



Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM)

Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR)

PEDECIBA, Química

TESIS DE DOCTORADO EN QUÍMICA

**“Desarrollo y evaluación de radiotrazadores para el estudio y diagnóstico precoz de gliopatías en la enfermedad de Alzheimer mediante tomografía por emisión de positrones.”**

Q.F. Ingrid Kreimerman Franco

Directores de Tesis: Dr. Eduardo Savio, Dra. Patricia Oliver

Febrero 2018

*A mis padres y mis hermanos,  
por el apoyo incondicional.*

*“No debemos olvidar que cuando se descubrió el radio nadie sabía que iba a ser útil en hospitales. Era un trabajo de ciencia pura. Y ello es prueba de que el trabajo científico no debe considerarse desde el punto de vista de su uso directo. Se debe realizar por sí mismo, por la belleza de la ciencia y luego siempre existirá la posibilidad de que un descubrimiento científico se convierta, como el radio, en un beneficio para la humanidad.”*

Marie Sklodowska-Curie

# ÍNDICE

RESUMEN	8
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>10</b>
1.1. Enfermedad de Alzheimer	10
1.2. Imagenología Molecular-Tomografía por Emisión de Positrones (PET)	13
1.3. Radiotrazadores PET para la Enfermedad de Alzheimer	16
1.4. Sulforrodamina 101: marcador de astroglía	19
1.5. Objetivos	21
<b>2. MARCO DE REFERENCIA: RADIOSÍNTESIS DE [<sup>11</sup>C]DED</b>	<b>23</b>
2.1. Introducción	23
2.2. Parte Experimental	26
2.2.1. Materiales y Equipos	26
2.2.2. Métodos	27
2.2.2.1. Radiosíntesis de [ <sup>11</sup> C]DED	27
2.2.2.2. Control de Calidad de [ <sup>11</sup> C]DED	28
2.3. Resultados y Discusión	29
2.3.1. Radiosíntesis de [ <sup>11</sup> C]DED	29
2.3.2. Control de Calidad de [ <sup>11</sup> C]DED	30
2.4. Conclusiones	31
2.5. Notas	31
<b>3. SÍNTESIS DE SRF101 Y RADIOSÍNTESIS DE [<sup>18</sup>F]SRF101</b>	<b>33</b>
3.1. Introducción	33
3.2. Parte Experimental	36
3.2.1. Materiales y Equipos	36
3.2.2. Métodos	37
3.2.2.1. Estudio <i>in silico</i> de SR101	37
3.2.2.2. Síntesis de SR101 fluoruro de sulfonilo (SR101 <sub>F</sub> )	38
3.2.2.3. Marcación de SR101 con <sup>18</sup> F	38
3.2.2.4. Estudio de estabilidad de la SR101 <sub>F</sub> en suero fisiológico	39
3.2.2.5. Derivatización de la SR101 (Síntesis de SR101 <i>N</i> -(3-Bromopropil)-sulfonamida)	39

3.2.2.6.	Identificación de los isómeros de SR101 <i>N</i> -(3-Bromopropil)-sulfonamida	40
3.2.2.7.	Síntesis de SR101 <i>N</i> -(3-Fluoropropil)-sulfonamida	40
3.2.2.7.1.	Síntesis de 3-Fluoropropilamina	42
3.2.2.8.	Marcación de SR101 <i>N</i> -(3-Bromopropil)-sulfonamida isómero 1B con <sup>18</sup> F – Radiosíntesis de [ <sup>18</sup> F]2B-SRF101	43
3.2.2.9.	Control de Calidad de [ <sup>18</sup> F]2B-SRF101	44
3.3.	Resultados y Discusión	45
3.3.1.	Estudio <i>in silico</i> de SR101	45
3.3.2.	Síntesis de SR101 fluoruro de sulfonilo (SR101 <sub>F</sub> )	46
3.3.3.	Marcación de SR101 con <sup>18</sup> F	48
3.3.4.	Estudio de estabilidad de la SR101 <sub>F</sub> en suero fisiológico	49
3.3.5.	Derivatización de la SR101 (Síntesis de SR101 <i>N</i> -(3-Bromopropil)-sulfonamida)	49
3.3.6.	Identificación de los isómeros de SR101 <i>N</i> -(3-Bromopropil)-sulfonamida	50
3.3.7.	Síntesis de SR101 <i>N</i> -(3-Fluoropropil)-sulfonamida	51
3.3.8.	Radiosíntesis de [ <sup>18</sup> F]2B-SRF101	54
3.3.9.	Control de Calidad de [ <sup>18</sup> F]2B-SRF101	56
3.4.	Conclusiones	58
3.5.	Notas	58
4.	EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA E <i>IN VITRO</i> DE [ <sup>18</sup> F]2B-SRF101	59
4.1.	Introducción	59
4.2.	Parte experimental	61
4.2.1.	Materiales y Equipos	61
4.2.2.	Métodos	61
4.2.2.1.	Estabilidad de [ <sup>18</sup> F]2B-SRF101 en formulación final	61
4.2.2.2.	Estabilidad de [ <sup>18</sup> F]2B-SRF101 en plasma	62
4.2.2.3.	Determinación del porcentaje de unión a proteínas plasmáticas de [ <sup>18</sup> F]2B-SRF101	62
4.2.2.4.	Lipofilicidad de [ <sup>18</sup> F]2B-SRF101	62
4.2.2.5.	Ensayos en cultivos celulares con SR101 y 2B-SRF101	63
4.3.	Resultados y Discusión	64

4.4. Conclusiones	67
4.5. Notas	68
5. EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i> Y <i>EX VIVO</i> DE [ <sup>18</sup> F]2B-SRF101	69
5.1. Introducción	69
5.2. Parte experimental	71
5.2.1. Materiales y Equipos	71
5.2.2. Métodos	71
5.2.2.1. Animales de experimentación	71
5.2.2.2. Estudios <i>ex vivo</i> de imagen por fluorescencia con 2B-SRF101	71
5.2.2.3. Biodistribuciones con [ <sup>18</sup> F]2B-SRF101 y [ <sup>11</sup> C]DED	72
5.2.2.4. Estudios imagenológicos PET/CT con [ <sup>18</sup> F]2B-SRF101 y [ <sup>11</sup> C]DED	73
5.2.2.5. Análisis estadístico	74
5.3. Resultados y Discusión	74
5.3.1. Estudios <i>ex vivo</i> de imagen por fluorescencia con 2B-SRF101	74
5.3.2. Biodistribuciones con [ <sup>18</sup> F]2B-SRF101 y [ <sup>11</sup> C]DED	75
5.3.3. Estudios imagenológicos PET/CT con [ <sup>18</sup> F]2B-SRF101 y [ <sup>11</sup> C]DED	81
5.4. Conclusiones	86
5.5. Notas	87
6. ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS Y DOSIMÉTRICOS DE [ <sup>18</sup> F]2B-SRF101	88
6.1. Introducción	88
6.2. Parte experimental	90
6.2.1. Materiales y Equipos	90
6.2.2. Métodos	90
6.2.2.1. Animales de experimentación	90
6.2.2.2. Ensayo de toxicidad de 2B-SRF101	90
6.2.2.3. Estudios dosimétricos de [ <sup>18</sup> F]2B-SRF101	93
6.3. Resultados y Discusión	94
6.3.1. Ensayo de toxicidad de 2B-SRF101	94
6.3.2. Estudios dosimétricos de [ <sup>18</sup> F]2B-SRF101	100
6.4. Conclusiones	106
6.5. Notas	106

<b>7. CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>107</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>111</b>
<b>9. AGRADECIMIENTOS</b>	<b>120</b>
<b>10. ANEXO PUBLICACIONES</b>	<b>122</b>

## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo del sistema nervioso central, que se caracteriza por el deterioro progresivo de las funciones mentales. Neuropatológicamente, se destaca por la presencia de numerosas placas de amiloide y ovillos neurofibrilares. En estos últimos años se ha comprobado que la EA presenta un importante componente neuroinflamatorio, en el que se ven comprometidas también las células gliales, en particular los astrocitos. Estos responden al daño celular mediante un proceso de reactividad en torno a las placas de amiloide.

La imagenología molecular por Tomografía por Emisión de Positrones (PET) es una técnica no invasiva que provee la capacidad de obtener información cuantitativa *in vivo* de diversos procesos biológicos y/o patológicos, así como el diagnóstico de numerosas patologías, incluyendo las enfermedades neurodegenerativas. Debido a ello, es una modalidad prometedora para la detección temprana y estadificación de la EA en pacientes con esta patología. En este sentido, el objetivo del presente trabajo consistió en el desarrollo y caracterización de nuevos radiofármacos PET específicos para la identificación de células gliales con potencial patogénico (astrocitosis), tomando como patrón de referencia al [ $^{11}\text{C}$ ]deutero-L-deprenil ([ $^{11}\text{C}$ ]DED), radiotrazador de uso clínico para la detección de astrocitosis).

En base a esto se propuso realizar un estudio y selección de moléculas como potenciales marcadores específicos de astrocitos, comenzando por el análisis de las estructuras químicas para evaluar las posibles estrategias de marcación con radionucleidos PET. Se planteó la posterior caracterización fisicoquímica y evaluación biológica *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de los compuestos marcados. Dado que el colorante Sulforrodamina 101 (SR101) ha sido reportado como marcador específico de astroglía, se comenzó trabajando con este compuesto.

Inicialmente se construyó el marco de referencia, optimizando un método de producción y control de calidad de [ $^{11}\text{C}$ ]DED, así como realizando su caracterización biológica mediante biodistribuciones y estudios imagenológicos.

Se llevaron a cabo estudios computacionales (*in silico*) que permitieron diseñar un farmacóforo, el cual aportó información útil para el análisis de las posibles estrategias de marcación de la SR101 con radionucleidos PET. En base a ello, se derivatizó la

SR101 mediante un linker de sulfonamida, sintetizando la SR101 *N*-(3-Bromopropil)-sulfonamida, así como su análogo fluorado SR101 *N*-(3-Fluoropropil)-sulfonamida. De este modo se logró contar con todos los estándares y precursores para la radiosíntesis y el control de calidad, que no estaban disponibles comercialmente. Seguidamente, se optimizó la marcación con  $^{18}\text{F}$ , así como la purificación y formulación del derivado de SR101, obteniéndose la SR101 *N*-(3- $^{18}\text{F}$ -Fluoropropil)-sulfonamida ( $^{18}\text{F}$ ]**2B-SRF101**), en concordancia con las especificaciones establecidas en el control de calidad.

Se realizaron estudios fisicoquímicos e *in vitro*, verificando que la  $^{18}\text{F}$ ]**2B-SRF101** presentaba características apropiadas para convertirse en un radiofármaco de diagnóstico PET. Además, se confirmó que el nuevo compuesto, a pesar de las modificaciones estructurales realizadas, aún mantenía la capacidad de marcar los astrocitos. Mediante la adquisición de imágenes de fluorescencia *ex vivo* de cerebro, se verificó la capacidad de **2B-SRF101** de atravesar la barrera hematoencefálica.

En la evaluación biológica de la  $^{18}\text{F}$ ]**2B-SRF101** se llevaron a cabo estudios *ex vivo* de biodistribución e imagenológicos *in vivo* en ratones sanos y en un modelo de ratón transgénico con EA, concluyendo que podría ser un potencial radiotrazador PET para la detección de astrocitosis. En base a la comparación de los estudios PET con  $^{18}\text{F}$ ]**2B-SRF101** y con  $^{11}\text{C}$ ]DED, se concluyó que ambos radiotrazadores brindan información diferente y complementaria a la vez. Esto presentaría ventajas en un enfoque multitrazador, dado que se estaría contando con herramientas útiles para determinar los cambios neuropatológicos en la progresión de la EA.

Finalmente se realizaron estudios de toxicidad y dosimetría, verificándose que el nuevo compuesto sería un radiotrazador seguro para administrar en pacientes. De este modo, se abre paso a una posible fase clínica piloto exploratoria en voluntarios sanos y en pacientes con EA, con la finalidad de dilucidar su potencial aplicación.

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

### **1.1. Enfermedad de Alzheimer**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa caracterizada por el deterioro progresivo de las funciones mentales. Dicha enfermedad presenta mayor incidencia en las personas de avanzada edad, observándose en la clínica pérdida progresiva de las funciones cognitivas, como ser la memoria, aprendizaje y habilidades sociales [1]. Dentro de las demencias, la EA es la patología más frecuente, ya que sus rasgos neuropatológicos pueden llegar a estar presentes en hasta el 70% de los casos [2].

Debido a que el envejecimiento poblacional progresivo es una característica actual en la mayoría de los países, se estima que el número de pacientes con demencia (46.8 millones en el año 2015) aumente a 74.7 millones en el 2030 y a 131.5 millones en el 2050 [3]. En Uruguay se estima que hay 54.000 personas con demencia, cifra que se proyecta ascienda a 77.000 personas en el año 2030 y a 112.000 personas en el 2050, lo que implicaría un incremento del 107% [4].

Debido a esto, la EA tiene un impacto socioeconómico cada vez mayor, lo cual representa un desafío para la sociedad y el sistema de cuidados y salud. Aunque en los últimos años ha habido una mejora en la comprensión de la etiología, genética y en los mecanismos fisiopatológicos subyacentes de la EA, aún no hay cura para esta patología.

Actualmente, la terapia es principalmente sintomática y se han hecho grandes esfuerzos para desarrollar nuevos fármacos con propiedades neuroprotectoras para disminuir la progresión de la enfermedad. Los tratamientos actualmente disponibles, aunque limitados en su efectividad y en el número de personas a quienes le son realmente de utilidad, tienen una mayor probabilidad de éxito en la medida que comiencen en estadios tempranos de la enfermedad [5]. Por ello, la detección precoz de la EA es fundamental tanto para lograr un tratamiento temprano como para permitir a los pacientes y a su familia tomar decisiones oportunas y prepararse mejor para el posterior deterioro en la sintomatología.

A pesar de que se están realizando múltiples investigaciones a nivel mundial con respecto a la EA y que se han obtenido resultados que ayudan a comprender mejor las causas de esta patología, los mecanismos exactos de la misma aún no están totalmente

dilucidados. La fisiopatología de la enfermedad es compleja e involucra procesos celulares, tales como: la acumulación del péptido beta amiloide ( $A\beta$ ), formando las placas de amiloide, la hiperfosforilación de la proteína tau y agregación de la misma en ovillos neurofibrilares, déficit de neurotransmisores, estrés oxidativo y apoptosis. Además, es una enfermedad neuroinflamatoria, en la que están involucradas las células gliales [1, 5, 6].

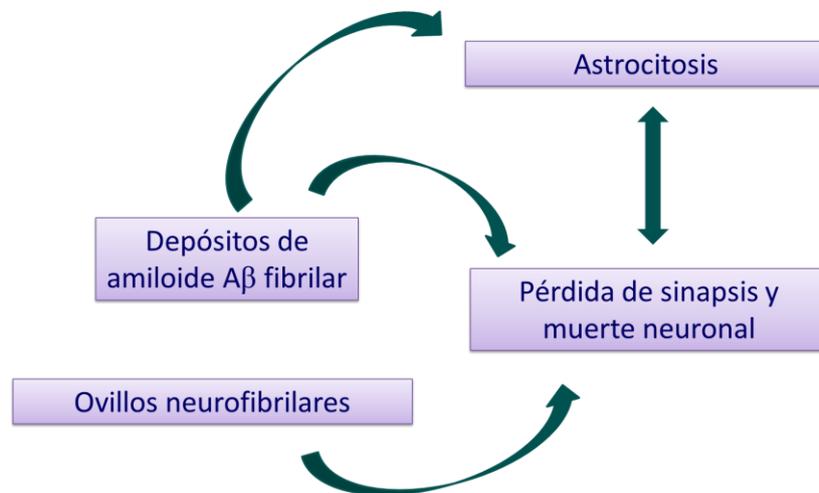
Las placas de amiloide están constituidas por pequeños péptidos, llamados beta-amiloides ( $A\beta$ ), los cuales provienen de la Proteína Precursora de Amiloide (APP). Esta es una proteína transmembrana, indispensable para el crecimiento de las neuronas, para su supervivencia y su reparación post-daño. En la EA, los péptidos  $A\beta$  son cortados de la APP por la acción de enzimas  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas, liberando los monómeros  $A\beta$  al ambiente extracelular. Una vez cortados, estos monómeros pueden formar los oligómeros solubles  $A\beta$  o agruparse constituyendo las placas de amiloide insolubles, las cuales se depositan fuera de las neuronas provocando la inflamación [5, 7].

Por otro lado, en la EA está involucrada la proteína tau, la cual en neuronas sanas es responsable de la estabilización de los microtúbulos. Estos últimos son críticos para el soporte del citoesqueleto y el transporte intracelular de los organelos, vesículas secretorias y otras sustancias como neurotransmisores. En la EA, la proteína tau sufre una hiperfosforilación, lo que genera la unión de la misma con otras hebras tau. Esto da lugar a la formación de los ovillos neurofibrilares, lo que causa la desintegración del sistema de transporte de la neurona [7, 8].

En décadas pasadas, la mayoría de las investigaciones estuvieron centradas en la patología sináptica y neuronal. Sin embargo, en estos últimos años se ha comprobado que la EA presenta un importante componente neuroinflamatorio, en el que se ven comprometidas también las células gliales, en particular los astrocitos. Estas células son las más abundantes del sistema nervioso central (SNC) y una de las más importantes del mismo debido al rol que cumplen. Los astrocitos presentan una función homeostática importante a nivel cerebral, siendo responsables del soporte metabólico, nutrición, control de iones y neurotransmisores del entorno, regulación de la barrera hematoencefálica (BHE) y defensa del SNC [9, 10]. En este sentido, los astrocitos responden al daño del SNC mediante la astrocitosis reactiva, una reacción glial específica caracterizada por cambios moleculares y morfológicos de los mismos. En

este proceso se manifiesta una hipertrofia y aumento de la proliferación celular, acompañado de un aumento de la expresión de la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) y de la proteína astrogial S100 $\beta$  (marcadores clásicos para la identificación inmunohistoquímica de astrocitos) [11]. Además, se observa un aumento de la producción de varias citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento que modulan la respuesta inmune del SNC [12]. Sin embargo, una hiperreactividad de estas células gliales puede a su vez causar la pérdida de sinapsis y muerte neuronal, acrecentando aún más el daño y la neuroinflamación del SNC [10].

En la EA las células gliales están ligadas al proceso crónico de neuroinflamación y estrés oxidativo que se observa en la misma, sobretudo en torno a las placas de amiloide. Aún no está dilucidado si la astrocitosis reactiva se inicia en la EA como respuesta y consecuencia de los fenómenos que se desarrollan en la misma, o si es el propio proceso inflamatorio que contribuye a la patogénesis y a la progresión de la enfermedad [9, 13]. En el esquema de la figura 1 se muestran los diferentes procesos que se presentan en la EA a nivel neuropatológico.



**Figura 1.** Fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer.

Como se desprende de lo anteriormente descrito, la EA es un desorden neurodegenerativo complejo, por lo que se requiere de un enfoque global para comprender los procesos patológicos asociados a la progresión de la enfermedad. En estos están involucrados la mayoría de los elementos celulares del SNC y se sabe que los astrocitos juegan un rol clave en esta enfermedad. Sin embargo, aún es difícil identificar las causas y consecuencias de dicha relación.

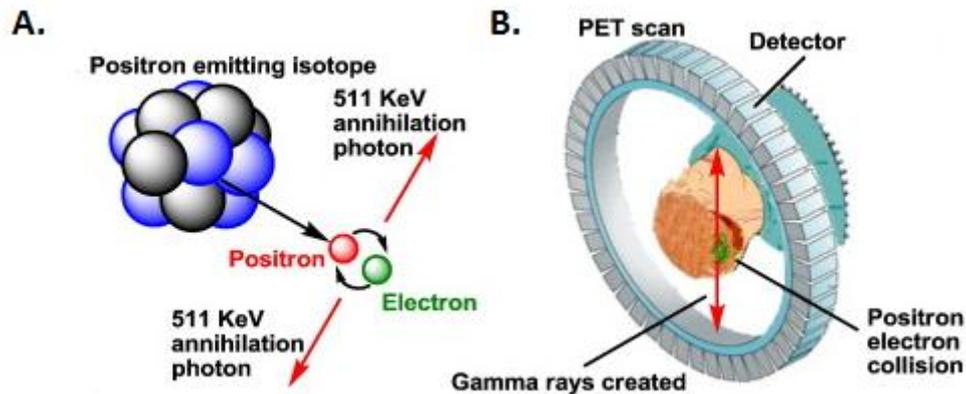
## 1.2. Imagenología Molecular - Tomografía por Emisión de Positrones (PET)

La Imagenología Molecular es una tecnología que permite la caracterización y medición de los procesos biológicos en los seres vivos a nivel celular y molecular, empleando técnicas de imagen. En particular, la Tomografía por Emisión de Positrones (PET) es una técnica no invasiva que genera imágenes tridimensionales de los procesos metabólicos a nivel molecular y celular. Las imágenes PET presentan una buena resolución y elevada sensibilidad, permitiendo una cuantificación precisa de los procesos fisiológicos, bioquímicos o farmacológicos.

Esta técnica utiliza radiofármacos de diagnóstico, que consisten en una molécula marcada con un radionucleido emisor de positrones de corto período de semidesintegración. Una de las ventajas de esta tecnología radica en la existencia de varios radionucleidos PET que son isótopos de elementos presentes en las biomoléculas o con propiedades similares a ellos ( $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ ), lo que hace posible realizar el marcado isotópico de gran variedad de moléculas de interés sin alterar su actividad biológica. Además, los radiofármacos de diagnóstico se usan en concentraciones muy bajas ( $10^{-6}$ - $10^{-12}$  M), por lo que permiten medir los procesos biológicos sin perturbar el sistema ni producir efectos farmacológicos [14, 15].

En general, para un estudio PET, primero se administra el radiofármaco por inyección intravenosa, el sujeto se coloca luego en una cámara híbrida PET/CT (tomografía de emisión de positrones y tomografía computada) y el radionucleido PET decae en el cuerpo por emisión de positrones. La colisión del positrón emitido con un electrón del medio físico o biológico que atraviesa, produce dos fotones de aniquilación (rayos gamma) de 511 keV cada uno, que son emitidos en 180 grados entre sí (Figura 2A). El tomógrafo consta de detectores de centelleo montados en una configuración circular, de modo que cada detector opera en coincidencia con otro colocado en posición opuesta. De esta manera sólo son contadas las señales que llegan simultáneamente a los detectores situados a 180 grados (Figura 2B). El conteo en coincidencia del total del campo se adquiere simultáneamente y se archiva en una matriz de una computadora para reconstruir las imágenes de los cortes transversales, sagitales y coronales de interés, obteniéndose información tridimensional de la distribución de la radiactividad en el organismo. Así, con el PET se detectan mínimos cambios metabólicos causados por alteraciones en los tejidos, mediante imágenes generadas por

la desintegración de los radionucleidos. Simultáneamente, la Tomografía Computada (CT) aporta imágenes estructurales anatómicas de la ubicación exacta, el tamaño y la forma del tejido enfermo y además permite la corrección por atenuación de los rayos. La combinación de los datos aportados por el PET (datos metabólicos) más el CT (datos anatómicos), permite obtener mayor información que con cada uno por separado [15-17].



**Figura 2. A.** Aniquilación de un positrón y un electrón, generando dos fotones de 511 keV en direcciones opuestas. **B.** Arreglo de detectores de rayos gamma de la cámara PET, en forma circular.

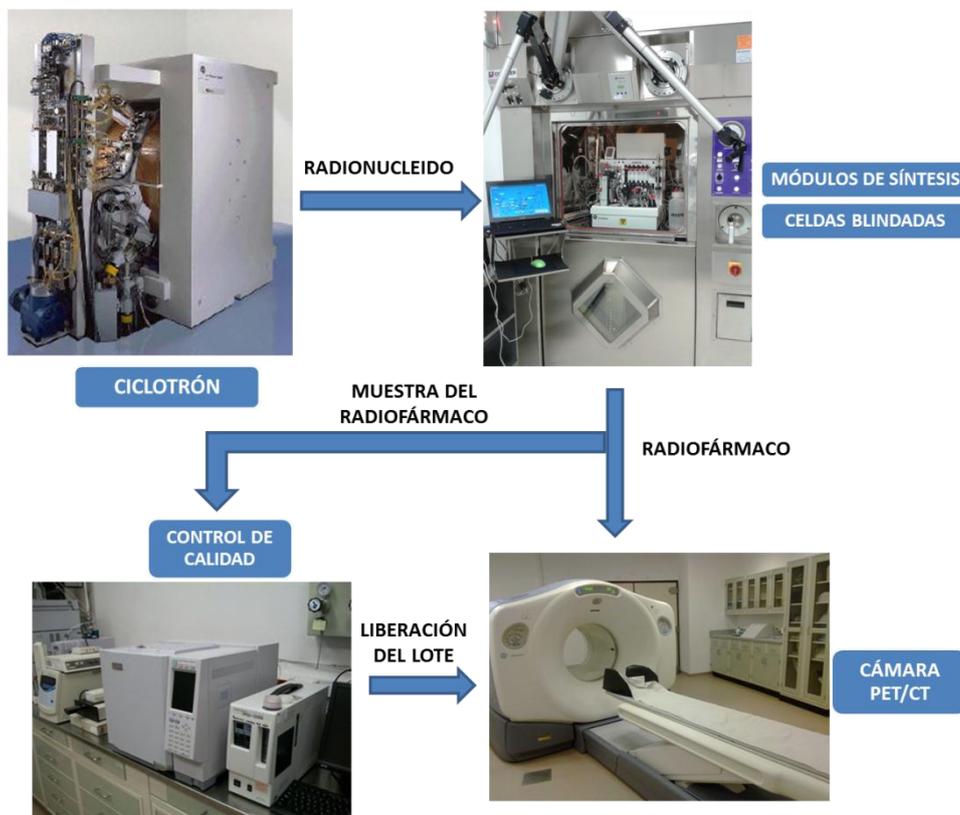
Para la producción de los radiofármacos PET se utilizan dos grandes componentes tecnológicos: el ciclotrón, donde se aceleran las partículas y se producen los radionucleidos y el área de producción, donde se sintetiza el radiofármaco propiamente dicho.

El ciclotrón es un acelerador de partículas, especialmente iones, en el cual la energía de los mismos se amplifica por la aplicación de un campo eléctrico, mientras éstos describen una trayectoria circular, garantizada por la presencia de un campo magnético. De esta manera, la partícula es acelerada en cada vuelta hasta que finalmente escapa del dispositivo en una trayectoria determinada. Luego, la partícula cargada, que actúa como proyectil, interacciona con los núcleos blancos, produciéndose la reacción nuclear, la cual genera el radionucleido [18].

En el área de producción se encuentran los módulos de síntesis, los cuales se ubican dentro de celdas blindadas. Estos permiten la automatización de la síntesis de diferentes radiofármacos, lo cual es fundamental dado el corto período de semidesintegración de

los radionucleidos emisores de positrones y la importancia de la protección radiológica del operador, acorde con las normas internacionales de seguridad en este campo [19]. El proceso productivo se lleva a cabo en un área blanca, donde la calidad del aire es controlada, de modo de cumplir con los requisitos GMP [20].

Además, es necesario contar con un laboratorio de control de calidad físicoquímico y microbiológico, donde se verifica que el radiofármaco cumple con las especificaciones preestablecidas. En general, dichos controles se encuentran establecidos en las diferentes farmacopeas [21, 22] y, en caso de no existir la monografía de un radiofármaco, se establecen controles internos del centro donde se produce el radiofármaco. Así, cuando finaliza el proceso de producción, se toma una muestra para ser analizada en control de calidad y una vez que se comprueba que el producto cumple con las especificaciones establecidas, el lote se libera para ser administrado en pacientes [23]. En la figura 3 se esquematiza el proceso general de producción de un radiofármaco de uso clínico, desde la generación del radionucleido en el ciclotrón hasta la adquisición de la imagen en la cámara PET/CT.



**Figura 3.** Esquema general de producción de un radiofármaco de uso clínico.

### 1.3. Radiotrazadores PET para la EA

La EA es una de las pocas patologías que aún no tiene prevención o cura. Sus causas no están totalmente dilucidadas y los tratamientos con fármacos fallan en aproximadamente el 90% de los casos. Debido a esto, se hace evidente la urgente necesidad de encontrar métodos precisos para la detección temprana así como terapias efectivas, antes del desarrollo de un daño cerebral significativo en los pacientes que padecen esta enfermedad.

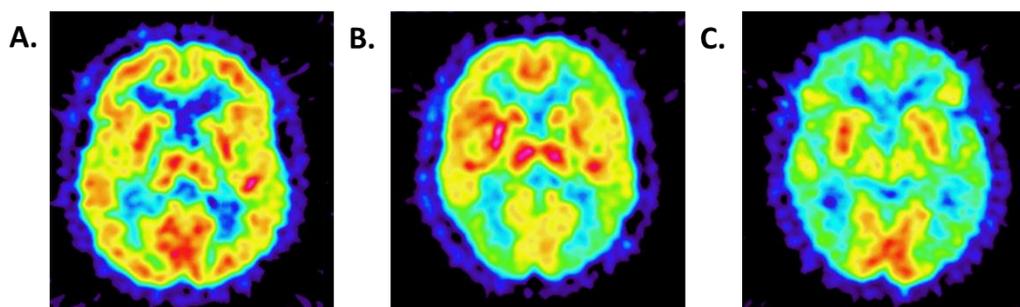
Actualmente, existen diferentes técnicas de imagen para el estudio morfológico (por ejemplo, Tomografía Computada o Resonancia Magnética) o funcional (por ejemplo, Tomografía Computarizada de Emisión Monofotónica - SPECT o PET), útiles para el diagnóstico de las demencias. Sin embargo, hasta el momento, el único diagnóstico definitivo posible de la EA es mediante una autopsia o biopsia cerebral post-mortem [24, 25].

La imagenología molecular, en particular el PET, es una modalidad prometedora para la detección temprana y estadificación de la EA en pacientes con esta patología. Los avances en la neuroimagenología han permitido identificar los diferentes fenómenos moleculares, funcionales y estructurales en la EA. En este sentido, la aplicación de estudios longitudinales han mostrado el potencial del PET para detectar la EA presintomática o prodrómica, en poblaciones con elevado riesgo genético o sujetos con deterioro cognitivo leve [26].

Los radiotrazadores PET más utilizados para la evaluación de los cambios cerebrales relacionados con la EA son aquellos que detectan los fenómenos moleculares que se observan a nivel fisiopatológico, como ser placas de amiloide y ovillos neurofibrilares, así como marcadores de lesión neuronal.

La [ $^{18}\text{F}$ ]-2-desoxi-glucosa ( $^{18}\text{F}$ FDG), uno de los radiotrazadores más empleados en la clínica para el diagnóstico de otras patologías, es de gran utilidad en las enfermedades neurodegenerativas, dado que permite visualizar los cambios regionales del metabolismo de la glucosa a nivel cerebral asociados a estas patologías. En el caso de la EA, se observa un hipometabolismo con menor captación de  $^{18}\text{F}$ FDG en determinadas zonas del cerebro relacionadas con las facultades cognitivas (figura 4). Esto permite

predecir la conversión de un deterioro cognitivo leve a EA, así como evaluar la progresión de dicha enfermedad [25-27].



**Figura 4.** Imagen PET de cerebro con [ $^{18}\text{F}$ ]FDG en: **A.** Voluntario sano. **B.** Paciente con EA. **C.** Paciente con EA en etapas avanzadas. Se observa disminución de la captación del radiofármaco a nivel temporoparietal posterior al inicio de la enfermedad (**B**) y los lóbulos frontales comprometidos en etapas más avanzadas (**C**) [28].

Por otro lado, se han desarrollado diferentes radiotrazadores para la detección de la placa de amiloide. El más utilizado es el compuesto de Pittsburgh marcado con  $^{11}\text{C}$  ([ $^{11}\text{C}$ ]PIB), el cual presenta gran afinidad por las hojas  $\beta$  de las placas de amiloide [29, 30]. Recientemente, otros radiofármacos similares pero marcados con  $^{18}\text{F}$  han sido desarrollados por compañías farmacéuticas, como ser [ $^{18}\text{F}$ ]florbetapir (Eli Lilly & company), [ $^{18}\text{F}$ ]florbetaben (Piramal) y [ $^{18}\text{F}$ ]flutemetamol (GE Healthcare). De hecho, estos tres últimos fueron aprobados recientemente por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) [31, 32]. A su vez, hace unos años en la Universidad de California en los Ángeles (UCLA), se desarrolló el [ $^{18}\text{F}$ ]FDDNP, un compuesto disponible hoy en día en la clínica, que se une tanto a las placas  $\text{A}\beta$  extracelulares, como a los ovillos neurofibrilares [33, 34].

La imagen de amiloide, a pesar de ser de gran utilidad, presenta ciertas limitaciones, dado que la detección de las placas es insuficiente por sí misma para un diagnóstico positivo de la EA. Por ello, conjuntamente se han ido desarrollando marcadores específicos de la proteína tau, de modo de combinar ambas imágenes para así mejorar la especificidad del diagnóstico y permitir una detección temprana de la patología. En este sentido, una serie de radiotrazadores para la detección de los ovillos neurofibrilares están siendo desarrollados y evaluados a nivel mundial, encontrándose en etapa de estudios clínicos. Entre ellos se encuentran: [ $^{11}\text{C}$ ]PBB3, [ $^{18}\text{F}$ ]THK-523, [ $^{18}\text{F}$ ]THK-5105, [ $^{18}\text{F}$ ]THK-5117, [ $^{18}\text{F}$ ]T808 y [ $^{18}\text{F}$ ]T807, entre otros [8, 24, 35].

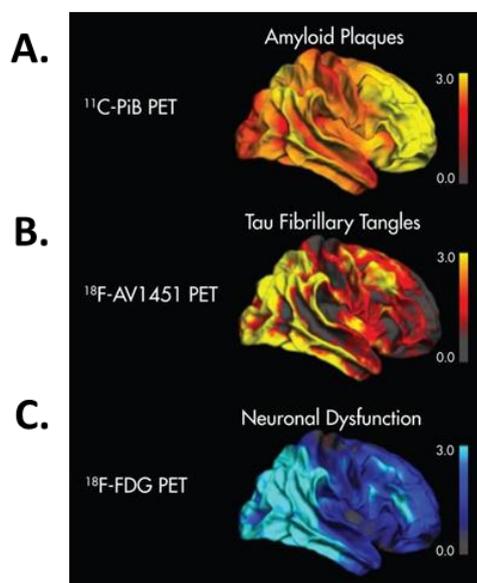
Además, dado que en la EA se observan procesos neuroinflamatorios, se han realizado estudios con [ $^{11}\text{C}$ ]PK11195 para evaluar la activación de la microglía en el transcurso de la enfermedad. El [ $^{11}\text{C}$ ]PK11195 es un radiotrazador que se une selectivamente a los receptores periféricos de benzodiazepina, presentes en la microglia activada, la cual está involucrada en las respuestas neuroinflamatorias. A pesar de que en la EA se ha observado un aumento en la unión de [ $^{11}\text{C}$ ]PK11195 a estos receptores, aún no se ha encontrado una correlación de la neuroinflamación con los depósitos de amiloide, por lo que el valor clínico de este radiotrazador todavía está en estudio [26, 36, 37].

Asimismo, se ha demostrado que la astrogía podría modular la neuroinflamación en etapas tempranas y tardías de la enfermedad [9]. En este sentido, dado que cuando los astrocitos se activan expresan niveles elevados de monoaminoxidasa B (MAO-B), con la finalidad de visualizar este proceso se desarrolló el [ $^{11}\text{C}$ ]deutero-L-deprenil ([ $^{11}\text{C}$ ]DED). Este es un radiofármaco antagonista que se une de forma irreversible a la MAO-B, por lo que se ha utilizado para la detección de astrocitos reactivos en la EA [38-40], así como también en otras enfermedades neurodegenerativas que presentan astrocitosis, como ser Creutzfeldt-Jakob [41, 42], Esclerosis Lateral Amiotrófica [43], entre otras.

Sin embargo, el [ $^{11}\text{C}$ ]DED presenta algunas limitaciones. Una de ellas es que los niveles de MAO-B disminuyen en un 40% en pacientes fumadores, en relación a los no fumadores. Esta reducción de la actividad de la MAO-B influye en el patrón de distribución cerebral, complicando la interpretación de las imágenes [44]. Por otro lado, la cuantificación de la unión de [ $^{11}\text{C}$ ]DED a la MAO-B así como la distribución inicial del trazador son analizadas por el método de Patlak [45], el cual fue previamente reportado [44]. Con este método, es posible obtener tanto la medida del flujo sanguíneo como la medida de unión a la MAO-B. A pesar del doble valor de la información que brinda este radiotrazador, el análisis de la imagen resulta complejo.

De lo anterior se desprende la constante necesidad de disponer de una batería de compuestos, posibilitando un abordaje desde diferentes miradas que aporten información relevante en la comprensión de la evolución de la EA. De este modo, mediante un enfoque multitrazador, se busca obtener información complementaria de los diferentes procesos fisiopatológicos que se desarrollan en el transcurso de la

enfermedad, permitiendo realizar un diagnóstico más temprano y certero de la patología (figura 5) [28].



**Figura 5.** Ejemplo de un estudio multitrazador, donde se pueden ver las imágenes con diferentes radiotrazadores que permiten detectar distintos procesos: **A.** [ $^{11}\text{C}$ ]PIB, detección de las placas de amiloide. **B.** [ $^{18}\text{F}$ ]AV1451 (T807), detección de ovillos neurofibrilares. **C.** [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, hipometabolismo [46].

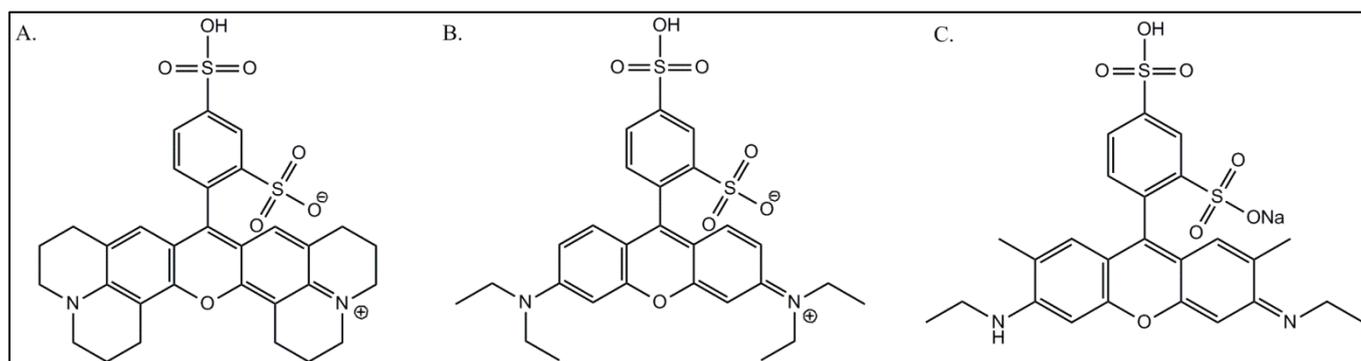
Además, como se ha visto, algunos radiotrazadores presentan limitaciones en el análisis de las imágenes, lo que genera dificultades a la hora de sacar conclusiones. Por ello, para sobrellevar estas dificultades es necesario continuar con la búsqueda de nuevos agentes diagnósticos. En este sentido, considerando que la astrocitosis es un proceso que se manifiesta en etapas tempranas de la EA, la identificación de moléculas marcadoras de astrocitos para su posterior marcación con radionucleidos PET, aportaría nuevas herramientas al diagnóstico precoz de la EA, así como al de otras enfermedades neurológicas que involucren procesos de astrocitosis reactiva.

#### 1.4. Sulforrodamina 101: marcador de astroglía

Los colorantes de la familia de las rodaminas son fluoróforos que pertenecen al grupo de los xantenos, junto con la fluoresceína y la eosina. Estos han sido ampliamente usados para la conjugación de biomoléculas, debido a sus propiedades fluorescentes. Por lo general, el colorante se usa bajo la forma libre, pero a veces es necesario utilizarlo bajo una forma activada, unido a otra molécula [47]. Los cloruros de Sulforrodamina se encuentran entre los colorantes reactivos comunmente más

empleados para el marcado de aminas, particularmente el cloruro de sulfonilo de Sulforrodamina B (SRB) y de Sulforrodamina 101 (SR101). Ambos colorantes presentan una fluorescencia roja intensa y se utilizan en combinación con fluoresceína para ensayos de fluorescencia [48-50].

El colorante rojo SR101 (figura 6A), se ha utilizado en investigaciones en el área de las neurociencias como una herramienta para la tinción de astrocitos, desde que este fue reportado como marcador específico de astrogliá [51, 52]. En dicho estudio se demostró el marcado de astrocitos *in vivo*, mediante una breve exposición de la corteza cerebral de roedores a la SR101. También hay estudios que reportan la tinción específica *in vivo* de astrocitos luego de inyección intravenosa de SR101, SRB y Sulforrodamina G (SRG) (figura 6A, 6B y 6C, respectivamente) [53, 54]. No obstante, aún está en discusión el mecanismo por el cual la SR101 marca los astrocitos.



**Figura 6.** Estructura química de: **A.** Sulforrodamina 101. **B.** Sulforrodamina B. **C.** Sulforrodamina G.

Inicialmente, se planteó que la SR101 ingresaba a los astrocitos predominantemente mediante endocitosis [55]. Debido a la eficacia y al rápido ingreso que se observó posteriormente en los astrocitos corticales, se sugirió que debería haber un sistema de transporte específico para el ingreso de la SR101 a estas células [56]. Nimmerjahn y colegas, en su estudio plantearon que en este marcado de astrocitos estaban involucrados los hemicanales de las uniones gap [51]. Sin embargo, luego se demostró que los astrocitos de un modelo de ratón que carecía de la mayoría de las proteínas de las uniones gap, efectivamente eran marcados con SR101 [57]. En los últimos estudios reportados se ha demostrado que la SR101 ingresa a los astrocitos mediante transporte activo, vía el polipéptido transportador de aniones orgánicos de la hormona tiroidea (organic anion-transporting polypeptide, OATP1C1) [58, 59].

Cabe destacar que recientemente se han planteado algunas limitaciones con respecto a la especificidad celular de la SR101. Diferentes autores postulan que este colorante no solo marca astrocitos, sino también oligodendrocitos mielinizantes maduros, ya que difunde a través de las uniones gap desde los astrocitos a los oligodendrocitos. Por ello se ha propuesto que los astrocitos son marcados por la SR101 previo a los oligodendrocitos [60-63].

Considerando las propiedades de la SR101 descritas anteriormente, en este trabajo se plantea la posibilidad de marcar la misma con un radionucleido emisor de positrones, de modo de convertirla en un radiotrazador PET que permita detectar los astrocitos. Y, dado que en la EA se desarrolla astrocitosis con aumento de su proliferación celular, contaríamos entonces con una nueva herramienta para el diagnóstico y comprensión de los mecanismos que se observan en esta patología, así como el de otras enfermedades neurodegenerativas que involucren este proceso.

### **1.5. Objetivos**

El objetivo del presente trabajo consiste en el desarrollo y caracterización de nuevos radiofármacos PET específicos para la identificación de células gliales con potencial patogénico (astrocitosis), tomando como patrón de referencia al [ $^{11}\text{C}$ ]DED. De este modo se espera poder aportar nuevas herramientas de imagenología molecular PET para el diagnóstico precoz de la EA, y eventualmente contribuir a la evaluación de la respuesta a nuevos tratamientos de la misma.

Para alcanzar el objetivo general planteado se propusieron los siguientes objetivos específicos dentro del plan de trabajo:

- **Construcción del marco de referencia**

Optimización de la síntesis y control de calidad de [ $^{11}\text{C}$ ]DED mediante marcaciones con  $^{11}\text{C}$ . Este tipo de marcaciones implican la adición del radionucleido mediante reacciones de metilación usando [ $^{11}\text{C}$ ]CH<sub>3</sub>I o [ $^{11}\text{C}$ ]CH<sub>3</sub>OTf como agentes metilantes. La caracterización biológica abarca estudios de biodistribución y adquisición de imágenes PET/CT en ratones sanos y en un modelo de ratón transgénico con EA.

- **Estudio y selección de potenciales moléculas como marcadores específicos de astrocitos.**

Estudio mediante método *in silico* de la SR101 y sus derivados, como potenciales moléculas marcadoras de astrocitos, para su posterior marcación con radionucleidos emisores de positrones.

- **Estrategias de marcación de las moléculas seleccionadas con radionucleidos emisores de positrones.**

Evaluación de las diferentes estrategias de marcación de la SR101. Derivatización de las SR101 para su posterior marcación con  $^{18}\text{F}$  mediante reacciones de sustitución nucleofílica. Optimización de la síntesis y control de calidad del nuevo compuesto.

- **Evaluación biológica mediante estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.**

Evaluación fisicoquímica del nuevo compuesto, incluyendo estudios de estabilidad en su formulación final y en plasma, determinación de la lipofilidad y de unión a proteínas plasmáticas. La evaluación *in vitro* del compuesto comprende ensayos en cultivos de astrocitos. La caracterización biológica *ex vivo* e *in vivo* abarca estudios en ratones sanos y en un modelo de ratón transgénico con EA. En los mismos se realizan tanto biodistribuciones, con las que se evalúa el perfil farmacocinético, las vías de eliminación y los órganos de acumulación, así como estudios imagenológicos PET/CT, donde se estudia la distribución cerebral del compuesto.

## 2. MARCO DE REFERENCIA: RADIOSÍNTESIS DE [<sup>11</sup>C]DED

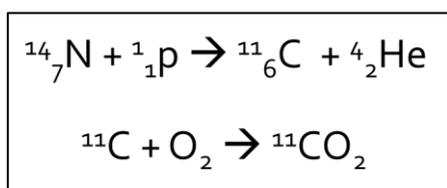
### 2.1. Introducción

La marcación es la reacción química por la cual el radionucleido es incorporado en la molécula deseada. En la química PET, al trabajar con radionucleidos de corto período de semidesintegración (por ejemplo,  $t_{1/2}$  <sup>11</sup>C: 20.4 minutos,  $t_{1/2}$  <sup>18</sup>F: 109.8 minutos), la seguridad y efectividad de los procesos es una prioridad, por lo que la química orgánica tradicional no es factible en este caso.

Con la finalidad de evitar elevadas dosis de radiación al personal ocupacionalmente expuesto, las radiosíntesis se realizan generalmente en módulos de síntesis contenidos en celdas blindadas con plomo. Además, es necesario que tanto las reacciones de marcación como el posterior proceso sintético, que implica la purificación y formulación, sean rápidos, de modo de poder asegurar suficiente actividad del radiofármaco para luego realizar el estudio. Esto implica un desafío a la hora del desarrollo radiofarmacéutico. En el caso de las marcaciones con <sup>11</sup>C y <sup>18</sup>F, generalmente se llevan a cabo mediante reacciones de química orgánica en un único paso de alto rendimiento. Sin embargo, a veces puede ser necesario proteger los grupos reactivos de la molécula o realizar la marcación mediante grupos prostéticos.

El carbono es uno de los principales constituyentes de la mayoría de las moléculas de importancia biológica. Por ello, el marcado isotópico con <sup>11</sup>C de elementos presentes en las biomoléculas, facilita el reconocimiento *in vivo* de sus blancos moleculares, dado que presenta un comportamiento químico y biológico igual al de los elementos que normalmente se encuentran en las biomoléculas.

La producción de <sup>11</sup>C se realiza en el ciclotrón, generalmente a través de una reacción nuclear <sup>14</sup>N(p, α)<sup>11</sup>C, en la que se obtiene bajo la forma de [<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub> (figura 7).

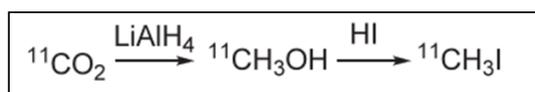


**Figura 7.** Reacción nuclear para la obtención de <sup>11</sup>C bajo la forma de [<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub>.

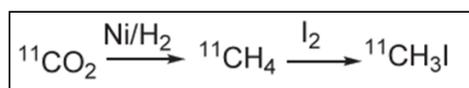
Las estrategias de marcación más frecuentemente utilizadas son reacciones de *N*-, *O*- o *S*- metilación, utilizando  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$  o  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$  como agente metilante. Existen dos formas de preparar el  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ : el método “húmedo” y el método en “fase gaseosa”. En el método húmedo, el  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$  es reducido a  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH}$  con  $\text{LiAlH}_4$ , seguido de  $\text{HI}$  (figura 8A). En el método en fase gaseosa, el  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$  es reducido a  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$  mediante hidrogenación catalítica y el  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$  es preparado directamente a partir de este, en presencia de vapor de yodo (figura 8B).

El uso de  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$  presenta algunas ventajas sobre el  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ . El  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$  es más reactivo que el  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ , por lo que las metilaciones pueden realizarse utilizando temperaturas de marcación más bajas, menores cantidades de precursor y tiempos de marcación más cortos. El  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$  puede ser preparado fácilmente pasando el  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$  a través de una columna conteniendo triflato de plata, precalentada a aproximadamente 200 °C (figura 8C).

**A. Síntesis de  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ : Método húmedo**



**B. Síntesis de  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ : Método en fase gaseosa**



**C. Síntesis de  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$**

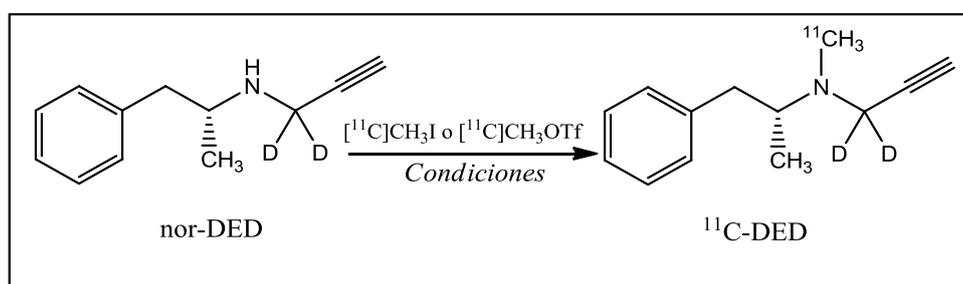


**Figura 8.** Preparación de  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$  (A y B) y  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$  (C).

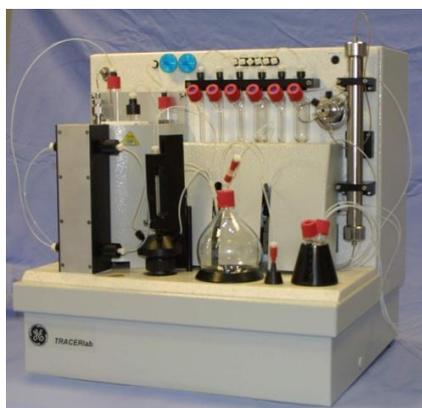
Las reacciones de alquilación se pueden llevar a cabo en solución o en un soporte sólido. Cuando las metilaciones se realizan en solución, se utilizan disolventes tales como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), metiletilcetona (MEK), acetonitrilo y acetona. En algunos casos puede ser necesaria la adición de una base para la desprotonación del precursor. Entre las bases comunmente utilizadas se encuentran:  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaOH}$  y  $\text{NaH}$ . En general, el precursor se disuelve en el disolvente apropiado en presencia de la base y el agente metilante es barbotado en la solución [15, 64]. En el

caso de las metilaciones en soporte sólido, el precursor se coloca en el mismo y la reacción se puede dar en un loop de HPLC o en un cartucho de extracción en fase sólida.

La radiosíntesis del [ $^{11}\text{C}$ ]DED consiste en una *N*-metilación del precursor desmetil-L-deprenil- $\text{D}_2$  (figura 9) [65]. En este trabajo, la optimización de la misma se realizó en un módulo de síntesis TRACERlab® FX-C Pro [66], el cual presenta la posibilidad de funcionar en modo automático, con programas preestablecidos para cada proceso y también puede ser comandado por el operador a través de una computadora conectada al módulo (figura 10).



**Figura 9.** Reacción de metilación para la radiosíntesis de [ $^{11}\text{C}$ ]DED.

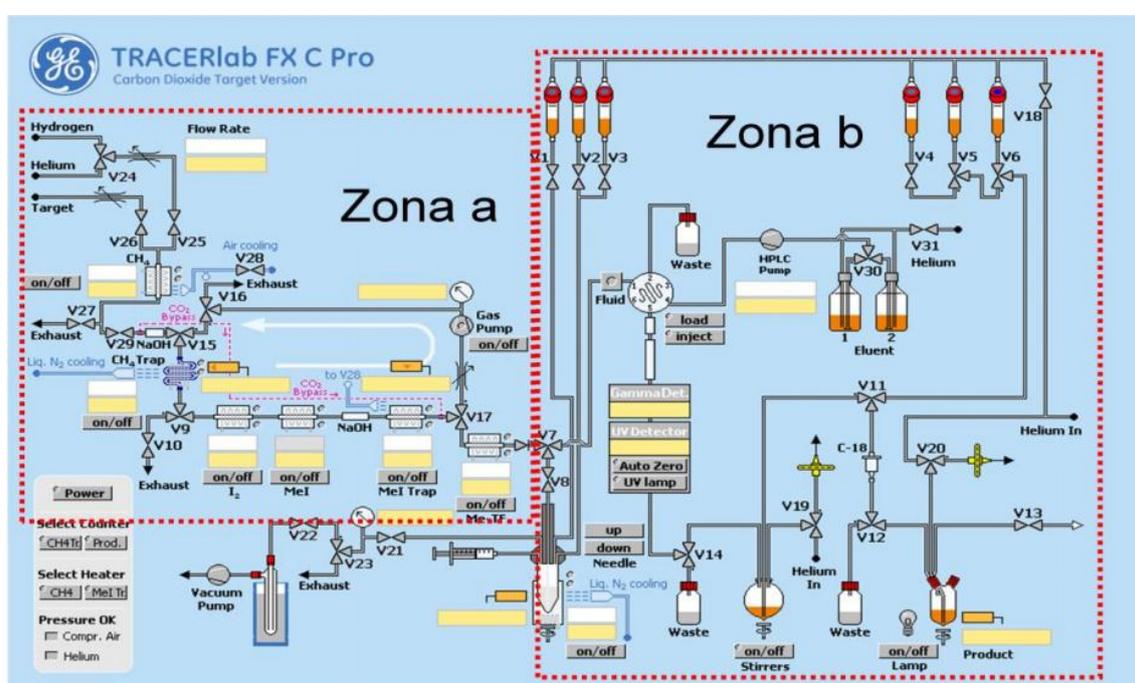


**Figura 10.** Módulo de síntesis TRACERlab FX-C Pro.

Este módulo de síntesis contiene dos grandes zonas que se pueden diferenciar. Una zona “seca”, en la cual se trabaja con componentes gaseosos, y otra “húmeda”, donde la mayoría de los procesos se realizan con componentes líquidos (figura 11, zona a y b, respectivamente). En la primera es donde llega el [ $^{11}\text{C}$ ]CO $_2$  gaseoso proveniente del ciclotrón, para ser luego reducido a [ $^{11}\text{C}$ ]CH $_4$ , con su posterior transformación en [ $^{11}\text{C}$ ]CH $_3\text{I}$  y/o [ $^{11}\text{C}$ ]CH $_3\text{OTf}$ , según cual sea el agente que se precisa para el

radiofármaco a sintetizar. En la segunda zona está el reactor, en el cual se coloca la solución de precursor para llevar a cabo la reacción de marcación una vez disuelto el agente metilante. Aquí también se encuentra el sistema de HPLC semipreparativo, el cual se utiliza para aislar el compuesto de interés marcado. Además, el módulo contiene una serie de viales en los cuales se colocan diferentes soluciones que se utilizan para la posterior extracción en fase sólida y formulación del radiofármaco.

Es importante mencionar que el módulo requiere una serie de acondicionamientos y chequeos previo a su uso. Debido a que es un sistema que trabaja con gases es importante verificar la hermeticidad del mismo.



**Figura 11.** Pantalla donde se muestran los procesos. Se pueden diferenciar las dos grandes zonas: la zona **a** que opera con componentes gaseosos y la zona **b**, que opera principalmente con componentes líquidos.

## 2.2. Parte Experimental

### 2.2.1. Materiales y Equipos

Todos los productos químicos y solventes usados fueron de calidad analítica (Merck, Sigma-Aldrich, Carlo Erba, Dorwil). El cartucho Sep-Pak C<sub>18</sub> light y el filtro esterilizante fueron comprados a Waters. El L-deprenil-D<sub>2</sub>.HCl (DED.HCl, estándar analítico) y desmetil-L-deprenil-D<sub>2</sub>.HCl (nor-DED.HCl, precursor) fueron comprados a Pharma Synth AS (Estonia). Se utilizó una columna semipreparativa VP 250/10 mm

Nucleosil 100-5 C<sub>18</sub> Nautilus (Macherey-Nagel) y una columna analítica EC 250/4.6 mm Nucleodur 100-5 C<sub>18</sub>ec (Macherey-Nagel). Se utilizó una columna analítica de GC DB-WAX (30 m largo, 0.53 mm diámetro y 1.00 mm espesor - Agilent).

El [<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub> fue producido en un ciclotrón PET Trace 16.5 MeV (GE Healthcare), utilizándose un target de alta performance que utiliza una mezcla de N<sub>2</sub> y 1.0% O<sub>2</sub> (Praxair o Air Liquide) para producir la reacción nuclear. La radiosíntesis se llevó a cabo en un módulo de síntesis TRACERlab® FX-C Pro (GE Healthcare). Se utilizó un HPLC analítico Shimadzu UFLC equipado con un detector de arreglo de diodos y detector gamma. El análisis de etanol y solventes residuales mediante GC se realizaron en un Shimadzu GC-2010 Plus equipado con un detector FID. Las medidas de actividad fueron realizadas en un calibrador de dosis Capintec® CRC 25R, CRC 25 PET o espectrómetro de centelleo sólido con cristal de NaI (Tl) de 3 x 3 pulgadas de pozo acoplado a una tarjeta multicanal ORTEC®. La determinación de endotoxinas bacterianas se realizó utilizando el equipo portátil Endosafe-PTS (Charles River Laboratories, Inc).

## 2.2.2. Métodos

### 2.2.2.1. Radiosíntesis de [<sup>11</sup>C]DED

La radiosíntesis comenzó con la producción en el ciclotrón de [<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub> mediante la reacción  $^{14}\text{N}(\text{p}, \alpha)^{11}\text{C}$ , el cual fue enviado al módulo de síntesis automatizado. El [<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub> fue reducido a [<sup>11</sup>C]CH<sub>4</sub> mediante hidrogenación catalítica, siendo luego transformado en [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I, el cual puede actuar como agente metilante o puede ser convertido posteriormente en [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>OTf. La incorporación de <sup>11</sup>C a la molécula consistió en una *N*-<sup>11</sup>C-metilación del precursor desmetil-L-deprenil-D<sub>2</sub>.HCl (nor-DED.HCl), por reacción con [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I ó [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>OTf [65]. En este proceso se probaron distintas condiciones de marcación hasta encontrar aquellas que permitieran obtener un producto con la mayor pureza radioquímica (PRQ) posible. Para ello se realizaron una serie de síntesis hasta el reactor, lo cual implica la obtención del producto en crudo, sin purificar. En las mismas se variaron algunos parámetros relacionados al proceso de marcación propiamente dicho, como ser: agente metilante ([<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I y [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>OTf), temperatura de marcación (70, 80, 90 y 150 °C) y disolvente (DMSO, DMF y MEK). En todos los casos la masa de precursor utilizado fue 1.0 mg, el volumen de disolvente 350 µL, el tiempo de marcación 1 minuto, y se utilizaron 3.0 µL de NaOH

3M a fin de obtener el precursor bajo forma de amina (dado que el precursor se utiliza bajo la forma de clorhidrato). Las reacciones fueron analizadas por HPLC analítico: columna C<sub>18</sub>; fase móvil: ácido trifluoroacético (TFA) 0.1%: CH<sub>3</sub>CN (75:25); flujo: 1,5 mL/min; detección gamma y UV  $\lambda$ : 210 nm (*sistema 1*).

Una vez obtenido el [<sup>11</sup>C]DED con la PRQ deseada, el crudo fue separado de sus impurezas mediante HPLC semipreparativo: columna C<sub>18</sub>; fase móvil: CH<sub>3</sub>CN: AcONH<sub>4</sub> 0.1M (60:40); flujo: 6.0 mL/min; detección gamma y UV  $\lambda$ :254 nm. La fracción correspondiente al [<sup>11</sup>C]DED fue eluida con un tiempo de retención de 7.3 min y recogida en un balón conteniendo 50 mL de H<sub>2</sub>O. La solución diluida se pasó a través de un cartucho de extracción de fase sólida (Sep-Pak C<sub>18</sub> light; pre-activado con 5 mL de etanol, seguidos por 10 mL de H<sub>2</sub>O), el cual se lavó luego con 10 mL de H<sub>2</sub>O. El compuesto de interés fue eluido con 1 mL de etanol y recolectado en un vial conteniendo 5 mL de suero fisiológico (solución salina 0.9 %). Finalmente el producto fue formulado como inyectable adicionando 5 mL de suero fisiológico, los cuales se pasaron a través del cartucho. La solución final fue transferida a un vial estéril en condiciones asépticas (filtración esterilizante por filtro de 0,22  $\mu$ m).

#### 2.2.2.2. Control de Calidad de [<sup>11</sup>C]DED

Las impurezas químicas y radioquímicas fueron detectadas y cuantificadas mediante HPLC analítico con detección gamma y UV, utilizando el *sistema 1*. El tiempo de retención del nor-DED.HCl y [<sup>11</sup>C]DED fueron 4.4 min y 5.4 min, respectivamente. La identidad radioquímica del [<sup>11</sup>C]DED se determinó comparando el tiempo de retención del mismo con el del compuesto de referencia DED.HCl. La PRQ se calculó considerando la fracción correspondiente al [<sup>11</sup>C]DED en relación a la radioactividad total. La actividad específica se determinó considerando la actividad total del radiofármaco al final de la síntesis ([<sup>11</sup>C]DED) y la cantidad de producto no marcado (DED). Los solventes residuales (acetona, acetonitrilo y metiletiletona) y el etanol fueron analizados por cromatografía gaseosa (GC) de acuerdo al capítulo general de la USP <467> [67]. Se controló la apariencia de la solución mediante inspección visual y se determinó el pH usando un pHmetro previamente calibrado. La pureza radionucleídica se verificó mediante adquisición del espectro gamma y la identidad mediante la determinación del período de semidesintegración. La esterilidad y concentración de endotoxinas bacterianas se testearon de acuerdo a los capítulos

generales de la USP <71> y <85>, respectivamente [68, 69]. En particular, el test de endotoxinas bacterianas se realizó mediante el ensayo de Lisado de Amebocitos del Limulus (test de LAL) [70].

## 2.3. Resultados y Discusión

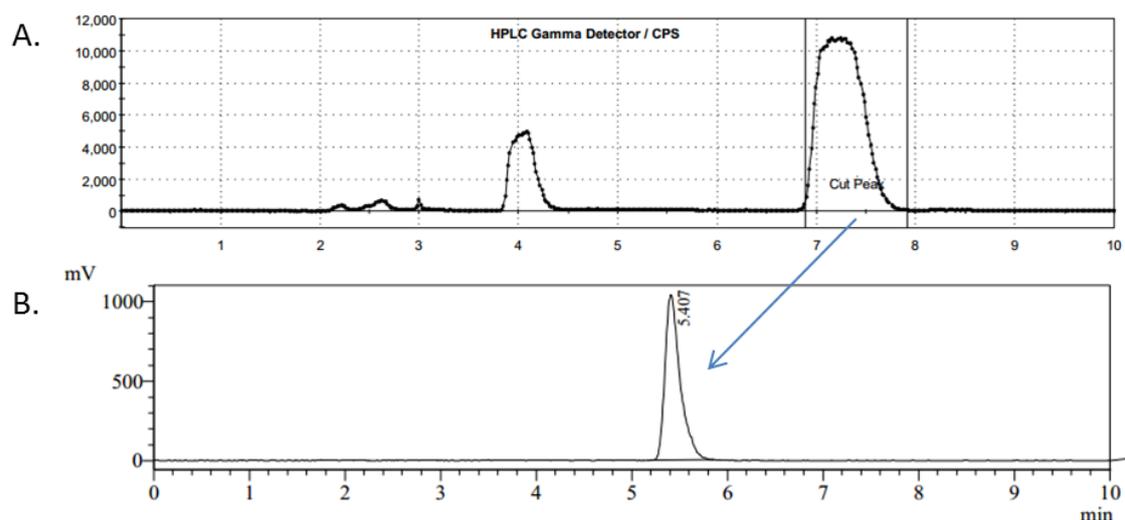
### 2.3.1. Radiosíntesis de [<sup>11</sup>C]DED

En la tabla 1 se resumen las condiciones utilizadas en las diferentes marcaciones así como la PRQ obtenida en cada una de ellas. En la misma se puede observar que las purezas radioquímicas más altas se obtuvieron al utilizar MEK como disolvente y [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>OTf como agente metilante. Una vez definidos estos parámetros, se probaron tres temperaturas de marcación diferentes, obteniendo el mejor resultado con 80 °C.

**Tabla 1.** Pureza radioquímica de [<sup>11</sup>C]DED en el crudo de reacción en las diferentes condiciones de marcación utilizadas.

Agente metilante	Disolvente	Temperatura de marcación (°C)	PRQ de [ <sup>11</sup> C]DED en el crudo de reacción (%)
[ <sup>11</sup> C]CH <sub>3</sub> OTf	DMSO	150	8.7
[ <sup>11</sup> C]CH <sub>3</sub> OTf	DMF	150	53.2
[ <sup>11</sup> C]MeI	DMF	150	42.5
[ <sup>11</sup> C]CH <sub>3</sub> OTf	MEK	80	98.4
[ <sup>11</sup> C]CH <sub>3</sub> OTf	MEK	70	79.1
[ <sup>11</sup> C]CH <sub>3</sub> OTf	MEK	90	91.8

En base a esto las condiciones de marcación que se seleccionaron para la síntesis fueron: 1 mg de precursor disuelto en 350 µL de MEK, 3 µL de NaOH (3 M), 1 minuto de marcación, calentamiento a 80 °C y [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>OTf como agente metilante. Con estas condiciones se realizó la síntesis completa, incluyendo la separación por HPLC (Figura 12), purificación por extracción en fase sólida y los pasos de formulación final. El rendimiento global de la síntesis fue de (2.3 ± 0.1)% (n=3), no corregido por decaimiento (ncd).



**Figura 12.** Ejemplo de un cromatograma gamma típico de HPLC semi-preparativo (A) y analítico (B) de  $[^{11}\text{C}]\text{DED}$ .

### 2.3.2. Control de Calidad de $[^{11}\text{C}]\text{DED}$

Debido a que previo a la utilización de todo radiofármaco se deben controlar las propiedades fisicoquímicas del mismo, la última etapa del desarrollo químico farmacéutico del  $[^{11}\text{C}]\text{DED}$  consistió en la puesta a punto de los métodos a emplear para el control de calidad. Luego de contar con el método optimizado, se realizaron 3 lotes pilotos. Los resultados del control de calidad de los mismos se resumen en la tabla 2, donde se puede observar que todos los lotes cumplieron con las especificaciones establecidas. En todos los casos se verificó la esterilidad de la solución y la concentración de endotoxinas bacterianas se encontró por debajo de los límites establecidos.

**Tabla 2.** Resultados del control de calidad de tres lotes pilotos de [<sup>11</sup>C]DED.

	<b>Especificaciones</b>	<b>Lote 1</b>	<b>Lote 2</b>	<b>Lote 3</b>
Apariencia	Solución límpida, incolora y libre de partículas	Cumple	Cumple	Cumple
pH	4.5-8.5	6.1	5.8	6.5
Pureza Radioquímica	> 90%	100 %	100 %	100 %
Identidad Radioquímica	Diferencia entre tr del pico radioactivo y del de referencia $\leq 10\%$	0.1 %	3.3%	1.4%
Solventes Residuales:				
-Acetona	< 0.05%	0.001%	0.002%	ND
-MEK	< 0.5%	ND	ND	ND
-Acetonitrilo	< 0.5%	0.002%	ND	ND
Límite de Etanol	< 10%	6.7 %	8.6 %	9.7 %
Pureza Radionucleídica	Presencia de picos de emisión $\gamma$ a 511KeV y/o 1022Kev	Cumple	Cumple	Cumple
Identidad Radionucleídica ( $t_{1/2}$ )	19.9 - 20.9 min	20.4 min	20.2 min	20.2 min
Actividad Específica	> 30 GBq/ $\mu$ mol	75.3 GBq/ $\mu$ mol	87.8 GBq/ $\mu$ mol	84.5 GBq/ $\mu$ mol

\* ND: No detectable

## 2.4. Conclusiones

Se desarrolló un método de producción y control de calidad del [<sup>11</sup>C]DED, que permitió contar con el mismo como radiotrazador de referencia para el desarrollo de nuevos radiofármacos PET específicos para la identificación de células gliales con potencial patogénico (astrocitosis).

## 2.5. Notas

A partir del desarrollo de este radiofármaco en el marco de esta tesis doctoral, el mismo comenzó a utilizarse a nivel clínico en el CUDIM para la detección de astrocitosis en enfermedades neurodegenerativas. Además, el desarrollo químico farmacéutico de [<sup>11</sup>C]DED descrito anteriormente dió lugar a una publicación en una revista científica internacional referada [71] (Ver Anexo Publicaciones).

Otro punto que vale la pena mencionar, es que el costo del precursor disponible

comercialmente para la síntesis del [ $^{11}\text{C}$ ]DED es muy elevado. Debido a ello, nuestro grupo optimizó la síntesis orgánica del mismo a partir de L-fenilalanina, obteniéndose de este modo el precursor bajo la forma de base libre. Con este precursor se obtuvieron rendimientos de marcación más elevados que con el precursor bajo la forma de sal. Los resultados obtenidos dieron lugar a otra publicación [72] (Ver Anexo Publicaciones).

### 3. SÍNTESIS DE SRF101 Y RADIOSÍNTESIS DE [<sup>18</sup>F]SRF101

#### 3.1. Introducción

El <sup>18</sup>F es uno de los radionucleidos más utilizados en la imagenología PET dado que sus propiedades de decaimiento proporcionan ventajas significativas. El mismo presenta un período de semidesintegración relativamente largo ( $t_{1/2}$ : 109.8 minutos) y una baja energía de positrón durante su decaimiento (0.64 MeV). Esto último hace que el positrón presente un rango lineal corto, lo que permite obtener imágenes PET con alta resolución espacial [15].

La marcación de las moléculas con <sup>18</sup>F en lugar de un átomo de hidrógeno no cambia su tamaño o forma y generalmente se obtienen compuestos metabólicamente estables. Sin embargo, las propiedades electrónicas del fluoruro, pueden generar un compuesto análogo con propiedades fisicoquímicas diferentes y alterar sus características bioquímicas, farmacológicas o toxicológicas. Esto hace que sea necesaria una evaluación del nuevo compuesto marcado con respecto a su uso previsto [73].

El <sup>18</sup>F puede ser introducido a la molécula mediante reacciones de fluoración electrofílica o nucleofílica. En el caso de la fluoración electrofílica se utiliza el [<sup>18</sup>F]F<sub>2</sub>, el cual suele generarse mediante la reacción nuclear <sup>20</sup>Ne(d,α)<sup>18</sup>F. En general, en este tipo de fluoraciones se obtiene un producto marcado con baja actividad específica y no es posible el marcado regioselectivo [15, 73].

Las reacciones de fluoración nucleofílica son las más utilizadas para la producción de radiotrazadores PET con <sup>18</sup>F. En estas, el ion [<sup>18</sup>F]-fluoruro se obtiene en una solución acuosa, mediante la reacción nuclear <sup>18</sup>O(p,n)<sup>18</sup>F, irradiando con protones un pequeño volumen de agua enriquecida ([<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O). Para convertir al ion fluoruro en un agente nucleofílico reactivo es necesario realizar algunos pasos adicionales. Usualmente, el [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> proveniente del ciclotrón es atrapado en una columna de intercambio iónico y luego es eluido de la misma utilizando una solución de carbonato de potasio en una mezcla agua/acetoneitrilo. Dado que el fluoruro acuoso es un nucleófilo pobre debido a la solvatación, generalmente se adiciona el reactivo de transferencia de fase kryptofix-222 (K<sub>222</sub>), seguido de la eliminación del agua. De esta forma, el catión potasio forma un complejo fuerte con el K<sub>222</sub>, dejando al ión fluoruro expuesto y más nucleofílico, en un disolvente polar aprótico [15].

La fluoración nucleofílica puede realizarse en compuestos alifáticos (sustitución nucleofílica alifática,  $S_N2$ ) o aromáticos (sustitución nucleofílica aromática,  $S_NAr$ ). Las  $S_N2$  suelen ser altamente eficientes, el único requerimiento es un buen grupo saliente. Los más comunes son los haluros (Cl, Br o I) y los sulfonil ésteres (triflato, mesilato, tosilato o nosilato). La reactividad del sustrato sigue el patrón típico de las  $S_N2$ , con sustitución en el carbono primario favorecido por un alto rendimiento. Mientras que la sustitución en el carbono secundario puede ir acompañada por una eliminación como reacción secundaria. En el caso de las  $S_NAr$ , los grupos salientes más comunes son F,  $NO_2$  y  $NMe_3^+$ , pero a su vez estas reacciones requieren de la activación previa del anillo con un grupo electrón atrayente en la posición *orto* o *para*, como ser  $CF_3$ ,  $NO_2$ , carbonilo o cianuro [73].

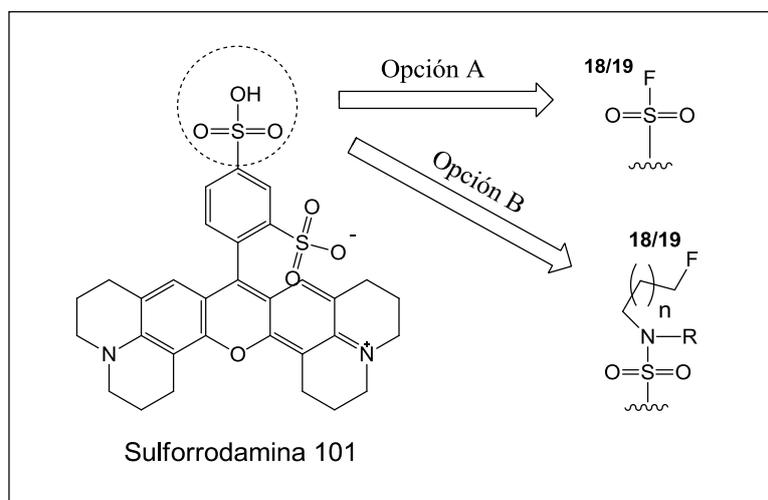
En ambos casos, el principal inconveniente del método es la necesidad de proteger del ataque nucleofílico a otros sitios potencialmente activos que pueda contener la molécula (principalmente ácidos, alcoholes o grupos aminos). Esto resulta en pasos adicionales de síntesis, dado que luego de la fluoración es necesario realizar la desprotección de los grupos (generalmente mediante hidrólisis u oxidación) [15].

Las condiciones típicas de las reacciones de fluoración involucran disolventes polares apróticos (acetonitrilo, DMF, DMSO) con temperaturas entre 80 y 180 °C y tiempos de reacción de 5 a 30 minutos.

Otra opción para preparar radiotrazadores marcados con  $^{18}F$  es la introducción del isótopo mediante un grupo prostético ( $[^{18}F]$ -sintón), lo cual generalmente requiere la implementación de pasos adicionales en la síntesis. Esta estrategia es más difícil que los métodos anteriores, dado que involucra la síntesis previa del  $[^{18}F]$ -sintón, para lo cual pueden ser necesarios varios pasos, y purificaciones del sintón previo a su uso en el acople posterior al precursor [73].

En base a las diferentes posibilidades de introducción de  $^{18}F$  en las moléculas, en este trabajo se realizó el análisis de la estructura de la SR101, con la finalidad de buscar la estrategia de marcación más apropiada para la misma. Para ello se realizó un estudio *in silico*, donde se utilizaron diferentes métodos computacionales, entre ellos la creación de un farmacóforo. Este consiste en el conjunto de grupos funcionales de la molécula que contienen las características esenciales indispensables para la actividad biológica.

Considerando la información obtenida a partir de esto, se plantearon diferentes estrategias para introducir el  $^{18}\text{F}$  en la SR101 (figura 13).



**Figura 13.** Estrategias de marcación de SR101 con  $^{18}\text{F}$ . **Opción A:** Fluoración directa del grupo sulfonato. **Opción B:** Fluoración mediante previa derivatización del grupo sulfonato, formando una alquil sulfamida con un grupo saliente en el extremo de la cadena carbonada.

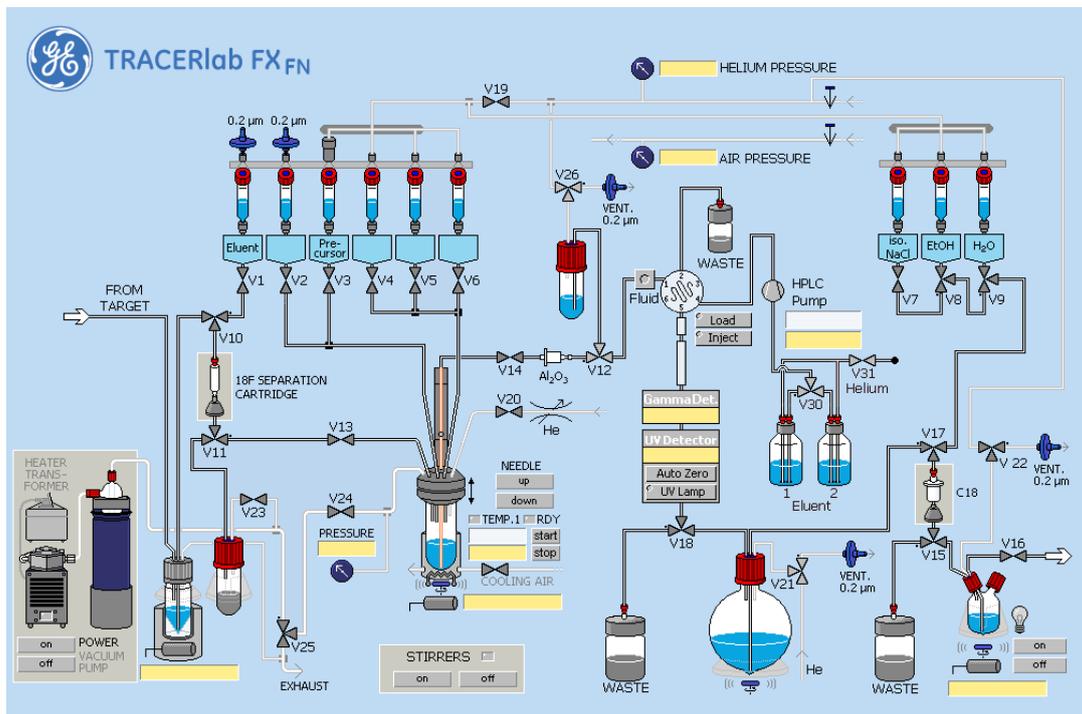
Las diferentes marcaciones se llevaron a cabo en el módulo de síntesis TRACERlab® FX-FN (figura 14) [74], el cual presenta un funcionamiento similar al mencionado en las marcaciones con  $^{11}\text{C}$ , dado que puede usarse en modo automático o comandado por el operador desde una computadora. En este caso todos sus componentes son líquidos, debido a que el  $^{18}\text{F}$  llega desde el ciclotrón solubilizado en agua.



**Figura 14.** Módulo de síntesis TRACERlab® FX-FN.

Este módulo consta de una serie de viales donde se colocan las soluciones tanto para la activación del  $^{18}\text{F}$  como para la síntesis y los subsiguientes pasos de purificación y formulación. La reacción de marcación propiamente dicha se lleva a cabo generalmente en un reactor, luego de la cual se tiene la posibilidad de inyectar el crudo en un HPLC semipreparativo para aislar el compuesto de interés. También se puede colocar un

cartucho de extracción en fase sólida para una posterior purificación del compuesto y eliminación de los disolventes (figura 15).



**Figura 15.** Pantalla del módulo TRACERlab® FX-FN donde se muestran los diferentes componentes del sistema.

En este trabajo fue necesario además, sintetizar los estándares de los análogos fluorados, dado que los mismos no se encontraban disponibles comercialmente. Para ello se utilizaron diferentes herramientas de la química orgánica que se describen en este capítulo.

## 3.2. Parte Experimental

### 3.2.1. Materiales y Equipos

Todos los productos químicos y solventes usados fueron de calidad analítica (Merck, Sigma-Aldrich, Carlo Erba, Dorwil). La TLC analítica se realizó con sílica gel 60 F-254 (Merck) y se visualizó con luz UV (254 nm) y/o *p*-anisaldehído en una solución ácida de etanol. Para realizar las cromatografías en columna se utilizó Sílica gel (Silica 60, 0.04 – 0.063 mm, Macherey - Nagel) y Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (óxido de aluminio 90 neutro, Macherey - Nagel). Los espectros de RMN se realizaron en un espectrómetro Bruker DPX-400 (Facultad de Química, UdelAR). Los valores de desplazamiento químico se asignaron en base a experimentos de RMN estándar (<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY, HSQC, HMBC and <sup>13</sup>C NMR) y

se expresaron en ppm en relación al tetrametilsilano como estándar interno. Los espectros de absorción se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800-240V. Los espectros de masa fueron determinados en un Applied Biosystem API 2000 (ESI-MS). Se utilizó un rotavapor Buchi R-201/2015.

El cartucho QMA Chromafix 30-PS-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> fue comprado a Macherey-Nagel. El cartucho Sep-Pak C<sub>18</sub> light cartridge y el filtro esterilizante fueron comprados a Waters. Se utilizó una columna semipreparativa VP 250/10 mm Nucleosil 100-5 C<sub>18</sub> (Macherey-Nagel) y una columna analítica EC 250/4.6 mm Nucleodur 100-5 C<sub>18</sub>ec (Macherey-Nagel). Se utilizó una columna analítica de GC DB-WAX (30 m largo, 0.53 mm diámetro y 1.00 mm espesor - Agilent).

El [<sup>18</sup>F]-fluoruro fue producido en un ciclotrón PET Trace 16.5 MeV (GE Healthcare). La radiosíntesis se llevó a cabo en un módulo de síntesis TRACERlab® FX-FN (GE Healthcare). Se utilizó un HPLC analítico Shimadzu UFLC equipado con un detector de arreglo de diodos y detector gamma. El análisis de etanol y solventes residuales mediante GC se realizó en un Shimadzu GC-2010 Plus equipado con un detector FID. Las medidas de actividad fueron realizadas en un calibrador de dosis Capintec® CRC 25R, CRC 25 PET o espectrómetro de centelleo sólido con cristal de NaI (Tl) de 3 x 3 pulgadas de pozo acoplado a una tarjeta multicanal ORTEC®.

### **3.2.2. Métodos**

#### **3.2.2.1. Estudio *in silico* de SR101**

Mediante la utilización del programa MOE (The Molecular Operating Environment, Version 2007.09, ChemComp Co.), se realizó un análisis computacional del compuesto en estudio (SR101). Para ello, se llevó a cabo un modelado de estructuras, creándose una base de modelos tridimensionales conteniendo la estructura de la SR101 y siete derivados de la misma. Además se realizó un análisis conformacional de las moléculas en estudio y tamizaje virtual (Virtual Screening) sobre la base de datos PubChem (The PubChem Project: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/), tomando como referencia la SR101. Finalmente se diseñó un modelo de farmacóforo en base a la SR101.

### 3.2.2.2. Síntesis de SR101 fluoruro de sulfonilo (SR101<sub>F</sub>)

**Técnica 1:** Se disolvió 1.0 mg de SR101 cloruro de sulfonilo (SR101<sub>Cl</sub>, mezcla de isómeros disponible comercialmente) (1.6 μmol) en 1 mL de acetonitrilo seco, se adicionó 1.0 mg de KF (17.0 μmol) y una punta de espátula de K<sub>222</sub>. La reacción se dejó agitando durante dos horas a temperatura ambiente, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>.

**Técnica 2:** Se disolvió 1.0 mg de SR101<sub>Cl</sub> (1.6 μmol) en 1 mL de acetonitrilo seco y se adicionaron 3.2 μL de TBAF (3.2 μmol). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>.

En ambos casos el nuevo producto formado fue analizado por espectrometría de masas: MS (ESI, modo positivo): [M + H]<sup>+</sup>, 609,4 y por HPLC analítico: columna C<sub>18</sub>; fase móvil: A: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100mM, pH 6.8, B: CH<sub>3</sub>CN; Gradiente: 0-10min: de 0% a 100% B, 10-15 min: 100% B; flujo total: 1.0 mL/min; detección UV, λ: 578 nm (*sistema 2*). Tr SR101: 9.8min; tr SR101<sub>Cl</sub> : 12.3min.

### 3.2.2.3. Marcación de SR101 con [<sup>18</sup>F]

El proceso de síntesis comenzó con la llegada de [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> desde el ciclotrón (solubilizado en agua enriquecida: [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O), el cual se produjo mediante la reacción nuclear <sup>18</sup>O(p,n)<sup>18</sup>F. Para eliminar el agua enriquecida el [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> fue retenido en una columna de intercambio catiónico, para luego ser eluído con una solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y K<sub>222</sub> en una mezcla H<sub>2</sub>O: CH<sub>3</sub>CN y recolectado en un reactor. Una vez que la mezcla se encontró en el reactor, esta fue calentada a 95 °C y sometida a vacío bajo una atmósfera de N<sub>2</sub>, para así llevarla a sequedad. En el siguiente paso se introdujo el precursor, disuelto en un solvente polar aprótico, para dar lugar a la marcación. En este proceso se probaron diferentes condiciones de marcación con la finalidad de obtener SR101 [<sup>18</sup>F]-fluoruro de sulfonilo (SR101<sup>18</sup><sub>F</sub>). Para ello se realizaron diversas síntesis variando algunos parámetros, tales como disolvente (DMSO y CH<sub>3</sub>CN), temperatura (50, 100 y 160 °C) y tiempo de marcación (2 y 10 min), utilizando en todos los casos 1 mg de precursor (SR101<sub>Cl</sub>). Las reacciones fueron analizadas por HPLC analítico con detección gamma y UV (*sistema 2*).

#### 3.2.2.4. Estudio de estabilidad de la SR101<sub>F</sub> en suero fisiológico

Se realizó una dilución 1/10 con suero fisiológico de una solución de SR101<sub>F</sub> (1mg/mL). Se inyectaron muestras de la misma en HPLC, a tiempo inicial, 30 y 60 minutos (*sistema 2*).

#### 3.2.2.5. Derivatización de la SR101 (Síntesis de SR101 *N*-(3-Bromopropil)-sulfonamida)

La síntesis se llevó a cabo según la técnica de obtención de *N*-(Sulforrodamina 101) -L-glicina, reportada por Romieu. A, *et al* [75]. Se sometieron a secado por vacío en desecador 300 mg de SR101 (0.49 mmol) durante 2 horas. La SR101 seca se mezcló con 1.8 mL de POCl<sub>3</sub> (20.0 mmol), bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, y se dejó agitando a temperatura ambiente durante 21 horas. Al día siguiente el POCl<sub>3</sub> remanente se eliminó por rotavaporación y el producto resultante (SR101<sub>Cl</sub>) se sometió a secado por vacío en desecador durante 1 hora. Se disolvieron 252 mg de bromopropilamina (1.1 mmol) y 348  $\mu$ L de trietilamina (TEA, 2.5 mmol) en 3.6 mL de DMF seco, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. La mezcla se enfrió con baño de hielo y se adicionaron, gota a gota, 8.4 mL de una solución de SR101<sub>Cl</sub> en DMF. La mezcla de reacción se dejó agitando toda la noche a temperatura ambiente, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Luego de 21 horas la misma se rotavaporó, el producto resultante se disolvió en diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y se lavó con agua desionizada. La capa orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se rotavaporó. Las reacciones se siguieron por TLC (FM CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH, 95:5) y al final se controlaron por HPLC analítico (*sistema 2*). Los productos (ambos isómeros de la SR101 *N*-(3-Bromopropil)-sulfonamida: **1A** y **1B**, figura 19) se aislaron y purificaron mediante cromatografía en columna. En las diferentes síntesis realizadas se utilizaron dos sistemas cromatográficos: 1) fase estacionaria: sílica gel (SiO<sub>2</sub>); 2) fase estacionaria: alúmina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). En ambos se utilizó CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> con un 5 y 10 % de MeOH secuencialmente como fase móvil (FM) (el isómero **1A** eluyó primero y luego eluyó el **1B**). En el caso del sistema cromatográfico de purificación 2 se obtuvieron 57.7 mg (16%) de SR101 *N*-(3-Bromopropil)-sulfonamida isómero *para* **1A** y 20.0 mg (6%) del isómero *orto* **1B**. Isómero *para* **1A**: <sup>1</sup>H RMN (400 Hz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 8.41 (1H, d, *J* = 2 Hz, ArH), 7.99 (1H, t, *J* = 5.6 Hz, NH), 7.91 (1H, dd, *J* = 2.0 Hz, 8.0 Hz, ArH), 7.37 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, ArH), 6.53 (2H, s, CHAr), 3.65 (2H, t, *J* = 6 Hz, CH<sub>2</sub>Br), 3.50 (8H, m, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>), 3.01 (6H, m, NHCH<sub>2</sub>, ArCH<sub>2</sub>), 2.62 (4H, t, *J* = 6 Hz, ArCH<sub>2</sub>), 2.02

(4H, m, ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.86 (6H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br, ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (100 Hz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 154.98, 151.74, 150.92, 148.58, 141.38, 134.26, 131.37, 129.0, 127.62, 127.04, 126.37, 122.95, 113.14, 104.67, 50.68, 50.20, 42.86, 36.25, 32.41, 27.40, 20.64, 19.73, 19.71. Isómero *orto* **1B**: <sup>1</sup>H-RMN (400 Hz, MeOH-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 8.59 (1H, s, ArH), 8.22 (1H, dd, *J* = 1.2 Hz, 8.0 Hz, ArH), 8.03 (1H, s, NH), 7.46 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, ArH), 6.63 (2H, s, CHAr), 3.70 (2H, t, *J* = 6 Hz, CH<sub>2</sub>Br), 3.55 (8H, m, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>), 3.10 (6H, m, NHCH<sub>2</sub>, ArCH<sub>2</sub>), 2.75 (4H, m, ArCH<sub>2</sub>), 2.15 (4H, m, ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.98 (6H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br, ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (100 Hz, MeOH-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 153.15, 152.01, 150.32, 147.95, 141.01, 134.76, 131.20, 129.2, 127.62, 127.04, 125.5, 122.95, 114.7, 105.5, 50.15, 49.75, 44.01, 41.12, 35.2, 27.80, 21.30, 20.80, 19.95. ESI-MS, *m/z*: 724 (M<sup>+</sup>•), 747 (M<sup>+</sup>• + Na), 706.5 (M<sup>+</sup>• - H<sub>2</sub>O).

### 3.2.2.6. Identificación de los isómeros de SR101 *N*-(3-Bromopropil)-sulfonamida

Los isómeros obtenidos en la derivatización de la SR101 fueron identificados por espectrofotometría de absorción UV, según el ensayo reportado por Marchesini, S, *et al* [76]. Se realizó el espectro de absorción de cada uno de los isómeros entre 500-700 nm, a diferentes pH (3, 7 y 11). Concentración de las soluciones: 0.1 mg/mL de isómero **1A** ó **1B** en H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1, v/v). Para ajustar el pH de las soluciones a un pH ácido o básico, se utilizó una solución de HCl 1N o NaOH 3N, respectivamente.

### 3.2.2.7. Síntesis de SR101 *N*-(3-Fluoropropil)-sulfonamida

**Técnica 1:** Se disolvieron 8.0 mg de la mezcla de isómeros de SR101 *N*-(3-Bromopropil)-sulfonamida (**1A:1B**, (85:11); 11 μmol) en 1.2 mL de DMF seco y se adicionaron 176 μL (0.61 mmol) de TBAF, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. La mezcla de reacción se sometió a 130 °C durante 45 minutos y luego el disolvente fue eliminado por rotavaporación. La reacción se controló por HPLC analítico (*sistema 2*). El crudo de reacción se analizó por RMN, dilucidándose un producto mayoritario. Compuesto **3**: <sup>1</sup>H-RMN (400 Hz, MeOH-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 8.34 (1H, s, ArH), 7.95 (2H, bs, NH, ArH), 7.48 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, ArH), 6.54 (2H, s, CHAr), 3.83 (4H, t, *J* = 7,6 Hz, SO<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>), 3.50 (8H, m, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>), 3.01 (4H, m, ArCH<sub>2</sub>), 2.63 (4H, t, *J* = 6 Hz, ArCH<sub>2</sub>), 2.06 (6H, m, SO<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.86 (4H, m, ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (100 Hz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 154.76, 151.73, 150.93, 148.58, 140.6, 135.28, 131.76, 129.7, 128.40, 127.61, 123.02, 113.09, 104.67, 99.98, 51.45, 50.70, 50.19, 36.24, 31.22, 27.42, 20.80, 19.78.

**Técnica 2:** Se disolvieron 0.8 mg del isómero **1B** de SR101 *N*-(3-Bromopropil)-sulfonamida (1.1  $\mu$ mol) en 1 mL de DMF seco y se adicionaron 17.6  $\mu$ L (0.06 mmol) de TBAF, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. La mezcla de reacción se sometió a 130 °C durante 160 minutos y a continuación se adicionaron 17.6  $\mu$ L más de TBAF. Al cabo de 2 horas la reacción se detuvo enfriando la mezcla de reacción. Se obtuvieron principalmente dos productos (uno mayoritario y otro secundario), los cuales fueron purificados por HPLC analítico y sus pesos moleculares fueron verificados por espectrometría de masas: ESI-MS, *m/z*: producto mayoritario 668.5 (M+•), 690.6 (M+• + Na); *m/z*: producto secundario 664.6 (M+•), 686.4 (M+• + Na). Sistema HPLC analítico utilizado para la purificación (*sistema 3*): columna C<sub>18</sub>; fase móvil: A: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100mM, pH 6.8, B: CH<sub>3</sub>CN; Gradiente: 0-15 min: de 0% a 100% B, 15-20 min: 100% B; flujo total: 1.0 mL/min; detección UV,  $\lambda$ : 578 nm. Tr compuesto mayoritario: 12.9 min y tr compuesto secundario: 14.1 min.

**Técnica 3:** La síntesis se llevó a cabo siguiendo la técnica previamente descrita para la derivatización de la SR101 (ítem 3.2.2.5), partiendo de 300 mg de SR101. En este caso se utilizaron 160 mg de 3-fluoropropilamina (0.84 mmol). Las reacciones se siguieron por TLC (FM CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH, 95:5) y al final se controlaron por HPLC analítico (*sistema 2*). La separación y purificación de los isómeros (**2A** y **2B**, figura 19) se realizó por cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>), utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> con un 2.5, 3.5, 4, 5 y 10% de MeOH secuencialmente como FM (el isómero **2A** eluyó primero y luego eluyó el **2B**). Se realizó una segunda purificación por HPLC semipreparativo, utilizando columna C<sub>18</sub>; fase móvil: MeCN:H<sub>2</sub>O (47:53); flujo: 4.0 mL/min; detección UV:  $\lambda$ =200 nm (tiempos de retención, isómero **2A**: 12 min e isómero **2B**: 23 min). Finalmente se obtuvieron 9.7 mg (3%) del isómero *para* **2A** de la SR101 *N*-(3-Fluoropropil)-sulfonamida y 3.5 mg (1%) del isómero *orto* **2B**. Isómero *para* **2A**: <sup>1</sup>H RMN (400 Hz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 8.41 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, ArH), 8.00 (1H, t, *J* = 6.0 Hz, NH), 7.92 (1H, dd, *J* = 1.6 Hz, 7.6 Hz, ArH), 7.38 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, ArH), 6.52 (2H, s, CHAr), 4.53 (2H, dt, *J* = 6 Hz, *J* = 47 Hz, CH<sub>2</sub>F), 3.52 (8H, m, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>), 3.00 (6H, m, NHCH<sub>2</sub>, ArCH<sub>2</sub>), 2.63 (4H, t, *J* = 5.6 Hz, ArCH<sub>2</sub>), 2.03 (4H, m, ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.85 (6H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br, ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (100 Hz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 153.80, 151.90, 151.05, 148.82, 141.64, 134.22, 131.55, 127.60, 127.15, 125.97, 122.95, 113.13, 104.66, 82.33 (d, *J*=158Hz), 50.68, 39.44, 27.37, 20.64, 19.87, 19.68. Isómero *orto* **2B**: <sup>1</sup>H-RMN (400 Hz, MeOH-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 8.38 (1H, s, ArH), 8.00 (1H, dd, *J* = 1.2 Hz, 8.0 Hz, ArH), 8.01

(1H, s, NH), 7.37 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, ArH), 6.54 (2H, s, CHAr), 4.43 (2H, dt,  $J = 5.2$  Hz,  $J = 45.6$  Hz, CH<sub>2</sub>F), 3.51 (8H, m, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>), 3.01 (6H, m, NHCH<sub>2</sub>, ArCH<sub>2</sub>), 2.65 (4H, m, ArCH<sub>2</sub>), 2.02 (4H, m, ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.84 (6H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br, ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (100 Hz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 153.45, 151.29, 151.09, 148.76, 141.35, 134.35, 131.30, 130.01, 126.75, 125.35, 122.15, 113.65, 104.01, 82.15 (d,  $J=145$ Hz), 50.16, 39.87, 27.67, 21.15, 20.98, 19.87. ESI-MS,  $m/z$ : 688.4 (M<sup>+</sup> + Na), 668.5 (M<sup>+</sup> + 2H), 647.7 (M<sup>+</sup> - F).

### 3.2.2.7.1. Síntesis de 3-Fluoropropilamina

La síntesis se llevó a cabo en 4 pasos, según la técnica de obtención de 2-fluoroetilamina, reportada por Gilissen. C, *et al* [77].

#### *N*-*t*-Boc-[3-(*p*-toluensulfoniloxi)propilamina].

Se disolvieron 0.77 mL de propanolamina (10.0 mmol) en 15 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la solución se enfrió a 0 °C y se agregaron 1.5 mL de tiretilamina (11.0 mmol). Se disolvieron 2.18 g de di-*tert*-butil dicarbonato (10.0 mmol) en 2 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y la misma se agregó a la solución de propanolamina. La mezcla se dejó agitando a temperatura ambiente por 22 horas. Al día siguiente se lavó con 10 mL de agua, la capa orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se rotavaporó, obteniéndose *N*-*tert*-Boc-3-aminopropanol, el cual se utilizó sin purificación en la siguiente reacción. En esta se disolvieron 1.75 g de *N*-*tert*-Boc-3-aminopropanol en 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la solución se enfrió a 0 °C y se agregaron 0.88 mL de trietilamina (6.3 mmol). Luego se adicionaron 1.09 g de cloruro de *p*-toluensulfonilo (5.7 mmol) y la mezcla se dejó agitando a temperatura ambiente durante 22 horas. Al otro día la mezcla se lavó con agua (20 mL), la capa orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se rotavaporó el disolvente de reacción. El producto se purificó mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>), utilizando hexano/acetato de etilo (7:3, v/v) como FM, obteniéndose 0.89 g de *N*-*t*-BOC-[3-(*p*-toluensulfoniloxi) propilamina] (27%). <sup>1</sup>H RMN (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ <sub>H</sub>: 7.81 (2H, d,  $J = 8.4$ Hz), 7.37 (2H, d,  $J = 8.0$ Hz), 4.63 (1H, bs), 4.10 (2H, t,  $J = 6.0$ Hz), 3.18 (2H, t,  $J = 6.4$ Hz), 2.47 (3H, s), 1.86 (2H, q,  $J = 6.4$ Hz), 1.44 (9H, s). Las señales de los protones del RMN fueron consistentes con los datos previamente publicados para este compuesto [78].

### *N-t*-Boc-(3-fluoropropilamina).

Se disolvieron 0.4g de *N-t*-Boc-[3-(*p*-toluensulfoniloxi)propilamina] (1.3 mmol) en 15 mL de acetonitrilo y se adicionaron 2.6 mL de una solución de fluoruro de tetrabutilamonio (1M en THF, 2.5 mmol). La solución se calentó a 70 °C, durante 30 minutos, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Finalmente se rotavaporó la mezcla de reacción y el producto se purificó mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>), con hexano/acetato de etilo (8:2, v/v) como FM, obteniéndose 0.15 g de *N-t*-Boc-(3-fluoropropilamina) (66%).  
<sup>1</sup>H RMN (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub>: 4.72 (1H, s), 4.54 (2H, dt, *J* = 47.2 Hz, 5.6 Hz), 3.29 (2H, m), 1.90 (2H, dq, *J* = 27.2 Hz, 6.0 Hz), 1.40 (9H, s). <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 158.66, 84.10 (d, *J* = 208.0 Hz), 76.67, 37.08, 29.69, 29.17. Las señales de los protones del RMN fueron consistentes con los datos previamente publicados para este compuesto [79].

### 3-fluoropropilamina

El grupo amino fue desprotegido por adición de 0.75 mL de ácido trifluoroacético (TFA) a una solución de *N-t*-Boc-(3-fluoropropilamina) en 3 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La solución se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se rotavaporó el disolvente de reacción, obteniéndose 0.16 g de 3-fluoropropilamina como una sal de TFA (99%).  
<sup>1</sup>H RMN (400 Hz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ<sub>H</sub>: 7.89 (3H, s), 4.54 (2H, dt, *J* = 47.2, *J* = 5.6Hz), 2.91 (2H, m), 1.94 (2H, m). <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 158.8 (q, *J* = 35.8 Hz, C=O), 116.2 (q, *J* = 285.4 Hz, CF<sub>3</sub>), 81.7 (d, *J* = 154.7 Hz, C3), 36.2 (d, *J* = 5.1 Hz, C1), 28.5 (d, *J* = 21.2 Hz, C2).

#### **3.2.2.8. Marcación de SR101 *N*-(3-Bromopropil)-sulfonamida isómero 1B con <sup>18</sup>F - Radiosíntesis de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101**

La marcación se llevó a cabo en el módulo de síntesis TRACERlab® FX-FN mencionado anteriormente. Una vez obtenido el [<sup>18</sup>F]-fluoruro activado, se adicionó la solución del precursor SR101 *N*-(3-Bromopropil)-sulfonamida (isómero **1A**, **1B** o la mezcla de ambos, figura 19). Se probaron diferentes condiciones de marcación con la finalidad de obtener la SR101 *N*-(3-[<sup>18</sup>F]Fluoropropil)-sulfonamida. Para ello se realizaron diversas síntesis variando algunos parámetros, tales como masa de precursor (1, 2 y 5 mg), disolvente (DMF y DMSO) y temperatura de marcación (50, 100, 130 y 160 °C). En todos los casos el tiempo de marcación fue de 10 minutos. Las reacciones

fueron analizadas por HPLC analítico con detección gamma y UV(*sistema 2*).

Una vez obtenida la [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 con la PRQ deseada (usando el isómero **1B** como precursor), el crudo fue separado de sus impurezas mediante HPLC semipreparativo: columna C<sub>18</sub>; fase móvil: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (47:53); flujo: 4.0 mL/min; detección gamma y UV λ:200 nm (tr precursor **1B** 16.0 min, tr **2B-SRF101** 12.5 min). La fracción correspondiente a [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 (eluida entre los 10 y 13 minutos) fue recogida en un balón conteniendo 50 mL de H<sub>2</sub>O. La solución diluida se pasó a través de un cartucho de extracción de fase sólida (Sep-Pak C<sub>18</sub> light; pre-activado con 1 mL de etanol, seguidos por 10 mL de H<sub>2</sub>O), el cual se lavó luego con 10 mL de H<sub>2</sub>O. El compuesto de interés fue eluido con 1 mL de etanol y recolectado en un vial conteniendo 6 mL de suero fisiológico. Finalmente el producto fue formulado como inyectable adicionando 3 mL de suero fisiológico, los cuales se pasaron a través del cartucho. La solución final fue transferida a un vial estéril mediante filtración por un filtro hidrofílico de 0.2 μm.

#### 3.2.2.9. Control de Calidad de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101

Las impurezas químicas y radioquímicas fueron detectadas y cuantificadas mediante HPLC analítico con detección gamma y UV (*sistema 2*). El tiempo de retención del precursor y del producto fueron 13.1 min y 12.8 min, respectivamente. La cantidad de producto no marcado y de precursor se determinaron considerando los valores obtenidos a partir del cromatograma UV de los respectivos estándares. Para calcular la cantidad de otras impurezas se consideró el valor del estándar de **2B-SRF101**, asumiendo que las impurezas presentan una absortividad similar a este. La identidad radioquímica de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 se determinó comparando el tiempo de retención del mismo con el del compuesto de referencia. La PRQ se calculó considerando la fracción correspondiente al [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 en relación a la radioactividad total. La actividad específica se determinó considerando la actividad total del radiofármaco al final de la síntesis ([<sup>18</sup>F]2B-SRF101) y la cantidad de producto no marcado (**2B-SRF101**). Los solventes residuales (acetona, acetonitrilo y DMSO) y el etanol fueron analizados por cromatografía gaseosa (GC) de acuerdo al capítulo general de la USP <467> [67]. Se controló la apariencia de la solución mediante inspección visual y se determinó el pH usando un pHmetro previamente calibrado. La pureza radionucleídica se verificó mediante adquisición del espectro gamma y la identidad mediante la determinación del

período de semidesintegración. La concentración de K<sub>222</sub> en el producto final se determinó por TLC revelada con I<sub>2</sub>. La esterilidad y concentración de endotoxinas bacterianas se testearon de acuerdo a los capítulos generales de la USP <71> y <85>, respectivamente [68, 69]. En particular, el test de endotoxinas bacterianas se realizó mediante el ensayo de Lisado de Amebocitos del Limulus (test de LAL) [70].

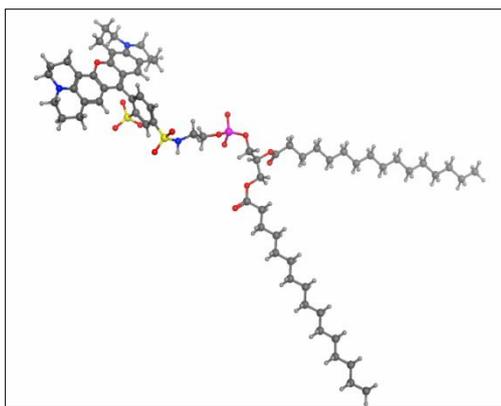
### **3.3. Resultados y Discusión**

#### **3.3.1. Estudio *in silico* de SR101**

Con la finalidad de obtener información sobre la estructura química de la SR101 y estudiar su posible comportamiento a nivel molecular, se realizó un estudio *in silico* de la misma.

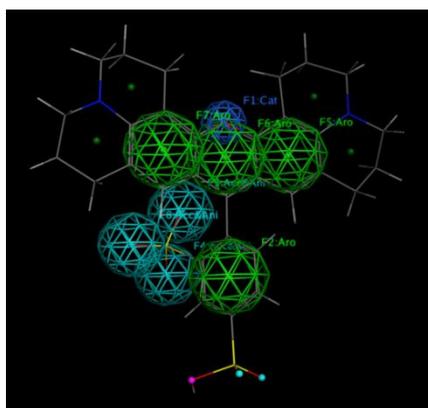
En primer lugar se creó una base de modelos tridimensionales de la SR101 y de sus derivados. El estudio conformacional de los mismos permitió determinar la flexibilidad estructural de las moléculas en estudio. Al analizar las diferentes conformaciones obtenidas se observó que las estructuras de la SR101 y sus derivados presentan una gran rigidez a nivel del grupo xanteno y que la mayor flexibilidad está dada por la rotación del enlace entre éste y el grupo fenilo.

Por otro lado se realizó un virtual screening, el cual permitió encontrar compuestos que tienen la estructura base de la SR101, pero presentan variaciones estructurales a nivel del grupo xanteno y de los grupos sulfonatos. De esta manera se logró amplificar la base de modelos análogos a la SR101, lo cual permitió contar con información útil para la comprensión del posible mecanismo de interacción a nivel molecular de los compuestos de interés con los astrocitos. El compuesto representado en la figura 16 es un ejemplo de esto, dado que presenta la estructura base de la SR101, pero la misma se encuentra unida, a través del azufre, a un átomo de nitrógeno de un fosfolípido, lo que podría representar un elemento presente en la membrana celular de los astrocitos y por lo tanto, dar una pauta de como podría llegar a interactuar la molécula en estudio.



**Figura 16.** SR101 unida a un fosfolípido.

A su vez, mediante el diseño de un farmacóforo se logró identificar aquellas zonas de las moléculas que podrían ser esenciales para la aplicación de las mismas como marcadores de astrocitos. Este farmacóforo se diseñó considerando las características que se suponen indispensables para la interacción entre las moléculas en estudio y los astrocitos (figura 17). Entre ellas se destacaron las características farmacofóricas del grupo xanteno, enfatizando las propiedades hidrofóbicas del mismo, las del anillo aromático y las del grupo sulfonato, dado que este último podría ser la subestructura responsable de la interacción en estudio. De este modo se logró obtener un farmacóforo con aquellas zonas de las moléculas que podrían ser esenciales para la aplicación de las mismas como marcadores de astrocitos.

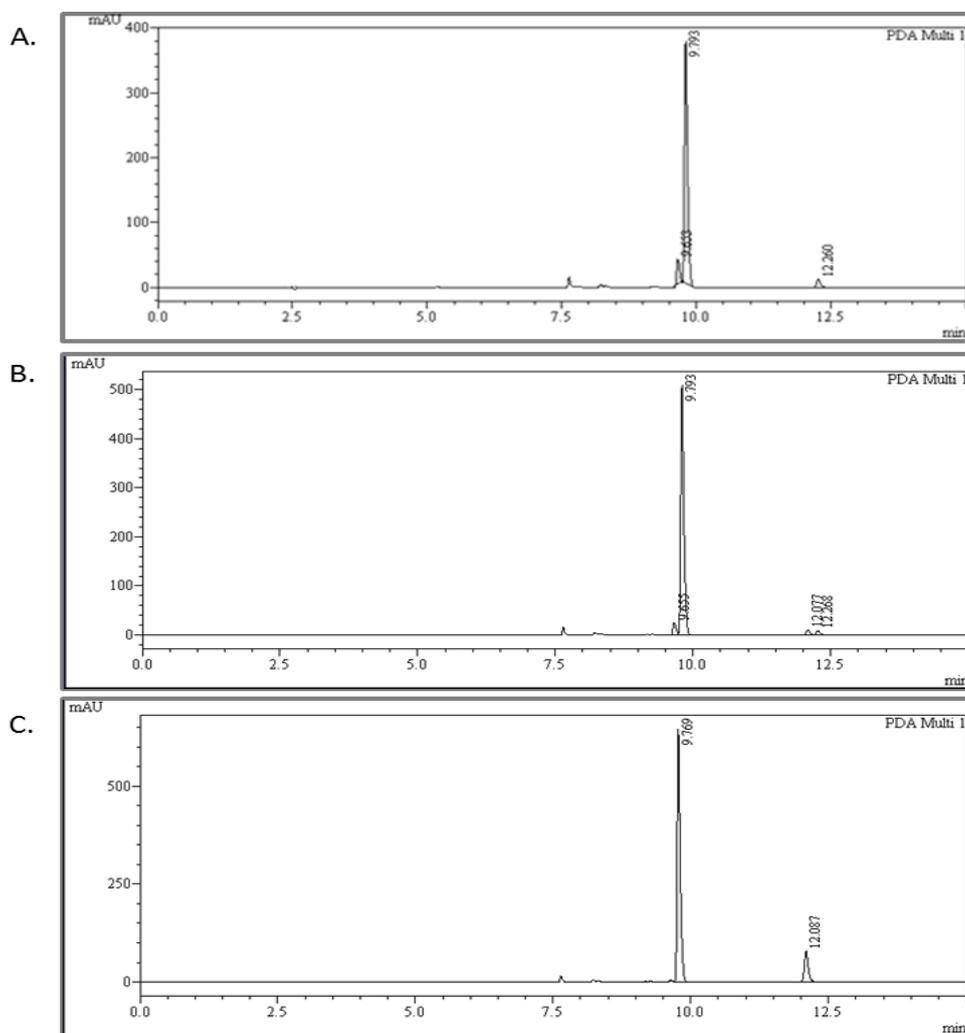


**Figura 17.** Farmacóforo diseñado en base a la estructura de la SR101.

### 3.3.2. Síntesis de SR101 fluoruro de sulfonilo (SR101<sub>F</sub>)

La reacción se llevó a cabo mediante dos técnicas que se diferencian en el agente de fluoración utilizado (KF y TBAF). En ambos casos el reactivo de partida fue la SR101<sub>Cl</sub> (mezcla de isómeros), la cual es muy susceptible al ataque nucleofílico del agua. Este

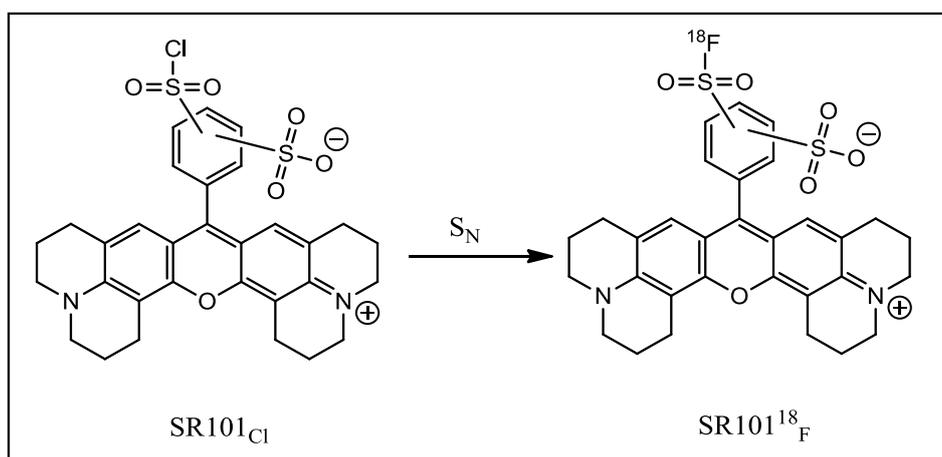
hecho puede dar lugar a la hidrólisis del grupo cloruro de sulfonilo, formándose el ácido correspondiente (SR101). En la reacción en la cual se utilizó KF (*técnica 1*), en el cromatograma UV de las inyecciones en HPLC, inicialmente se observaron dos picos: uno con tr de 12.3 min, coincidente con el del estándar de SR101<sub>Cl</sub> y otro con tr de 9.8 min, correspondiente a la SR101 (producto de hidrólisis que se explicó anteriormente) (figura 18A). Luego de una hora de reacción se observó la aparición de un nuevo pico a los 12.1 min, que podría corresponder a la SR101<sub>F</sub> (figura 18B). La reacción se cortó luego de dos horas, cuando ya no se observó más reactivo de partida (figura 18C). Finalmente, mediante espectrometría de masa, se verificó que el producto obtenido era la SR101<sub>F</sub>. En el caso de la *técnica 2*, la reacción se dio instantáneamente al agregar TBAF, obteniéndose también un elevado porcentaje de SR101 como producto secundario.



**Figura 18.** Cromatogramas UV de inyecciones en HPLC de la reacción de fluoración de SR101 utilizando KF como agente fluorante. **A.** Tiempo inicial. **B.** 1 hora de reacción. **C.** 2 horas de reacción.

### 3.3.3. Marcación de SR101 con $^{18}\text{F}$

Dado que la SR101 contiene en su estructura un grupo cloruro de sulfonilo y que la radiosíntesis de [ $^{18}\text{F}$ ]-fluoruros de sulfonilo a partir de cloruros de sulfonilos ha sido reportada [80], se optó por marcar la SR101 mediante una sustitución nucleofílica con [ $^{18}\text{F}$ ] $\text{F}^-$  (figura 19).



**Figura 19.** Marcación de SR101<sub>Cl</sub> con  $^{18}\text{F}$  mediante sustitución nucleofílica.

Para ello se ensayaron diferentes condiciones (ver tabla 3), pero en todos los casos, al analizar las reacciones por HPLC, en los cromatogramas gamma se observó un único pico en el tiempo muerto, correspondiente al [ $^{18}\text{F}$ ] $\text{F}^-$  sin reaccionar. Por lo que se concluyó que en ninguno de los casos se logró obtener la SR101 $^{18}\text{F}$ . Esto podía deberse a una descomposición del precursor así como también a la descomposición del compuesto ya marcado, el cual probablemente fuera inestable en el medio de reacción. Debido a esto se procedió a realizar el estudio de estabilidad de la SR101<sub>F</sub> en suero fisiológico, dado que en caso de obtener la SR101 $^{18}\text{F}$  como radiotrazador, la formulación final del mismo debería contener suero fisiológico para cumplir con las especificaciones de un inyectable.

**Tabla 3.** Resumen de condiciones ensayadas en las marcaciones de SR101<sub>Cl</sub> con  $^{18}\text{F}$ .

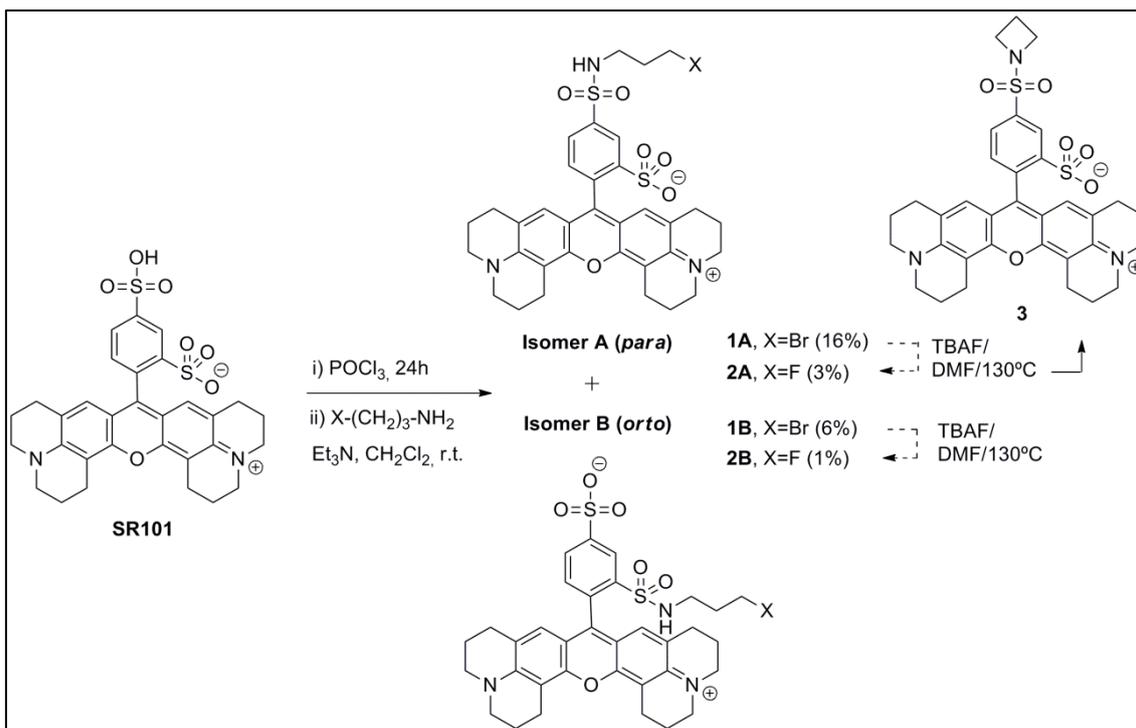
Disolvente	Temp marcación (°C)	Tiempo marcación (min.)
CH <sub>3</sub> CN	100	2
CH <sub>3</sub> CN	50	10
DMSO	160	10

### 3.3.4. Estudio de estabilidad de la SR101<sub>F</sub> en suero fisiológico

Mediante análisis por HPLC se observó que, al mismo tiempo que la cantidad de SR101<sub>F</sub> disminuía, la de SR101 aumentaba (esta última es producto de hidrólisis de la primera), hasta que luego de una hora, toda la SR101<sub>F</sub> se transformó en SR101. En base a esto se llegó a la conclusión de que la SR101<sub>F</sub> no era estable en suero fisiológico. Dado que, como ya se mencionó, esta solución es necesaria en la formulación final de un inyectable, se descartó la posibilidad de seguir trabajando en obtener este compuesto. Por esta razón se prosiguió en la búsqueda de una estrategia de derivatización de la SR101 de modo de obtener precursores factibles de marcar tanto con <sup>11</sup>C como con <sup>18</sup>F. Luego de un análisis orgánico de la estructura del compuesto en estudio, se decidió realizar una modificación a nivel de uno de los grupos sulfonato de la SR101, generando una *N*-(3-Bromopropil)-sulfonamida (figura 19), de modo de obtener un posible precursor para marcar con <sup>18</sup>F, mediante una sustitución nucleofílica del bromo.

### 3.3.5. Derivatización de la SR101 (Síntesis de SR101 *N*-(3-Bromopropil)-sulfonamida)

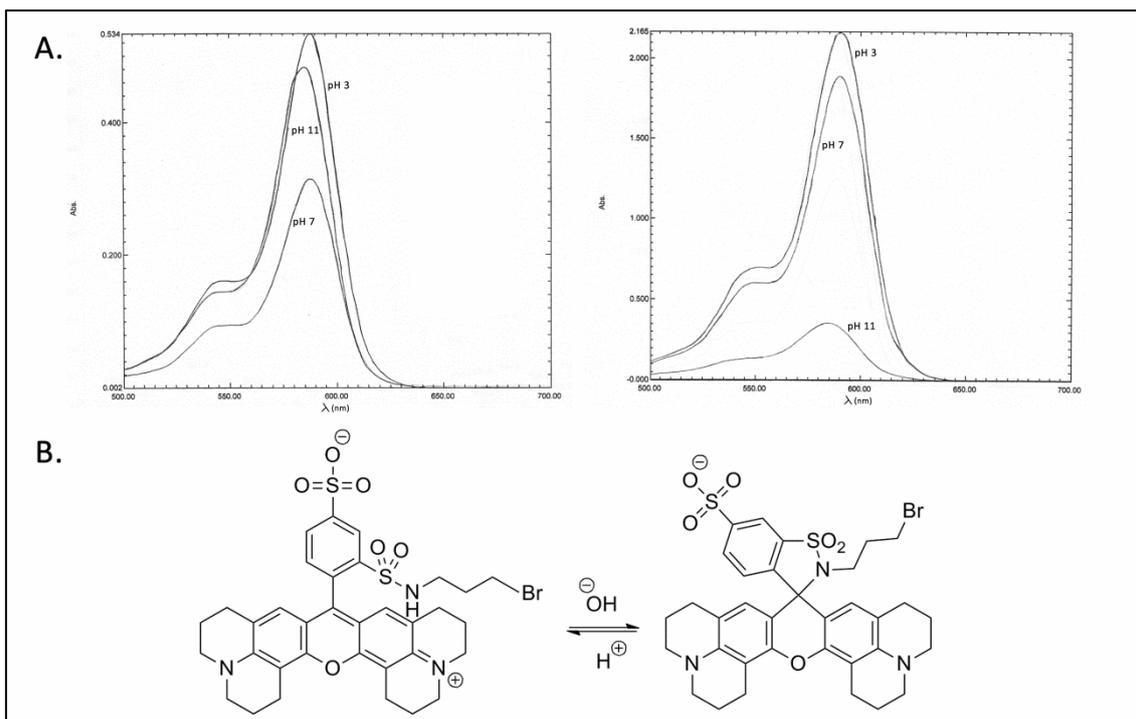
Con la finalidad de obtener un precursor factible de marcar con [<sup>18</sup>F], se sintetizó una SR101-sulfonamida (**1**). Para ello, primero se convirtió la SR101 en SR101<sub>Cl</sub> mediante el tratamiento de la misma con un exceso de oxiclورو de fósforo (Figura 19). Dado que se conoce que el derivado de cloruro de sulfonilo es inestable a la humedad y propenso a la hidrólisis [75], luego de remover el POCl<sub>3</sub>, el derivado formado se usó directamente en el siguiente paso, sin purificación cromatográfica. La derivatización química del grupo sulfonato de la SR101 se realizó luego haciendo reaccionar la SR101<sub>Cl</sub> con 3-bromopropilamina, dando lugar a la formación de dos regioisómeros de *N*-(3-Bromopropil)-sulfonamida (isómero *para* **1A** e isómero *orto* **1B**, Figura 19). Los tiempos de retención de los mismos en HPLC analítico fueron 13.1 min y 14.6 min (isómero **1B** y **1A**, respectivamente). Para la separación y purificación de ambos isómeros se probaron diferentes condiciones de cromatografía en columna. En un inicio, los isómeros fueron purificados usando sílica gel como fase estacionaria, pero no fueron separados (isómero **1A** + **1B**, como una mezcla 85:5). Finalmente, la separación se logró utilizando una columna de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, con la cual se obtuvieron los isómeros *para* **1A** y *orto* **1B** con un rendimiento de 16% y 6%, respectivamente.



**Figura 19.** Esquema de síntesis de los derivados de SR101-sulfonamida.

### 3.3.6. Identificación de los isómeros de SR101 *N*-(3-Bromopropil)-sulfonamida

Los isómeros de la SR101-sulfonamida (**1A** y **1B**, Figura 19) se identificaron mediante espectrofotometría de absorción UV, debido al comportamiento diferente que presentan ambos frente a la variación de pH de sus soluciones. Al variar el pH de la solución del isómero **1A**, no se observaron cambios apreciables en la intensidad del espectro de absorción UV, dado que la misma no se modifica con la variación de pH. Por otro lado, la solución del isómero **1B** disminuyó notablemente su absorción al aumentar el pH, y esto pudo observarse tanto en el espectro de absorción UV como a simple vista (figura 20A), dado que la solución viró de un color rosado intenso a rosado pálido. Este fenómeno puede explicarse debido a que a pH alcalino se produce una ciclación reversible formando un dióxido de isotiazolina (Figura 20B) [76].



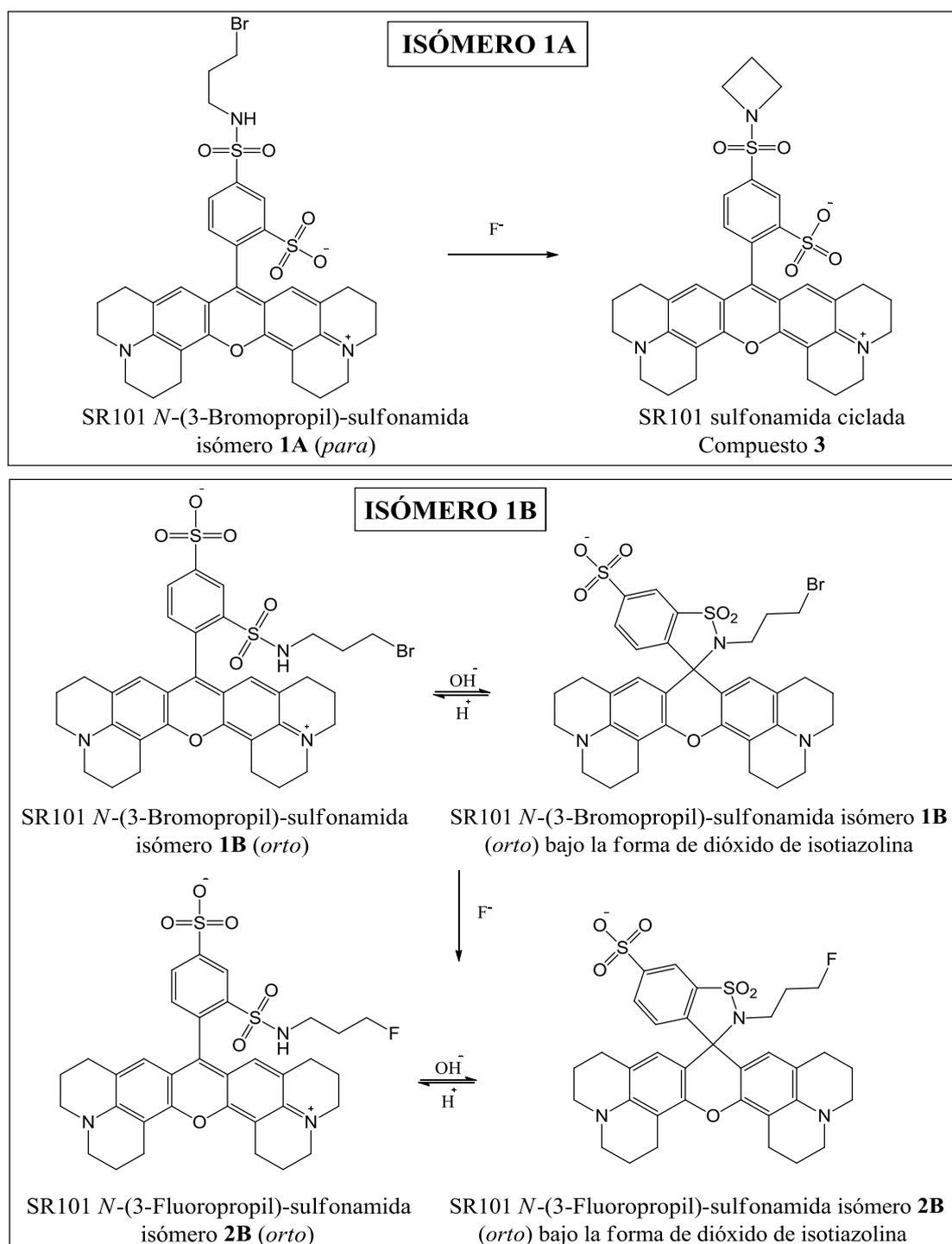
**Figura 20.** A. Espectro de absorción UV del isómero **1A** (izquierda) y **1B** (derecha), realizados a diferentes pH. B. Ciclación del isómero **1B** a pH alcalino, dando lugar al dióxido de isotiazolina.

### 3.3.7. Síntesis de SR101 *N*-(3-Fluoropropil)-sulfonamida

La SR101 *N*-(3-Fluoropropil)-sulfonamida (**2**) se sintetizó para contar con la misma como estándar analítico. En un inicio, con la finalidad de realizar una sustitución nucleofílica del átomo de bromo en la sulfonamida **1** por un átomo de flúor, se hizo reaccionar la mezcla de isómeros (**1A** y **1B**) con TBAF, calentando la misma a 130 °C por 45 minutos (*Técnica 1*). El crudo de reacción se analizó por RMN, para verificar la presencia de SR101 *N*-(3-Fluoropropil)-sulfonamida en el mismo. Al comparar el espectro con el de la SR101 *N*-(3-Bromopropil)-sulfonamida se esperaba observar una señal correspondiente al acople F-H de los protones de la fluoropropilsulfonamida, con una multiplicidad diferente al correspondiente de la bromopropilasulfonamida. Sin embargo la multiplicidad mencionada no cambió y además los protones de la posición 1 y 3 de la propilsulfonamida aparecieron en una misma señal, por lo que se concluyó que los mismos eran equivalentes entre sí. En base a esto y a que la señal correspondiente al protón de la sulfonamida ( $\text{SO}_2\text{NH}$ ) no se observó, se concluyó que el compuesto mayoritario obtenido no era el derivado fluorado esperado, sino que era el compuesto **3** (figura 19). Este derivado se formó debido a una ciclación interna de **1A**, la cual puede

haber sido promovida por el  $F^-$  actuando como base, por la elevada temperatura o por una combinación de ambos. Esto no sucedió con el isómero **1B**, dado que en este caso el fluoruro inicialmente promovió la ciclación que dio lugar al dióxido de tiazolina (figura 20B), dejando al átomo de bromo libre para ser reemplazado por el fluoruro. Dado que en la mezcla inicial el isómero **1B** se encontraba en menor proporción, en el RMN no se visualizó el producto correspondiente a la reacción del mismo con el flúor.

Una vez que se obtuvieron los isómeros por separado, se llevó a cabo la *Técnica 2*, con la finalidad de realizar la sustitución nucleofílica del bromo utilizando únicamente el isómero **1B**. Los dos productos principales obtenidos se aislaron por HPLC y se analizaron por espectrometría de masas (dado que la masa obtenida no era suficiente para análisis por RMN), llegando a la conclusión de que en este caso sí tuvo lugar la reacción esperada y se obtuvo la SR101 *N*-(3-Fluoropropil)-sulfonamida (isómero **2B**, compuesto mayoritario, tr 14.1 min). De este modo se verificó que ambos isómeros presentaban diferente comportamiento al someterlos a la reacción de fluoración, concluyendo que solamente el isómero **1B** de la SR101 *N*-(3-Bromopropil)-sulfonamida era factible de marcar con  $^{18}F$ . En la figura 21 se esquematiza lo descrito anteriormente. Por otro lado, al analizar el compuesto secundario (tr 12.9 min) por espectrometría de masas, se concluyó que el mismo podría corresponder a la SR101 *N*-(3-hidroxipropil)-sulfonamida, como producto de hidrólisis del compuesto de partida.

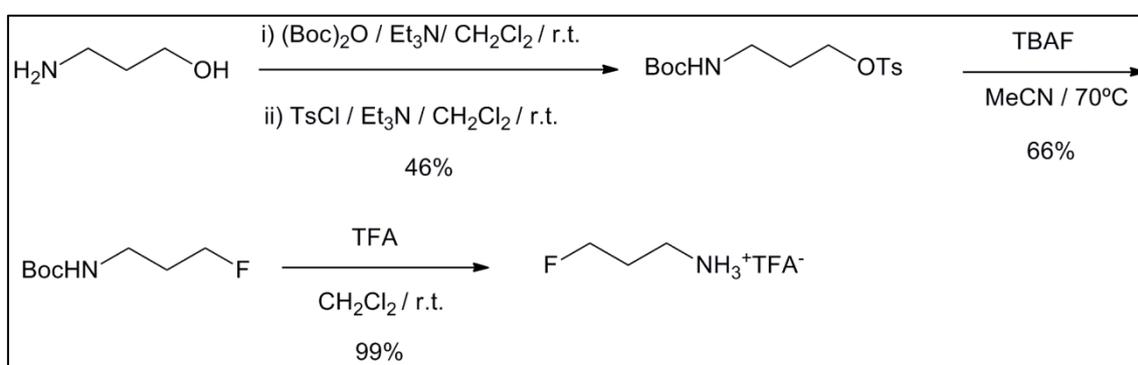


**Figura 21.** Comportamiento de los isómeros **1A** (arriba) y **1B** (abajo) de SR101 *N*-(3-Bromopropil)-sulfonamida frente a un agente de fluoración.

En este contexto, se procedió a realizar la síntesis de SR101 *N*-(3-Fluoropropil)-sulfonamida (**2**) mediante el acople de la 3-fluoropropilamina a la SR101, con la finalidad de obtener mayor cantidad del compuesto y así realizar su elucidación estructural. La síntesis se realizó partiendo de la activación de la SR101 con  $\text{POCl}_3$ , para

luego hacerla reaccionar con 3-fluoropropilamina (figura 19). Para ello, previamente se sintetizó la 3-fluoropropilamina, la cual se llevó a cabo mediante los 4 pasos de reacción que se esquematizan en la figura 22, obteniéndose el producto bajo la forma de sal de TFA. En este caso, se obtuvieron los dos isómeros de SR101 *N*-(3-Fluoropropil)-sulfonamida, cuyos tiempos de retención en HPLC analítico fueron 12.8 min y 13.9 min (isómero **2B** y **2A** respectivamente). Los mismos fueron separados y purificados por columna cromatográfica (SiO<sub>2</sub>) seguido de HPLC semipreparativo.

Cabe destacar que el bajo rendimiento tanto de la síntesis de los compuestos **1** como de los compuestos **2** se puede atribuir a la inestabilidad de la SR101<sub>Cl</sub> [75].



**Figura 22.** Esquema sintético para la obtención de 3-Fluoropropilamina.

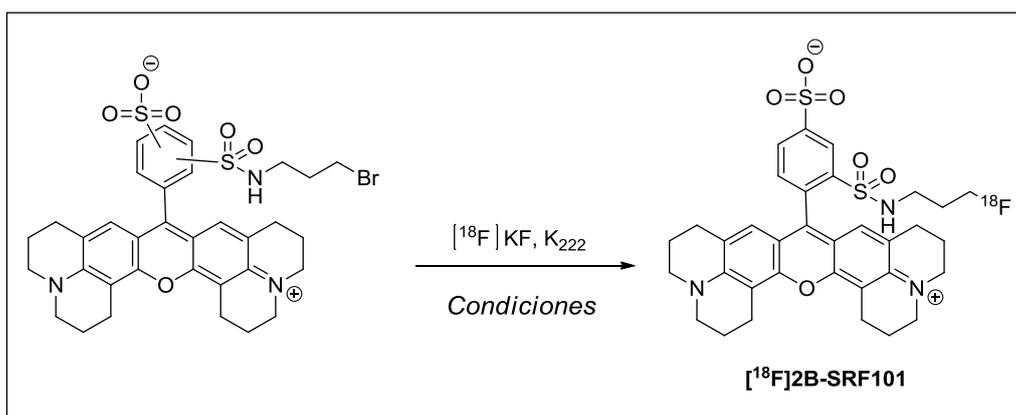
De este modo, se logró contar con los compuestos **2** no sólo para su utilización como estándar para HPLC, sino que además fue posible realizar ensayos biológicos con los mismos debido a sus propiedades fluorescentes.

### 3.3.8. Radiosíntesis de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101

Inicialmente se ensayaron diferentes condiciones de marcación utilizando la mezcla de isómeros (**1A** + **1B**) como precursor. En la tabla 4 se resumen las condiciones ensayadas así como los resultados obtenidos. En la misma se puede observar que al usar DMF como disolvente y baja temperatura de reacción (50 °C) no se obtuvo producto, mientras que al calentar la reacción a 130 °C se obtuvo un compuesto marcado. Sin embargo la PRQ del mismo fue muy baja (Tabla 4, entrada 1 y 2). El DMSO también fue testado como disolvente de reacción, utilizando diferentes masas de precursor (1.0 y 5.0 mg), obteniendo un único producto mayoritario en ambos casos (Tabla 4, entrada 3 y 4). Esto demostró que sólo uno de los isómeros estaba reaccionando con el <sup>18</sup>F.

Una vez que ambos isómeros fueron separados, se probaron diferentes condiciones de marcación con cada uno de ellos, considerando los resultados obtenidos previamente con la mezcla de ambos. La marcación con  $^{18}\text{F}$  fue posible solo con el isómero **1B**, mientras que el isómero **1A** sufrió la ciclación interna que fue descrita en el ítem anterior (Tabla 4, entrada 5-8). Se probaron diferentes temperaturas de marcación utilizando el isómero **1B** como precursor (100 y 160 °C), obteniéndose el compuesto deseado ( $[^{18}\text{F}]\text{2B-SRF101}$ ) con mayor PRQ al calentar a 160 °C la reacción (Tabla 4, entrada 6 y 7). Además se utilizaron 1.0 y 2.0 mg de precursor **1B**, dando lugar al compuesto marcado con una PRQ similar. Debido a esto, la masa de precursor seleccionada para la marcación fue de 1.0 mg (Tabla 4, entrada 7 y 8).

**Tabla 4.** Pureza radioquímica de  $[^{18}\text{F}]\text{2B-SRF101}$  en el crudo de reacción en las diferentes condiciones de marcación utilizadas.



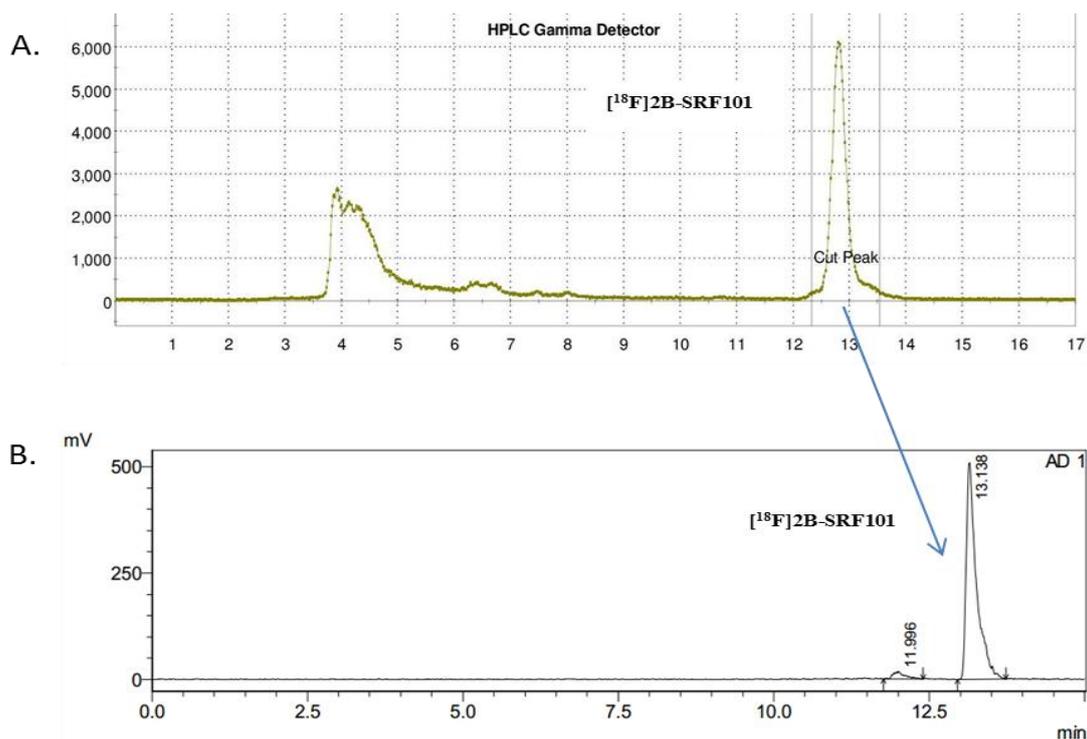
	Precursor	Masa de precursor (mg)	Disolvente	Temperatura de marcación (°C)	PRQ de $[^{18}\text{F}]\text{2B-SRF101}$ en el crudo de reacción (%)
<b>1</b>	Mezcla de isómeros	1.0	DMF	50	0 <sup>a</sup>
<b>2</b>	Mezcla de isómeros	1.0	DMF	130	3.6 <sup>a</sup>
<b>3</b>	Mezcla de isómeros	1.0	DMSO	160	11.2 <sup>a</sup>
<b>4</b>	Mezcla de isómeros	5.0	DMSO	160	19.5 <sup>a</sup>
<b>5</b>	Isómero <b>1A</b>	1.0	DMSO	160	0 <sup>a</sup>
<b>6</b>	Isómero <b>1B</b>	1.0	DMSO	100	0.5 <sup>a</sup>
<b>7</b>	Isómero <b>1B</b>	1.0	DMSO	160	44.1 <sup>b</sup>
<b>8</b>	Isómero <b>1B</b>	2.0	DMSO	160	41.3 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>(n=1); <sup>b</sup>(n=2)

Finalmente, las condiciones óptimas para la marcación del isómero **1B** fueron: 1 mg de precursor en 1 mL de DMSO, 10 minutos de marcación y calentamiento a 160 °C. Estas

condiciones fueron seleccionadas como las más apropiadas para realizar la síntesis completa (incluyendo separación por HPLC, purificación por extracción en fase sólida y los pasos de formulación) (Figura 23).

En la síntesis completa, la SR101 *N*-(3-[<sup>18</sup>F]Fluoropropil)-sulfonamida (**[<sup>18</sup>F]2B-SRF101**) se obtuvo en un volumen de solución de 10 mL y el rendimiento de la misma fue de (11.9 ± 1.7)%, ncd.



**Figura 23.** Ejemplo de un cromatograma gamma típico de HPLC semi-preparativo (A) y analítico (B) de **[<sup>18</sup>F]2B-SRF101**.

### 3.3.9. Control de calidad de **[<sup>18</sup>F]2B-SRF101**

En la última etapa del desarrollo químico farmacéutico de la **[<sup>18</sup>F]2B-SRF101** se pusieron a punto los métodos a emplear para el control de calidad. Además, se establecieron las especificaciones para los diferentes ensayos, en base a las ya existentes en el centro, acorde a la USP o EP, según el caso [21, 22].

Luego de contar con el método optimizado, se realizaron 3 lotes pilotos. Los resultados del control de calidad de los mismos se resumen en la tabla 5, donde se puede observar que todos los lotes estuvieron en concordancia con las especificaciones establecidas. En todos los casos se verificó la esterilidad de la solución y la concentración de

endotoxinas bacterianas se encontró por debajo de los límites establecidos. La actividad específica de la [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 estuvo en el rango de 23 a 69 GBq/μmol (al final de la síntesis).

Cabe destacar que el valor de la actividad específica es un parámetro importante cuando el radiofármaco se une a un blanco específico (como ser un receptor o una enzima). En estos casos generalmente se establece una actividad específica mayor a 30 GBq/ μmol. En el caso de la [<sup>18</sup>F]2B-SRF101, como aún no se conoce el mecanismo por el cual el radiotrazador interaccionaría con el blanco molecular no se estableció una especificación con respecto al valor de la actividad específica.

**Tabla 5.** Resultados del control de calidad de tres lotes pilotos de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101.

	<b>Especificaciones</b>	<b>Lote 1</b>	<b>Lote 2</b>	<b>Lote 3</b>
Apariencia	Solución límpida, rosada y libre de partículas	Cumple	Cumple	Cumple
pH	4.5-8.5	6.3	6.0	6.0
Límite de Kryptofix	<50 μg/mL	<50 μg/mL	<50 μg/mL	<50 μg/mL
Pureza Radioquímica	> 90%	96.3 %	97.4 %	97.4 %
Identidad Radioquímica	Diferencia entre tr del pico radioactivo y del de referencia ≤ 10%	3.2 %	1.5%	2.3%
Pureza Química	SR101 N-(Fluoropropil)-sulfonamida < 100 μg/V	14.6 μg/mL	6.4 μg/mL	11.2 μg/mL
	SR101 N-(Bromopropil)-sulfonamida < 100 μg/V	13.0 μg/mL	3.6 μg/mL	11.2 μg/mL
	Otras impurezas Individuales < 100 μg/V**	1.0 μg/mL	1.5 μg/mL	1.3 μg/mL
	Total impurezas < 500 μg/V	29.8 μg/mL	4.5 μg/mL	27.0 μg/mL
Solventes Residuales:				
-Acetonitrilo	< 0.05%	0.0064%	0.0035%	0.0030%
-Acetona	< 0.5%	0.0014%	0.0012%	ND
-DMSO	< 0.5%	0.0029%	0.0006%	0.0002%
Límite de Etanol	< 10%	9.7 %	9.9 %	9.6 %
Pureza Radionucleídica	Presencia de picos de emisión γ a 511KeV y/o 1022Kev	Cumple	Cumple	Cumple
Identidad Radionucleídica (t <sub>1/2</sub> )	105 - 115 min	111 min	109 min	107 min

\*ND: No detectable

\*\* Ninguna de las impurezas individuales debe superar los 100 μg/V, donde V es el volumen de administración. Los valores que se indican corresponden al máximo obtenido para una impureza

individual, expresados en mg/mL.

### 3.4. Conclusiones

El estudio de potenciales moléculas marcadoras de astrocitos mediante métodos *in silico* brindó información útil sobre la estructura química de las mismas, así como información complementaria para la comprensión del posible mecanismo de interacción con los blancos moleculares. Esto es de especial interés dado que actualmente se encuentra en discusión el posible modo de ingreso/unión de la SR101 a los astrocitos y otras células. Además, la creación del farmacóforo resultó de gran utilidad a la hora de buscar estrategias de marcación de la SR101 con radionucleidos PET, dado que permitió identificar las zonas de la molécula que eran deseables que no se modificaran para mantener la capacidad de las mismas de atravesar la BHE y marcar astrocitos.

En base a esto, con la finalidad de marcar la SR101 con  $^{18}\text{F}$  se sintetizó la SR101 fluoruro de sulfonilo. La misma resultó inestable en suero fisiológico, descartándose su radiosíntesis. Luego de un análisis del compuesto en estudio, se derivatizó la SR101 mediante un linker de sulfonamida, realizando la síntesis orgánica de SR101 *N*-(3-Bromopropil)-sulfonamida así como de su análogo fluorado SR101 *N*-(3-Fluoropropil)-sulfonamida. De este modo se logró contar con todos los estándares y precursores para la radiosíntesis y el control de calidad, que no estaban disponibles comercialmente.

Finalmente, se optimizó la marcación con  $^{18}\text{F}$ , así como la purificación y formulación del derivado de SR101, obteniéndose la SR101 *N*-(3- $^{18}\text{F}$ -Fluoropropil)-sulfonamida ( $^{18}\text{F}$ 2B-SRF101), en concordancia con las especificaciones establecidas en el control de calidad.

### 3.5. Notas

El trabajo descripto en este capítulo dio lugar a una publicación en una revista científica internacional referada [81] (Ver Anexo Publicaciones).

## 4. EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA E *IN VITRO* DE [<sup>18</sup>F]2B-SRF101

### 4.1. Introducción

La evaluación fisicoquímica e *in vitro* es una etapa fundamental en el desarrollo de los radiofármacos. La misma se realiza previo a los estudios preclínicos *in vivo*, dado que aporta información útil para predecir el comportamiento biológico que tendrá el nuevo compuesto. Dentro de los estudios que se utilizan comúnmente para la caracterización se encuentran: ensayos de estabilidad en la formulación final y en plasma, determinación del porcentaje de unión a proteínas plasmáticas y evaluación de la lipofiliidad.

El estudio de la estabilidad de los radiofármacos en su formulación final se realiza comúnmente para verificar que el compuesto sea estable desde que finaliza el proceso de producción hasta que es inyectado en el sujeto. Este período de tiempo puede variar según el radionucleido con el que se está trabajando, dado que el período de semidesintegración de este condiciona el número de estudios que se pueden realizar con un mismo lote del radiofármaco. Tal es así que por lo general con los radiofármacos marcados con <sup>18</sup>F es posible realizar más estudios que con los de <sup>11</sup>C a partir de una única producción, por lo que se requiere que el producto sea estable por un período de tiempo mayor.

Los ensayos de estabilidad en plasma se realizan con la finalidad de predecir la estabilidad de los radiofármacos frente al medio biológico, el cual es altamente competitivo. Por lo general se espera que el compuesto sea estable durante el período de tiempo del estudio imagenológico, el cual puede variar pero generalmente no dura más de dos horas.

La mayoría de los fármacos se unen a las proteínas plasmáticas, generalmente a albúmina y algunas veces también a las globulinas. En general, el grado de unión a proteínas plasmáticas de un fármaco es uno de los principales factores que determina la distribución del mismo en el cuerpo, dado que influye en la partición del fármaco entre la sangre y los tejidos. Además, la unión a proteínas plasmáticas también influye en el transporte y la eliminación de los fármacos [82]. Considerando esto, la determinación del porcentaje de unión a proteínas plasmáticas de los radiofármacos es un factor importante.

Por otro lado, la evaluación de la lipofilicidad de los compuestos es una de las medidas más importantes en el desarrollo de los radiofármacos. La misma está relacionada con la interacción de los diferentes átomos con el medio, por lo que permite predecir experimentalmente el comportamiento de determinada sustancia en el organismo. La lipofilicidad de los fármacos influye tanto en la capacidad de los mismos para atravesar las membranas biológicas y acceder al sitio de acción, como en su posterior eliminación [82, 83].

Asimismo, la distribución de los fármacos en el SNC a partir de la sangre es un fenómeno peculiar, dado que las células del endotelio de los capilares encefálicos presentan uniones estrechas continuas que condicionan la difusión capilar de los compuestos. Como consecuencia, la lipofilicidad de los fármacos constituye un factor determinante de su captación por el encéfalo, es decir, cuanto más lipofílico sea, con mayor facilidad cruzará la BHE. De todos modos, es importante considerar que algunos fármacos penetran en el SNC gracias a ciertos transportadores que normalmente participan en el transporte de nutrientes y compuestos endógenos desde la sangre hasta el cerebro y el líquido cefalorraquídeo [82]. En base a lo anteriormente descrito, si bien la lipofilicidad es una propiedad que permite predecir a priori la capacidad de los radiofármacos de atravesar la BHE, es necesario tener en cuenta que este fenómeno depende a su vez de otros factores biológicos.

Las líneas de cultivos celulares son modelos homogéneos que permiten realizar una evaluación más precisa acerca del comportamiento de los compuestos en estudio a nivel celular y molecular. En el caso de las tinciones celulares con colorantes fluorescentes, a través de la observación de las muestras por microscopía, es posible verificar si el compuesto se une o ingresa a las células, así como determinar cuáles son los componentes celulares que diferencia. En el caso de la SR101, hay estudios reportados que demuestran su capacidad de marcar astrocitos [51, 52]. Sin embargo, en el presente trabajo se utilizó un derivado de la misma con modificaciones a nivel estructural, por lo que fue necesario verificar que el nuevo compuesto mantenía la capacidad de marcar los astrocitos.

## 4.2. Parte experimental

### 4.2.1. Materiales y Equipos

Todos los productos químicos y solventes usados fueron de calidad analítica (Merck, Sigma-Aldrich, Carlo Erba, Dorwil). Se utilizaron la [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 y 2B-SRF101 sintetizadas y controladas según la metodología descrita en el capítulo 3. Se usó una columna analítica EC 250/4.6 mm Nucleodur 100-5 C<sub>18</sub>ec (Macherey-Nagel). Se utilizaron columnas de exclusión molecular Microspin TM G-50, GE Healthcare. Los estudios *in vitro* se realizaron utilizando un pool de plasma humano donado por la Cátedra de Radioquímica, UdelaR. Para generar el cultivo de astrocitos se usaron ratas Sprague Dawley, provenientes del bioterio del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Se utilizó un HPLC analítico Shimadzu UFLC equipado con un detector de arreglo de diodos y detector gamma. Las medidas de actividad fueron realizadas en un espectrómetro de centelleo sólido con cristal de NaI (Tl) de 3 x 3 pulgadas de pozo acoplado a una tarjeta multicanal ORTEC®. En los estudios de estabilidad se utilizó una centrífuga Thermo Scientific Sorvall ST 16R y un vórtex Qilinyiyong 5, Scienfitic Instrument. En los estudios con cultivos celulares se utilizó un microscopio Olympus Epifluorescence IX71 conectado con una cámara DPP70 Olympus o un microscopio FV300 Olympus Confocal. La evaluación de la intensidad de fluorescencia de las imágenes se realizó mediante el software Imagen J (NIH).

### 4.2.2. Métodos

#### 4.2.2.1. Estabilidad de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 en formulación final

La estabilidad radioquímica de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 en la formulación final se chequeó a temperatura ambiente durante 4 horas. Se tomaron 4 muestras de la solución final de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 a diferentes tiempos (30 minutos, 2, 3 y 4 horas). Las muestras se analizaron por HPLC analítico con detección gamma y UV (*sistema 2*) y se determinó la PRQ del compuesto en cada punto.

#### 4.2.2.2. Estabilidad de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 en plasma

La estabilidad radioquímica de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 en plasma se chequeó a 37 °C durante 2 horas. Se incubaron 100 µL de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 con 1000 µL de plasma humano a 37 °C y se tomaron muestras (100 µL) a diferentes tiempos (25, 60, 90 y 120 minutos). Con la finalidad de desnaturalizar las proteínas, una vez extraída cada muestra, se agregaron 100 µL de etanol absoluto frío (a -15 °C), se agitó en vortex y se colocó en freezer durante 5 minutos. Luego, para precipitar las proteínas, la mezcla se centrifugó a 5000 rpm (4696 xg) durante 2 minutos a 4 °C. Finalmente se tomó una muestra del sobrenadante, se analizó por HPLC analítico con detección gamma y UV (*sistema 2*) y se determinó la PRQ del compuesto en cada punto.

#### 4.2.2.3. Determinación del porcentaje de unión a proteínas plasmáticas de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101

Se emplearon columnas de exclusión molecular, las cuales fueron previamente centrifugadas a 3300 rpm (2046 xg) durante 2 minutos a 4 °C, con la finalidad de extraer el buffer de conservación. Se incubaron 100 µL de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 con 1000 µL de plasma humano a 37 °C durante 120 minutos. Se tomaron muestras (50 µL) a diferentes tiempos (35, 60 y 120 minutos), se sembraron en las columnas y se incubaron durante 2 minutos. Las columnas se centrifugaron a 3300 rpm (2046 xg) durante 2 minutos a 4 °C y se colectaron los respectivos eluidos. La radioactividad de las columnas y los eluidos se midieron en un contador de centelleo sólido. Se realizó un blanco a 120 minutos de incubación, reemplazando el plasma por buffer fosfato 0.1M. Cada tiempo se realizó por duplicado [84].

#### 4.2.2.4. Lipofilicidad de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101

Se determinó el coeficiente de partición octanol/buffer fosfato 0.1M (pH 7.0) de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101. Para ello, 2 mL de octanol se mezclaron en un tubo de centrífuga con 2 mL de buffer fosfato. Luego se agregaron 100 µL de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 en cada tubo, la mezcla se agitó en vortex durante 2 minutos y se centrifugó a 5000 rpm (4696 xg) durante 5 minutos a 4 °C. Luego de la separación de ambas fases, se tomaron 3 muestras de 100 µL de cada fase y se midió la radioactividad en contador de centelleo sólido. Se realizaron dos extracciones por cada tubo. El coeficiente de partición se calculó como:

$$\text{Log } P_{\text{OCT}}: \text{Log (cuentas en octanol/ cuentas en buffer).}$$

#### **4.2.2.5. Ensayos en cultivos celulares con SR101 y 2B-SRF101**

##### Cultivo primario de astrocitos

Se prepararon cultivos primarios de astrocitos enriquecidos a partir de cortezas cerebrales de crías de rata Sprague Dawley de 1 día, según los métodos descritos por Saneto y De Vellis, con modificaciones menores [85]. Los animales fueron decapitados, se retiró el cráneo y se removieron las meninges. Se cortó el tejido cortical y se disoció con tripsina-EDTA al 0.5% durante 25 minutos a 37 °C. La tripsinización se detuvo con DMEM-HEPES (Dulbecco's Modified Eagle Medium) conteniendo 10% de FBS (Fetal Bovine Serum). Se añadieron 50 µg/mL de ADNasaI, se realizó una desagregación mecánica para obtener una suspensión. La misma se pasó a través de una malla de 80 µm y luego se centrifugó durante 10 minutos a 800 xg. El sedimento obtenido se resuspendió en DMEM-HEPES, conteniendo 10% de FBS + 100 UI/mL de penicilina + 100 µg/mL de estreptomina. Luego se sembró en un matraz de cultivo de tejidos de 25 cm<sup>2</sup>. Los medios se cambiaron cada dos días hasta la confluencia (el cultivo cubre toda la superficie del fondo del matraz). Las botellas de cultivo cerradas se agitaron durante 48 horas a 250 rpm y se volvieron a incubar. Luego de una semana, las células se sembraron en placas de Petri de 35 mm a  $2,8 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y se usaron 5-7 días después.

##### Tinción con SR101 y 2B-SRF101

Los cultivos de astrocitos confluentes enriquecidos se enjuagaron con solución buffer fosfato (10 mM, pH 7,2), conteniendo glucosa 20 mM y luego se incubaron durante 1 minuto en una estufa de cultivo con: i - 10 µM de SR101 a partir de un stock de 10 mg/mL disuelto en suero fisiológico; ii-10 µM de SR101 a partir de un stock de 10 mg/mL disuelto en suero fisiológico con 10% de etanol; iii-10 µM de **2B-SRF101** preparada a partir de 10 mg/mL disuelto en suero fisiológico con 20% de etanol y finalmente diluida en 10% de etanol; iv- 10 µM de SR101 preparada a partir de un stock de 10 mg/mL disuelto en DMSO y diluido en suero fisiológico con 0.5% de DMSO o; v- 10 µM de **2B-SRF101** obtenida diluyendo un stock de 10 mg/mL en DMSO y luego en suero fisiológico con 0.5% de DMSO. Después de 1 minuto, las células se enjuagaron en PBS (buffer fosfato salino) con glucosa a 37 °C e inmediatamente se obtuvieron imágenes en un microscopio de fluorescencia. Todas las imágenes se obtuvieron con los mismos parámetros de adquisición mediante el uso del controlador

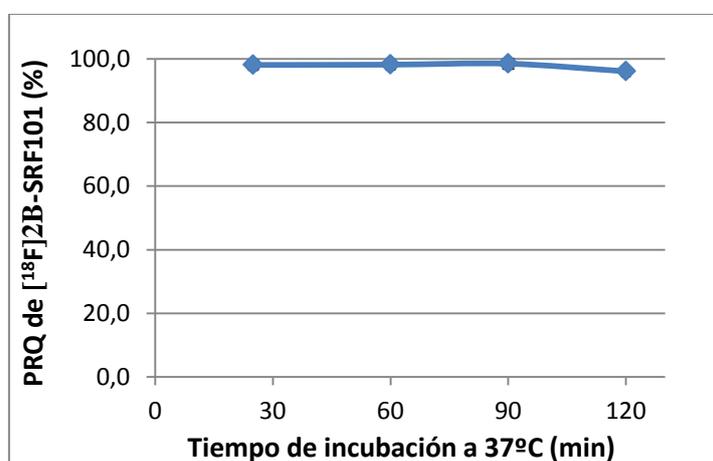
DPP. Cada condición experimental se realizó por triplicado y se analizaron 5 campos por placa.

### 4.3. Resultados y Discusión

Los ensayos *in vitro* son estudios necesarios previo a la evaluación biológica de todo radiotrazador, dado que se usan para predecir el comportamiento *in vivo* de los mismos. En este trabajo se realizaron varios estudios con la finalidad de caracterizar la [<sup>18</sup>F]2B-SRF101: evaluación de la estabilidad en la formulación final y en contacto con plasma, determinación del porcentaje de unión a proteínas plasmáticas y evaluación de la lipofilidad del compuesto.

Los estudios de estabilidad se realizaron determinando la PRQ a lo largo del tiempo. La [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 fue estable en la formulación final, manteniendo una PRQ mayor a 90% durante las 4 horas controladas.

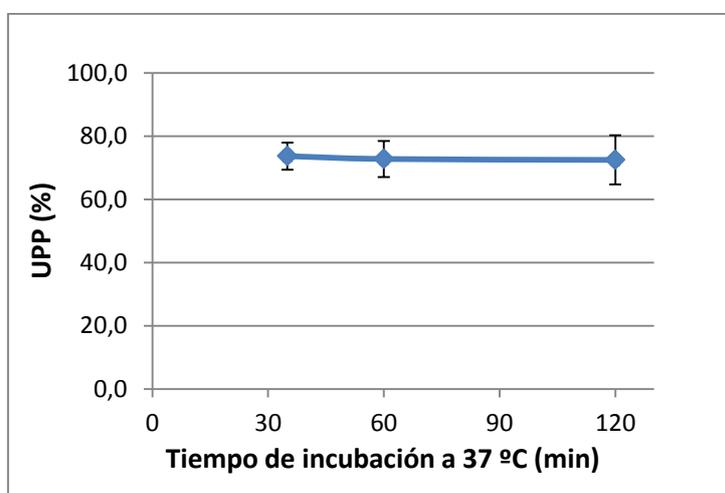
Por otro lado, los estudios en plasma demostraron que la [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 fue estable a todos los tiempos de incubación (figura 24). Este ensayo se realizó durante 120 minutos dado que es el tiempo máximo requerido para realizar las evaluaciones biomédicas, tanto por biodistribuciones como por estudios de imagenología molecular PET/CT.



**Figura 24.** Estudio de estabilidad en plasma: PRQ de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 a diferentes tiempos de incubación (n=3).

La determinación de unión a proteínas plasmáticas de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 se realizó mediante gel filtración. En el ensayo se midió tanto la actividad retenida en la columna (compuesto libre) como la del eluido (compuesto unido a proteínas). En base a esto se determinó el porcentaje de unión a proteínas plasmáticas (%UPP) de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 a

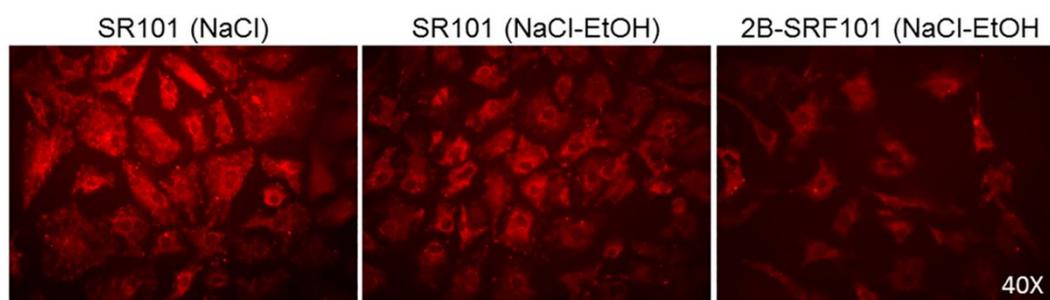
diferentes tiempos de incubación. En la figura 25 se puede observar que el producto presentó un elevado %UPP, el cual fue constante a lo largo del tiempo. Esto podría afectar la depuración del compuesto, dado que en general es la fracción libre la que sufre metabolización. Además, la unión a proteínas plasmáticas puede influir en el pasaje del compuesto a través de las membranas celulares así como también a través de la BHE [82, 86]. De todos modos, estos factores fueron evaluados luego en los estudios de biodistribución en ratones. Por otro lado, es importante tener en cuenta que, en base al estudio de estabilidad en plasma humano, se verificó que el porcentaje de fracción libre del compuesto correspondería a la [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 y no a un metabolito, lo cual es favorable para obtener los resultados esperados en el estudio imagenológico.



**Figura 25.** Unión a proteínas plasmáticas de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 a diferentes tiempos de incubación en plasma (n=3).

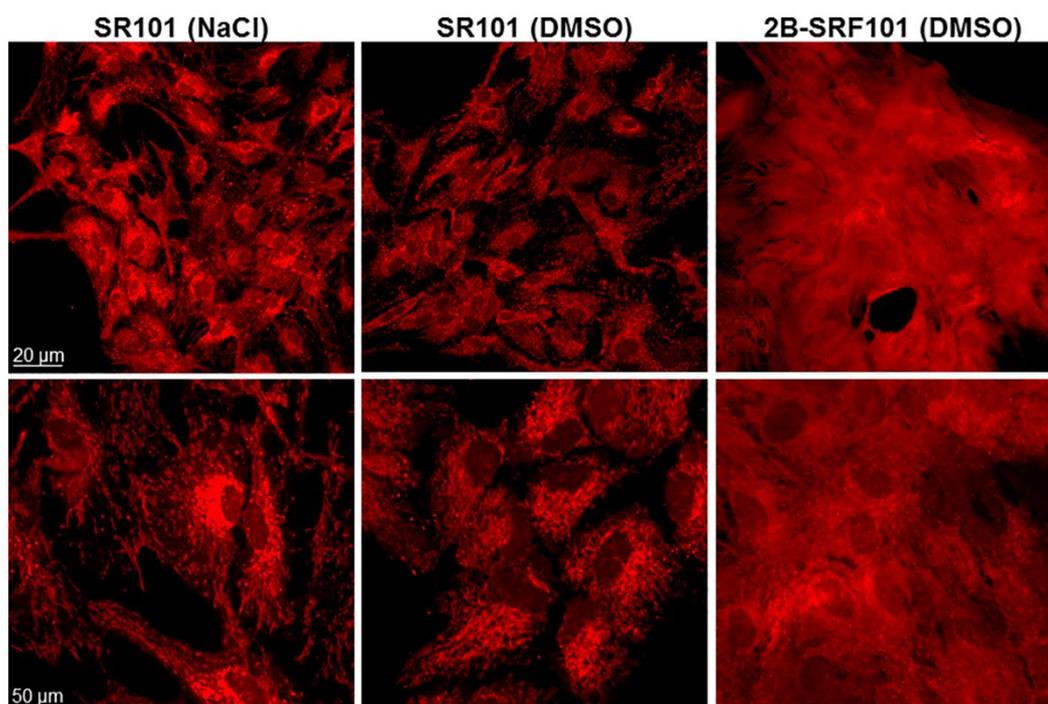
La evaluación de la lipofiliidad de los compuestos permite predecir la capacidad de los mismos para atravesar la BHE, requisito indispensable para los radiofármacos PET que actúan a nivel del SNC. El coeficiente de reparto octanol/agua ( $\log P_{OCT}$ ) es un indicador de la lipofilia del compuesto. Ha sido reportado que para que el compuesto atraviese la BHE es deseable que el valor de  $\log P_{OCT}$  se encuentre entre 1 y 3 [87]. En este caso, se evaluó la lipofiliidad de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101, determinándose un valor de  $\log P_{OCT}$  para la misma de  $(1.88 \pm 0.14)$  (n=4). Este valor indicó un carácter lipofílico del compuesto, por lo que considerando lo anteriormente mencionado, se esperaba que el mismo atravesara la BHE. De todos modos esta propiedad fue evaluada luego mediante ensayos de biodistribución, utilizando las propiedades de fluorescencia del compuesto en estudio.

Dado que la **2B-SRF101** es un compuesto derivado de SR101, con algunas modificaciones a nivel estructural que podrían variar las propiedades del compuesto y por consiguiente el comportamiento biológico del mismo, fue necesario verificar que el nuevo compuesto aún mantenía la capacidad de marcar astrocitos. Para ello se realizaron estudios de tinción de astrocitos con SR101 y **2B-SRF101**. Debido a la baja solubilidad de **2B-SRF101** en suero fisiológico, los ensayos se llevaron a cabo agregando DMSO o etanol al suero fisiológico y se evaluó como afectaban los mismos en las imágenes, comparando siempre con SR101. En los ensayos con SR101 (disuelta en suero fisiológico), mediante una breve incubación, se lograron teñir casi todos los astrocitos presentes en el cultivo confluyente. La tinción se localizó preferentemente en las mitocondrias, las cuales estaban distribuidas por todo el cuerpo celular. En el caso de la incubación con SR101 disuelta en suero fisiológico con 10% de etanol, se reconocieron todas las células y el marcado de las mitocondrias no se vio afectado, aunque fue menos intenso en comparación con el compuesto disuelto en suero fisiológico. Por otro lado, con **2B-SRF101** se identificaron todos los astrocitos y sus mitocondrias. El efecto del etanol en la intensidad del marcado fue mayor, comparando con los niveles de fluorescencia obtenidos en imágenes adquiridas en las mismas condiciones (figura 26).



**Figura 26.** Marcación de astrocitos con SR101 y **2B-SRF101** disueltas en NaCl 0.9% y NaCl 0.9%- 10% etanol.

La disolución de ambos stocks de SR101 y **2B-SRF101** en DMSO causó una disminución significativa en la intensidad de fluorescencia. Sin embargo, esto permitió que la **2B-SRF101** marcara todo el soma del astrocito (figura 27). En base a esto, se puede considerar que el nuevo compuesto en estudio podría usarse no solo para reconocer astrocitos sino también para evaluar los cambios mitocondriales asociados a la neurotoxicidad de los astrocitos.



**Figura 27.** Marcación de astrocitos con SR101 y **2B-SRF101** disueltas en DMSO.

#### 4.4. Conclusiones

Se llevaron a cabo las evaluaciones fisicoquímicas e *in vitro* de [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101 que son recomendadas realizar a todo radiotrazador en etapa de desarrollo. De este modo se verificó que la [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101 era estable tanto en su formulación final como en plasma humano, lo cual es de vital importancia dado que los radiofármacos PET son inyectados por vía intravenosa. Además se determinó el %UPP, encontrándose un valor moderadamente elevado. Por otro lado, se evaluó la lipofilia del compuesto, lo cual da una idea previa del comportamiento del mismo frente al pasaje de las membranas biológicas y en particular de la BHE, capacidad indispensable para un radiotrazador con fines de estudio del SNC. Considerando el valor del coeficiente de reparto octanol/agua, que es un indicador de la lipofilia de los compuestos, se concluyó que a priori la [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101 atravesaría la BHE.

Estos estudios confirmaron que la [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101 presentaba propiedades apropiadas para ser utilizada como radiofármaco, lo cual dio paso a la evaluación biológica *ex vivo* e *in vivo* de la misma.

Finalmente, se evaluó la capacidad de **2B-SRF101** de marcar astrocitos, en comparación con SR101. En los ensayos en cultivos celulares se demostró que el nuevo compuesto marcaba los astrocitos y sus mitocondrias con mayor afinidad que la SR101.

#### **4.5. Notas**

Los estudios en cultivos celulares fueron realizados en cooperación con la Dra. Silvia Olivera, del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Los ensayos mencionados en este capítulo fueron reportados en la publicación mencionada en el capítulo 3 [81] (Ver Anexo Publicaciones).

## 5. EVALUACIÓN *IN VIVO* Y *EX VIVO* DE [<sup>18</sup>F]2B-SRF101

### 5.1. Introducción

Una de las etapas más importantes en el desarrollo de nuevos radiofármacos PET es la caracterización biológica de los mismos. Esta se realiza mediante ensayos *in vivo* y/o *ex vivo*, que permiten verificar si los compuestos siguen las rutas metabólicas de interés, si presentan una vida media biológica suficiente para la realización del estudio y si son útiles para la aplicación diagnóstica que se presumió inicialmente [88].

Generalmente la evaluación biológica de los radiotrazadores se realiza en roedores, como ser ratones o ratas, e incluye ensayos tales como estudios *ex vivo* de biodistribución y estudios *in vivo* por imagenología. En los mismos suelen utilizarse animales sanos y modelos de animales que presentan o simulan la patología a estudiar. Comúnmente, si ya existen otros radiofármacos para estudiar los mismos fenómenos, suelen compararse los resultados con los de los compuestos ya existentes, de modo de evaluar si el nuevo radiofármaco presenta ventajas para su diagnóstico.

Las biodistribuciones implican el sacrificio de los animales luego de distintos tiempos pre-establecidos post-inyección del radiotrazador, disección de los órganos de interés y posterior medida de su actividad. Mediante las biodistribuciones en un modelo animal normal se identifica el perfil farmacocinético del compuesto, incluyendo la distribución del radiotrazador en los diferentes órganos y tejidos, así como las vías de eliminación. Además se puede determinar la captación específica del compuesto en los órganos blanco y no blanco. En el caso de las biodistribuciones en los modelos animales que presentan la patología a estudiar, las mismas se utilizan para conocer si el perfil de biodistribución del radiofármaco presenta alteraciones debido a la enfermedad. También son útiles para evaluar la captación específica del radiofármaco en los órganos y tejidos de interés, que pueden estar alterados debido a la patología, en comparación con los animales sanos [89].

Los estudios de imagenología molecular PET se realizan en cámaras microPET/CT para pequeños animales, cuyo funcionamiento se rige por los principios ya descritos para las cámaras para humanos de similares características. Sin embargo, este equipo presenta un anillo detector más pequeño, que permite que los cristales detectores sean de menor tamaño, mejorando así la eficiencia de detección geométrica del sistema. De

este modo, los estudios PET/CT con estos equipos proporcionan información metabólica cuantitativa en modelos animales con alta sensibilidad, especificidad y mayor resolución espacial. Estas cámaras permiten realizar estudios estáticos y dinámicos, con capacidad de fusión de imágenes y de cuantificación. Se pueden adquirir imágenes de cuerpo entero o de porciones anatómicas específicas [88]. En particular, en las imágenes de cerebro es posible cuantificar la actividad acumulada en las diferentes regiones cerebrales.

Es importante considerar que estos estudios que se realizan en animales de laboratorio se utilizan como un instrumento de estimación del comportamiento y potencial utilidad de los radiofármacos en su etapa de desarrollo. Debido a ello, los resultados que se obtienen a partir de los mismos no son directamente extrapolables a los humanos, aunque sí brindan un modelo útil para conocer el comportamiento de los compuestos en el organismo [89]. De hecho, para el estudio de la EA existen diversos modelos de animales genéticamente modificados. Sin embargo, estos modelos están inherentemente limitados para la enfermedad humana, dado que reflejan fenotípicamente solo algunos aspectos de la enfermedad [90].

En este trabajo se realizaron biodistribuciones y estudios imagenológicos PET/CT con [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101 y [ $^{11}\text{C}$ ]DED, en los cuales se utilizaron animales sanos y un modelo de ratón triple transgénico de EA desarrollado por LaFerla y colegas [91]. Este modelo es útil para estudiar la interacción entre las placas de amiloide y la proteína tau así como su efecto en la función sináptica. Está reportado en qué etapa de la edad del ratón se desarrolla cada proceso. En particular, se ha visto que la gliosis se desarrolla a partir de los 7 meses de edad [91]. Debido a ello, en este trabajo se utilizaron ratones de entre 9 y 10 meses de edad, de modo de tener certeza que al momento de realizar el estudio el proceso ya se había desarrollado.

En el caso de los radiotrazadores para el diagnóstico de patologías del SNC es importante conocer previamente si el compuesto es capaz de atravesar la BHE. Para ello, antes de comenzar con la evaluación del radiotrazador propiamente dicha, se realizó un estudio como método de screening en el que se utilizó el estándar del compuesto análogo al mercado (2B-SRF101), aprovechando sus propiedades fluorescentes. El mismo consistió en una biodistribución en ratones sanos, con posterior análisis del cerebro en una cámara de fluorescencia.

## 5.2. Parte experimental

### 5.2.1. Materiales y Equipos

Se utilizó el [<sup>11</sup>C]DED, la [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 y la 2B-SRF101 sintetizados y controlados según las metodologías descriptas en los capítulos 2 y 3, respectivamente. Los estudios de biodistribuciones e imagenología molecular se realizaron en ratones machos C57BL6J Black y en un modelo de ratón triple transgénico (3xTg) de EA (PS1<sub>M146V</sub>, APP<sub>Swe</sub>, and tau<sub>P301L</sub>), ambos de entre 9-10 meses de edad, provenientes del bioterio de CUDIM. En el caso de los estudios de imagenología por fluorescencia *ex vivo* post-biodistribución, se utilizaron ratones machos C57BL6J Black, de 4 meses de edad, provenientes del bioterio de la Washington University (San Luis, EEUU).

Las medidas de actividad fueron realizadas en un calibrador de dosis Capintec® CRC 25R, CRC 25 PET o espectrómetro de centelleo sólido con cristal de NaI (Tl) de 3 x 3 pulgadas de pozo acoplado a una tarjeta multicanal ORTEC®. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron en una cámara de fluorescencia IVIS® Lumina XR. La adquisición de imágenes PET/CT se realizó en una cámara trimodal para pequeños animales (Triumph™ PET/SPECT/CT, TriFoil Imaging). El análisis semi-cuantitativo se realizó usando el software PMOD, v. 3.301 (PMOD Technologies, Ltd., Zurich, Suiza).

### 5.2.2. Métodos

#### 5.2.2.1. Animales de experimentación

Los animales fueron criados en una habitación del bioterio de CUDIM, con temperatura y humedad controladas; sometidos a ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La comida y el agua se dispusieron *ad libitum*. El protocolo de investigación se llevó a cabo de acuerdo a los requisitos del Comité Nacional de Bioética y se aplicó bajo las regulaciones éticas actuales previstas en la ley de experimentación animal No. 18.611 (Comisión Nacional de Experimentación Animal, CNEA, Uruguay). El comité de bioética animal del CUDIM aprobó los protocolos (N° 15060901).

#### 5.2.2.2. Estudios *ex vivo* de imagen por fluorescencia con 2B-SRF101

Se realizaron estudios de biodistribución *ex vivo* con 2B-SRF101 en ratones machos C57BL6J Black (4 meses de edad). Se utilizó una solución de 2B-SRF101 disuelta en

suero fisiológico/etanol (90:10, v/v), en una concentración de 10 mg/mL. Los animales se inyectaron por vía intravenosa en la vena dorsal de la cola con **2B-SRF101** (20 mg/kg) y luego de 15 minutos se sacrificaron por dislocación cervical. Los cerebros se removieron y se cortaron coronalmente en tres porciones. Luego se adquirieron las imágenes en la cámara de fluorescencia. Este procedimiento se realizó además con la SR101, la cual se utilizó como referencia.

### 5.2.2.3. Biodistribuciones con [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 y [<sup>11</sup>C]DED

El perfil biológico y farmacocinético de la [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 se determinó mediante estudios de biodistribución, tanto en un modelo de ratón 3xTg de EA como en un grupo control normal (ratones C57BL6J Black), de 9 meses de edad. Para ello, ambos modelos de animales se inyectaron con 1.5-38.2 MBq (100-250 µL) de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101, por vía intravenosa en la vena dorsal de la cola y se sacrificaron a los 10, 30, 65 y 110 minutos post inyección. Luego se removieron los órganos y tejidos (pulmones, corazón, bazo, hígado, riñones, músculos, huesos, estómago, intestino, vejiga y cerebro) y se tomaron muestras de sangre. Los mismos fueron pesados y su radioactividad se midió en un contador gamma. Durante el tiempo de biodistribución se colectó la totalidad de la orina, luego del sacrificio la misma se removió de la vejiga y su actividad fue medida. Se calculó el porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido (% AI/g) y el porcentaje de actividad inyectada en órgano total (% AI). Se aplicaron correcciones por geometría cuando fue necesario. En el caso del cerebro, el mismo se dividió en tres zonas: cerebro superior (que contiene hipocampo y corteza), cerebro inferior y cerebelo. Los resultados se expresaron como porcentaje de actividad con respecto a cerebro total.

De manera de comparar los resultados con el radiotrazador usado como marco de referencia, se realizaron también biodistribuciones en ratones transgénicos y en ratones C57BL6J Black con [<sup>11</sup>C]DED. Para ello, los animales se inyectaron con 3.6-27.2 MBq (100-250 µL) de [<sup>11</sup>C]DED por vía intravenosa en la vena dorsal de la cola. Los ratones transgénicos se sacrificaron a los 14, 30 y 75 minutos post inyección. Luego, para el procesamiento de las muestras se siguió el mismo procedimiento descrito para la [<sup>18</sup>F]2B-SRF101. En el caso del grupo control solo se analizó la distribución cerebral a los 75 minutos.

#### 5.2.2.4. Estudios imagenológicos PET/CT con [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 y [<sup>11</sup>C]DED

Las imágenes PET/CT de ratones se adquirieron con la cámara trimodal para pequeños animales mencionada anteriormente. Los animales fueron anestesiados con isoflurano 2% en un flujo de oxígeno de 2 L/min y colocados en posición prona en la camilla del scanner. Posteriormente fueron inyectados por vía intravenosa en la vena dorsal de la cola, con 100 - 200 µL de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 (21.7 - 39.3 MBq) o [<sup>11</sup>C]DED (11.5 - 28.0 MBq). Se realizaron estudios PET dinámicos de cerebro durante 90 o 60 minutos cuya adquisición comenzó inmediatamente después de la inyección de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 (1 frame x 5 min, 2 frames x 30 min y 1 frame x 25 min) o de [<sup>11</sup>C]DED (1 frame x 5 min, 1 frame x 30 min y 1 frame x 25 min), respectivamente. Los sinogramas se reconstruyeron utilizando el algoritmo 3D-MLEM (3D Maximum Likelihood-Expectation Maximization) con 30 iteraciones.

Los estudios PET se co-registraron con el correspondiente estudio CT, para la localización anatómica. Las imágenes de cerebro se obtuvieron como cortes coronales, sagitales y axiales. Las mismas fueron normalizadas espacialmente contra un modelo de MRI (Nuclear Magnetic Resonance Imaging) de cerebro de ratón incluido en el software PMOD, de modo de escalarlas al sistema de coordenadas del Atlas de Paxinos y Watson [92]. Las imágenes fueron previamente enmascaradas a fin de excluir la actividad extracerebral y mejorar los resultados de la normalización. Luego, con la finalidad de ajustar los volúmenes de interés (VOIs) incluidos en el atlas de cerebro de ratón de PMOD al espacio original de cada animal, se estimó una transformación matemática inversa y se aplicó a los mismos. Se seleccionaron 8 VOIs para el análisis: estriado, corteza, hipocampo, hipotálamo, tálamo, amígdala, bulbo olfatorio y cerebro medio. Para cuantificar la captación en las diferentes áreas del cerebro seleccionadas, el promedio de actividad por unidad de volumen (kBq/cc) se corrigió por la actividad inyectada y el peso del ratón, expresándose como SUV (Standardized Uptake Value). Los valores de captación se normalizaron contra cerebelo (área de referencia), calculando la relación SUV entre el área de interés y la del cerebelo. Los resultados se expresaron como Coeficiente de Normalización contra Cerebelo (CNC) ± SEM (Error Estándar de la Media).

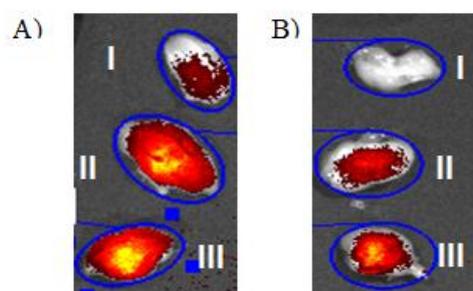
### 5.2.2.5. Análisis estadístico

Los datos de los diferentes grupos fueron analizados mediante la distribución *t de student* (test de una y dos colas). El mismo se aplicó con un nivel de confianza del 95%. La homogeneidad de las varianzas se chequeó previamente usando el test de Fisher. Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  DE (desviación estándar) para cada grupo estudiado.

## 5.3. Resultados y Discusión

### 5.3.1.1. Estudios *ex vivo* de imagen por fluorescencia con 2B-SRF101

Dado que todo radiofármaco PET destinado a la adquisición de imágenes a nivel cerebral debe atravesar la BHE, esta propiedad debía ser confirmada en el compuesto en estudio. Para ello, como método de screening, se realizaron biodistribuciones en ratones sanos con **2B-SRF101** y se adquirieron imágenes aprovechando las propiedades de fluorescencia del compuesto. La **2B-SRF101** se inyectó en ratones por vía intravenosa y luego de 15 minutos los cerebros se removieron y se cortaron en 3 porciones en sentido coronal. Los mismos se analizaron en la cámara de fluorescencia, en donde se observó la presencia de fluorescencia en dos de las tres regiones analizadas. De este modo se confirmó la capacidad de **2B-SRF101** de atravesar la BHE. Además este mismo procedimiento se realizó con la SR101 (utilizada como referencia), observándose un patrón de distribución cerebral diferente entre ambos compuestos (Figura 28).



**Figura 28.** Imágenes de cortes coronales del tercio anterior(I), medio (II) y posterior (III) de cerebro. (A) SR101 (B) **2B-SRF101**.

### 5.3.2. Biodistribuciones con [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 y [<sup>11</sup>C]DED

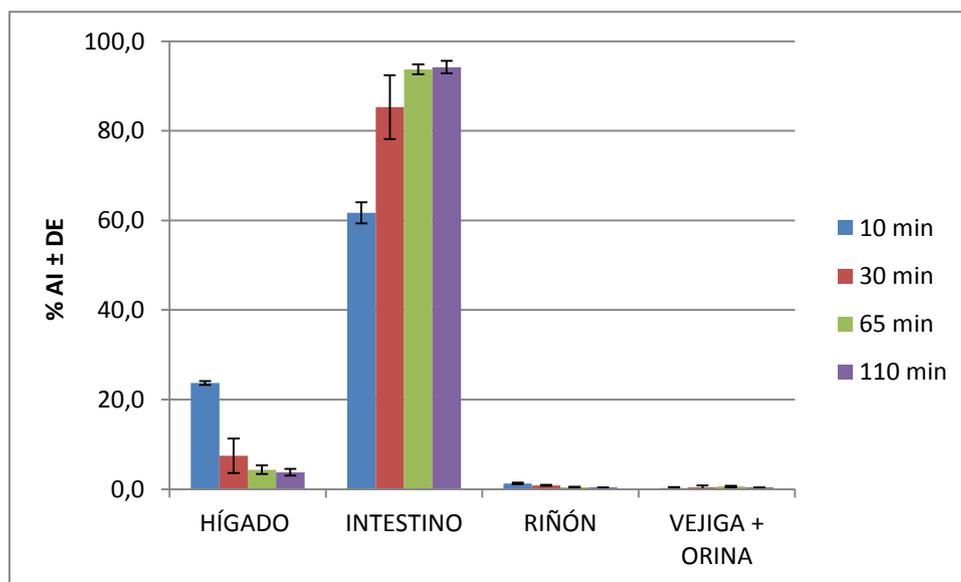
#### Biodistribuciones con [<sup>18</sup>F]2B-SRF101

Se realizaron estudios de biodistribución de la [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 en ratones C57BL6J con la finalidad de determinar el perfil farmacocinético del compuesto nuevo en ratones sanos. Los resultados se resumen en la figura 29 y en la tabla 6. En los mismos se observa una alta concentración de actividad en el hígado e intestino a lo largo del estudio, lo cual, junto con la baja captación en los riñones y vejiga, sugiere una metabolización hepatointestinal (figura 29). Estos resultados son consistentes con las propiedades lipofílicas del compuesto, que fueron previamente determinadas en este trabajo:  $\log P_{OCT} [\text{<sup>18</sup>F}]2\text{B-SRF101} = (1.88 \pm 0.14)$ . En la gráfica de la figura 30 se muestran los % AI en hígado e intestino a diferentes tiempos de inyección. En la misma se puede observar que la concentración de actividad en el intestino aumenta a medida que disminuye en el hígado. Esta observación es consistente con la metabolización hepatointestinal mencionada previamente. La actividad concentrada en el intestino fue relativamente alta luego de 10 minutos de inyección ( $61.72 \pm 2.36$  % AI), alcanzando un plateau de  $85.28 \pm 7.14$  % AI a los 30 minutos post inyección (p.i.), el cual se mantuvo prácticamente constante durante los 110 minutos de estudio. Este porcentaje elevado de actividad muestra que a los 30 minutos p.i. casi el 90 % del compuesto fue metabolizado, lo que refleja la ausencia de uniones no específicas. Esto además se vio reflejado en la baja concentración de actividad en los tejidos no blanco, como ser corazón, hueso, pulmones, bazo y músculo, en todos los tiempos estudiados (tabla 6). Es importante observar que la concentración de actividad en sangre fue muy baja, mostrando un valor de  $1.09 \pm 0.26$  % AI/g a los 10 minutos p.i., el cual luego decreció aún más a lo largo del estudio ( $0.16 \pm 0.08$  % AI/g a los 110 minutos p.i.), indicando una rápida depuración sanguínea del radiotrazador. Teniendo en cuenta en conjunto las características farmacocinéticas descritas anteriormente, podría considerarse que la [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 sería aplicable como un potencial radiotrazador PET. Finalmente, merece la pena notar la mínima acumulación de actividad en hueso ( $\sim 0.05$  % AI/g), la cual no aumentó durante el estudio. Esto sugiere que el compuesto no sufrió una pérdida apreciable de [<sup>18</sup>F].

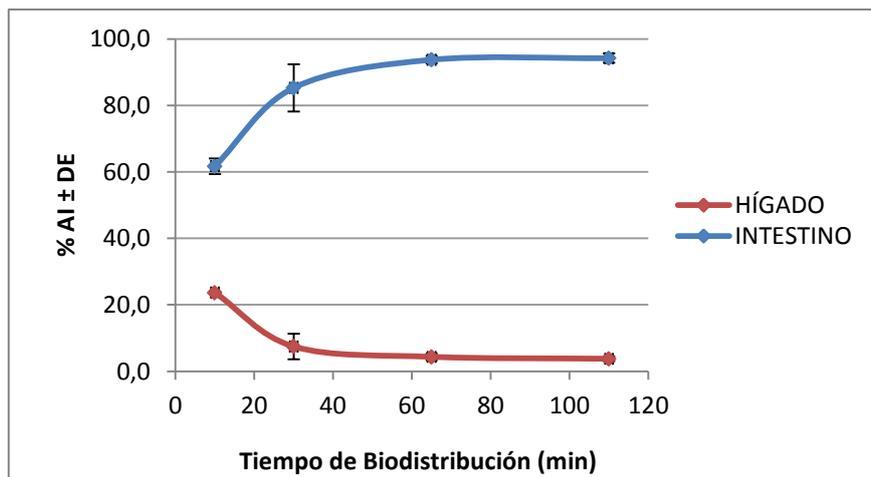
**Tabla 6.** Biodistribución de la radioactividad luego de la inyección i.v. de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 en ratones sanos C57BL6J Black <sup>a</sup>.

Órgano	10 min	30 min	65 min	110 min
Sangre	1.09 ± 0.26	0.37 ± 0.21	0.07 ± 0.02	0.16 ± 0.08
Hígado	12.85 ± 2.74	4.01 ± 2.39	2.24 ± 0.33	2.06 ± 0.65
Corazón	0.14 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.003	0.02 ± 0.02
Pulmones	0.62 ± 0.19	0.25 ± 0.08	0.09 ± 0.03	0.10 ± 0.06
Bazo	0.14 ± 0.09	0.04 ± 0.004	0.02 ± 0.008	0.01 ± 0.009
Riñones	3.49 ± 0.002	2.10 ± 0.29	0.89 ± 0.32	0.96 ± 0.04
Músculo	0.27 ± 0.27	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.002	0.01 ± 0.004
Hueso	0.07 ± 0.06	0.07 ± 0.004	0.03 ± 0.008	0.03 ± 0.009
Cerebro	0.11 ± 0.04	0.07 ± 0.01	0.03 ± 0.003	0.04 ± 0.01

<sup>a</sup> Resultados expresados como promedio de % AI/g ± DE para n=2 (10 y 110 min) y n=3 (30 y 65 min)



**Figura 29.** Metabolización de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 en ratones C57BL6J Black a diferentes tiempos post-inyección.



**Figura 30.** Curvas de actividad-tiempo de hígado e intestino luego de la inyección de  $[^{18}\text{F}]2\text{B-SRF101}$  en ratones C57BL6J Black.

Los estudios de biodistribución se realizaron además en el modelo de ratón transgénico de EA, a los 10, 30, 65 y 110 minutos luego de la inyección de  $[^{18}\text{F}]2\text{B-SRF101}$ . Los resultados se resumen en la tabla 7. En este modelo, el compuesto mostró un patrón de distribución similar al observado en el grupo control. Se observó una alta acumulación de actividad en hígado e intestino, confirmando la metabolización hepatointestinal mencionada anteriormente en el grupo control. Inicialmente la actividad en intestino fue de  $61.07 \pm 3.54$  % AI a los 10 minutos p.i, alcanzando un valor de  $79.72 \pm 16.59$  % AI a los 110 minutos p.i. No se detectó unión inespecífica en otros tejidos y se observó una rápida depuración en sangre del radiotrazador en este modelo, características apropiadas para un agente de diagnóstico PET.

**Tabla 7.** Biodistribución de la radioactividad luego de la inyección i.v. de  $[^{18}\text{F}]2\text{B-SRF101}$  en ratones 3xTg<sup>a</sup>.

Órgano	10 min	30 min	65 min	110 min
Sangre	$1.42 \pm 0.48$	$4.11 \pm 3.98$	$1.61 \pm 0.55$	$0.25 \pm 0.11$
Hígado	$11.43 \pm 4.04$	$5.42 \pm 3.54$	$6.56 \pm 2.49$	$4.64 \pm 2.11$
Corazón	$0.09 \pm 0.02$	$0.06 \pm 0.04$	$0.06 \pm 0.04$	$0.03 \pm 0.01$
Pulmones	$0.46 \pm 0.05$	$0.57 \pm 0.14$	$0.19 \pm 0.01$	$0.18 \pm 0.07$
Bazo	$0.08 \pm 0.02$	$0.05 \pm 0.03$	$0.03 \pm 0.02$	$0.04 \pm 0.04$
Riñones	$2.25 \pm 0.34$	$1.75 \pm 0.61$	$1.03 \pm 0.34$	$0.89 \pm 0.33$
Músculo	$0.07 \pm 0.02$	$0.03 \pm 0.02$	$0.03 \pm 0.01$	$0.02 \pm 0.01$
Hueso	$0.09 \pm 0.01$	$0.07 \pm 0.04$	$0.07 \pm 0.03$	$0.05 \pm 0.03$
Cerebro	$0.09 \pm 0.005$	$0.07 \pm 0.03$	$0.04 \pm 0.005$	$0.05 \pm 0.03$

<sup>a</sup> Resultados expresados como promedio de % AI/g ± DE para  $n=3$  (10, 30 y 65 min) y  $n=4$  (110 min).

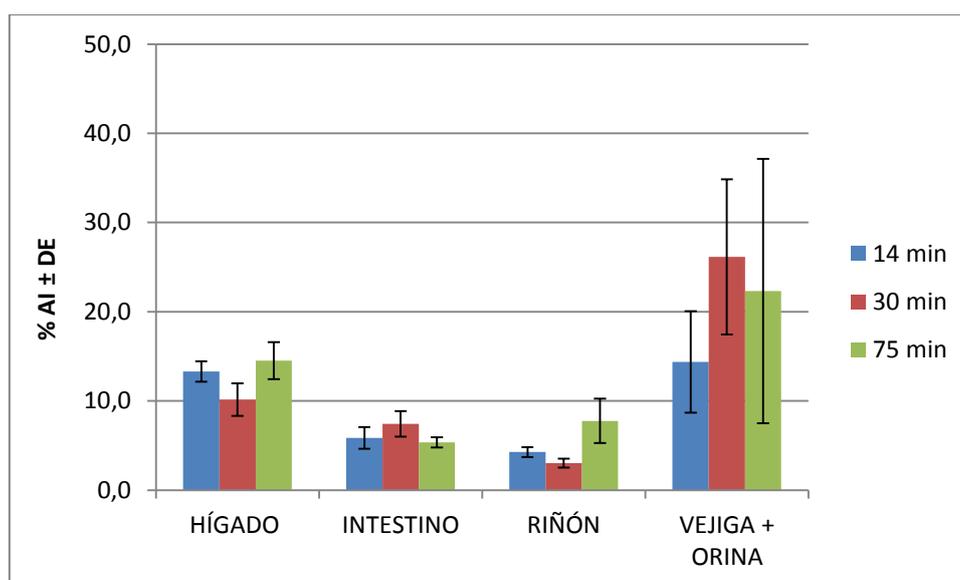
## Biodistribuciones con [<sup>11</sup>C]DED

Dado que el [<sup>11</sup>C]DED es el radiotrazador que actualmente está disponible en la clínica para la detección de astrocitosis, el mismo se utilizó como referencia en este trabajo para los estudios biológicos. Por ello se realizaron estudios de biodistribución, con la finalidad de evaluar su comportamiento en los ratones transgénicos de EA. En la tabla 8 y en la figura 31 se resumen los resultados. A partir de estos se puede observar que el compuesto presentó una eliminación mayoritariamente urinaria ( $22.3 \pm 14.8$  % AI a los 75 minutos p.i.), combinada con una baja metabolización hepatointestinal ( $5.4 \pm 0.6$  % AI a los 75 minutos p.i.). Además se vio una rápida depuración sanguínea y no se detectó unión inespecífica en otros tejidos.

**Tabla 8.** Biodistribución de la radioactividad luego de inyección i.v. de [<sup>11</sup>C]DED en ratones 3xTg<sup>a</sup>.

Órgano	14 min	30 min	75 min
Sangre	$2.86 \pm 1.17$	$2.48 \pm 0.14$	$1.76 \pm 0.44$
Hígado	$7.55 \pm 1.36$	$6.07 \pm 1.72$	$7.33 \pm 1.57$
Corazón	$2.91 \pm 0.24$	$2.92 \pm 0.06$	$1.38 \pm 0.31$
Pulmones	$7.56 \pm 1.29$	$7.92 \pm 1.21$	$2.00 \pm 0.65$
Bazo	$3.63 \pm 0.80$	$4.06 \pm 0.39$	$1.89 \pm 0.27$
Riñones	$8.95 \pm 0.43$	$7.57 \pm 0.91$	$12.93 \pm 3.62$
Músculo	$1.68 \pm 0.30$	$1.41 \pm 0.43$	$0.85 \pm 0.21$
Hueso	$1.68 \pm 0.26$	$1.50 \pm 0.06$	$0.87 \pm 0.12$
Cerebro	$7.46 \pm 0.79$	$7.11 \pm 0.48$	$3.24 \pm 0.29$

Resultados expresados como promedio de % AI/g  $\pm$  DE (desviación estándar) para  $n=3$  (14 y 30 min) y  $n=4$  (75 min).



**Figura 31.** Metabolización de [<sup>11</sup>C]DED en ratones 3xTg a diferentes tiempos post-inyección.

### Análisis de la distribución cerebral de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 y [<sup>11</sup>C]DED

Dado que ambos radiotrazadores serían utilizados para la obtención de imágenes a nivel cerebral, se realizó un análisis más profundo sobre la captación de los mismos en cerebro.

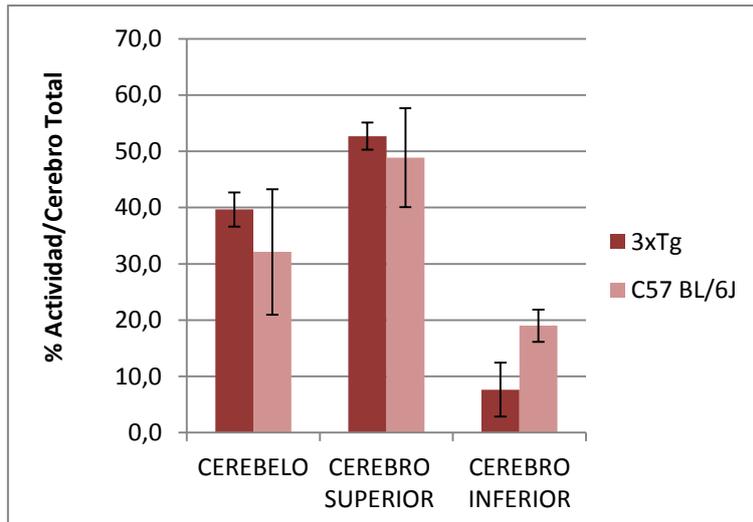
Por un lado se observó que la captación de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 en el cerebro total fue relativamente baja en ambos modelos (tablas 6 y 7). Sin embargo, al comparar la actividad acumulada en cerebro entre ambos grupos (%AI/g), a los 65 minutos se encontró una diferencia significativa en ambos tiempos, siendo mayor en los ratones 3xTg que en el grupo control ( $p < 0.05$ ). Este punto era de especial interés dado que las imágenes PET/CT se analizaron en el frame que abarca entre los 35 y 65 minutos del estudio (se explicará en el siguiente ítem).

En el caso del [<sup>11</sup>C]DED, se observó una importante captación en cerebro (tabla 8), pero al realizar la comparación entre la actividad acumulada en los cerebros de ambos grupos (%AI/g), luego de 75 minutos de inyección, no se encontró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ).

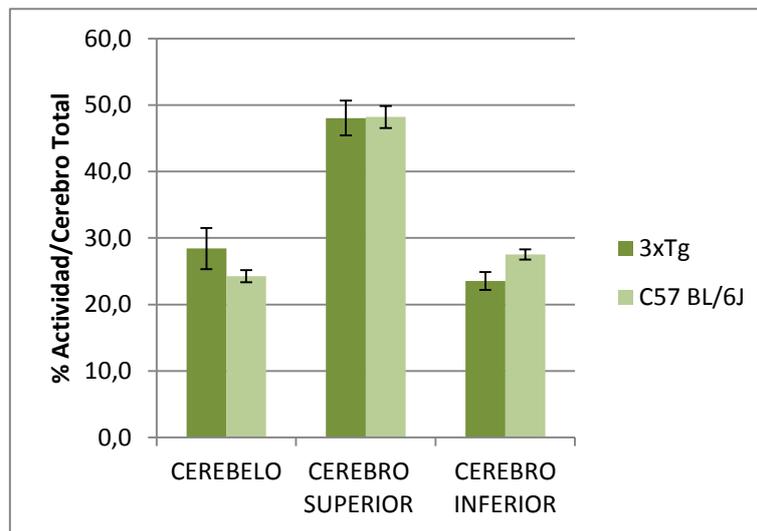
Debido a que está reportado que en el modelo transgénico de EA utilizado, el proceso de astrocitosis se desarrolla mayoritariamente a nivel de la corteza e hipocampo [91], en las biodistribuciones el cerebro se dividió en 3 secciones: cerebelo, cerebro superior (donde se encuentra la corteza e hipocampo) y cerebro inferior. De este modo se evaluó la captación tanto de [<sup>11</sup>C]DED como de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 en las diferentes regiones del cerebro.

Tanto en el caso de la [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 como del [<sup>11</sup>C]DED, a los 65-75 minutos, se observó que la mayor captación estaba a nivel del cerebro superior, donde se encuentran la corteza y el hipocampo (figuras 32 y 33). Sin embargo, con ninguno de los radiotrazadores se obtuvo diferencia significativa de captación en esta región entre ambos modelos ( $p > 0.05$ ).

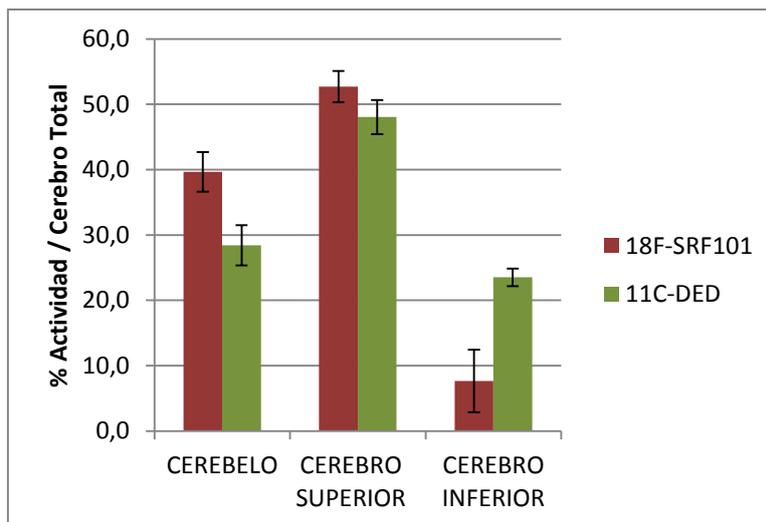
Además, se comparó la captación de ambos radiotrazadores en ratones transgénicos en la región de interés, no encontrándose diferencia significativa entre los compuestos ( $p > 0.05$ ). En el gráfico de la figura 34 se puede observar que ambos radiotrazadores presentaron una distribución cerebral similar.



**Figura 32.** Distribución cerebral en ratones transgénicos (n=3) y grupo control (n=3), a los 65 minutos post-inyección de [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101.



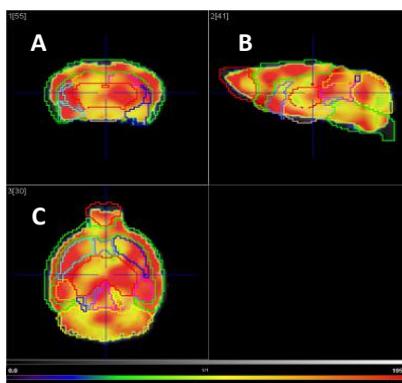
**Figura 33.** Distribución cerebral en ratones transgénicos (n=4) y grupo control (n=3), a los 75 minutos post-inyección de [ $^{11}\text{C}$ ]DED.



**Figura 34.** Distribución cerebral en ratones transgénicos, a los 65 y 75 minutos post-inyección de  $^{18}\text{F}$ 2B-SRF101 (n=3) y  $^{11}\text{C}$ DED (n=4), respectivamente.

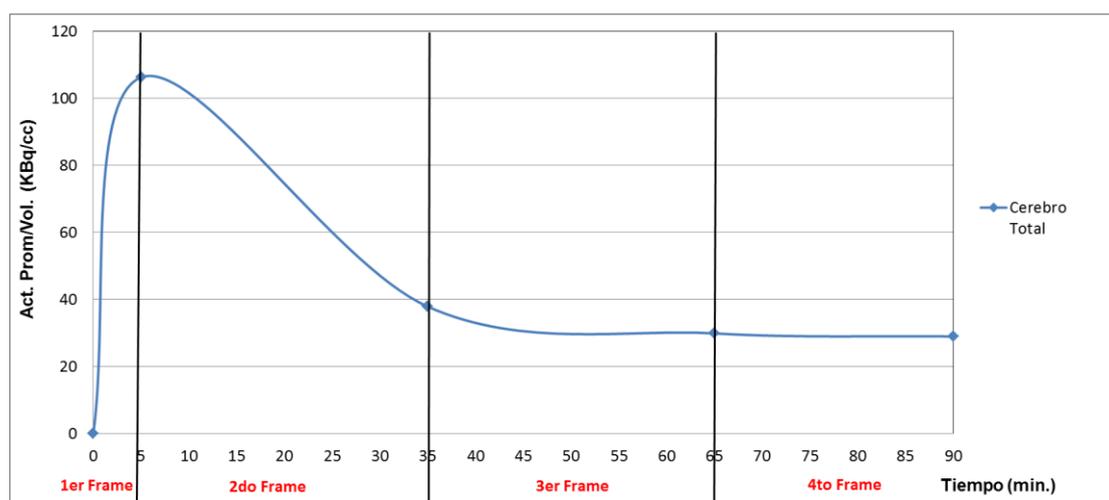
### 5.3.3. Estudios imagenológicos PET/CT con $^{18}\text{F}$ 2B-SRF101 y $^{11}\text{C}$ DED

Se realizaron estudios PET/CT dinámicos con  $^{18}\text{F}$ 2B-SRF101 y  $^{11}\text{C}$ DED con la finalidad de analizar la distribución de ambos radiotrazadores en el modelo transgénico de EA, comparando con el grupo control. En el análisis de las imágenes se seleccionaron diferentes regiones cerebrales (VOIs), en las cuales se evaluó la captación de los compuestos (Figura 35). Para la cuantificación, se consideró la relación SUV entre el VOI de las diferentes áreas del cerebro analizadas y el del cerebelo. Se utilizó el cerebelo como área de referencia debido a que es una zona que en condiciones normales presenta bajo número de astrocitos. De hecho, en los estudios que se realizan actualmente en pacientes con  $^{11}\text{C}$ DED, la normalización se realiza contra cerebelo.



**Figura 35.** Estudio PET con  $^{18}\text{F}$ 2B-SRF101. Imágenes coronal (A), sagital (B) y axial (C) de cerebro de ratón con atlas de Volúmenes de Interés (VOIs).

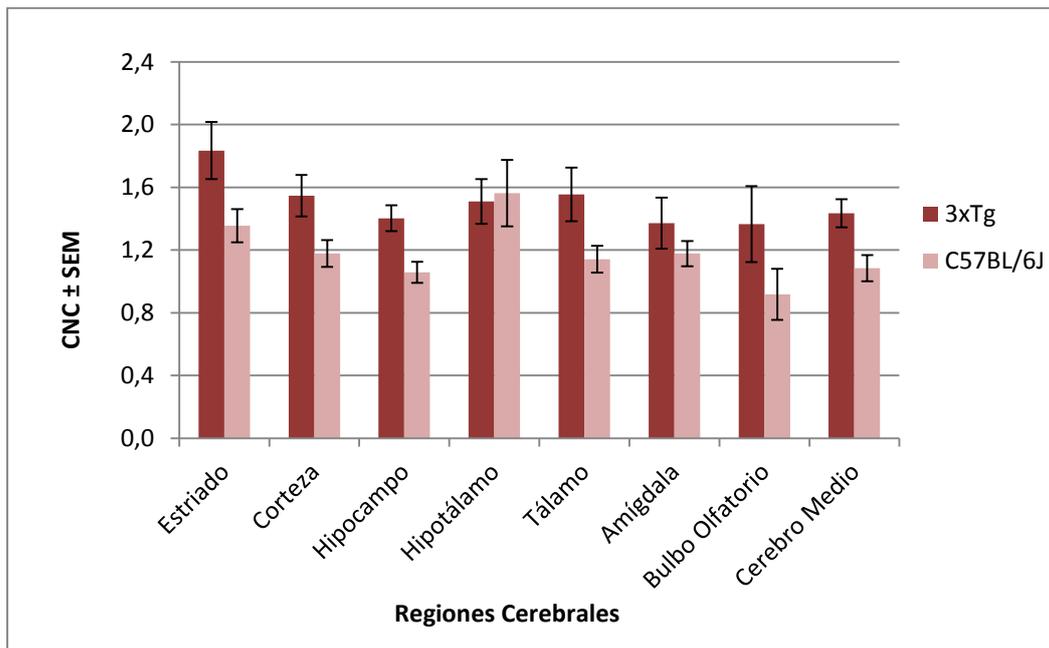
En base a las curvas de actividad-tiempo que se obtuvieron en estos estudios, se decidió utilizar el tercer frame de los mismos para realizar el análisis cuantitativo de la captación de las diferentes regiones cerebrales seleccionadas. Este frame abarca desde los 35 a los 65 minutos post-inyección, en el caso de la [<sup>18</sup>F]2B-SRF101, y desde los 35 a los 60 minutos, en el caso del [<sup>11</sup>C]DED. En la figura 36 se muestra un ejemplo de una curva obtenida para un ratón del grupo control en un estudio con [<sup>18</sup>F]2B-SRF101, considerando la captación cerebral total. En la misma se puede observar que el primer frame (de 0 a 5 minutos del estudio) corresponde al flujo sanguíneo (pool), produciéndose luego una depuración de la actividad hasta llegar a un plateau, el cual representa la retención o captación del radiotrazador en el cerebro. Esto ocurre a partir del tercer frame, razón por la cual este período temporal fue el que se seleccionó para el ya mencionado análisis cuantitativo. Las curvas actividad-tiempo en el caso de los ratones transgénicos mostraron el mismo perfil.



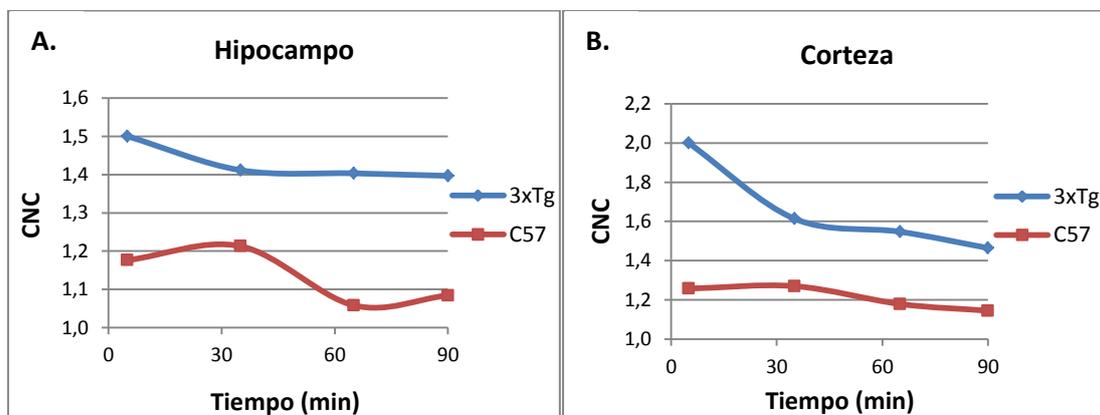
**Figura 36.** Curva actividad-tiempo de cerebro total de un estudio con [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 en un ratón del grupo control.

En la figura 37 se muestra el coeficiente de normalización contra cerebelo (CNC) en diferentes regiones del cerebro de ratones 3xTg y del grupo control, luego de la inyección de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101. Al comparar ambos grupos, se observó una diferencia significativa de captación de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 en estriado, corteza, hipocampo, tálamo y cerebro medio, siendo mayor en los ratones 3xTg que en el grupo control ( $p < 0.05$ ). Dado que está reportado que en este modelo de ratón transgénico la astrocitosis se desarrolla principalmente en hipocampo y corteza [91], se analizó especialmente el CNC en estas dos regiones a lo largo del tiempo. En la figura 38 se puede observar una

clara tendencia a lo largo de los 90 minutos del estudio, donde la captación de [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101 en los ratones 3xTg fue mayor que en el grupo control. Esto se verificó a nivel estadístico, observando una diferencia significativa en la captación de [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101 entre ambos grupos, en las dos regiones en todos los tiempos analizados ( $p < 0.05$ ), excepto en el primer frame (5 minutos) del hipocampo, donde no se encontró diferencia. Esto puede deberse al componente sanguíneo inicial. En conjunto, estos resultados demuestran que el compuesto en estudio presenta propiedades idóneas para constituirse como un marcador de astrocitosis en este modelo animal.



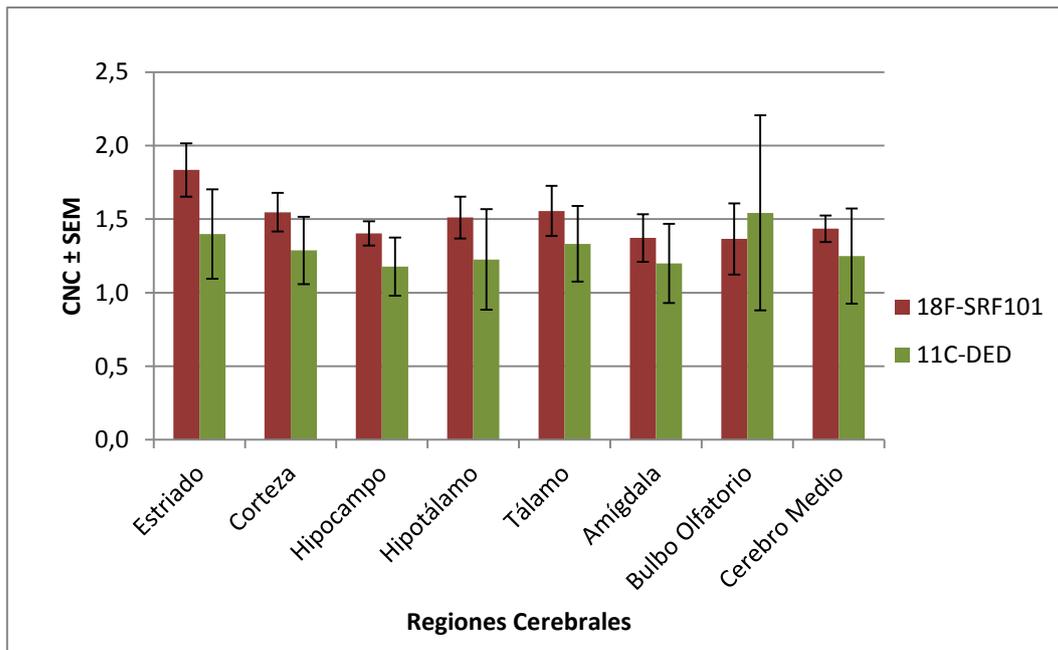
**Figura 37.** Coeficiente de Normalización contra Cerebelo en diferentes regiones cerebrales, del tercer frame del estudio con [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101, en ratones 3xTg (n=7) y grupo control (n=7).



**Figura 38.** Curva CNC-tiempo de hipocampo (A) y corteza (B), obtenida a partir de la imagen PET/CT con [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101.

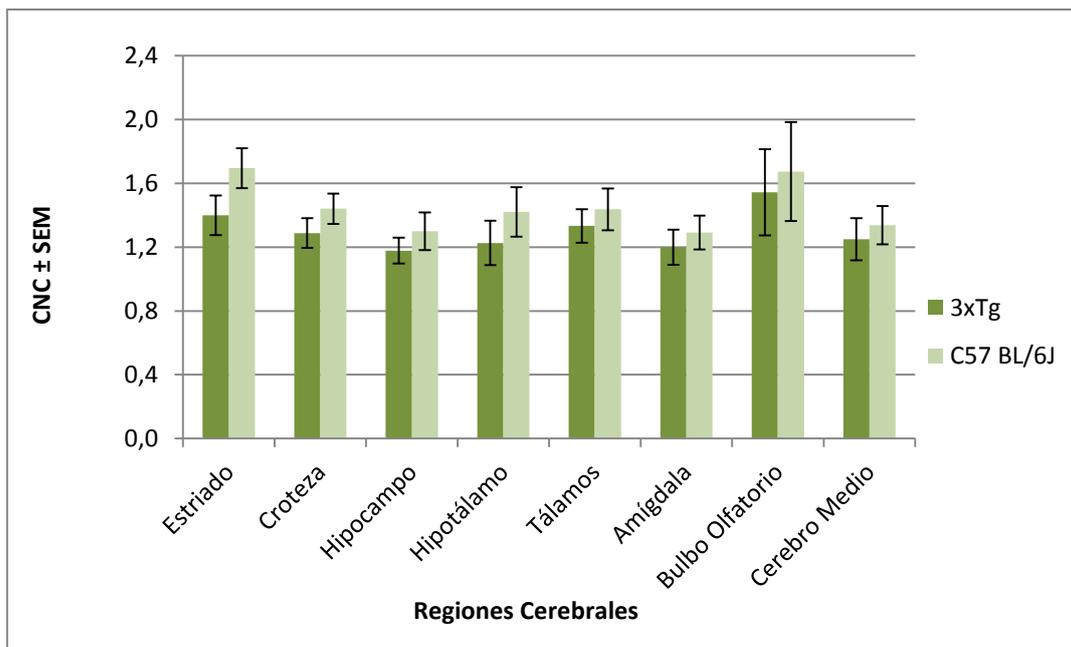
En los estudios comparativos entre la captación de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 y [<sup>11</sup>C]DED en los ratones 3xTg, no se observó diferencia significativa en ninguna de las regiones analizadas ( $p > 0.05$ ) (figura 39). De todos modos, para comparar los resultados y sacar conclusiones, se debe tener presente que ambos radiotrazadores actúan mediante blancos moleculares diferentes. En el caso de la [<sup>18</sup>F]2B-SRF101, se esperaba que la misma detectara a los astrocitos por un mecanismo directo de unión/entrada a estos, por lo que se esperaría que marcara todos los astrocitos presentes, tanto reactivos como no. Esto es diferente en el caso del [<sup>11</sup>C]DED, ya que este presenta un mecanismo indirecto de marcación de astrocitos, dado que se une a la MAO-B, la cual se ve aumentada principalmente en los astrocitos reactivos. Por ello, la marcación de astrocitos con [<sup>11</sup>C]DED puede estar más relacionada con el estadio de la enfermedad, que condiciona el nivel de activación de los astrocitos. De hecho, en un estudio recientemente reportado, se demostró que el [<sup>11</sup>C]DED es una herramienta útil para el diagnóstico de la neuroinflamación en estadios tempranos de la enfermedad [6]. Los autores afirman que los cambios en los niveles de expresión de MAO-B y células GFAP positivas (marcador de astrocitos) no ocurren simultáneamente. Al parecer, los niveles de MAO-B aumentan al inicio de la enfermedad, manteniéndose luego prácticamente incambiables en el transcurso de la misma. Mientras que, por otro lado, la marcación con GFAP aumenta como consecuencia del avance de la patología, junto con la acumulación de placas A $\beta$ . Incluso, afirman que los dos marcadores no se co-localizan en una misma población de células.

En base a esto, al realizar la analogía con los radiotrazadores en estudio en nuestro trabajo, considerando la [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 como un marcador general de astrocitos, se puede decir que ambos trazadores por separado no serían suficientes para estimar el nivel total de la astrocitosis. Sin embargo, la [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 y el [<sup>11</sup>C]DED utilizados en conjunto, podrían brindar información diferente y complementaria a la vez. De este modo, mediante un enfoque multitrazador [28] se podría obtener información útil para la estadificación de la enfermedad y así contribuir a un diagnóstico temprano y certero de la misma.



**Figura 39.** Coeficiente de Normalización contra Cerebelo en diferentes regiones cerebrales, del tercer frame del estudio con [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101 (n=7) y [ $^{11}\text{C}$ ]DED (n=6) en ratones 3xTg.

Finalmente se comparó la captación de [ $^{11}\text{C}$ ]DED entre ratones 3xTg y el grupo control, donde no se encontró diferencia significativa en ninguna de las regiones analizadas ( $p > 0.05$ ) (figura 40). Esto puede explicarse teniendo en cuenta un estudio reportado recientemente, donde evaluaron la captación de [ $^{11}\text{C}$ ]DED en un modelo animal de EA similar al utilizado en nuestro trabajo [90]. En el mismo encontraron que la captación del radiotrazador disminuía notoriamente con la edad de los ratones transgénicos, sobretodo en la corteza e hipocampo, mientras que en el grupo control la captación no se relacionaba directamente con la edad. Incluso observaron que la actividad de [ $^{11}\text{C}$ ]DED en estas zonas era mayor en los ratones 3xTg a los 6 meses de edad que a los 8 ó 15 meses. En nuestro trabajo los estudios se realizaron con ratones de entre 9 y 10 meses de edad, por lo que la baja captación podría corresponderse con lo reportado en dicho estudio. En base a esto es importante tener en cuenta que existen varios modelos de ratones transgénicos con diferentes mutaciones de la EA, pero ninguno de ellos replica completamente la enfermedad humana. Por ello, a la hora de analizar los resultados, para una mejor comprensión de los mismos, es importante considerar minuciosamente las características del modelo utilizado.



**Figura 40.** Coeficiente de Normalización contra Cerebelo en diferentes regiones cerebrales, del tercer frame del estudio con [ $^{11}\text{C}$ ]DED, en ratones 3xTg (n=6) y grupo control (n=6).

#### 5.4. Conclusiones

En un inicio se confirmó la capacidad de **2B-SRF101** de atravesar la BHE, mediante estudios de biodistribución en ratones, aprovechando las propiedades de fluorescencia del mismo. Considerando estos resultados, se procedió con la evaluación biológica de la [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101, la cual comprendió estudios de biodistribución y de imagenología molecular PET/CT.

Los estudios de biodistribución dejaron de manifiesto una metabolización hepatointestinal del compuesto, la cual fue consistente con el carácter lipofílico del mismo. No se detectó unión inespecífica en tejidos no blanco y se observó una rápida depuración del radiotrazador en sangre, características apropiadas para un agente de diagnóstico PET. La captación de [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101 a nivel cerebral fue relativamente baja, pero se encontró que la actividad acumulada en cerebro en los tiempos de interés (30 y 65 minutos p.i.) era significativamente mayor en ratones 3xTg que en el grupo control ( $p < 0.05$ ).

En los estudios PET/CT se observaron diferencias significativas entre los ratones 3xTg y el grupo control, observándose una mayor captación de [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101 en ratones transgénicos en varias de las regiones del cerebro estudiadas ( $p < 0.05$ ). En particular se

observó esta diferencia en la corteza e hipocampo, zonas de particular interés, donde principalmente se desarrolla la astrocitosis en el modelo de ratón con EA utilizado.

Además, se realizaron estudios de biodistribución con [ $^{11}\text{C}$ ]DED, con la finalidad de evaluar su comportamiento en los ratones transgénicos de EA. En los mismos se observó una eliminación mayoritariamente urinaria, combinada con una baja metabolización hepatointestinal. Asimismo, se vio una rápida depuración sanguínea y tampoco se detectó unión inespecífica en tejidos no blanco. A nivel cerebral se observó una importante captación de [ $^{11}\text{C}$ ]DED, pero al comparar la actividad acumulada en el cerebro entre ambos grupos no se encontró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ).

Tanto en el caso de la [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101 como del [ $^{11}\text{C}$ ]DED, la mayor captación cerebral se observó a nivel del cerebro superior (donde se encuentran la corteza y el hipocampo) pero con ninguno de los radiotrazadores se obtuvo diferencia significativa de captación en esta región al comparar ambos modelos ( $p > 0.05$ ).

En los estudios PET/CT con [ $^{11}\text{C}$ ]DED no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en ninguna de las regiones analizadas ( $p > 0.05$ ). Esto puede deberse a un tema del estadio de reactividad de los astrocitos en el modelo de ratón transgénico utilizado.

En conclusión, de los datos obtenidos en la evaluación biológica de la [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101, el compuesto en estudio podría ser un potencial radiotrazador PET para la detección de astrocitosis. Al considerar los resultados obtenidos en conjunto, se desprende que la [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101 y el [ $^{11}\text{C}$ ]DED podrían brindar información diferente y complementaria a la vez. Por lo que si ambos radiotrazadores se utilizaran en conjunto, con un enfoque multitrazador, serían útiles herramientas para determinar los cambios neuropatológicos en la progresión de la EA.

## 5.5. Notas

Los estudios de biodistribución en los que se utilizó la cámara de fluorescencia fueron realizados por un integrante del equipo de investigación de CUDIM (Q.F. Tania Pardo) en el marco de una pasantía en la Washington University (San Luis, EEUU).

Los resultados presentados en este capítulo dieron lugar a la redacción de un artículo que será enviado próximamente a una revista científica internacional referada.

## 6. ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS Y DOSIMÉTRICOS DE [<sup>18</sup>F]2B-SRF101

### 6.1. Introducción

Una etapa importante en la evaluación preclínica de un nuevo radiofármaco incluye estudios dosimétricos y toxicológicos del compuesto. De este modo, se verifica que el radiotrazador es seguro para el uso en humanos desde el punto de vista de la seguridad farmacéutica y radiológica [73].

Se debe verificar que la dosis recibida por el paciente como consecuencia del estudio diagnóstico sea lo más baja posible, a fin de minimizar efectos estocásticos inherentes a la radiación ionizante. Por este motivo las propiedades del radiofármaco empleado deben ser tales que permitan una máxima eficiencia de detección de la radiación emitida, para lograr una buena calidad de imagen que permita realizar el diagnóstico, con un mínimo de dosis absorbida por el paciente. Los estudios dosimétricos permiten estimar la dosis que recibiría un paciente, a nivel de cada órgano o cuerpo entero, asociada al estudio imagenológico del nuevo agente.

Los cálculos dosimétricos en la etapa de evaluación preclínica se basan en los datos obtenidos a partir de biodistribuciones del radiotrazador en animales sanos. En los mismos se estima la dosis absorbida y efectiva.

La dosis absorbida se define como el cociente entre el valor medio de la energía cedida por la radiación y la absorbida por una cantidad de masa, la misma se mide en Gray (Gy):

$$D = \Delta E / \Delta m \text{ (Gy)}$$

Para el cálculo de la misma se utiliza la siguiente ecuación:

$$D \text{ (Gy)} = \tilde{A} \times S = A_0 \times \tau \times S$$

Donde  $\tilde{A}$  es la actividad acumulada que matemáticamente está representada por el área bajo la curva de actividad-tiempo y S es el factor que representa la dosis absorbida por unidad de actividad acumulada. Los valores de este factor se encuentran tabulados, dependen de las propiedades del radionucleido y son relativos al tamaño y posición de cada órgano. La actividad acumulada también se puede calcular según la actividad administrada y el tiempo de residencia. Este último no es una medida de tiempo, sino

que es la actividad acumulada normalizada a la cantidad de actividad administrada. Es otra manera de expresar el número de desintegraciones que ocurren en un órgano fuente.

La dosis equivalente es aquella que tiene en cuenta la cantidad de energía que absorbe el tejido vivo considerando un factor de ponderación según el tipo de radiación (factor  $W_R$  o  $Q$ ). La misma se mide en Sievert (Sv) y se calcula:

$$\text{Dosis equivalente, } H \text{ (Sv)} = D \times W_R$$

En el caso de los emisores  $\gamma$  y  $\beta^+$  el factor  $W_R$  es igual a 1, por lo que el valor de la dosis equivalente y absorbida es el mismo.

La dosis efectiva se calcula como la suma de las dosis equivalentes considerando un factor de ponderación según la radiosensibilidad de cada tejido y órgano ( $W_T$ ), [71]:

$$\text{Dosis efectiva, } E \text{ (Sv)} = \sum H \times W_T$$

En base a lo expresado anteriormente, se realizaron estudios dosimétricos con el fin de evaluar la seguridad radiológica del nuevo radiotrazador.

Los estudios de toxicidad se enfocan en la potencial toxicidad química de los compuestos, no del radionucleido. Aun cuando los radiofármacos PET se utilizan en concentraciones muy bajas con fines diagnósticos y no para producir efectos farmacológicos, la seguridad del nuevo compuesto debe ser evaluada. Para ello, se realiza un ensayo de toxicidad para verificar la ausencia de efectos adversos en un modelo animal luego de la administración del compuesto no marcado. Dado que las concentraciones inyectadas de radiofármaco son del orden de micro a picomolar se puede aplicar el concepto de microdosis. En base a esto, los ensayos de toxicidad pueden realizarse en una sola especie animal, mediante dosis única empleando cantidades de 100-1000 veces mayores de las que se administrarían para el estudio [73, 94].

En este trabajo, se realizaron los cálculos dosimétricos a partir de las biodistribuciones con [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101 realizadas en ratones sanos y el estudio de toxicidad se llevó a cabo mediante un ensayo de dosis única con la 2B-SRF101.

## **6.2. Parte experimental**

### **6.2.1. Materiales y Equipos**

Se utilizó la [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 y 2B-SRF101 sintetizadas y controladas según la metodología descrita en el capítulo 3. Para los estudios dosimétricos se utilizaron ratones machos C57BL6J Black, de entre 9-10 meses de edad. El ensayo de toxicidad se realizó en ratones Swiss, machos y hembras, de entre 3-4 meses de edad. Ambas cepas provenientes del bioterio de CUDIM.

Para los cálculos dosimétricos se utilizaron los softwares Wolfram Mathematica, OLINDA/EXM V1.0 y OLINDA/EXM V2.0. Las medidas de actividad fueron realizadas en un calibrador de dosis Capintec® CRC 25R, CRC 25 PET o espectrómetro de centelleo sólido con cristal de NaI (TI) de 3 x 3 pulgadas de pozo acoplado a una tarjeta multicanal ORTEC®. En la evaluación de la función hepática y renal se utilizó un fotómetro de reflexión automática (Reflotron® Plus, Laboratorio Roche). Para la toma de muestras de sangre se utilizaron tubos de extracción sanguínea conteniendo EDTA y jeringas con heparina sódica (Fármaco Uruguayo).

### **6.2.2. Métodos**

#### **6.2.2.1. Animales de experimentación**

Los animales fueron criados en una habitación del bioterio de CUDIM, con temperatura y humedad controladas; sometidos a ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La comida y el agua se dispusieron *ad libitum*. El protocolo de investigación se llevó a cabo de acuerdo a los requisitos del Comité Nacional de Bioética y se aplicó bajo las regulaciones éticas actuales provistas en la ley de experimentación animal No. 18.611 (Comisión Nacional de Experimentación Animal, CNEA, Uruguay). El comité de bioética animal del CUDIM aprobó los protocolos (N° 17050801).

#### **6.2.2.2. Ensayo de toxicidad de 2B-SRF101**

##### Cálculo de dosis

La toxicidad de 2B-SRF101 se evaluó mediante un estudio de dosis única en ratones Swiss sanos. Inicialmente se estableció un límite de dosis para humanos de 100 µg para

administración intravenosa, el cual se utilizó para definir la dosis de prueba para el estudio de toxicidad.

Para determinar la dosis de **2B-SRF101** a administrar a cada animal, se consideró 100 veces la cantidad máxima propuesta de 100 µg a ser administrada a una persona de 50 kg. Esta dosis equivalente en humanos (DEH) se convirtió en dosis animal a través de la siguiente ecuación:

$$\text{DEH (mg/kg)} = \text{Dosis Animal (mg/kg)} \times (\text{Km Ratón} / \text{Km Humano})$$

Donde el factor de corrección (Km) se estima dividiendo el promedio del peso del cuerpo (kg) entre el área de la superficie corporal de la especie (m<sup>2</sup>) (Km ratón= 3; Km humano=37) [95]. Finalmente, la dosis se calculó considerando un peso corporal de ratón de 30 g. Se determinó una dosis de 2.5 mg/kg de **2B-SRF101** a administrar por vía intravenosa, lo que equivale a 74 µg/ratón.

#### Preparación de la solución de **2B-SRF101**

Se preparó una solución de **2B-SRF101** de 0.5 mg/mL, formulada en una mezcla de suero fisiológico/etanol (90:10, v/v). Para ello, primero se disolvió la cantidad apropiada de **2B-SRF101** en etanol absoluto y luego en suero fisiológico para alcanzar la concentración deseada. Finalmente la solución se pasó a través de un filtro esterilizante hidrofílico de 0.2 µm y se almacenó a temperatura ambiente en un vial de vidrio hasta el momento de su uso. En todos los casos la solución se utilizó antes de las 24 horas luego de preparada y se verificó su estabilidad en este período de tiempo mediante HPLC analítico (*sistema 2*).

#### Procedimiento de dosis

En el día 1, se inyectó una dosis única intravenosa en bolo de la solución de **2B-SRF101** (200 µL; 0.5 mg/mL) a cada ratón (21 machos y 19 hembras), a través de la vena dorsal de la cola. El día 2 se sacrificaron 25 animales por dislocación cervical (13 machos y 12 hembras), mientras que el día 14 se sacrificaron 15 animales (8 machos y 7 hembras). Además se empleó un grupo control (7 machos y 8 hembras), el cual no recibió ninguna dosis y se sacrificó a los 3-4 meses de edad.

### Protocolo observacional

Todos los animales fueron observados una vez al día durante el estudio para detectar signos de morbilidad, lesión y disponibilidad de comida y agua. Se registraron los pesos corporales de cada animal el día 1 antes de la inyección y los días 2, 7 y 14 (antes de la necropsia en cada caso).

### Bioquímica clínica y hematología

Se tomaron muestras de sangre para análisis hematológico y bioquímico, mediante punción intracardíaca, inmediatamente después del sacrificio. Las muestras se recogieron en tubos que contenían EDTA (muestras para hematología) y en jeringas con heparina (muestras para bioquímica clínica).

Los ensayos hematológicos se realizaron en un laboratorio de análisis clínico veterinario externo (LACLIVET) y se determinaron los siguientes parámetros: recuento de eritrocitos ( $10^3/\text{mm}^3$ ), recuento total de leucocitos ( $10^6/\text{mm}^3$ ) (fórmula leucocitaria), hemoglobina (g/dL), hematocrito (%) y recuento de plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ ).

En la evaluación de la función renal y hepática se determinaron los siguientes parámetros: actividad de fosfatasa alcalina y  $\alpha$ -amilasa, bilirrubina, creatinina, urea, cuantificación de glutamato oxalacetato transaminasa (aspartato aminotransferasa) - GOT (AST) y transaminasa glutámico pirúvica (alanina aminotransferasa) - GPT (ALT).

### Necropsia macroscópica

Luego del sacrificio y extracción de sangre, se realizó un examen post mortem completo en todos los animales, incluyendo una inspección completa de todas las superficies externas, órganos y orificios. También se examinaron los órganos abdominales, torácicos y craneales. Además, algunos órganos se removieron, pesaron y fijaron en formaldehído para un posterior análisis histológico: corazón, páncreas, bazo, pulmones, riñones, intestinos, hígado y cerebro. El contenido de los intestinos se vació previo a la fijación.

### Examen histopatológico

El procesamiento de los tejidos de los animales de los grupos tratados y control para su examen histopatológico se realizó en un laboratorio externo. En el mismo los tejidos ya fijados se cortaron en un micrótopo. Las diferentes secciones de tejido se montaron en un portaobjetos de vidrio, se tiñeron con hematoxilina y eosina, y se cubrieron con cubreobjetos para su examen histopatológico. Los mismos fueron examinados por un especialista en anatomopatología.

### Análisis estadístico

En el caso de los hemogramas y los pesos relativos de los órganos, los datos de los grupos tratados se compararon con los del grupo control mediante la distribución *t de student* (test de dos colas). El mismo se aplicó con un nivel de confianza del 99 %. La homogeneidad de las varianzas se chequeó previamente usando el test de Fisher. Para la detección de datos anómalos se aplicó el test de Grubbs. En ambos casos se utilizó el contraste de dos colas, con un nivel de confianza del 95%.

Para el análisis de los datos de la bioquímica clínica, se utilizó el test de proporciones entre los grupos tratados y el grupo control. El mismo se aplicó con un nivel de confianza del 95 %.

#### **6.2.2.3. Estudios dosimétricos de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101**

Los cálculos dosimétricos (dosis absorbida y dosis efectiva) se basaron en estudios de biodistribución con [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 en ratones C57BL6J Black a 14, 33, 65 y 97 minutos (n=3, n=3, n=3 y n=2, respectivamente). Las biodistribuciones se realizaron acorde a la metodología descripta previamente en el capítulo 5. Se generaron curvas actividad-tiempo para cada órgano.

Para el cálculo de tiempo de residencia el ajuste de datos se llevó a cabo por segmentos, tomando dos o tres puntos de medición y utilizando polinomios de primer o de segundo grado, respectivamente. En todos los casos para la estimación de la actividad acumulada se integró el área bajo la curva de las funciones encontradas en el ajuste de datos. En particular entre t=0 minutos hasta t=14 minutos se utilizó un polinomio de primer grado. A partir del último punto experimental, se asumió un decaimiento mono-exponencial, considerando solo el decaimiento físico (radioactivo) y se estimó el área bajo la curva

desde este punto hasta infinito. El procesamiento matemático se realizó utilizando el software Wolfram Mathematica [96].

Se calculó el tiempo de residencia para cada órgano con la finalidad de extrapolarlo a humanos. Aquellos órganos de los cuales no se conocía su masa, así como los que no estaban definidos dentro de los software de OLINDA/EXT, fueron considerados como distribuidos uniformemente dentro del “remainder”. Debido a ello, el tiempo de residencia del resto del cuerpo (remainder) se calculó como la suma de los tiempos de residencia de: sangre, músculo, hueso, estómago, carcasa, intestinos y vejiga y orina. La actividad acumulada para humanos se calculó mediante un escalado entre los pesos de ratón y de humano para cuerpo entero (CE) y órganos. Para ello se utilizó la siguiente ecuación [97, 98]:

$$\tilde{A}_{\text{Órgano,Humano}} = \left( \frac{m_{\text{Ratón}}}{m_{\text{Humano}}} \right)_{CE} * \left( \frac{m_{\text{Humano}}}{m_{\text{Ratón}}} \right)_{Org} * \tilde{A}_{\text{Órgano,Ratón}}$$

Los tiempos de residencia para cuerpo entero y órganos extrapolados a humanos, se utilizaron como entrada en el software OLINDA/EXM V1.0 [99] y OLINDA/EXM V2.0 [100], para el cálculo de dosis absorbida por actividad administrada en humanos, seleccionando el modelo computacional de cuerpo humano. En el caso de OLINDA/EXM V1.0 se utilizó el modelo Cristy and Eckerman, considerando las recomendaciones del ICRP-60 [101] y para OLINDA/EXM V2.0 se utilizó el modelo ICRP-89 [102], considerando las recomendaciones de ICRP-103[103]. A diferencia del OLINDA/EXM V1.0, el OLINDA/EXM V2.0 proporciona información sobre la masa del contenido de los intestinos en humano. Esto significa que estos y sus contenidos se pueden considerar como fuentes explícitas. Debido a ello, en este caso para el tiempo de residencia del remainder en humanos no se incluyeron los intestinos.

### 6.3. Resultados y discusión

#### 6.3.1. Ensayo de toxicidad de 2B-SRF101

Dado que la [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 es un radiofármaco que se prepara mediante una reacción de marcación no cuantitativa y que su procedimiento sintético implica una etapa de

purificación para separar el compuesto radioactivo deseado de la mezcla de reacción, los estudios de toxicidad se realizaron con **2B-SRF101** (no marcada) [94].

En este caso, el límite toxicológico elegido fue <100 µg, dado que es la dosis máxima de **2B-SRF101** que podría llegar a recibir un paciente en un estudio PET con [<sup>18</sup>F]**2B-SRF101**. En base a esto, siguiendo las recomendaciones de la guía ICH M3 (R2) [104], se aplicó el concepto de microdosis, por lo que la toxicidad de **2B-SRF101** se evaluó mediante un estudio de dosis única en ratones. Este se llevó a cabo con una dosis ajustada mediante escala alométrica con un factor de seguridad de 100 [94, 95, 104]. Para ello se inyectaron 40 ratones con la dosis seleccionada de **2B-SRF101**; 25 de ellos se examinaron en el día siguiente a la inyección, mientras que los 15 animales restantes se examinaron luego de 14 días. Los estudios realizados a estos ratones incluyeron: observación y control de peso corporal, análisis hematológico, determinaciones bioquímicas, necropsia e histopatología. Además, se incluyó un grupo control, al cual no se le inyectó ninguna dosis y se le realizaron los mismos estudios que a los ratones tratados, de modo de comparar los resultados con estos.

En todos los casos, los animales sobrevivieron hasta el final del estudio, sin detectarse variaciones en los pesos corporales ni en el consumo de agua y comida. Tampoco se observaron signos de enfermedad ni cambios externos a nivel de la piel, pelaje, ojos, oídos, nariz, cavidad bucal, genital, abdomen y extremidades.

Una vez sacrificados los animales se realizó la necropsia, examinando los órganos abdominales, torácicos y craneales. Para evaluar si había ocurrido variación en el peso de los órganos en los ratones tratados, se comparó el peso relativo de los órganos de cada grupo con respecto a los del grupo control (no tratados). En la tabla 9 se muestran los valores obtenidos para todos los grupos. En ningún caso se encontró diferencia significativa de peso entre los ratones tratados y el respectivo grupo control, comparando siempre entre el mismo sexo ( $p > 0.01$ ).

**Tabla 9.** Valores promedio de peso relativo de cada órgano en los diferentes grupos (tratados y control).

Órgano	Promedio peso relativo (%)*					
	Hembras			Machos		
	2 días <sup>a</sup>	14 días <sup>b</sup>	Control <sup>c</sup>	2 días <sup>d</sup>	14 días <sup>e</sup>	Control <sup>f</sup>
Hígado	4.15 ± 0.59	4.49 ± 0.40	4.31 ± 0.19	4.31 ± 0.36	4.46 ± 0.39	4.51 ± 0.75
Riñones	1.06 ± 0.15	0.98 ± 0.11	1.16 ± 0.12	1.44 ± 0.23	1.42 ± 0.23	1.63 ± 0.17
Pulmones	0.55 ± 0.08	0.54 ± 0.08	0.57 ± 0.11	0.48 ± 0.07	0.50 ± 0.05	0.38 ± 0.16
Bazo	0.35 ± 0.13	0.35 ± 0.13	0.29 ± 0.04	0.27 ± 0.09	0.24 ± 0.06	0.29 ± 0.07
Corazón	0.38 ± 0.07	0.39 ± 0.11	0.39 ± 0.06	0.39 ± 0.05	0.38 ± 0.05	0.42 ± 0.10
Cerebro	1.36 ± 0.27	1.37 ± 0.18	1.60 ± 0.32	1.07 ± 0.19	1.13 ± 0.14	1.20 ± 0.10
Páncreas	0.58 ± 0.08	0.62 ± 0.05	0.60 ± 0.10	0.57 ± 0.11	0.52 ± 0.08	0.52 ± 0.07

\*Peso relativo: (peso órgano/peso corporal ratón) x 100

<sup>a</sup> n=12; <sup>b</sup> n=7; <sup>c</sup> n=4; <sup>d</sup> n=13; <sup>e</sup> n=8; <sup>f</sup> n=5

Luego, a los órganos removidos se les realizó un examen histopatológico, mediante tinción con hematoxilina/eosina. En el análisis microscópico de los mismos, tanto en sistema nervioso como en órganos periféricos, no se observaron lesiones ni diferencias evidentes entre los grupos tratados y los controles.

Además, inmediatamente luego de sacrificados los animales se tomaron muestras de sangre para realizar hemograma completo y para determinación de parámetros bioquímicos. En la tabla 10 se muestran los resultados de los hemogramas realizados a las muestras de los ratones de los diferentes grupos. Al comparar los valores de cada grupo tratado con su respectivo grupo control (del mismo sexo), no se encontraron diferencias significativas en ningún parámetro ( $p > 0.01$ ).

**Tabla 10.** Valores promedio de los parámetros correspondientes a los hemogramas completos en los diferentes grupos (tratados y control).

Parámetro	Promedio					
	Hembras			Machos		
	2 días <sup>a</sup>	14 días <sup>b</sup>	Control <sup>c</sup>	2 días <sup>d</sup>	14 días <sup>e</sup>	Control <sup>f</sup>
Hematías (mill/mm <sup>3</sup> )	7.67 ± 0.44	7.72 ± 0.89	7.74 ± 0.34	7.43 ± 0.73	7.97 ± 0.51	7.32 ± 0.61
Hemoglobina (g/dl)	13.74 ± 1.16	15.01 ± 1.52	14.19 ± 1.25	13.61 ± 1.25	15.34 ± 1.06	13.79 ± 1.52
Hematocrito (%)	41.91 ± 2.81	41.43 ± 1.69	41.13 ± 2.80	41.77 ± 5.99	43.13 ± 2.95	40.14 ± 3.02
Plaquetas (mill/mm <sup>3</sup> )	561.09 ± 235.74	435.57 ± 277.43	422.13 ± 265.16	560.69 ± 249.55	499.13 ± 392.95	273.71 ± 269.46
Leucocitos (mill/mm <sup>3</sup> )	3.00 ± 0.86	5.19 ± 1.76	3.81 ± 1.85	3.48 ± 1.13	5.64 ± 3.68	4.70 ± 1.30
Neutrófilos (%)	14.36 ± 4.63	14.57 ± 2.37	16.75 ± 4.65	19.25 ± 7.44	21.00 ± 6.72	15.86 ± 5.40
Linfocitos (%)	81.73 ± 5.27	82.57 ± 2.82	80.63 ± 3.89	77.75 ± 8.85	76.00 ± 6.21	82.43 ± 5.09
Monocitos (%)	2.73 ± 1.95	2.00 ± 1.41	2.38 ± 1.69	2.50 ± 2.32	2.75 ± 1.75	1.71 ± 2.81
Eosinófilos (%)	0.27 ± 0.65	0.86 ± 1.21	0.13 ± 0.35	0.46 ± 1.13	0.25 ± 0.46	0.00 ± 0.00
Basófilos (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

<sup>a</sup> n=11; <sup>b</sup> n=7; <sup>c</sup> n=8; <sup>d</sup> n=13; <sup>e</sup> n=8; <sup>f</sup> n=7

En el caso de los parámetros bioquímicos, se encontró que en la mayoría de los casos los valores se encontraban por debajo del límite de cuantificación del equipo. Esto se puede observar en la tabla 11, donde hay muchos datos cuyo valor está dado por “< x”, es decir, son datos censurados. Debido a la gran cantidad de datos censurados, no se podía asumir una distribución normal de la muestra, por lo que para verificar si había variaciones entre los parámetros bioquímicos de los grupos no era aplicable un test paramétrico, como en los casos anteriores. Por ello se aplicó la prueba de proporciones para dos muestras, de modo de verificar si había diferencia en la proporción de datos censurados entre los grupos [105]. En base a esto, al aplicar el test entre los grupos tratados y su respectivo grupo control, se encontró que la proporción de datos censurados era igual en ambos grupos para todos los parámetros bioquímicos ensayados, excepto en el caso de la amilasa de ratones machos. En estos se encontró diferencia tanto en los ratones tratados de 2 días como de 14 días, con respecto al control. Al analizar los valores obtenidos para este parámetro, se puede observar que esta diferencia se debe principalmente a que el grupo control de machos presentó una

gran dispersión. Debido a esto, no se puede afirmar que haya habido una variación significativa en el valor de la amilasa como consecuencia de la administración de **2B-SRF101**.

**Tabla 11.** Valores de los parámetros bioquímicos de los diferentes grupos (tratados y control).

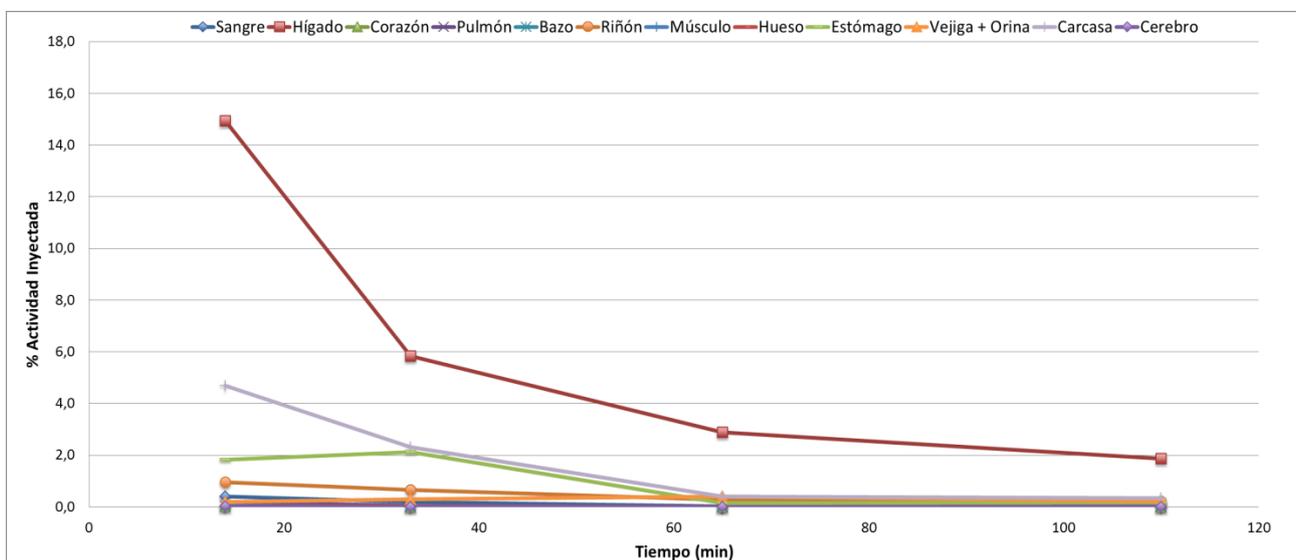
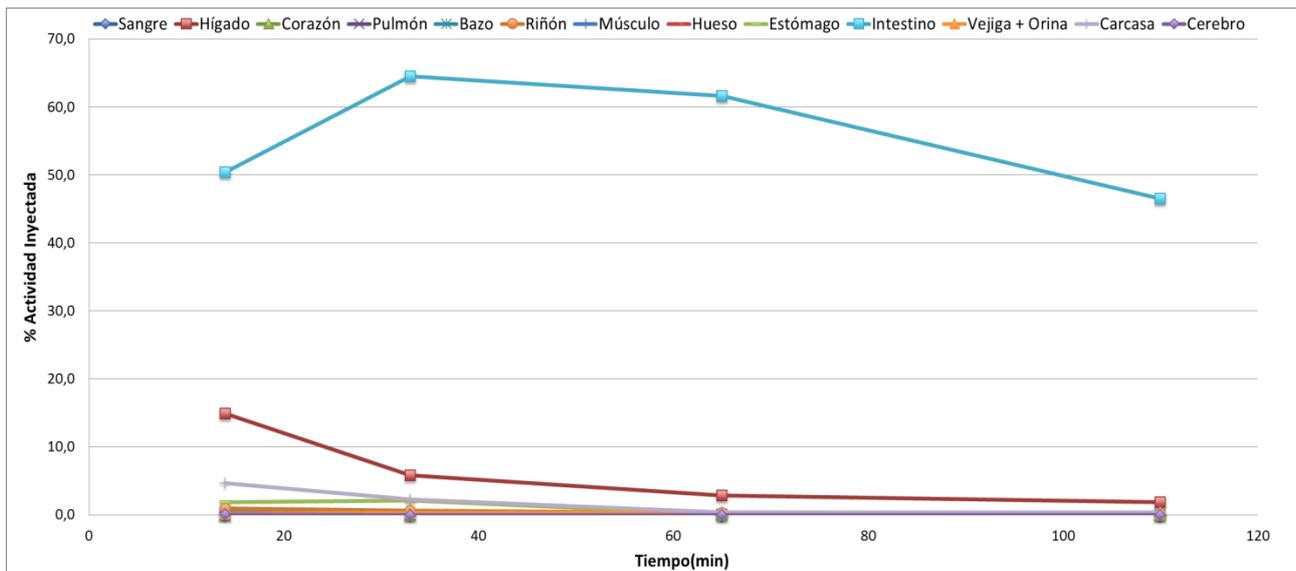
Parámetro	Hembras						Machos					
	2 días		14 días		Control		2 días		14 días		Control	
$\alpha$ -amilasa (U/L)	n=1	< 29.0	n=1	346	n=1	381	n=1	< 29.0	n=1	< 29.0	n=1	71.6
	n=2	< 29.0	n=2	< 29.0	n=2	161	n=2	< 29.0	n=2	< 29.0	n=2	81.8
	n=3	< 29.0	n=3	< 29.0	n=3	< 29.0	n=3	< 29.0	n=3	< 29.0	n=3	43.7
	n=4	102	n=4	< 29.0	n=4	< 29.0	n=4	< 29.0	n=4	< 29.0	n=4	< 29.0
	n=5	< 29.0	n=5	< 29.0	n=5	< 29.0	n=5	< 29.0	n=5	< 29.0	n=5	80.3
	n=6	< 29.0	n=6	< 29.0	n=6	< 29.0	n=6	< 29.0	n=6	< 29.0	n=6	< 29.0
	n=7	< 29.0	n=7	< 29.0	n=7	< 29.0	n=7	239	n=7	< 29.0	n=7	< 29.0
	n=8	384	-	-	-	-	n=8	< 29.0	n=8	< 29.0	-	-
	n=9	30.1	-	-	-	-	n=9	< 29.0	-	-	-	-
	n=10	< 29.0	-	-	-	-	n=10	< 29.0	-	-	-	-
	n=11	< 29.0	-	-	-	-	n=11	< 29.0	-	-	-	-
	n=12	< 29.0	-	-	-	-	n=12	< 29.0	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	n=13	< 29.0	-	-	-	-
Fosfatasa alcalina (U/L)	n=1	< 20.0	n=1	< 20.0	n=1	< 20.0	n=1	< 20.0	n=1	< 20.0	n=1	< 20.0
	n=2	< 20.0	n=2	< 20.8	n=2	< 20.0	n=2	< 20.0	n=2	< 20.0	n=2	< 20.0
	n=3	< 20.0	n=3	< 20.0	n=3	< 20.0	n=3	< 20.0	n=3	< 20.0	n=3	< 20.0
	n=4	< 20.0	n=4	< 20.0	n=4	< 20.0	n=4	< 20.0	n=4	< 20.0	n=4	20.2
	n=5	< 20.0	n=5	< 20.0	n=5	< 20.0	n=5	< 20.0	n=5	< 20.0	n=5	46.6
	n=6	< 20.0	n=6	< 20.0	n=6	< 20.0	n=6	< 20.0	n=6	< 20.0	n=6	< 20.0
	n=7	< 20.0	n=7	< 20.0	n=7	< 20.0	n=7	< 20.0	n=7	< 20.0	n=7	< 20.0
	n=8	< 20.0	-	-	-	-	n=8	< 20.0	n=8	< 20.0	-	-
	n=9	< 20.0	-	-	-	-	n=9	< 20.0	-	-	-	-
	n=10	< 20.0	-	-	-	-	n=10	20.5	-	-	-	-
	n=11	< 20.0	-	-	-	-	n=11	< 20.0	-	-	-	-
	n=12	< 20.0	-	-	-	-	n=12	< 20.0	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	n=13	< 20.0	-	-	-	-
GOT (U/L)	n=1	< 5.00	n=1	< 5.00	n=1	< 5.00	n=1	< 5.00	n=1	< 5.00	n=1	< 5.00
	n=2	< 5.00	n=2	< 5.00	n=2	< 5.00	n=2	< 5.00	n=2	< 5.00	n=2	< 5.00
	n=3	< 5.00	n=3	< 5.00	n=3	< 5.00	n=3	< 5.00	n=3	< 5.00	n=3	< 5.00
	n=4	< 5.00	n=4	< 5.00	n=4	< 5.00	n=4	< 5.00	n=4	< 5.00	n=4	< 5.00
	n=5	< 5.00	n=5	< 5.00	n=5	< 5.00	n=5	< 5.00	n=5	< 5.00	n=5	< 5.00
	n=6	< 5.00	n=6	< 5.00	n=6	< 5.00	n=6	< 5.00	n=6	< 5.00	n=6	< 5.00
	n=7	< 5.00	n=7	< 5.00	n=7	< 5.00	n=7	41.8	n=7	< 5.00	n=7	< 5.00
	n=8	< 5.00	-	-	-	-	n=8	< 5.00	n=8	< 5.00	-	-
	n=9	< 5.00	-	-	-	-	n=9	< 5.00	-	-	-	-
	n=10	< 5.00	-	-	-	-	n=10	< 5.00	-	-	-	-
	n=11	< 5.00	-	-	-	-	n=11	< 5.00	-	-	-	-
	n=12	< 5.00	-	-	-	-	n=12	< 5.00	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	n=13	< 5.00	-	-	-	-

Parámetro	Hembras						Machos					
	2 días		14 días		Control		2 días		14 días		Control	
GPT (U/L)	n=1	< 5.00	n=1	< 5.00	n=1	< 5.00	n=1	< 5.00	n=1	< 5.00	n=1	< 5.00
	n=2	< 5.00	n=2	< 5.00	n=2	< 5.00	n=2	< 5.00	n=2	< 5.00	n=2	< 5.00
	n=3	< 5.00	n=3	< 5.00	n=3	< 5.00	n=3	< 5.00	n=3	< 5.00	n=3	< 5.00
	n=4	< 5.00	n=4	< 5.00	n=4	< 5.00	n=4	< 5.00	n=4	< 5.00	n=4	< 5.00
	n=5	< 5.00	n=5	< 5.00	n=5	< 5.00	n=5	< 5.00	n=5	< 5.00	n=5	< 5.00
	n=6	< 5.00	n=6	< 5.00	n=6	< 5.00	n=6	< 5.00	n=6	< 5.00	n=6	< 5.00
	n=7	< 5.00	n=7	< 5.00	n=7	< 5.00	n=7	< 5.00	n=7	< 5.00	n=7	< 5.00
	n=8	< 5.00	-	-	-	-	n=8	< 5.00	n=8	< 5.00	-	-
	n=9	< 5.00	-	-	-	-	n=9	< 5.00	-	-	-	-
	n=10	< 5.00	-	-	-	-	n=10	< 5.00	-	-	-	-
	n=11	< 5.00	-	-	-	-	n=11	< 5.00	-	-	-	-
	n=12	< 5.00	-	-	-	-	n=12	< 5.00	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	n=13	< 5.00	-	-	-	-
Bilirrubina (mg/dL)	n=1	< 0.50	n=1	< 0.50	n=1	< 0.50	n=1	< 0.50	n=1	< 0.50	n=1	< 0.50
	n=2	< 0.50	n=2	< 0.50	n=2	< 0.50	n=2	< 0.50	n=2	< 0.50	n=2	< 0.50
	n=3	< 0.50	n=3	< 0.50	n=3	1.19	n=3	< 0.50	n=3	< 0.50	n=3	< 0.50
	n=4	< 0.50	n=4	< 0.50	n=4	< 0.50	n=4	< 0.50	n=4	< 0.50	n=4	< 0.50
	n=5	< 0.50	n=5	< 0.50	n=5	< 0.50	n=5	< 0.50	n=5	< 0.50	n=5	< 0.50
	n=6	< 0.50	n=6	< 0.50	n=6	< 0.50	n=6	< 0.50	n=6	< 0.50	n=6	< 0.50
	n=7	< 0.50	n=7	< 0.50	n=7	< 0.50	n=7	< 0.50	n=7	< 0.50	n=7	< 0.50
	n=8	< 0.50	-	-	-	-	n=8	< 0.50	n=8	< 0.50	-	-
	n=9	< 0.50	-	-	-	-	n=9	< 0.50	-	-	-	-
	n=10	< 0.50	-	-	-	-	n=10	< 0.50	-	-	-	-
	n=11	< 0.50	-	-	-	-	n=11	< 0.50	-	-	-	-
	n=12	< 0.50	-	-	-	-	n=12	< 0.50	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	n=13	< 0.50	-	-	-	-
Creatinina (mg/dL)	n=1	< 0.50	n=1	< 0.50	n=1	< 0.50	n=1	< 0.50	n=1	< 0.50	n=1	< 0.50
	n=2	< 0.50	n=2	< 0.50	n=2	< 0.50	n=2	< 0.50	n=2	< 0.50	n=2	< 0.50
	n=3	< 0.50	n=3	< 0.50	n=3	< 0.50	n=3	< 0.50	n=3	< 0.50	n=3	< 0.50
	n=4	< 0.50	n=4	< 0.50	n=4	< 0.50	n=4	< 0.50	n=4	< 0.50	n=4	< 0.50
	n=5	< 0.50	n=5	< 0.50	n=5	< 0.50	n=5	< 0.50	n=5	< 0.50	n=5	< 0.50
	n=6	< 0.50	n=6	< 0.50	n=6	< 0.50	n=6	< 0.50	n=6	< 0.50	n=6	< 0.50
	n=7	< 0.50	n=7	< 0.50	n=7	< 0.50	n=7	< 0.50	n=7	< 0.50	n=7	< 0.50
	n=8	< 0.50	-	-	-	-	n=8	< 0.50	n=8	< 0.50	-	-
	n=9	< 0.50	-	-	-	-	n=9	< 0.50	-	-	-	-
	n=10	< 0.50	-	-	-	-	n=10	< 0.50	-	-	-	-
	n=11	< 0.50	-	-	-	-	n=11	< 0.50	-	-	-	-
	n=12	< 0.50	-	-	-	-	n=12	< 0.50	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	n=13	< 0.50	-	-	-	-

Parámetro	Hembras						Machos					
	2 días		14 días		Control		2 días		14 días		Control	
Urea (mg/dL)	n=1	< 20.0	n=1	< 20.0	n=1	< 20.0	n=1	< 20.0	n=1	< 20.0	n=1	< 20.0
	n=2	< 20.0	n=2	< 20.0	n=2	< 20.0	n=2	< 20.0	n=2	< 20.0	n=2	23.9
	n=3	< 20.0	n=3	< 20.0	n=3	< 20.0	n=3	< 20.0	n=3	< 20.0	n=3	< 20.0
	n=4	< 20.0	n=4	< 20.0	n=4	< 20.0	n=4	< 20.0	n=4	< 20.0	n=4	< 20.0
	n=5	< 20.0	n=5	< 20.0	n=5	30.7	n=5	< 20.0	n=5	< 20.0	n=5	90.0
	n=6	< 20.0	n=6	34.2	n=6	32.9	n=6	< 20.0	n=6	< 20.0	n=6	< 20.0
	n=7	< 20.0	n=7	25.7	n=7	35.2	n=7	< 20.0	-	-	n=7	< 20.0
	n=8	< 20.0	-	-	-	-	n=8	< 20.0	-	-	-	-
	n=9	< 20.0	-	-	-	-	n=9	< 20.0	-	-	-	-
	n=10	< 20.0	-	-	-	-	n=10	< 20.0	-	-	-	-
	n=11	< 20.0	-	-	-	-	n=11	24.2	-	-	-	-
	n=12	22.9	-	-	-	-	n=12	34.8	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	n=13	29.7	-	-	-	-

### 6.3.2. Estudios dosimétricos de [<sup>18</sup>F]2B-SRF101

Se realizaron estudios dosimétricos con la finalidad de obtener una estimación de la dosis que recibiría un paciente en cuerpo entero y por órgano durante un estudio imagenológico con [<sup>18</sup>F]2B-SRF101. Para ello se utilizaron los datos obtenidos a partir de biodistribuciones en ratones sanos con el radiotrazador mencionado, entre los 14 y los 97 minutos post-inyección. En base a esto, se realizaron curvas de la variación del % de AI en cada órgano a los diferentes tiempos de estudio (Figura 41A). Debido a que la actividad acumulada en intestino fue muy elevada con respecto al resto de los órganos (por ser el órgano excretor), se realizó un nuevo gráfico sin considerar los valores de las mismas (Figura 41B). En esta última se puede observar que el hígado fue el órgano que presentó mayor acumulación de actividad a lo largo del período de estudio.



**Figura 41.** Porcentaje de actividad inyectada de  $[^{18}\text{F}]\text{2B-SRF101}$  en función del tiempo en ratones para: **A.** todos los órganos medidos. **B.** todos los órganos, excepto intestino.

Con la finalidad de calcular los tiempos de residencia para cada órgano, los datos de actividad-tiempo se adecuaron a un polinomio de primer o segundo grado. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 12. El órgano que mostró mayor valor de tiempo de residencia (sin considerar el intestino) fue el hígado. A este lo siguieron la carcasa, el estómago y riñón.

**Tabla 12.** Tiempos de residencia para cada órgano con [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 en ratones y masas de los órganos utilizadas para el escalado.

Órgano	Tiempo de Residencia (h)	Masa de órganos (g)
Sangre	3.11E-03	---
Hígado	1.16E-01	1.8596
Corazón	9.52E-05	0.1646
Pulmón	9.75E-04	0.2193
Bazo	5.48E-05	0.0963
Riñón	1.29E-02	0.4204
Músculo	2.63E-04	---
Hueso	2.18E-04	---
Estómago	1.77E-02	---
Intestino	1.69E+00	3.3000
Vejiga + Orina	7.65E-03	---
Carcasa	3.11E-02	---
Cerebro	1.37E-04	0.4090
Remainder <sup>a</sup>	1.75E+00	28.4063
Cuerpo Entero	---	34.8755

<sup>a</sup> Remainder: suma de los tiempos de residencia de sangre, músculo, hueso, intestino, estómago, carcasa, vejiga y orina.

Para extrapolar a humanos los valores obtenidos en ratones, se empleó el modelo dosimétrico masculino del software OLINDA/EXM V1.0 y el masculino y femenino del OLINDA/EXM V2.0. Los valores utilizados para el cálculo y los resultados obtenidos se resumen en las tablas 13 y 14, respectivamente. En las mismas se puede observar que, en todos los modelos de escalado dosimétrico empleados para el traslado de los datos de ratón a humano, los valores de tiempo de residencia obtenidos para los órganos considerados fueron muy similares. En el caso del OLINDA/EXM V1.0 se observó un elevado valor de tiempo de residencia para el remainder, ya que este incluye el intestino. A nivel de los órganos el mayor valor se vio en el hígado. Por otro lado, los mayores tiempos de residencia obtenidos con el OLINDA/EXM V2.0 fueron para el hígado y el contenido de las diferentes secciones del intestino, junto con el remainder.

**Tabla 13.** Valores de masa y de factor S utilizados en el escalado para la determinación de los tiempos de residencia en humanos, disponibles en ambas versiones del OLINDA/EXM.

Órgano	OLINDA/EXM V2.0				OLINDA/EXM V1.0	
	$m_{\text{masc}}^b$ (g)	Factor S <sup>a</sup> (mGy/MBq-s)	$m_{\text{fem}}^c$ (g)	Factor S <sup>a</sup> (mGy/MBq-s)	$m_{\text{masc}}^b$ (g)	Factor S <sup>a</sup> (mGy/MBq-s)
Cerebro	1450	4.44E-05	1300	4.89E-05	1420	4.62E-05
Corazón	330	1.42E-04	250	1.86E-06	316	1.54E-04
Riñón	310	1.64E-04	275.5	1.82E-04	299	1.69E-04
Colon izquierdo	75	2.95E-04 <sup>d</sup>	80	2.77E-04 <sup>b</sup>	---	---
Intestino delgado	350	7.17E-05 <sup>d</sup>	280	8.71E-05 <sup>c</sup>	---	---
Colon derecho	150	1.68E-04 <sup>d</sup>	160	1.57E-04 <sup>d</sup>	---	---
Recto	650	3.10E-04 <sup>d</sup>	80	3.00E-04 <sup>c</sup>	---	---
Hígado	1800	3.62E-05	1400	4.53E-05	1910	3.40E-05
Pulmón	1200	3.90E-05	950	4.80E-05	1000	4.69E-05
Bazo	150	3.29E-04	130	3.76E-04	183	2.82E-04
Remainder	67760	1.29E-06	55694	1.57E-06	68572	1.28E-06
Cuerpo entero	73000	---	60000	---	73700	---

<sup>a</sup>Factor S: Dosis absorbida por unidad de actividad acumulada; <sup>b</sup> $m_{\text{masc}}$ : masa modelo masculino; <sup>c</sup> $m_{\text{fem}}$ : masa modelo femenino; <sup>d</sup>Considera los contenidos como fuente de irradiación.

**Tabla 14.** Tiempos de residencia utilizados para las estimaciones dosimétricas.

Órgano	OLINDA/EXM V1.0	OLINDA/EXM V2.0	
	$\tau_{\text{masc}}(\text{h})^a$	$\tau_{\text{masc}}(\text{h})^a$	$\tau_{\text{fem}}(\text{h})^a$
Cerebro	2.25E-04	2.31E-04	2.52E-04
Corazón	8.65E-05	9.12E-05	8.41E-04
Riñón	4.36E-03	4.56E-03	4.93E-03
Contenido colon izquierdo	---	1.83E-02	1.96E-02
Contenido intestino delgado	---	8.56E-02	6.85E-02
Contenido colon derecho	---	3.67E-02	3.91E-02
Contenido recto	---	1.83E-02	1.96E-02
Hígado	5.64E-02	5.37E-02	5.08E-02
Pulmón	2.10E-03	2.55E-03	2.64E-03
Bazo	4.92E-05	4.07E-05	4.30E-05
Remainder	2.00E+00 <sup>b</sup>	6.77E-02 <sup>c</sup>	6.76E-02 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $\tau$ : Tiempo de residencia; <sup>b</sup>Remainder tiene en cuenta sangre, hueso, músculo, estómago, intestino, carcasa, vejiga y orina; <sup>c</sup>Remainder tiene en cuenta sangre, hueso, músculo, estómago, carcasa, vejiga y orina.

Los valores de tiempo de residencia obtenidos se utilizaron como entrada en los softwares mencionados para estimar la dosis absorbida y dosis efectiva para cada órgano y para cuerpo entero. En la tabla 15 se resumen los resultados obtenidos. En el caso de OLINDA/EXM V1.0 varios órganos mostraron valores de dosis absorbidas

totales del mismo orden de magnitud, sobretodo los asociados a la vía de eliminación del radiotrazador. El resto de los órganos mostraron dosis de un orden de magnitud menor con respecto a los anteriores. Estos resultados en los que se observa una irradiación homogénea en varios órganos se debe a que esta versión del software no considera el contenido de los intestinos como un órgano fuente, por lo que los mismos fueron incluidos en el remainder. Por otro lado, en el OLINDA/EXM V2.0 los modelos dosimétricos masculinos y femeninos presentaron la misma tendencia entre ellos, donde la mayor dosis se observó en las diferentes secciones de los intestinos. En el caso del modelo masculino los órganos que les siguieron en los valores de dosis fueron hígado, riñón, vesícula biliar y páncreas. En el modelo femenino fueron los mismos órganos, junto con el útero. En este caso, al considerar el contenido de los intestinos aparte, se pudieron visualizar más diferencias en los valores de dosis del resto de los órganos.

**Tabla 15.** Valores de dosis absorbida y dosis efectiva para los modelos de humano, según OLINDA/EXM V1.0 (hombre) y OLINDA/EXM V2.0 (hombre y mujer).

Órgano blanco	Hombre – OLINDA 1		Órgano blanco	Hombre – OLINDA 2		Mujer– OLINDA 2	
	Dosis Absorbida Total (mGy/MBq)	Dosis Efectiva (mSv/MBq)		Dosis Absorbida Total (mGy/MBq)	Dosis Efectiva (mSv/MBq)	Dosis Absorbida Total (mGy/MBq)	Dosis Efectiva (mSv/MBq)
Suprarrenales	1.09E-02	5.44E-05	Suprarrenales	3.05E-03	2.82E-05	2.75E-03	2.54E-05
Cerebro	2.21E-03	1.11E-05	Cerebro	1.28E-04	1.28E-06	1.58E-04	1.58E-06
Mama	7.94E-03	3.97E-04	Mama	---	---	6.27E-04	7.52E-05
Vesícula Biliar (pared)	1.17E-02	---	Esófago	1.06E-03	4.26E-05	1.23E-03	4.93E-05
Intestino Grueso Inferior (pared)	1.16E-02	1.39E-03	Ojos	2.97E-04	---	3.56E-04	---
Intestino Delgado	1.18E-02	5.90E-05	Vesícula Biliar (pared)	4.31E-03	3.98E-05	4.66E-03	4.30E-05
Estómago (pared)	1.09E-02	1.30E-03	Colon izquierdo	2.24E-02	1.08E-03	2.63E-02	1.27E-03
Intestino Grueso Superior (pared)	1.16E-02	5.78E-05	Intestino Delgado	2.40E-02	2.21E-04	2.82E-02	2.60E-04
Corazón (pared)	5.90E-03	---	Estómago (pared)	1.46E-03	1.75E-04	2.07E-03	2.49E-04
Riñón	8.23E-03	4.12E-05	Colon derecho	2.42E-02	1.17E-03	2.93E-02	1.42E-03
Hígado	1.09E-02	5.45E-04	Recto	2.20E-02	5.06E-04	2.72E-02	6.25E-04
Pulmón	5.35E-03	6.42E-04	Corazón (pared)	1.16E-03	1.07E-05	9.34E-04	8.63E-06

Órgano blanco	Hombre – OLINDA 1		Órgano blanco	Hombre – OLINDA 2		Mujer– OLINDA 2	
	Dosis Absorbida Total (mGy/MBq)	Dosis Efectiva (mSv/MBq)		Dosis Absorbida Total (mGy/MBq)	Dosis Efectiva (mSv/MBq)	Dosis Absorbida Total (mGy/MBq)	Dosis Efectiva (mSv/MBq)
Músculo	9.52E-03	4.76E-05	Riñón	4.44E-03	4.10E-05	5.46E-03	5.04E-05
Ovarios	1.20E-02	2.39E-03	Hígado	7.87E-03	3.15E-04	9.33E-03	3.73E-04
Pancreas	1.14E-02	5.72E-05	Pulmón	1.10E-03	1.32E-04	1.23E-03	1.48E-04
Médula Roja	9.05E-03	1.09E-03	Ovarios	---	---	2.96E-03	1.18E-04
Células Osteogénicas	1.49E-02	1.49E-04	Pancreas	3.57E-03	3.30E-05	3.68E-03	3.40E-05
Piel	7.59E-03	7.59E-05	Próstata	1.84E-03	8.49E-06	---	---
Bazo	5.44E-03	2.72E-05	Glándulas Salivales	3.58E-04	3.58E-06	4.07E-04	4.07E-06
Testículos	9.66E-03	---	Médula Roja	9.23E-04	1.11E-04	1.27E-03	1.52E-04
Timo	9.77E-03	4.88E-05	Células Osteogénicas	6.64E-04	6.64E-06	8.24E-04	8.24E-06
Tiroides	9.90E-03	4.95E-04	Bazo	1.14E-03	1.05E-05	1.89E-03	1.74E-05
Vejiga (pared)	1.15E-02	5.74E-04	Testículos	4.55E-04	1.82E-05	---	---
Útero	1.21E-02	6.04E-05	Timo	6.35E-04	5.86E-06	7.45E-04	6.88E-06
Cuerpo Entero	9.55E-03	---	Tiroides	4.67E-04	1.87E-05	5.26E-04	2.10E-05
Dosis Efectiva Total (mSv/MBq)	---	9.52E-03	Vejiga (pared)	1.31E-03	5.24E-05	2.47E-03	9.89E-05
			Útero	---	---	4.62E-03	2.13E-05
			Cuerpo Entero	1.20E-03	---	1.85E-03	---
			Dosis Efectiva Total (mSv/MBq)	---	4.03E-03	---	5.08E-03

La dosis efectiva total a partir del OLINDA/EXM V1.0, usando el modelo dosimétrico masculino Cristy and Eckerman, fue de 9.52E-03 mSv/MBq. Mientras que para OLINDA/EXM V2.0 el valor fue de 4.03E-03 mSv/MBq y 5.08E-03 mSv/MBq, usando el modelo ICRP-89 masculino y femenino, respectivamente. Estos resultados se encuentran en el mismo orden de magnitud que datos publicados para otros radiofármacos de  $^{18}\text{F}$  en desarrollo [106, 107] y un orden menor que los radiofármacos de  $^{18}\text{F}$  en uso clínico reportados por la ICRP 106 [108].

En base a estos resultados, se calculó la dosis efectiva que recibiría un paciente al realizarse un estudio PET, considerando los protocolos de estudios clínicos de CUDIM para radiofármacos de  $^{18}\text{F}$ . Dado que en los mismos se inyecta entre 3-6 MBq/kg, lo que equivale a una administración de entre 219-438 MBq para un paciente de 73 kg, la dosis efectiva en este caso se encontraría entre 2.08-4.17 mSv, 0.88-1.77 mSv y 1.11-2.23 mSv para OLINDA/EXM V1.0 y OLINDA/EXM V2.0 masculino y femenino, respectivamente.

Es importante destacar que los datos dosimétricos obtenidos fueron extrapolados a partir de medidas realizadas en ratones. Debido a esto, para validar los resultados sería necesario realizar estudios dosimétricos en voluntarios sanos.

#### **6.4. Conclusiones**

Se realizaron los estudios de toxicidad y dosimetría, de modo de evaluar la bioseguridad de la [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101. Mediante los cálculos dosimétricos a partir de datos de ratones, fue posible estimar la dosis absorbida y la dosis efectiva en humanos, tanto para los diferentes órganos como para cuerpo entero. En base a esto, se pudo concluir que el riesgo asociado con la irradiación en un estudio con [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101 estaría justificado para el uso en pacientes, al ser del orden de otros radiofármacos empleados en la clínica.

Por otro lado, en el estudio de toxicidad realizado con 2B-SRF101, no se observaron efectos adversos apreciables ni cambios significativos en los parámetros estudiados, que pudieran atribuirse a la administración del compuesto en estudio.

En conclusión, la información obtenida en los estudios de toxicidad y dosimetría en los modelos animales utilizados, demostró que la [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101 sería un radiotrazador seguro para aplicar en pacientes. Esto habilitaría la posibilidad de realizar un estudio clínico piloto, con la finalidad de dilucidar su potencial aplicación como marcador de astrocitosis.

#### **6.5. Notas**

Los estudios dosimétricos se realizaron en colaboración con el grupo de Erick Mora-Ramirez y Manuel Bardiès del Inserm, Université Toulouse III-Paul Sabatier, Toulouse, Francia. Los resultados presentados en este capítulo dieron lugar a la redacción de un artículo que será enviado próximamente a una revista científica internacional referada.

## 7. CONCLUSIONES GENERALES

En el transcurso del trabajo de doctorado se logró optimizar un método de producción y control de calidad de [ $^{11}\text{C}$ ]DED, radiofármaco que se utiliza actualmente en la clínica para detectar astrocitosis en diversas enfermedades neurodegenerativas. Esto permitió contar con el radiofármaco que se utilizó como referencia en el presente trabajo. Se considera un aporte relevante para el CUDIM, debido a que posibilitó su uso a nivel clínico.

La aplicación de métodos computacionales (*in silico*) en este estudio brindó herramientas de gran utilidad que ayudaron a conocer las características estructurales de los compuestos en estudio, principalmente de la SR101. En particular, la creación de un farmacóforo aportó información útil para el análisis de las posibles estrategias de marcación de la SR101 con radionucleidos PET. Además, se obtuvieron datos que podrían contribuir a la comprensión del posible mecanismo de interacción de estos compuestos con los astrocitos. En base a las diferentes hipótesis que han sido planteadas en los últimos años sobre el ingreso e interacción de la SR101 con los astrocitos, sería posible realizar un análisis computacional con la finalidad de comprender el acoplamiento molecular del compuesto, ya sea con un transportador o un receptor presente en las células de interés.

En el presente trabajo se desarrolló un nuevo radiotrazador, en base a la marcación de la SR101 con un radionucleido PET. Inicialmente, con la finalidad de marcar la SR101 con  $^{18}\text{F}$  se sintetizó la SR101 fluoruro de sulfonilo. La misma resultó inestable en suero fisiológico, descartándose su radiosíntesis. Luego de un análisis del compuesto en estudio, se derivatizó la SR101 mediante un linker de sulfonamida, realizando la síntesis orgánica de SR101 *N*-(3-Bromopropil)-sulfonamida, así como de su análogo fluorado SR101 *N*-(3-Fluoropropil)-sulfonamida. De este modo se logró contar con todos los estándares y precursores para la radiosíntesis y el control de calidad, que no estaban disponibles comercialmente.

Finalmente, se optimizó la marcación con  $^{18}\text{F}$ , así como la purificación y formulación del derivado de SR101, obteniéndose la SR101 *N*-(3- $^{18}\text{F}$ -Fluoropropil)-sulfonamida ( $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101), en concordancia con las especificaciones establecidas en el control de calidad.

Una vez que se obtuvo la [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101, se comprobó que la misma presentaba propiedades apropiadas para convertirse en un radiofármaco de diagnóstico. Para ello se realizaron estudios fisicoquímicos e *in vitro*, en los cuales se verificó la estabilidad del compuesto en su formulación final y en plasma humano. Además se determinó el %UPP, encontrándose que la [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101 presenta una significativa unión a proteínas plasmáticas. Por otro lado se evaluó la lipofilia del compuesto mediante el coeficiente de reparto octanol/agua, obteniéndose un valor apropiado para atravesar la BHE, capacidad indispensable para un radiotrazador con fines de estudio del SNC.

Dado que la 2B-SRF101 es un compuesto derivado de SR101, con algunas modificaciones a nivel estructural, se verificó que el nuevo compuesto aún mantenía la capacidad de marcar astrocitos. En base a los resultados obtenidos en los ensayos en cultivos celulares se demostró que la 2B-SRF101 no solo detecta los astrocitos, sino que es capaz de teñir todo el cuerpo celular de los mismos.

En la siguiente etapa del trabajo se realizaron estudios de biodistribución en ratones con 2B-SRF101, confirmando su capacidad de atravesar la BHE, mediante la adquisición de imágenes de fluorescencia *ex vivo* del cerebro. Considerando esto, se procedió con la evaluación biológica de la [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101, la cual comprendió estudios de biodistribución y de imagenología molecular PET/CT en ratones sanos y en un modelo de ratón transgénico con EA.

Los estudios de biodistribución con [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101 permitieron evaluar el perfil farmacocinético y verificar que el mismo presenta características apropiadas para un agente de diagnóstico PET.

En los estudios imagenológicos se observó una mayor captación de [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101 en los ratones transgénicos en varias de las regiones del cerebro estudiadas con respecto al grupo control sano. En particular se observó esta diferencia en la corteza e hipocampo, zonas de particular interés, donde principalmente se desarrolla la astrocitosis en el modelo de ratón con EA utilizado.

Considerando los datos obtenidos en la evaluación biológica de la [ $^{18}\text{F}$ ]2B-SRF101 se pudo concluir que el compuesto en estudio podría ser un potencial radiotrazador PET para la detección de astrocitosis.

En base a la comparación de estudios PET con [<sup>18</sup>F]2B-SRF101 y con [<sup>11</sup>C]DED, se concluyó que ambos radiotrazadores brindan información diferente y complementaria a la vez. Esto presentaría ventajas en un enfoque multitrazador, dado que se estaría contando con herramientas útiles para determinar los cambios neuropatológicos en la progresión de la EA.

En la última etapa del trabajo se realizaron estudios de toxicidad y dosimetría, de modo de evaluar la seguridad radiológica y farmacéutica de la [<sup>18</sup>F]2B-SRF101. La dosis efectiva estimada fue similar a la de los radiofármacos de <sup>18</sup>F en uso clínico. El ensayo de toxicidad aguda no mostró efectos adversos relacionados a la administración del compuesto. De este modo se verificó que este compuesto sería un radiotrazador seguro para administrar en pacientes.

Dado que los resultados son muy prometedores, esto abriría paso a una posible fase clínica piloto exploratoria en voluntarios sanos y en pacientes con EA, con la finalidad de dilucidar su potencial aplicación. Esto permitiría la caracterización del compuesto en humanos y la evaluación de la aplicación del radiofármaco tanto en la EA como en otras patologías neurodegenerativas en las que se desarrolla astrocitosis.

Por otro lado, en un futuro se pretende continuar trabajando con otros compuestos de la familia de las Sulforrodaminas, tales como Sulforrodamina B o G, las cuales también han sido reportadas como marcadoras de astrocitos. De este modo se podría contar con una batería de compuestos marcados con radionucleidos PET y así evaluar la performance biológica de los mismos, definiendo cual presenta mejores propiedades como radiofármaco de diagnóstico.

A partir de este trabajo se abren nuevas perspectivas para continuar con la evaluación a nivel molecular de esta familia de compuestos, para lo cual serían necesarios otros ensayos *in vitro*. A modo de ejemplo, la tinción de astrocitos con **2B-SRF101** en cultivos celulares obtenidos a partir de ratones que presentan la patología, así como la evaluación de la posibilidad de interacción de los nuevos compuestos con el péptido Aβ o con las placas de amiloide (dado que es un elemento que está presente en grandes cantidades en la EA), serían dos aspectos a encarar.

En resumen, en este trabajo se desarrolló un nuevo radiotrazador con potencial aplicación para la detección de astrocitosis. Esto podría generar un impacto positivo sobre la salud de la población, brindando nuevas herramientas para el diagnóstico precoz de la EA y otras enfermedades neurodegenerativas. Asimismo esto podría aportar una herramienta para evaluar la respuesta a nuevos tratamientos.

Finalmente, es importante destacar el aprendizaje que significó este trabajo, dado que se adquirieron nuevos conocimientos en el área biológica y se profundizó en los de otras áreas como ser la química orgánica y la radioquímica. Además, la experiencia brindó la capacidad de enfrentarse a diferentes obstáculos que surgen normalmente en la práctica experimental, adaptándose a los cambios en el plan de trabajo, de modo de solucionar los mismos. Asimismo, se adquirió experiencia en la escritura de publicaciones científicas, ya que en el marco de este trabajo se publicaron 3 artículos y se generaron dos borradores que en breve serán enviados a revistas científicas internacionales referadas.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Svedberg M, Hellstrom-Lindahl E, Rahman O, et al. Amyloid imaging PET ligands as biomarkers for Alzheimer's Disease, preclinical evaluation. *PET-Current Clinical and Research Aspects*. 2012; 10: 254-274.
- 2) WHO/ADI - World Health Organization / Alzheimer's Disease International Report: Dementia. A public health priority. World Health Organization, United Kingdom. 2012.
- 3) ADI - Alzheimer's Disease International. Informe Mundial sobre el Alzheimer. Las consecuencias de la demencia análisis de prevalencia, incidencia, coste y tendencias. 2015.
- 4) ADI – Bupa. Alzheimer's Disease International. La demencia en América: El coste y la prevalencia del Alzheimer y otros tipos de demencia. 2013.
- 5) Nordberg A. PET imaging of amyloid in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*. 2004; 3 (9): 519-527.
- 6) Olsen M, Aguilar X, Sehlin D, et al. Astroglial responses to Amyloid-Beta progression in a mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Imaging and Biology*. 2017. doi: 10.1007/s11307-017-1153-z.
- 7) Connelly. D. Closing in on Alzheimer's disease. *The pharmaceutical journal*. 2015; 295:142-143.
- 8) Villemagne V.L., Okamura N. In vivo tau imaging: obstacles and progress. *Alzheimer's and Dementia*. 2014; 10(3): 254-264.
- 9) Verkhratsky A, Olabarria M, Noristani H.N, et al. Astrocytes in Alzheimer's Disease. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2010; 7: 399-412.
- 10) Rodríguez JJ, Olabarria M, Verkhratsky A. Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. *Cell Death Differentiation*. 2009; 16: 378-385.
- 11) Guillamón-Vivancos T, Gómez-Pinedo U, Matías-Guiu J. Astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. *Neurología*. 2015; 30: 119-129.
- 12) Dzamba D, Harantova L, Butenko O, et al. Glial Cells – The key Elements of Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*. 2016; 13: 894-911.
- 13) Steele M.L, Robinson S.R. Reactive astrocytes give neurons less support: implications for Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 2012; 33: 423.e1-423.e13.

- 14) Mikla, V.I, Mikla, V.V. Positron Emission Tomography In: Medical Imaging Technology. Elsevier Insights. 2014; 53-64.
- 15) Li Z, Conti P.S. Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography. *Advanced Drug Delivey Reviews*. 2010; 62: 1031-1051.
- 16) Durán B.B. Imagenología Molecular. *Anales de Radiología de México*. 2004; 2: 63-64.
- 17) Liu S. Bifunctional Coupling Agents for Radiolabeling of Biomolecules and Target-Specific Delivery of Metallic Radionuclides. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008; 60(12): 1347-1370.
- 18) Moreira R. Principios y elementos de un ciclotrón. XIV Seminario de Ingeniería Biomédica. Facultades de Medicina e Ingeniería - Universidad de la República, UdelaR. 2004.
- 19) Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA). Protección radiológica y seguridad de las fuentes de radiación: Normas básicas internacionales de seguridad. Normas de seguridad del OIEA para la protección de las personas y el medio ambiente. Requisitos de Seguridad Generales, Parte 3. Viena, 2016.
- 20) Organización Mundial de la Salud (OMS). Buenas prácticas de manufactura establecidas por la OMS para productos farmacéuticos estériles. Serie de Informes Técnicos de la OMS. 2011; No. 961, Anexo 6.
- 21) U.S. Pharmacopeia-National Formulary [USP 40 NF 35], Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, Inc. <1823> Positron Emission Tomography Drugs – Information. 2017, Volume 1; pp. 2190-2201.
- 22) European Pharmacopeia 8.0. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare. Council of Europe. Radiopharmaceutical preparations and starting materials for radiopharmaceutical preparations. 2014, Volume 1; pp.1043-1114.
- 23) PET, ciclotrón y radiofarmacia. Boletín Tecnológico Evaluación de Tecnologías en Salud. Sub Gerencia de Evaluación Tecnológica - Gerencia de Planeamiento y Evaluación de Inversiones - Oficina Central de Planificación y Desarrollo. Perú. 2009; N° 30.
- 24) James O, Doraiswamy P, Borges-Neto S. PET imaging of tau pathology in Alzheimer`s disease and tauopathies. *Frontiers in Neurology*. 2015; 6 (38): 1-4.
- 25) Ishii K. PET Approaches for Diagnosis of Dementia. *American Journal of Neuroradiology*. 2014; 35 (11): 2030-2038.

- 26) Rosa-Neto P, Leuzy A. Molecular Imaging of Alzheimer's Disease Using PET. *The Canadian Review of Alzheimer's Disease and other dementias*. 2008; 11 (1): 18-24
- 27) Teipel S, Drzazga A, Grothe MJ, et al. Multimodal imaging in Alzheimer's disease: validity and usefulness for early detection. *The Lancet Neurology*. 2015; 14: 1037-1053.
- 28) Engler H. PET and the multitracer concept: An approach to neuroimaging pathology. *Acta Universitatis Upsaliensis. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine* 345. pp. 72. Uppsala. ISBN 978-91-554-7186-6. 2008.
- 29) Engler H, Klunk W, Nordberg A, et al. First PET Study with a Benzothiazol Amyloidimaging Agent (PIB) in Alzheimer's Disease Patients and Healthy Volunteers. En: *The Living Brain and Alzheimer's Disease*. Hyman B.T, Demonet J.F, Christen Y. Springer, Berlin, Heidelberg. 2004, pp.123-137.
- 30) Klunk W, Engler H, Nordberg A, et al. Imaging Brain Amyloid in Alzheimer's Disease with Pittsburgh Compound-B. *Annals of Neurology*. 2004; 55(3): 306-319.
- 31) Landau S, Thomas B, Thurfjell L, et al. Amyloid PET imaging in Alzheimer's disease: a comparison of three radiotracers. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2014; 41(7):1398-1407.
- 32) Fodero-Tavoletti MT, Brockshnieder D, Villemagne VL, et al. In vitro Characterization of <sup>18</sup>F-Florebetaben, an A $\beta$  imaging radiotracer. *Nuclear Medicine and Biology*. 2012; 39: 1042-1048.
- 33) Barrio Jr, Huang SC, Cole G, et al. PET imaging of tangles and plaques in Alzheimer disease with a highly hydrophobic probe. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 1999; 42: S194-195.
- 34) Tolboom N, Yaqub M, van der Flier W.M, et al. Detection of Alzheimer Pathology In Vivo Using Both <sup>11</sup>C-PIB and <sup>18</sup>F-FDDNP PET. *Journal of Nuclear Medicine*. 2009; 50:191-197.
- 35) Villemagne V, Fodero-Tavoletti M, Masters C, et al. Tau imaging: early progress and future directions. *The Lancet Neurology*. 2015; 14: 114-121.
- 36) Schuitemakera A, Krophollerb M.A, Boellaardb R, et al. Microglial activation in Alzheimer's disease: an (R)-[<sup>11</sup>C]PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiology of Aging*. 2013; 34:128-136.
- 37) Yokokura M, Mori N, Yagi S, et al. In vivo changes in microglial activation and amyloid deposits in brain regions with hypometabolism in Alzheimer's disease.

- European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 2011; 38(2): 343-351.
- 38) Choo IL, Carter SF, Schöll ML, et al. Astrocytosis measured by  $^{11}\text{C}$ -deprenyl PET correlates with decrease in gray matter density in the parahippocampus of prodromal Alzheimer's patients. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 2014; 41 (11): 2120-2126.
  - 39) Carter SF, Schöll M, Almkvist O, et al. Evidence for astrocytosis in prodromal Alzheimer disease provided by  $^{11}\text{C}$ -deuterium-L-deprenyl: a multitracer PET paradigm combining  $^{11}\text{C}$ -Pittsburgh compound B and  $^{18}\text{F}$ -FDG. Journal of Nuclear Medicine. 2012; 53 (1): 37-46.
  - 40) Santillo AF, Gambini JP, Lannfelt L, et al. In vivo imaging of astrocytosis in Alzheimer's disease: an  $^{11}\text{C}$ -L-deuteriodeprenyl and PIB PET study. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 2011; 38 (12): 2202-2208.
  - 41) Engler H, Lunderg P.O, Ekblom K, et al. Multitracer study with positron emission tomography in Creutzfeldt-Jakob disease. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 2003; 30: 85-95.
  - 42) Engler H, Nennesmo I, Kumlien E, et al. Imaging astrocytosis with PET in Creutzfeldt-Jakob disease: case report with histopathological findings. International journal of clinical and experimental medicine. 2012; 5 (2): 201-217.
  - 43) Johansson A, Engler H, Blomquist G, et al. Evidence for astrocytosis in ALS demonstrated by [ $^{11}\text{C}$ ](L)-deprenyl-D2 PET. Journal of the Neurological Sciences. 2007; 255 (1-2): 17-22.
  - 44) Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, et al. Inhibition of monoamine oxidase B in the brains of smokers. Nature. 1996; 379: 733-736.
  - 45) Patlak CS, Blasberg RG, Fenstermacher JD. Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple time uptake data. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 1983; 3: 1-7.
  - 46) Bischof G, Hammes J, van Eimeren T, et al. Differential contributions of Amyloid and Tau burden to Neurodegeneration in Alzheimer's Disease: A multimodal in vivo PET study. The Journal of Nuclear Medicine. 2016; 57 (2): 124.
  - 47) Beija M., Afonso C, Martinho J. Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. Chemical Society Reviews. 2009; 28: 2410-2433.
  - 48) Corrie J, Davis C, Eccleston, J. Chemistry of Sulforhodamine-Amine Conjugates. Bioconjugate Chemistry, 2001; 12: 186-194.

- 49) Lefevre C, Kang H, Haugland R, et al. Texas Red-X and Rhodamine Red-X, New Derivatives of Sulforhodamine 101 and Lissamine Rhodamine B with Improved Labeling and Fluorescence Properties. *Bioconjugate Chemistry*. 1996; 7: 482-489.
- 50) Titus J.; Haugland R.; Sharrow S. Texas Red, a hydrophilic red-emitting fluorophore for use with fluorescein in dual parameter flow microfluorometric and fluorescence microscopic studies. *Journal of Immunological Methods*. 1982; 50: 193-204.
- 51) Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Kerr J, et al. Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nature Methods*. 2004; 1(1): 1-7.
- 52) Nimmerjahn A, Helmchen F. In vivo labeling of cortical astrocytes with sulforhodamine 101 (SR101). *Cold Spring Harbor Protocols*. 2012; 3: 326-334.
- 53) Appaix F, Girod S, Boisseau, S, et al. Specific in vivo staining of astrocytes in the whole brain after intravenous injection of sulforhodamine dyes. *PLoS One*, 2012, 7 (4): e35169.
- 54) Vérant P, Ricard C, Serduc R, et al. In vivo staining of neocortical astrocytes via the cerebral microcirculation using Sulforhodamine B. *Journal of Biomedical Optics*. 2008; 13 (6), 064028-1-5.
- 55) Keifer J, Vyas D, Houk J. Sulforhodamine labeling of neural circuits engaged in motor pattern generation in the in vitro turtle brainstem-cerebellum. *The Journal of Neuroscience*. 1992; 12 (8): 3187-3199.
- 56) Ehinger B, Zucker C, Bruun A. In vivo staining of oligodendroglia in the rabbit retina. *Glia*. 1994; 10: 40-48.
- 57) Pannasch U, Vargová L, Reingruber J. Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108 (20): 8467-8472.
- 58) Schnell C, Hagos Y, Hülsmann S. Active Sulforhodamine 101 uptake into hippocampal astrocytes. *PLoS One*. 2012; 7 (11): e49398.
- 59) Schnell C, Shahmoradi A, Wichert S. The multispecific thyroid hormone transporter OATP1C1 mediates cell-specific sulforhodamine 101-labelling of hippocampal astrocytes. *Brain Structure and Function*. 2015; 220: 193-203.
- 60) Wasseff S, Scerer S. Cx3 and Cx47 mediate oligodendrocyte:astrocyte and oligodendrocyte:oligodendrocyte gap junction coupling. *Neurobiology of Disease*. 2011; 42: 506-513.
- 61) Hill R, Grutzendler I. In vivo imaging of oligodendrocytes with sulforhodamine. *Nature Methods*. 2014; 11: 1081-1082.

- 62) Hagos L, Hülsmann S. Unspecific labelling of oligodendrocytes by sulforhodamine 101 depends on astrocytic uptake via the thyroid hormone transporter OATP1C1 (SLCO1C1). *Neuroscience Letters*. 2016; 631: 13-18.
- 63) Hülsmann S, Hagos L, Heuer H. Limitations of Sulforhodamine 101 for brain imaging. *Frontier in Cellular Neuroscience*. 2017; 11 (44): 1-6.
- 64) Wuest F, Berndt M, Kniess T. Carbon-11 Labeling Chemistry Based upon [<sup>11</sup>C]Methyl Iodide. En: *PET Chemistry*; Schubiger P.A, Lehmann L, Friebe M, Ed.; Ernst Schering Research Foundation Workshop: Springer, Berlin, Heidelberg, 2007; Vol. 64, pp. 183-213.
- 65) Dolle F, Bramouille Y, Hinnen F, et al. Efficient synthesis and formulation of (R)-(-)-[<sup>11</sup>C]Deprenyl, a selective radioligand for quantification of MAO-B activity using PET. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 2002; 45 (10): 803-811.
- 66) TRACERlab FX<sub>C</sub> Guía del operador. Technical Publications. GE Medical Systems. General Electric Company. 2004. Rev. 0.
- 67) U.S. Pharmacopeia-National Formulary [USP 40 NF 35], Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, Inc; 2017. <467> General chapter Residual Solvents; 2017, Volume 1; pp. 369-384.
- 68) U.S. Pharmacopeia-National Formulary [USP 40 NF 35], Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, Inc; 2017. <71> Sterility Tests; 2017, Volume 1; pp. 136-143.
- 69) U.S. Pharmacopeia-National Formulary [USP 40 NF 35], Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, Inc; 2017. <85> Bacterial Endotoxins Test; 2017, Volume 1; pp. 163-172.
- 70) Perdomo R. Ensayo del lisado de amebocitos del Limulus (LAL), *Revista Cubana de Farmacia*. 2004; 38 (1): 1.
- 71) Buccino P, Kreimerman I, Zirbesegger K, et al. Automated radiosynthesis of <sup>11</sup>C-L-deprenyl-D2 and <sup>11</sup>C-D-deprenyl using a commercial platform. *Applied Radiation and Isotopes*. 2016; 110: 47-62.
- 72) Zirbesegger K, Buccino P, Kreimerman I, et al. An efficient preparation of labeling precursor of [<sup>11</sup>C]L-deprenyl-D2 and automated radiosynthesis. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging - Radiopharmacy and Chemistry*. 2017, 2:10. doi:10.1186/s41181-017-0029-5.
- 73) Coenen H, Elsinga P, Iwata, R. Fluorine-18 radiopharmaceuticals beyond [<sup>18</sup>F] FDG for use in oncology and neurosciences. *Nuclear Medicine and Biology*. 2010; 37: 727-740.

- 74) TRACERlab FX<sub>F-N</sub> Operator Guide. Technical Publications. GE Medical Systems. General Electric Company. 2003-2004. Rev. 2.
- 75) Romieu A, Brossard D, Hamon M, et al. Postsynthetic Derivatization of Fluorophores with  $\alpha$ -Sulfo- $\beta$ -alanine Dipeptide Linker. Application to the Preparation of Water-Soluble Cyanine and Rhodamine Dyes. *Bioconjugate Chemistry*. 2008; 19: 279-289.
- 76) Marchesini S, Gatt S, Agmon V, et al. A novel fluorescent pH indicator for the acidic range. *Biochemistry International*. 1992; 27: 545-550.
- 77) Gilissen C, Bormans G, de Groot, T, et al. Synthesis of N-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroethyl)-N'-methylthiourea: a hydrogen peroxide scavenger. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 1998; 41: 491-502.
- 78) Guo Z, Zhang R, Liang F. Facile functionalization of FK506 for biological studies by the thiol-ene 'click' reaction. *RSC Advances*. 2014; 4: 11400-11403.
- 79) Nielsen M, Ugaz C, Li W, et al. PyFluor: A Low-Cost, Stable, and Selective Deoxyfluorination Reagent. *Journal of the American Chemistry Society*. 2015; 137 (30): 9571- 9574.
- 80) Matesic L, Wyatt N, Fraser B, et al. Ascertaining the Suitability of Aryl Sulfonyl Fluorides for [<sup>18</sup>F]Radiochemistry Applications: A Systematic Investigation using Microfluidics. *The Journal of Organic Chemistry*. 2013; 78: 11262-11270.
- 81) Kreimerman I, Porcal W, Olivera S, et al. Synthesis of [<sup>18</sup>F]2B-SRF101: A sulfonamide derivative of the fluorescent dye Sulforhodamine 101. *Current Radiopharmaceuticals*. 2017; 10: 212-20.
- 82) Goodman and Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. México. 11ma ed, McGraw-Hill Interamericana. 2007. pp.1-41.
- 83) Wilson A, Jin L, Garcia A, et al. An admonition when measuring the lipophilicity of radiotracers using counting techniques. *Applied Radiation and Isotopes*. 2001; 54: 203-208.
- 84) Giglio J. Diseño, síntesis y evaluación de complejos de <sup>99m</sup>Tc conteniendo ligandos nitroimidazólicos, como potenciales radiofármacos con selectividad hacia tejido hipóxico. Tesis de Doctorado en Química, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay, 2010.
- 85) Olivera S, Fernandez A, Latini A, et al. Astrocytic proliferation and mitochondrial dysfunction induced by accumulated glutaric acidemia I (GAI) metabolites: Possible implications for GAI pathogenesis. *Neurobiology of Disease*. 2008; 32(3): 528-534.

- 86) Aulton E. Farmacia: Ciencia y diseño de formas farmaceuticas. Madrid, España. ELSEVIER. 2004.
- 87) Villemagne V, Furumoto S, Fodero-Tavoletti M, et al. The Challenges of Tau Imaging. *Future Neurology*. 2012; 7(4): 409-421.
- 88) Alva-Sánchez H, Rodríguez-Balderas C, Trejo-Ballado F, et al. Investigación preclínica por microPET en la UNAM. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. 2012; 55 (3): 4-10.
- 89) Conde Suárez, E. Preparación del radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-[Lys3]-BN. Tesis, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. 2007.
- 90) Rodriguez-Vieitez E, Ni R, Gulyás B, et al. Astrocytosis precedes amyloid depositiomn in Alzheimer APPswe transgenic mouse brain: a correlative positron emission tomography and in vitro imaging study. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2015; 42 (7): 1119-1132.
- 91) Oddo S, Caccamo A, Shepherd J, et al. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A $\beta$  and Synaptic Dysfunction. *Neuron*. 2003; 39 (3): 409-421.
- 92) Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Orlando, FL: Academic Press. 1998.
- 93) Mariella Terán. *Manual de Protección Radiológica*. CUDIM. 2016.
- 94) Kozirowski J, Behe M, Decristoforo C, et al. Position paper on requirements for toxicological studies in the specific case of radiopharmaceuticals. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging - Radiopharmacy and Chemistry*. 2016; 1:1. doi:10.1186/s41181-016-0004-6.
- 95) Nair A, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*. 2016; 7: 27–31.
- 96) Mathematica. Version 10.4. Champaign, Illinois: 2015.
- 97) Kakar M, Khan M, Khan M, et al. Prevalence of tick infestation in different breeds of cattle in balochistan. *The Journal of Animal & Plant Sciences*. 2017; 27(3): 797-802.
- 98) Tolvanen T, Yli-Kerttula T, Ujula T, et al. Biodistribution and radiation dosimetry of [ $^{11}\text{C}$ ]choline: A comparison between rat and human data. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2010; 37(5): 874–883.

- 99) Stabin M, Sparks R, Crowe E. OLINDA/EXM: the second-generation personal computer software for internal dose assessment in nuclear medicine. *Journal of Nuclear Medicine*. 2005; 46 (6): 1023-1027.
- 100) Stabin M, Xu X, Emmons M, et al. RADAR Reference Adult, Pediatric, and Pregnant Female Phantom Series for Internal and External Dosimetry. *Journal of Nuclear Medicine*. 2012; 53(11): 1807–1813.
- 101) ICRP. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 60. *Ann ICRP*. 1991; 21:1-201.
- 102) ICRP. Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: reference values. A report of age- and gender-related differences in the anatomical and physiological characteristics of reference individuals. ICRP Publication 89. *Ann ICRP* 2002; 32:5–265.
- 103) Protection R. ICRP publication 103. *Ann ICRP* 2007; 37:2.
- 104) M3(R2); ICH E. ICH M3(R2) - Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals. International Conference Harmon. 2009; 3:25. doi:EMA/CPMP/ICH/286/1995.
- 105) Suárez M.. Interaprendizaje de Probabilidades y Estadística Inferencial con Excel, Winstats y Graph. Ibarra, Ecuador. Primera Edición. Imprenta M & V. 2012.
- 106) Kranz M, Sattler B, Tiepolt S, et al. Radiation dosimetry of the alpha4beta2 nicotinic receptor ligand (+)-[<sup>18</sup>F]flubatine, comparing preclinical PET/MRI and PET/CT to first-in-human PET/CT results. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging - Physics*. 2016; 3:25. doi:10.1186/s40658-016-0160-5.
- 107) Boschi S, Lee JT, Beykan S, et al. Synthesis and preclinical evaluation of an Al<sup>18</sup>F radiofluorinated GLU-UREA-LYS(AHX)-HBED-CC PSMA ligand. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2016; 43: 2122-2130.
- 108) ICRP. Radiation Dose to Patients from Radiopharmaceuticals - Addendum 3 to ICRP Publication 53. ICRP Publication 106. *Ann. ICRP* 38 (1-2).

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM) por permitir realizar este trabajo en sus instalaciones, brindando los materiales y equipamientos necesarios.

Al Dr. Eduardo Savio y Dra. Patricia Oliver por realizar la tutoría de este trabajo, asimismo al Dr. Henry Engler por su rol como asesor científico.

A PEDECIBA-Química por el apoyo económico y a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la beca otorgada.

A la Cátedra de Radioquímica de Facultad de Química por la donación de reactivos para los ensayos fisicoquímicos.

A los centros PET de las siguientes instituciones donde se realizó la pasantía: Nuklearmedicin, PET, Hospital Universitario Norrlands de Umeå, Suecia; Centro PET de la Universidad de Uppsala, Suecia; Bencar AB, Uppsala, Suecia; Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia.

Al Dr. Kooresh Shoghi de MicroPET facility, Washington University in Sant Louis, Estados Unidos, por la colaboración en los estudios de fluorescencia.

A la Dra. Silvia Olivera del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), por la colaboración en los ensayos en cultivos celulares.

A la Lic. Elena Vasilskis y al Dr. Pablo Díaz, del área de cultivos celulares de CUDIM por la colaboración en los ensayos.

Al Dr. Manuel Ibarra del Centro de Evaluación de Biodisponibilidad y Bioequivalencia de Medicamentos (CEBIOBE), por la colaboración en el análisis estadístico del ensayo de toxicidad.

Al Lic. Erick Mora-Ramirez y Dr. Manuel Bardiès del Inserm, Université Toulouse III-Paul Sabatier, Toulouse, Francia, por la colaboración en los estudios dosimétricos.

Al Dr. Pedro Piccardo, por el análisis anatomopatológico de las muestras del ensayo de toxicidad.

A Williams Porcal, por su invaluable apoyo académico, desde las discusiones científicas, análisis de espectros, aporte bibliográfico, etc.

Un agradecimiento especial a Pablo, quien estuvo siempre brindándome su apoyo tanto en lo académico y profesional, como en lo emocional durante este largo trayecto.

A Andrea, por su colaboración durante los controles de calidad de los radiofármacos y su gran apoyo emocional.

A Laura, por incursionar juntas en el área de los estudios toxicológicos y por su apoyo en el la realización y procesamiento de datos de las evaluaciones biológicas.

A Tania, por la realización de los estudios de fluorescencia en su pasantía en Estados Unidos y las largas horas compartidas cambiando jaulas.

A Javier, por todas las consultas académicas y experimentales.

Gracias a mis compañeros de CUDIM, en especial a Elena, Inés, Victoria, Stefanía, Omar, Carlos y Andrea P.

Una mención especial a Soledad, a quien siempre recuerdo y quien me transmitió su motivación para emprender este camino.

A Florencia, mi compañera y amiga, con quien iniciamos este trayecto y que sin su compañía y apoyo no hubiera llegado a esta meta.

A mi familia y amigos por el aguante en todo este tiempo.

**ANEXO**  
**PUBLICACIONES**