



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 diagnóstico de cáncer de próstata y evaluación de su agresividad y progresión mediante tomografía por emisión de positrones”

Q.F. Florencia Zoppolo Lencina

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

Febrero 2018

*A Rodrigo, mis padres y familia por el apoyo de
siempre, sobre todo durante este largo camino*

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 6 |
| 1. INTRODUCCIÓN GENERAL | 9 |
| 1.1. Cáncer de próstata | 9 |
| 1.2. Imagenología molecular – Tomografía por emisión de positrones (PET) | 12 |
| 1.3. Radiofármacos PET para el CP | 16 |
| 1.4. Rol de la S-adenosil metionina (SAM o AdoMet) en el CP | 19 |
| 1.5. Objetivos | 22 |
| 2. CAPÍTULO I: Síntesis de SAM, radiosíntesis y control de calidad de [¹¹C]SAM | 24 |
| 2.1. Introducción | 24 |
| 2.2. Parte experimental | 29 |
| 2.2.1. Materiales y equipos | 29 |
| 2.2.2. Métodos | 30 |
| 2.2.2.1. Síntesis de SAM | 30 |
| 2.2.2.2. Síntesis de [¹¹ C]SAM | 32 |
| 2.2.2.3. Control de calidad de [¹¹ C]SAM | 33 |
| 2.3. Resultados y discusión | 34 |
| 2.3.1. Síntesis de SAM | 34 |
| 2.3.2. Síntesis de [¹¹ C]SAM | 39 |
| 2.3.3. Control de calidad de [¹¹ C]SAM | 48 |
| 2.4. Conclusiones | 49 |
| 2.5. Información adicional | 49 |
| 3. CAPÍTULO II: Evaluación fisicoquímica e <i>in vitro</i> de [¹¹C]SAM | 50 |
| 3.1. Introducción | 50 |
| 3.2. Parte experimental | 51 |
| 3.2.1. Materiales y equipos | 51 |
| 3.2.2. Métodos | 52 |
| 3.2.2.1. Síntesis de [¹¹ C]SAM y [¹¹ C]COL | 52 |
| 3.2.2.2. Estabilidad en formulación final | 53 |
| 3.2.2.3. Estabilidad en plasma | 53 |
| 3.2.2.4. Determinación del porcentaje de unión a proteínas plasmáticas | 53 |
| 3.2.2.5. Lipofilicidad | 54 |
| 3.2.2.6. Ensayo de unión e internalización celular de [¹¹ C]SAM y | |

| | |
|--|----|
| [¹¹ C]COL en cultivos celulares PC3 | 54 |
| 3.2.2.7. Análisis estadístico | 55 |
| 3.3. Resultados y discusión | 55 |
| 3.3.1. Estudios fisicoquímicos y de estabilidad <i>in vitro</i> | 55 |
| 3.3.2. Ensayo de unión e internalización celular de [¹¹ C]SAM y [¹¹ C]COL en cultivos celulares PC3 | 57 |
| 3.4. Conclusiones | 59 |
| 4. CAPÍTULO III: Evaluación <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> de [¹¹ C]SAM | 60 |
| 4.1. Introducción | 60 |
| 4.2. Parte experimental | 64 |
| 4.2.1. Materiales y equipos | 64 |
| 4.2.2. Métodos | 65 |
| 4.2.2.1. Síntesis de [¹¹ C]SAM y [¹¹ C]COL | 65 |
| 4.2.2.2. Animales de experimentación y línea celular | 65 |
| 4.2.2.3. Desarrollo del modelo tumoral | 65 |
| 4.2.2.4. Estudios <i>ex vivo</i> de biodistribución | 66 |
| 4.2.2.5. Estudios <i>in vivo</i> de imagenología molecular PET/CT | 66 |
| 4.2.2.6. Seguimiento del crecimiento tumoral con [¹¹ C]COL y [¹¹ C]SAM | 67 |
| 4.2.2.7. Estudios dosimétricos de [¹¹ C]SAM | 68 |
| 4.2.2.8. Análisis estadístico | 69 |
| 4.3. Resultados y discusión | 69 |
| 4.3.1. Estudios <i>ex vivo</i> de biodistribución | 69 |
| 4.3.2. Estudios <i>in vivo</i> de imagenología molecular PET/CT | 72 |
| 4.3.3. Seguimiento del crecimiento tumoral con [¹¹ C]COL y [¹¹ C]SAM | 75 |
| 4.3.4. Estudios dosimétricos de [¹¹ C]SAM | 77 |
| 4.4. Conclusiones | 82 |
| 4.5. Información adicional | 83 |
| 5. CAPÍTULO IV: Ensayo clínico con [¹¹ C]SAM | 84 |
| 5.1. Introducción | 84 |
| 5.2. Parte experimental | 85 |
| 5.2.1. Materiales y equipos | 85 |
| 5.2.2. Métodos | 86 |
| 5.3. Resultados esperados | 86 |
| 5.4. Conclusiones | 87 |

| | |
|--|------------|
| 6. CAPÍTULO V: Comparación <i>in vivo</i> de [¹¹C]MET con [¹¹C]COL en un modelo murino de tumor xenográfico de CP | 88 |
| 6.1. Introducción | 88 |
| 6.2. Parte experimental | 89 |
| 6.2.1. Materiales y equipos | 89 |
| 6.2.2. Métodos | 90 |
| 6.2.2.1. Síntesis de [¹¹ C]COL y [¹¹ C]MET | 90 |
| 6.2.2.2. Animales de experimentación y línea celular | 91 |
| 6.2.2.3. Desarrollo del modelo tumoral | 91 |
| 6.2.2.4. Estudios <i>in vivo</i> de imagenología molecular PET/CT | 91 |
| 6.2.2.5. Análisis estadístico | 92 |
| 6.3. Resultados y discusión | 92 |
| 6.4. Conclusiones | 93 |
| 7. CAPÍTULO VI: Estudios <i>in silico</i> de derivados de SAM | 94 |
| 7.1. Introducción | 94 |
| 7.2. Parte experimental | 96 |
| 7.2.1. Materiales y métodos | 96 |
| 7.2.1.1. Búsqueda de las estructuras necesarias para las simulaciones | 96 |
| 7.2.1.2. Estudios de acoplamiento molecular | 96 |
| 7.2.1.3. Estudios de dinámica molecular | 97 |
| 7.3. Resultados y discusión | 97 |
| 7.3.1. Búsqueda de las estructuras necesarias para las simulaciones | 97 |
| 7.3.2. Estudios de acoplamiento molecular a ciegas entre GNMT y los ligandos (SAM y sus derivados) | 99 |
| 7.3.3. Estudios de acoplamiento molecular por la zona de interacción predicha entre GNMT y los ligandos (SAM y sus derivados) | 101 |
| 7.3.4. Estudios de dinámica molecular | 103 |
| 7.4. Conclusiones | 106 |
| 7.5. Información adicional | 107 |
| 8. CONCLUSIONES GENERALES | 108 |
| 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 112 |
| AGRADECIMIENTOS | 120 |
| ANEXO I – Publicaciones | 122 |
| ANEXO II - Protocolo Ensayo Clínico | 123 |

RESUMEN

El cáncer de próstata (CP) es uno de los cánceres sólidos más comúnmente diagnosticados en el hombre. El mismo constituye la quinta causa principal de mortalidad por cáncer a nivel mundial, representando un problema de salud pública. Esta patología se caracteriza por tener una evolución y sintomatología muy heterogénea, pudiendo presentar una amplia gama de comportamientos biológicos. Para poder establecer el tratamiento más adecuado en cada caso, es de suma importancia estadificar con precisión esta patología. De aquí surge la necesidad de contar con métodos diagnósticos específicos para cada estadio.

La tomografía por emisión de positrones (PET) es una modalidad de imagenología molecular que permite obtener información funcional y metabólica de los distintos órganos y tejidos del cuerpo, a partir de la obtención de imágenes tridimensionales. Esta técnica ofrece una herramienta cuantitativa útil para la caracterización *in vivo* de la biología tumoral, y por ello juega un rol muy importante en el diagnóstico de CP. Para poder realizar un diagnóstico preciso, la imagenología molecular por PET/CT debe ajustarse específicamente a la biología tumoral y al estadio evolutivo del paciente. La [¹¹C]colina ([¹¹C]COL) ha sido uno de los radiofármacos más utilizados estos últimos años, como referencia para la detección y evaluación del CP en la clínica. Sin embargo, el diagnóstico de esta patología con dicho radiofármaco presenta varias desventajas, basadas fundamentalmente en su baja sensibilidad.

En tal sentido, el presente trabajo tiene por objetivo el desarrollo químico y caracterización fisicoquímica y biológica de nuevos radiotrazadores PET que contribuyan al diagnóstico del CP, así como a la evaluación de la agresividad y la progresión del mismo por imagenología molecular, tomando como patrón de referencia el radiofármaco [¹¹C]COL.

La sarcosina es un aminoácido que ha sido identificado como un metabolito diferencial que se ve ampliamente incrementado durante la progresión del CP. Se ha demostrado que dicho incremento se relaciona con el aumento de la agresividad tumoral y se debe a la sobreexpresión de la enzima Glicina *N*-metiltransferasa (GNMT). En consecuencia, la identificación de ligandos de la GNMT para su posterior marcación con radionucleidos PET, constituiría una nueva herramienta para el diagnóstico de esta patología por imagenología molecular.

Esta enzima cataliza la metilación de glicina para formar sarcosina empleando *S*-adenosil metionina (SAM) como sustrato donador del grupo metilo. Habiendo identificado esta molécula se plantearon los siguientes objetivos específicos: síntesis de SAM a partir de *S*-adenosil homocisteína (SAH), optimización de la síntesis de [¹¹C]SAM mediante reacciones de marcación de *N*-metilación con ¹¹C, desarrollo del control de calidad del nuevo agente, evaluación fisicoquímica e *in vitro* de [¹¹C]SAM seguido de su caracterización biológica *ex vivo* e *in vivo*, así como la evaluación de otros intermediarios metabólicos como potenciales moléculas de interés.

Con la finalidad de estudiar la reactividad química del par SAH-SAM se realizaron ensayos de metilación en “frío”. Se logró optimizar un método químico para la síntesis de [¹¹C]SAM, que permitió obtener el compuesto como mezcla diastereomérica. No fue posible separar los diastereómeros mediante el sistema de HPLC semi-preparativo del módulo de síntesis.

La caracterización fisicoquímica e *in vitro* de [¹¹C]SAM aportó elementos para predecir el comportamiento *in vivo* del compuesto y así poder continuar con la etapa de evaluación biológica del mismo.

La evaluación biológica de [¹¹C]SAM se llevó a cabo empleando dos modelos de ratón, uno sano y otro portador de tumor xenográfico de CP humano, mediante estudios *ex vivo* de biodistribución e *in vivo* por imagenología molecular PET/CT. Los estudios realizados utilizando el modelo tumoral con [¹¹C]SAM permitieron determinar que la concentración de actividad obtenida a nivel del tumor fue significativamente mayor que la del músculo usado como órgano de referencia, a todos los tiempos analizados. Los estudios comparativos PET/CT con [¹¹C]COL, mostraron una captación tumoral *in vivo* de [¹¹C]SAM significativamente mayor que la obtenida para el radiofármaco de referencia.

Se realizaron estudios dosimétricos del nuevo compuesto desarrollado, a partir de los cuales se pudo concluir que el nivel de dosis efectiva asociada a la irradiación en un estudio con [¹¹C]SAM habilita su uso en pacientes, al ser del orden de otros radiofármacos en uso clínico.

Los resultados anteriormente descritos permitieron continuar con la redacción de un protocolo clínico piloto a fin de evaluar la potencial utilidad de [¹¹C]SAM en el diagnóstico de CP. Actualmente, el ensayo clínico planteado se encuentra en ejecución.

Con el fin de obtener otros potenciales radiotrazadores, se tomaron en consideración intermediarios metabólicos relacionados con la ruta bioquímica de la sarcosina. Se seleccionó a la metionina, considerando su rol como molécula precursora en la biosíntesis de SAM. En tal sentido, los estudios PET/CT comparativos entre [^{11}C]MET y [^{11}C]COL permitieron evaluar la captación tumoral específica de ambos radiofármacos en el modelo murino de tumor xenográfico de CP humano.

Por otro lado, se evaluaron potenciales ligandos de la enzima GNMT, basados en moléculas derivadas de SAM marcadas con radionucleidos PET. Mediante estudios *in silico* se pudo obtener información estructural útil para el desarrollo de estos agentes. Los estudios de docking permitieron estudiar y establecer el modo de unión entre GNMT y los ligandos en estudio (SAM y derivados). Mientras que, mediante estudios de dinámica molecular se evaluó la estabilidad en el tiempo de los complejos más prometedores.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Cáncer de próstata

El cáncer se puede definir como un grupo de enfermedades caracterizado por el crecimiento descontrolado y la propagación de células anormales que pueden comprometer el funcionamiento normal del tejido involucrado. Esta patología habitualmente puede ser causada tanto por factores externos (tabaco, agentes químicos, radiaciones, e infecciones) como por factores internos (mutaciones heredadas, hormonas, condiciones inmunológicas, y mutaciones que pueden ocurrir como consecuencia del propio metabolismo), lo cual en la mayoría de los casos es muy difícil de determinar [1].

En particular, el cáncer de próstata (CP) se origina cuando las células prostáticas comienzan a crecer sin control. Los factores de riesgo que están fuertemente asociados con la probabilidad de que un hombre padezca CP son la edad, los antecedentes familiares y el grupo étnico. La edad constituye el factor de riesgo más importante, la mayoría de los casos clínicamente diagnosticados de CP se dan en hombres mayores de 60 años. Es poco común que el CP afecte a los hombres menores de 40 años, pero la probabilidad de padecerlo aumenta rápidamente después de los 50 años [1-3].

Por otro lado, hay que tener en cuenta los antecedentes familiares, un hombre con una historia familiar de CP presenta riesgos significativamente mayores de padecerlo. En el entorno de un 25% de los hombres diagnosticados con CP tienen antecedentes familiares de la enfermedad, lo cual sugiere que en algunos casos puede haber un factor hereditario o genético [4]. El nivel de riesgo además está asociado al grado de parentesco y a la edad en la cual fue diagnosticado el CP en los familiares afectados. El mismo es mayor cuando el familiar involucrado es de primer grado y cuanto más joven haya sido diagnosticado [1-2].

La relevancia de los factores étnicos en el riesgo de sufrir CP ha sido extensamente estudiada, por su importancia respecto de la etiología de este cáncer. Los hombres afrodescendientes presentan mayor riesgo de padecer CP que los hombres de otras razas. En EEUU el riesgo en la población afrodescendiente es 1.6 veces mayor en relación a la población blanca. Las menores tasas de incidencia ocurren en los hombres asiáticos. Las razones de estas diferencias raciales y étnicas aún no están claramente definidas [2-3].

Desde hace varios años en Uruguay el CP es el más frecuente entre los hombres, superando al cáncer de pulmón. Además, es el tercero más frecuente considerando ambos

sexos, luego del cáncer de mama y el cáncer colorrectal. Su incidencia en Uruguay es 59.9/100.000, constituyendo la segunda causa de mortalidad (19.9/100.000) por cáncer en el hombre [2]. A nivel mundial, es el segundo cáncer más comúnmente diagnosticado en los hombres y constituye la quinta causa de muerte por cáncer [5].

El problema del cáncer es uno de los desafíos sanitarios más relevantes de esta época debido, en gran parte, al envejecimiento de la población. Como consecuencia del avance en la prevención y tratamiento de las enfermedades infecciosas, así como de las mejoras generales en la calidad de vida, la expectativa de vida ha tenido un aumento sustantivo. Esto dio lugar a que surgiera un nuevo perfil epidemiológico en el cual las enfermedades crónicas y degenerativas, especialmente las patologías cardiovasculares y el cáncer, constituyeran las primeras causas de muerte [6]. Además de esto, en particular para el CP, el incremento en su incidencia también está relacionado con el uso de nuevas estrategias de screening y diagnóstico precoz. Teniendo en consideración lo anterior, el CP es un problema mayor de salud pública en Uruguay y en el mundo, generando una gran carga de morbi-mortalidad así como impactos socio-económicos relevantes [2].

El CP clínicamente se puede definir como una enfermedad heterogénea desde el punto de vista de su evolución y sintomatología. Se caracteriza generalmente, por presentar una historia natural larga, que puede llevar muchos años, en comparación con otro tipo de tumores sólidos. Además, durante las diferentes etapas de su desarrollo puede mostrar un amplio espectro de comportamientos biológicos que van desde cánceres indolentes de bajo grado, hasta tumores agresivos que se pueden extender localmente e incluso generar metástasis óseas. Los diferentes CP varían ampliamente en cuanto a su tasa de crecimiento, su agresividad y su tendencia a generar metástasis. La biología de esta enfermedad durante la progresión evoluciona desde un carcinoma indolente de crecimiento lento, bien diferenciado, andrógeno-dependiente, hacia un tumor andrógeno independiente cada vez más indiferenciado y agresivo [2,7-9]. En base a esta gran variabilidad inter-pacientes, algunos hombres podrán padecer una enfermedad agresiva, que experimente progresión, incluso a pesar de tratamientos primarios, mientras que otros experimentarán una patología que no afecte su vida normal [9]. Esto plantea importantes desafíos relacionados con el diagnóstico, tratamiento y seguimiento óptimo del paciente.

Como fue mencionado anteriormente, el CP puede presentar diferentes etapas durante el proceso de evolución de la enfermedad. Sin embargo, la estadificación del mismo puede ser compleja debido a que existen varios sistemas de clasificación y los mismos pueden

utilizarse solos o en combinación. Lo más útil puede ser describir el CP según su estadio clínico, en una de las siguientes etapas: localizado (sin extensión fuera de la cápsula prostática), localmente avanzado (con invasión extracapsular o de vesículas seminales) o diseminado (con invasión linfática, metástasis o tumor primario fijo que invade estructuras adyacentes distintas de las vesículas seminales). El pronóstico para el caso de pacientes con enfermedad metastásica avanzada es pobre, presentando un 30% de supervivencia a los cinco años posteriores al diagnóstico. En contraste, para el caso del CP localizado, la tasa de supervivencia a los cinco años es del 90%. Esta cifra se reduce levemente a (70-80)% para la enfermedad localmente avanzada [3].

Por otro lado, existen otros tipos de clasificaciones del CP que evalúan de forma más detallada el estadio de la patología. Dentro de estos se encuentra el sistema TNM. El mismo tiene en consideración para la estadificación tumoral: el tamaño y ubicación del tumor (T), el compromiso de los ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia de metástasis (M). Los resultados de cada parámetro se combinan para determinar el estadio del CP [10].

Por otro lado, existe el sistema de estadificación de Gleason el cual clasifica al CP según su grado histopatológico. El mismo se basa en la apariencia microscópica que presentan las células cancerosas en comparación con las células sanas (grado de diferenciación entre las mismas). Los tumores menos agresivos, por lo general, tienen un aspecto más semejante al del tejido sano. Los tumores que son más agresivos y por ende, con mayor probabilidad de crecer y diseminarse, presentan un aspecto más indiferenciado con respecto al tejido sano. El patólogo observa cómo se disponen las células cancerosas en la próstata y asigna una puntuación [11].

Por último se encuentra la clasificación del CP según el riesgo, denominado sistema de D'Amico. Los pacientes diagnosticados con CP localizado o localmente avanzado pueden dividirse en subgrupos de riesgo en función de los valores anteriormente mencionados de T de la clasificación TNM y de Gleason, además de considerar el valor del Antígeno Prostático Específico (PSA) en sangre, según se muestra a continuación [3]:

- Bajo riesgo: $PSA \leq 10$ ng/mL, Gleason ≤ 6 y estadio clínico T1-2a.
- Riesgo intermedio: PSA entre 10-20 ng/mL, Gleason = 7 o estadio clínico T2b.
- Alto riesgo: $PSA > 20$ ng/mL, Gleason ≥ 8 o estadio clínico T2c-3a.

Para poder establecer el tratamiento más adecuado en cada caso, es muy importante estadificar con precisión el CP. A pesar de la gran variedad de los sistemas de clasificación definidos para esta enfermedad, todavía existe controversia en cuanto al significado de los exámenes de detección, para cada estadio de la misma. Hoy en día se ha visto que estos exámenes diagnósticos pueden llegar a ser poco específicos, e incluso en algunos casos, llevar a la toma de decisiones terapéuticas incorrectas. Este es el caso del análisis de PSA en sangre, ampliamente difundido en los últimos años. Existe polémica acerca de su uso para la detección del CP en pacientes que no presentan síntomas. Por un lado, es útil para detectar la patología en etapa inicial, lo cual ayuda a que muchos hombres reciban el tratamiento adecuado antes de que el cáncer se disemine. Por otra parte, la variación de los niveles de PSA puede estar asociada con afecciones no cancerígenas, como lo es la hiperplasia benigna de próstata y las infecciones del tracto urinario, además de aquellos casos de CP inocuos que nunca amenazarían contra la vida de un paciente. Además, no es capaz de distinguir si un cáncer es localizado o se encuentra diseminado. Como consecuencia, esta determinación podría implicar que un paciente se someta a cirugías y otros tratamientos, que posiblemente no sean necesarios y que puedan afectar gravemente su calidad de vida. En suma, con los exámenes paraclínicos hoy disponibles no es fácil predecir qué tumores crecerán y se diseminarán rápidamente y cuáles no crecerán o lo harán lentamente [12].

Por otro lado, los tratamientos disponibles para el CP en etapas tempranas (enfermedad localizada y localmente avanzada), van desde la vigilancia activa, hasta tratamientos radicales como lo son la prostatectomía o la radioterapia, así como la terapia de privación de andrógenos [13]. Estas terapias pueden presentar efectos secundarios que afectan la calidad de vida del paciente, e incluso un número considerable de casos experimentan recaída bioquímica post-tratamiento. En consecuencia, el contar con nuevos métodos diagnósticos más específicos para la enfermedad, y que permitan la detección y estadificación de forma precisa es de suma relevancia para poder definir el tratamiento oportuno en cada caso [14-15].

1.2. Imagenología molecular – Tomografía por emisión de positrones (PET)

La imagenología molecular se puede definir como una tecnología emergente que permite la caracterización y medición de los procesos biológicos *in vivo* a nivel celular y molecular, empleando técnicas de imagen. Presenta la habilidad potencial de optimizar la detección de enfermedades en su fase inicial de desarrollo. Esta técnica permite investigar

las anomalías moleculares que constituyen la base de una enfermedad, y no solo los efectos finales relacionados a dichas alteraciones moleculares [16-17].

El PET es una modalidad de imagenología molecular mínimamente invasiva, que permite obtener información funcional y metabólica de los órganos y tejidos del cuerpo, a partir de la obtención de imágenes tridimensionales. Esta técnica de imagen ofrece una herramienta cuantitativa para el estudio de los procesos fisiológicos, bioquímicos, farmacológicos y patológicos, permitiendo de esta manera la evaluación y el diagnóstico de diversas patologías [16,18].

Los estudios imagenológicos en general proveen información diagnóstica basándose en el patrón de distribución de la actividad en el organismo tras la administración de un radiofármaco de diagnóstico. Este último, generalmente está constituido por una molécula orgánica o un compuesto inorgánico que presenta afinidad por el blanco molecular, acoplado a un átomo radioactivo (radionucleido). Es recomendable que los radiofármacos de diagnóstico presenten un período de semidesintegración corto, pero compatible con el tiempo requerido para su síntesis y control, así como para la adquisición del estudio. Esto se cumple en el caso de la técnica PET, la cual requiere del empleo de radiofármacos que contengan radionucleidos emisores de positrones (radionucleidos PET). Este tipo de radionucleidos al decaer emiten positrones, los cuales tras ser emitidos pierden su energía por colisiones atravesando una corta distancia en el medio hasta que alcanzan el reposo. En este momento es que se combinan con su antipartícula, el electrón, produciéndose el fenómeno de aniquilación con emisión de dos rayos gama de 511 keV cada uno en sentido opuesto (180° entre sí) (figura 1a). Es importante destacar que los radiofármacos PET se utilizan en concentraciones trazas (de micro a picomolar), por lo que permiten evaluar los procesos biológicos sin perturbar los sistemas, ni ejercer efectos farmacológicos apreciables.

Una vez preparado el radiofármaco, es administrado al paciente generalmente por vía intravenosa. Luego que el radiotrazador se distribuye en el organismo, la radiación emitida desde los distintos órganos y tejidos es detectada externamente al paciente mediante un equipo detector denominado cámara PET. Este dispositivo basa su funcionamiento en la detección en coincidencia de los dos fotones de aniquilación de 511 keV que se producen como resultado del proceso de aniquilación descrito. La cámara consta de una cantidad variable de detectores de centelleo montados en una configuración circular y el paciente es colocado en el centro de este arreglo de detectores. Cada detector

opera en coincidencia con otro colocado en posición opuesta, de esta manera solo son contados los pulsos que llegan simultáneamente a los dos detectores situados a 180° entre sí. La energía absorbida por los detectores es re-emitida como luz visible y es detectada por tubos fotomultiplicadores. La señal luminosa es convertida en corriente eléctrica, la cual es proporcional a la energía del fotón incidente. Los eventos registrados son reconstruidos en imágenes tridimensionales que representan la distribución espacial del radiofármaco en el organismo (figura 1b) [16-19].

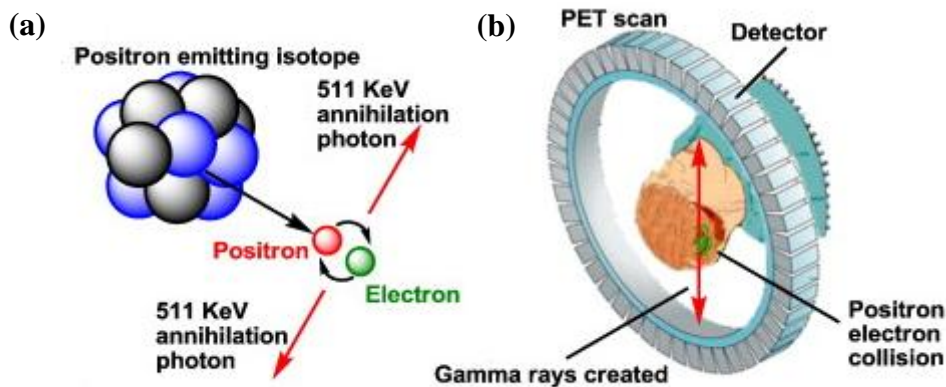


Figura 1. (a). Aniquilación del positrón y el electrón produciendo dos fotones de 511 keV emitidos cada uno en sentido opuesto; (b). Detección en coincidencia de los dos fotones de 511 keV por el arreglo de detectores de la cámara PET.

El PET generalmente se utiliza en combinación con la Tomografía Computarizada (CT), empleando tomógrafos híbridos PET/CT. De esta manera se puede obtener información anatómica y funcional de forma simultánea. El CT aporta imágenes detalladas de la ubicación exacta, el tamaño y la forma del tejido enfermo, mientras que el PET brinda datos metabólicos y funcionales de este tejido. De esta forma se puede obtener mayor información con un único estudio [17].

Los radiofármacos PET presentan determinadas características como lo son su corto período de semidesintegración y su elevada energía de emisión debida al proceso de aniquilación. En base a ello, para su producción y control de calidad es necesario contar con una infraestructura especial que disponga de determinados elementos tecnológicos, los cuales se pasan a detallar, (figura 2) [20-21]:

- El **ciclotrón** es un acelerador de partículas que se emplea para la producción de los radionucleidos PET. El mismo está constituido por una cámara de alto vacío en la que mediante un campo magnético paralelo al eje del cilindro y un sistema de radiofrecuencia

para generar un campo eléctrico alternante, se aceleran partículas como protones y deuterones, a energías muy elevadas. Estas partículas son producidas mediante una fuente de iones situada en el centro de la cavidad. Cuando estas partículas han adquirido suficiente energía (10 a 20 MeV en aplicaciones médicas) su trayectoria es desviada para que choquen con los blancos, en los que tienen lugar las reacciones nucleares que llevan a la obtención de los radionucleidos PET. El ciclotrón debe encontrarse dentro de una sala especial blindada por paredes de concreto de gran espesor, que constituye el bunker del ciclotrón. Existen además ciclotrones autoblandados, para los cuales no es necesaria dicha sala.

- Los **módulos de síntesis** constituyen el lugar físico donde se van a desarrollar los procesos químicos que permiten que el radionucleido PET se una a la molécula de interés, generando de este modo los radiofármacos. El funcionamiento de estos módulos es automatizado, operado mediante un software, evitando la manipulación directa por parte del operador. Esto permite que las reacciones de síntesis se lleven a cabo de forma rápida lo que es de suma importancia al trabajar con radionucleidos de corto período de semidesintegración. Además, los procesos se desarrollan de forma controlada, lo que aumenta la eficacia y el rendimiento de los mismos. Estos módulos deben ubicarse dentro de lo que se denominan **celdas calientes** debido a la elevada energía de emisión de los rayos gama de aniquilación. Las celdas calientes son cabinas de flujo laminar que garantizan por un lado, la protección microbiológica del radiofármaco al presentar un sistema de acondicionamiento de aire (en cuanto a número de partículas, temperatura y humedad) en su interior. Y por otro lado, la protección radiológica del operador al estar constituidas por puertas, paredes y ventanas de plomo.

- Los controles de calidad fisicoquímico y microbiológico son esenciales para verificar las especificaciones establecidas para cada radiofármaco. Una vez que culmina el proceso productivo, se envía una muestra del radiofármaco a control de calidad para analizar diferentes parámetros radioquímicos, fisicoquímicos y farmacéuticos. Si el compuesto cumple con todas las especificaciones establecidas el lote es liberado y está apto para ser administrado en pacientes.

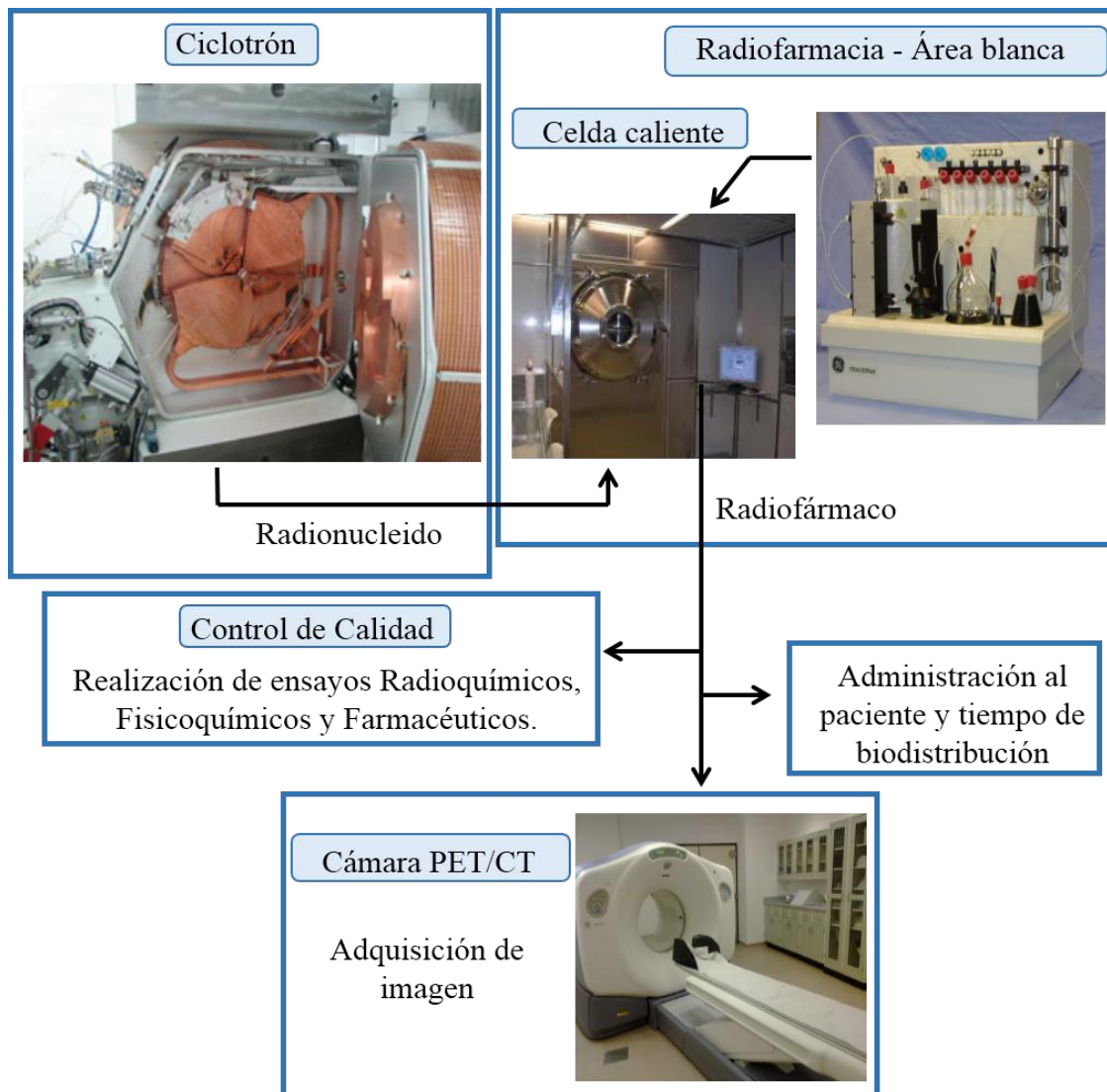


Figura 2. Esquema de los componentes tecnológicos involucrados en el proceso productivo y la aplicación clínica de un radiofármaco PET.

1.3. Radiofármacos PET para el CP

La gran heterogeneidad que presenta el CP inter-paciente determina que su evaluación por imagenología PET sea altamente desafiante. La imagenología molecular juega un rol muy importante en esta patología ya que a través del estudio de la biología tumoral permite determinar varios aspectos tales como: la localización y caracterización del tumor primario, si existe invasión extra capsular, evaluar y monitorear las terapias locales para la enfermedad confinada a la glándula, planificar la radioterapia, entre otros. Para poder realizar un diagnóstico preciso, la imagenología molecular por PET/CT debe ajustarse específicamente a la biología tumoral y al estadio evolutivo del paciente [22].

Al día de hoy, varios radiotrazadores han sido o están siendo investigados y desarrollados con el fin de evaluar por imágenes PET/CT el CP. Dentro de los que se encuentran en uso clínico se incluyen: [¹⁸F]fluorodesoxiglucosa (análogo de glucosa, [¹⁸F]FDG), [¹⁸F] y [¹¹C]colina ([¹¹C]COL), [¹¹C]acetato, [¹⁸F]fluoruro de sodio ([¹⁸F]NaF), agentes dirigidos al antígeno prostático específico de membrana marcados con ⁶⁸Ga ([⁶⁸Ga]PSMA). Otros radiotrazadores actualmente están en etapas de desarrollo clínico o preclínico, como lo son: [¹⁸F]PSMA, [¹⁸F]FDHT (análogo de andrógenos, 16-β-[¹⁸F]-fluoro-5-α-dihidrotestosterona), [¹⁸F]FACBC (análogo de L-leucina, anti-1-amino-3-[¹⁸F]-fluorociclobutano-1-ácido carboxílico) y análogos de bombesina [14,23]. A continuación se pasan a describir los que se encuentran en uso clínico.

La [¹⁸F]FDG por ser un análogo de la glucosa, permite analizar el metabolismo de la misma en las diferentes enfermedades. Su uso para el diagnóstico de CP ha sido ampliamente estudiado, ya que constituye el radiotrazador más empleado en el diagnóstico de pacientes con patologías oncológicas. Sin embargo, los resultados obtenidos no han sido promisorios. Esto probablemente está relacionado con varios factores. Por un lado, la limitada tasa de sensibilidad y especificidad que presenta la [¹⁸F]FDG para lesiones de CP, que oscilan entre 31 y 61%, respectivamente [23]. Por otro lado, la intensa excreción urinaria del radiofármaco, que genera alta actividad en uréteres y vejiga, dificultando la distinción de los ganglios linfáticos o la recurrencia local. Además, requiere del uso de técnicas de reconstrucción de imágenes más antiguas, que conducen a artefactos en la pelvis, interfiriendo con el análisis [8].

El [¹⁸F]NaF es utilizado en la práctica clínica para la detección de enfermedades óseas. En este caso, permite el diagnóstico de las metástasis óseas que se generan en estadios avanzados del CP. El mecanismo de acción de este radiotrazador se basa en la quimisorción por intercambio iónico del ion ¹⁸F⁻ con los grupos hidroxilos de los cristales de hidroxiapatita del hueso para formar la fluoroapatita. Esta última se deposita preferentemente en las superficies óseas sometidas a una mayor tasa de recambio, lo que explica la captación en las lesiones óseas. La sensibilidad y especificidad que presenta el [¹⁸F]NaF para la exploración ósea de rutina es de 82 y 57%, respectivamente [23].

La captación de [¹¹C]acetato está relacionada con la biosíntesis de lípidos, proceso que se encuentra aumentado en las células tumorales. El acetato es un precursor natural de los ácidos grasos que se convierte *in vivo* en acetyl-CoA, el cual se incorpora en el colesterol y los ácidos grasos. Por lo tanto, este radiofármaco actúa como biomarcador indirecto de

la síntesis de los ácidos grasos. El [¹¹C]acetato no se ha probado en grandes poblaciones de pacientes con CP [24]. No obstante, los estudios realizados han permitido evaluar su aplicación en esta patología. Por un lado, se pudo definir que este compuesto presenta una sensibilidad y especificidad de aproximadamente 62 y 80%, respectivamente, siendo más útil para la detección del CP avanzado recurrente. Sin embargo, en base a otro estudio se determinó que la intensidad de la absorción del [¹¹C]acetato en el tejido tumoral está relacionado con el valor de PSA en sangre. La tasa de detección es del 59% para valores de PSA > 3 ng/mL, decayendo bruscamente a 4% para valores de PSA < 3ng/mL. Además se ha visto que este compuesto no es un marcador específico de cáncer, sino que también tiende a acumularse en el tejido prostático normal e hiperplásico. Estos resultados justifican el hecho de que el [¹¹C]acetato no haya sido tan ampliamente utilizado en la práctica clínica para el diagnóstico del CP, en comparación con los radiofármacos de colina [8,23].

La [¹¹C]COL ha sido el radiofármaco más utilizado, estos últimos años, como referencia para la detección y evaluación del CP en la clínica. Este compuesto presenta alta afinidad por los tejidos neoplásicos debido a que actúa como sustrato en la biosíntesis de la fosfatidilcolina, principal fosfolípido de las membranas celulares. La absorción de la [¹¹C]COL está mediada por un transportador específico que se encuentra en mayor proporción en las células tumorales. Además, su captación está aumentada en estas células por la sobreexpresión de la enzima colina quinasa, de la cual la colina es sustrato. El estudio PET con [¹¹C]COL no está recomendado para la detección primaria de un CP, ni para su estadificación inicial, debido a su limitada sensibilidad y especificidad. En pacientes con valores de PSA bajos o cinéticas lentas de dicho parámetro, la sensibilidad del radiofármaco es limitada. Debido a ello, en algunos casos la [¹¹C]COL no tiene la capacidad de diferenciar entre un CP primario y una hiperplasia benigna de próstata o una prostatitis crónica [15,24]. La aplicación clínica de [¹¹C]COL se centra en la re-estadificación del CP en aquellos pacientes que sufren recaída bioquímica, definida en base a la presencia de valores elevados de PSA, luego de un tratamiento radical. Este interés alcanza relevancia clínica cuando los métodos de diagnóstico por imagen convencionales son negativos o no concluyentes en la localización de la recaída. La ausencia de tejido prostático permite detectar mejor las recurrencias locales y las metástasis. Sin embargo, la tasa de detección de la [¹¹C]COL depende de los niveles de PSA, mostrando cifras de 44% cuando el valor de PSA < 1 ng/mL y de 89% con valores

de PSA > 5 ng/mL. Esto podría explicar la relativamente alta tasa de resultados falsos negativos que presenta cuando se realiza el estudio con valores bajos de PSA. En resumen, este marcador no es aplicable en pacientes que presentan un valor absoluto de PSA < 1 ng/mL [23-25].

Por otro lado, al realizarse estudios con [¹¹C]COL a menudo surgen problemas en la interpretación de las imágenes. Esto se puede deber al metabolismo oxidativo indeseado que sufre la [¹¹C]COL en el organismo, que produce metabolitos radioactivos. Estos metabolitos no responden al mismo proceso de distribución ni de captación que el radiotrazador original y por ende pueden generar actividad de fondo que interfiere en las imágenes [26].

El PSMA es una proteína transmembrana presente principalmente en los tejidos prostáticos. La expresión de esta proteína está aumentada en una variedad de tumores malignos, pero su concentración es más elevada en el CP. Casi todos los adenocarcinomas de la próstata muestran sobreexpresión de PSMA en la mayoría de las lesiones, tanto primarias como metastásicas. En los últimos años, diferentes grupos han reportado resultados prometedores con respecto a la aplicación clínica del PET/CT empleando ligandos del PSMA marcados con ⁶⁸Ga y ¹⁸F. En la mayoría de los trabajos, se evaluó el uso de [⁶⁸Ga]PSMA para la localización del CP en recaída bioquímica. En este caso, se pudo concluir que el uso de este radiofármaco está recomendado especialmente en pacientes que presentan valores bajos de PSA entre 0.2 y 10 ng/mL para identificar el sitio de recurrencia y potencialmente guiar la terapia. Se observaron sensibilidades más altas en pacientes con cinéticas lentas de PSA. A partir de estos resultados se puede deducir que el [⁶⁸Ga]PSMA presenta propiedades más favorables que [¹¹C]COL para la evaluación de pacientes con CP recurrente y bajos valores de PSA [15,27-28].

En resumen, se siguen realizando múltiples investigaciones con el fin de contar con nuevos trazadores PET que aporten al diagnóstico del CP, que permitan mejorar la sensibilidad y especificidad de detección tanto para estadios primarios de la enfermedad como para el cáncer recurrente.

1.4. Rol de la S-adenosil metionina (SAM o AdoMet) en el CP

La sarcosina (*N*-metilglicina) es un derivado de aminoácido que actúa como intermediario y subproducto en la síntesis y degradación de la glicina. Las enzimas involucradas en estos procesos son la sarcosina deshidrogenasa que metaboliza la sarcosina produciendo

glicina, y la glicina *N*-metiltransferasa (GNMT) que genera sarcosina a partir de la glicina (figura 3).

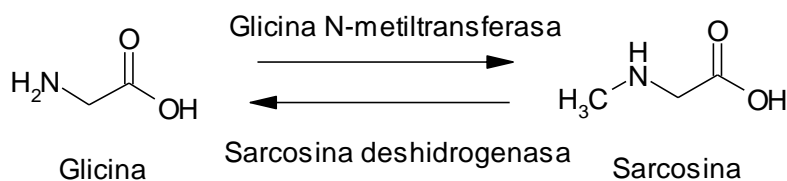


Figura 3. Transformación enzimática reversible de glicina a sarcosina.

Este metabolito además, está involucrado en el metabolismo de la colina. Naturalmente se encuentra en los músculos y otros tejidos del cuerpo. La sarcosina se forma a partir de la ingesta de colina y del metabolismo de la metionina, y se degrada rápidamente a glicina. Esta última, además de desempeñar un papel muy importante como componente de las proteínas, se encuentra involucrada en diversos procesos fisiológicos como principal fuente metabólica de componentes celulares como lo son el glutatión, la creatina, las purinas y la serina. La concentración de sarcosina en el suero sanguíneo de sujetos normales se encuentra a niveles micromolares, mientras que en orina no es detectada [29-30].

A partir de un estudio que evaluó el perfil de más de 1126 metabolitos en muestras clínicas de tejido, orina y plasma de pacientes con CP, se pudo identificar a la sarcosina como un metabolito diferencial que se ve ampliamente incrementado durante la progresión del CP a metástasis. En el caso de pacientes con enfermedad confinada a la glándula, este metabolito pudo ser detectado mediante un procedimiento no invasivo en orina.

Este trabajo a su vez, permitió demostrar que los niveles de sarcosina se encontraban aumentados en líneas celulares de CP humano invasivo, en relación a células epiteliales prostáticas benignas. Además, se vio que la disminución de la enzima GNMT en las líneas celulares de CP resultaba en una reducción significativa de la invasión del cáncer, con la disminución concomitante de los niveles intracelulares de sarcosina. Por otro lado, se estudió el efecto del aumento de los niveles de sarcosina en un medio de células epiteliales prostáticas benignas. Para ello se realizaron dos ensayos, en uno se adicionó sarcosina exógena al medio mencionado y en el otro se inhibió la sarcosina deshidrogenasa. Como resultado, se pudo demostrar que al incrementar los niveles de sarcosina en las células estudiadas se inducía un fenotipo invasivo. En base a esto, la sarcosina y sus enzimas

reguladoras parecen tener un rol importante como intermediarios metabólicos en la invasión y agresividad de las células cancerígenas de CP [31].

Por otro lado, estudios reportados demostraron que la GNMT se encontraba expresada en mayor proporción en varias líneas celulares de CP (PC3, LNCaP), en comparación con células epiteliales prostáticas normales. Este grupo además evaluó el efecto de inhibir la expresión de la GNMT en cultivos de CP y se obtuvo como resultado una inhibición en la proliferación celular e inducción de la apoptosis en dichos cultivos. Por otra parte, se realizaron estudios clínicos que permitieron determinar que la expresión de GNMT citoplasmática se correlaciona con un mayor grado de agresividad tumoral (dado por mayores valores de Gleason y de T). Los pacientes que presentaron mayor expresión citoplasmática de la enzima, mostraron tasas de supervivencia significativamente menores que los pacientes con baja expresión. Esto justifica la hipótesis de que el incremento de los niveles de sarcosina en determinados estadios del CP está relacionado de forma directa con la sobreexpresión de la GNMT [32].

Varios trabajos evaluaron los niveles de esta enzima en diferentes procesos neoplásicos y demostraron que esta enzima está implicada en los mismos. Por ejemplo, se estudió la expresión de la GNMT en tejidos de carcinoma hepatocelular humano y se encontró que el nivel de expresión estaba disminuido, al igual que en líneas celulares de esta patología [33]. Por otro lado, se determinaron los niveles intracelulares de GNMT en muestras de tejido de cáncer de mama y se obtuvieron valores significativamente mayores en relación a los generados para tejidos mamarios normales. Además, se evaluó la GNMT en tumores benignos (displasias proliferativas y fibroadenomas) y los valores se encontraron dentro del rango normal [34].

En resumen, dado el rol de la GNMT y de la sarcosina en la progresión y agresividad del CP, la identificación de potenciales ligandos de la GNMT así como de intermediarios metabólicos relacionados con la sarcosina para su posterior marcación con radionucleidos PET, constituiría una nueva herramienta para el diagnóstico de esta patología por imagenología molecular PET. Asimismo, estas observaciones abren el camino para el futuro desarrollo de fármacos anticancerígenos basados en la capacidad de antagonizar la GNMT.

En este sentido la SAM ha sido identificada como ligando natural de la GNMT. La misma actúa como sustrato de la enzima interviniendo en la transferencia del grupo metilo,

reacción de *N*-metilación catalizada por la misma. Esta molécula posee en su estructura un grupo metilo, unido a un átomo de azufre, que es químicamente reactivo (figura 4) lo que permite su donación hacia el grupo amino de la glicina, generando de esta manera, la sarcosina. Por lo tanto, teniendo en consideración tanto la relación natural existente entre la SAM y la GNMT así como el rol de esta enzima en el CP, se plantea marcar este metabolito con ^{11}C . Esto permitiría contar con un nuevo radiotrazador que aporte al diagnóstico y la estadificación del CP por imagenología molecular, en particular en estadios agresivos de la enfermedad.

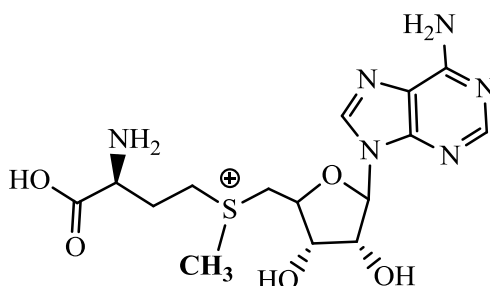


Figura 4. Estructura química de SAM

Cabe destacar que la SAM es un cofactor natural involucrado en una gran variedad de procesos bioquímicos, incluidas las reacciones de transmetilación [35-36]. Es el principal donador biológico de grupos metilo, por lo que *in vivo* interacciona con una gran diversidad de enzimas [37]. En el organismo, estos grupos metilo pueden transferirse a proteínas, lípidos, ADN, ARN y metabolitos de bajo peso molecular [38-39]. Debido a ello, la SAM marcada con ^{11}C podría ser útil además para evaluar la actividad de transmetilación en diferentes procesos tumorales, aún en aquellos en los cuales no esté involucrada la GNMT.

1.5. Objetivos

El presente trabajo tiene por objetivo el desarrollo químico y caracterización fisicoquímica y biológica de nuevos radiofármacos PET que contribuyan al diagnóstico del cáncer de próstata, así como a la evaluación de la agresividad y la progresión del mismo por imagenología molecular, tomando como patrón de referencia el radiofármaco [^{11}C]COL.

Para alcanzar el objetivo general propuesto se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Síntesis de SAM

Síntesis de SAM a partir de *S*-adenosil homocisteína (SAH) con la finalidad de estudiar la reactividad química del par SAH-SAM y así poder determinar las mejores condiciones para la síntesis de [¹¹C]SAM.

- Estrategias de marcación de las moléculas seleccionadas con radionucleidos emisores de positrones - Síntesis de [¹¹C]SAM

Optimización de la síntesis y el control de calidad de [¹¹C]SAM mediante reacciones de marcación de *N*-metilación con ¹¹C. Este tipo de marcaciones implican la adición del radionucleido a la molécula de interés mediante reacciones de metilación usando [¹¹C]CH₃I o [¹¹C]CH₃OTf como agentes metilantes.

- Evaluación de otros intermediarios metabólicos como potenciales moléculas de interés.

Predecir mediante métodos *in silico* el modo y la afinidad de unión entre la enzima GNMT y compuestos derivados de la SAM, para evaluar su utilidad como potenciales agentes diagnósticos de CP.

- Evaluación fisicoquímica y biológica mediante estudios *in vitro* e *in vivo*

Evaluación fisicoquímica del nuevo radiotrazador ([¹¹C]SAM), incluyendo: estudio de estabilidad en formulación final y en plasma, determinación de la lipofilidad y del porcentaje de unión a proteínas plasmáticas.

La evaluación *in vitro* del compuesto comprende ensayos de unión e internalización celular en cultivos de CP humano.

La caracterización biológica *ex vivo* e *in vivo* involucra estudios en ratones sanos y en un modelo murino de tumor xenográfico de CP. Estos estudios incluyen: biodistribuciones con las que se evalúa la cinética de distribución biológica, las vías de eliminación y la captación por órgano, e imagenología molecular PET/CT para estudiar la distribución del compuesto en el organismo y la captación tumoral.

Las marcaciones con ^{11}C presentan una gran ventaja debido a que el carbono es uno de los principales constituyentes en la mayoría de las moléculas de importancia biológica. Esto permite el marcado isotópico que da como resultado un radiotrazador que presenta la misma estructura química que la molécula no marcada. Esto es muy favorable ya que, si al introducir el radionucleido PET al compuesto de interés se modifica su estructura, pueden verse modificadas sus propiedades biológicas así como su afinidad por el blanco molecular.

La producción de ^{11}C se da a nivel del ciclotrón mediante la reacción nuclear $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$. La misma consiste en el bombardeo de $^{14}\text{N}_2$ (g) 99% (impurificado con $^{16}\text{O}_2$) con protones, que resulta en la obtención del radionucleido ^{11}C bajo la especie química $^{11}\text{CO}_2$ y la emisión de una partícula alfa.

Dentro de las estrategias de marcación disponibles para la obtención de radiofármacos PET con ^{11}C , se cuenta con reacciones de metilación, para las cuales se utiliza $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ como agentes metilantes. Estas reacciones constituyen el método más ampliamente utilizado para la introducción de ^{11}C en las moléculas de interés. Existen dos métodos para la obtención del $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$, método por vía "húmeda" o método "en fase gaseosa" (figura 6). El primero se basa en la reducción del $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ a $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH}$ por LiAlH_4 , seguido del tratamiento con HI . 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 con níquel. Luego, el $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ producido es convertido en $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ al entrar en contacto con I_2 (g). El $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ generado por cualquiera de los dos métodos puede actuar directamente como agente metilante o puede ser convertido en $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ mediante la reacción con AgOTf .

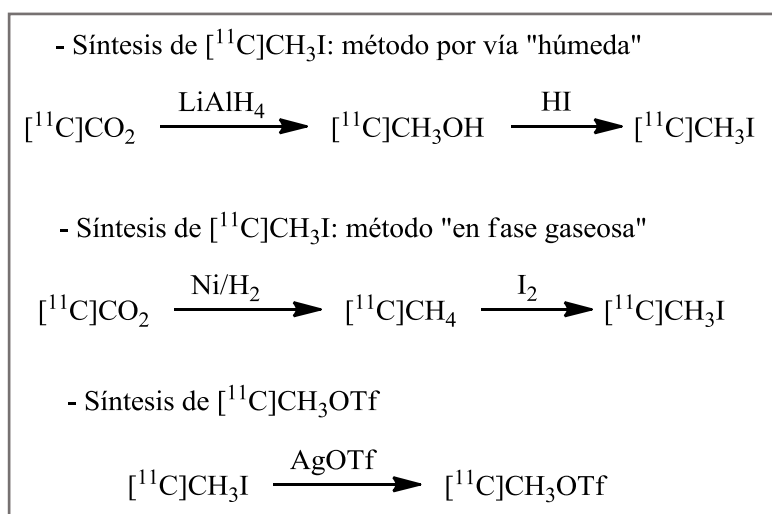


Figura 6. Preparación de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ y $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$.

El uso de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ en las reacciones de metilación presenta varias ventajas en relación al $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$, debido a que el primero es mucho más reactivo. Esto genera que las metilaciones se puedan realizar usando temperaturas de reacción más bajas, cantidades más pequeñas de precursor y tiempos de reacción más cortos, obteniéndose mayores rendimientos. Además, el $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ es menos volátil que el $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ por lo tanto es más fácilmente atrapado en pequeños volúmenes de disolvente. Sin embargo, la alta reactividad de este agente puede dar lugar a la formación de otras impurezas radiactivas.

Cabe destacar que el CO_2 , gas presente en el aire, puede competir con el $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ durante los procesos mencionados, disminuyendo las actividades específicas alcanzadas. Por lo tanto, se deben tomar precauciones para eliminar el aire de los módulos de síntesis y de las soluciones empleadas. Por otro lado, al trabajar con $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ es importante eliminar la humedad del medio de reacción para evitar la hidrólisis, que da como resultado la formación de la impureza $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH}$ reduciendo los rendimientos de síntesis.

Una gran cantidad de radiofármacos han sido obtenidos mediante reacciones de *N*-, *O*- y *S*-metilación por contener grupos nucleofílicos en su estructura. Estas reacciones pueden llevarse a cabo en solución o en fase sólida. Cuando las metilaciones se llevan a cabo en solución, generalmente se emplean disolventes orgánicos apróticos polares como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), acetona y acetonitrilo, para atrapar el agente metilante gaseoso. En algunos casos, es necesario una base para desprotonar el precursor y favorecer la reacción de marcación. Las bases más comúnmente utilizadas son K_2CO_3 , NaOH y NaH . En general, el precursor se disuelve en el disolvente seleccionado, en presencia o no de una base y el agente metilante es burbujeado a través de la solución. En el caso de las metilaciones en fase sólida, el precursor se encuentra absorbido sobre un soporte sólido, como puede ser el loop de inyección del cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC) o un cartucho de extracción en fase sólida (SPE) y el agente metilante es transferido a través de dicho soporte donde ocurre la reacción. Este método posee varias ventajas ya que es un proceso simple, rápido y no genera pérdida significativa de la radioactividad. Las reacciones en fase sólida usualmente utilizan cartuchos SPE descartables los cuales son cargados con una solución que contiene el precursor deseado y si es necesario una base [16,40].

Como se mencionó previamente, para llevar a cabo los métodos sintéticos de forma rápida y evitar altas dosis de irradiación del personal, las reacciones de marcación se realizan en módulos de síntesis automatizados. Para el caso de las marcaciones con ^{11}C se puede

utilizar el módulo TRACERlab® FX C Pro, el cual presenta la posibilidad de funcionar de forma automatizada con programas preestablecidos para cada proceso (figura 7). A su vez, dicho módulo puede ser comandado por el operador a través de una computadora conectada al mismo [41].

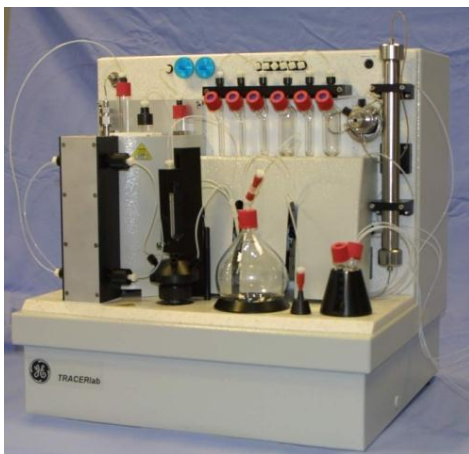


Figura 7. Módulo de síntesis TRACERlab® FX C Pro.

El módulo de síntesis TRACERlab® FX C Pro está constituido por un hardware que consiste en la unidad de síntesis y una computadora asociada a ella, además de un software que está diseñado para operar dicha unidad de síntesis en los dos modos mencionados: automático y manual, según sea el caso.

En la figura 8 se puede visualizar un diagrama esquemático del software que controla el módulo de síntesis. En el mismo se indica en que parte física del módulo se dan los procesos que involucran componentes gaseosos y los que involucran componentes líquidos. En la zona gaseosa se llevan a cabo las reacciones descritas anteriormente que permiten obtener el agente metilante, ya sea $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$. La zona líquida comienza a partir del reactor, lugar donde se van a dar las reacciones de metilación en solución. En el caso de las reacciones en fase sólida se realiza un by-pass para evitar el pasaje del agente metilante por el reactor, y lograr que el mismo pase directamente por el soporte que contiene absorbido el precursor. En esta zona se llevan a cabo además, los procesos de purificación y formulación del compuesto radiactivo obtenido. Para los procesos de purificación el módulo incluye un sistema de HPLC semi-preparativo.

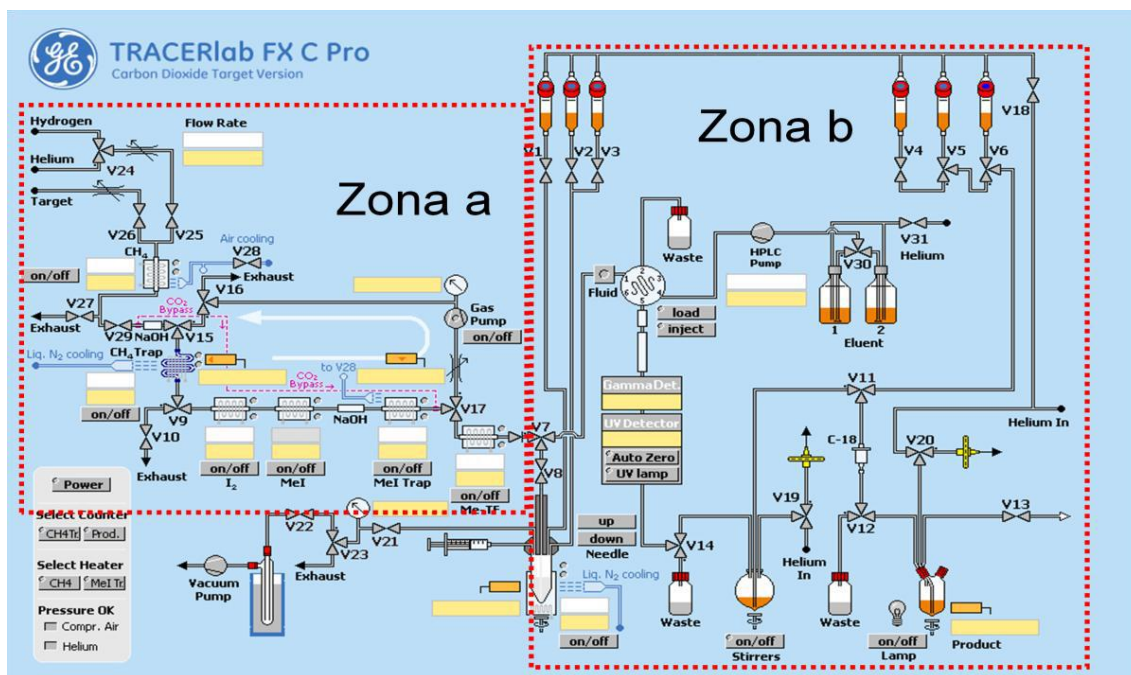


Figura 8. Diagrama esquemático del software que controla y asiste al módulo TRACERlab® FX C Pro. Zona (a). Opera con componentes gaseosos; Zona (b). Opera con componentes líquidos.

Al finalizar cada proceso de síntesis, el módulo TRACERlab® FX C Pro brinda al operador un reporte de síntesis conteniendo los parámetros del proceso de producción incluyendo gráficos, así como los parámetros operativos del módulo. Dicho reporte, a su vez, puede ser visualizado durante el proceso productivo.

El presente trabajo se centró en el desarrollo y la optimización de la síntesis de [¹¹C]SAM. Actualmente, el único método reportado para la obtención de [¹¹C]SAM se basa en un proceso enzimático, que simula la biosíntesis de este compuesto en el organismo. Ishiwata y sus colegas describen dicha síntesis utilizando [¹¹C]metionina ([¹¹C]MET), ATP y extracto de hígado de rata como fuente de la enzima *L*-metionina *S*-adenosil transferasa. Este proceso se desarrolla en dos etapas, la primera consiste en la síntesis de [¹¹C]MET utilizando [¹¹C]CH₃I y *L*-homocisteína tiolactona como precursor. La segunda es el paso enzimático, que implica la incubación de [¹¹C]MET con ATP y el extracto de hígado, seguido de la purificación del producto [42]. Este método presenta varias limitaciones, entre ellas: a) la necesidad de preparar el extracto como fuente de la enzima a partir de hígado de rata; b) dos etapas de síntesis (primero la producción de [¹¹C]MET, para posteriormente realizar la reacción enzimática); c) el tedioso aislamiento del producto que implica diversas técnicas para desnaturar y precipitar las proteínas del extracto, así como la purificación y formulación del producto final [43-44].

Hasta este momento, no se había descrito ningún método directo para la síntesis de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$. En este trabajo, se desarrolló un método químico para el marcado de SAM con ^{11}C , a través de una síntesis en un sólo paso. Este proceso se basó en la *S*-metilación directa de la SAH para obtener el producto deseado. El ^{11}C fue incorporado a la molécula bajo la forma de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3$ a nivel del átomo de S de la estructura de la SAH. Las marcaciones se llevaron a cabo empleando el módulo TRACERlab® FX C Pro descripto. Previamente, con la finalidad de estudiar la reactividad química del par SAH-SAM se evaluaron varias condiciones de metilación de la SAH con CH_3I y CH_3OTf . Estos ensayos fueron una guía para poder determinar las mejores condiciones de la síntesis de $[^{11/12}\text{C}]\text{SAM}$ (figura 9). Además, se optimizaron los procesos necesarios para llevar a cabo el control de calidad fisicoquímico y microbiológico de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$.

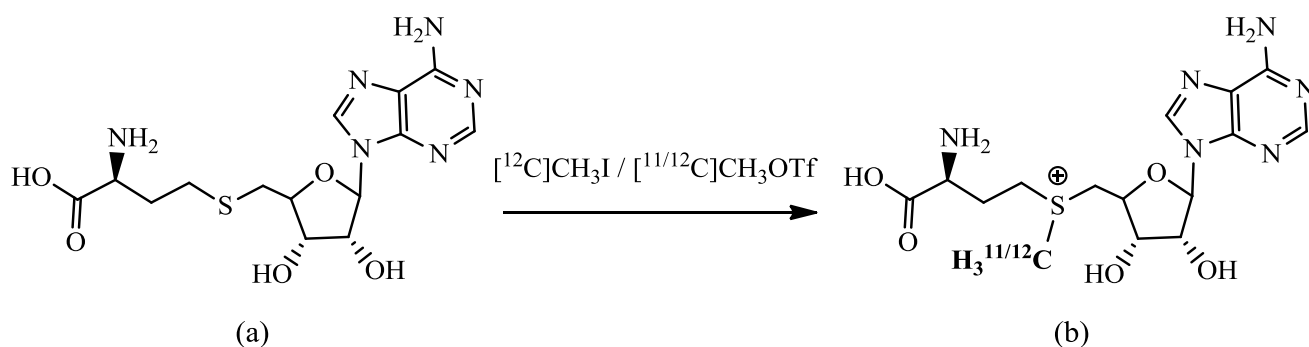


Figura 9. Síntesis y radiosíntesis de $[^{11/12}\text{C}]\text{SAM}$. (a). Precursor SAH; (b). Producto $[^{11/12}\text{C}]\text{SAM}$.

2.2. Parte experimental

2.2.1. Materiales y equipos

Los reactivos y disolventes utilizados fueron de calidad analítica (Merck, Sigma-Aldrich, Carlo Erba, Dorwil) y se usaron sin purificación adicional. El $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ empleado en las reacciones de marcación fue producido en un ciclotrón PET Trace® 16.5 MeV (GE Healthcare). Para dicha producción se utilizó un blanco de alto rendimiento conteniendo una mezcla de N_2 y 1.0% O_2 (Praxair o Airliquide). Las radiosíntesis se desarrollaron en un módulo TRACERlab® FX C Pro (GE Healthcare). El avance de las reacciones y la pureza de los productos se evaluaron por HPLC, empleando un equipo Shimadzu UFLC equipado con detectores de arreglo de diodos y gamma en serie. La columna de HPLC analítica utilizada fue una EC 250/4.6 mm Nucleodur 100-5 C18ec (Macherey-Nagel). Los estándares de SAM y de precursor (SAH) empleados para la síntesis y el control de calidad, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Las columnas de HPLC semi-preparativo

ensayadas en la purificación del producto radiactivo fueron: una VP 250/10 mm Nucleosil 100-5 C18 (Macherey-Nagel), una VP 125/10 mm Nucleodur 5 µm C18 (Macherey-Nagel), una VP 250/16 mm Nucleosil 100-7 C18 (Macherey-Nagel), una 250/10 mm Luna 5 µm C18 (Phenomenex), una 50/3 mm Synergi 4 µm (Phenomenex) y una 100/10 mm SemiPrep RP-18e (Chromolith). Se emplearon cartuchos de extracción en fase sólida Strata XC-SPE (Phenomenex) para la purificación del producto final. Los filtros esterilizantes de 0.22 µm se compraron a Waters. El análisis de etanol y solventes residuales se realizó mediante el uso de un cromatógrafo de gases (GC, Shimadzu GC-2010 Plus) equipado con un detector FID. La columna de GC analítica era una DB-WAX de 30 m de longitud, 0.53 mm de diámetro y con un grosor de película de 1.00 mm (Agilent). Para las determinaciones de actividad se emplearon una cámara de ionización (Capintec® CRC 25R, CRC 25 PET) y un espectrómetro de centelleo sólido con cristal de NaI (TI) de 3 x 3 pulgadas de pozo acoplado a un sistema analizador multicanal ORTEC®. Para la determinación de endotoxinas bacterianas se utilizó el equipo portátil Endosafe-PTS (Charles River Laboratories, inc.)

2.2.2. Métodos

2.2.2.1. Síntesis de SAM

Técnica 1. La síntesis se realizó según las técnicas de preparación de SAM reportadas por Deshpande *et al.* [43] y por Senthilkumar *et al.* [44]. En base a ello, se disolvieron 10 mg de SAH (26 µmol) en 500 µL de ácido trifluoroacético (TFA) con agitación magnética y la solución se enfrió a -10 °C. Una vez alcanzada dicha temperatura se agregaron 4 µL de ácido sulfúrico concentrado (73 µmol), luego 4 µL de yoduro de metilo (64 µmol) y la mezcla de reacción se mantuvo a -10 °C por un período de 2 horas. Posteriormente, se adicionaron otros 4 µL de yoduro de metilo (64 µmol) y se comenzó a elevar la temperatura de reacción hasta alcanzar temperatura ambiente. La reacción se dejó con agitación magnética, a temperatura ambiente, hasta el día siguiente. El avance de la reacción se siguió por HPLC analítico empleando las siguientes condiciones: columna analítica C18, buffer acetato de sodio 0.1 M pH 4.5 (A) y acetonitrilo (B) como disolventes, gradiente: 0-7 min: 4.2% B, 7-13 min: de 4.2 a 50% B, 13-20 min: 50% B, un flujo total de 1.5 mL/min y un detector de arreglo de diodos (UV, λ=260 nm), (método 1)[45]. El tiempo de retención del precursor (SAH) fue de 10.7 minutos y el del estándar de SAM de 3.5 minutos.

Técnica 2. La síntesis fue realizada en base a la técnica de obtención de SAM descrita por Matos *et al.* [38]. Para ello, 10 mg de SAH (26 μmol) fueron disueltos en 283 μL de ácido fórmico 99% con agitación magnética. Luego se adicionaron 333 μL de yoduro de metilo (5.4 mmol) a la solución y la mezcla de reacción se dejó agitando a temperatura ambiente, protegida de la luz durante un período de 5 días. El avance de la reacción fue seguido por HPLC analítico utilizando las condiciones descritas en la técnica 1 (método 1).

Técnica 3. La síntesis se basó en la técnica reportada en el artículo citado en la técnica 2 [38]. Para la misma se disolvió 1 mg de SAH (2,6 μmol) en 200 μL de ácido fórmico y se agregaron 200 μL de DMF. Luego se adicionaron 16,2 μL de yoduro de metilo (0,26 mmol) y la mezcla de reacción se incubó a 40 °C por 1 hora, con agitación magnética. Posteriormente, se aumentó la temperatura de reacción a 80 °C y se mantuvo con agitación durante 1 hora. Finalmente la reacción fue sometida a 100 °C por otra hora. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo por el método de HPLC descrito en la técnica 1 (método 1).

Técnica 4. La síntesis se llevó a cabo según la técnica de preparación de análogos de SAM reportada por Stecher *et al.* ⁽⁸⁾. En base a la misma, se disolvieron 2.5 mg de SAH (6.5 μmol) en 500 μL de ácido fórmico 99% con agitación magnética. Luego se adicionaron a la solución 5.2 mg de triflato de plata (AgOTf) (20 μmol) y 24.3 μL de yoduro de metilo (0.4 mmol) con agitación magnética. La reacción se llevó a cabo a dos temperaturas: temperatura ambiente durante 4 horas y 40 °C durante 1 hora. Las reacciones fueron seguidas por HPLC analítico utilizando las condiciones descritas en la técnica 1 (método 1).

Técnica 5. Se disolvieron 2.5 mg de SAH (6.5 μmol) en 500 μL de DMF. Se adicionaron a la solución 6.7 mg de AgOTf (20 μmol) y 16.4 mg de Tris-(pentafluorofenil)-borano (32.5 μmol). Luego se agregaron 200 μL más de DMF con el fin de arrastrar el sólido que quedó en las paredes del balón de reacción. Por último se adicionaron 24.3 μL de yoduro de metilo (0.39 mmol) y la mezcla de reacción se dejó con agitación a temperatura ambiente, protegida de la luz, durante toda la noche. El seguimiento de la reacción se realizó por el método de HPLC descrito en la técnica 1 (método 1).

2.2.2.2. Síntesis de [¹¹C]SAM

Las reacciones de marcación se llevaron a cabo en el módulo automatizado de síntesis TRACERlab® FX C Pro. Los precursores radioactivos secundarios [¹¹C]CH₃I y [¹¹C]CH₃OTf se produjeron de acuerdo al método descrito por Buccino *et al.* [46]. Brevemente, el proceso de síntesis comenzó con la producción de [¹¹C]CO₂ en el ciclotrón mediante la reacción nuclear ¹⁴N(p, α)¹¹C. El [¹¹C]CO₂ producido fue enviado al módulo de síntesis, donde fue atrapado y purificado, para luego ser reducido a [¹¹C]CH₄ mediante hidrogenación catalítica. Posteriormente, el [¹¹C]CH₄ se transformó en [¹¹C]CH₃I al reaccionar con I₂(s) en un circuito de recirculación. El [¹¹C]CH₃I generado puede actuar directamente como agente metilante o puede ser convertido en [¹¹C]CH₃OTf mediante la reacción con AgOTf. El [¹¹C]CH₃I o [¹¹C]CH₃OTf se burbujearon finalmente en el reactor cargado con el disolvente de reacción y el precursor. La disolución del agente metilante en la solución del precursor se llevó a cabo a diferentes temperaturas dependiendo de los puntos de fusión de los disolventes empleados, en este caso de (-10 a 15) °C.

Se llevaron a cabo una serie de síntesis hasta reactor variando las condiciones de marcación del precursor (SAH). Dentro de las pruebas realizadas se utilizaron diferentes cantidades de precursor (1, 3 o 5 mg) y se variaron los disolventes (TFA 400 μL + H₂SO₄ 4 μL, ácido fórmico: DMF (400 μL; 1:1) o ácido fórmico (400 μL)). La solución del precursor se mezcló vigorosamente usando un agitador vortex y la mezcla se cargó en el reactor. A continuación, el agente metilante fue burbujeadado en la solución del precursor. En estas pruebas se ensayaron [¹¹C]CH₃I, [¹¹C]CH₃I con AgOTf (2.5 mg) y [¹¹C]CH₃OTf como agentes metilantes. Luego, la mezcla de reacción se llevó a diferentes temperaturas (40, 60, 80, 100 o 120 °C) variando los tiempos de reacción (1, 5, 10 o 30 minutos). Posteriormente, la mezcla de reacción se enfrió a 40 °C, se diluyó con la fase móvil analítica A (600 μL) y una muestra del crudo de reacción fue analizada por HPLC analítico. Las condiciones de HPLC utilizadas fueron las siguientes: columna analítica C18, buffer acetato de sodio 0.1 M pH 4.5 (A) y acetonitrilo (B) como disolventes, gradiente: 0-7 min: 2% B, 7-13 min: de 2 a 50% B, 13-25 min: 50% B, flujo total de 1.0 mL/min, detectores de arreglo de diodos (UV, λ=260 nm) y centelleo sólido (gamma) en serie, (método 2). El tiempo de retención del precursor (SAH) fue de 14.4 minutos y el del producto ([¹¹C]SAM) de 5.4 minutos.

Además, se realizaron una serie de blancos de reacción hasta reactor. Para los mismos se empleó [¹¹C]CH₃I y [¹¹C]CH₃OTf como agentes metilantes y se varió el disolvente (ácido

fórmico: DMF (400 μ L; 1:1), ácido fórmico (400 μ L) y DMF: NaOH 3 M (400 μ L; 1:1). La reacción se desarrolló a diferentes temperaturas (60 o 80 °C) durante 1, 5 o 10 minutos. Las reacciones fueron controladas por HPLC analítico utilizando las condiciones previamente descritas (método 2).

Una vez obtenido el producto de interés ($[^{11}\text{C}]\text{SAM}$) con una pureza radioquímica adecuada, el crudo proveniente del reactor fue purificado por HPLC semi-preparativo. Luego de la marcación, la mezcla de reacción se enfrió a 40°C, se diluyó por la adición de fase móvil del HPLC semi-preparativo (1 mL), y posteriormente se transfirió al loop de inyección de 5 mL. La inyección del crudo de reacción al sistema de HPLC semi-preparativo se controló mediante un detector de fluido automático.

Para determinar las condiciones óptimas de HPLC semi-preparativo se ensayaron diferentes sistemas variando las condiciones de columna, fase móvil y flujo total. Para determinar el tiempo de retención de SAM se empleó un estándar del compuesto en frío. Detección: UV ($\lambda=254$ nm).

Optimizadas las condiciones de HPLC semi-preparativo se procedió con la etapa de purificación de la síntesis. La fracción conteniendo $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ fue recogida y diluida en 40 mL de agua para inyección. La solución resultante se purificó mediante columna Strata XC-SPE de extracción en fase sólida (pre-activada con 1 mL de etanol absoluto seguido de 1 mL de buffer acetato de sodio 0.1 M pH 4.5). Previo a la elución la columna se lavó con 3 mL de agua para inyección. El producto de interés atrapado fue eluido con 4 mL de una solución de Na_2HPO_4 0.1 M pH 8.5: EtOH (9:1). Para la formulación se emplearon 6 mL de NaCl 0.9% y la solución final fue transferida a un vial estéril a través de una membrana esterilizante de 0.22 μm . El volumen total de la solución del radiofármaco fue de 10 mL.

2.2.2.3. Control de calidad de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$

El aspecto de la solución final fue chequeado por inspección visual y el pH determinado usando un pH-metro previamente calibrado. Los solventes residuales (acetona, etanol y acetonitrilo) fueron analizados por GC de acuerdo a lo establecido en la USP, Capítulo General <467> [47]. Las purezas química y radioquímica de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ fueron determinadas mediante HPLC analítico. Se emplearon las siguientes condiciones: columna analítica C18, buffer acetato de amonio 50 mM pH 5.4 con 1% TFA (A) y acetonitrilo (B) como disolventes, gradiente: 0-15 min: 0% B, 15-20 min: de 0 a 100% B,

20-25 min: 100% B, un flujo total de 2.0 mL/min y detectores UV (arreglo de diodos, $\lambda=260$ nm) y gamma (centelleo sólido) en serie (método 3) [48]. El tiempo de retención del precursor (SAH) fue de 17.4 minutos. El tiempo de retención de cada uno de los isómeros de [^{11}C]SAM fue: [^{11}C](S,S)-SAM 10.8 minutos y [^{11}C](R,S)-SAM 11.8 minutos. La pureza radioquímica fue calculada considerando el porcentaje de área bajo la curva de los dos isómeros de [^{11}C]SAM en relación a la actividad total. La identidad radioquímica fue determinada por comparación de los tiempos de retención del producto marcado con el del correspondiente estándar de referencia (en frío). La actividad específica fue determinada considerando la actividad correspondiente al isómero [^{11}C](S,S)-SAM al término de la síntesis y la masa de dicho compuesto en frío. La pureza radionucleídica fue determinada en base al espectro gamma de la muestra y la identidad radionucleídica por medida del período de semidesintegración. La esterilidad y concentración de endotoxinas bacterianas se determinaron de acuerdo a lo establecido en los Capítulos Generales <71> [49] y <85> [50] de la USP, respectivamente. El test de endotoxinas bacterianas se realizó mediante el ensayo de Lisado de Amebocitos del Limulus (test de LAL) [51].

2.3. Resultados y discusión

2.3.1. Síntesis de SAM

Con el fin de estudiar la reactividad química del par SAH-SAM y así poder determinar las mejores condiciones para la síntesis de SAM “en frío”, se llevaron a cabo diferentes reacciones de metilación variando las condiciones de síntesis (figura 9).

Como metodología de seguimiento de las reacciones se seleccionó el HPLC con detección UV y gamma de los productos (HPLC acoplado a detectores de arreglo de diodos y centelleo sólido en serie). En base a esto, en una primera instancia se puso a punto un sistema de HPLC analítico que permitiera la detección y cuantificación del estándar de SAM, así como la de su precursor (SAH), de modo de poder evaluar la identidad y pureza química del compuesto una vez sintetizado.

Durante este proceso se llevaron a cabo varios análisis de los estándares mencionados en el HPLC analítico, variando en cada uno de ellos un parámetro, hasta encontrar las condiciones más adecuadas para caracterizar los tiempos de retención de los diferentes productos, lograr resolución adecuada de los compuestos y obtener picos simétricos. Los parámetros ensayados fueron los siguientes: relación porcentual de los componentes de

la fase móvil, flujo de la fase móvil, volumen de inyección, concentración de los estándares y longitud de onda del detector UV-VIS.

Finalmente, se obtuvo un sistema adecuado para la determinación de la pureza e identidad química y radioquímica de los compuestos en estudio, constituido por las condiciones descritas en el método 1 de la parte experimental.

Establecido el sistema de HPLC analítico, se procedió con la evaluación y selección de las mejores condiciones para la reacción de metilación “en frío”. En base a bibliografía consultada, se pudo concluir que era necesario desarrollar la reacción de metilación en un medio ácido, en el cual los grupos amino e hidroxilo reactivos de la SAH se encontraran protonados. De esta forma no quedaban disponibles para competir con el azufre en la reacción de metilación y se evitaba la formación de productos secundarios no deseados [43]. Por lo que, considerando esto último, se realizaron una serie de síntesis variando las condiciones de: agente metilante, disolvente, cantidad de precursor, temperatura y tiempo de reacción, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Resumen de condiciones de reacción y pureza del producto para la síntesis de SAM.

| Agente metilante (Eq) | Disolvente | Masa de precursor (mg) | T (°C) | Tiempo de reacción (h) | Pureza de SAM (%) ^[a] | Entrada |
|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------|--------|------------------------|----------------------------------|------------------------|
| CH ₃ I (2 Eq) | TFA/H ₂ SO ₄ | 10 | -10 | 2 | 0 | 1 |
| CH ₃ I (4 Eq) | TFA/H ₂ SO ₄ | 10 | T amb | 24 | 0 | 2 |
| CH ₃ I (ex) | Ácido fórmico | 10 | T amb | 120 | 39.9 | 3 |
| CH ₃ I (ex) | Ácido fórmico/DMF | 1 | 40 | 1 | 0 | 4 |
| CH ₃ I (ex) | Ácido fórmico/DMF | 1 | 80 | 1 | 0 | 5 |
| CH ₃ I (ex) | Ácido fórmico/DMF | 1 | 100 | 1 | 0 | 6 |
| CH ₃ I/AgOTf (ex/3 Eq) | Ácido fórmico | 2.5 | T amb | 4 | 91.4 | 7 |
| CH ₃ I/AgOTf (ex/3 Eq) | Ácido fórmico | 2.5 | 40 | 1 | 84.9 | 8 |
| CH ₃ I/AgOTf (ex/3 Eq) | DMF | 2.5 | T amb | 2 | 6.4 | 9^[b] |

^[a] La pureza de SAM fue determinada por HPLC analítico empleando las condiciones del método 1 descritas en la parte experimental. ^[b] Con adición de tris-(pentafluorofenil)-borano (5 Eq).

En primera instancia, se ensayó la metilación de la SAH con CH₃I bajo condiciones ácidas generadas por TFA (utilizado como disolvente de la reacción), y H₂SO₄ concentrado, siguiendo la técnica 1 descrita en la parte experimental (tabla 1, entradas 1-2). En un inicio, la mezcla de reacción se mantuvo a -10 °C por 2 h (tabla 1, entrada 1). Luego, al

no verificarse avance de la misma por HPLC, se agregó más agente metilante a la mezcla de reacción y se fue aumentando gradualmente la temperatura hasta alcanzar temperatura ambiente (tabla 1, entrada 2). Al controlar finalmente la reacción no se observó formación del producto deseado SAM, sino que se dio la formación de otro compuesto que presenta un tiempo de retención diferente al del estándar de SAM. En resumen, las condiciones empleadas en la técnica 1 no permitieron obtener el compuesto esperado.

Posteriormente, se probó la metilación de la SAH con CH_3I como agente metilante bajo condiciones ácidas generadas por ácido fórmico, que se utilizó como disolvente. Las condiciones utilizadas se describen en la técnica 2 de la parte experimental (tabla 1, entrada 3). Al agregar el CH_3I a la solución de SAH en ácido fórmico se formaron dos fases líquidas debido a que el ácido y el CH_3I no son miscibles, por ello, la reacción se llevó a cabo con agitación vigorosa que asegurara el contacto entre las fases. De esta forma se mantuvo la reacción a temperatura ambiente, durante un período de 5 días. Al controlar el avance de la misma por HPLC se observó la formación del producto deseado, a través de un pico con igual tiempo de retención que el asignado al estándar de SAM. Sin embargo, en el cromatograma se presentaron además, una serie de picos no esperados con diversos tiempos de retención, (pureza de SAM 39.9%). Esto dio la pauta de que el compuesto de interés se obtuvo de forma impura, en conjunto con otras impurezas.

Esto último, si bien no es lo ideal, no constituiría un impedimento a la hora de la metilación “en caliente”, ya que el módulo utilizado para la síntesis cuenta con un sistema de HPLC semi-preparativo que permite el aislamiento del compuesto de interés. Sin embargo, se continuó con la optimización de la reacción de metilación de la SAH “en frío”, con el fin de aumentar la pureza de SAM, acercarnos a las condiciones que normalmente se emplean en las marcaciones con ^{11}C y disminuir el tiempo de reacción, condición limitante al trabajar con radionucleidos PET de corto período de semidesintegración.

En base a lo anterior, se continuó probando condiciones más similares a las comúnmente utilizadas en las reacciones de metilación con ^{11}C . En estos casos, es habitual emplear menor cantidad de precursor, así como disolventes orgánicos apróticos polares (tales como DMSO, DMF, acetonitrilo) para atrapar el agente metilante gaseoso [16,40]. Por lo tanto, la cantidad de precursor se redujo a 1 mg y se incorporó DMF a la mezcla de disolventes. En este caso, se utilizó CH_3I como agente metilante y se fue aumentando gradualmente la temperatura desde 40 hasta 100 °C, siguiendo la técnica 3 de la parte

experimental (tabla 1, entradas 4-6). Inicialmente, la mezcla de reacción se mantuvo a 40 °C, temperatura en la cual no se logró obtener el producto de interés (tabla 1, entrada 4). Al no verificarse avance de la reacción, se fue aumentando la temperatura hasta alcanzar 100 °C (tabla 1, entradas 5-6). En este caso, al ir subiendo la temperatura no se observó formación significativa del producto deseado, sino que se dio la formación de otras impurezas. Por lo anterior, las condiciones empleadas no permitieron obtener el compuesto de interés.

Continuando con los ensayos, se probó la metilación de la SAH utilizando CH₃OTf como agente metilante. El uso de este agente presenta ventajas en relación al CH₃I debido a su mayor reactividad. Generalmente, las reacciones de metilación con CH₃OTf dan rendimientos más altos usando tiempos de reacción más cortos o temperaturas de reacción más bajas [16,40]. La formación del CH₃OTf se dio “*in situ*” en el balón de reacción por el agregado conjunto de CH₃I y AgOTf. Dicha reacción se ensayó en ácido fórmico a temperatura ambiente y en paralelo a 40 °C, siguiendo la técnica 4 descrita en la parte experimental (tabla 1, entradas 7-8). La reacción se llevó a cabo a dos temperaturas distintas, en dos balones diferentes, los cuales contenían la misma mezcla de reacción. Al controlar el avance de la reacción que se desarrolló a temperatura ambiente, se fue observando la formación del producto de interés SAM. Al cabo de 4 horas la reacción se había desarrollado de forma completa, obteniéndose SAM con una pureza de 91.4%, sin la presencia significativa de impurezas (tabla 1, entrada 7). Esto se puede observar en la figura 10b. Por otro lado, la reacción que se desarrolló a 40 °C se mantuvo a dicha temperatura durante 1 hora. Una vez finalizado el calentamiento se controló el avance de la reacción, observándose que la misma se había dado de forma completa ya que no se observaba producto de partida y se había dado la formación del producto SAM con una pureza de 84.9% (tabla 1, entrada 8) (figura 10c). En base a estos últimos resultados, se puede afirmar que con estas condiciones se pudo obtener el producto de interés (SAM) con una pureza adecuada y a un tiempo de reacción más corto que con las técnicas anteriores.

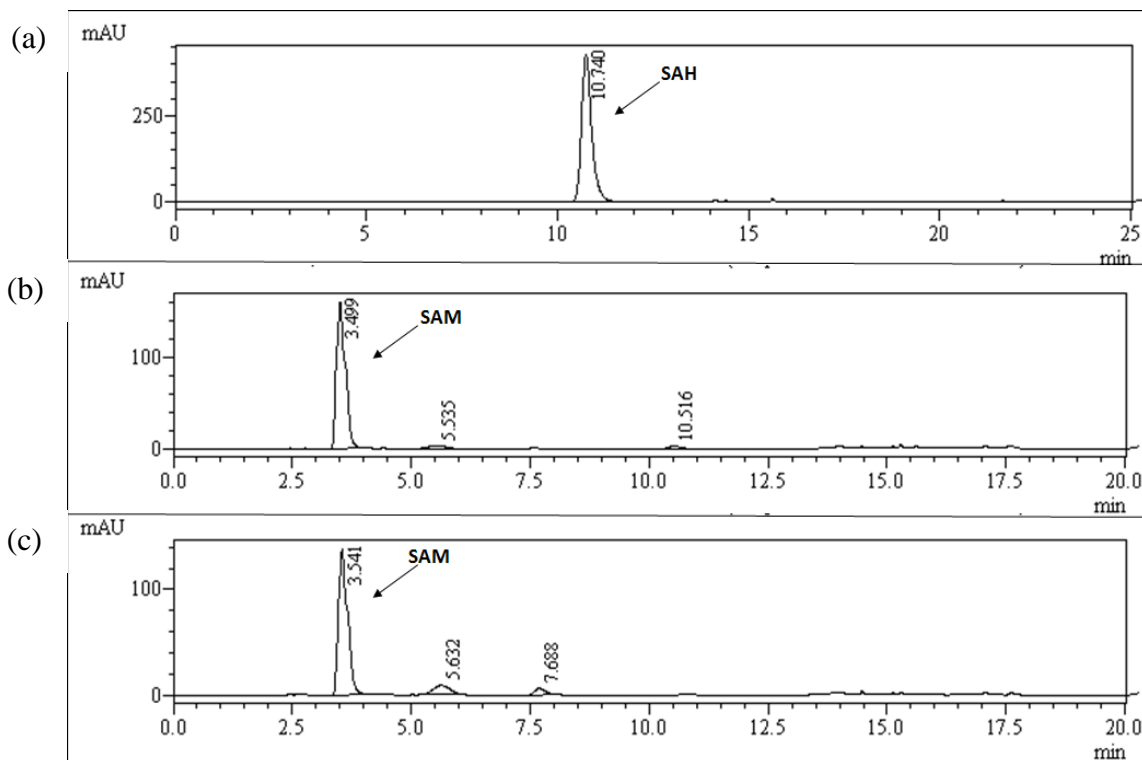


Figura 10. Cromatograma HPLC analítico (UV): (a). mezcla de reacción a tiempo inicial; (b). mezcla de reacción luego de 4 horas a temperatura ambiente; (c). mezcla de reacción luego de 1 hora a 40 °C.

Finalmente, se evaluó la posibilidad de utilizar un ácido de Lewis con el fin de bloquear los posibles grupos reactivos de la SAH que pudieran competir en la reacción. Para ello, se ensayó la marcación en presencia de tris-(pentafluorofenil)-borano, utilizando CH_3OTf generado “*in situ*” como agente metilante y DMF como disolvente (técnica 5), (tabla 1, entrada 9). Inicialmente no se dio disolución completa de los sólidos en DMF, por lo que la reacción se llevó a cabo bajo forma de suspensión, a temperatura ambiente. Al cortar la reacción, se controló el avance de la misma y se observó la formación del producto deseado SAM con una pureza del 6.4%, junto con una serie de impurezas con diversos tiempos de retención. Esto da la pauta de que el compuesto de interés se obtuvo de forma impura.

En resumen, aun cuando las condiciones de metilación empleadas “en frío” son diferentes que las normalmente utilizadas “en caliente”, los ensayos descriptos permitieron generar conocimiento útil en cuanto a la reactividad del par SAH-SAM. Esto sirvió como guía para la etapa posterior de marcación.

2.3.2. Síntesis de [^{11}C]SAM

Luego de las pruebas “en frío”, se procedió a evaluar las diferentes condiciones a ensayar en el proceso de metilación “en caliente” (marcación), a fin de obtener el radiotrazador deseado ([^{11}C]SAM). Para ello se plantearon una serie de síntesis hasta reactor, lo cual implica la obtención del producto sin purificar.

La marcación del precursor se lleva a cabo en el módulo automático de síntesis descrito en la parte experimental. En base a esto, hay que tener en cuenta que las condiciones de reacción son muy diferentes a las de la metilación “en frío”. Por ejemplo, en las marcaciones con ^{11}C el precursor desmetilado siempre está presente en exceso molar en comparación con el agente metilante, incluso la relación estequiométrica puede alcanzar un factor de $10^4:1$ [40]. Las condiciones de presión y temperatura alcanzadas en el reactor se pueden controlar de forma más precisa, lo que permite reducir los tiempos de reacción, parámetro crítico al trabajar con radionucleidos de corto período de semidesintegración. Por ello, las mismas condiciones empleadas “en frío” y “en caliente” pueden llevar a resultados diferentes. En base a esto, no se quiso descartar, en principio, ninguna de las condiciones utilizadas “en frío” y las mismas fueron ensayadas en el módulo. A pesar de estas diferencias, cabe destacar que las pruebas de síntesis “en frío” proporcionaron información valiosa sobre el comportamiento químico del par SAH-SAM, que fue útil en la etapa de radiosíntesis.

Con el propósito de optimizar la síntesis de [^{11}C]SAM, se ensayaron diferentes condiciones de marcación. Los parámetros evaluados durante este proceso (agente metilante, disolvente, masa de precursor, temperatura y tiempo de reacción) se resumen en la tabla 2. A continuación, se describen los ensayos realizados.

Tabla 2. Resumen de condiciones de reacción y pureza radioquímica del producto en el crudo de reacción para la síntesis de [¹¹C]SAM.

| Agente metilante | Disolvente (μL) | Masa de precursor (mg) | T (°C) | Tiempo de reacción (min) | Pureza RQ de [¹¹ C]SAM en el crudo de reacción (%) | Entrada | |
|---|---|------------------------|--------|--------------------------|--|---------------------|-----------|
| [¹¹ C]CH ₃ I | TFA + H ₂ SO ₄ (400 μL + 4 μL) | 1 | 60 | 1 | 0 ^[a] | 1 | |
| | Ácido fórmico: DMF (400 μL; 1:1) | 1 | 60 | 5 | 0 ^[a] | 2 | |
| | | | 80 | 5 | | 3 | |
| [¹¹ C]CH ₃ I/ AgOTf (2.5 mg) | Ácido fórmico (400μL) | 1 | 40 | 5 | 0 ^[a] | 4 | |
| | Ácido fórmico/DMF (400 μL; 1:1) | 1 | 40 | 5 | | 5 | |
| [¹¹ C]CH ₃ OTf | Ácido fórmico/DMF (400 μL; 1:1) | 1 | 60 | 10 | 0 ^[a] | 6 | |
| | | | 80 | 10 | | 7 | |
| | | | 100 | 10 | | 8 | |
| | Ácido fórmico (400 μL) | 1 | 40 | 10 | 9.8 ^[a] | 9 | |
| | | | 60 | 1 | 6.8 ^[a] | 10 | |
| | | | | 10 | 12.5 ^[b] | 11 | |
| | | | | 30 | 11.8 ^[a] | 12 | |
| | | | 80 | 10 | 4.2 ^[a] | 13 | |
| | | | | 30 | 5.4 ^[a] | 14 | |
| | | | 100 | 10 | 2.9 ^[a] | 15 | |
| | | | 120 | 10 | 0.5 ^[a] | 16 | |
| | | | 3 | 60 | 10 | 23.0 ^[a] | 17 |
| | | | 5 | 60 | 10 | 34.3 ^[a] | 18 |
| | 60 | 5 | | 30.7 ^[a] | 19 | | |
| | 60 | 1 | | 31.7 ^[b] | 20 | | |

^[a] (n=1); ^[b] (n=2).

En la primera marcación que se llevó a cabo se utilizó como agente metilante [¹¹C]CH₃I y como disolvente TFA con H₂SO₄. La misma tuvo lugar a 60 °C, durante 1 minuto (tabla 2, entrada 1). Al controlar la reacción por el método de HPLC descripto, se pudo concluir que no se dio formación del producto deseado ([¹¹C]SAM), ya que no se observó ningún pico de igual tiempo de retención que el del estándar en el cromatograma gamma. A su vez, en el cromatograma UV se puede visualizar un pico a tiempo de retención similar al obtenido cuando se realizó la primera metilación “en frío”. En base a esto, se pudo concluir que dicho compuesto no constituye un producto de metilación en una posición

no deseada, ya que si lo fuera debería haberse observado a nivel del cromatograma gamma. En resumen, las condiciones empleadas no permitieron obtener el compuesto esperado.

Continuando con los ensayos, se varió el disolvente empleado para la marcación. Se utilizó una mezcla de ácido fórmico y DMF con el fin de lograr el medio ácido necesario y a su vez, retener adecuadamente el agente metilante gaseoso sobre dicha solución en el reactor. La reacción se llevó a cabo a 60 y 80 °C, durante 5 minutos, utilizando $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ como agente metilante, (tabla 2, entradas 2-3). Al controlar las dos reacciones de marcación se observó un perfil similar, en base al mismo se pudo concluir que no se dio la formación del compuesto marcado de interés, ya que no se observa un pico en el cromatograma gamma a igual tiempo de retención que el del estándar. A su vez, en el UV se observó el pico correspondiente a la SAH que quedó sin reaccionar.

En el cromatograma gamma también se pudo observar un pico a mayor tiempo de retención que el de los estándares, que podía corresponderse con el $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ que quedó sin reaccionar. Para verificar esto, se llevó a cabo un blanco de reacción. El mismo se basa en realizar una marcación utilizando las mismas condiciones de reacción con los mismos reactivos que se emplearon, excepto por el precursor. En este caso, se llevó a cabo un blanco con las condiciones descritas en la entrada 1 de la tabla 3. Al observar el cromatograma gamma obtenido al controlar dicha reacción, se pudo verificar que el pico correspondiente con el $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ presentaba un tiempo de retención de 20.9 minutos.

Tabla 3. Resumen de condiciones de síntesis para los blancos de reacción.

| Agente metilante | Disolvente (μL) | T ($^{\circ}\text{C}$) | Tiempo de reacción (min) | Entrada |
|--|---|----------------------------|--------------------------|----------|
| $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ | Ácido fórmico: DMF (400 μL ; 1:1) | 60 | 1 | 1 |
| $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ | Ácido fórmico: DMF (400 μL ; 1:1) | 60 | 5 | 2 |
| | DMF: NaOH 3M (400 μL ; 1:1) | 80 | 10 | 3 |
| | Ácido fórmico (400 μL) | 60 | 1 | 4 |

Posteriormente, se ensayó la marcación variando el agente metilante. En primera instancia se hicieron pruebas con el $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ generado “*in situ*” en el reactor, por la reacción entre AgOTf y $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ generado en el módulo. Dicha reacción se llevó a cabo en ácido fórmico y en una mezcla de ácido fórmico: DMF, a 40 °C (igual temperatura que la reacción “en frío”), durante 5 minutos. Las condiciones se corresponden con la 4 y 5 de

la tabla 2. Al controlar las reacciones se pudo concluir que no se alcanzaron resultados favorables, debido a que no se dio la formación del compuesto marcado de interés. Esto podría deberse a que la reacción entre el $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ y el AgOTf no se haya dado de forma completa, lo que llevaría a no contar con suficiente $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ en el medio para reaccionar. En base a esto, se decidió seguir trabajando con el $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ gaseoso producido directamente en el módulo.

En este marco, se realizaron una serie de síntesis empleando $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ del módulo como agente metilante y una mezcla de ácido fórmico: DMF como disolvente. Las reacciones se llevaron a cabo a diferentes temperaturas (tabla 2, entradas 6-8). Al realizar los controles de las mismas se obtuvieron perfiles muy similares. En primer lugar, no se logró obtener $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$. Sin embargo, se obtuvieron dos picos radioactivos que podían corresponderse con el $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ que quedó sin reaccionar y con $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH}$, el cual puede formarse como producto secundario por la reacción entre $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ y agua presente en el medio (reacción de hidrólisis) (figura 11).

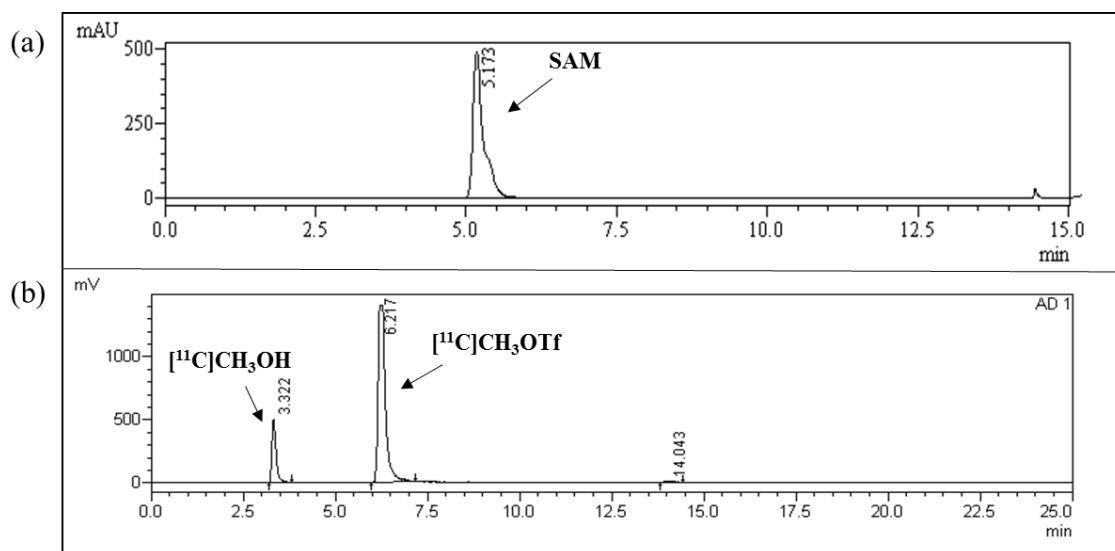


Figura 11. Cromatograma HPLC analítico: (a). estándar de SAM (UV); (b). crudo de reacción luego de 10 minutos a 60 °C (gamma) (tabla 2, entrada 6).

Para verificar la correspondencia entre los picos radioactivos obtenidos y los posibles productos planteados, se realizaron dos blancos (tabla 3, entradas 2-3). Con la condición de la entrada 2 se pudo verificar que el pico que sale a tiempo de retención de 6.2 minutos se corresponde con el $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$. En el caso del otro blanco se agregó NaOH 3M a la mezcla de reacción de forma de asegurar la formación de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH}$. Al controlar esta

reacción se pudo determinar que el pico que aparece a tiempo de retención 3.3 minutos se corresponde con el $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH}$.

Continuando con las pruebas, se realizaron una serie de ensayos utilizando $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ como agente metilante y ácido fórmico como disolvente. Se fue variando la temperatura y tiempo de reacción, así como la masa de precursor empleada, de forma de poder obtener el compuesto deseado. Las condiciones ensayadas se describen en la tabla 2, entradas 9-20. Al controlar las distintas reacciones por HPLC, se pudo visualizar en el cromatograma gamma la presencia de un pico a igual tiempo de retención que el del estándar de SAM (ejemplo en figura 12). Para verificar que el mismo se correspondía con $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$, se realizó un blanco empleando las condiciones de la entrada 4, tabla 3. En este caso, en el cromatograma gamma no se obtuvo el pico a igual tiempo de retención que el del estándar de SAM. Esto permitió concluir que con las condiciones previamente mencionadas (tabla 2, entradas 9-20), si se había formado el producto esperado.

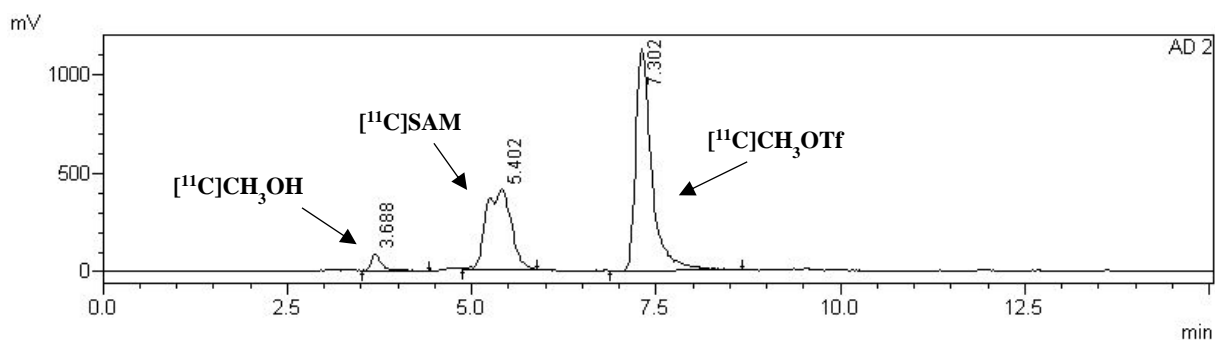


Figura 12. Cromatograma gamma HPLC analítico, crudo de reacción obtenido con las mejores condiciones ensayadas (tabla 2, entrada 20).

Observando la tabla 2 se deduce que $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ se obtuvo con diferentes purzas radioquímicas, dependiendo de las condiciones empleadas para la marcación. A su vez, en los diferentes cromatogramas gamma se pueden observar los picos correspondientes al $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ que quedó sin reaccionar y al $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH}$ formado, que constituyen las dos impurezas radioquímicas obtenidas en todos los casos ensayados.

En la figura 13 se muestran dos gráficas que resumen cómo varía la pureza radioquímica del producto en base a la temperatura de marcación y a la masa de precursor empleadas.

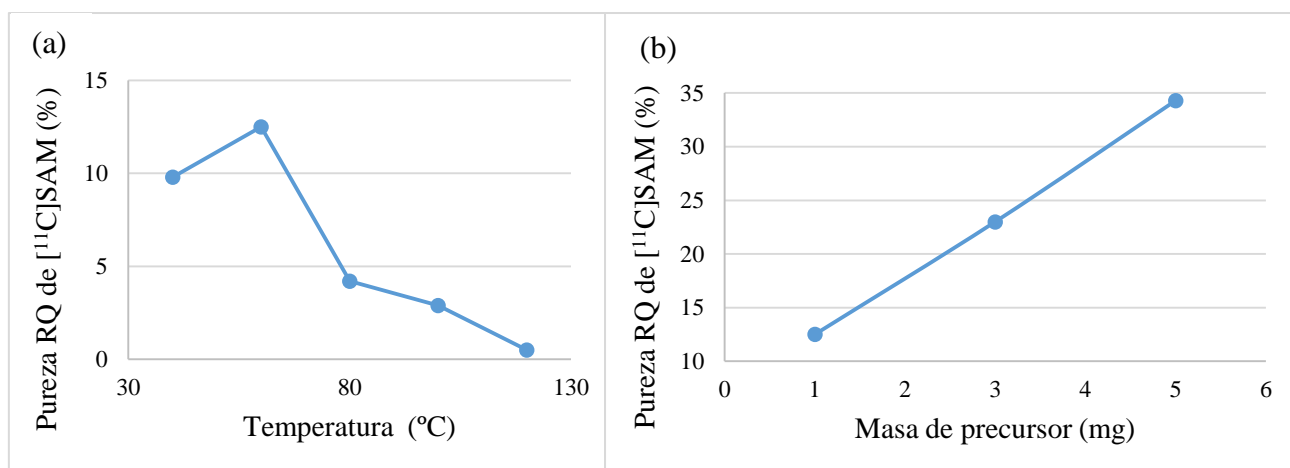


Figura 13. (a). Variación de la pureza RQ de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ en el crudo de reacción con la temperatura de reacción (tabla 2, entradas 9,11,13,15-16); (b). Variación de la pureza RQ de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ en el crudo de reacción con la masa de precursor empleada (tabla 2, entradas 11,17-18).

Si nos centramos en la gráfica (a) de la figura 13, se puede observar que la pureza radioquímica de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ presenta un máximo a 60 °C y que al aumentar la temperatura por encima de este valor se da una disminución significativa de la pureza radioquímica del producto de interés. Esta disminución podría explicarse debido a que, al aumentar la temperatura de marcación por encima de 60 °C se va descomponiendo el precursor SAH, quedando menos masa disponible para reaccionar. Esto puede visualizarse en los cromatogramas UV de las reacciones a diferentes temperaturas. En base a estos resultados, se selecciona 60 °C como temperatura óptima de marcación.

Por otro lado, al observar la gráfica (b) se deduce que al aumentar la masa del precursor se da un aumento significativo de la pureza radioquímica del producto. En nuestro caso se ensayó la reacción con 1, 3 y 5 mg de SAH, masas que se encuentran en el orden de las usuales para las reacciones de marcación con ^{11}C . Con 5 mg de precursor se obtuvo el mejor resultado.

Una vez optimizada la temperatura de reacción (60 °C) y la masa de precursor (5 mg), se ensayaron distintos tiempos de reacción: 1, 5 y 10 min. En la tabla 2 (entradas 18-20) se pueden visualizar los resultados obtenidos. Como la pureza radioquímica de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ fue similar en cualquiera de los tres tiempos ensayados, se decidió tomar como tiempo óptimo 1 minuto, ya que se está trabajando con un radionucleido de corto período de semidesintegración.

En resumen, las condiciones óptimas de marcación que permitieron obtener [^{11}C]SAM con mayor pureza radioquímica fueron: [^{11}C]CH₃OTf como agente metilante, 5 mg de precursor en ácido fórmico, a una temperatura de marcación de 60 °C durante 1 minuto. La pureza radioquímica de [^{11}C]SAM en el crudo de reacción fue de 31.7% (tabla 2, entrada 20).

Empleando las condiciones óptimas mencionadas, se obtuvo un cromatograma gamma en el cual el pico correspondiente a [^{11}C]SAM se presenta desdoblado, (figura 12). Esto se puede deber a que en la reacción de marcación se forma un azufre trivalente (un sulfonio), el cual es quiral. Por lo que, el grupo metilo al incorporarse a la molécula lo puede hacer tanto por arriba como por debajo de la misma, dando lugar de esta manera a la formación de dos isómeros posibles: (*S,S*)-SAM y (*R,S*)-SAM, (figura 14).

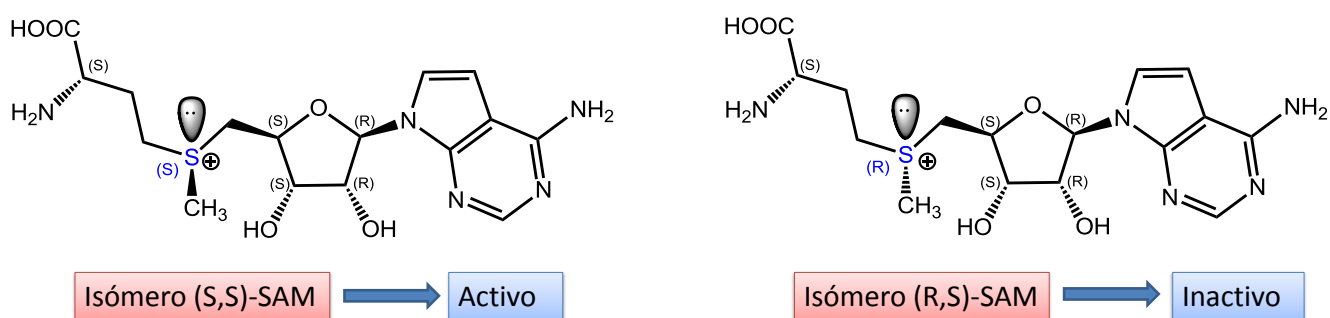


Figura 14. Isómeros de SAM: (*S,S*)-SAM y (*R,S*)-SAM.

En la bibliografía está reportado que la configuración (*S,S*) de SAM es la única forma biosintetizada. Este isómero es el único biológicamente activo para casi todas las metiltransferasas dependientes de SAM, incluida la GNMT. Sin embargo, hay algunas metiltransferasas que son capaces de reconocer el isómero (*R,S*) [52-53]. En base a esto, inicialmente la etapa de purificación se centró en tratar de optimizar un método de HPLC semi-preparativo que permitiera la separación de los isómeros con el fin de obtener (*S,S*)-SAM de forma pura. Para ello, se realizaron varios ensayos inyectando un estándar de SAM que contenía los dos isómeros, variando los siguientes parámetros: columna cromatográfica, componentes de la fase móvil y flujo total, como se observa en la tabla 4.

Tabla 4. Resumen de condiciones de HPLC semi-preparativo ensayadas.

| Columna | Fase móvil | Flujo (mL/min) | t _R SAM (min) ^[a] | Entrada |
|--|---|----------------|---|-----------|
| Luna C18 250/10 mm, 5 µm | buffer acetato de sodio 0.1 M pH 4.5: acetonitrilo (98:2) | 6.0 | (3.4-4.7) pico único | 1 |
| Luna C18 250/10 mm, 5 µm | buffer acetato de amonio 50 mM pH=5.4 1% TFA ^[b] | 6.0 | (11.0-12.0) pico desdoblado | 2 |
| | | 4.0 | (18.0-19.0) pico desdoblado | 3 |
| SemiPrep RP-18e 100/10 mm Chromolith | buffer acetato de amonio 50 mM pH=5.4 1% TFA ^[b] | 2.0 | (8.0-9.0) pico único | 4 |
| | | 4.0 | (5.0-6.0) pico único | 5 |
| Nucleodur C18 VP 125/10 mm, 5 µm | buffer acetato de amonio 50 mM pH=5.4 1% TFA ^[b] | 4.0 | (8.0-9.0) pico único | 6 |
| | | 2.0 | (17.0) pico único | 7 |
| Nucleosil C18 VP 250/16 mm, 100-7 | buffer acetato de amonio 50 mM pH=5.4 1% TFA ^[b] | 8.0 | (35.0 y 37.5) dos picos | 8 |
| | | 10.0 | (26.0 y 28.0) dos picos | 9 |
| | | 15.0 | (15.0-16.0 y 17.0) dos picos | 10 |
| | | 17.0 | (14.0 y 15.2) dos picos | 11 |
| Nucleosil C18 VP 250/10 mm, 100-5 | buffer acetato de amonio 50 mM pH=5.4 1% TFA ^[b] | 6.0 | (13.5-14.0) pico desdoblado | 12 |
| Synergi 50/3 mm, 4 µm | buffer acetato de amonio 50 mM pH=5.4 1% TFA ^[b] | 1.0 | (1.2) pico único | 13 |
| | | 1.9 | (1.9) pico único | 14 |

^[a] t_R: tiempo de retención; ^[b] [48].

Con algunas de las condiciones ensayadas ambos isómeros eluyeron con el mismo tiempo de retención, mostrando un pico único en el cromatograma del HPLC semi-preparativo (tabla 4, entradas 1,4-7,13-14). Usando las condiciones cromatográficas 2-3,12, descritas en la tabla 4, se obtuvo un pico desdoblado, de modo que los isómeros no pudieron separarse de forma completa. Finalmente, empleando las condiciones cromatográficas de las entradas 8-11, tabla 4, se logró obtener dos picos separados. Sin embargo, para lograr dicha separación se tuvieron que emplear condiciones muy drásticas de flujo, e incluso en algunos casos, los tiempos de retención obtenidos fueron demasiado largos y por ende incompatibles con el corto período de semidesintegración de una molécula marcada con ¹¹C (tabla 4, entradas 8-9). Además, en otros casos (tabla 4, entradas 10-11), no se logró obtener una resolución adecuada entre los picos (figura 15).

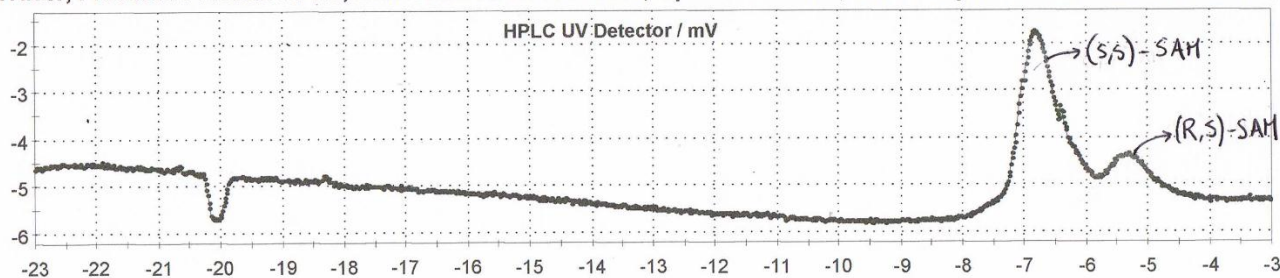


Figura 15. cromatograma UV HPLC semi-preparativo, estándar de SAM (tabla 4, entrada 10).

De todos modos, se hicieron pruebas en “caliente” ensayando las condiciones 10 y 11 para evaluar la separación de los isómeros de [^{11}C]SAM en el módulo. En estas ocasiones, no fue posible obtener el isómero de interés aislado debido a la baja intensidad de los picos radioactivos, la proximidad de sus tiempos de retención y la mala resolución de los mismos. Como no fue posible separar los isómeros radiactivos, se decidió continuar trabajando con el producto como mezcla de dos diastereómeros.

Para purificar [^{11}C]SAM de las otras impurezas radioquímicas presentes en el crudo de reacción ([^{11}C]CH₃OTf y [^{11}C]CH₃OH), se seleccionaron las condiciones 1 de la tabla 4. Estas condiciones fueron elegidas teniendo en cuenta que permiten la elución del producto a un tiempo de retención adecuado empleando un flujo óptimo.

En base a los resultados mencionados anteriormente, se realizó una síntesis completa empleando las condiciones óptimas de marcación (tabla 2, entrada 20) y purificación (tabla 4, entrada 1), seleccionadas. En la síntesis de cualquier radiofármaco inyectable es necesario un último paso de formulación para ajustar la isotonicidad y el pH de la solución. Por ello, el producto final fue formulado y además transferido a un vial a través de una membrana esterilizante. Aplicando las condiciones descritas, se obtuvo [^{11}C]SAM como mezcla diastereomérica con un rendimiento radioquímico de fin de síntesis (EOS), desde [^{11}C]CH₃I, de $(10 \pm 2)\%$ (no corregido por decaimiento; n=3). El rendimiento de [^{11}C]CH₃I a partir de [^{11}C]CO₂ en el módulo fue de $(22 \pm 2)\%$ (no corregido por decaimiento; n=3). El proceso se completó en (28 ± 1) minutos, desde el envío del [^{11}C]CO₂ al módulo hasta la obtención del producto final formulado. En el proceso de marcación, el isómero inactivo se obtuvo como producto mayoritario en relación 53:47 [isómero (R,S):isómero (S,S)]. Esta relación entre los isómeros se pudo determinar mediante un método de HPLC analítico (sección: control de calidad de [^{11}C]SAM, parte experimental), que permitió la separación de los isómeros (figura 16). La separación fue

posible únicamente en una columna analítica debido a la mayor resolución que presentan frente a las columnas semipreparativas.

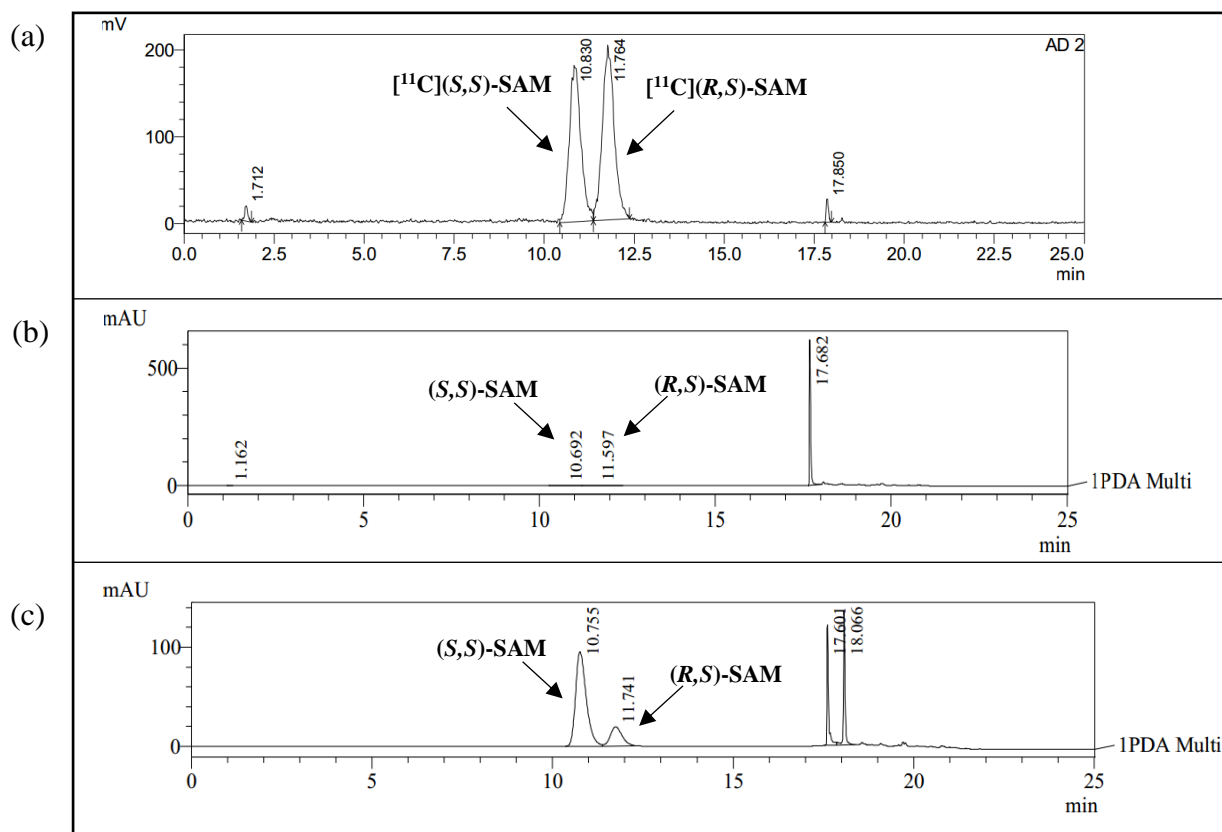


Figura 16. Cromatograma HPLC analítico: (a). $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ post-purificación (gamma); (b). $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ post-purificación (UV); (c). estándar de SAM (UV).

2.3.3. Control de calidad de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$

Al trabajar con radiofármacos inyectables, una vez finalizada su síntesis, es necesario llevar a cabo una serie de análisis y determinaciones para evaluar su identidad, pureza y calidad. Estos parámetros, a su vez, permiten demostrar que la tecnología empleada durante el proceso productivo da lugar a un producto con las características deseadas.

Con este propósito, optimizada la síntesis de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ se prosiguió con los ensayos de control de calidad, los cuales involucran la determinación de parámetros fisicoquímicos y biológicos. En la tabla 5 se resumen las especificaciones, así como los resultados de la evaluación del control de calidad para tres lotes pilotos de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$. En todos los casos, el producto obtenido cumplió con las especificaciones establecidas para el control de calidad. Además de los parámetros descritos en la tabla 5, se verificó la esterilidad de la solución final en cada lote y la concentración de endotoxinas estuvo de acuerdo con los estándares establecidos para una solución inyectable.

Tabla 5. Especificaciones y resultados del control de calidad para tres lotes pilotos de [¹¹C]SAM.

| Ensayo | Especificaciones | Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 |
|--|---|-------------|-------------|--------------|
| Apariencia | Límpida, incolora y libre de partículas | Cumple | Cumple | Cumple |
| pH | 4.5-8.5 | 7.5 | 7.5 | 7.5 |
| Pureza Radioquímica | > 90% | 97.4% | 98.0% | 97.7% |
| Identidad Radioquímica | Diferencia entre t _R del pico radioactivo y el de referencia ≤ 10% | 0% | 1% | 2% |
| Solventes Residuales: | | | | |
| Acetonitrilo | < 0.04% | 0.0011% | 0.0009% | 0.0009% |
| Acetona | < 0.5% | 0.0001% | 0.0002% | 0.0002% |
| Etanol | < 10% | 3.8% | 4.1% | 3.8% |
| Pureza Radionucleídica | Presencia de picos de emisión gamma a 511 keV y/o 1022 keV | Cumple | Cumple | Cumple |
| Identidad Radionucleídica (t_{1/2}) | 19.9 – 20.9 min | 19.9 min | 20.3 min | 20.3 min |
| Actividad Específica | > 30 GBq/μmol (EOS) | 83 GBq/μmol | 75 GBq/μmol | 129 GBq/μmol |

2.4. Conclusiones

Se logró obtener el producto de interés SAM con mínima cantidad de impurezas y a un tiempo de síntesis adecuado para la reacción de metilación en “frío”. Estos ensayos de síntesis orgánica brindaron información valiosa sobre la reactividad y comportamiento químico del par SAH-SAM, que resultó útil en la etapa posterior de radiosíntesis. Se optimizó un nuevo método químico para la producción de [¹¹C]SAM a través de una síntesis en un paso, utilizando la plataforma comercial GE TRACERlab® FX C Pro. El compuesto marcado con ¹¹C se obtuvo como mezcla diastereomérica, presentando una relación entre los isómeros de 53:47 [isómero (*R,S*):isómero (*S,S*)]. Fue posible optimizar un método de HPLC analítico para separar los diastereómeros. Sin embargo, esta separación no fue posible en el sistema de HPLC semi-preparativo. El radiotrazador obtenido se ajustó a las especificaciones establecidas por el centro, en base a las generales que aplican a radiofármacos según las Farmacopeas (USP y EP) [54-55], para el control de calidad.

2.5. Información adicional

Es importante destacar, que este trabajo dio lugar a una publicación en una revista referada [56], (Anexo I).

3. CAPÍTULO II: Evaluación fisicoquímica e *in vitro* de [¹¹C]SAM

3.1. Introducción

Dentro de las etapas del desarrollo de un nuevo radiofármaco, es de gran relevancia la caracterización fisicoquímica e *in vitro* del compuesto en estudio. Esta evaluación involucra varios ensayos que consisten en determinar diferentes parámetros tales como, la estabilidad en formulación final, la estabilidad en plasma, la unión a proteínas plasmáticas, la lipofilidad y la unión e internalización celular. Estos parámetros están relacionados con la distribución que presentará el nuevo radiofármaco en el organismo. Por lo que, permiten predecir el comportamiento *in vivo* del compuesto marcado. En base a ello, estas caracterizaciones constituyen un requisito previo para las evaluaciones biológicas *in vivo*, [57-58].

El estudio de estabilidad del radiofármaco en su formulación final permite determinar durante cuánto tiempo post-producción el compuesto permanece invariable. Este parámetro se vuelve relevante al momento de considerar el tiempo necesario entre la producción del radiofármaco y su potencial administración a pacientes.

Los estudios de estabilidad en plasma son predictivos del comportamiento que presentará el radiofármaco en un medio altamente competitivo como lo es el biológico. Es importante que el compuesto una vez administrado se mantenga estable en el organismo, de manera tal de ser capaz de ir al sitio donde se encuentra su blanco molecular e interactuar con él, y de esta forma permitir su localización mediante los estudios de imagen.

El grado de unión a proteínas plasmáticas constituye un parámetro que está directamente relacionado con la distribución que presentará el compuesto en el organismo, así como con su velocidad de eliminación. Es de suma importancia poder determinarlo ya que ejerce un efecto marcado sobre la farmacocinética y farmacodinamia del compuesto. En este punto, es importante tener presente que solo la fracción libre queda disponible para atravesar las membranas celulares y alcanzar los blancos moleculares [58-59].

Al momento de caracterizar un radiofármaco también es importante considerar su lipofilidad. Este parámetro está relacionado con la interacción de los diferentes átomos con el medio y permite predecir experimentalmente el comportamiento de determinada sustancia en el organismo. En muchos casos los radiofármacos necesitan atravesar las membranas celulares para poder interactuar con su blanco molecular. En el caso de los

compuestos que no poseen un transportador que les posibilite atravesar la membrana celular, su llegada al citoplasma es mediante difusión pasiva a través de la misma. Para ello, el compuesto debe tener una lipofilicidad adecuada de modo de favorecer este pasaje. Por otro lado, el valor de lipofilicidad de un compuesto se relaciona con la velocidad y vía de eliminación que este presenta. Cuando el valor es excesivamente alto, el compuesto presentará baja eliminación renal y alta hepatobiliar, además de una depuración lenta de los tejidos no blanco [57,60].

Con el fin de realizar la caracterización fisicoquímica y estudiar la estabilidad *in vitro* de [^{11}C]SAM, y así poder estimar su comportamiento *in vivo*, se llevaron a cabo los ensayos descriptos anteriormente.

Una vez que un radiofármaco es desarrollado, es recomendable realizar además evaluaciones en medios biológicos. Los estudios *in vitro* basados en células son útiles para analizar los mecanismos moleculares de una enfermedad e identificar posibles marcadores de la misma. En particular, los ensayos de unión e internalización empleando cultivos celulares de la patología en estudio brindan información muy útil acerca del comportamiento que presentará un nuevo radiotrazador a nivel celular. Los cultivos celulares tumorales por ejemplo, son modelos homogéneos que permiten un conocimiento más preciso de la biología tumoral [61]. En tal sentido, para los ensayos de unión e internalización celular de [^{11}C]SAM se utilizó un cultivo de células de CP humano (línea PC3).

3.2. Parte experimental

3.2.1. Materiales y equipos

Los reactivos y disolventes utilizados fueron de calidad analítica (ABX, Merck, Sigma-Aldrich, Fluka, Carlo Erba, Dorwil, Capricorn Scientific, Gibco) y se usaron sin purificación adicional. El [^{11}C]CO₂ empleado en las reacciones de marcación fue producido en un ciclotrón PET Trace® 16.5 MeV (GE Healthcare). Para dicha producción se utilizó un blanco de alto rendimiento conteniendo una mezcla de N₂ y 1.0% O₂ (Praxair o Airliquide). Las radiosíntesis se desarrollaron en un módulo TRACERlab® FX C Pro (GE Healthcare). Para las determinaciones se utilizó [^{11}C]SAM sintetizada y controlada de acuerdo con lo descripto en el capítulo I. Los cartuchos de intercambio catiónico Sep-Pak Classic Accell Plus CM y los filtros esterilizantes de 0.22 μm empleados en la síntesis de [^{11}C]COL fueron comprados a Waters. La pureza

radioquímica de [^{11}C]COL fue evaluada por HPLC, empleando un equipo Shimadzu UFLC equipado con detectores de arreglo de diodos, conductividad y gamma en serie. La columna de HPLC analítica utilizada fue una EC 250/4.6 mm Nucleodur 100-5 C18ec (Macherey-Nagel). Los estándares de COL y el precursor (precursor *N,N*-dimetil aminoetanol) empleados para la síntesis y el control de calidad, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y Fluka, respectivamente. El pool de plasma humano empleado en los estudios fisicoquímicos fue donado por un laboratorio clínico registrado (donación de la Cátedra de Radioquímica, Facultad de Química). El agitador vortex utilizado en los estudios fue un Vortex-QILINYIYONG 5 (Scientific Instrument). En los ensayos de estabilidad la pureza radioquímica del compuesto fue determinada por HPLC, empleando un equipo Shimadzu UFLC equipado con detectores de arreglo de diodos y gamma en serie. La columna de HPLC analítica utilizada fue una EC 250/4.6 mm Nucleodur 100-5 C18ec (Macherey-Nagel). Para los estudios fisicoquímicos se utilizó una centrífuga Thermo Scientific Sorvall ST 16R. Se emplearon columnas de exclusión molecular MicrospinTM G-50 (GE Healthcare), para la determinación del porcentaje de unión a proteínas plasmáticas. Para los estudios de unión e internalización celular se utilizó la línea celular de CP humano PC3 (ATCC[®] ATCC[®] CRL-1435 TM), adquirida en American Type Culture Collection Cell. Para las mediciones de actividad se emplearon una cámara de ionización (Capintec[®] CRC 25R, CRC 25 PET) y un espectrómetro de centelleo sólido con cristal de NaI (Tl) de 3 x 3 pulgadas de pozo, acoplado a un sistema analizador multicanal ORTEC[®].

3.2.2. Métodos

3.2.2.1. Síntesis de [^{11}C]SAM y [^{11}C]COL

Los procesos sintéticos se realizaron utilizando la plataforma automatizada TRACERlab[®] FX C Pro descrita anteriormente. Los lotes de [^{11}C]SAM fueron sintetizados y controlados de acuerdo con lo descrito en el capítulo I. La síntesis de [^{11}C]COL se llevó a cabo de acuerdo con el método reportado por Shao *et al.* [62]. En este caso se utilizó [^{11}C]CH₃I como agente metilante en la reacción de marcación. El [^{11}C]CH₃I producido en el módulo, fue transferido a través de un cartucho CM Sep-Pak cargado con el precursor *N,N*-dimetil aminoetanol (40 μL). Luego, el cartucho fue lavado con etanol (10 mL) seguido de agua para inyección (10 mL). El producto fue eluido y formulado con NaCl 0.9% (10 mL). La solución final se transfirió a un vial estéril a través de un filtro de esterilización de 0.22 μm . Finalmente, una muestra del producto fue

sometida a los ensayos de control de calidad. El compuesto obtenido se analizó mediante HPLC, empleando las siguientes condiciones: columna analítica C18, NaH₂PO₄ 0.05 M como fase móvil, flujo total de 0.8 mL/min. Los cromatogramas se registraron empleando detectores de arreglo de diodos (UV, $\lambda=200$ nm), conductividad y centelleo sólido (gamma) en serie, (método 4). El radiotrazador se obtuvo con una pureza radioquímica > 90%.

3.2.2.2. Estabilidad en formulación final

La estabilidad de [¹¹C]SAM en la formulación final se estudió, a temperatura ambiente, por determinación de su pureza radioquímica a lo largo del tiempo. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de incubación (30, 70 y 100 minutos). Las mismas fueron analizadas mediante HPLC analítico empleando las condiciones del método 3, descrito en la sección control de calidad de la parte experimental del capítulo anterior.

3.2.2.3. Estabilidad en plasma

El ensayo de estabilidad en plasma se realizó incubando [¹¹C]SAM (100 μ L) con plasma humano (1000 μ L) a 37 °C. Transcurridos diferentes tiempos de incubación (15, 30 y 60 minutos), se tomaron muestras de 100 μ L de la mezcla. Una vez extraída la muestra, con la finalidad de desnaturalizar las proteínas, se agregaron 100 μ L de TFA 25% y se agitó en vortex. Para la precipitación de las mismas, se centrifugó la muestra a 5000 rpm (4696 xg) durante 2 minutos a 4° C. Finalmente se tomó una muestra del sobrenadante y su pureza radioquímica fue analizada por HPLC analítico. En este caso, se emplearon las condiciones del método 2, descrito en la sección síntesis de [¹¹C]SAM de la parte experimental del capítulo anterior.

3.2.2.4. Determinación del porcentaje de unión a proteínas plasmáticas

Para la determinación del porcentaje de unión a proteínas plasmáticas se emplearon columnas de exclusión molecular. Las mismas se prepararon por centrifugación (2 minutos a 3300 rpm (2046 xg) a 4 °C) para extraer el buffer de conservación. Se incubó plasma humano (1000 μ L) con el radiofármaco (100 μ L) a 37 °C durante diferentes tiempos (30, 60 y 120 minutos). Transcurrido cada uno de los tiempos, se sembraron 50 μ L de la mezcla en las columnas y las mismas se incubaron durante 2 minutos. A continuación, las columnas se centrifugaron a 3300 rpm (2046 xg) a 4 °C por 2 minutos y se recogieron los eluidos. La actividad retenida tanto en las columnas, como en los

eluidos se midió mediante centelleo sólido. Cada tiempo se llevó a cabo por duplicado. Para el último punto (120 minutos) se procesó un blanco, reemplazando el plasma por buffer fosfato 0.1 M durante la incubación [63].

3.2.2.5. Lipofilicidad

La lipofilicidad de [¹¹C]SAM fue estudiada a pH 7.0 a través de la determinación del coeficiente de partición 1-octanol/buffer fosfato 0.1 M. Para ello, el 1-octanol (2 mL) y el buffer fosfato 0.1 M pH 7.0 (2 mL) se mezclaron en un tubo de centrifuga. A la mezcla se agregó el radiofármaco (100 µL), y se agitó en vortex durante 2 minutos. La mezcla se centrifugó por 5 minutos a una velocidad de 5000 rpm (4696 xg), a 4 °C. Luego de esperar la separación de las dos fases, se tomaron tres muestras de (50 – 100) µL de cada fase y se midió la actividad de cada una de ellas en un contador de centelleo sólido. Se realizaron 4 repeticiones de cada experiencia y cada una de ellas por duplicado. El coeficiente de partición se calculó usando la ecuación:

$$\log P_{\text{OCT}} = \log (\text{cuentas en octanol} / \text{cuentas en buffer})$$

3.2.2.6. Ensayo de unión e internalización celular de [¹¹C]SAM y [¹¹C]COL en cultivos celulares PC3

Para la realización de los ensayos de unión e internalización celular se empleó la línea celular de CP humano PC3. Las células se cultivaron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con alto contenido en glucosa, con suplemento de suero fetal bovino al 10% (v/v) y solución antibiótica/antimicótica. Las mismas fueron cultivadas hasta confluencia bajo atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂ a 37 °C. Estos ensayos se realizaron según el método reportado previamente por Paulmichl *et al.*[64]. Brevemente, las células se sembraron en placas de seis pozos, a razón de 300.000 células por pozo, dos días antes del experimento (3 placas por estudio). El día del experimento, las células se lavaron dos veces con buffer fosfato salino frío (PBS) y el mismo fue reemplazado por DMEM con 1% de SFB (1.2 mL por pozo). La mitad de los pozos fueron bloqueados con 150 µL/pozo de una solución de estándar de SAM o COL en exceso (10.000 veces más que la cantidad presente en el radiofármaco), según el caso. A la otra mitad (no bloqueada) se les agregó 150 µL/pozo de PBS con BSA (suero de albumina bovina) al 0.5%. A continuación, a todos los pozos se les añadió 150 µL del radiotrazador correspondiente (1.3-2.7 MBq por pozo), y las placas se incubaron a 37 °C por 40 minutos.

La incubación se detuvo mediante la adición de PBS frío. Luego se realizaron dos lavados de 5 minutos con 1 mL de buffer glicina frío (0.05 M de glicina / NaCl 0.1 M, pH 3) a fin de poder recoger la fracción del radiotrazador unida a la membrana plasmática. Luego se lisaron las células mediante dos lavados con 1 mL de NaOH 0.1 N y la fracción de actividad internalizada fue recogida. Finalmente, se midió la actividad unida a membrana y la internalizada en un contador de centelleo sólido. La actividad específica unida a membrana así como la internalizada se calcularon mediante la resta de la actividad no específica (medida en los pozos bloqueados = Unión No Específica - UNE) a la actividad total (medida en los pocillos no bloqueados). La captación celular se determinó respecto a la actividad total añadida inicialmente por pozo, es decir por 300.000 células.

3.2.2.7. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio \pm la desviación estándar (DE). Se utilizó la distribución de t de Student (test de dos colas), para comparar la actividad específicamente unida a membrana e internalizada. El test se aplicó con un nivel de confianza del 95%.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Estudios fisicoquímicos y de estabilidad *in vitro*

Con el fin de caracterizar el radiofármaco obtenido ($[^{11}\text{C}]\text{SAM}$), se realizaron varios estudios: a) estabilidad en formulación final y en plasma; b) unión a proteínas plasmáticas y c) lipofilicidad. Estos estudios permiten predecir el comportamiento *in vivo* del compuesto marcado, por lo que constituyeron un requisito previo a las evaluaciones biológicas.

El ensayo de estabilidad en formulación final se basa en determinar la pureza radioquímica del producto en el medio de formulación a lo largo del tiempo. En este caso, se obtuvieron valores mayores al 90% a todos los tiempos estudiados (tabla 6), límite establecido por las farmacopeas para radiofármacos de diagnóstico [54-55]. Esto indica que $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ fue estable en la formulación final durante al menos 100 minutos.

Tabla 6. Resultados del ensayo de estabilidad en formulación final para $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$.

| Tiempo de incubación (min) | 30 ^[a] | 70 ^[a] | 100 ^[a] |
|---|-------------------|-------------------|--------------------|
| Pureza RQ de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ ^[b] | (96.5 \pm 0.1)% | (95.5 \pm 0.1)% | (95.0 \pm 0.4)% |

^[a] (n=3); ^[b] Los resultados se expresaron como el promedio de la Pureza RQ \pm DE.

Por otro lado, se realizó el ensayo de estabilidad en plasma. Dicho estudio permite predecir la estabilidad de los compuestos frente a un medio fuertemente competitivo, como lo es el biológico. En este ensayo se obtuvo una pureza radioquímica mayor a 90% luego de 60 minutos de incubación (figura 17a). Esto indica una estabilidad adecuada de [^{11}C]SAM en plasma humano en el lapso de tiempo estudiado.

En base a los resultados anteriores se puede afirmar que el producto en estudio es estable durante el tiempo requerido para la administración, la biodistribución y la adquisición de imágenes para estudios PET.

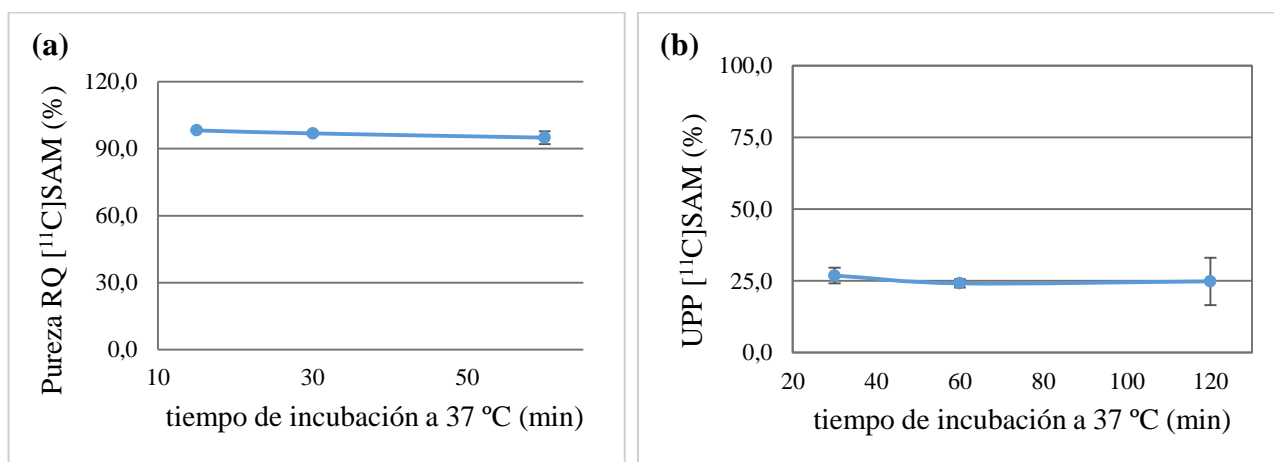


Figura 17. (a). Estabilidad radioquímica de [^{11}C]SAM en plasma en función del tiempo, (n=3); (b). Unión a proteínas plasmáticas de [^{11}C]SAM en función del tiempo, (n=3).

Otro de los ensayos realizados fue la determinación del porcentaje de unión a proteínas plasmáticas de [^{11}C]SAM. Para este ensayo se utilizó el método de gel filtración que permite separar la fracción de actividad unida de la libre por exclusión molecular. Este método es de elección por ser rápido y reproducible. El estudio se llevó a cabo a distintos tiempos de incubación. Los resultados obtenidos se resumen en la gráfica que se muestra en la figura 17b. De los mismos se deduce que el compuesto presentó un bajo porcentaje de unión a proteínas plasmáticas, que se mantuvo constante a lo largo del tiempo (valor máximo $(27 \pm 3)\%$ a los 30 minutos de incubación). Esto es deseable debido a que la fracción libre del compuesto es la que queda disponible para atravesar las membranas, penetrar en las células e interactuar con los blancos moleculares dentro de ellas. Por lo que, si el compuesto permanece fuertemente unido a las proteínas plasmáticas, no va a encontrarse disponible para interactuar con las células, además de presentar una muy lenta depuración [58-59].

La lipofilidad se estudió mediante la determinación del coeficiente de partición del compuesto entre octanol y buffer fosfato pH 7.0. El valor de $\log P_{\text{OCT}}$ obtenido para [^{11}C]SAM fue (-2.01 ± 0.07) ($n=4$). Este valor permite concluir que el compuesto presenta un carácter mayormente hidrofílico, lo que es consecuente con lo esperado de acuerdo a su estructura química. En general, los valores de $\log P$ que se consideran óptimos para un buen pasaje a través de una membrana biológica se encuentran entre -0.5 y 2 a pH 7.4. Sin embargo, el pasaje de SAM a través de las membranas celulares ha sido estudiado en varios modelos biológicos, y se cree que el mismo está mediado por transportadores de membrana [65-66].

3.3.2. Ensayo de unión e internalización celular de [^{11}C]SAM y [^{11}C]COL en cultivos celulares PC3

Con la finalidad de determinar la captación de [^{11}C]SAM por células de CP se realizaron ensayos de unión e internalización celular en cultivos de células de CP. Para estos ensayos se emplearon cultivos generados a partir de una línea celular de CP humano agresivo andrógeno independiente, PC3. Esta línea celular fue seleccionada debido a que ha sido reportado que en la misma existe sobreexpresión de la enzima GNMT, lo que llevaría a un aumento en la captación de [^{11}C]SAM [32]. En este caso se utilizó [^{11}C]COL como radiofármaco de referencia.

Los estudios realizados mostraron niveles muy bajos de captación para [^{11}C]SAM con respecto a la actividad total empleada por pozo (cada 300.000 células), (figura 18a). Los valores se encontraron en el entorno de (0.19 ± 0.08) y $(0.13 \pm 0.02)\%$ para las células no bloqueadas y bloqueadas, respectivamente. Estos resultados son concordantes con los generados en un trabajo reportado, que estudió la captación de SAM en dos modelos celulares. En el mismo se observó que el transporte de SAM a través de la membrana celular se daba en ambas direcciones, de apical a basolateral y de basolateral a apical, con coeficientes de permeabilidad similares. Ellos determinaron la acumulación por ambos tipos de células y obtuvieron una relación (célula:medio, en equilibrio) muy baja, mostrando valores de entre 0.2-0.5. En base a ello concluyen que esta baja acumulación celular apoya la idea del transporte paracelular como único modo de transporte a través de las membranas [67]. Por otro lado, la baja captación del radiotrazador podría estar relacionada con el tipo de interacción que presenta con su blanco molecular. Es importante tener en cuenta que la unión entre [^{11}C]SAM y la GNMT es reversible. Debido a esto, una vez que el trazador ejerza su acción en el sitio activo de la enzima se va a

separar de ella. Además, la enzima al catalizar la reacción de metilación va a transferir el grupo $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3$ desde $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ hacia la glicina, generando $[^{11}\text{C}]\text{sarcosina}$, la cual es capaz de salir de la célula [31].

Con respecto a $[^{11}\text{C}]\text{COL}$, la misma presentó una captación celular específica de $(7.2 \pm 4.4)\%$, lo que podría indicar una mayor afinidad del radiotrazador por las células de CP empleadas. Sin embargo, como se puede observar en la figura 18b los datos obtenidos mostraron una gran dispersión, por lo que, para poder afirmar que la captación de $[^{11}\text{C}]\text{COL}$ es elevada se tendría que haber aumentado el número de muestras analizadas.

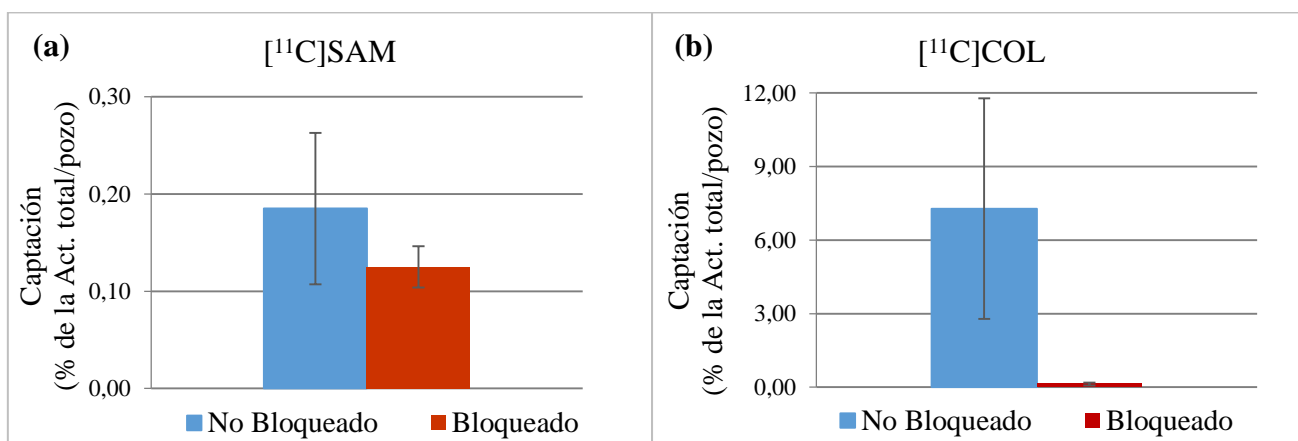


Figura 18. Captación celular del radiotrazador respecto a la actividad total añadida inicialmente por pozo (a 300.000 células): (a). para $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$, (n=2); (b). para $[^{11}\text{C}]\text{COL}$ (n=3).

Independientemente de la captación obtenida para cada radiotrazador, en ambos casos se verificó que la actividad específicamente internalizada fue significativamente mayor que la unida a membrana plasmática ($p < 0.05$), presentando valores de $(82 \pm 1)\%$ y $(80 \pm 8)\%$, para $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ y $[^{11}\text{C}]\text{COL}$, respectivamente, figura 19.

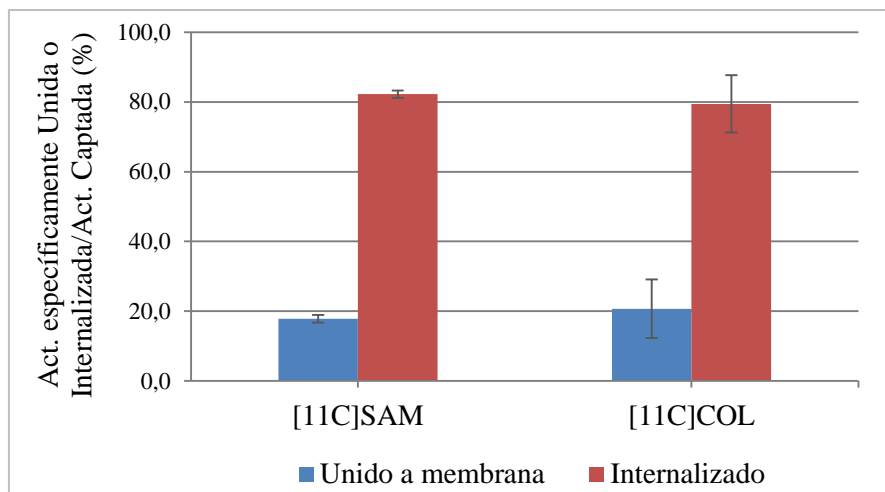


Figura 19. Actividad específica unida a membrana o internalizada de [^{11}C]SAM (n=2) y [^{11}C]COL (n=3), respecto a la actividad captada.

3.4. Conclusiones

Se realizó la caracterización fisicoquímica del producto obtenido. En base a los estudios de estabilidad se puede concluir que [^{11}C]SAM mostró estabilidad adecuada en su medio de formulación y en plasma humano. En ambos casos el compuesto presentó valores de pureza radioquímica mayores al 90% para todos los tiempos analizados. Esto indica que el producto en estudio es estable durante el tiempo requerido para la realización de estudios imagenológicos PET. Con respecto a la determinación de unión a proteínas plasmáticas el compuesto presentó valores bajos, que se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo. Esto es una característica favorable para el empleo del producto como radiofármaco de diagnóstico. El valor de lipofilidad obtenido para [^{11}C]SAM permitió caracterizar al compuesto como hidrofílico, lo que se corresponde con su estructura química. Se realizó la evaluación *in vitro* de [^{11}C]SAM mediante ensayos de unión e internalización en cultivos celulares de CP humano. El compuesto mostró bajos niveles de captación, lo que podría relacionarse con el tipo de interacción que presenta con la GNMT, o con que su pasaje a través de la membrana celular se puede dar en ambos sentidos. De todos modos, la actividad específicamente internalizada fue mayor que la unida a membrana.

Estos resultados en conjunto permitieron aportar elementos para comprender el comportamiento *in vivo* del compuesto marcado y así poder continuar posteriormente con las evaluaciones biológicas.

4. CAPÍTULO III: Evaluación *ex vivo* e *in vivo* de [¹¹C]SAM

4.1. Introducción

En el desarrollo de nuevos radiofármacos PET se requiere de métodos que permitan verificar que estos compuestos siguen las rutas metabólicas de interés, que su vida media biológica es adecuada para la realización de estudios PET, que no presentan efectos adversos, que las dosis absorbidas son compatibles con un radiofármaco de diagnóstico, y que por ende son aptos para futuros estudios en pacientes. Para poder verificar estos parámetros, la evaluación preclínica de los radiofármacos puede basarse en diversos ensayos biológicos, como ser estudios de biodistribución, de imagenología, de toxicidad y de dosimetría, en animales de laboratorio. Estos ensayos se realizan generalmente en modelos de experimentación animal, por lo que los resultados que brindan, si bien no son directamente extrapolables a humanos, ofrecen un buen modelo para conocer y estimar el comportamiento de los radiofármacos en el organismo [68-69].

Los estudios de biodistribución e imagenología en modelos animales sanos permiten analizar distintos aspectos biológicos del radiotrazador como ser, su cinética de biodistribución, la concentración de actividad en los diferentes órganos y tejidos, así como determinar sus vías de eliminación y sitios de captación específicos y no específicos como referencia. Por otro lado, el empleo de modelos animales portadores de enfermedades, permite determinar la unión específica del radiotrazador a los blancos moleculares que están relacionados, y en muchos casos sobreexpresados, en la patología en estudio. En el caso específico de modelos animales tumorales, estos estudios permiten definir la capacidad de captación tumoral del nuevo compuesto. Además, el uso de estos modelos es esencial para el estudio del seguimiento de diferentes terapias y para la evaluación de su eficacia [69].

La biodistribución es una técnica *ex vivo* que implica el sacrificio del animal luego de un tiempo preestablecido post-administración de un radiotrazador. A continuación, se realiza la disección de los órganos y tejidos de interés a fin de poder medir la actividad acumulada en cada muestra.

El estudio preclínico por imagenología molecular PET/CT consiste en una técnica *in vivo* que requiere del empleo de una cámara micro PET/CT para pequeños animales. El funcionamiento de esta cámara se basa en el mismo fundamento que la empleada para pacientes, descrita anteriormente. Sin embargo, este equipo cuenta con un anillo detector

más pequeño, lo que permite que los cristales detectores sean de menor tamaño y se mejore así la eficiencia de detección geométrica del sistema. Por lo que, el estudio PET/CT con estos equipos proporciona información metabólica cuantitativa en modelos animales con alta sensibilidad, especificidad y mayor resolución espacial. La cámara permite realizar estudios estáticos y dinámicos, con capacidad de fusión de imágenes y de cuantificación. Esta técnica de imagen presenta varias ventajas debido a que permite un seguimiento rápido y eficaz de la cinética *in vivo* de los radiofármacos, lo que es de suma importancia en la evaluación de compuestos marcados con ^{11}C por su corto período de semidesintegración [68].

Con el fin de determinar la cinética de biodistribución de [^{11}C]SAM y la concentración de actividad en los distintos órganos y tejidos, se realizaron estudios de biodistribución y de imagenología molecular PET/CT en un modelo de ratones sanos.

Por otro lado, para evaluar la captación tumoral de este nuevo compuesto en un modelo tumoral de CP, se realizaron los mismos estudios, pero en este caso empleando un modelo murino de tumor xenográfico de CP, generado a partir de la línea celular PC3. Para poder predecir el rol de [^{11}C]SAM como potencial agente diagnóstico se utilizó [^{11}C]COL como referencia. La selección de este radiofármaco como referencia para la comparación se basó, en que al momento de comenzar los estudios biológicos era el compuesto que se encontraba en uso clínico para el diagnóstico de la patología en estudio.

Finalmente, otro aspecto relevante en la evaluación preclínica de un nuevo radiofármaco lo constituyen los estudios dosimétricos y toxicológicos del compuesto. De este modo, se verifica que el radiotrazador sea seguro para el uso en humanos desde el punto de vista de la seguridad radiológica y farmacéutica [70].

Es importante que la dosis recibida por el paciente como consecuencia del estudio diagnóstico sea lo más baja posible a fin de minimizar la probabilidad de padecer 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, pero con un mínimo de dosis absorbida por el paciente. En este sentido, es necesario llevar a cabo estudios dosimétricos que permitan estimar la dosis que recibiría un paciente, a nivel de cada órgano y cuerpo entero, asociada al estudio imagenológico con el nuevo agente.

Los cálculos dosimétricos en la etapa de evaluación preclínica se basan en estimar las dosis absorbida y efectiva, empleando los datos obtenidos en las biodistribuciones del radiotrazador en animales sanos.

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 la estimación 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 γ y β^+ 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. Por ello, se realizan estudios 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 los radiofármacos 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 [70,72].

En cuanto a los aspectos toxicológicos, la SAM desde hace años se utiliza como fármaco para la prevención y tratamiento de la artrosis primaria y secundaria, síndrome depresivo y hepatopatías agudas y crónicas [73]. En nuestro país se encuentran disponibles las siguientes presentaciones comerciales que contienen SAM como monodroga o en asociación: Tunik 100 (Laboratorio Brandt), Tunik B12 (Laboratorio Brandt, en asociación con vitamina B2) [74]. Ambos productos se encuentran disponibles en presentación de ampolla para administración intramuscular, conteniendo 100 mg de SAM. Para las indicaciones antes mencionadas los tratamientos son prolongados, durando entre 2 y 3 meses.

Según la FDA (Food and Drug Administration), la SAM está aprobada como suplemento alimenticio desde el año 1998 [75-76]. En el Memorandum - New Dietary Ingredient: S-adenosylmethionine de la FDA, se hace referencia a una serie de artículos sobre la SAM basados en estudios clínicos y preclínicos. Dicha información permite concluir que la SAM es un compuesto seguro cuando se utiliza de acuerdo con las condiciones establecidas de uso (40 – 1600 mg/día) y que presenta buena tolerabilidad en humanos durante largos periodos de uso [76]. Dentro de las publicaciones mencionadas se encuentran reportados los valores de toxicidad aguda para la SAM (valores de DL₅₀, Dosis Letal 50%), para diferentes vías de administración en las especies de rata y ratón. En el caso de la administración intravenosa de SAM en ratón, la DL₅₀ presentó un valor de 560 mg/kg, mientras que para la rata dicho valor fue > 2000 mg/kg [77].

Por otro lado, Manzillo, *et al.* [78] realizaron un ensayo multicéntrico de la SAM, que fue desarrollado a doble-ciego controlado con placebo, para el tratamiento de la colestasis intrahepática. En este estudio se trataron 343 pacientes por vía intravenosa con una dosis de 800 mg de SAM por día o con placebo durante 2 semanas. Posteriormente, los pacientes que respondieron al tratamiento con SAM fueron seleccionados para recibir vía

oral ya sea 1600 mg de SAM por día o placebo, durante 8 semanas. Los ensayos permitieron concluir que la administración de la SAM, tanto por vía intravenosa como oral, fue bien tolerada al igual que el placebo, sin generar efectos adversos en ninguno de los grupos en estudio.

En base a la bibliografía y ensayos reportados está demostrada la seguridad farmacéutica de SAM, por lo que en este trabajo no fue necesario realizar el estudio de toxicidad.

4.2. Parte experimental

4.2.1. Materiales y equipos

Los reactivos y disolventes utilizados fueron de calidad analítica (ABX, Merck, Sigma-Aldrich, Carlo Erba, Dorwil, Capricorn Scientific, Gibco) y se usaron sin purificación adicional. El [^{11}C]CO₂ empleado en las reacciones de marcación fue producido en un ciclotrón PET Trace® 16.5 MeV (GE Healthcare). Para dicha producción se utilizó un blanco de alto rendimiento conteniendo una mezcla de N₂ y 1.0% O₂ (Praxair o Airliquide). Las radiosíntesis se desarrollaron en un módulo TRACERlab® FX C Pro (GE Healthcare). Para los ensayos biológicos se utilizó [^{11}C]SAM y [^{11}C]COL sintetizadas y controladas de acuerdo con lo descrito en los capítulos I y II, respectivamente. Para las determinaciones de actividad se emplearon una cámara de ionización (Capintec® CRC 25R, CRC 25 PET) y un espectrómetro de centelleo sólido con cristal de NaI (Tl) de 3 x 3 pulgadas de pozo acoplado a un sistema analizador multicanal ORTEC®. Para estos estudios preclínicos se utilizaron ratones machos Swiss y Nude N: NIH (S) -Foxn 1^{nu}, provenientes del bioterio del CUDIM. Para el desarrollo del modelo murino de tumor xenográfico de CP humano, se adquirió la línea celular PC3 (ATCC® ATCC® CRL-1435™) en American Type Culture Collection Cell. Los estudios de imagenología molecular se realizaron empleando una cámara trimodal PET/SPECT/CT para pequeños animales (Triumph™, TriFoil Imaging, Inc.). El procesamiento y análisis semi-cuantitativo de las imágenes se llevó a cabo con el software PMOD, v.3.4. (PMOD Technologies, Ltd., Zurich, Suiza). Para los cálculos dosimétricos se utilizaron los softwares Wolfram Mathematica, OLINDA/EXM V1.0 y OLINDA/EXM V2.0.

4.2.2. Métodos

4.2.2.1. Síntesis de [¹¹C]SAM y [¹¹C]COL

Los procesos sintéticos se realizaron utilizando la plataforma automatizada TRACERlab® FX C Pro descrita anteriormente. Los lotes de [¹¹C]SAM fueron sintetizados y controlados de acuerdo con lo descrito en el capítulo I, mientras que los lotes de [¹¹C]COL, de acuerdo a lo detallado en el capítulo II.

4.2.2.2. Animales de experimentación y línea celular

Para los estudios biológicos *ex vivo* e *in vivo* se utilizaron ratones machos Swiss y Nude. Los ratones Swiss fueron empleados como modelo control sano, mientras que los Nude se utilizaron para generar el modelo de tumor xenográfico de CP (modelo tumoral). Los animales fueron mantenidos de a pares en racks con aire filtrado, bajo condiciones controladas de humedad (40-60)% y temperatura (24 ± 1) °C. Fueron sometidos a ciclos de luz/oscuridad de 14:10 horas en el bioterio del CUDIM con comida y agua ad libitum.

En el desarrollo del modelo tumoral se empleó la línea celular de CP humano PC3. Las células se cultivaron en DMEM con alto contenido en glucosa, con suplemento de suero fetal bovino al 10% (v/v) y solución antibiótica/antimicótica. Las mismas fueron cultivadas hasta confluencia bajo atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂ a 37 °C.

Los protocolos de experimentación animal se realizaron de acuerdo con pautas institucionales, nacionales e internacionales para el uso de animales de investigación, con la aprobación del Comité de Bioética del CUDIM y bajo las regulaciones éticas de la ley nacional de experimentación animal No. 18.611 (Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA), Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA)). Número de protocolo 14012202.

4.2.2.3. Desarrollo del modelo tumoral

Para los ensayos biológicos se generó un modelo murino de tumor xenográfico de CP. Con dicho fin, se inocularon tres millones de células PC3, suspendidas en NaCl 0.9% (100-200 µL), en ratones Nude machos de 9-12 semanas. La inoculación se realizó por vía subcutánea a nivel del extremo superior de la pata anterior derecha de los ratones. Entre las cuatro y seis semanas posteriores a la inoculación se alcanzaron volúmenes tumorales apropiados de entre (100-350) mm³. Los tumores fueron medidos en dos

dimensiones empleando un calibre, una vez por semana. Los volúmenes tumorales se calcularon como: $(\text{diámetro menor})^2 \times \text{diámetro mayor} \times \pi/6$.

4.2.2.4. Estudios *ex vivo* de biodistribución

Se realizaron estudios de biodistribución con el modelo control y el modelo tumoral generado. Para ello, se inyectó una solución de [¹¹C]SAM (7.7-36.0 MBq, 100-200 μL) por vía intravenosa (iv) en el grupo control (15-16 semanas de edad, 32.9-38.8 g) y en los ratones portadores de tumor (13-18 semanas de edad, 21.5-27.1 g), a través de la vena dorsal de la cola. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical a distintos tiempos post-inyección: 10, 30 y 70 minutos para el grupo control y 14, 30 y 70 minutos en el caso del modelo tumoral. Diferentes órganos y tejidos fueron extraídos (sangre, hígado, corazón, pulmones, bazo, riñones, músculo, hueso, estómago, tracto gastrointestinal, vejiga y orina). En el caso del modelo tumoral, el tumor también fue extirpado. Los órganos y tejidos retirados fueron pesados y su actividad se midió en un contador de centelleo sólido. Los resultados fueron expresados como porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido (% AI/g) y porcentaje de actividad inyectada por órgano completo (% AI). Además, se calculó la relación de captación entre tumor y músculo, este último considerado como tejido no tumoral (relación T/NT: Tumor/No Tumor). En aquellos casos que se consideró necesario se aplicó corrección por geometría.

4.2.2.5. Estudios *in vivo* de imagenología molecular PET/CT

Se realizaron estudios PET/CT con los dos grupos de animales en estudio, empleando una cámara micro PET/SPECT/CT para pequeños animales. Los animales se anestesiaron con isoflurano al 2% en flujo de oxígeno (2 L/min) y fueron inyectados con los diferentes radiotrazadores bajo cámara por vía iv, en la vena dorsal de la cola. En el caso de [¹¹C]SAM (18.3-50.4 MBq en 100-200 μL), se realizaron estudios con los dos modelos animales, mientras que con [¹¹C]COL (15.3-35.7 MBq en 100-200 μL) se llevaron a cabo estudios únicamente empleando el modelo tumoral. Las imágenes de los ratones portadores de tumor, fueron adquiridas entre las 13-18 semanas de edad, cuando se alcanzó un tamaño tumoral óptimo para el estudio (100-350 mm³). En base a esto, los ratones del grupo control fueron analizados a la misma edad.

La adquisición de imágenes para el modelo tumoral fue realizada en modo dinámico comenzando a t=0 post-administración del radiotrazador y durante 60 minutos (1 frame × 5 minutos, 1 frame × 15 minutos, 2 frames × 20 minutos). Para el grupo control, las

imágenes fueron adquiridas en modo estático comenzando 5 minutos post-inyección del radiotrazador hasta los 15 minutos, seguido de otras dos adquisiciones estáticas de 20 minutos cada una. El análisis por CT se realizó durante 1.98 minutos. Los ratones fueron escaneados en orden aleatorio.

Los sinogramas fueron reconstruidos utilizando el algoritmo Maximum Likelihood-Expectation Maximization 3D (3D-MLEM) con 30 iteraciones.

El procesamiento y análisis semi-cuantitativo de las imágenes se llevó a cabo con el software PMOD, v.3.4. Los estudios PET fueron co-registrados con el correspondiente CT para asegurar la localización anatómica. Las imágenes se muestran como cortes coronales, sagitales y axiales. Se construyeron Volúmenes de Interés (VOIs) de forma manual sobre los diferentes órganos a analizar (cerebro, corazón, pulmón, hígado, riñón, vejiga, hueso y músculo para el grupo control; tumor y músculo contralateral para el grupo tumoral), a fin de generar curvas actividad-tiempo y calcular la relación T/NT. La concentración de actividad dentro de cada VOI fue expresada como Hot Spot Average 5 (promedio de los 5 puntos más calientes en kBq/cc), para el caso del modelo tumoral y como Average (promedio de todos los puntos contenidos en el VOI en kBq/cc), para el grupo control. El porcentaje de actividad de cada órgano se calculó considerando todas las muestras analizadas.

4.2.2.6. Seguimiento del crecimiento tumoral con [¹¹C]COL y [¹¹C]SAM

Para el seguimiento del crecimiento tumoral se utilizó el modelo murino de tumor xenográfico de CP humano descrito. Con dicho fin, se inocularon tres millones de células PC3, suspendidas en NaCl 0.9% (100-200 μ L), en ratones Nude machos de 9-11 semanas de edad. La inoculación se realizó por vía subcutánea a nivel del extremo superior de la pata anterior derecha de los ratones. Los tumores fueron controlados semanalmente, desde la semana posterior a la inoculación hasta la cuarta semana, mediante estudios por imagenología PET/CT post-inyección iv de [¹¹C]SAM (22.1-39.1 MBq en 100-200 μ L) y de [¹¹C]COL (14.1-45.4 MBq en 100-200 μ L). La adquisición de imágenes, la reconstrucción de los sinogramas y el procesamiento y análisis semi-cuantitativo se llevó a cabo según la metodología anteriormente descrita. Los volúmenes tumorales fueron medidos, una vez por semana, en dos dimensiones empleando un calibre. Los mismos se calcularon según: (diámetro menor)² x diámetro mayor x $\pi/6$.

4.2.2.7. Estudios dosimétricos de [¹¹C]SAM

Los cálculos dosimétricos (dosis absorbida y dosis efectiva), se basaron en estudios de biodistribución con [¹¹C]SAM en ratones Swiss a 10, 30 y 80 minutos (n=3, n=3 y n=1, respectivamente). Las biodistribuciones se realizaron acorde a la metodología descrita previamente en este capítulo. Con los datos obtenidos 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 puntos de medición y utilizando polinomios de primer grado. Para la estimación de la actividad acumulada se integró el área bajo la curva de las funciones encontradas en el ajuste de datos. A partir del último punto experimental, se asumió un decaimiento mono-exponencial, considerando solo el decaimiento físico (radioactivo) del compuesto, y se estimó el área bajo la curva desde este punto hasta infinito. El procesamiento matemático se realizó utilizando el software Wolfram Mathematica [79].

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/EXM, fueron considerados como distribuidos uniformemente dentro del resto del cuerpo (remainder). Debido a ello, el tiempo de residencia del remainder se calculó como la suma de los tiempos de residencia de: sangre, músculo, hueso, estómago, carcasa, intestino y vejiga y orina (sin vaciamiento de vejiga). La actividad acumulada para humanos se calculó mediante un escalado entre los pesos de ratón y de humano para cuerpo entero (CE) y por órganos. Para ello se utilizó la siguiente ecuación [80-81]:

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

Para realizar extrapolaciones dosimétricas a humanos hay dos softwares OLINDA disponibles: OLINDA/EXM V1.0 [82] y OLINDA/EXM V2.0 [83]. En el caso de OLINDA/EXM V1.0 se basa en los modelos dosimétricos matemáticos Cristy and Eckerman, considerando las recomendaciones del ICRP-60 [84] y el OLINDA/EXM V2.0 emplea los modelos derivados de ICRP-89 [85], considerando las recomendaciones de ICRP-103. OLINDA/EXM V2.0 proporciona información sobre la masa del contenido de la vejiga humana. Esto significa que esta y su contenido se pueden considerar como

fuentes explícitas en dicho software. Por el contrario, en OLINDA/EXM V1.0 no se dispone de esta masa, por lo que la vejiga y su contenido deben considerarse en el remainder. Debido a esto, se utilizó OLINDA/EXM V2.0 para estimar las dosis absorbidas y dosis efectivas por actividad administrada en humanos, con un tiempo de residencia del remainder que incluye sangre, músculo, huesos, estómago, carcasa e intestino. Dado que el contenido de la vejiga (orina) podía sobreestimar la irradiación, los tiempos de residencia se extrapolaron a humanos con y sin vaciamiento de vejiga.

4.2.2.8. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio \pm la desviación estándar (DE). Se utilizó la distribución de t de Student (test de dos colas), para comparar la captación de cada radiotrazador entre tumor y músculo, así como la captación tumoral entre los diferentes trazadores. El test se aplicó con un nivel de confianza del 95%.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Estudios *ex vivo* de biodistribución

Para caracterizar a [¹¹C]SAM desde un punto de vista biológico y estudiar su comportamiento *in vivo*, se realizaron estudios de biodistribución en ratones sanos (grupo control) y en el grupo tumoral. El modelo de tumor xenográfico de CP humano fue generado en ratones Nude machos, empleando la línea celular PC3. Como modelo control se utilizaron ratones Swiss machos.

Con el grupo control se realizaron biodistribuciones a diferentes tiempos post-administración de [¹¹C]SAM (10, 30 y 70 minutos). Estos resultados se resumen en la figura 20 y la tabla 7. La concentración de actividad en los riñones fue relativamente alta. La misma alcanzó un máximo a los 30 minutos post-inyección presentando un valor de $(8.61 \pm 0.08)\%$ de la AI. Este valor posteriormente disminuyó a $(4.72 \pm 0.14)\%$ de la AI a los 70 minutos de la administración. La mayor captación de actividad fue observada a nivel de vejiga y orina. En cambio, la acumulación en el hígado e intestino se mantuvo baja y constante durante todo el estudio (figura 20). Estos resultados sugieren que la eliminación del radiotrazador se da principalmente por excreción urinaria, lo que está en concordancia con la alta hidrofiliidad que presenta este compuesto ($\log P_{OCT} = -2.01 \pm 0.07$). Este perfil de eliminación es consistente con un trabajo previo, donde se estudió la distribución de [¹¹C]SAM en ratas. En este trabajo se destaca que, una parte de la actividad acumulada en riñón reflejaba la excreción renal del trazador, mientras que la

otra fracción se debía a la participación de la molécula en reacciones de transmetilación [42].

El % AI en vejiga y orina fue mayor del 50% a los 10 minutos post-inyección y fue aumentando con el tiempo hasta alcanzar el 80% a los 70 minutos (figura 20). Este perfil de eliminación podría llegar a comprometer la calidad de las imágenes debido a que una alta concentración de actividad en vejiga puede interferir con el correcto reconocimiento de la captación a nivel de la próstata o sus alrededores. Sin embargo, al presentar el compuesto una rápida eliminación, la realización de adquisiciones tardías podría constituir una opción para superar este posible inconveniente.

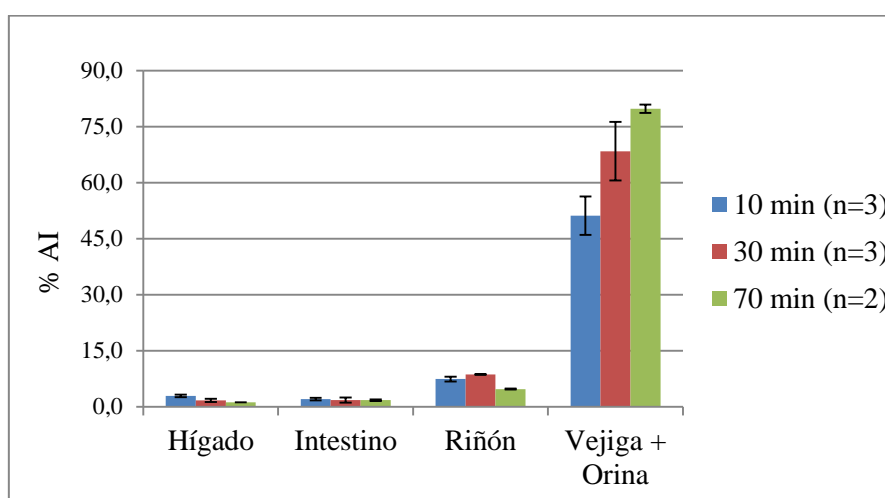


Figura 20. Perfil de eliminación de [^{11}C]SAM en el grupo control, basado en estudios de biodistribución.

La concentración de actividad en sangre fue disminuyendo con el tiempo. Inicialmente, a los 10 minutos post-inyección se obtuvo un valor de $(4.43 \pm 0.55)\%$ AI/g y a los 70 minutos quedó un remanente de $(0.84 \pm 0.37)\%$ AI/g (tabla 7). De esta forma se verificó una rápida depuración sanguínea del trazador. Además, el compuesto no mostró captación en otros órganos como ser: corazón, pulmones, bazo, músculo o hueso (tabla 7).

Tabla 7. Biodistribución de [¹¹C]SAM en el modelo control.

| Órgano o tejido | Captación de [¹¹ C]SAM ^[a] | | |
|-----------------|---|-----------------------|-----------------------|
| | 10 min ^[b] | 30 min ^[b] | 70 min ^[c] |
| Sangre | 4.43 ± 0.55 | 2.00 ± 0.77 | 0.84 ± 0.37 |
| Hígado | 1.46 ± 0.24 | 0.92 ± 0.19 | 0.71 ± 0.10 |
| Corazón | 1.15 ± 0.10 | 0.50 ± 0.05 | 0.25 ± 0.06 |
| Pulmón | 2.56 ± 0.33 | 1.09 ± 0.09 | 0.43 ± 0.06 |
| Bazo | 0.93 ± 0.10 | 0.62 ± 0.22 | 0.46 ± 0.02 |
| Riñón | 16.17 ± 1.64 | 19.43 ± 1.20 | 8.63 ± 0.21 |
| Músculo | 0.65 ± 0.12 | 0.26 ± 0.06 | 0.23 ± 0.16 |
| Hueso | 0.87 ± 0.10 | 0.36 ± 0.04 | 0.36 ± 0.28 |

^[a] Los resultados se expresaron como el promedio del % AI/g ± DE; ^[b] n=3; ^[c] n=2.

Para evaluar la captación tumoral del radiotrazador, se realizaron estudios de biodistribución de [¹¹C]SAM en el modelo de tumor xenográfico de CP. Los ensayos se realizaron a distintos tiempos post-administración del trazador (14, 30 y 70 minutos) (tabla 8). En este modelo, se observó el mismo patrón de biodistribución que el obtenido en el grupo control. Los ensayos mostraron acumulación significativa de actividad en los riñones. La mayor captación se detectó a nivel de vejiga y orina, presentando valores desde (53.22 ± 14.91)% de la AI a los 14 minutos post-inyección, hasta (78.47 ± 6.41)% de la AI a los 70 minutos. Se volvió a verificar que el trazador presenta una rápida depuración sanguínea y que no hubo captación en otros órganos. Este comportamiento es favorable para un radiofármaco de diagnóstico, ya que se espera que el mismo permanezca en el cuerpo solo el tiempo necesario para realizar el estudio y no presente uniones no deseadas, lo que aseguraría una baja dosis de irradiación. Por otra parte, la baja captación de fondo, permitiría generar una relación T/NT adecuada y una mejor calidad de imagen PET.

Tabla 8. Biodistribución de [¹¹C]SAM en el modelo tumoral.

| Órgano o tejido | Captación de [¹¹ C]SAM ^[a] | | |
|-----------------|---|-----------------------|-----------------------|
| | 14 min ^[b] | 30 min ^[b] | 70 min ^[c] |
| Sangre | 4.43 ± 0.98 | 1.94 ± 0.78 | 1.43 ± 0.94 |
| Hígado | 1.29 ± 0.35 | 0.98 ± 0.08 | 0.78 ± 0.17 |
| Corazón | 1.34 ± 0.47 | 0.50 ± 0.12 | 0.37 ± 0.16 |
| Pulmón | 2.13 ± 0.50 | 1.07 ± 0.24 | 0.64 ± 0.31 |
| Bazo | 0.92 ± 0.29 | 0.47 ± 0.04 | 0.48 ± 0.16 |
| Riñón | 15.49 ± 2.93 | 13.40 ± 3.36 | 12.03 ± 2.21 |
| Músculo | 0.67 ± 0.25 | 0.27 ± 0.06 | 0.18 ± 0.08 |
| Hueso | 0.92 ± 0.39 | 0.40 ± 0.09 | 0.30 ± 0.14 |
| Tumor | 2.43 ± 0.40 | 0.90 ± 0.11 | 0.58 ± 0.32 |
| Relación T/NT | 3.93 ± 1.27 | 3.37 ± 0.36 | 3.14 ± 0.69 |

^[a] Los resultados se expresaron como el promedio del % AI/g ± DE; ^[b] n=3; ^[c] n=5.

La captación de [^{11}C]SAM en el tumor se comparó con la obtenida a nivel del músculo (tejido de referencia). En este caso, la acumulación tumoral fue significativamente mayor que la alcanzada en el músculo a todos los tiempos analizados ($p < 0.05$) (figura 21). Esto se vio reflejado en la relación T/NT calculada, que presentó un valor máximo de $3,93 \pm 1,27$ a los 14 minutos post-inyección. Este valor disminuyó ligeramente a 3.37 ± 0.36 a los 30 minutos luego de la administración, permaneciendo relativamente constante hasta los 70 minutos (3.14 ± 0.69) (tabla 8 y figura 21). Esta diferencia entre la captación tumoral y muscular es esencial para lograr una detección y localización adecuada de los tejidos neoplásicos en el organismo.

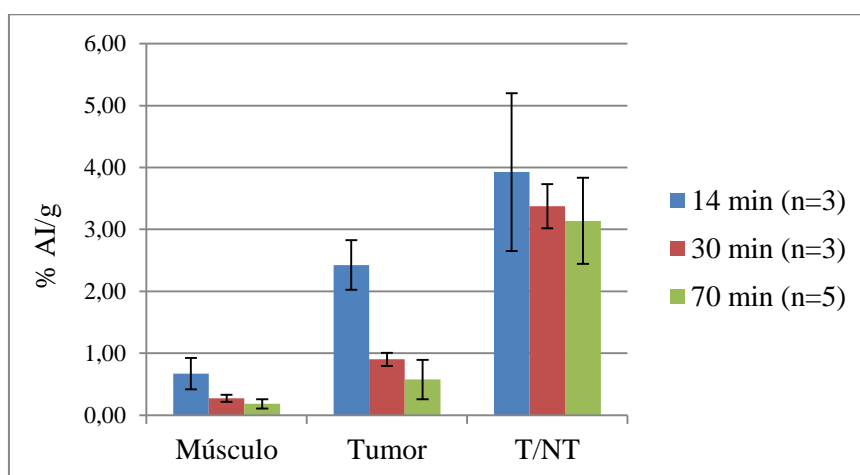


Figura 21. Evolución del % AI/g en función del tiempo para músculo, tumor y relación T/NT en el modelo tumoral post-inyección de [^{11}C]SAM, en base a estudios de biodistribución.

4.3.2. Estudios *in vivo* de imagenología molecular PET/CT

Para evaluar la distribución *in vivo* de [^{11}C]SAM también se realizaron estudios PET/CT del grupo control, así como de los ratones portadores de tumor. Los mismos se llevaron a cabo empleando una cámara PET/SPECT/CT para pequeños animales. Los estudios PET tanto estáticos, como dinámicos fueron co-registrados con el correspondiente CT para asegurar la localización anatómica.

Los estudios de imagen del grupo control mostraron alta acumulación urinaria de actividad (a nivel de riñón y vejiga). Lo que está en concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de biodistribución, (figura 22). Además, los estudios PET permitieron determinar que la concentración de actividad a nivel cerebral fue baja y se mantuvo constante a lo largo del tiempo. Esto probablemente se deba a que el compuesto

no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, como ha sido reportado anteriormente [42].

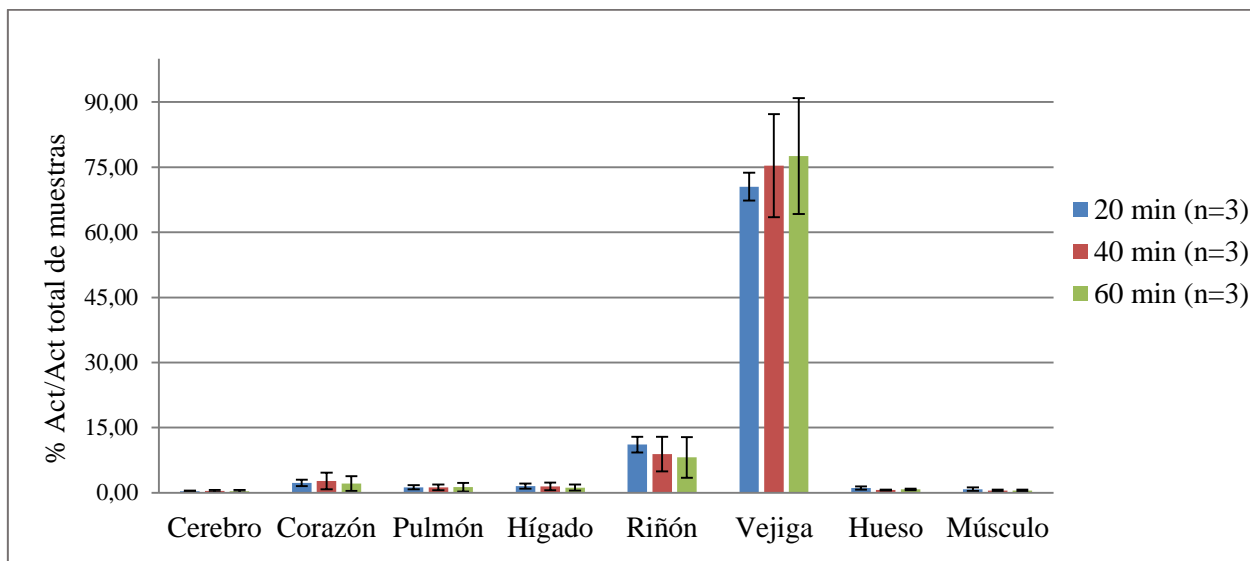


Figura 22. Evolución del % AI en función del tiempo para diferentes órganos en el grupo control post-inyección de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$, en base a estudios de imagenología.

Para evaluar el rol de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ como potencial agente diagnóstico para CP, se realizaron estudios imagenológicos PET/CT en el modelo tumoral. En este caso se seleccionó $[^{11}\text{C}]\text{COL}$ como radiofármaco de referencia para la comparación.

Los perfiles dinámicos de tumor y músculo contralateral para ambos radiotrazadores fueron evaluados mediante gráficos actividad-tiempo (figura 23). En el caso de $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$, los estudios PET mostraron una captación significativamente mayor a nivel tumoral en comparación con el músculo contralateral ($p < 0.05$). La concentración de actividad en el tumor fue aumentando con el tiempo, mientras que la captación muscular disminuyó, generando una relación T/NT promedio de $2,08 \pm 0,44$ a los 60 minutos de adquisición. Para el caso de $[^{11}\text{C}]\text{COL}$, la captación tumoral no presentó diferencias significativas en relación al músculo ($p > 0.05$), lo que se refleja en una relación T/NT más baja ($1,17 \pm 0,40$ a los 60 minutos de adquisición), figura 23.

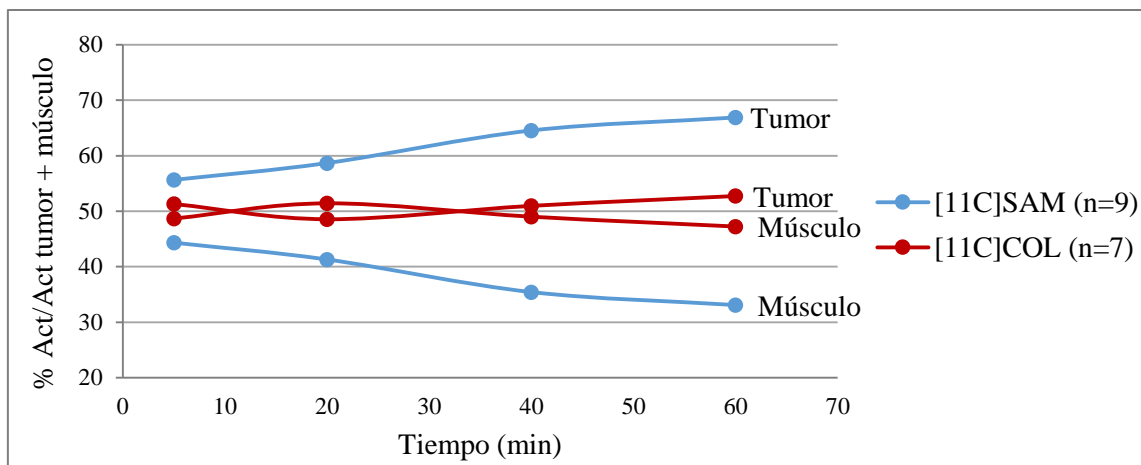


Figura 23. Curvas actividad-tiempo de captación tumoral y muscular para $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ y $[^{11}\text{C}]\text{COL}$ en ratones portadores de tumor, basado en estudios de imagenología.

La relación T/NT obtenida para $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ fue aumentando a lo largo del estudio, mientras que para el caso de $[^{11}\text{C}]\text{COL}$ presentó un patrón relativamente constante (figura 24). Esto es consistente con los perfiles de captación descritos anteriormente. Esta relación a su vez, fue significativamente mayor para $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ en comparación a la obtenida con $[^{11}\text{C}]\text{COL}$ para todos los tiempos analizados, excepto por el primer punto a los 5 minutos de adquisición, ($p < 0.05$). Esto se puede explicar debido al componente sanguíneo (pool sanguíneo) que inicialmente existe en los tejidos hasta su depuración. Los resultados anteriores indican que $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ presentó una captación tumoral *in vivo* estadísticamente mayor que $[^{11}\text{C}]\text{COL}$, en el modelo de tumor xenográfico de CP estudiado, (ver ejemplo de estudio PET/CT de la figura 25). Con estos resultados se puede establecer que, el radiofármaco en estudio presenta propiedades diagnósticas más adecuadas que el de referencia para el modelo tumoral considerado.

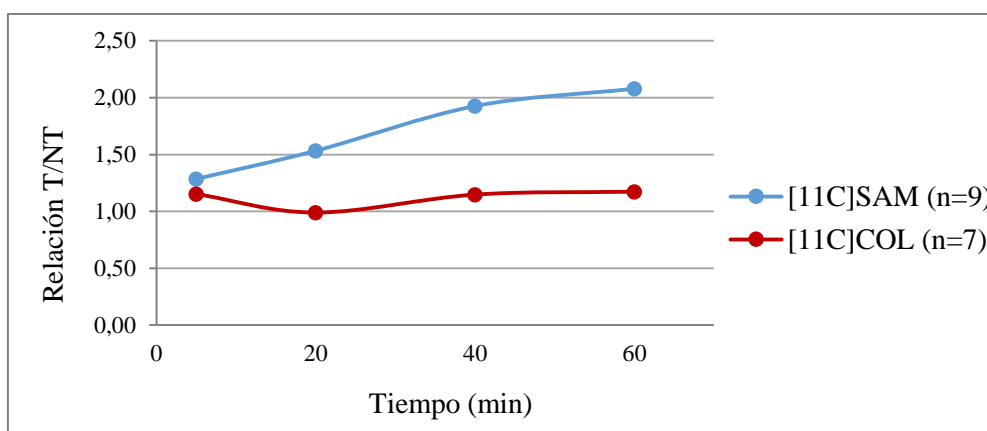


Figura 24. Evolución de la relación T/NT en función del tiempo para $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ y $[^{11}\text{C}]\text{COL}$ en el modelo tumoral, basado en estudios de imagenología.

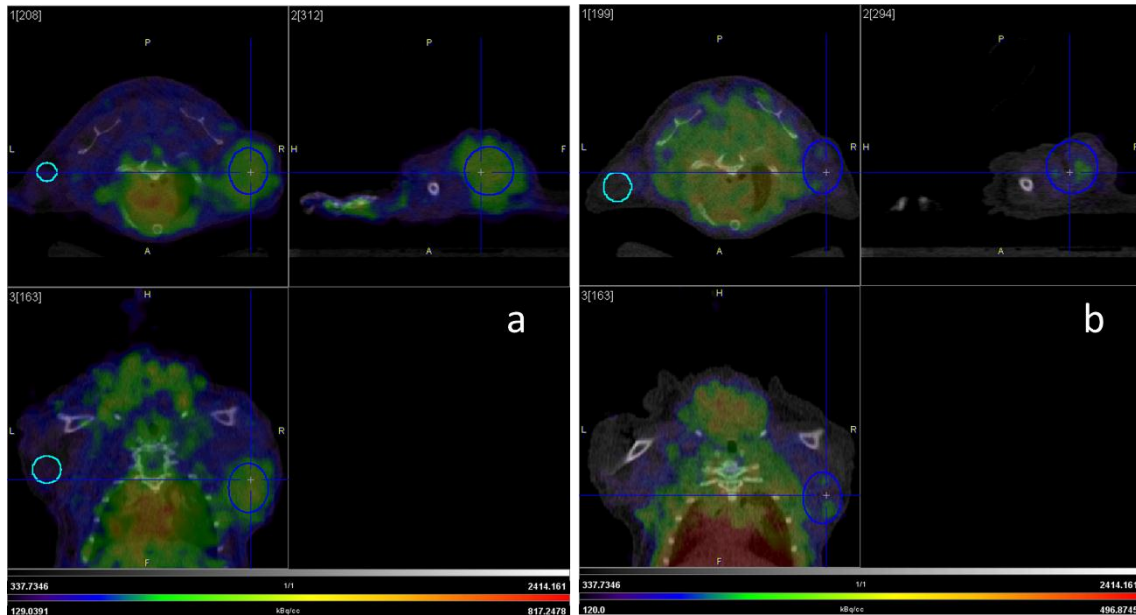


Figura 25. Ejemplo de imagen PET/CT de ratón portador de tumor, a los 60 minutos de adquisición post-inyección de: (a). $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$; (b) $[^{11}\text{C}]\text{COL}$. VOIs azules a nivel tumoral, VOIs celestes a nivel del músculo contralateral.

Los valores de T/NT obtenidos para $[^{11}\text{C}]\text{COL}$ fueron más bajos de lo esperado. Al tratarse de un radiofármaco que ha sido ampliamente utilizado en la clínica y que es conocido su mecanismo de captación, se hubiera esperado una acumulación tumoral significativamente mayor que la del músculo, lo que generaría valores mayores de relación T/NT. A partir de esto surge la interrogante de si los estudios PET/CT se realizaron cuando el tumor se encontraba en su punto óptimo de crecimiento. Para corroborar este punto se realizó un seguimiento del crecimiento tumoral como se describe a continuación.

4.3.3. Seguimiento del crecimiento tumoral con $[^{11}\text{C}]\text{COL}$ y $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$

Con la finalidad de corroborar que al momento que se realizaron los estudios PET/CT los tumores habían alcanzado un tamaño óptimo, se realizó una evaluación del crecimiento tumoral. Para ello se utilizó el modelo de tumor xenográfico de CP humano descripto. Una vez realizada la inoculación de las células tumorales en los ratones, los tumores fueron controlados semanalmente, desde la semana 1 post-inoculación hasta la semana 4, mediante estudios de imagen PET/CT con $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ y $[^{11}\text{C}]\text{COL}$. Además, se hizo un seguimiento de los volúmenes tumorales mediante la determinación de su medida una vez por semana.

En un inicio el ensayo se realizó empleando cuatro ratones, analizando los cuatro con $[^{11}\text{C}]\text{COL}$ y dos con $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$. Sin embargo, a lo largo del estudio el tumor de uno de ellos creció demasiado rápido y de modo dispar con respecto a los demás, por lo que este ratón fue descartado del ensayo quedándonos con un $n=3$ y un $n=1$ para $[^{11}\text{C}]\text{COL}$ y $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$, respectivamente. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 26 mediante gráficos que muestran los perfiles de la relación T/NT en función del tiempo de adquisición para las diferentes semanas analizadas con los dos radiotrazadores.

Para el caso de $[^{11}\text{C}]\text{COL}$ se puede observar que a la 4ª semana post-inoculación la relación T/NT presentó valores levemente mayores que los obtenidos para las semanas anteriores (figura 26a). Si bien estos resultados son visualmente mayores para la semana 4, no existe diferencia significativa con respecto a las demás semanas, por lo que estos ensayos no nos permiten concluir que la captación tumoral de $[^{11}\text{C}]\text{COL}$ aumente al aumentar el tamaño del tumor, ($p > 0.05$).

En relación a $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$, se observó un patrón similar, a la 4ª semana los valores de T/NT presentaron un perfil levemente mayor que los obtenidos para las semanas anteriores, excepto por el punto de 40 minutos de adquisición (figura 26b). Sin embargo, en este caso no fue posible sacar conclusiones debido a que se contó con un $n=1$ y sería necesario completar el ensayo aumentando las muestras a analizar.

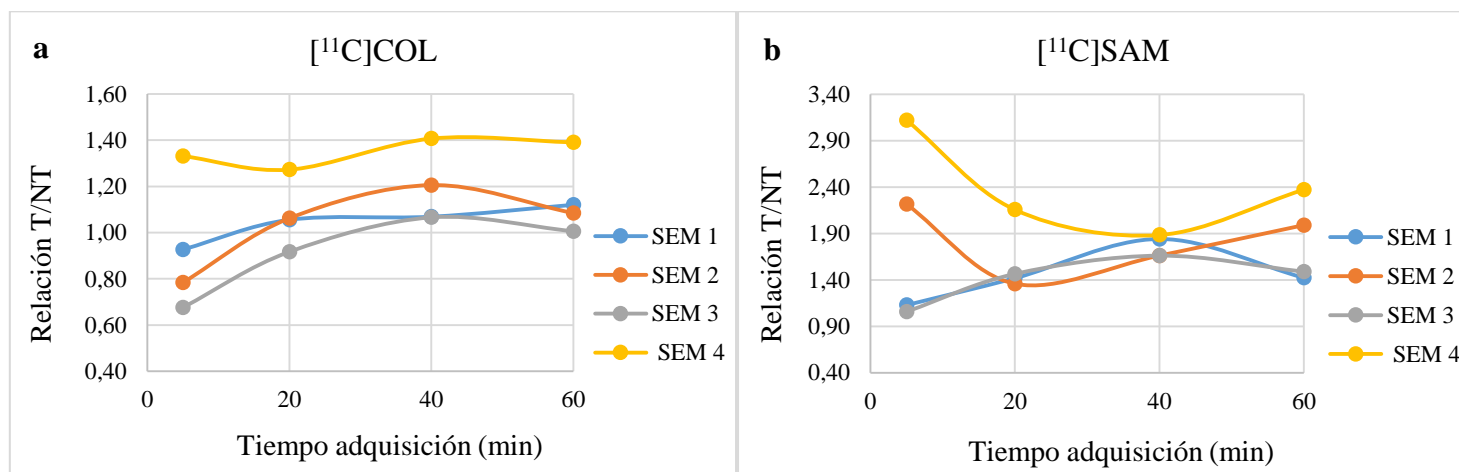


Figura 26. Variación del perfil de la relación T/NT en función del tiempo de adquisición para las diferentes semanas post-inoculación de células PC3 en ratones Nude, según estudios PET con: (a). $[^{11}\text{C}]\text{COL}$ ($n=3$) y (b). $[^{11}\text{C}]\text{SAM}$ ($n=1$).

De todos modos, al graficar los valores de T/NT obtenidos a los 60 minutos de adquisición para cada semana estudiada con ambos radiotrazadores (figura 27, tabla 9), se pudo

observar nuevamente que la captación tumoral de [¹¹C]SAM fue mayor que la obtenida para el radiofármaco de referencia.

Tabla 9. Relación T/NT para [¹¹C]SAM y [¹¹C]COL y volumen tumoral según la semana post-inoculación, en base a estudios PET/CT a los 60 minutos de adquisición.

| Semana post-inoculación | Relación T/NT | | Volumen tumoral (mm ³) |
|-------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| | [¹¹ C]SAM ^[a] | [¹¹ C]COL ^[b] | |
| 1 | 1.42 | 1.12 ± 0.16 | (ND-29) ^[c] |
| 2 | 1.99 | 1.08 ± 0.31 | (ND-34) ^[c] |
| 3 | 1.49 | 1.01 ± 0.39 | (32-58) |
| 4 | 2.37 | 1.39 ± 0.74 | (74-101) |

^[a] n=1; ^[b] Los resultados se expresaron como el promedio de la relación T/NT ± DE, n=3; ^[c] ND: no detectable.

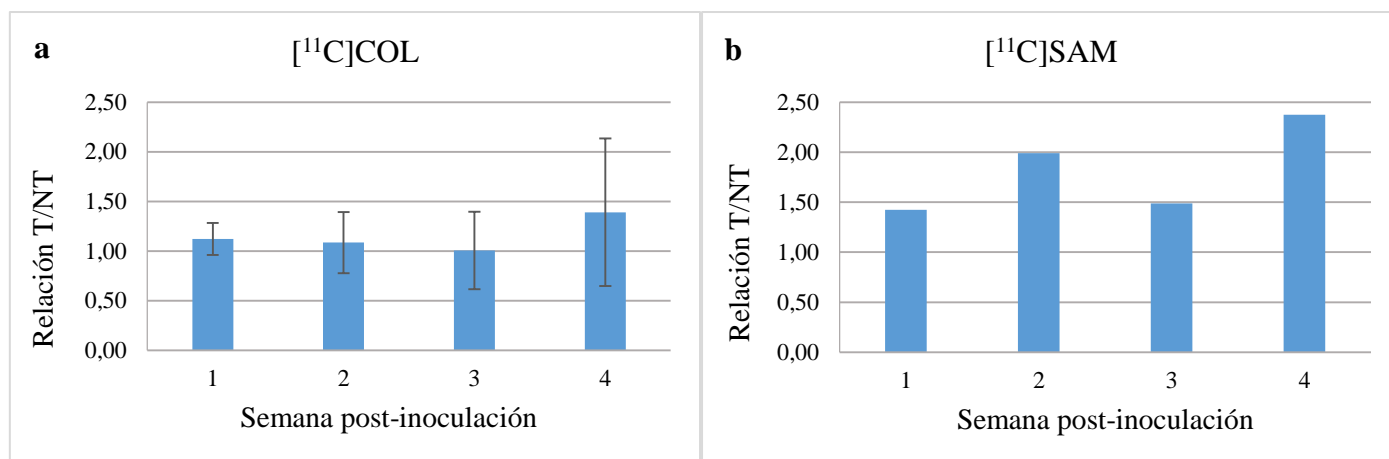


Figura 27. Evolución de la relación T/NT a lo largo de las semanas post-inoculación de células PC3 en ratones Nude, según estudios PET/CT con: (a). [¹¹C]COL (n=3) y (b). [¹¹C]SAM (n=1), a los 60 minutos de adquisición.

4.3.4. Estudios dosimétricos de [¹¹C]SAM

Se realizó la evaluación dosimétrica de [¹¹C]SAM 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 este radiotrazador. Para ello se utilizaron datos obtenidos a partir de biodistribuciones en ratones sanos a 10 y 80 minutos post-inyección del compuesto en estudio. En base a esto, se realizaron curvas de variación del % de AI en cada órgano a los diferentes tiempos analizados (figura 28a). Debido a que la actividad acumulada en vejiga y orina fue muy elevada con respecto al resto de los órganos (por estar involucradas en la vía de eliminación), se realizó un nuevo gráfico sin considerar dichos valores (figura 28b). En este último se pudo observar que la carcasa fue la que

presentó mayor captación a lo largo del período de estudio, seguida del riñón. La elevada captación que se observa en el riñón a los 10 minutos concuerda con lo reportado previamente en un estudio realizado en ratas con [^{11}C]SAM [42,81]. Se puede observar en la figura 28c la variación del % de AI para la vejiga, con y sin vaciamiento.

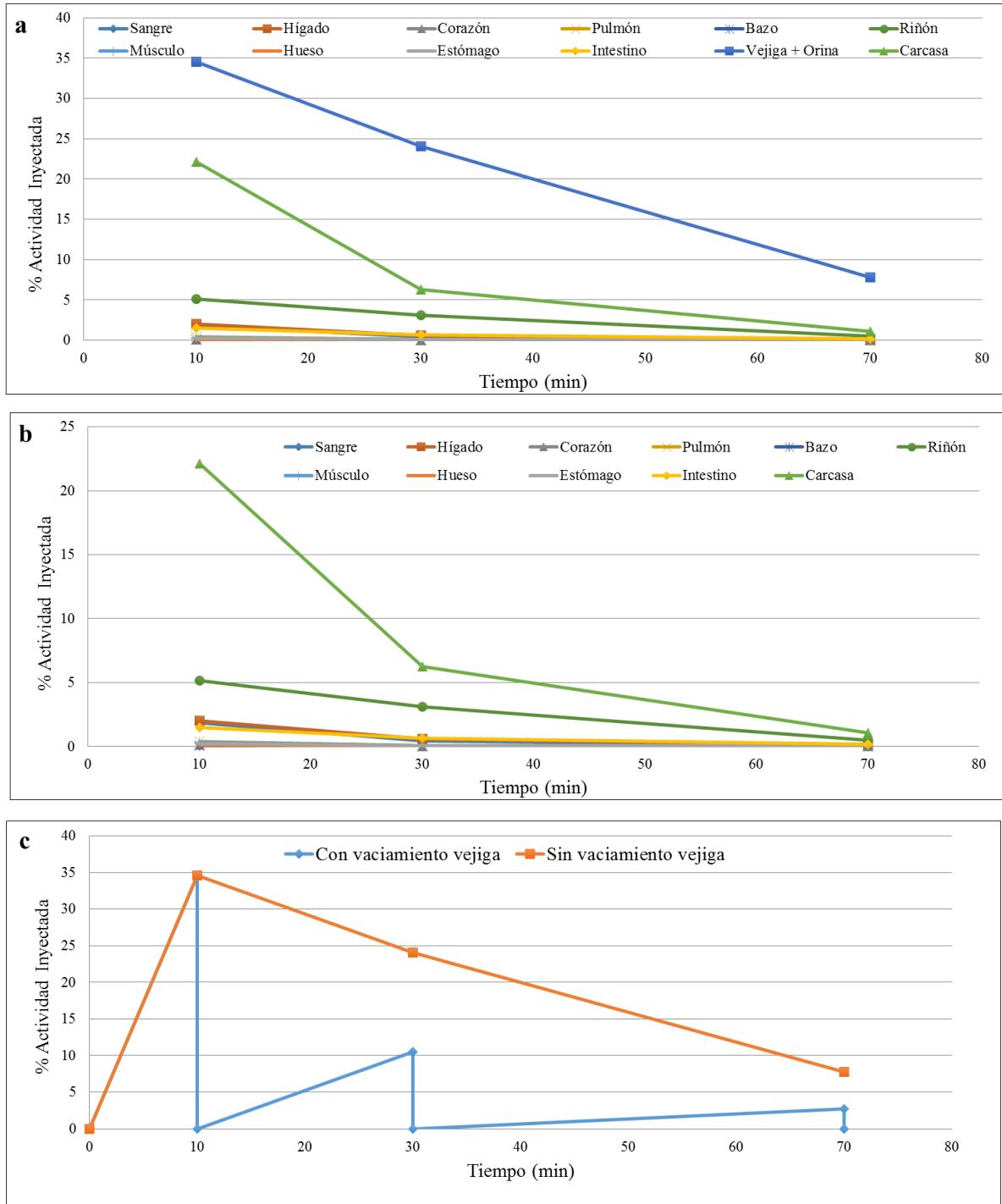


Figura 28. Porcentaje de actividad inyectada de [^{11}C]SAM en función del tiempo en ratones Swiss para: (a). todos los órganos medidos; (b). todos los órganos, excepto vejiga y orina; (c) vejiga con y sin vaciamiento.

Con la finalidad de calcular los tiempos de residencia para cada órgano, los datos de actividad-tiempo se adecuaron a un polinomio de primer grado. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 10. El mayor valor de tiempo de residencia a nivel de órgano fue observado para la vejiga y orina (sin vaciamiento de vejiga), seguido por la carcasa, vejiga y orina (con vaciamiento de vejiga) y riñón. La relación entre los tiempos de residencia de la vejiga y orina con y sin vaciamiento fue de 4, siendo mayor para el último caso.

Tabla 10. Tiempos de residencia para cada órgano de ratones Swiss inyectados con [¹¹C]SAM.

| Órgano | Tiempo de Residencia (h) |
|--|---------------------------------|
| Sangre | 7.14E-03 |
| Hígado y vesícula biliar | 8.53E-03 |
| Corazón | 4.22E-04 |
| Pulmón | 1.40E-03 |
| Bazo | 3.43E-04 |
| Riñón | 3.03E-02 |
| Músculo | 1.27E-03 |
| Hueso | 4.20E-04 |
| Estómago | 1.24E-03 |
| Intestino | 7.65E-03 |
| Carcasa | 9.06E-02 |
| Vejiga y orina (sin vaciamiento de vejiga) | 2.36E-01 |
| Vejiga y orina (con vaciamiento de vejiga) | 5.54E-02 |
| Remainder ^[a] | 3.45E-01 |

^[a] El remainder se refiere a la suma de los tiempos de residencia de: sangre, músculo, hueso, estómago, intestino, carcasa y vejiga y orina (sin vaciamiento de vejiga).

Para extrapolar a humanos los valores obtenidos en ratones, se empleó un modelo dosimétrico de humano masculino del software OLINDA/EXM V2.0. Tanto los valores utilizados para el cálculo como los resultados obtenidos se resumen en la tabla 11. La diferencia de masas entre el modelo humano y los órganos medidos de ratón se encontraron entre 2 a 4 órdenes de magnitud. El órgano que presentó mayor tiempo de residencia fue la vejiga y orina (sin vaciamiento), seguido de la vejiga y orina (con vaciamiento) y el riñón (sin considerar el remainder).

Tabla 11. Valores de masa y de factor S utilizados en el escalado para la determinación de los tiempos de residencia en humanos.

| Órgano | OLINDA/EXM V2.0 | | | |
|-------------------------------------|-------------------------|--|------------------------|---|
| | m_{humano} (g) | Factor S ^[a] (mGy/MBq-s) | $m_{\text{ratón}}$ (g) | τ_{humano} (h) ^[b] |
| Corazón (pared) | 330 | 2.11E-4 | 0.1400 | 5.03E-04 |
| Riñón | 310 | 2.36E-4 | 0.4746 | 1.00E-02 |
| Hígado | 1858 | 4.91E-5 | 1.8355 | 4.36E-03 |
| Pulmón | 1200 | 5.72E-5 | 0.2018 | 4.20E-03 |
| Bazo | 150 | 4.77E-4 | 0.1109 | 2.34E-04 |
| Contenido de vejiga sin vaciamiento | 211 | 1.91E-4 ^[c] | 0.1000 | 2.52E-01 |
| Contenido de vejiga con vaciamiento | 211 | 1.91E-4 | 0.1000 | 5.90E-02 |
| Remainder | 68941 | --- | 34.0023 | 1.11E-01 ^[d] |
| Cuerpo entero | 73000 | 1.65E-6 | 36.8650 | ----- |

^[a] Factor S: dosis absorbida por unidad de actividad acumulada; ^[b] τ : tiempo de residencia; ^[c]

Factor S para la pared de la vejiga considerando como fuente el contenido de la vejiga; ^[d]

Remainder tiene en cuenta sangre, músculo, hueso, estómago, carcasa e intestino.

Los valores de tiempo de residencia obtenidos se utilizaron como entrada en el software mencionado para estimar la dosis absorbida y dosis efectiva para cada órgano y para cuerpo entero. En la tabla 12 se resumen los resultados obtenidos con y sin vaciamiento de vejiga.

Tabla 12. Valores de dosis absorbida y dosis efectiva estimadas según el modelo de humano adulto masculino según OLINDA/EXM 2.0.

| Órgano blanco | OLINDA/EXM V 2.0 - masculino | | | |
|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| | Sin vaciamiento de vejiga | | Con vaciamiento de vejiga | |
| | Dosis absorbida total (mGy/MBq) | Dosis Efectiva ICRP-103 (mSv/MBq) | Dosis absorbida total (mGy/MBq) | Dosis Efectiva ICRP-103 (mSv/MBq) |
| Suprarrenales | 1.81E-03 | 1.68E-05 | 1.62E-03 | 1.49E-05 |
| Cerebro | 6.23E-04 | 6.23E-06 | 6.22E-04 | 6.22E-06 |
| Esófago | 8.32E-04 | 3.33E-05 | 7.87E-04 | 3.15E-05 |
| Ojo | 6.33E-04 | --- | 6.25E-04 | --- |
| Vesícula biliar (pared) | 1.45E-03 | 1.33E-05 | 1.27E-03 | 1.17E-05 |
| Colon izquierdo | 1.51E-03 | 7.31E-05 | 1.04E-03 | 5.03E-05 |
| Intestino delgado | 2.44E-03 | 2.25E-05 | 1.23E-03 | 1.14E-05 |
| Estómago (pared) | 9.34E-04 | 1.12E-04 | 8.61E-04 | 1.03E-04 |
| Colon derecho | 1.55E-03 | 7.54E-05 | 1.03E-03 | 4.98E-05 |
| Recto | 6.58E-03 | 1.51E-04 | 2.15E-03 | 4.94E-05 |
| Corazón (pared) | 8.66E-04 | 7.99E-06 | 8.25E-04 | 7.61E-06 |
| Riñón | 9.19E-03 | 8.48E-05 | 8.93E-03 | 8.24E-05 |
| Hígado | 1.23E-03 | 4.93E-05 | 1.13E-03 | 4.53E-05 |
| Pulmón | 1.22E-03 | 1.46E-04 | 1.19E-03 | 1.43E-04 |
| Páncreas | 1.08E-03 | 9.95E-06 | 9.38E-04 | 8.66E-06 |
| Próstata | 9.28E-03 | 4.29E-05 | 2.78E-03 | 1.28E-05 |
| Glándulas salivales | 7.03E-04 | 7.03E-06 | 7.01E-04 | 7.01E-06 |
| Médula roja | 1.66E-03 | 1.99E-04 | 9.00E-04 | 1.08E-04 |
| Células osteogénicas | 1.08E-03 | 1.08E-05 | 6.80E-04 | 6.80E-06 |
| Bazo | 1.08E-03 | 9.96E-06 | 9.86E-04 | 9.10E-06 |
| Testículo | 2.65E-03 | 1.06E-04 | 1.13E-03 | 4.53E-05 |
| Timo | 7.65E-04 | 7.06E-06 | 7.48E-04 | 6.90E-06 |
| Tiroides | 7.43E-04 | 2.97E-05 | 7.32E-04 | 2.93E-05 |
| Vejiga (pared) | 1.74E-01 | 6.96E-03 | 4.13E-02 | 1.65E-03 |
| Cuerpo entero | 2.20E-03 | --- | 1.09E-03 | --- |
| Dosis efectiva total (mSv/MBq) | --- | 8.17E-03 | --- | 2.49E-03 |

Para los órganos cercanos al contenido de la vejiga (pared de la vejiga, intestino delgado, recto, próstata y testículos) se verificó que los valores de dosis absorbida sin vaciamiento de vejiga fueron entre 2 a 4 veces mayores que con vaciamiento. Para el caso de los órganos alejados al contenido de la vejiga, los valores de dosis absorbida con y sin

vaciamiento de vejiga se encontraron en el mismo orden de magnitud. Esto demuestra que es importante tener en cuenta esta consideración.

En ambos casos se observó que la mayor dosis absorbida fue a nivel de la pared de la vejiga, por lo que la misma se identificó como órgano crítico. Además, el riñón (en ambas situaciones) y la próstata (sin vaciamiento de vejiga) recibieron dosis ligeramente elevadas de entre $8.9\text{E-}03$ – $9.3\text{E-}03$ mGy/MBq.

Las dosis efectivas totales a partir del OLINDA/EXM V2.0, usando el modelo dosimétrico masculino ICRP-89, fueron de $8.17\text{E-}03$ mSv/MBq y $2.49\text{E-}03$ mSv/MBq sin y con vaciamiento de vejiga, respectivamente. Estos resultados se encuentran en el mismo orden de magnitud que los datos reportados por Tolvanen *et al.* para otros radiofármacos de ^{11}C de uso clínico (valores de dosis efectivas totales reportados entre $3.2\text{E-}03$ y $1.41\text{E-}02$ mSv/MBq) [81].

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 ^{11}C . Dado que en los mismos se inyecta entre 4-6 MBq/kg, lo que equivale a una administración de entre 292-438 MBq para un paciente de 73 kg, la dosis efectiva en este caso se encontraría entre 2.38-3.58 mSv y 0.73-1.09 mSv, sin y con vaciamiento de vejiga, 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 humanos.

4.4. Conclusiones

Se logró realizar la evaluación biológica de [^{11}C]SAM en un modelo de ratón sano (grupo control) y en un modelo de tumor xenográfico de CP humano (grupo tumoral), mediante estudios de biodistribución e imagenología molecular PET/CT. En base a los ensayos realizados con el grupo control, se observó mayor captación de actividad a nivel de riñón, vejiga y orina. Estos resultados indican una alta eliminación del compuesto por excreción urinaria. Además, se verificó una rápida depuración sanguínea del radiotrazador y no se observó captación en otros órganos. Los estudios realizados utilizando el modelo tumoral permitieron evaluar la captación tumoral de [^{11}C]SAM. La concentración de actividad a nivel del tumor fue significativamente mayor que la obtenida para el músculo en todos

los tiempos analizados. Los estudios de imagenología PET/CT mostraron una captación tumoral *in vivo* de [¹¹C]SAM estadísticamente mayor que la obtenida con [¹¹C]COL en el modelo tumoral estudiado. Estos resultados sugieren que [¹¹C]SAM podría ser potencialmente útil como agente diagnóstico por imagen para el CP, e incluso más efectivo que el radiofármaco tomado como referencia.

En base al ensayo de seguimiento del crecimiento tumoral se pudo dilucidar que la captación tumoral de [¹¹C]COL no varió significativamente al aumentar el tamaño del tumor para el modelo animal evaluado. Con respecto a [¹¹C]SAM sería necesario completar el ensayo aumentando las muestras a analizar para poder sacar conclusiones.

Se realizaron los estudios de dosimetría, de modo de evaluar la seguridad radiológica de la [¹¹C]SAM. 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 [¹¹C]SAM habilita su uso en pacientes, al ser del orden de otros radiofármacos empleados en la clínica.

En resumen, en base a los resultados obtenidos se pudo concluir que el nuevo radiotrazador podría ser útil y seguro para su aplicación en pacientes. Lo que habilita a la realización de un protocolo clínico piloto para evaluar su potencial utilidad para el diagnóstico de CP.

4.5. Información adicional

Cabe destacar que 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. Este trabajo dio lugar a la redacción de un artículo que fue enviado recientemente a una revista referada.

5. CAPÍTULO IV: Ensayo clínico con [¹¹C]SAM

5.1. Introducción

Se planteó desarrollar un ensayo clínico con el objetivo de evaluar nuevas técnicas de imagenología molecular mediante el uso de radiotrazadores PET, con el potencial de impactar en el manejo clínico de pacientes con CP metastásico o en recaída bioquímica. Dichos pacientes ya deben haber sido tratados en su enfermedad primaria mediante cirugía o radioterapia con intención curativa.

Según el decreto Ref N° 001-4573/2007 [86] un ensayo clínico se define como “un estudio sistemático, siguiendo en un todo las pautas del método científico en seres humanos voluntarios, sanos o enfermos, realizado con medicamentos y/o especialidades medicinales con el objeto de descubrir o verificar los efectos y/o identificar reacciones adversas del producto en investigación y/o estudiar la absorción, distribución, metabolismo (biotransformación) y excreción de los principios activos con el objeto de establecer su eficacia y seguridad”.

Para poder llevar a cabo un ensayo clínico es necesario contar con un protocolo de investigación que se define como “el documento que describe la investigación en sus aspectos fundamentales, hipótesis y metodología, informaciones relativas al sujeto de la misma, la calificación de los investigadores y de todas las instancias responsables”. El mismo debe ser presentado y aprobado ante un Comité de Ética en Investigación Institucional [86]. En tal sentido, para la realización del ensayo clínico en estudio se redactó un protocolo de investigación (Anexo II), en concordancia con la normativa nacional vigente (decreto mencionado) así como con las guías de ética de investigación en biomedicina internacionales [86-87], y el mismo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Institucional de CUDIM.

Nuestro protocolo plantea como hipótesis nula que el PET/CT con [¹¹C]SAM presenta valor diagnóstico en pacientes con CP en recaída bioquímica. Para verificar la validez de esta hipótesis se establecieron los siguientes objetivos específicos: a) comparar los resultados del PET/CT con [¹¹C]SAM con los de [⁶⁸Ga]PSMA; b) comparar intraindividualmente la captación de ambos radiofármacos por parte de las lesiones detectadas en la muestra a analizar.

El protocolo del ensayo clínico debe incluir los aspectos que se detallan a continuación:

- Hoja de presentación: incluye el título del proyecto y se definen los investigadores responsables, los alternos y el equipo de investigación, con sus respectivos roles. Además de definir las instituciones participantes.
- Descripción de la investigación: incluye un resumen de la investigación, la descripción de los objetivos, antecedentes científicos y datos que justifiquen la investigación, descripción detallada del proyecto de investigación (materiales y métodos, bibliografía), resultados esperados, balance riesgo beneficio, período y duración de la investigación a partir de la aprobación, equipamiento disponible y declaración de la divulgación de resultados.
- Información relativa al sujeto de investigación: descripción de la población a estudiar incluyendo mecanismos de reclutamiento, criterios de inclusión y exclusión, redacción del formulario de consentimiento informado incluyendo la información a ser ofrecida a los sujetos de investigación y declaración de cualquier compensación que se otorgue a los participantes, indemnización en caso de daño como consecuencia del estudio.
- Clasificación de los investigadores participantes: se deben presentar los antecedentes del equipo de investigación que demuestren que tiene idoneidad y experiencia en la temática propuesta.

5.2. Parte experimental

5.2.1. Materiales y equipos

Para la producción de radionucleidos el CUDIM cuenta con un ciclotrón PET Trace®16.5 MeV (GE Healthcare). Además, existe un suministro permanente de generadores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ para la obtención de ^{68}Ga . Asimismo se dispone de un sector de producción de radiofármacos, que operan en ambiente controlado cumpliendo normas de buenas prácticas de manufactura (GMP). Dicho sector dispone de plataformas para la producción de radiofármacos de ^{11}C y ^{68}Ga , sistema de acondicionamiento de aire (en cuanto a limpieza, temperatura y humedad), gases y agua de alta pureza. Se cuenta además con un Laboratorio de Control de Calidad de Radiofármacos. El centro está equipado con dos salas con equipos PET/CT: un equipo General Electric Discovery STE con tomógrafo de 16 cortes y un equipo General Electric Discovery 690 VCT con tomógrafo de 64 cortes. Para el procesamiento de imágenes se dispone de cuatro estaciones de trabajo General

Electric (plataforma HP Workstation y software LINUX con aplicación propietaria), dos AW 4.5 y dos AW 4.6.

5.2.2. Métodos

Se trata de un estudio prospectivo en donde se incluirán 5 pacientes con CP en recaída bioquímica. Los pacientes se realizarán consecutivamente un estudio PET/CT con [⁶⁸Ga]PSMA y otro con [¹¹C]SAM. El intervalo máximo de tiempo será de 2 semanas entre ambos estudios PET/CT.

Los procesos de síntesis y control de calidad de [¹¹C]SAM y [⁶⁸Ga]PSMA se detallan en el protocolo de investigación (Anexo II).

Criterios de admisión de pacientes al protocolo clínico:

Criterios de inclusión:

- Pacientes con CP metastásico o en recaída bioquímica confirmados por anatomía patológica del tumor primario y dosificación reciente de PSA con valores superiores a 0.4 ng/mL.

Criterios de exclusión:

- Expectativa de vida < 6 meses.
- Presencia de otras enfermedades neoplásicas concomitantes.
- Intervalo > 2 semanas entre ambos estudios PET/CT.
- Intervalo > 30 días entre la dosificación de PSA y los estudios PET/CT.
- Pacientes portadores de hepatopatía con bilirrubinas aumentadas y transaminasas mayores a 1.5 veces por encima del límite superior del rango normal.
- Pacientes con insuficiencia renal.
- Pacientes que no brinden su consentimiento informado.

El paciente tendrá la libertad de retirarse del estudio en cualquier momento, siendo su participación voluntaria. En caso de no participar, este hecho no alterará la atención que recibirá, lo cual será especificado en el consentimiento informado.

5.3. Resultados esperados

La comparación de la captación de [¹¹C]SAM con la correspondiente al [⁶⁸Ga]PSMA en la misma muestra de pacientes evaluará aspectos diferentes de la biología tumoral de la

muestra a estudiar. Asimismo, y de confirmarse la hipótesis planteada, permitirá poner a punto una nueva metodología diagnóstica que podrá ser usada posteriormente en otros contextos clínicos de la enfermedad. El presente proyecto intenta realizar aportes significativos con un gran potencial de traslación a la rutina clínica asistencial en un área de alta relevancia sanitaria como lo es el CP. Estos aportes se realizan en un área de gran interés académico y asistencial como lo es el área de las imágenes moleculares. El proyecto tiene vínculos naturales con las líneas de trabajo centradas en el desarrollo y validación clínica de radiofármacos de aplicación oncológica provenientes de las Facultades de Química y de Medicina.

El presente protocolo clínico se encuentra en ejecución.

5.4. Conclusiones

Se valora en forma positiva haber alcanzado esta etapa, que implica un trabajo multidisciplinario entre las diferentes áreas del centro. De esta forma, se ha realizado un trabajo de investigación con potencial aplicación a pacientes en el contexto de un ensayo clínico preliminar que está en curso.

La realización del presente ensayo clínico aportará elementos para aceptar o rechazar la hipótesis planteada.

6. CAPÍTULO V: Comparación *in vivo* de [¹¹C]MET con [¹¹C]COL en un modelo murino de tumor xenográfico de CP

6.1. Introducción

La *L*-metionina es un aminoácido esencial implicado en la síntesis de proteínas y múltiples vías metabólicas tales como la regulación y síntesis de ADN. Los gliomas, al igual que otras neoplasias, presentan un metabolismo proteico elevado en comparación con los tejidos normales. Debido a esto se espera que la captación de [¹¹C]MET se encuentre aumentada en dichas patologías. Los estudios PET con este radiofármaco se aplican en la clínica para la evaluación de los tumores primarios del sistema nervioso central [88]. A su vez, la [¹¹C]MET puede ser de utilidad en determinados casos para la localización preoperatoria de adenoma de paratiroides en pacientes con hiperparatiroidismo primario [89].

Con el propósito de contar con otros compuestos marcados con radionucleidos PET que permitan el diagnóstico del CP, nos centramos en identificar intermediarios metabólicos relacionados con la ruta bioquímica de la sarcosina. Esta búsqueda se realizó sobre la base de que si la enzima GNMT se encuentra sobreexpresada, se esperaría que los sustratos directos e indirectos de la misma se estén captando y consumiendo en mayor proporción. En tal sentido, en base a la ruta bioquímica de síntesis de sarcosina (figura 29) se identificó a la metionina como molécula precursora en la biosíntesis de SAM y a la glicina como un sustrato natural de la GNMT y precursora de sarcosina.

En este punto, se decidió comenzar a trabajar con la [¹¹C]MET dado que es un radiofármaco de uso clínico que ya estaba desarrollado y disponible en el centro. Por lo tanto, para evaluar el rol de este radiofármaco en el diagnóstico de CP, se llevaron a cabo estudios PET/CT en un modelo murino de tumor xenográfico de CP, tomando como referencia [¹¹C]COL.

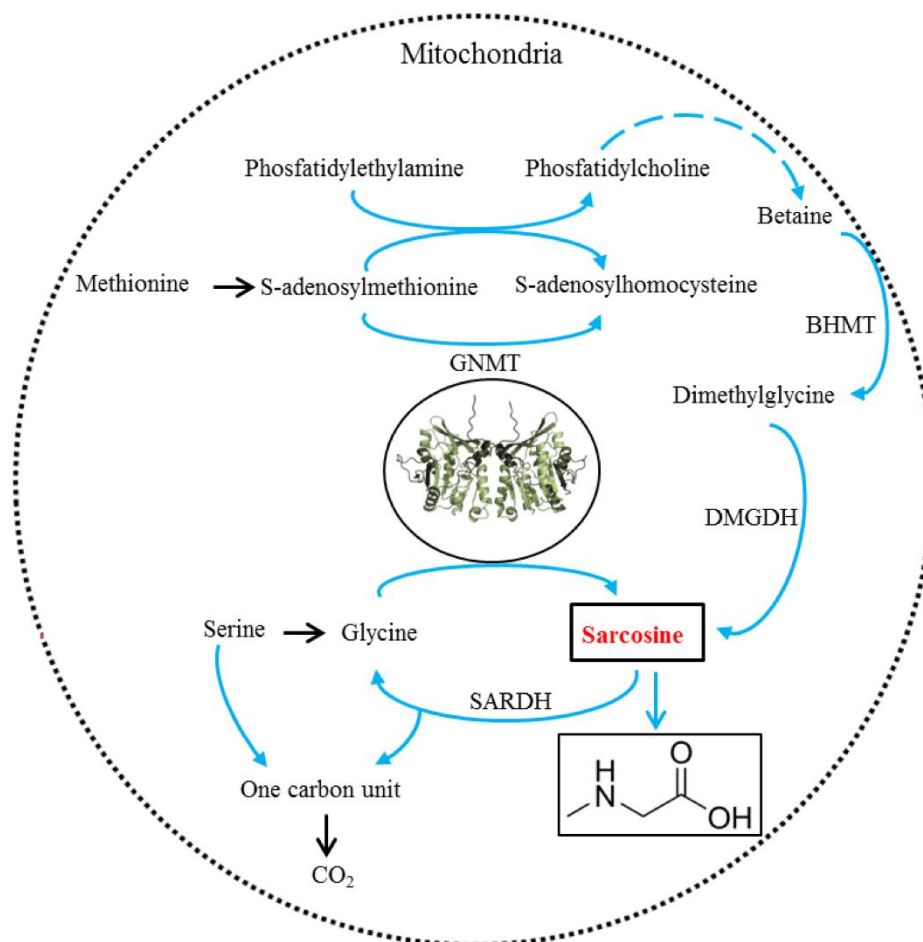


Figura 29. Esquema de ruta bioquímica que involucra la síntesis enzimática de sarcosina.

6.2. Parte experimental

6.2.1. Materiales y equipos

Los reactivos y disolventes utilizados fueron de calidad analítica (ABX, Merck, Sigma-Aldrich, Carlo Erba, Dorwil, Capricorn Scientific, Gibco) y se usaron sin purificación adicional. El $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ empleado en las reacciones de marcación fue producido en un ciclotrón PET Trace® 16.5 MeV (GE Healthcare). Para dicha producción se utilizó un blanco de alto rendimiento conteniendo una mezcla de N_2 y 1.0% O_2 (Praxair o Airliquide). Las radiosíntesis se desarrollaron en un módulo TRACERlab® FX C Pro (GE Healthcare). Para los ensayos biológicos se utilizó $[^{11}\text{C}]\text{COL}$ sintetizada y controlada de acuerdo con lo descrito en el capítulo II. Los cartuchos Sep-Pak C18 light y los filtros esterilizantes de 0.22 μm empleados en la síntesis de $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ fueron comprados a Waters. La pureza radioquímica de $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ fue evaluada por HPLC, empleando un equipo Shimadzu UFLC equipado con detectores de arreglo de diodos y gamma en serie. La columna de HPLC analítica utilizada fue una EC 250/4.6 mm Nucleodur 100-5 C18ec

(Macherey-Nagel). Los estándares de *D,L*-metionina y el precursor (*L*-Homocisteina tiolactona cloridrato) empleados para la síntesis y el control de calidad, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y ABX, respectivamente. Para las determinaciones de actividad se empleó una cámara de ionización (Capintec® CRC 25R, CRC 25 PET). Para los ensayos biológicos se utilizaron ratones machos Nude N: NIH (S) -Foxn 1^{nu}, provenientes del bioterio del CUDIM. Para el desarrollo del modelo de tumor xenográfico de CP humano, se adquirió la línea celular PC3 (ATCC® ATCC® CRL-1435™) en American Type Culture Collection Cell. Los estudios de imagenología molecular se realizaron empleando una cámara trimodal PET/SPECT/CT para pequeños animales (Triumph™, TriFoil, Inc., US). El procesamiento y análisis semi-cuantitativo de las imágenes se llevó a cabo con el software PMOD, v.3.4. (PMOD Technologies, Ltd., Zurich, Suiza).

6.2.2. Métodos

6.2.2.1. Síntesis de [¹¹C]COL y [¹¹C]MET

Los procesos sintéticos se realizaron utilizando la plataforma automatizada TRACERlab® FX C Pro descrita anteriormente. Los lotes de [¹¹C]COL fueron sintetizados y controlados de acuerdo con lo descrito en el capítulo II. La síntesis de [¹¹C]MET se llevó a cabo de acuerdo al método reportado de ¹¹C-metilación del precursor *L*-Homocisteina tiolactona cloridrato en fase sólida [90]. En este caso se utilizó [¹¹C]CH₃I producido en el módulo, como agente metilante. El mismo fue transferido a través de un cartucho Sep-Pak C18 light cargado con una solución del precursor *L*-Homocisteina tiolactona cloridrato (2 mg disueltos en 1 mL de NaOH:etanol (50/50; v/v)). El producto fue eluido con buffer NaH₂PO₄ 0.05 M (5.5 mL) y formulado con NaCl 0.9% (4.4 mL). La solución final se transfirió a un vial estéril a través de un filtro de esterilización de 0.22 µm. El producto fue sometido a los ensayos de control de calidad. El compuesto obtenido fue analizado por HPLC, empleando las siguientes condiciones: columna analítica C18, KH₂PO₄ 1.4 g/L (A) y acetonitrilo (B) como disolventes, gradiente: 0-11 min: de 1 a 3% B, flujo total de 1.0 mL/min. Los cromatogramas se registraron empleando detectores de arreglo de diodos (UV, λ=225 nm) y centelleo sólido (gamma) en serie, (método 5). El radiotrazador se obtuvo con una pureza radioquímica > 90%.

6.2.2.2. Animales de experimentación y línea celular

Se utilizaron ratones Nude machos para generar el modelo de tumor xenográfico de CP empleado en los estudios de imagenología PET/CT. Los animales fueron mantenidos según lo descrito en la parte experimental del capítulo III.

En el desarrollo del modelo tumoral se empleó la línea celular de CP humano PC3. Las células se cultivaron de acuerdo a lo descrito en la parte experimental del capítulo III.

Como se mencionó anteriormente, los protocolos de experimentación animal se realizaron de acuerdo con pautas institucionales, nacionales e internacionales para el uso de animales de investigación, con la aprobación del Comité de Bioética del CUDIM y bajo las regulaciones éticas de la ley nacional de experimentación animal No. 18.611 (Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA), Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA)). Número de protocolo 14060301.

6.2.2.3. Desarrollo del modelo tumoral

Para los ensayos biológicos se utilizó un modelo de tumor xenográfico de CP. El mismo se generó empleando ratones Nude y la línea celular PC3, según lo descrito en la parte experimental del capítulo III. A las cuatro semanas post-inoculación se alcanzaron volúmenes tumorales apropiados de entre (100-350) mm³. Los tumores fueron medidos en dos dimensiones empleando un calibre, una vez por semana. Los volúmenes tumorales se calcularon como: (diámetro menor)² x diámetro mayor x $\pi/6$.

6.2.2.4. Estudios *in vivo* de imagenología molecular PET/CT

Se realizaron estudios de imagenología PET/CT empleando una cámara micro PET/SPECT/CT para pequeños animales. El modelo animal empleado fue el modelo tumoral descrito anteriormente. Los animales se anestesiaron con isofluorano al 2% en flujo de oxígeno (2 L/min) y fueron inyectados con los diferentes radiotrazadores bajo cámara por vía iv, en la vena dorsal de la cola. En el caso de [¹¹C]MET las actividades inyectadas fueron de 11.7-27.3 MBq en 100-200 μ L y las de [¹¹C]COL de 9.4-21.6 MBq en 100-200 μ L. Las imágenes fueron adquiridas entre las 13-14 semanas de edad, al alcanzar un tamaño tumoral óptimo para su estudio (100-350 mm³).

La adquisición de imágenes fue realizada en modo dinámico comenzando a t=0 post-administración del radiotrazador y durante 60 minutos (10 frames \times 30 segundos, 5

frames \times 5 minutos, 3 frames \times 10 minutos). El análisis por CT se realizó durante 1.98 minutos. Los ratones fueron escaneados en orden aleatorio.

Los sinogramas fueron reconstruidos utilizando el algoritmo Maximum Likelihood-Expectation Maximization 3D (3D-MLEM) con 30 iteraciones.

El procesamiento y análisis semi-cuantitativo de las imágenes se llevó a cabo con el software PMOD, v.3.4. Los estudios PET fueron co-registrados con el correspondiente CT para asegurar la localización anatómica. Se construyeron VOIs de forma manual sobre el tumor y músculo contralateral, para calcular la relación T/NT. La concentración de actividad dentro de cada VOI fue expresada como Hot Spot Average 5 (promedio de los 5 puntos más calientes en kBq/cc).

6.2.2.5. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio \pm DE. Se utilizó la distribución de t de Student (test de dos colas), para comparar la captación tumoral entre los diferentes trazadores. El test se aplicó con un nivel de confianza del 95%.

6.3. Resultados y discusión

Con el fin de evaluar el rol que podría tener el radiofármaco [^{11}C]MET en el diagnóstico de CP, se realizaron estudios imagenológicos PET/CT en el modelo de tumor xenogénico de CP. Al igual que en el caso de [^{11}C]SAM, para la comparación se tomó como radiofármaco de referencia [^{11}C]COL. Los exámenes PET dinámicos fueron co-registrados con CT para asegurar la localización anatómica.

Los valores de la relación T/NT calculados para cada ratón con los dos radiotrazadores, así como sus promedios, se resumen en la tabla 13.

Tabla 13. Valores de relación T/NT a los 60 minutos de adquisición luego de la inyección de [¹¹C]MET y [¹¹C]COL.

| Radiotrazador | Ratón | Relación T/NT ^[a] | Relación T/NT promedio |
|-----------------------|--------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| [¹¹ C]MET | R1 | 1.12 | 1.24 ± 0.11 ^[b] |
| | R2 | 1.32 | |
| | R3 | 1.28 | |
| [¹¹ C]COL | R1 | 1.31 | 1.24 ± 0.48 ^[b] |
| | R2 | 1.68 | |
| | R3 | 0.73 | |

^[a] Relación T/NT a los 60 minutos de adquisición; ^[b] Los resultados se expresaron como el promedio de la relación T/NT ± DE, (n=3).

En este caso, el presente estudio no mostró diferencias significativas entre las relaciones T/NT de ambos trazadores, ($p > 0.05$). Esto sugiere que la captación tumoral de [¹¹C]MET fue comparable con la obtenida con [¹¹C]COL en el modelo tumoral utilizado en los estudios. Por lo que, en base a los ensayos realizados, el empleo de [¹¹C]MET como agente diagnóstico para CP, a priori no presentaría ventajas apreciables con respecto al radiofármaco de referencia.

6.4. Conclusiones

Los estudios PET realizados permitieron evaluar la captación tumoral de [¹¹C]MET en el modelo de tumor xenográfico de CP humano estudiado. Las relaciones T/NT obtenidas no mostraron diferencias significativas entre el radiofármaco en estudio y el de referencia, [¹¹C]COL.

7. CAPÍTULO VI: Estudios *in silico* de derivados de SAM

7.1. Introducción

Los experimentos *in silico* son simulaciones o reproducciones de experimentos *in vivo* o *in vitro*, que emplean modelos matemáticos y softwares de simulación. Estos permiten modelizar fenómenos naturales. La interrelación de las ciencias biológicas con las ciencias de la computación y la ingeniería han permitido construir y resolver modelos matemáticos que permiten llevar a una computadora un determinado fenómeno. Estos modelos permiten progresar intelectualmente sobre un determinado fenómeno, pensando en las variables que podrían influir sobre él sin producir grandes gastos y a velocidades apreciables. Permiten simular situaciones reales, modificando los valores de las variables involucradas en un amplio rango y contrastarlos con los valores reales [91].

En este campo, el acoplamiento molecular (docking) es un método que permite predecir modos de enlace entre ligandos y proteínas, así como estimar la conformación preferencial que adoptará el ligando al estar unido a la proteína, con el fin de formar un complejo estable [92]. El conocimiento de los modos de unión a su vez puede ser usado para predecir la fuerza de la asociación o la afinidad de enlace entre las dos moléculas, usando por ejemplo, las funciones de puntuación (o funciones de scoring). El acoplamiento molecular es muy utilizado en el diseño racional de nuevos fármacos para predecir la orientación del enlace de estas moléculas con su blanco molecular. Esto permite predecir la afinidad y la actividad de la molécula en estudio con su blanco de interés biológico [93]. No obstante, los resultados obtenidos mediante esta técnica tienden a la subjetividad, debido a que los programas utilizados proporcionan más de un criterio de selección de la mejor pose. Debido a ello, los resultados deben ser verificados mediante ensayos experimentales de laboratorio [94].

Otra de las herramientas *in silico* disponibles es la dinámica molecular. La misma es un tipo de simulación computacional que permite analizar el comportamiento o evolución de un sistema (físico, químico o biológico) a través del tiempo, calculando las fuerzas entre los átomos que lo conforman. Por medio de dinámica molecular, se pueden calcular diferentes propiedades fisicoquímicas del sistema como la energía libre, entropía, solubilidad, viscosidad, presión, temperaturas de cambio de fase. En el caso de sistemas biológicos, permite medir la fuerza de interacción entre posibles fármacos y sus dianas biomoleculares o receptores, e incluso, describir el comportamiento de una proteína y moléculas complejas bajo ciertas condiciones [95-96].

Con la finalidad de obtener otros potenciales radiotrazadores que permitan el diagnóstico del CP, se buscaron y evaluaron otras moléculas. En este caso, para la búsqueda de las mismas se tuvieron en cuenta moléculas derivadas de la SAM que, por la similitud estructural que presentaban con el ligando natural, pudieran actuar como potenciales ligandos de la enzima GNMT. En este sentido, se consideró la posibilidad de marcar la molécula de SAM en otras posiciones (figura 30a). Por ejemplo, por medio de reacciones de metilación la molécula se podría marcar con ^{11}C a nivel de los grupos amino primarios presentes en la estructura. Por otro lado, por medio de síntesis orgánica se podría modificar la estructura de la SAM, incorporando un halógeno a nivel de la adenina, para luego marcar la molécula con ^{18}F por sustitución nucleofílica (figura 30b).

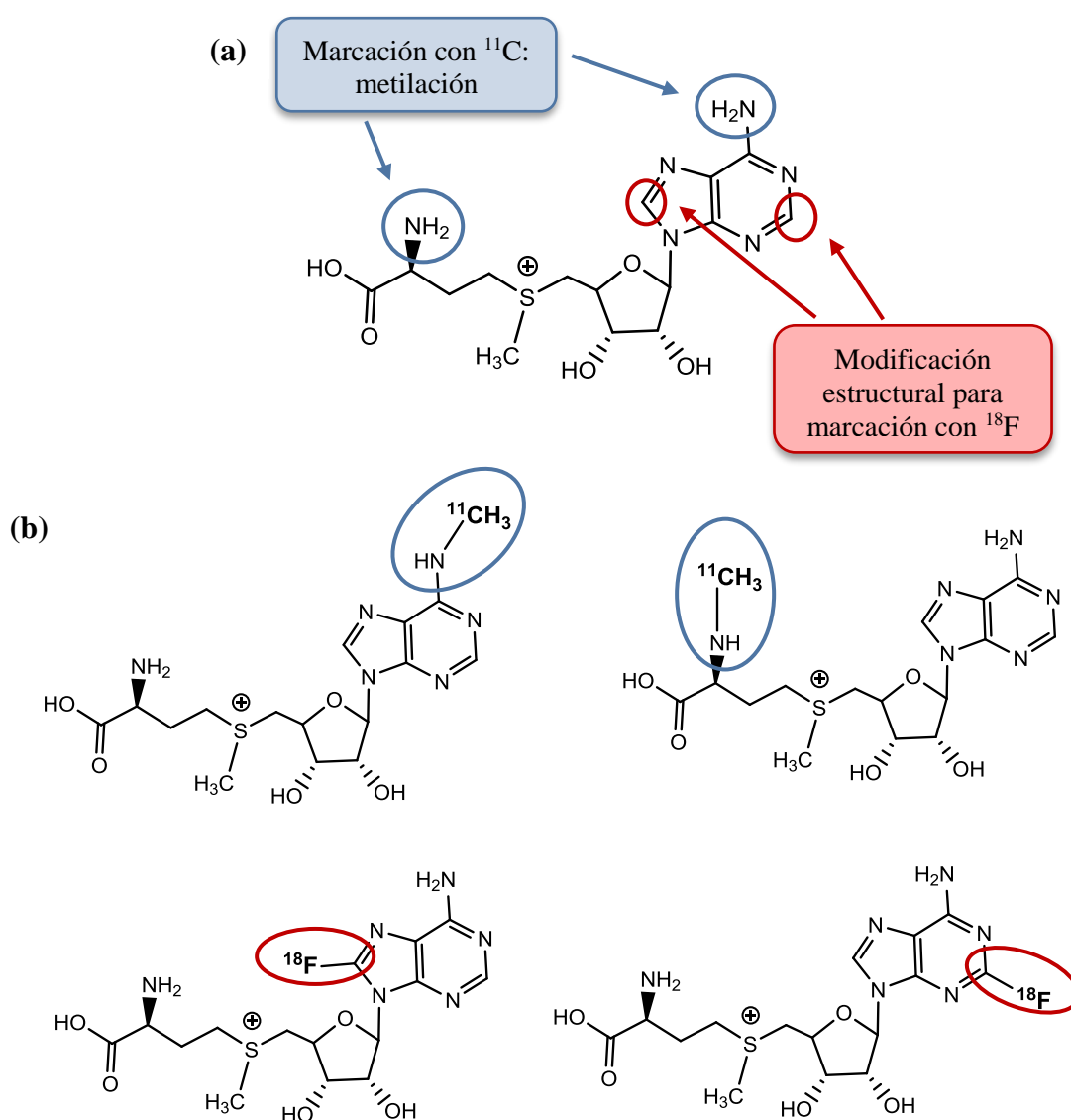


Figura 30. (a). Estructura química de SAM donde se muestran los potenciales sitios de marcación por metilación o fluoración. (b). Compuestos obtenidos a partir de la marcación de SAM en los diferentes sitios.

Sin embargo, previo a la síntesis y marcación de estas moléculas era fundamental estudiar y poder predecir la afinidad que presentarían por la GNMT, para estimar su aplicación como potenciales ligandos de la enzima. En este punto fueron de gran utilidad las herramientas computacionales y métodos *in silico* descritos. Los mismos permitieron establecer, el modo de unión entre la GNMT y SAM, para su posterior comparación con los cuatro derivados. Además, permitieron predecir la estabilidad en el tiempo de los complejos proteína-ligando estudiados.

7.2. Parte experimental

7.2.1. Materiales y métodos

7.2.1.1. Búsqueda de las estructuras necesarias para las simulaciones

La búsqueda de las estructuras se realizó en la base de datos Protein Data Bank (PDB) en el caso de la GNMT y en la base de datos de ligandos ZINC para el ligando natural SAM. Las modificaciones estructurales de la enzima se llevaron a cabo empleando el software Pymol, mientras que el diseño de los ligandos derivados de SAM se realizó en el software Avogadro, utilizando GAFF como campo de fuerza.

7.2.1.2. Estudios de acoplamiento molecular

A partir de las estructuras en formato pdb de la proteína y los derivados de SAM se obtuvieron los ficheros de entrada en formato pdbqt para llevar a cabo las simulaciones de docking, utilizando el programa AutoDock Tools. Todas las simulaciones de acoplamiento molecular de los complejos GNMT-ligandos se realizaron empleando el programa AutoDock Vina y los resultados fueron analizados con la ayuda del Pymol. El cómputo se llevó a cabo con el empleo de ficheros de configuración, así como con los ficheros individuales de las estructuras de los ligandos y la proteína. Los ficheros de configuración se desarrollaron con el lenguaje de programación Python y se obtuvo un fichero por cada una de las simulaciones. Para la selección de los parámetros de cada fichero se utilizó el subprograma “Autodock/Vina Plugins” incluido en Pymol. Así se seleccionaron los valores en Å para las coordenadas x, y, z del centro de la caja y las dimensiones para cada uno de los ejes. Se definieron los nombres de los ficheros de salida del programa (extensión .pdbqt y .log). Se utilizó un procesador por simulación. Para el caso del acoplamiento molecular a ciegas se realizaron 30 simulaciones por cada complejo ligando-proteína. Para el acoplamiento molecular por la zona de interacción predicha se realizaron 20 simulaciones con 9 repeticiones cada una por cada complejo.

7.2.1.3. Estudios de dinámica molecular

Para los estudios de dinámica molecular los parámetros de los ligandos no proteicos se obtuvieron a partir del campo de fuerzas generalizado de AMBER (GAFF). Para cada ligando las cargas atómicas parciales se calcularon mediante el método semi-empírico AM1-BCC implementado en el programa antechamber. A todos los ligandos se les asignó carga neta cero. Se determinaron los estados de protonación de los residuos ionizables de la proteína a pH = 6.8 con el programa PDB2PQR. Todos los residuos básicos (Lys) se predijeron en su forma cargada, al igual que los extremos amino y carboxilo. En cada sistema los parámetros correspondientes a la proteína se generaron con el campo de fuerzas AMBER99SB. El resto de los pasos necesarios para la minimización de energía se realizaron con el paquete GROMACS v4.6.5-1. Los átomos de hidrógeno se añadieron a las estructuras de partida, utilizando los estados de protonación predichos anteriormente. Se creó un dodecaedro como caja de solvatación, envolviendo a cada complejo con 10 Å de distancia entre la superficie del soluto y las paredes de la caja. A continuación, se añadieron las moléculas de agua usando el modelo de solvente explícito TIP3P. Las simulaciones de cada complejo se realizaron bajo condiciones periódicas de contorno (PBC). Se garantizó la electro-neutralidad adicionando iones Na⁺ en las celdas unitarias en una proporción adecuada.

La minimización de energía de cada sistema se realizó empleando el algoritmo de pasos descendentes con 50.000 pasos de integración y un paso de minimización de 0.01 nm. La fuerza o tolerancia máxima permitida se fijó a 1000 kJ mol⁻¹ nm⁻¹. Para evaluar las interacciones de van der Waals y electrostáticas se emplearon radios de corte de 1.4 y 1.0 nm, respectivamente. Para el cálculo de las interacciones electrostáticas a distancias superiores al valor de corte se aplicó el método PME (Particle Mesh Ewald). En ninguno de los sistemas se impusieron constricciones a las distancias de enlace entre los átomos.

7.3. Resultados y discusión

7.3.1. Búsqueda de las estructuras necesarias para las simulaciones

Con el fin de realizar las simulaciones correspondientes para poder predecir el modo de unión entre la enzima GNMT y los cuatro derivados de su ligando natural SAM, era necesario contar con las estructuras de dichas moléculas y/o con la estructura de un complejo proteína-ligando. Por lo que inicialmente, se llevó a cabo una búsqueda exhaustiva de las mismas en la literatura científica y en la base de datos PDB. Como

resultado de esta búsqueda, no se encontró reportado ningún complejo formado por la GNMT y SAM (complejo proteína-ligando), que se pudiera tomar como punto de partida en la predicción del modo de unión entre los cuatro nuevos compuestos y la enzima en estudio. Sin embargo, se encontró una buena estructura para la enzima humana con el código PDB: 1R74. La GNMT es una proteína tetramérica de 295 aminoácidos que consta de cuatro subunidades idénticas de aproximadamente 32.5 kDa. Cada una de las cuatro subunidades de la GNMT posee un sitio activo donde se da la unión con la SAM y la glicina [97]. En la estructura encontrada la enzima se presentaba como homodímero por lo que, mediante la utilización de Pymol, nos quedamos con una sola de las cadenas con la cual se realizaron todos los estudios de acoplamiento molecular (docking).

Posteriormente, fue necesario utilizar la base de datos de ligandos ZINC, para encontrar una estructura del ligando natural SAM, que sirviera como molde para poder hacer las metilaciones y fluoraciones correspondientes. De esta base de datos se descargó una estructura de SAM con el código: zinc_13522357.mol2. A partir de este ligando se obtuvieron las estructuras de los cuatro derivados en estudio, realizando los cambios requeridos mediante el programa Avogadro.

De esta manera se obtuvieron las estructuras, tanto de la proteína, como de los ligandos, con las que se realizaron todas las simulaciones (figura 31).

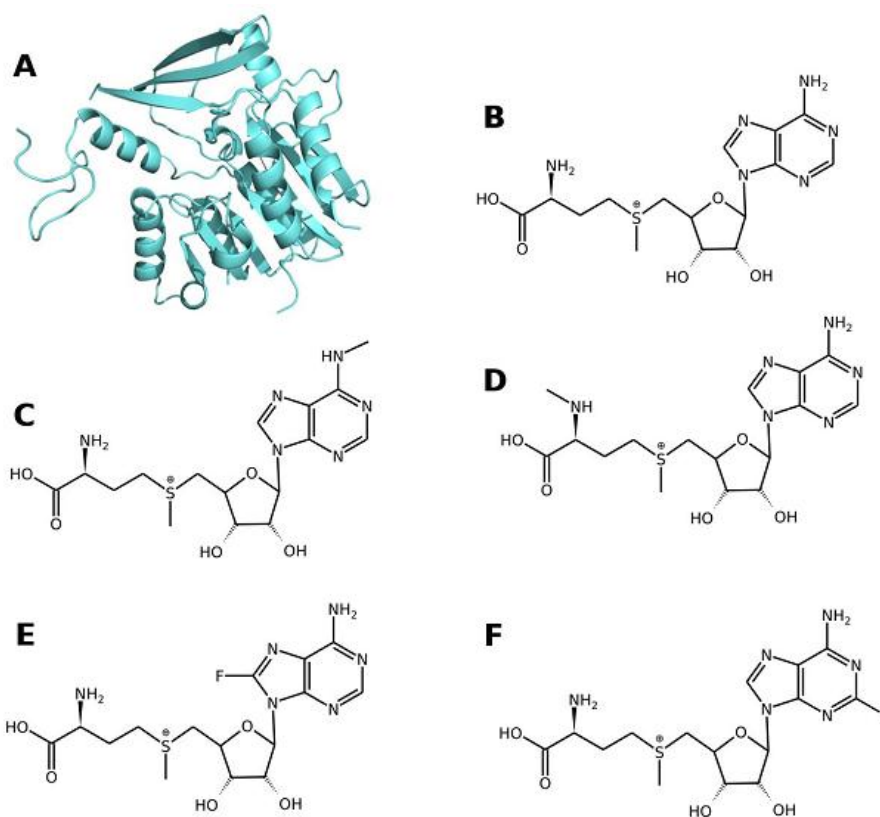


Figura 31. Representación de las estructuras utilizadas para las simulaciones computacionales: (A). Estructura tridimensional de la enzima GNMT, tomada del PDB; (B). Estructura bidimensional del ligando natural SAM, tomada del ZINC; (C-D). Estructuras de los derivados metilados de SAM; (E-F). Estructuras de los derivados fluorados de SAM.

7.3.2. Estudios de acoplamiento molecular a ciegas entre GNMT y los ligandos (SAM y sus derivados)

Luego de identificar y diseñar las estructuras de la enzima y de los compuestos en estudio, fue necesario establecer el modo de unión entre la GNMT y el ligando SAM. Con este fin, se realizó un docking a ciegas que permitiera dilucidar el posible sitio por donde interaccionaban estas dos estructuras. Para ello se realizaron 30 simulaciones tomando como espacio de búsqueda toda la proteína, asegurando así que el ligando pudiera interaccionar por el sitio por el cual presentara mayor preferencia.

Los resultados de las simulaciones arrojaron 30 posibles posiciones preferenciales del ligando con respecto a la proteína. A partir de ello, nos centramos en buscar concordancias espaciales entre cada uno de los resultados. Los mismos fueron sometidos a un proceso de clustering con un valor de corte de 6 Å es decir, se agruparon los

resultados de forma tal que en cada grupo la diferencia entre la posición fuera menor de esa distancia de corte. De esta manera se obtuvo que el 50% de las posiciones del ligando interaccionaban por una zona de la proteína comprendida entre los aminoácidos Tyr 33 y Leu 138 (figura 32). Esta zona se encuentra justamente en el lugar por donde se encuentra el extremo n-terminal de la segunda subunidad del homodímero de GNMT, el cual está activo cuando este extremo se “abre” y permite la interacción con los ligandos. En base a estos resultados, se deduce que el estudio con los ligandos restantes debe realizarse por esta zona.

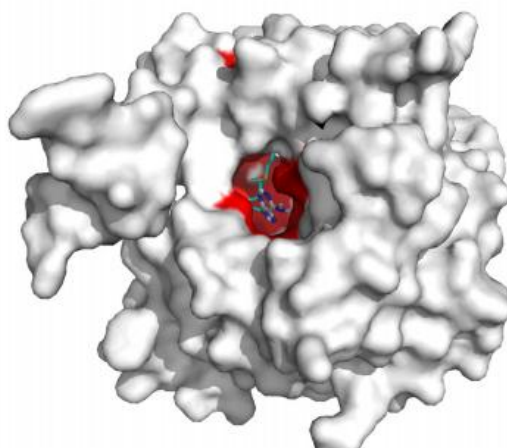


Figura 32. Representación del sitio de interacción predicho para el complejo enzima-ligando natural. En rojo se muestra la zona por la cual coincide el 50% de los resultados de las simulaciones realizadas con SAM.

Por otro lado, con el objetivo de comprobar cuan afín podrían estar cada uno de los ligandos derivados de SAM con las predicciones obtenidas para el ligando natural, se realizaron 30 simulaciones con cada uno de ellos. Estos ensayos fueron llevados a cabo bajo las mismas condiciones de docking a ciegas. Los resultados obtenidos mostraron que, al igual que en el caso anterior, alrededor del 50% de las posiciones arrojadas presentaron preferencia por este sitio de unión. De todos los derivados, el compuesto D de la figura 31 es el que mayor parecido presentó frente a SAM en cuanto a su preferencia por la misma zona de interacción.

7.3.3. Estudios de acoplamiento molecular por la zona de interacción predicha entre GNMT y los ligandos (SAM y sus derivados)

Estudio con el ligando natural SAM

Una vez predicha la zona de interacción entre la proteína y el ligando, se procedió a buscar el modo de unión específico entre las dos estructuras. Esto se basa en definir la posición preferencial que debe adoptar el ligando en la cavidad de la proteína, así como el tipo de interacción específica que se da con los aminoácidos presentes. Para ello, se realizó un estudio de docking, pero en este caso el espacio conformacional de la proteína se restringió a la zona identificada como activa en los estudios anteriores. El complejo que se utilizó como base para el estudio fue el conformado por GNMT-SAM. Los resultados obtenidos con el mismo, se utilizaron posteriormente como referencia para la comparación con los estudios de los ligandos derivados de SAM.

Con el complejo GNMT-SAM se realizaron 20 simulaciones con 9 repeticiones cada una, para tratar de obtener la posición preferencial de SAM en el sitio activo. Se obtuvo en total 180 estructuras diferentes del sistema en estudio. Las mismas fueron sometidas a un proceso de clustering con un valor de corte de 2 Å, para así agruparlas. De los resultados obtenidos se puede deducir que, más del 70% de las simulaciones adoptaron una forma en la proteína como se muestra en la figura 33.

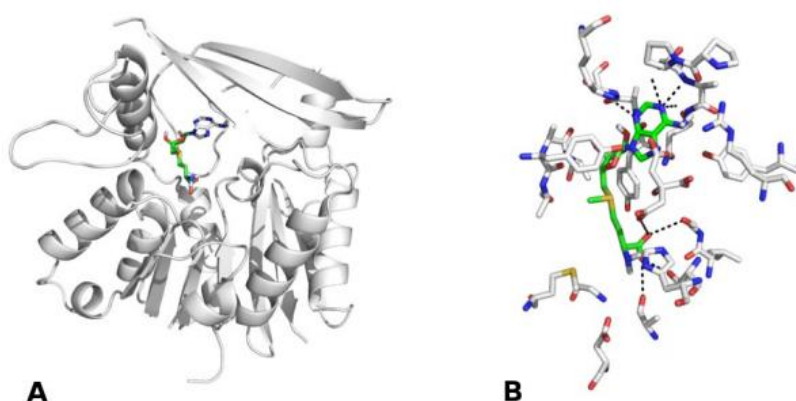


Figura 33. Representación del complejo GNMT-SAM en el sitio de interacción predicho: (A). Modo de interacción del ligando con el sitio activo de la proteína; (B). Interacciones polares o enlaces de hidrógeno existentes entre el ligando y los aminoácidos de la proteína.

A cada una de las estructuras del ligando obtenidas en las simulaciones, se le buscó los aminoácidos específicos con los cuales interaccionaba con la enzima. Se escogieron

aquellos que se encontraban a no más de 4.6 Å de distancia de al menos un átomo del ligando. La mayoría de las interacciones que se establecieron entre SAM y la proteína fueron de tipo de enlace de hidrógeno, lo cual le confiere una gran fortaleza al complejo formado. Los aminoácidos involucrados en estas interacciones fueron: Tyr 33, Ile 34, Asp 36, Thr 37, Ala 64, Gly 66, Asp 85, Met 90, Leu 138, Gly 139, Ser 140, His 144, Lys 192 y Asn 193.

Al observar la serie de aminoácidos, aparecen dos que se encuentran distantes de la zona de interacción en cuanto a la posición que ocupan en la cadena carbonada (Lys 192 y Asn 193). Sin embargo, sus cadenas laterales se encuentran dirigidas hacia el sitio de interacción al ligando, y de esta forma probablemente aportan estabilidad al complejo debido a la formación de los respectivos enlaces de hidrógeno.

Estudio con los ligandos derivados de SAM

Para el resto de los ligandos se procedió de forma análoga que con SAM. Se realizaron un total de 180 simulaciones con cada uno y del proceso de clustering se obtuvo que el 60% de todas las estructuras adoptaban un modo de interacción similar al de SAM. De todos los ligandos derivados de SAM, se pudo determinar que el compuesto D (figura 31), es el que presentó un acoplamiento estructural con SAM por debajo de 0.5 Å. Además casi el 75% de esas simulaciones presentaron las mismas características y los mismos enlaces de hidrógeno previamente analizados para el ligando natural (figura 34).

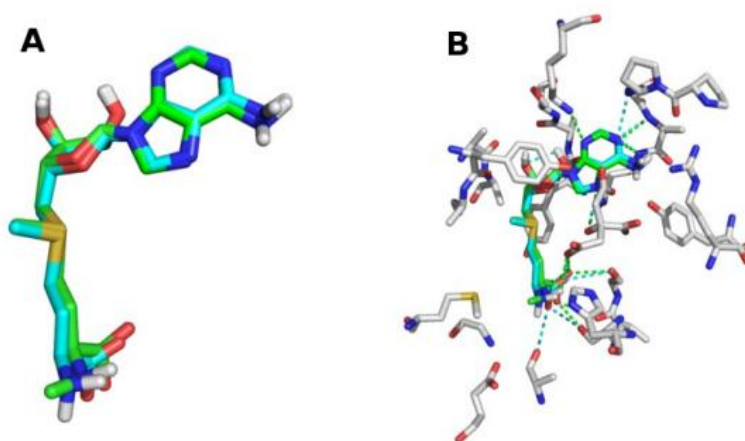


Figura 34. Comparación estructural entre el ligando SAM y el compuesto D: (A). Superposición estructural de los resultados de las distintas simulaciones con los ligandos SAM (celeste) y D (verde); (B). Sitio de interacción y enlaces de hidrógeno entre la enzima y la superposición de los dos ligandos.

El programa con el cual se realiza el docking, además de arrojar los resultados de las simulaciones, devuelve el resultado del cálculo de la función de puntuación (scoring) para cada uno de los complejos proteína-ligando. Este resultado puede considerarse como un valor medianamente aproximado de la energía de afinidad entre las dos estructuras presentes en la simulación. Este valor no presenta ningún poder predictivo cuando se trata de varias proteínas y estamos probando sobre ellas distintos tipos de ligandos. Sin embargo, para este caso, donde la única variable que cambia en la ecuación son los ligandos a simular y se mantiene constante el sitio de interacción, es posible utilizar estos valores para estimar cuál de los compuestos es más afín al sitio de interacción predicho (tabla 14).

Tabla 14. Valores de la función de scoring (energía de afinidad) para cada uno de los compuestos.

| Compuesto | Energía de afinidad (Kcal/mol) |
|------------------|---------------------------------------|
| SAM | -10.6 |
| C | -9.1 |
| D | -9.6 |
| E | -9.1 |
| F | -9.2 |

Como se puede ver en la tabla 14, el menor valor de afinidad lo obtuvo el ligando natural, como era de esperar, aunque todos los valores obtenidos se encuentran dentro del rango de valores permisibles al usar el AutoDock Vina para hacer docking molecular (± 3 Kcal/mol). El compuesto D fue el que presentó el valor más bajo de energía de afinidad entre los derivados de la SAM, lo que está en concordancia con los resultados del acoplamiento molecular.

7.3.4. Estudios de dinámica molecular

Las simulaciones realizadas por los programas de acoplamiento molecular brindaron información útil sobre la zona de interacción entre los compuestos derivados de SAM y la GNMT. Sin embargo, los mismos no tienen en cuenta la estabilidad de los complejos formados en el tiempo. Para ello es necesario realizar cálculos y simulaciones por dinámica molecular. Estos cálculos, permiten determinar cuál va a ser el comportamiento de dicha interacción en un intervalo de tiempo determinado, bajo condiciones que simulan un ambiente acuoso y con neutralidad de cargas. Es decir, permiten evaluar la estabilidad temporal de cada complejo estudiado. Además, estas simulaciones permiten calcular de

forma eficaz la energía de interacción entre cada uno de los ligandos y la enzima en estudio.

Para las simulaciones de dinámica molecular se estudió el complejo GNMT-compuesto D, debido a que éste fue el que obtuvo resultados más prometedores en los estudios de docking. Como referencia se utilizó el complejo formado por la enzima y el ligando SAM. Las estructuras de partida que se emplearon para las simulaciones fueron las obtenidas mediante los cálculos de acoplamiento molecular para cada uno de los compuestos. El tiempo de simulación de cada dinámica fue de más de 90 nanosegundos y se obtuvieron alrededor de 1000 estructuras por cada complejo evaluado. De acuerdo con los resultados obtenidos, los complejos analizados mantuvieron una marcada estabilidad en el tiempo de simulación, conservando las interacciones hidrofóbicas y del tipo de enlace de hidrógeno con los aminoácidos involucrados en la interacción.

En el intervalo de tiempo simulado, la diferencia de RMSD (desviación cuadrática media) entre las posiciones de mayor y menor distancia del complejo proteína-ligando, fue menor de 2 Å, figura 35.

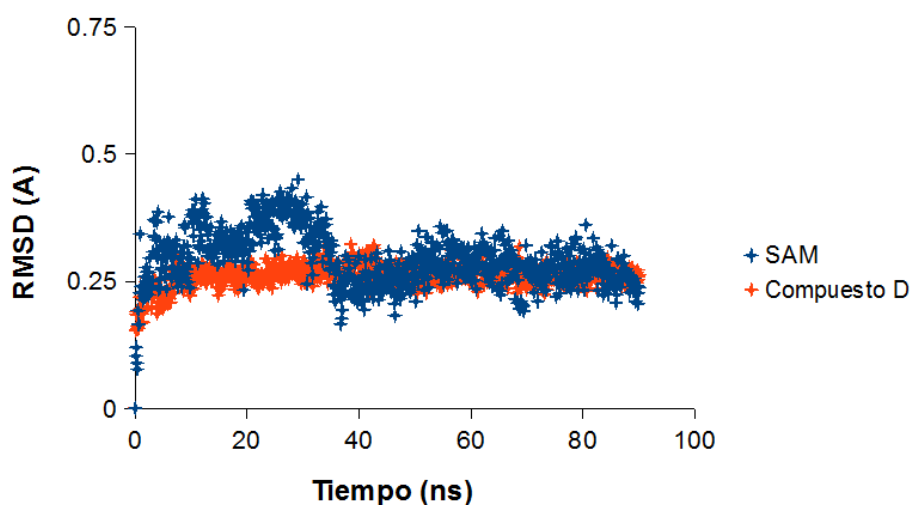


Figura 35. Desviación cuadrática media del complejo GNMT-ligando para SAM y el compuesto D a lo largo del tiempo de simulación.

En el gráfico se puede observar que durante los primeros 40 nanosegundos de simulación el ligando natural (SAM) presentó cierta tendencia a disgregarse de la zona de interacción. Sin embargo a partir de este punto logró llegar a una meseta de equilibrio donde se mantuvo durante el tiempo restante de simulación. Por otro lado, el complejo formado por la GNMT y el compuesto D, alcanzó esta zona de equilibrio desde casi los primeros

5 nanosegundos y la mantuvo hasta el final. Lo peculiar de este resultado es que a pesar de que los dos complejos alcanzan la estabilidad temporal con estructuras similares (figura 36), el compuesto D es capaz de estabilizar más rápido su estructura en el sitio de unión. Esto influye en que el compuesto D alcance el equilibrio termodinámico con la enzima primero que el complejo formado con SAM.

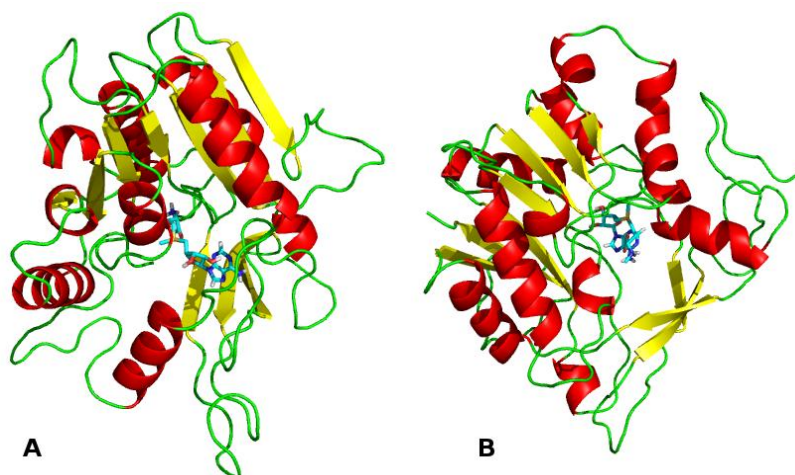


Figura 36. Complejos más estables obtenidos de la dinámica molecular: (A). GNMT-SAM; (B). GNMT-compuesto D.

A partir de la dinámica molecular, también se pudo realizar un análisis energético de los complejos. Para ello se evaluó el comportamiento del sistema en cuanto a la variación de energías de tipo Coulomb y Van der Waals, durante el tiempo de simulación, figura 37.

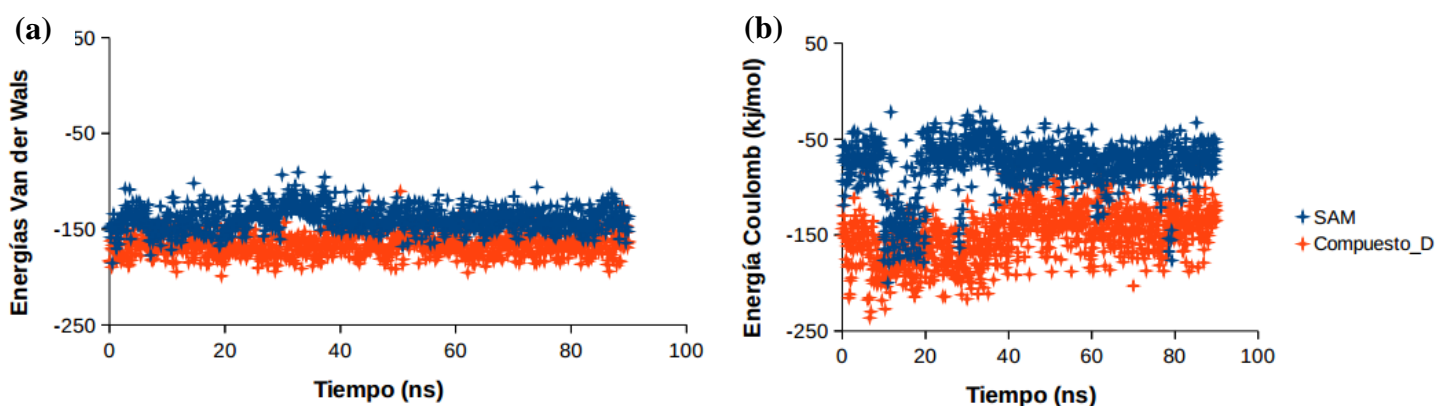


Figura 37. Comportamiento energético de los complejos formados por la enzima y los ligandos SAM y compuesto D a lo largo del tiempo de simulación. (a). Energía de Van der Waals vs. tiempo; (b). Energía de Coulomb vs. tiempo.

Como se puede observar en la figura 37b, luego de los 40 nanosegundos el sistema GNMT-SAM alcanza la estabilidad, lo que concuerda con los resultados mostrados en la

figura 35. De esto se deduce que las posibles diferencias encontradas entre los dos sistemas se centran en la energía de Coulomb. Por lo que, el compuesto D presenta mayor tendencia a la formación de enlaces polares (dígase enlaces de hidrógeno), lo cual puede explicar la mayor estabilidad presentada en los primeros nanosegundos de simulación.

7.4. Conclusiones

Se logró identificar y diseñar las estructuras de la enzima GNMT y de los compuestos en estudio, necesarios para las simulaciones. Mediante los estudios de docking a ciegas se pudo establecer que el complejo GNMT-SAM interactuaba por la zona de la proteína comprendida entre los aminoácidos Tyr 33 y Leu 138. Estos estudios con los ligandos derivados de SAM mostraron que los mismos también presentaron preferencia por este sitio de unión, siendo el compuesto D el que mayor parecido tuvo frente a SAM.

Los estudios de docking por la zona de interacción predicha permitieron establecer que la mayoría de las interacciones entre SAM y la proteína fueron de tipo de enlace de hidrógeno y se identificaron los aminoácidos involucrados en esta interacción. Los ligandos derivados de SAM adoptaban un modo de interacción similar al de SAM. El compuesto D presentó un acoplamiento estructural con SAM por debajo de 0.5 Å, además del menor valor de energía de afinidad entre los derivados de SAM.

En base a los estudios de dinámica molecular, los complejos GNMT-SAM y GNMT-compuesto D presentaron una marcada estabilidad en el tiempo de simulación, mostrando un RMSD < 2 Å. El compuesto D fue capaz de estabilizar más rápido su estructura en el sitio de unión, alcanzando el equilibrio termodinámico con la enzima antes que SAM. Considerando el análisis energético, las diferencias encontradas entre los dos sistemas se centran en la energía de Coulomb.

Los estudios *in silico* permitieron concluir que el ligando D es el que presentó mejores características para la interacción con la GNMT, en referencia al ligando natural. Debido a ello, este compuesto sería el de elección para contar con nuevas herramientas para el diagnóstico de CP basadas en derivados de SAM marcados con radionucleidos PET.

En resumen, los métodos *in silico* aplicados a la SAM y sus derivados permitieron obtener información estructural muy útil para el desarrollo de nuevos radiotrazadores para el diagnóstico del CP mediante PET. Sin embargo, estos estudios deben ser verificados mediante ensayos experimentales de laboratorio a fin de poder seguir adelante.

7.5. Información adicional

Cabe destacar que los ensayos *in silico* fueron llevados a cabo en cooperación con el grupo de Alberto Bencomo y Chryslaine Rodriguez del Centro de Inmunología Molecular de La Habana, Cuba.

8. CONCLUSIONES GENERALES

Los ensayos de metilación en “frío” aportaron información valiosa sobre la reactividad química del par SAH-SAM, que resultó útil para la etapa de radiosíntesis. Se logró optimizar un nuevo método químico para la obtención de SAM marcada con ^{11}C a través de una síntesis en un paso. El compuesto marcado [^{11}C]SAM se obtuvo como mezcla diastereomérica, presentando una relación entre los isómeros de 53:47 [isómero (*R,S*):isómero (*S,S*)]. No fue posible separar los diastereómeros empleando el sistema de HPLC semi-preparativo del módulo de síntesis. El radiotrazador obtenido se ajustó a las especificaciones establecidas para el control de calidad.

La caracterización fisicoquímica e *in vitro* de [^{11}C]SAM aportó elementos para predecir el comportamiento *in vivo* del compuesto y poder continuar con su evaluación biológica. [^{11}C]SAM presentó una estabilidad adecuada en su medio de formulación y en plasma humano, lo que indica que es estable durante el tiempo requerido para la realización de estudios imagenológicos PET. En relación al porcentaje de unión a proteínas plasmáticas, el compuesto presentó valores bajos que se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo. La determinación de lipofilicidad permitió caracterizar a [^{11}C]SAM como un compuesto hidrofílico. Los ensayos de unión e internalización de [^{11}C]SAM en cultivos celulares de CP humano mostraron bajos niveles de captación del compuesto. Esto podría estar relacionado con el tipo de interacción que presenta el ligando con la GNMT. La actividad específicamente internalizada fue mayor que la unida a membrana.

Se realizó la evaluación biológica de [^{11}C]SAM en dos modelos de ratón, uno sano y otro portador de tumor xenográfico de CP humano, mediante estudios *ex vivo* de biodistribución e *in vivo* por imagenología molecular PET/CT. Los ensayos realizados empleando el grupo control sano mostraron alta eliminación del compuesto por excreción urinaria. Asimismo, se verificó una rápida depuración sanguínea del radiotrazador, sin captación en otros órganos. Los estudios realizados utilizando el modelo tumoral con [^{11}C]SAM permitieron determinar que la concentración de actividad obtenida a nivel del tumor fue significativamente mayor que la del músculo usado como órgano no tumoral de referencia, a todos los tiempos analizados. Los estudios comparativos PET/CT con [^{11}C]COL mostraron una captación tumoral *in vivo* de [^{11}C]SAM significativamente mayor que la obtenida para el radiofármaco de referencia. Estos resultados sugieren que [^{11}C]SAM podría ser potencialmente útil como agente diagnóstico para el CP.

Los ensayos de seguimiento del crecimiento tumoral permitieron determinar que la captación tumoral de [¹¹C]COL no varió significativamente al aumentar el tamaño tumoral en el modelo animal estudiado. Con respecto a [¹¹C]SAM, sería necesario completar el ensayo aumentando las muestras a analizar para poder sacar conclusiones.

Los estudios dosimétricos del nuevo compuesto desarrollado, efectuados en base a las biodistribuciones de animales sanos, permitieron estimar la dosis absorbida y la dosis efectiva en humanos, tanto para los diferentes órganos como para cuerpo entero. En base a los resultados obtenidos, el riesgo asociado con la irradiación en un estudio con [¹¹C]SAM habilita su uso en pacientes al ser del orden de otros radiofármacos en uso clínico.

Los resultados anteriormente descritos permitieron continuar con la redacción de un protocolo clínico piloto a fin de evaluar la potencial utilidad de [¹¹C]SAM en el diagnóstico de CP. Actualmente, el ensayo clínico planteado se encuentra en ejecución. En este punto se valora en forma positiva haber alcanzado esta etapa, que implica un trabajo multidisciplinario entre las diferentes áreas del centro. La culminación del ensayo clínico mencionado aportará elementos para dilucidar la potencial aplicación en la clínica del agente en estudio.

Con el fin de obtener otros potenciales radiotrazadores se consideraron intermediarios metabólicos relacionados con la ruta bioquímica de la sarcosina. En este punto se seleccionó la metionina, considerando su rol como molécula precursora en la biosíntesis de SAM. Y por otro lado, se evaluaron potenciales ligandos de la enzima GNMT, basados en derivados de SAM marcados con radionucleidos PET.

Los estudios PET/CT comparativos entre [¹¹C]MET y [¹¹C]COL permitieron evaluar la captación tumoral de ambos radiofármacos en el modelo murino de tumor xenográfico de CP humano. Las relaciones T/NT obtenidas no mostraron diferencias significativas entre el radiofármaco en estudio y la [¹¹C]COL. Por lo que, el empleo de [¹¹C]MET como agente diagnóstico para el CP, a priori no presentaría ventajas apreciables con respecto al radiofármaco de referencia.

Los estudios *in silico* permitieron obtener información estructural útil para el desarrollo de nuevos agentes diagnósticos para el CP basados en moléculas derivadas de SAM. Los estudios de docking permitieron predecir el modo de unión entre GNMT y SAM, así como entre GNMT y los ligandos derivados. Además, se logró establecer las interacciones

específicas entre los distintos ligandos y la proteína. A través de estudios de dinámica molecular se evaluó la estabilidad temporal de los complejos GNMT-SAM y GNMT-compuesto D. El compuesto D fue capaz de estabilizar su estructura en el sitio de unión de forma más rápida, alcanzando el equilibrio termodinámico con la enzima antes que SAM. En base a estos resultados, se puede concluir que el compuesto D es el que presentó mejores características en cuanto a la interacción con la GNMT, en referencia al ligando natural. Por lo que, este compuesto sería el de elección para contar con nuevas herramientas para el diagnóstico de CP basadas en derivados de SAM marcados con radionucleidos PET.

En resumen, durante el trabajo de tesis se pudieron llevar a cabo las diferentes etapas relacionadas al desarrollo de un nuevo radiofármaco. Esto permitió profundizar en los conocimientos y en la formación de diversas áreas como lo son, la radioquímica, la química orgánica, el cultivo de células, los ensayos *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*, *in silico* y clínico.

Como perspectiva a futuro, para continuar con esta línea de investigación, sería interesante poder contar con un método sintético que permitiera obtener únicamente el isómero activo de la [^{11}C]SAM, [^{11}C](S,S)-SAM. En tal sentido existe un proyecto aprobado por la ANII, en el marco del llamado María Viñas, a desarrollarse en colaboración con el grupo de investigación liderado por la Dra. Sonia Rodríguez (Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias - DEP BIO, Facultad de Química, UdelaR). El proyecto se titula “Biocatálisis aplicada a la síntesis de radiotrazadores de utilidad en tomografía de emisión de positrones (PET)”. Como parte de sus objetivos se plantea el desarrollo de un método biocatalítico para la obtención de [^{11}C](S,S)-SAM. El mismo se basa en la optimización de los procesos enzimáticos ya reportados [42].

En cuanto a los estudios *in silico*, para poder continuar trabajando con alguno de los derivados de SAM, los resultados obtenidos deben ser verificados mediante ensayos experimentales de laboratorio. Con este propósito, se plantea sintetizar los compuestos derivados, para posteriormente evaluar la afinidad de unión de los complejos enzima-ligando (SAM y compuestos derivados). Dicha evaluación se puede llevar a cabo mediante estudios enzimáticos *in vitro*, basados en el consumo de sustrato y/o aparición de producto.

Otro trabajo que queda pendiente para continuar en un futuro, se basa en el desarrollo de la síntesis de [^{13}C]glicina. Como ya fue mencionado, esta molécula actúa como sustrato natural de la GNMT, por lo que su marcación con ^{13}C aportaría un nuevo agente potencial para el diagnóstico de CP. La síntesis de [^{13}C]glicina se encuentra reportada. Para la misma se utiliza [^{13}C]NH₄CN como molécula precursora para incorporar el radionucleido a la molécula de interés. Para la generación de este compuesto se debe utilizar el PROCAB que es una plataforma que permite la generación de precursores secundarios radiactivos alternativos a los agentes metilantes empleados [98].

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Tarver T. Cancer Facts & Figures 2012. American Cancer Society (ACS). J Consum Health Internet 2012; 16(3):366–367.
- [2] Barrios E, Garau M. Epidemiología del cáncer en Uruguay y el mundo. An Facultad Med (Univ Repúb Urug) 2017; 4(1):9-47.
- [3] Williamson S. Prostate cancer: risk factors and diagnosis. Clin. Pharm. 2015; 7:127–130.
- [4] Walsh P.C, Partin A.W. Family history facilitates the early diagnosis of prostate carcinoma. Cancer 1997; 80(9):1871–1874.
- [5] Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0. Cancer Incidence and Mortality Worldwide. IARC cancer base no.11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013.
- [6] Linet M.S. Evolution of cancer epidemiology. Epidemiol Rev 2000; 22(1):35–56.
- [7] Jadvar H. Prostate cancer: PET with ^{18}F -FDG, ^{18}F - or ^{11}C -acetate, and ^{18}F - or ^{11}C -choline. J. Nucl. Med. Soc Nuclear Med. 2011; 52:81–89.
- [8] Schöder H, Larson S.M. Positron emission tomography for prostate, bladder, and renal cancer. Semin. Nucl. Med. 2004; 34:274–292.
- [9] Lee D.J, Mallin K, Graves A.J, et al. Recent Changes in Prostate Cancer Screening Practices and Epidemiology. J. Urol. 2017; 198:1230-1240.
- [10] Edge S, Byrd D.R, Compton C.C, et al. AJCC Cancer Staging Manual. American Joint Committee on Cancer. 7th ed. New York: Springer, 2010.
- [11] Gleason D.F. Classification of prostatic carcinomas. Cancer Chemother Rep 1966; 50:125-128.
- [12] ASCO Cancer.net: Cáncer de próstata. (internet): <https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-de-pr%C3%B3stata/detecci%C3%B3n>. (consultado el 09/01/2018).
- [13] Williamson S. Prostate cancer: treatment options. Clin. Pharm. 2015; 7:132–137.
- [14] Jadvar H. Prognostic utility of PET in prostate cancer. PET Clin 2015; 10:255-263.
- [15] Castellucci P, Ceci F, Graziani T, et al. PET/CT in prostate cancer. Med. Nucl. 2015; 39:54-58.
- [16] Li Z, Conti P.S. Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography. Adv. Drug Deliv. Rev. 2010; 62:1031–1051.
- [17] Boleaga D.B. Imagenología molecular. Anales de Radiología México 2004; 2:63-64.

- [18] Mikla V.I, Mikla V.V. Positron Emission Tomography In: Medical Imaging Technology. Elsevier Insights 2014; 53-64.
- [19] Liu S. Bifunctional Coupling Agents for Radiolabeling of Biomolecules and Target-Specific Delivery of Metallic Radionuclides. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60(12): 1347–1370.
- [20] Moreira R. Principios y elementos de un ciclotrón. XIV Seminario de Ingeniería Biomédica, Facultad de Medicina e Ingeniería, UdelaR 2005.
- [21] PET/CT, 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; 30:1-8.
- [22] Ceci F, Fiorentino M, Castellucci P, et al. Molecular Imaging and Precision Medicine in Prostate Cancer. *PET Clin* 2017; 12:83–92.
- [23] Rossi P.J, Schuster D.M. Molecular imaging of advanced prostate cancer. *Curr. Probl. Cancer* 2015; 39:29–32.
- [24] Schuster D.M, Nanni C, Fanti S. PET Tracers Beyond FDG in Prostate Cancer. *Semin Nucl Med* 2016; 46:507–521.
- [25] Mestre-Fusco A, Suárez-Piñera M. Use of choline tracers in the prostate carcinoma management. *Médecine Nucléaire* 2013; 37:71–77.
- [26] Roivainen A, Forsback S, Grönroos T, et al. Blood metabolism of [methyl-¹¹C]choline; implications for in vivo imaging with positron emission tomography. *Eur J Nucl Med* 2000; 27(1): 25–32.
- [27] Fendler W.P, Eiber M, Beheshti M, et al. ⁶⁸Ga-PSMA PET/CT: Joint EANM and SNMMI procedure guideline for prostate cancer imaging: version 1.0. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2017; 44(6):1014-1024.
- [28] García J.R, Arcocha M.T, Delgado-Bolton R.F, et al. La PET/TC con ⁶⁸Ga-PSMA en el cáncer de próstata. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol*. Available online 21 September 2017: <http://dx.doi.org/10.1016/j.remnm.2017.07.004>.
- [29] PubChem, Open Chemistry Database: Sarcosine. (internet): <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1088#section=Top>. (consultado el 10/01/2018).
- [30] Allen R.H, Stabler S.P, Lindenbaum J. Serum betaine, *N,N*-dimethylglycine and *N*-methylglycine levels in patients with cobalamin and folate deficiency and related inborn errors of metabolism. *Metabolism Clinical and Experimental* 1993; 42(11):1448–1460.

- [31] Sreekumar A, Poisson L, Rajendiran T, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* 2009; 457:910-914.
- [32] Song Y. H, Shiota M, Kuroiwa K, et al. The important role of glycine *N*-methyltransferase in the carcinogenesis and progression of prostate cancer. *Modern Pathology* 2011; 24:1272-1280.
- [33] Chen Y.A, Chen L, Wong F, et al. Genomic Structure, Expression, and Chromosomal Localization of the Human Glycine *N*-Methyltransferase Gene. *Genomics* 2000; 66:43–47.
- [34] Guerinot F, Bohuon C. Glycine-*N*-Methyltransferase Levels in Human Breast Cancer Tissue. *Europ. J. Lancer.* 1977; 13:1257-1259.
- [35] Krijt J, Dutá A, Kozich V. Determination of *S*-Adenosylmethionine and *S*-Adenosylhomocysteine by LC–MS/MS and evaluation of their stability in mice tissues. *J. Chromatogr. B* 2009; 877:2061-2066.
- [36] Clarke S, Banfield K. *S*-Adenosylmethionine-dependent Methyltransferases. En: *Homocysteine in Health and Disease*; Carmel R, Jacobsen D.W. Eds. Cambridge University Press: Cambridge 2001; 63-78.
- [37] Stabler S.P, Allen R.H. Quantification of Serum and Urinary *S*-Adenosylmethionine and *S*-Adenosylhomocysteine by Stable-Isotope Dilution Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Clin Chem* 2004; 50(2):365-372.
- [38] Matos J.R, Raushel F.M, Wong C.H. *S*-Adenosylmethionine: Studies on Chemical and Enzymatic Synthesis. *Biotechnol Appl Biochem* 1987; 9:39-52.
- [39] Iwig D.F, Booker S.J. Insight into the Polar Reactivity of the Onium Chalcogen Analogues of *S*-Adenosyl-*L*-methionine. *Biochemistry* 2004; 43:13496-13509.
- [40] Wuest F, Berndt M, Kniess T. Carbon-11 Labeling Chemistry Based upon [¹¹C]Methyl Iodide. In: *PET Chemistry*; Schubiger P.A, Lehmann L, Friebe M, Ed. Ernst Schering Research Foundation Workshop: Springer, Berlin, Heidelberg 2007; 64:183-213.
- [41] TRACERlab FXC Guía del operador. Technical Publications. GE Medical Systems. General Electric Company 2004. Rev. 0.
- [42] Ishiwata K, Ido T, Sato H, et al. Simplified enzymatic synthesis and biodistribution of ¹¹C-*S*-adenosyl-*L*- methionine. *Eur J Nucl Med* 1986; 11:449–52.
- [43] Deshpande P.B, Senthilkumar U.P, Padmanabhan R. Chemical synthesis of *S*-adenosyl-*L*-methionine with enrichment of (*S,S*)-isomer. U.S. Patent 6,881,837 B2, April 19, 2005.

- [44] Senthilkumar U.P, Padmanabhan R, Sivasankaran V. Improved process for the chemical synthesis of *S*-adenosyl-*L*-methionine with enrichment of (*S,S*)-isomer. WO 2006/000883 A2. 22 June 2004.
- [45] Castro R, Struys E. A, Jansen E.E, et al. Quantification of plasma *S*-adenosylmethionine and *S*-adenosylhomocysteine as their fluorescent 1,*N*6-etheno derivatives: an adaptation of previously described methodology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2002; 29:963–968.
- [46] Buccino P, Kreimerman I, Zirbesegger K, et al. Automated radiosynthesis of [¹¹C]*L*-deprenyl-D2 and [¹¹C]*D*-deprenyl using a commercial platform. *Appl Radiat Isot* 2016; 110:47-52.
- [47] 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.
- [48] Zhang J, Klinman J.P. HPLC Separation of the (*S,S*)- and (*R,S*)- forms of *S*-Adenosyl-*L*-methionine. *Anal Biochem* 2015; 476:81-83.
- [49] 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.
- [50] 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.
- [51] Perdomo R. Ensayo del lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL). *Rev Cubana Farm* 2004; 38(1).
- [52] Vinci C.R, Clarke S.G. Recognition of age-damaged (*R,S*)-adenosyl-*L*-methionine by two methyltransferases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2007; 282:8604-8612.
- [53] Vinci C.R, Clarke S.G. Homocysteine methyltransferases Mht1 and Sam4 prevent the accumulation of age-damaged (*R,S*)-AdoMet in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2010; 285:20526-20531.
- [54] U.S. Pharmacopeia-National Formulary [USP 40 NF 35], Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, Inc; 2017. <1823> Positron Emission Tomography Drugs – Information. 2017, Volume 1; pp. 2190-2201.

- [55] 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.
- [56] Zoppolo F, Porcal W, Oliver P. Automated One-pot Radiosynthesis of [¹¹C]S-adenosyl Methionine. *Current Radiopharmaceuticals* 2017; 10:203-211.
- [57] Aulton E. *Farmacía: Ciencia y diseño de formas farmacéuticas*. Ed. ELSEVIER, Madrid, España 2004.
- [58] García L.J, Medina L.J, Jung H. Unión a proteínas plasmáticas de la DL-3-hidroxi-3-etil-3-fenil-propionamida (HEPP). Un nuevo anticonvulsivante. *Revista de la Sociedad Química de México* 1999; 43(2):39-42.
- [59] Lee B, Yeh J, Chiu N, et al. Evaluation on of Tc-99m(v) dmsa binding to human plasma proteins. *Kaohsiung J Med Sci* 2008; 24:1-9.
- [60] Wilson A.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.
- [61] Vasilskis E, Kreimerman I, Olivera S, et al. Comparative *In Vitro* Study of ¹¹C-Methionine and ¹¹C-Deuterodeprenyl Uptake in Three Human Glioma Cell Lines. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 2017; 32(9):344-350.
- [62] Shao X, Hockley B.G, Hoareau R, et al. Fully automated preparation of [¹¹C]choline and [¹⁸F]fluoromethylcholine using TracerLab synthesis modules and facilitated quality control using analytical HPLC. *Appl. Radiat. Isot.* 2011; 69:403–409.
- [63] Giglio J. Diseño, síntesis y evaluación de complejos de ^{99m}Tc conteniendo ligandos nitroimidazólicos, como potenciales radiofármacos con selectividad hacia tejido hipóxico. Tesis de Doctorado en Química, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay, 2010.
- [64] Paulmichl A, Summer D, Manzl C, et al. Targeting gastrointestinal stromal tumor with ⁶⁸Ga-labeled peptides: An *in vitro* study on gastrointestinal stromal tumor-cell lines. *Cancer Biother Radiopharm* 2016; 31(8):302-310.
- [65] Nakamura K.D, Schlenk F. Active Transport of Exogenous S-Adenosylmethionine and Related Compounds into Cells and Vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* 1974; 120(1):482-487.
- [66] Dridi L, Ouameur A.A, Ouellette M. High Affinity S-Adenosylmethionine Plasma Membrane Transporter of Leishmania Is a Member of the Folate Biotpterin Transporter (FBT) Family. *The journal of biological chemistry* 2010; 285(26):19767–19775.

- [67] McMillan J.M, Walle U.K, Walle T. *S*-adenosyl-*l*-methionine: transcellular transport and uptake by Caco-2 cells and hepatocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2005; 57:599–605.
- [68] Alva-Sánchez H, Rodríguez-Balderas C.A, 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.
- [69] Conde E.S. Preparación del radiofármaco ^{99m}Tc -HYNIC-[Lys3]-BN. Tesis, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México, 2007.
- [70] Coenen H, Elsinga P, Iwata R, et al. Fluorine-18 radiopharmaceuticals beyond [^{18}F]FDG for use in oncology and neurosciences. *Nucl Med Biol* 2010; 37:727-740.
- [71] Mariela Terán. *Manual de Protección Radiológica*. CUDIM, 2016.
- [72] Kozirowski J, Behe M, Decristoforo C, et al. Position paper on requirements for toxicological studies in the specific case of radiopharmaceuticals. *EJNMMI radiopharm. Chem.* (2017) 1:1. <https://doi.org/10.1186/s41181-016-0004-6>.
- [73] Tunik 100 B12 – Adenosil metionina Vitamina B12. (internet): <http://www.baliarda.com.ar/esp/PDF/Tunik100B12.pdf>, (consultado el 16/03/2017).
- [74] Farmanuario. *Guía Farmacológica y Terapéutica*. Uruguay, 2015.
- [75] Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration – New Dietary Ingredients in Dietary Supplements - Background for Industry. (internet): <https://www.fda.gov/food/dietarysupplements/newdietaryingredientsnotificationprocess/ucm109764.htm>, (consultado el 13/03/2017).
- [76] Memorandum - New Dietary Ingredient: S-adenosylmethionine. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Office of Special Nutritionals. 05/1998; 1-9.
- [77] NLM (1999) RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances), Bethesda, MD, Searched November 1999 [Record Nos. 7176, 7177].
- [78] Manzillo G, Piccinino I. F, Surrenti C, et al. Multicentre Double-Blind Placebo-Controlled Study of Intravenous and Oral *S*-Adenosyl-L-Methionine (SAME) in Cholestatic Patients with Liver Disease. *Drug Investigation* 1992; 4:90-100.
- [79] Mathematica W. Wolfram Research. Inc., Champaign, Illinois. 2015.
- [80] McParland B.J. *Nuclear Medicine Radiation Dosimetry: Advanced Theoretical Principles*. Springer Science & Business Media 2010.

- [81] Tolvanen T, Yli-Kerttula T, Ujula T, et al. Biodistribution and radiation dosimetry of [^{11}C]choline: A comparison between rat and human data. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2010; 37:874–883.
- [82] Stabin M.G, Sparks R.B, Crowe E. OLINDA/EXM: the second-generation personal computer software for internal dose assessment in nuclear medicine. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 2005; 46:1023–1027.
- [83] Stabin M.G, Siegel J.A. Radar Dose Estimate Report: a Compendium of Radiopharmaceutical Dose Estimates Based on Olinda/Exm Version 2.0. *J Nucl Med* 2018; 59(1):154-160.
- [84] ICRP. 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 60. *Ann. ICRP. ICRP21(1-3);* 1991; 21:1–201.
- [85] 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(3-4):5–265.
- [86] Decreto Ref N° 001-4573/2007. Diario Oficial de la República Oriental del Uruguay, Montevideo, Uruguay, 04 de agosto de 2008.
- [87] Comité de Ética del Instituto de Investigación de Enfermedades Raras (CEIIR) Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Ciencia e Innovación, Noviembre 2009
- [88] Casas I.P, Igirio J.L.G, Blumenkrantz Y, et al. Utilidad de ^{11}C -metionina PET/CT en neurooncología. *Medicina* 2013; 73:201-206.
- [89] Martínez-Amador N, Martínez-Rodríguez I, Jiménez-Bonilla J, et al. Localización preoperatoria con ^{11}C -Metionina PET/TAC y $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi en pacientes con adenoma de paratiroides confirmado quirúrgicamente. *Rev Esp Med Nucl* 2013; 32 (1):26-32.
- [90] Pascali C, Bogni A, Iwata R, et al. High efficiency preparation of *L*-[S -methyl- ^{11}C]methionine by on-column ^{11}C -methylation on C18 Sep-Pak. *Journal of a Labelled compounds and radiopharmaceuticals* 1999; 42:715-724.
- [91] Fina B.L, Lombarte M, Rigalli A. Investigación de un fenómeno natural: ¿Estudios *in vivo*, *in vitro* o *in silico*? *Actual. Osteol.* 2013; 9(3):239-240.
- [92] Lengauer T. Computational methods for biomolecular docking. *Current Opinion in Structural Biology* 1996; 6(3):402-406.
- [93] Kitchen D.B, Decornez H, Furr J.R, et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(11):935-949.

- [94] Velásquez M, Drosos J, Gueto C, et al. Método acoplado Autodock–PM6 para seleccionar la mejor pose en estudios de acoplamiento molecular. *Rev. Colomb. Quim.* 2013; 42(1):1-8.
- [95] Cai W, Li J, Yip S. Molecular Dynamics. In: *Comprehensive Nuclear Materials*, Volume 1. Konings RJM, editor. Amsterdam: Elsevier; 2012. p. 249-265.
- [96] Meller J. Molecular Dynamics. *Encyclopedia of life sciences*, Nature Publishing Group 2001; 1-8.
- [97] Luka Z, Wagner C. Effect of naturally occurring mutations in human glycine *N*-methyltransferase on activity and conformation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 312:1067–1072.
- [98] Johnström P, Stone-Elander S, Ericson K, et al. ¹¹C-Labelled Glycine: Synthesis and Preliminary report on its Use in the Investigation of Intracranial Tumours using Positron Emission Tomography. *Appl. Radiat. Isot.* 1987; 38:729-734.

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. Alberto Bencomo y la Dra. Chryslaine Rodriguez del Centro de Inmunología Molecular de La Habana, Cuba, por la colaboración en los estudios *in silico*.

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.

A Williams Porcal por todo su apoyo y su guía en este trabajo, por las valiosas discusiones académicas, apoyo en la redacción de las publicaciones, así como el aporte bibliográfico.

Una mención especial a Pablo por su apoyo incondicional tanto académico como emocional durante todas las etapas de este proyecto.

A Andrea por su gran apoyo moral y su colaboración en los controles de calidad de los radiofármacos.

A Laura por toda su ayuda en el análisis y procesamiento de los estudios imagenológicos, así como en la realización y análisis de las biodistribuciones.

A Elena por su gran ayuda en la realización de los ensayos *in vitro* y el desarrollo del modelo tumoral en ratones.

A Javier por todas las consultas académicas y experimentales.

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

Un agradecimiento especial a Soledad, a quien siempre tengo presente, que me motivó para comenzar con este trabajo.

A Ingrid, mi amiga de la vida, que sin su apoyo no hubiera podido culminar con esta etapa.

Gracias a todos mis amigos y familia por la paciencia durante todos estos años, sobre todo a Rodrigo y mis padres quienes estuvieron siempre.

ANEXO I – Publicaciones

ANEXO II - Protocolo Ensayo Clínico