativa entre el % dosis inyectada / g órgano en el músculo y en el tumor (P=0.05) entre las 2 y las 4 h post inyección. Esto indicaría que existe un proceso de retención del complejos dentro de las células tumorales que hace que la actividad en éstas se mantenga constante mientras disminuye en el resto de los órganos. Este complejo presenta una buena relación entre el órgano blanco y el no blanco, conjuntamente con una buena depuración de los tejidos lo que lo hace un buen candidato a radiofármaco para hipoxia.

COMPLEJO 2

	% Dosis inyectada / g órgano			
	30 minutos	1 horas	2 horas	4 horas
% Tumor/g (T)	1.3 ± 0.4	0.5 ± 0.1	0.31 ± 0.03	0.4 ± 0.1
% Sangre/g (S)	5.7 ± 0.9	2.17 ± 0.08	1.43 ± 0.08	1.4 ± 0.2
% Músculo/g (M)	1.0 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.25 ± 0.07	0.20 ± 0.03
Rel T/M	1.3 ± 0.5	1.7 ± 0.2	1.2 ± 0.1	2.0 ± 0.1
Rel T/S	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2

Figura 105 – Biodistribución en animales portadores de tumores para el COMPLEJO 2.

La captación por el tumor también fue moderada para este complejo pero presenta valores del doble que el COMPLEJO 1, lo cual no se explicaría

unicamente con la diferencia de lipofilidad del mismo. Ya que este complejo presenta una menor lipofilidad y esto en teoría daría una menor penetración a través de la membrana. La captación en el tumor también se mantiene prácticamente constante entre las 1 y 4 horas luego de la disminución ocurrida entre las 0.5 y 1 horas post inyección. Las relaciones T/M resultaron menos favorables entre las 0.5 y 4h (2.0 a las 4h) que para el COMPLEJO 1 y la diferencia del porcentaje de dosis inyectada / g órgano entre el músculo y el tumor resulta significativa (P=0.05) solamente para las 4 h. Esto es debido a que este complejo presenta una menor depuración de tejidos blandos como músculo y una menor depuración de sangre (1.4 a las 4 horas) que en el caso del COMPLEJO 1.

COMPLEJO 3

	% Dosis inyectada / g órgano			
	30 minutos	1 horas	2 horas	4 horas
% Tumor/g (T)	1.2 ± 0.4	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3
% Sangre/g (S)	3.7 ± 0.2	3.5 ± 1.2	1.7 ± 0.2	1.0 ± 0.1
% Músculo/g (M)	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.56 ± 0.07	0.40 ± 0.02
Rel T/M	0.28 ± 0.03	0.30 ± 0.17	0.65 ± 0.21	1.15 ± 0.32
Rel T/S	1.63 ± 0.26	1.29 ± 0.10	1.80 ± 0.17	2.43 ± 0.75

Figura 106 – Biodistribución en animales portadores de tumores para el COMPLEJO 3.

La captación por el tumor oscilo de 1.2 a los 30 min a 1.0 %/g de a las 4h. Este complejo a diferencia de los anteriores muestra una captación prácticamente constante desde el inicio del estudio. Las relaciones T/M resultaron favorables entre las 0.5 y 4h (2.0 a las 4h) debida a una menor captación de los tejidos blandos como músculo. El % dosis inyectada / g órgano entre tumor y músculo presentan una diferencia (P=0.05) entre las 2 y 4 horas.

En este caso también se observa unos valores de tumor/sangre favorables siendo esta diferencia mayor a 1 a lo largo de todo el período de estudio.

COMPLEJO 4

	% Dosis inyectada / g órgano			
	30 minutos	1 horas	2 horas	4 horas
% Tumor/g (T)	-	-	0.5 ± 0.3	-
% Sangre/g (S)	-	-	1.9 ± 0.4	-
% Músculo/g (M)	-	-	0.34 ± 0.09	-
Rel T/M	-	-	1.50 ± 0.37	-
Rel T/S	-	-	0.28 ± 0.07	-

Figura 107 – Biodistribución en animales portadores de tumores para el COMPLEJO 4.

La captación en animales portadores de tumores inducidos para el COMPLEJO 4 se estudió solamente a las 2 horas post inyección. Esto es debido a que con los datos obtenidos de los estudios fisicoquímicos (alta unión a proteínas plasmáticas) y de la biodistribución en animales normales (alta captación en hígado) y por motivos éticos no se justifica el empleo de más animales en este estudio. Igualmente se decide realizar un único tiempo a fin de tener los datos para este complejo para luego poder realizar un estudio comparativo.

Aunque la captación por el tumor fue baja, siendo de 0.5 %/g de a las 2h, la relación T/M resultó favorable. El % dosis inyectada / g órgano entre el tumor y el músculo presenta una diferencia significativa (P=0.05). Esto indicaría que a pesar de las propiedades desfavorables de este compuesto, el mismo presenta una captación selectiva por las células tumorales.

COMPLEJO 5

	% Dosis inyectada / g órgano			
	30 minutos	1 horas	2 horas	4 horas
% Tumor/g (T)	2.5 ± 0.3	2.2 ± 0.5	1.9 ± 0.4	1.2 ± 0.2
% Sangre/g (S)	4.1 ± 0.4	3.8 ± 1.0	1.9 ± 0.3	1.2 ± 0.6
% Músculo/g (M)	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.6	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.2
Rel T/M	2.8 ± 0.4	2.4 ± 0.9	2.4 ± 0.5	2.0 ± 0.4
Rel T/S	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.4

Figura 108 – Biodistribución en animales portadores de tumores para el COMPLEJO 5.

La captación por el tumor fue buena, siendo de 2.5 %/g a los 30 min a 1.2 %/g de a las 4h. Las relaciones T/M resultaron favorables entre las 0.5 y 4h (2.0 a las 4h). En este caso se observa unos valores de tumor/sangre no tan favorables siendo esta diferencia menor o igual a 1 a lo largo de todo el período de estudio.

La captación en el tumor presenta una lenta depuración de 2.5 a los 30 minutos a 1.2 a las 4 horas. El % dosis inyectada / g órgano entre el tumor y el músculo presenta una diferencia significativa ($P=0.05$) a todos los tiempos estudiados.

COMPLEJO 6

	% Dosis inyectada / g órgano			
	30 minutos	1 horas	2 horas	4 horas
% Tumor/g (T)	-	-	0.4 ± 0.2	-
% Sangre/g (S)	-	-	2.3 ± 0.6	-
% Músculo/g (M)	-	-	0.2 ± 0.1	-
Rel T/M	-	-	2.0 ± 0.7	-
Rel T/S	-	-	0.2 ± 0.8	-

Figura 109 – Biodistribución en animales portadores de tumores para el COMPLEJO 6.

La captación en animales portadores de tumores inducidos para el COMPLEJO 6, al igual que para el COMPLEJO 4 es únicamente estudiada a las 2 horas post inyección, por las consideraciones explicadas para el COMPLEJO 4. La captación por el tumor fue baja, siendo de 0.5 %/g a las 2h. La relación T/M resultó favorable, pero el test estadístico indica que en realidad el % dosis inyectada / g entre el músculo y el tumor en este caso no presenta una diferencia significativa (P=0.05).

De la serie de complejos evaluados, el COMPLEJO1 es el que presenta un mejor perfil como radiofármaco de diagnóstico, ya que presenta una buena estabilidad in vivo, muy buena depuración, la relación T/M más alta (4.22±0.07 a las 4 h) y una relación T/S mayor a 1 entre 2 y 4 horas.

El otro compuesto que también mostro un buen perfil es el COMPLEJO 3, que si bien no logro relación tumormúsculo tan alta (1.15±0.32 a las 4 h) como el COMPLEJO 1, este presenta un buen perfil general de biodistribución: actividad en sangre baja (1.98±1.69 a las 4 h), baja actividad en hígado (9.36±0.70 a las 4 h) y eliminación combinada por vía urinaria y hepatobiliar (39.03±7.24 y 26.55±4.41 respectivamente). La captación en tumor fue buena

(% dosis/g 1.0 ± 0.3 a las 4 h), además presenta una relación T/S durante todo el periodo de estudio (1.63 ± 0.26 a las 0.5 h - 2.43 ± 0.75 a las 4 h).

El otro complejo que también podría ser adecuado sería el COMPLEJO 5, el cual muestra un perfil general similar al del COMPLEJO 3, actividad baja en sangre (1.31 ± 0.54 a las 4 h), actividad baja en hígado (9.56 ± 0.70 a las 4 h) y eliminación combinada por vía urinaria y hepatobiliar (35.69 ± 3.93 y 29.88 ± 3.20 respectivamente). La captación en tumor fue buena (% dosis/g 1.2 ± 0.2 a las 4 h), pero la relación T/S no fue tan buena, siendo menor o igual a 1 durante todo el periodo de estudio (0.6 ± 0.3 a las 0.5 h - 1.0 ± 0.4 a las 4 h).

5.3 – Estudios estructurales de los complejos con Re estable..

Para la realización de estudios químicos y de elucidación estructural no es posible el trabajo con ^{99m}Tc , debido a que este se encuentra en concentraciones de 10^{-7} a 10^{-10} M y es imposible obtenerlo en cantidades mayores. Además el Tc no posee ningún isótopo estable.

Sin embargo, los estudios químicos pueden realizarse utilizando el isótopo ^{99}Tc , emisor β^- con un $t_{1/2} = 2.1 \times 10^5$ años, con el que puede trabajarse en cantidades de miligramos, siempre que se disponga de un laboratorio equipado para la manipulación de emisores β^- en estado sólido, debido al riesgo de contaminación. Otra estrategia es utilizar para dichos estudios el Re, elemento que pertenece a la misma familia del Tc y posee isótopos estables. Además, debido al fenómeno de la contracción lantánida, los elementos de la tercera serie de transición presentan un radio atómico mucho más pequeño de lo esperado. Por lo tanto el Tc y Re presentan radios atómicos casi iguales y sus propiedades químicas son casi idénticas. Teniendo en cuenta estos hechos, puede anticiparse con alta probabilidad que complejos análogos de Tc y Re van a tener el mismo tamaño, forma, momento dipolar, carga formal, movilidad iónica y lipofilicidad en casi todos los casos.

Existen numerosos estudios sobre complejos de Tc y Re que reafirman lo anteriormente expuesto. (52-61)

En todos los casos al contar con cantidades limitadas de los ligandos para su preparación en gran escala, en este trabajo se realiza el análisis estructural de los complejos obtenidos mediante espectrometría de masas.

El primer paso luego de la síntesis consiste en la separación del crudo de reacción mediante HPLC analítico. Para este estudio se utiliza una columna analítica y no una preparativa que permitiría la separación de mayor cantidad de muestra de una sola vez, debido a que la espectrometría de masas es una técnica muy sensible y el HPLC analítico logra una mejor resolución de los picos y por lo tanto una mejor separación. En la siguiente imagen se muestra como ejemplo el cromatograma del complejo de ^{99m}Tc y del de Re estable para el COMPLEJO 1, del cual se aisló el pico correspondiente para el análisis de masa.

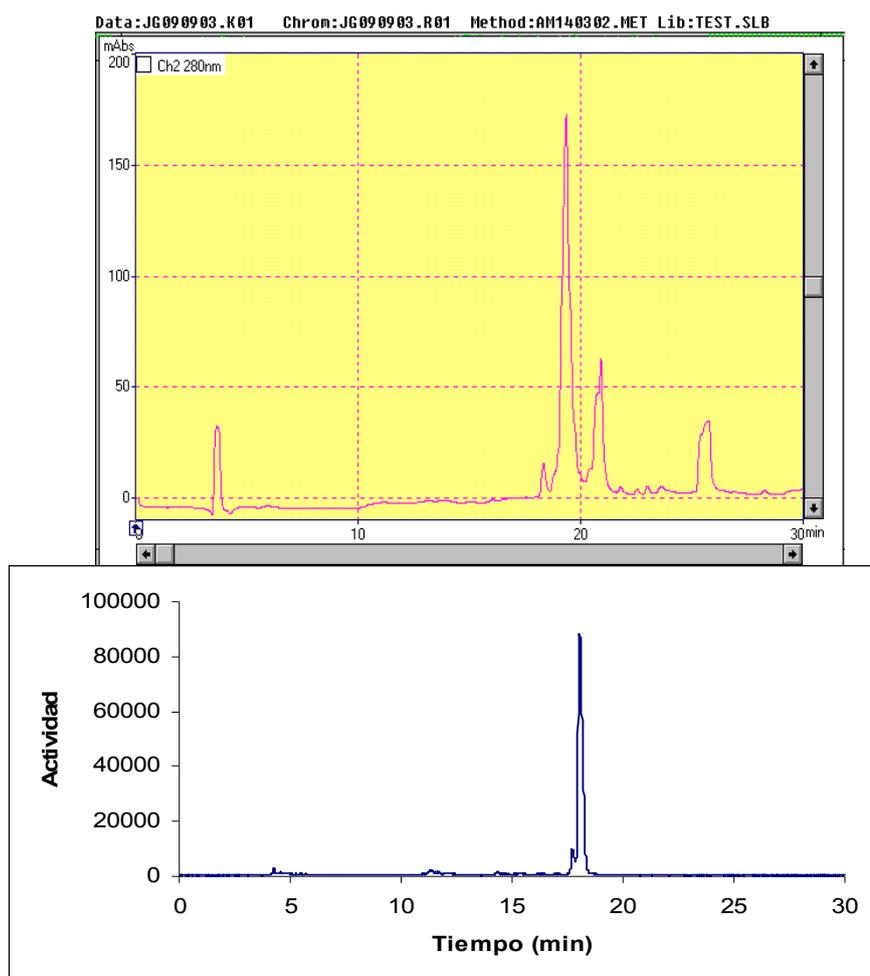


Figura 110 – Comparación de cromatogramas para el COMPLEJO 1 de Re estable con detección UV y ^{99m}Tc con detección gamma.

En todos los casos con el complejo de Re estable se obtuvo un pico principal coincidente con el tiempo de retención de los complejos de ^{99m}Tc . Las pequeñas diferencias en los tiempos pueden ser debidas a que un detector está a continuación del otro y que en el detector UV el comienzo del cromatograma es automático y en el caso del gamma es manual.

5.3.1 – COMPLEJOS 1 y 2 de Re estable

La síntesis del precursor se realizó a partir de $\text{Re}_2(\text{CO})_{10}$ en un proceso en dos etapas según se muestra en el siguiente esquema.

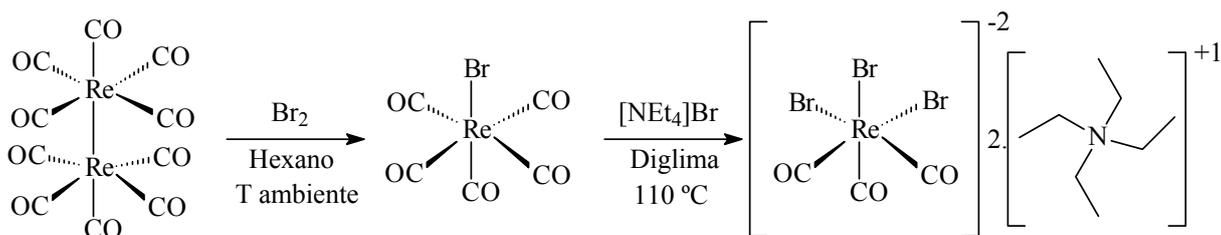


Figura 111 – Esquema de síntesis del precursor de Re-tricarbonilo

La primera etapa consistió en la síntesis del $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}$ por sustitución nucleofílica con Br_2 realizada en hexano a temperatura ambiente.

Luego de realizada la purificación por sublimación la estructura se corroboró mediante espectroscopia IR, el cual se muestra en la siguiente figura.

File # 1 = REBRCO5	Mode = 2 (Mid-IR)	11/1/1983 3:09
Sample Description: 18/8		
Scans = 30	Res = 4 cm-1 21 scans/min	Apod = Cosine

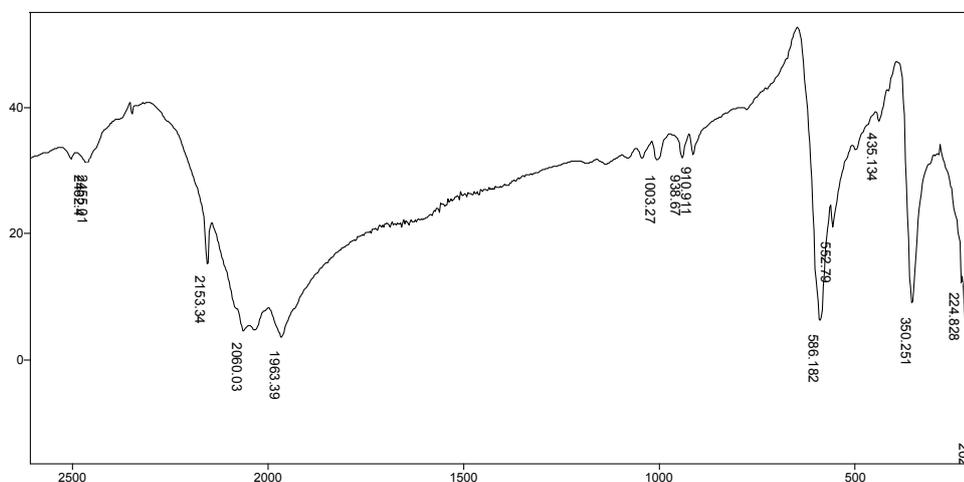


Figura 112 - IR del $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}$.

El espectro IR muestra las bandas características de estiramiento simétrico y asimétrico del enlace Re-CO a 1963 cm^{-1} y 2060 cm^{-1} . La banda correspondiente al enlace Re-Br aparece a frecuencia 202 cm^{-1} , la cual se encuentra en el límite del rango del equipo. Estos datos coinciden con la bibliografía y permiten por lo tanto confirmar la identidad del complejo formado.

Posteriormente el $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}$ se hizo reaccionar con Net_4Br (bromuro de tetraetilamina) en diglima para realizar la sustitución de 2 carbonilos por 2 Br. De esta manera se obtuvo el precursor tricarbónico con la geometría adecuada para luego por simple sustitución de las moléculas de Br obtener los complejos de interés.

Una vez sintetizado se obtuvo el espectro IR para confirmar la estructura del compuesto formado.

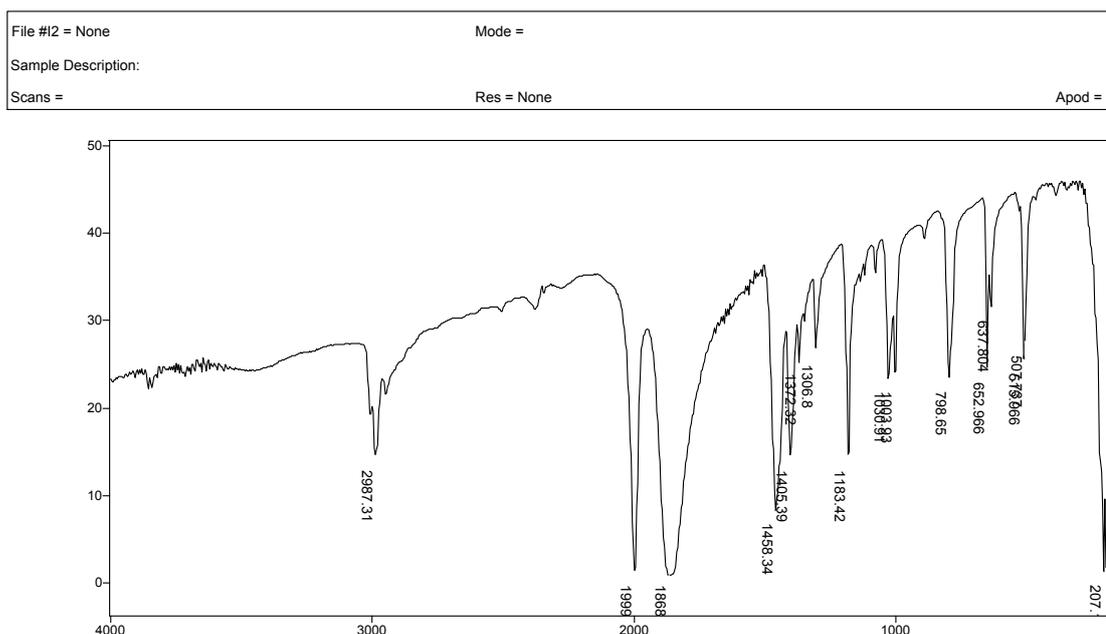


Figura 113 - IR del $[\text{Net}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$.

En el espectro IR se observan las bandas características del estiramiento simétrico y asimétrico del carbonilo en estos complejos a 1868 cm^{-1} y 1999 cm^{-1} . La banda correspondiente al Re-Br no se observa porque en este tipo de complejos aparecen a frecuencias menores a 200 cm^{-1} . Si se observan las bandas características de la tetraetil amina a frecuencias de 2948, 2987 y 3008 cm^{-1} .

En virtud de los datos obtenidos y los datos bibliográficos del IR se concluye que la identidad del producto formado fue la esperada.

Finalmente se realiza la sustitución empleando cantidades equimoleculares de precursor y ligandos, para luego aislar el pico correspondiente al complejo mediante HPLC.

Para el COMPLEJO 1 no se obtiene el ión de relación m/z equivalente al ión molecular característico de un complejo de Re, formado por los isótopos 185 y 187. Sin embargo, se observan iones a m/z en la región 969-973, y especialmente en la región 846-852 que podrían corresponder a una especie dimerizada, ya que dichos grupos de iones se presentan con una distribución de abundancias relativas características de dos átomos de Re en una molécula,

M (30%), M+1 (8%), M+2 (100%), M+3 (28%), M+4 (87%), M+5 (24%), M+6(4%). Esto se muestra en la siguiente figura.

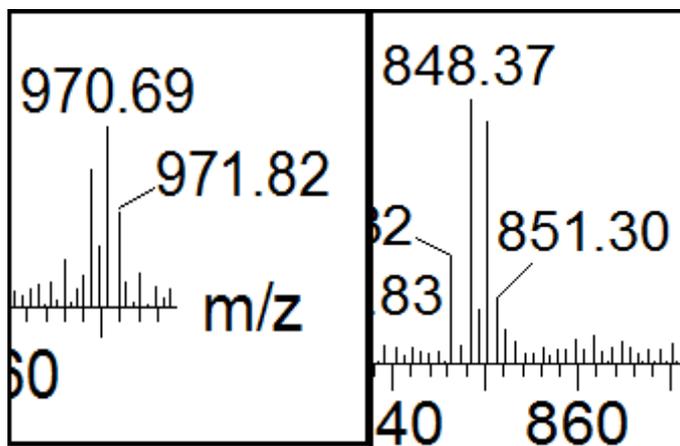


Figura 114 – Zona seleccionada del espectro de masas del COMPLEJO 1 de Re estable

Para el COMPLEJO 2 de Re estable, al igual que para el COMPLEJO 1, no se observa el ión m/z correspondiente al ión molecular, pero parece observarse algún grupo de iones correspondientes a fragmentos del complejo dimerizado, como se muestra en la siguiente figura.

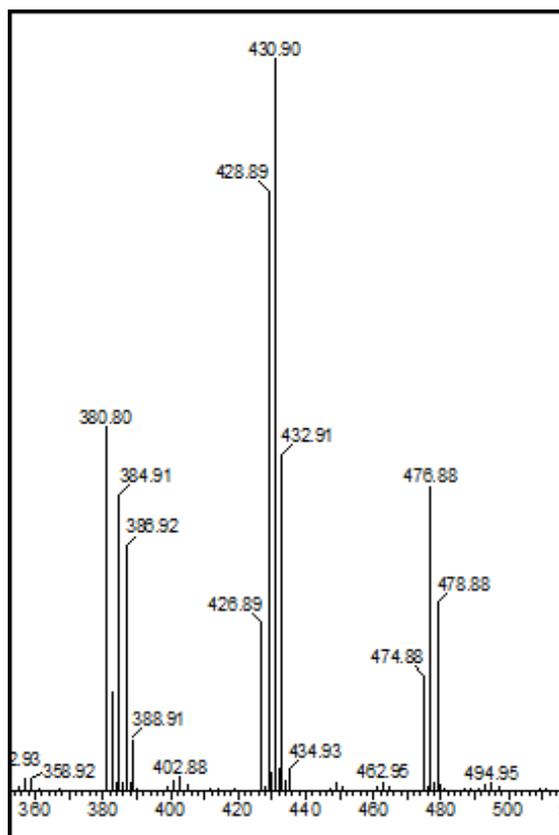


Figura 115 – Zona seleccionada del espectro de masas del COMPLEJO 2 de Re estable

Para ambos complejos es necesario realizar más estudios a fin de corroborar o descartar las estructuras propuestas. Esto se debe a que al realizar la síntesis en diferentes escalas es posible que aparezcan otras especies que no se observan en la preparación de complejos de ^{99m}Tc .

5.3.2 – COMPLEJOS 3 y 4 de Re estable

La síntesis del precursor se realiza según el siguiente esquema:

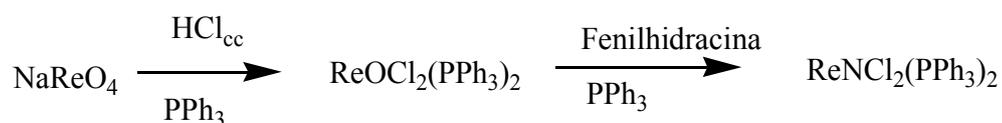


Figura 116 – Esquema de síntesis del precursor de $\text{Re(V)}\equiv\text{N}$.

El primer paso consiste en la preparación del complejo trans-oxotriclorobistrifenilfosfino Re(V) [ReOCl₃(PPh₃)₂], precursor frecuentemente utilizado en la preparación de monoxo complejos de Re(V). El mismo se obtuvo con alto rendimiento (>85%) por reacción de perrenato de sodio con trifenilfosfina en medio clorhídrico. Su identidad fue corroborada por la presencia en el espectro IR de la banda de absorción característica al estiramiento asimétrico del Re=O a 969 cm⁻¹.

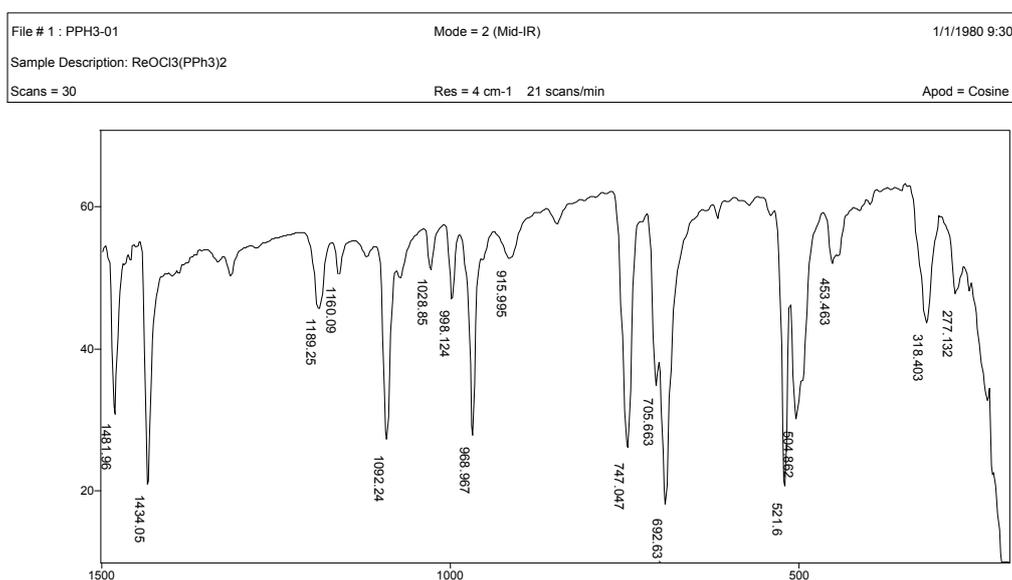


Figura - 116 Espectro IR del ReOCl₃(PPh₃)₂

Luego el complejo formado se hace reaccionar con cloruro de fenilhidrazina a fin de sustituir el O por un N y obtener el precursor nitrado correspondiente. El complejo obtenido se controla por análisis elemental corroborando la obtención del mismo (%N teórico = 1.76 %, %N experimental 1.79%).

Finalmente se realiza la sustitución de los ligandos empleando 2 moles de ligandos por cada mol de complejo y su posterior purificación mediante HPLC analítico, para separar el pico correspondiente al tiempo de retención del complejo de ^{99m}Tc para la realización de los espectros de masas de ambos complejos.

Si bien para los COMPLEJOS 3 y 4, de Re estable, en los espectros de masas no se identifican los iones moleculares ciertos iones indicarían la presencia de los complejos deseados.

Por ejemplo para el COMPLEJO 3 se observa el ión de m/z 249/251 que, por su valor y su distribución isotópica, indicaría la presencia del sistema ReS_2 , y los iones de m/z 631/633 y 633/635 indicarían la presencia del fragmento del complejo en el que se perderían los NO como se muestra en la siguiente figura.

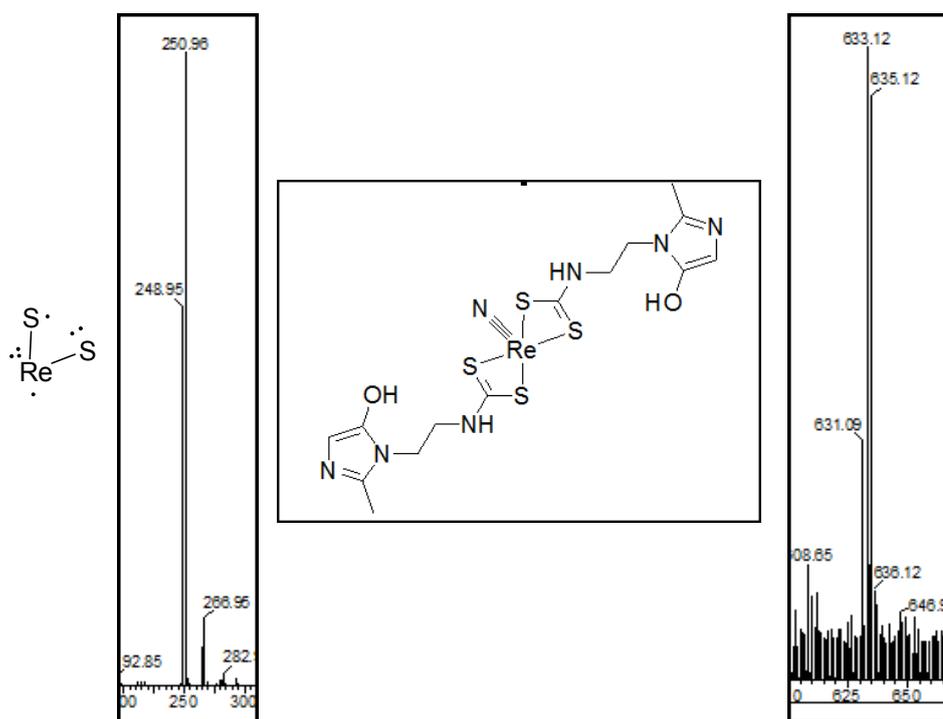


Figura 117 – Zona seleccionada del espectro de masas del COMPLEJO 3 de Re estable

Para el COMPLEJO 4 no se observa la presencia de los iones m/z correspondientes al ión molecular o de fragmentos de éste, únicamente se observan los iones a m/z 249/251, que por su valor y su distribución isotópica, indicaría la presencia del sistema ReS_2 .

Al igual que para los COMPLEJOS 1 y 2 en este caso también es necesaria la realización de mas experimentos para poder confirmar o descartar la estructura propuesta.

5.3.3 – COMPLEJOS 5 y 6 de Re estable

Los complejos de Re(III) 4 +1 son sintetizados empleando el precursor preparado por el grupo del Dr. Pietzsch por sustitución con el coligando correspondiente en relación molar 1 a 1 según el siguiente esquema.

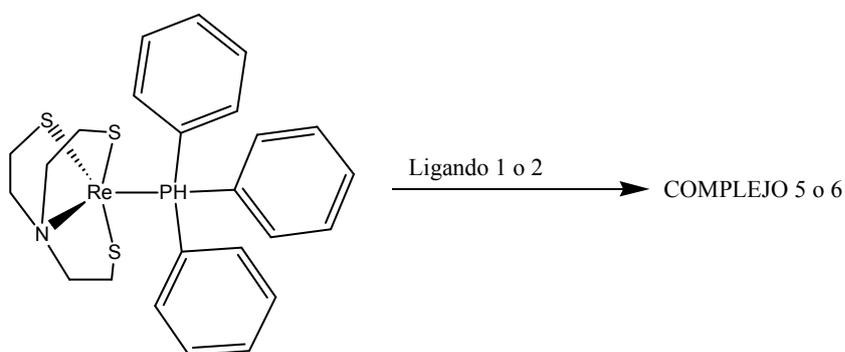
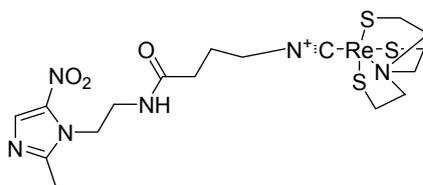


Figura 118 – Esquema de síntesis de los complejos 5 y 6

Luego de la sustitución, el crudo de reacción se separa mediante HPLC empleando la columna analítica para obtener el complejo correspondiente con el tiempo de retención del complejo de ^{99m}Tc para el análisis de masa.

Para los COMPLEJOS 5 y 6 se observan en ambos casos la presencia del ión *m/z* correspondiente al ión molecular, con la distribución isotópica correspondiente a los dos isótopos del Re, confirmando la formación de los complejos con la estructura propuesta. Cabe destacar que, a pesar que el espectro de masas de los ligandos correspondientes no mostrase el ión molecular, en el complejo es posible identificar el mismo. Los espectros de ambos complejos se muestran en las siguientes figuras.



m/e: 646 (100,0%), 644 (54,3%), 647 (23,1%), 648 (15,9%), 645 (12,7%), 649 (3,2%), 650 (1,0%)

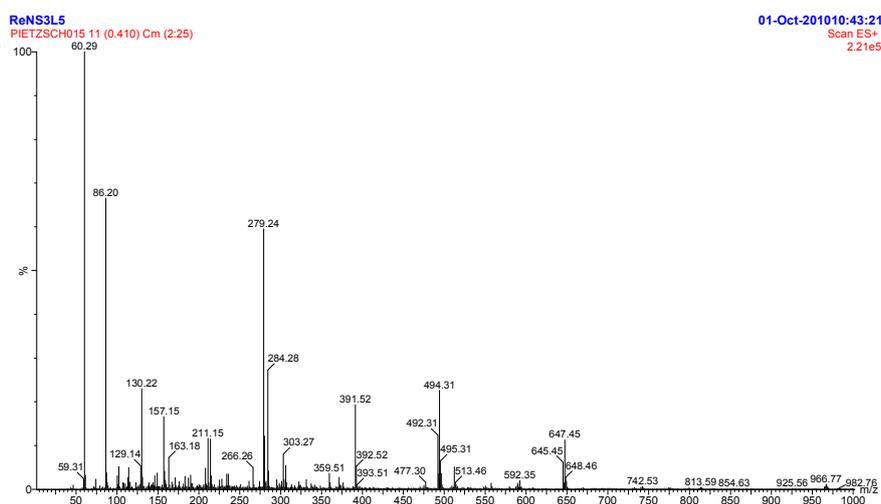
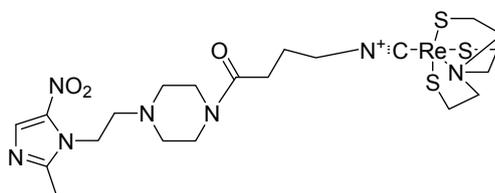


Figura 119 – Espectro de masas del COMPLEJO 5 de Re estable



m/e: 715 (100,0%), 713 (53,9%), 716 (27,7%), 717 (17,0%), 714 (15,2%), 718 (3,9%), 719 (1,2%)

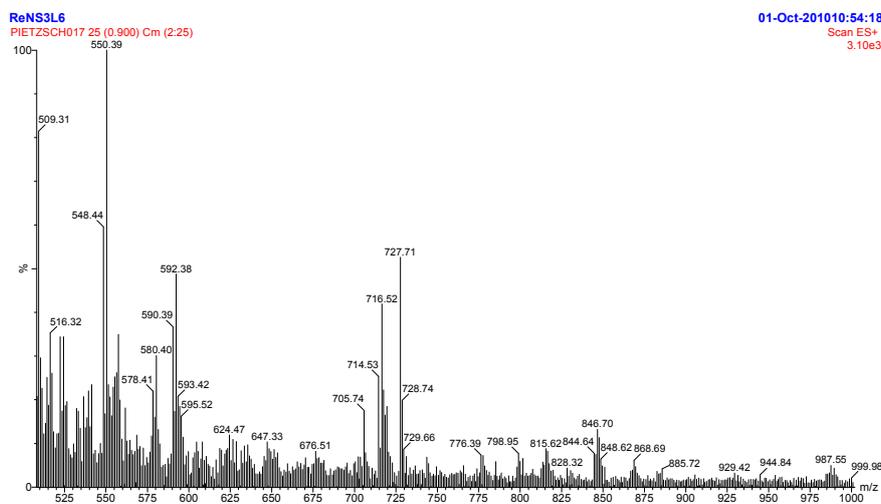


Figura 120 – Espectro de masas del COMPLEJO 6 de Re estable

6 – Conclusiones

Se pudo lograr con éxito la síntesis de una serie de 6 ligandos conteniendo el grupo 5-nitroimidazol como farmacoforo. Partiendo del reactivo metronidazol[®], comercialmente disponible, se llevaron a cabo las modificaciones químicas necesarias con el fin de preparar complejos de ^{99m}Tc en los diferentes estados de oxidación. La estructura de los ligandos fue confirmada mediante espectroscopia de RMN e IR y espectrometría de masas.

El empleo de los LIGANDOS 1 y 2 en la preparación de los complejos de ^{99m}Tc(I)-tricarbonílicos lleva a la formación de una única especie con elevada pureza radioquímica, que se mantuvo estable por al menos 4 horas. Los LIGANDOS 3 y 4 se emplearon para formar los complejos simétricos de ^{99m}Tc(V)-nitrido. En ambos casos se obtuvo una única especie, la cual es estable por al menos 4 horas a temperatura ambiente.

Al emplear los LIGANDOS 5 y 6 en la formación de los complejos 4+1 de Tc(III), se generaron complejos con una pureza radioquímica cercana al 50%, por lo que debieron ser purificados mediante HPLC previo a su uso. Una vez purificados resultaron estables por al menos 4 horas a temperatura ambiente.

La determinación de la estabilidad frente a plasma humano revela gran estabilidad de todos los complejos estudiados, presentando valores mayores al 85% a las 4 horas en todos los casos.

Los coeficientes de partición octanol/buffer muestran que se logró generar complejos con lipofilicidades variadas, que permitieron estudiar la influencia de este parámetro sobre las propiedades biológicas de los complejos. Estos coeficientes se encuentran entre -0.75 para el COMPLEJO 2 y 1.2 para el COMPLEJO 6.

Los valores de unión a proteínas plasmáticas mostraron que los complejos conteniendo un anillo piperacina en su estructura presentan una elevada unión, haciendo que éstos no sean adecuados para su empleo como radiofármaco de diagnóstico.

Se desarrolló un ensayo con el fin de determinar la captación de los complejos de ^{99m}Tc por células humanas en cultivo en estado de hipoxia, el cual resultó un método robusto y reproducible. Para todos los complejos la

captación en hipoxia fue favorable en comparación con la captación en oxia, estando los valores entre 2.2 para el COMPLEJO 1 y 1.3 para el COMPLEJO 3. Este método podría emplearse en el futuro como un método de screening para este tipo de complejos con el fin de poder reducir el número de animales empleados, aunque sería necesario ensayar un mayor número de complejos con el fin de poder validar su uso.

La biodistribución en animales normales corrobora la estabilidad frente a la reoxidación in vivo debido a la baja captación en tiroides y estómago para todos los complejos estudiados.

Los COMPLEJOS 4 y 6, que poseen en su estructura un anillo piperacina en su cadena espaciadora, presentaron una alta unión a proteínas, lo que se vio reflejado en la biodistribución, al presentar una alta captación en hígado (COMPLEJO 3 = $55.13 \pm 9.07\%$, COMPLEJO 6 = $54.00 \pm 1.61\%$) y una baja eliminación.

Se pudieron realizar con éxito correlaciones entre las propiedades fisicoquímicas y el comportamiento biológico, en particular entre la unión a proteínas y la lipofilicidad con la eliminación de los mismos.

Los estudios en animales portadores de tumores inducidos indican que la relación tumor/músculo fue favorable a las 4 horas post inyección para todos los complejos estudiados, lo que evidenciaría una retención de la actividad en el tumor y una depuración de tejidos blandos de rápida a moderada.

De la serie de complejos evaluados, el COMPLEJO1 es el que presenta un mejor perfil como radiofármaco de diagnóstico, ya que presenta una buena estabilidad in vivo, muy buena depuración, la relación T/M más alta (4.22 ± 0.07 a las 4 h) y una relación T/S mayor a 1 entre 2 y 4 horas.

El otro compuesto que también mostro un buen perfil como radiofármaco es el COMPLEJO 3, que si bien no logro relación tumormúsculo tan alta (1.15 ± 0.32 a las 4 h) como el COMPLEJO 1, este presenta un buen perfil general de biodistribución. La captación en tumor fue buena (% dosis/g 1.0 ± 0.3 a las 4 h), además presenta una relación T/S superior a 1 durante todo el periodo de estudio (1.63 ± 0.26 a las 0.5 h - 2.43 ± 0.75 a las 4 h).

El otro complejo que también podría ser adecuado sería el COMPLEJO 5, el cual muestra un perfil general similar al del COMPLEJO 3, con una buena

captación en tumor (% dosis/g 1.2 ± 0.2 a las 4 h), pero la relación T/S no fue tan favorable, siendo menor o igual a 1 durante todo el periodo de estudio (0.6 ± 0.3 a las 0.5 h - 1.0 ± 0.4 a las 4 h).

Los valores obtenidos para la serie de complejos estudiada demuestra que la variación del core empleado en la formación de los complejos tiene gran influencia tanto en las propiedades fisicoquímicas, como en las biológicas.

En el presente trabajo de tesis se pudieron realizar todas las etapas concernientes al desarrollo de un nuevo radiofármaco, desde la selección del farmacoforo, síntesis de los ligandos, síntesis de los complejos, así como los estudios in vitro e in vivo. De esta forma este trabajo permitió profundizar los conocimientos no solo en el área de la radioquímica sino también adquirir nuevos conocimientos principalmente en las áreas de química orgánica y en el trabajo con cultivo de células in vitro.

7 – Bibliografía

1. Caramelo C, Peña J, Castilla A, Justo S, De Solis AJ, Neria F, Peñate S, Gonzalez-Pacheco FR. Respuesta a la hipoxia. *Medicina*, 66, 155 -164 (2006).
2. Fyles AW, Milosevic M, Wong R. Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervical cancer. *Radiother. Oncol.* 48, 149-156, (1998).
3. Berne RM, Levy MN. Skeletal physiology. Berne RM, Levy MN, ed *Physiology*, 3rd ed. St. Louis: Mosby Yearbook, 292-308 (1993).
4. Berne RM, Levy MN. The peripheral circulation and its control. Berne RM, Levy MN, ed *Physiology*, 3rd ed. St. Louis: Mosby Yearbook, 478-493 (1993).
5. Liu R, Kiess MC, Okada RD, Block PC, Strauss HW, Pohost GM, Boucher CA. The persistent defect on exercise thallium imaging and its fate after myocardial revascularization: Does it represent scar or ischemia. *Am. Heart.* 110, 996-1001 (1985).
6. Straub NC. Transport of oxygen and carbon dioxide: tissue oxygenation. En: Berne RM, Levy MN, 3rd edn. St. Louis: Mosby Yearbook, 590-598 (1993)
7. Buxton RB, Alpert NM, Babikian V, Weise S, Correia JA, Ackerman RH. Evaluation of the ¹¹C¹⁸O₂ positron emission tomographic method for measuring brain pH. I. pH changes measured in states of altered PCO₂. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 6, 709-719 (1987).
8. Olive PL, Durand RE. Misonidazole binding in SCCVII tumors in relation to the tumor blood supply. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 16, 755-761 (1989).
9. Connet RJ, Honig CG, Gayeski E, Brooks GA. Defining hypoxia: a systems view of VO₂, glycolysis, energetics and intercellular PO₂. *J. Appl. Physiol.* 68, 833-842 (1990).
10. Brown JM, Giaccia A J. The unique physiology of solid tumors: Opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer. Res.* 58, 1408-1416 (1998).

11. Shaw RJ. Glucose metabolism and cancer. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 18, 598–608 (2006).
12. Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci.*, 24, 68–72 (1999).
13. Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo B-Z, Rubinstein M, Cohen B. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1a. *ARNT. EMBO J.*, 17, 5085–5094 (1998).
14. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci.* 92, 5510–5514 (1995).
15. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Cellular injury and adaptation. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1-38 (1989).
16. Webster LT. Drugs used in chemotherapy of protozoal infections. The pharmacological basis of therapeutics, 8th ed. New York: Pergamon, 1002-1004 (1990).
17. Edwards DI. Nitroimidazole drugs - action and resistance mechanisms. Mechanisms of action. *J. Antimicrob. Chemother.* 31, 9-20 (1993).
18. Brown JM. Hypoxic cell radiosensitisers: Where next? *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 16, 987-993 (1989).
19. Chapman JD, Franko AJ, Sharplin J. A marker for hypoxic cells in tumours with potential clinical applicability. *Br. J. Cancer.* 43, 546-550 (1981)
20. Kedderis GL, Miwa GT. The metabolic activation of nitroheterocyclic therapeutic agents. *Drug. Metab. Rev.* 19, 33-62 (1988).
21. Sasai K, Iwai H, Yoshizawa T, Nishimoto S, Shibamoto Y, Kitakabu Y, Oya N, Takahashi M, Abe M. Pharmacokinetics of fluorinated 2-nitroimidazole hypoxic cell radiosensitisers in murine peripheral nervous tissue. *Int. J. Radiat. Biol.* 62, 221-227 (1992).
22. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T. Hypoxia mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. *Nature* 379, 88-91 (1969).
23. Reynolds TY, Rockwell S, Glazer PM: Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 56, 5754-5757 (1996).

24. Maeda K., Osato T., Urezawa H. A new antibiotic, Azomicin. *J. Antibiotic*, 6, 182. (1953)
25. Nakamura S. Structure of Azomicin, a new antibiotic. *Pharm. Bull.*, 3, 379-383. (1955)
26. Nunn A, Linder K, Strauss H. Nitroimidazoles and imaging hypoxia. *Eur. J. Nucl. Med.* 22, 265-280 (1995).
27. Workman P. Pharmacokinetics of hypoxic cell radiosensitizers. Review. *Cancer Clin. Trials*, 3, 237–251 (1980).
28. Dische S, Saunders MI, Anderson P, Stratford MR, Minchinton A. Clinical experience with nitroimidazoles as radiosensitizers. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 8, 335–338 (1982).
29. Evans SM, Joiner B, Jenkins WT. Identification of hypoxia in cells and tissues of epigastric 9L rat glioma using EF5 [2-(2-nitro-1Himidazol-1-yl)-N-(2,2,3,3,3-pentafluoropropyl)acetamide]. *Br. J. Cancer.* 72, 875-882, (1995).
30. Buxton RB, Alpert NM, Babikian V, Weise S, Correia JA, Ackerman RH. Evaluation of the ¹¹C¹⁸O positron emission tomographic method for measuring brain pH. I. pH changes measured in states of altered PCO₂. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 6, 709-719 (1987).
31. Olive PL, Durand RE. Misonidazole binding in SCCVII tumors in relation to the tumor blood supply. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 16, 755-761 (1989).
32. Kowalski R., Falen S. "Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine". 2nd edn. American Pharmacists Association (2004).
33. Ballinger J. Imaging Hypoxia in Tumors. *Seminars in Nuclear Medicine*, 31, 321-329, (2001).
34. Early P, Sodee D. "Principles and practice of Nuclear Medicine". Mosby Yearbook (1995).
35. Moreno M, Arranz A. Unidad De Radiofarmacia Hospitalaria: Creación Y Desarrollo. *Farmacia Hospitalaria*, 27, 1, 42-49 (2003).
36. Radiopharmaceuticals. Final Text For Addition To The International Pharmacopoeia (November 2008). Consulta Realizada El 09/2010. <http://www.who.int/medicines/publications/pharmacopoeia/Radgenmono.pdf>.

37. Linder K, Chan Y, Nunn A. Synthesis and in vitro and in vivo evaluation of three radioiodinated nitroimidazole analogues as tumor hypoxia markers. *Bioconjug. Chem.* 4, 326-329 (1993).
38. Linder K, Chan Y, Cyr J. [BMS-181321], a new technetium-containing nitroimidazole complex for imaging hypoxia: synthesis, characterization, and xanthine oxidase-catalyzed reduction. *J. Med. Chem.* 7, 9-15 (1994).
39. Rattat D, Verbruggen A, Berke H, Alberto R. Exploring the nitrosyl-approach: "Re(CO)₂(NO)"- and "Tc(CO)₂(NO)"-complexes provide new pathways for bioorganometallic chemistry. *J. Organometal Chem.* 689, 4833–4836 (2004).
40. 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. Synthesis ¹²³I-Interleukin-2: biochemical characterization. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 33, 474-82 (2006).
41. Wilkinson G, Gillard R, McCleverty. The synthesis, reactions, properties and applications of coordination compounds. *J. Comprehensive Coordination Chemistry* 6, 963-970 (1987).
42. Jurisson S., Lydon. Potential Technetium Small Molecule Radiopharmaceuticals. *J. Chem. Rev.* 99, 2205-2223, (1999).
43. Dizio J., Anderson C., Davison. Technetium- and Rhenium-Labeled Progestins: Synthesis, Receptor Binding and In Vivo Distribution of an 11β-Substituted Progestin Labeled with Technetium-99 and Rhenium-186. *J. Nucl. Med.* 33, 558-569 (1992).
44. Arano Y. Recent advances in ^{99m}Tc radiopharmaceuticals. *Ann. Nucl. Med.* 16, 79-93 (2002).
45. Ginj M, Chen J, Walter M, Eltschinger V, Reubi J, and 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).
46. Liu S. The role of coordination chemistry in the development of target specific radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* 33(7), 445-461 (2004).
47. A. M. Catafau. Brain SPECT in Clinical Practice. *J. Nucl. Med.*, 42, 259 – 271, (2001).

48. Rey A. Aplicación de nuevos cores de Tc al diseño de radiofármacos. Avances en radiofarmacia. Comité de radiofarmacia asociación latinoamericana de sociedades de biología y medicina nuclear. Noviembre (2009).
49. Melo T, Duncan J, Ballinger J, Rauth M. BRU 59521, a second-generation ^{99m}Tc -Labeled 2-Nitroimidazole for imaging hypoxia in tumors. *J. Nucl. Med.* 41, 169-176, (2000).
50. Murugesana S, Shettyb S, Noronha O, Samuela A, Srivastavab T, Nairc C, Kotharid L. Technetium-99m-cyclam AK 2123: a novel marker for tumor hypoxia. *Applied Radiation and Isotopes* 54, 81-88 (2001).
51. Baldas J, Bonnyman J. Substitution reactions of $^{99m}\text{TcNCl}_4$ - A new route to a new class of ^{99m}Tc -radiopharmaceuticals. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 36, 133-139 (1985).
52. Boschi A, Ucelli L, Duatti A,. Asymmetrical Nitrido Tc-99m heterocomplexes as potential imaging agents for benzodiazepine receptors. *Bioconjugate Chem.* 14, 1279-1288 (2003).
53. Banerjee S, Maresca K, Francesconi L, Valliant J, Babich J, Zubieta J. New directions in the coordination chemistry of ^{99m}Tc : a reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design . *Nucl. Med. Biol.* 32, 1-20 (2005).
54. Boschi A., Bolzati C., Benini E. A Novel Approach to the High-Specific activity labeling of small peptides with the Technetium-99m fragment $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PXP})]^{+2}$ (PXP = Diphosphine ligand). *Bioconjugate Chem.* 12, 1035-1042 (2001).
55. OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS, 11 Número de publicación: 2 193 407. Titular/es: Nihon Medi-Physics Co., Ltd. 9-8 Rokutanji-cho Nishinomiya-shi, Hyogo 662-0918, JP
56. Pietzsch H, Gupta A, Syhre R, Leibnitz P, Spies H. Mixed-Ligand Technetium(III) Complexes with Tetradendate / Monodendate NS_3 / isocyanide coordination: A new nonpolar Technetium chelate system for the design of neutral and lipophilic complexes stable in vivo. *Bioconjugate Chem.* 12, 538-544 (2001).
57. Sampson C. Textbook of radiopharmacy, theory and practice. 2º Edición. Gordon and Breach Science publishers (1998).

58. Johannsen B. Institute of bioinorganic and Radiopharmaceutical Chemistry. Forschungszentrum Rossendorf. Annual Report 1997.
59. Mirschink P, Stehr S, Pietzsch H.J., Bergmann R, Pietzsch J, Wunderlich G, Heintz A, Kropp J, Spies H, Kraus W, Deussen A and Walther M. Modified "4 + 1" Mixed Ligand Technetium-Labeled Fatty acids for Myocardial Imaging: Evaluation of Myocardial Uptake and Biodistribution. *Bioconjugate Chem.* 19, 97–108 (2008).
60. Drews A, Pietzsch H, Syhre R, Seifert S, Varnäs K, Hall H, Halldin C, Kraus W, Karlsson P, Johnsson C, Spies H, Johannsen B. Synthesis and biological evaluation of technetium(III) mixed-ligand complexes with high affinity for the cerebral 5-HT_{1A} receptor and the alpha1-adrenergic receptor. *Nucl. Med. Biol.* 29, 389-398 (2002).
61. Seifert S, Künstler J, Schiller E, Pietzsch H, Pawelke B, Bergmann R, Spies H. Novel Procedures for Preparing ^{99m}Tc(III) Complexes with Tetradentate/Monodentate Coordination of Varying Lipophilicity and Adaptation to ¹⁸⁸Re Analogues. *Bioconjugate Chem.* 15, 856-863 (2004).
62. Schiller E, Seifert S, Tisato F, Refosco F, Kraus W, Spies H, Pietzsch H. Mixed-Ligand Rhenium-188 Complexes with Tetradentate/Monodentate NS3/P ('4 + 1') Coordination: Relation of Structure with Antioxidation Stability. *Bioconjugate Chem.* 16, 634-643 (2005).
63. Künstler J, Seidel G, Bergmann R, Gniazdowska E, Walther M, Schiller E, Decristoforo C, Stephan H, Haubner R, Steinbach J, Pietzsch H.J. Novel ^{99m}Tc '4 + 1' peptide conjugates: Tuning the biodistribution by variation of coligands *Eur. J. Med. Chem.* 45, 3645-3655 (2010).
64. Alberto R, Syntheses, structural characterization and CO releasing properties of boranocarbonate [H₃BCO₂H]- derivatives. *Radiochim. Acta* 87, 99-103 (1997).
65. Alberto R. In: Technetium, rhenium and other metals in chemistry and Nuclear Medicine p. 3-14 SGEEditoriali, Padova. (2002).
66. Schibli R, Shubiger A. Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals. *Eur. J. Nucl. Med.* 29, 1529-1542 (2002).
67. R. Alberto, J. Bernhard, J. Wald. Technical Reports Series No.426. IAEA. 169, (2004).

68. Tzanopoulou S, Pirmettis I, Patsis G, Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation of M(I)(CO)₃(NNO) Complexes (M = Re, ^{99m}Tc) Conjugated to 2-(4-Aminophenyl)benzothiazole as Potential Breast Cancer Radiopharmaceuticals. *J. Med. Chem.* 49, 5408-5410 (2006).
69. Rattat D, Verbruggen V, Berke H, Alberto R. Exploring the nitrosyl-approach: “Re(CO)₂(NO)”- and “Tc(CO)₂(NO)”-complexes provide new pathways for bioorganometallic chemistry. *Journal of Organometallic Chemistry* 689, 4833–4836 (2004).
70. Johannsen B, Spies H. *Topics in Current Chemistry*, 176, Technetium and Rhenium. Yoshihara K., Omori T. Eds., Springer Verlag, (1996).
71. Chu T, Li R, Hu S, Wang Y, Liu X, Wang X. Synthesis and biodistribution of the ^{99m}Tc nitrido complex with 2-(4-nitro-1H-imidazolyl)ethyl dithiocarbamate (NIET). *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 261, 199-202 (2004).
72. Mallia M, Mathur A, Subramanian S, Banerjee S. A novel [^{99m}Tc≡N]²⁺ complex of metronidazole xanthate as a potential agent for targeting hypoxia. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15, 3398–3401 (2005).
73. Dasa T, Banerjee S, Samuela G, Sarmab HG, Kordea A, Venkatesha M, Pillai MR. A ^{99m}Tc-labeling studies of a modified metronidazole and its biodistribution in tumor bearing animal models. *Nuclear Medicine and Biology* 30, 127–134 (2003).
74. Mallia M, Subramanian S, Mathur M, Sarma H, Venkatesh M, Banerjee S, Sarmac H and Venkatesha M. On the isolation and evaluation of a novel unsubstituted 5-nitroimidazole derivative as an agent to target tumor hypoxia. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18, 5233-5237 (2008).
75. Soo Y Ko. Unusual Regioselection in the Mitsunobu Reactions of SYN-2,3-Dihydroxi Esters. *J. Org.Chem.* 67, 2689-2691 (2002).
76. Bertinaria M., Galli U., Sorba G., Fruttero R., Gasco A., Brenciaglia M., Scaltrito M., Dubini F. Syntesis and anti *H. Pylori* properties of NO-donor metronidazole hybrids and relactes compounds. *Drug Development Research* 60, 225-239 (2003).

77. Mindt T., Struthers H., Brans L., Anguelov T., Schweinsberg C., Maes V., Tourwé D., Schibli R. "Click to chelate": Synthesis and installation of metal chelates into biomolecules in a single step. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 15096 – 15097 (2006).
78. Saadeh H, Mosleh I, Al-Bakri A, Mubarak M. Synthesis and antimicrobial activity of new 1,2,4-triazole-3-thiol metronidazole derivatives. *Monatsh. Chem.* 141, 471–478 (2010).
79. R.F.W. Jackson, R.J. Moore, C.S. Dexter, J. Elliott and C.E. Mowbray, *J. Org. Chem.* 63, 7875-7884 (1998).
80. Tzanopoulou S, Sagnou M, Paravatou-Petsotas M, Gourni E, Loudos G, Xanthopoulos S, Lafkas D, Kiaris H, Varvarigou A, Pirmettis I, Papadopoulos M and Pelecanou M. Evaluation of Re and ^{99m}Tc Complexes of 2-(4'-Aminophenyl)benzothiazole as Potential Breast Cancer Radiopharmaceuticals. *J. Med. Chem.* 53, 4633–4641 (2010).
81. Goubert R., Schneider R., Walcarius A. Synthesis of new dithiocarbamate-based organosilanes for grafting on silica. *Tetrahedron Letters*, 48, 2113-2116 (2007).
82. Muller D, Zeltser I, Bitan G, and Gilon C. Building Units for N-Backbone Cyclic Peptides. 3. Synthesis of Protected N α -(ω -Aminoalkyl)amino Acids and N α -(ω -Carboxyalkyl)amino Acids. *J. Org. Chem.* 62, 411-416 (1997).
83. Mano T, Okumura Y, Sakakibara M, Okumura T, Tamura T, Miyamoto K, and Stevens R. 4-[5-Fluoro-3-[4-(2-methyl-1H-imidazol-1-yl)benzyloxy]phenyl]-3,4,5,6-tetrahydro-2H-pyran-4-carboxamide, an Orally Active Inhibitor of 5-Lipoxygenase with Improved Pharmacokinetic and Toxicology Characteristics. *J. Med. Chem.* 47, 720-725 (2004).
84. Pietzsch, H.-J., Gupta, A., Syhre, R., Leibnitz, P., Spies, H.: Mixed-Ligand Technetium(III) Complexes with Tetradentate/Monodentate NS3/Isocyanide Coordination: A New Nonpolar Technetium Chelate System for the Design of Neutral and Lipophilic Complexes Stable in Vivo. *Bioconj. Chem.* 12, 538-544 (2001).
85. 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).

86. Kodina G, Malysheva A, Klement'eva O, Inkin A, Gorshkov N, Lumpov A, Suglobovb D. Mechanism of Carbonylation Reactions of Technetium-99m. *Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences* 6, 183-185 (2005).
87. Pasqualini R., Duatti A., Bellande. Bis(Dithiocarbamate) Nitrido Technetium-99m Radiopharmaceuticals: A Class of Neutral Myocardial Imaging Agents. *J. Nucl. Med* 35, 334-341 (1994).
88. Bolzati C, Benini E, Cazzola E, Jung C, Tisato F, Refosco F, Pietzsch HJ, Spies H, Uccelli L, Duatti A. Synthesis, characterization, and biological evaluation of neutral nitrido technetium(V) mixed ligand complexes containing dithiolates and aminodiphosphines. A novel system for linking technetium to biomolecules. *Bioconjug. Chem.* 15, 628-37 (2004).
89. Duatti A, Bolzatti C., Ucceli L. Technetium-99m radiopharmaceuticals. *Transition Med. Chem.* 23, 313-314 (1997).
90. Seifert S, Künstler J, Schiller E, Pietzsch H-J, Pawelke B, Bergmann R, Spies H. Novel Procedures for Preparing ^{99m}Tc(III) Complexes with Tetradentate/Monodentate Coordination of Varying Lipophilicity and Adaptation to ¹⁸⁸Re Analogues. *Bioconjugate Chem.* 15, 856–863 (2004).
91. Pietzsch HJ, Gupta A, Syhre R, Leibnitz P, Spies H. Mixed-ligand technetium(III) complexes with tetradentate/monodentate NS(3)/isocyanide coordination: a new nonpolar technetium chelate system for the design of neutral and lipophilic complexes stable in vivo. *Bioconjug Chem.* 12, 538-44 (2001).
92. Papadopoulos M, Chiotellis E, Varvarigou A, Mastrostamatis S, Cotsyfakis C, Vavouraki H, Stathaki S. Correlation of lipophilicity to biodistribution of ^{99m}Tc-labelled aminothiols. *Nucl. Med. Biol.* 20, 101-104 (1993).
93. Decristoforo C, Santos I, Pietzsch H-J, Kuenstler J, Duatti A, Smith C, Rey A, Alberto R, Von Guggenberg E, Haubner R. Comparison of in vitro and in vivo properties of [^{99m}Tc]cRGD peptides labeled using different novel Tc-cores. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 51,33-41 (2007).

94. Giglio J, Patsis G, Pirmettis I, Papadopoulos M, Raptopoulou C, Pelecanou M, León E, González M, Cerecetto H, Rey A. Preparation and characterization of technetium and rhenium tricarbonyl complexes bearing the 4-nitrobenzyl moiety as potential biorreductive diagnostic radiopharmaceuticals. In vitro and in vivo Studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* 43, 741-748 (2008).
95. Garrido G, Lorenzano P, Sánchez B, Beausoleil I, Alonso D, Pérez R, Fernández L. T cells are crucial for the anti-metastatic effect of anti-epidermal growth factor receptor antibodies. *Cancer Immunol Immunother.* 19, 767-743 (2006).
96. Hawkes J. and Ginsberg P. Dianionic rhenium carbonyl halides. *Inorg. Chem.* 8, 2189-2192 (1969).
97. Alberto R, Egli A, Abram U, Hegetschweiler K, Gramlich V and Schubiger A. Synthesis and reactivity of $[\text{NEt}_4]_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$. Formation and structural characterization of the clusters $[\text{NEt}_4][\text{Re}_3(\mu_3\text{-OH})(\mu\text{-OH})_3(\text{CO})_9]$ and $[\text{NEt}_4][\text{Re}_2(\mu\text{-OH})_3(\text{CO})_6]$ by alkaline titration. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2815-2820 (1994).
98. Chatt J., Rowe G. The synthesis of a technetium(V) phenylimido complex from pertechnetate. *J. Chem. Soc.*, 208-212 (1967).
99. Sullivan, B. P.; Brewer, J. C.; Gray, H. B. Nitrido and Oxo Complexes of Re(V). *Inorganic Syntheses* 29, 146-150 (1992).
100. Johannsen B., Spies H. *Topics in Current Chemistry*, 176, Technetium and Rhenium. Yoshihara K., Omori T. Eds., Springer Verlag, (1996).
101. Gomez J and Silverman R. Short, Highly Efficient Syntheses of Protected 3-Azido- and 4-Azidoproline and Their Precursors. *Organic Letter* 3, 2481-2483 (2001).
102. Rostovtset V, Green L, Fokin V, Sharpless K. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective ligation of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int.* 41, 2596-2599 (2002).
103. Lin F, Hoyt H, Halbeek H, Bergman R, Bertozzi C, *J. Am. Chem. Soc.* 127, 2686-2692 (2005).
104. Bartoli G, Antonio G., Giovannini R., Giuli S., Lanari S., Paoletti M., Marcantoni E. Efficient transformation of azides to primary amines using

- the mild and easily accesible CeCl₃/NaI system. *J Org Chem.* 73, 1919-1924 (2008).
105. Agarwal S, Tiwari HP, Santiago JP. Pyridinium Chlorochromate: an Improved Method for its Synthesis and use of Anhydrous acetic acid as catalyst for oxidation reactions. *Tetrahedron* 46, 4417–4420 (1990).
106. Sidney S and Sharp B. Derivatives of 4 and 5-nitro-2-methylimidazol-1-yl-acetaldehyde. *Eur. J. Med. Chem. – Chimica Therapeutica* 10, 171-177 (1975).
107. Aulton E. *Farmacía: Ciencia y diseño de formas farmaceuticas*. Ed. ELSEVIER, Madrid, España. 2004.
108. Johansen B., Spies H. Progress and problems in the chemistry of technetium-99m tracers. *Isotopenpraxis.* 24, 449-454 (1988).
109. Tisato F, Refosco F, Bandoli G. Structural survey of technetium complexes . *Coord. Chem. Rev.* 135, 325-397 (1994).
110. Suzuki T, Fujikura K, Higashiyama T, and Takata K. DNA Staining for Fluorescence and Laser Confocal Microscopy. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 45, 49–53 (1997).
111. Miller J. And Miller J. *Estadística y quimiometría para química analítica*. 4 ° ed. Pearson educations S.A. Madrid (2002).

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quisiera agradecer a Noel, por su apoyo siempre, por aguantarme y por compartir este trabajo, que en parte también es de ella. Y también a “Porotito” por ser la alegría más grande.

Quisiera agradecer a mis directores de tesis Ana y Hugo, por su constante apoyo en todo, no solo en las discusiones teóricas, sino también en el laboratorio. Estando siempre disponibles para lo que hiciera falta.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por el apoyo económico a través de la beca de doctorado el cual me permitió desarrollar este trabajo.

A el Laboratorio Gramón-Bagó del Uruguay S.A. por la donación del Metronidazol, en especial a Silvino Olivera y a María Jose Mendaro.

A Covidean por la donación de los Kits “Isolink” para la síntesis del precursor tricarbonílicos.

A CIS-Bio por la donación de los Kits para la preparación del precursor de nitrído.

A todos los compañeros de Orgánica (Mercedes, Luis, Gastón, William, Vicky, Alicia, Paola, Mauricio, Diego, Guzmán, Mariana, Marcos, Renata, María Laura y al los que me olvido de poner) por los buenos momentos (y no tan buenos) que pasamos juntos. Porque desde el primer día de trabajo me hicieron sentir como en casa.

A todos los compañeros de Radioquímica, (Mariella, Nancy, Laura, Elena, Eduardo), por todo su apoyo en el día a día y en especial a Soledad Fernández por toda su ayuda y colaboración con las biodistribuciones.

A la Dra. Sylvia Dematteis (la “Rubia”) de la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Química por todas sus enseñanzas y colaboración con el trabajo con cultivo de células, también cuando había que cambiar el medio de cultivo los domingos.

Al Dr. Hans Jurgen Pietzsch y a toda la gente del laboratorio de Radiofarmacia del Forschungszentrum Dresden-Rossendorf, Research Center por su apoyo durante mi estancia y por la colaboración a través de los

productos necesarios para la síntesis de los complejos 4+1 de Tc(III) y por la realización de las espectrometrías de masas de los complejos de Re estable.

A Ioannis Pirmettis del Instituto de Radioisótopos y Productos radiodiagnósticos, National Centre for Scientific Research (NCSR) "Demokritos", Atenas, Grecia, por su apoyo en este trabajo.

Al Centro de Medicina Nuclear del Hospital de Clínicas por el pertecneciato.

A mis padres, a mi hermana Lorena por apoyarme y a mi sobrina Cami.

A la suegra también por todo su apoyo.

Y a todos mis amigos que de una manera u otra colaborarán dandome para adelante en el trabajo.

Y a las puchungis, por alegrar la casa

Muchas gracias a todos.