



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**“Desarrollo y evaluación de potenciales
radiofármacos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ y $[^{18}\text{F}]\text{F}$ derivados del
estradiol con potencial aplicación en Medicina
Nuclear”**

María Emilia Tejería Pérez

Tesis de Doctorado

Presentada como uno de los requisitos para el título de
Doctor

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de
Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Marzo/2022

**“Desarrollo y evaluación de potenciales
radiofármacos de [^{99m}Tc]Tc y [¹⁸F]F derivados del
estradiol con potencial aplicación en Medicina
Nuclear”**

Integrante del tribunal, Dra. Daniela Gamenara

Integrante del tribunal, Dr. Adriano Duatti

Integrante del tribunal, Dr. Juan Pablo Gambini

Directora de tesis, Dra. Ana María Rey

Director de tesis, Dr. Javier Gabriel Giglio

A mis padres y hermano por la confianza, el apoyo y el cariño de siempre...

A Maxi por llegar en el momento preciso a ser mi compañero de vida y darme tanto amor...

AGRADECIMIENTOS

Ha pasado mucho tiempo desde que comencé el posgrado, sin dudas la Emi que comenzó no es la Emi que está terminando. Este tiempo me ha hecho crecer de una forma inimaginable tanto a nivel personal como profesionalmente. He tenido que aprender a trabajar en equipo, a enfrentar problemas, a tomar decisiones, a organizarme, a expresar y defender mis resultados e infinitudes de cosas más. Pero, sobre todo he tenido que aprender a investigar... Siempre supe que quería ser investigadora, pero en estos años creo que realmente comencé a serlo. Este camino de aprendizaje no termina acá y eso es lo que más me gusta de esto. Aprender todos los días algo nuevo y tener un nuevo desafío a resolver es lo que hace que esto me apasione tanto. No ha sido un camino fácil...hubo momentos de incertidumbre, de estrés, de presión, de ansiedad y a pesar de haber vivido estos momentos siempre encontré la manera de superarme y seguir amando lo que hago.

Quiero agradecerle enormemente a Ana y a Javier por ser mis tutores, gracias por aceptar el desafío y darme la oportunidad de comenzar mi posgrado.

Gracias Ana por cada oportunidad que me diste todo este tiempo, cada desafío me hizo crecer. Si bien en algunos momentos me estresé mucho y tuve miedo siempre intenté dar lo mejor de mí. Algunas veces no entendí tu modo de actuar... hoy entiendo que es la forma de poder crecer. Gracias por siempre dejarme trabajar a mi modo y por confiar en mi capacidad de organización. Gracias por cada discusión, cada enseñanza, cada charla... GRACIAS POR CONFIAR EN MI... Pero por sobre todo gracias por entenderme y escucharme las veces que no pude separar mi vida personal del trabajo... es lindo trabajar en un lugar donde uno se siente como en casa.

Javier gracias por tantos momentos en el laboratorio, por esos esquemas interminables que me obligabas a hacer y que tanto me ayudaron al momento del escribir la tesis, gracias por solucionar cada relajo que me mande en el laboratorio... cuando sea grande quiero tener esa capacidad resolutive que tenes. Gracias por dejarme ser... por dejarme equivocarme... por dejarme resolver. Gracias por atender cada llamada mía de noche a preguntarte como

largaba las primeras reacciones orgánicas... perdón a Noel jajajaja. Lo que si no te agradezco es tu ansiedad.... Creo que un poco me la pasaste... ahora convivo con eso jajajaja. GRACIAS POR CONFIAR EN MI....

Gracias a Mamá, Papá, Emi y Valeria... Gracias por el apoyo constante a lo largo de toda mi vida, gracias por darme valores, por darme herramientas para manejarme en la vida, pero por sobre todo gracias por enseñarme a ser buena gente. Gracias por festejar conmigo cada triunfo y por abrazarme en cada fracaso. Gracias por nunca dejarme sola a pesar de la distancia. Gracias por esas palabras que me dan tanta fuerza... te va a ir bien... Gracias por cada velita que prendió mamá a sus santos, yo no creo mucho en nada, pero si creo en el amor de mis padres. Gracias Emi por esos mensajes interminables donde me decías lo importante que soy para vos, me gusta mucho que me lo digas. Gracias por pensar en mí y ser mi familia.

Gracias a Maxi por llegar en el momento menos pensado, en el lugar menos pensado... parece que tenía que ser así. Gracias por llegar a demostrarme que aun quedan personas hermosas y comprometidas con una relación. Gracias por bancarme la cabeza en estos meses de escritura, por abrazarme cuando llore, por hablarme, por cada ida a caminar para despejarme, cada salida a comer, cada ida al gym, cada festejo. Gracias por adaptarte a mi dieta al pie de la letra, nunca lo voy a olvidar. Gracias por ser un gran compañero de vida y al que quiero tener para siempre a mi lado. Gracias por siempre estar pendiente de mi... gracias por tanto amor... Gracias a Botas, simplemente por ser Botas. Gracias por estar a mi lado cada vez que escribí tesis en lo de Maxi... fue muy lindo tener tu compañía. Gracias a la familia de Maxi por tanto apoyo y cariño.

Gracias a mis amigas... por ser mis amigas, por estar en cada momento de mi vida escuchando y acompañando. Gracias por cada festejo que hicimos cuando las cosas salieron bien, gracias por estar cada vez que necesité despejarme o me sentí mal. Han sido muchos años, pasaron muchas cosas... sin duda son lo mejor de este mundo. Gracias por hacerme reír, por tanto cariño, por hacerme sentir increíble cuando estoy con ustedes... Gracias Gio, Cata, Sara, Inés, Gaby, Ceci, Nadia, Charito, Analía, Elena, Maia, Caro, Pía, Maru, Kari e Isa.

El último tiempo me sentí con muchas ganas de hablar mis cosas con alguien... es así que gracias a Carito conocí a Lía. Un ser maravilloso que quiero tener cerca el resto de mis días. Gracias por escucharme, por darme herramientas, por motivarme, por hacerme llorar, por hacerme reír, por retarme cuando fue necesario. Gracias por hacerme saber cuales son mis virtudes y también cuales son mis debilidades. Gracias por la revolución de sentimientos que me hiciste tener.... Gracias por algunas cositas que solo vos y yo sabemos... Gracias por empoderarme cada lunes.

Gracias a Erika Kreimerman, "mi nutri" quien me ayudo a cumplir un gran desafío de vida. Gracias por tantas ideas para pasar los momentos de estrés y ansiedad. Gracias por darme hábitos que nunca voy a olvidar.

Gracias a mis compañeros de pintura por cada lunes, por hacerme pasar uno de los mejores ratos de la semana, por darme tanto cariño y por tanta buena onda.

Mariella gracias por las charlas interminables, por cada consejo cuando profesionalmente no supe cómo actuar y por confiar en mi a la hora de trabajar juntas. Gracias por escucharme y aconsejarme cuando llegaron los momentos tristes... gracias por hablarme como si le estuvieras hablando a tu hija. Gracias por aquellas palabras cuando me dieron la DT que no olvidare jamás ... "ahora el cielo es el límite" ... creo que fue uno de los días mas felices de mi vida. Gracias por contribuir con chocolates cada vez que algo salió mal.... Fue de mucha ayuda.

Gracias a mis compañeros del Área de Radioquímica, a todos los que conocí este tiempo, no se imaginan todo el cariño y la ayuda que me dieron. Gracias por prepararme el HPLC, por prenderme la plancha, por destilarme agua, por cuidar mis reacciones, por ayudarme con las células y los animales, por musicalizar el laboratorio, por cada mate, cada helado, cada chocolate, cada cerveza, cada abrazo, gracias por hacerme reír... sin lugar a duda esto no hubiera sido posible sin su ayuda. Gracias por animarme cada vez que algo salió mal y cada vez que me sentí triste. También agradezco a las personas que me pusieron un palo en la rueda, no hicieron más que impulsarme para superarme y crecer más. Gracias a Ma. Elena Cardoso, Maia Zeni, Laura Reyes, Maia Mombrú, Carolina Brindisi, Isabel Galain, Ma. Pia Pereira, Romina Keucherian, Nancy Crocarno, Ariadna

Pérez, Sara Armand Ugon, Eduardo Savio, Jessica Osorio, Paula De Cuadra, Ivana Aguiar, Leticia Fernández, Soledad Fernández, Javier Giglio, Ana Rey y Mariella Terán.

Gracias a Helen María (así le digo yo) por todo el tiempo compartido estos años. Si de algo no hay duda es que juntas aprendimos a investigar. Gracias por las discusiones interminables que nos hicieron crecer, gracias por ayudarme tanto. Juntas aprendimos a entendernos, a trabajar, a escribir, a dar clases, a compartir... hasta el punto de que llegamos a ser amigas. Gracias por tanto cariño, por cada torta de cumple, por las salidas luego de los prácticos....
GRACIAS POR SER MI MEJOR EQUIPO.

Por allá por 2016 conocí a Maia... un ser espectacular que se robo mi corazón... al inicio fui su docente... hoy es mi compañera de trabajo y mi amiga. Gracias por todo lo que has hecho por mi en este tiempo, gracias por darme tanto cariño a tu manera, gracias por siempre mostrarme que cuento con vos.

Que decir de mi querida Pía, ella lo es todo, gracias por llegar a esta cátedra para llenar todos los rincones de risas y entusiasmo. Gracias por ayudarme tanto, gracias por tanto cariño, por cada cerveza, por cada charla... has sido una pieza fundamental en este camino.

Un agradecimiento muy especial para mis niñas (así les digo yo) Paula, Caro y Jessica, gracias por llegar a esta catedra... gracias por tanta buena onda, tanta ayuda, tanto cariño. Gracias por ser tan buena gente y comprometerse con el trabajo.

Gracias a todos los alumnos con los que tuve contacto muy estrecho. Gracias por tanta buena onda y por hacerme todas las preguntas que me hicieron... sin lugar a duda eso me hizo pensar y crecer. Gracias a Romina, Maia, Fatima, Sara, Martin, Matías, Gary, Luis, Ariadna, Irene, Cynthia y Eugenia.

Gracias a mis compañeros de Ion Mariela Aharonian, Eloisa Pereira y Rafael Larrosa (Planta baja) por apoyarme y aconsejarme en los primeros tiempos del posgrado. Gracias a Silvia Ripoll quien me permitió tomarme horario de trabajo para realizar la parte experimental de mi posgrado y quien me dejo hacer infinitos cambios de horarios para cumplir con los primeros créditos de materias.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación, ANII:

- por mi beca de Maestría (POS_NAC_2015_1_109615) que me permitió desarrollar parte de esta tesis.
- por mi beca de movilidad (MOV_CA_2017_1_137587) que me permitió realizar una pasantía única en la Universidad de Zúrich.
- por el proyecto (ANII FCE FCE_1_2017_1_136416) que permitió al grupo contar con fondos para investigar parte de los resultados que se detallan en este documento.

A el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, PEDECIBA:

- por cada alícuota anual que me permitió comprar parte del material necesario para llevar a cabo esta tesis doctoral.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica, CSIC:

- por cada asistencia a congresos que me financiaron a través del Programa de Movilidad e Intercambios Académicos (MIA-CSIC), cada congreso y cada viaje contribuyó a mi formación académica, a la divulgación de los resultados obtenidos y a la vinculación con personas del área.
- por el proyecto CSIC iniciación 1803-348 que me permitió dirigir mi primer proyecto de investigación junto a la B.C.Ma. Elena Cardoso. Este proyecto ha representado un salto de calidad en mi formación profesional de docente-investigador.

A la Comisión Académica de Posgrado (CAP):

- Por mi beca de Doctorado
- Por mi beca de finalización de los estudios de doctorado

A Bayer Schering Pharma, Uruguay por donarme parte del etinilestradiol utilizado en la síntesis de los ligandos de esta tesis

A la Cátedra de inmunología del Instituto de Higiene por permitirme realizar los ensayos en células en sus instalaciones. Gracias a la querida “Rubia”, Silvia Dematteis que me enseñó con tanto amor y dedicación todo lo que tenía que saber del mundo del cultivo celular. Cuando la “Rubia” se jubiló conocí a tres

seres maravillosos Paula Arbildi, Gustavo Mourglia y Claudio Rodríguez, ellos me ayudaron por años a resolver cada problema que se presentaba, estuvieron conmigo en las etapas en las que yo no estaba segura y siempre, siempre me hicieron sentir parte de su equipo. Gracias a María Lamas por nuestras charlas en el cultivo y a Diego Hernández por siempre tener el material disponible para mi uso.

A Gonzalo Carrau, Alejandro Peixoto, Mariana Pazos, Estefania Dibello, Grysette Daher, Ignacio Carrera, Daniela Gamenara, Valeria Schapiro, Virginia Aldabalde, Paola Rodríguez, Agustín Delfino, Juan Mesa, Pierina Schiappapietra, Bruno González, Gustavo Seoane y Mariela Risso del Área de Química Orgánica de la Facultad de Química. Gracias por la buena onda de siempre, por ayudarme cada vez que lo necesité, por cada reactivo que me prestaron y por explicarme un poco del mundo de la Química Orgánica. Gracias a Alejandro por la ayuda en los IR, a Mariela por secarme los solventes que necesité para las reacciones y a Gonzalo por contestar mis dudas al momento de redactar la tesis.

Al Centro Uruguayo de Imagenología Molecular, CUDIM por permitirme usar sus instalaciones para desarrollar el trazador [^{18}F]F-FEET. Con este desafío que nos planteamos tuve la oportunidad de acercarme a la Química del [^{18}F]F, al uso de las plataformas automatizadas de síntesis y también “sufrí” bastante con la Química Orgánica. Gracias CUDIM por permitirme usar el Espectrómetro de masas, el Espectrofotómetro infrarrojo y los HPLC con detectores UV cada vez que los necesité. Sin dudas una etapa de muchísimo aprendizaje que no hubiera sido posible sin el apoyo, el cariño y la ayuda de Ma. Pía Pereira y Maia Zeni. Gracias a Florencia Zoppolo, Ingrid Kreimerman, Pablo Buccino, Kevin Zirbesegger, Laura Reyes, Eduardo Savio, Victoria Trindade, Natalí Bentancor, Lucía Tajam, Omar García, Andrea Boné, Henia Balter y Williams Porcal quienes estuvieron siempre para ayudarme y discutir cuando se presentaba alguna problemática.

Gracias a Hans-Jürgen Pietzsch del Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Alemania, por darme el Isonitrilo Activado y el NS_3 para poder realizar el complejo de [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc(III) “4+1” y por la charla que mantuvimos durante el coffe break del

TERACHEM 2018 donde me dio ideas para realizar una mejor optimización del trabajo.

Gracias a Medicina Nuclear del Hospital de Clínicas, a la Española, a Impasa y a Médica Uruguay por darme el [^{99m}Tc]Tc para trabajar cada día. Un gracias muy especial a Fátima quien siempre me dio la actividad que necesite. Con Fátima compartimos mucho tiempo juntas y si bien nos peleamos en alguna oportunidad aprendimos a entendernos y a trabajar. Gracias por tu apoyo y tu cariño durante este tiempo.

Gracias a Ivana Aguiar por la ayuda con las medidas en el centelleo líquido y a Mariana Barraco por prestarme cocktail de centelleo.

Gracias a Aline Katz por ayudarme con el estudio de Docking Molecular y luego ayudarme a redactar esa parte de la tesis. Fue un gran desafío para mí.

Gracias a Raul Chiozzone por ayudarme a buscar bibliografía para escribir la tesis.

A Roger Alberto por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de realizar la pasantía en la Universidad de Zurich, Suiza. Gracias Roger por las charlas que mantuvimos, por mostrarme tu entusiasmo y tu pasión, fue un placer inolvidable conocerte. El viaje a Suiza fue un antes y un después en mi vida profesional y personal y agradezco enormemente haber tenido esa oportunidad. Esta pasantía me permitió observar cómo funciona un grupo de investigación de primer nivel mundial, trabajar con equipos de última tecnología, aprender nuevas reacciones químicas, entre otras. Gracias a Daniel Hernández, Carla Gotzmann, Robin Bolliger, Ana Resende, Rapahel Leganher, Janvier Mukiza y Qaisar Nadeem que son las personas con las que estuve todo el tiempo en el laboratorio y las que me ayudaron en cada etapa de la pasantía.

Por último y no menos importante... Gracias a Sole. Es muy difícil escribir esto porque significas mucho para mí... Sos la persona que me enseñó a trabajar en el laboratorio, aun mantengo alguna de tus costumbres al pie de la letra... Sos la persona que me enseñó a trabajar entusiasmada, con alegría y con pasión... Sos la persona que también me retó cada vez que hice algo mal... gracias por eso. También sos la personas que unos días antes de que sucediera lo que ya

sabemos que sucedió me escribió un mensaje muy lindo... el cual confieso en su momento no entendí mucho... decías que me querías y que querías que hiciera el posgrado, que volviera a trabajar a la catedra, que me necesitabas. Cumplí con lo que me pediste Sole... hoy me encuentro terminando el doctorado... lo que no sabía es que todo esto lo tenía que hacer sin vos. Me hiciste mucha falta, tenía mucho miedo de quedarme hasta tarde en el laboratorio... hoy todo me recuerda a vos y entiendo que siempre has estado conmigo... de otra manera, pero conmigo. Ya nos volveremos a ver... enfría la cerveza eso si no me esperes con las manos vacías.

“Desarrollo y evaluación de potenciales radiofármacos de [^{99m}Tc]Tc y [¹⁸F]F derivados del estradiol con potencial aplicación en Medicina Nuclear”

María Emilia Tejería Pérez

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2022

DIRECTORES: Dra. Ana María Rey (Facultad de Química), Dr. Javier Giglio (Facultad de Química)

El cáncer de mama es un problema de salud pública mundial y es el cáncer más frecuente en las mujeres. Los tumores de mama pueden sobreexpresar distintos tipos de receptores, cuya presencia determina tanto el pronóstico como el tipo de tratamiento a seguir. El receptor de estrógeno (RE) se encuentra sobreexpresado en el 70% de los casos de cáncer de mama. La Medicina Nuclear permite monitorerar la presencia de los RE en la totalidad de la masa tumoral de forma mínimamente invasiva. Esto evita los errores de muestreo en los métodos “*ex vivo*” que sólo permiten estudiar una porción del tumor y puede, por tanto, verse afectada por la expresión no homogénea de los receptores.

En el presente trabajo se han desarrollado cuatro radiotrazadores con potencial aplicación para imágenes de RE en cáncer de mama. Para ello, se han seleccionado dos radionucleidos, [^{99m}Tc]Tc y [¹⁸F]F, radionucleidos más ampliamente utilizados en SPECT y PET, respectivamente.

Se sintetizaron tres ligandos (**L1**, **L2** y **L3**) partiendo del etinilestradiol (agonista de los RE) y añadiendo átomos donadores de electrones para coordinar con [^{99m}Tc]Tc. Su estructura fue corroborada a través de diversos estudios espectroscópicos. La marcación de **L1** se realizó mediante la formación de un complejo del tipo [^{99m}Tc]Tc(I)tricarbonílico (**C1**), la de **L2** mediante la formación de un complejo [^{99m}Tc]Tc(V) ≡ N (**C2**) y la de **L3** mediante la formación de un

complejo [^{99m}Tc]Tc(III) 4+1 (**C3**). Todos los complejos se obtuvieron con una pureza radioquímica (PRQ) mayor al 90%.

El radiotrazador de [^{18}F]F ([^{18}F]F-**FEET**) posee la molécula del estradiol como farmacóforo. Continuando con el uso de la reacción de Huisgen se incorporó en posición 17 del estradiol un anillo triazólico sustituido en posición 4 por una cadena de dos carbonos con el [^{18}F]F. Para su obtención se sintetizó un precursor (**M**) que contiene el grupo tosilo como buen grupo saliente necesario para incorporar el [^{18}F]F mediante sustitución nucleofílica y además un grupo azida para incorporar la parte biológicamente activa mediante la reacción de Huisgen. La marcación de **M** con [^{18}F]F fue realizada en un módulo automatizado de síntesis Synthra RNplus Research, mientras que la reacción de Huisgen se optimizó de forma manual y de forma automatizada, siendo el primer reporte de una reacción de este tipo realizada en un módulo automatizado de síntesis. En ambos casos el producto de interés se obtuvo con elevada PRQ.

Todos los radiotrazadores resultaron ser estables en el medio de reacción y en plasma por al menos 4 horas. La lipofilidad y la unión a proteínas plásmicas fue elevada, lo cual es esperable por el tipo de estructura que poseen los mismos. La evaluación *in vitro* se realizó utilizando células de cáncer de mama MCF-7. **C1** posee una unión de $(2.0 \pm 0.2)\%$, **C2** (6.7 ± 0.8) , **C3** $(3.7 \pm 0.5)\%$ y [^{18}F]F-**FEET** $(0.8 \pm 0.2)\%$.

C2 presentó las mejores propiedades *in vitro* ya que presenta una unión específica al receptor (un 70% fue bloqueado por adición de ligando frío) y comparable con el estradiol natural (Estradiol [$6,7\text{-}^3\text{H}(\text{N})$]) $(6.6 \pm 1.4)\%$ y con el [^{18}F]F-FES $(6.3 \pm 1.3)\%$, radiofármaco de referencia para imagenología molecular de estos receptores. Además, **C2** presenta un eflujo bajo, liberando solo el 26.7% de la actividad unida a las células y se internaliza en un 84%, confirmando que atraviesa la membrana plasmática. Los estudios *in vivo* de **C2** mostraron una baja actividad en tiroides y estómago, lo que indica una reoxidación insignificante. La excreción se produjo principalmente a través del sistema hepatobiliar, siendo la excreción por orina minoritaria. **C2** presenta una actividad en sangre superior a la actividad del [^{18}F]F-FES. Sin embargo, la captación hepática de **C2** es significativamente menor que él [^{18}F]F-FES. Las biodistribuciones de **C2** en ratones portadores de tumores de mama inducidos

mostraron una acumulación preferencial del trazador en tumor, con una relación tumor/músculo cercana a 4.

En suma, se ha trabajado en todas las etapas del diseño de un radiofármaco, y los resultados obtenidos son promisorios, aunque serán necesarios nuevos estudios para continuar la caracterización de los complejos.

Como resultado de esta tesis doctoral, se logró un complejo **(C2)** con propiedades comparables al FES como potencial radiofármaco de ^{99m}Tc para Imagenología Molecular de receptores de estrógeno y se adquirió experiencia que podrá ser capitalizada por el grupo en investigaciones futuras sobre este y otros blancos moleculares de interés.

**“Development and evaluation of potential [^{99m}Tc]Tc and [¹⁸F]F
radiopharmaceuticals of derived from estradiol with potential application
in nuclear medicine”**

María Emilia Tejería Pérez

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

2022

DIRECTORS: Dra. Ana María Rey (Facultad de Química), Dr. Javier Giglio
(Facultad de Química)

Breast cancer is a public health problem worldwide and is the most common cancer in women. Breast tumors can overexpress different types of receptors, the presence of which determines both the prognosis and the type of treatment to be followed. The estrogen receptor (ER) is overexpressed in 70% of breast cancer. Nuclear Medicine allows monitoring the presence of ER in the entire tumor mass in a minimally invasive way. This avoids sampling errors in "ex vivo" methods that only allow a portion of the tumor to be studied and can therefore be affected by non-homogeneous receptor expression.

In the present work, four radiotracers with potential application for ER imaging in breast cancer have been developed. For this purpose, two radionuclides have been selected, [^{99m}Tc]Tc and [¹⁸F]F, radionuclides most widely used in SPECT and PET, respectively.

Three ligands (**L1**, **L2** and **L3**) were synthesized starting from ethinylestradiol (ER agonist) and adding electron donor atoms to coordinate with [^{99m}Tc]Tc. Its structure was corroborated through spectroscopic studies. The labeling of **L1** was carried out through the formation of a [^{99m}Tc]Tc(I)tricarbonyl complex (**C1**), **L2** through the formation of a [^{99m}Tc]Tc(V) ≡N complex(**C2**) and **L3** by the formation of a [^{99m}Tc]Tc(III) 4+1 complex (**C3**). All the complexes were obtained with a radiochemical purity (RCP) greater than 90%.

The [¹⁸F]F radiotracer (**[¹⁸F]F-FEET**) has the estradiol molecule as a pharmacophore. Continuing with the use of the Huisgen reaction, a triazole ring substituted in position 4 by a two-carbon chain bearing the [¹⁸F]F was incorporated on position 17 of estradiol. It was obtained using a precursor (**M**), **which** contains the tosyl group as a good leaving group necessary to incorporate [¹⁸F]F through nucleophilic substitution and also an azide group to incorporate the biologically active part through the Huisgen reaction. The labeling of **M** with [¹⁸F]F was performed in a Synthra RNplus Research automated synthesis module. The Huisgen reaction was optimized manually and automatically, being the first report of a reaction of this type performed in an automated synthesis module. In both cases, the product of interest was obtained with a high RCP.

All radiotracers were stable in the reaction medium and in plasma for at least 4 hours. Lipophilicity and binding to plasmatic proteins was high, which is expected due to their structure. In vitro evaluation was performed using MCF-7 breast cancer cells. Uptake of **C1**, **C2** and **C3** was (2.0 ± 0.2)%, (6.7 ± 0.8) and (3.7 ± 0.5)%, respectively. Uptake of **[¹⁸F]F-FEET** was very low (0.8 ± 0.2)%.

C2 presented the best in vitro properties, including a specific binding to the receptor (70% was blocked by addition of cold ligand) comparable to that of natural estradiol (Estradiol [6,7-³H(N)]) (6.6 ± 1.4)% and [¹⁸F]F-FES (6.3 ± 1.3)%, the gold standard for molecular imaging of ER. Furthermore, **C2** exhibits low efflux, releasing only 26.7% of the cell-bound activity and 84% is internalized, confirming that it crosses the plasmatic membrane. In vivo studies of **C2** showed low activity in the thyroid, indicating low reoxidation. Excretion occurred mainly through the hepatobiliary system, with urinary excretion being negligible. **C2** has a higher activity in blood than [¹⁸F]F-FES, but significantly lower hepatic uptake. The biodistributions of **C2** in mice bearing induced breast tumors showed a preferential accumulation of the tracer in the tumor, with a tumor/muscle ratio close to 4. However, uptake in tumour is significantly lower in comparison with [¹⁸F]F-FES.

The work performed includes all stages of the design of a potential radiopharmaceutical, and the results obtained are promising, although new

studies will be necessary to complete the characterization of the potential radiotracer.

As a result of this doctoral thesis, a complex (**C2**) with properties comparable to [¹⁸F]F-FES was achieved as a potential [^{99m}Tc]Tc radiopharmaceutical for Molecular Imaging of estrogen receptors. The gained experience may be capitalized on by the group in future research on this and other molecular targets of interest.

ÍNDICE

1	ABREVIATURAS	21
2	INTRODUCCIÓN	22
2.1	Cáncer de mama	22
2.2	Radiofármacos de diagnóstico	28
2.3	Radiometales y química del [^{99m} Tc]Tc.....	36
2.4	Química del [¹⁸ F]F	59
2.5	Estrógenos y receptor de estrógenos (RE).....	72
2.6	Desarrollo de trazadores destinados al RE.....	78
3	OBJETIVOS	89
3.1	Objetivo general.....	89
3.2	Objetivos específicos.....	89
3.3	Esquema de ligandos incluidos en esta Tesis.....	92
4	PARTE EXPERIMENTAL	94
4.1	Materiales.....	94
4.2	Métodos	96
4.2.1	Síntesis de los ligandos	96
4.2.1.1	17[ácido Boc-2-amino-3-(1H-1,2,3-triazol-1-yl) propanoico]estradiol (L1-BOC) 96	
4.2.1.2	17 [sodio (1-carboxi-2-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)etil) ditiocarbamato] estradiol (L2) 97	
4.2.1.3	17[5-((1-carboxi-2-(1H-1, 2,3-triazol-1-yl) etil) amino)-N-metilidine-5-oxopentano-1-amonio] estradiol (L3)	98
4.2.1.4	17[1-(4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)fenil)-2-bromoetanone] estradiol (L4)	99
4.2.1.5	17[4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)butil 4- metilbencenosulfonato] estradiol (L5)	100
4.2.1.6	17[2-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)etil 4-metilbencenosulfonato] estradiol (L6).....	101
4.2.2	Síntesis del 17[1-(2-fluoroetil)-1H-1,2,3-triazol] estradiol ([¹⁹ F]F-FEET)	102
4.2.3	Preparación de los trazadores de [^{99m} Tc]Tc	103
4.2.3.1	Síntesis del complejo [[^{99m} Tc]Tc(I)(CO) ₃ L1] (C1).....	103
4.2.3.1.1	Síntesis del <i>fac</i> -[[^{99m} Tc]Tc(CO) ₃ (H ₂ O) ³⁺	103
4.2.3.1.2	Síntesis de C1	104
4.2.3.2	Síntesis del complejo de [[^{99m} Tc]Tc(V)≡N L2] (C2)	104
4.2.3.2.1	Síntesis del core [[^{99m} Tc]Tc(V)nitrido].....	104
4.2.3.2.2	Síntesis de C2	105
4.2.3.3	Síntesis del complejo de [[^{99m} Tc]Tc(III)NS ₃ L3] (C3).....	105
4.2.3.3.1	Síntesis del precursor [[^{99m} Tc]Tc(III)EDTA]	105
4.2.3.3.2	Síntesis de C3	105
4.2.4	Síntesis del trazador [¹⁸ F]F-FEET	106
4.2.4.1	Síntesis del trazador [¹⁸ F]F-FEET partiendo de L6	106
4.2.4.2	Síntesis del trazador [¹⁸ F]F-FEET partiendo de M	107
4.2.4.2.1	Síntesis del [¹⁸ F]F-PRE-FEET	107
4.2.4.2.2	Síntesis manual del [¹⁸ F]F-FEET – Reacción de Huisgen <i>in situ</i>	108
4.2.4.2.3	Síntesis del [¹⁸ F]F-FEET en el modulo automatizado de síntesis	108
4.2.5	Caracterización fisicoquímica de los trazadores	110
4.2.5.1	Estabilidad en el medio de reacción.....	110

4.2.5.2	Estabilidad en plasma	110
4.2.5.3	Lipofilicidad	110
4.2.5.4	Unión a proteínas plasmáticas.....	111
4.2.6	Evaluación biológica <i>in vitro</i> de los trazadores	111
4.2.6.1	Ensayo de unión.....	112
4.2.6.2	Ensayo de unión dependiente del tiempo	112
4.2.6.3	Ensayo de eflujo	113
4.2.6.4	Ensayo de competencia	113
4.2.6.5	Ensayo de internalización	114
4.2.7	Docking Molecular	114
4.2.8	Evaluación <i>in vivo</i> de los trazadores	115
4.2.8.1	Biodistribución en animales normales	115
4.2.8.2	Biodistribución en animales con tumor	116
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	117
5.1	Síntesis de los ligandos.....	117
5.1.1	17 [ácido Boc-2-amino-3-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-yl) propanoico] estradiol (L1-BOC) 117	
5.1.2	17 [sodio (1-carboxi-2-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-yl)etil) ditiocarbamato] estradiol (L2)	143
5.1.3	17[5-((1-carboxi-2-(1 <i>H</i> -1, 2,3-triazol-1-yl) etil) amino)- <i>N</i> -metilidine-5-oxopentano- 1-amonio] estradiol (L3).....	147
5.1.4	17[1-(4-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-yl)fenil)-2-bromoetanone] estradiol (L4).....	153
5.1.5	17[4-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-yl)butil 4- metilbencenosulfonato] estradiol (L5).....	159
5.1.6	17[2-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-yl)etil 4-metilbencenosulfonato] estradiol (L6).....	163
5.2	17[1-(2-fluoroetil)-1<i>H</i>-1,2,3-triazol] estradiol ([¹⁹F]F-FEET)	170
5.3	Preparación de los complejos de [^{99m}Tc]Tc.....	172
5.3.1	Síntesis del complejo [^{99m} Tc]Tc(I)(CO) ₃ L1] (C1).....	172
5.3.1.1	Síntesis del precursor tricarbónico fac-[[^{99m} Tc]Tc(CO) ₃ (H ₂ O) ₃] ⁺	172
5.3.1.2	Síntesis de C1	175
5.3.2	Síntesis del complejo de [[^{99m} Tc]Tc(V)≡N L2] (C2)	178
5.3.2.1	Síntesis del core [[^{99m} Tc]Tc(V)nitrido]	178
5.3.2.2	Síntesis de C2	179
5.3.3	Síntesis del complejo de [[^{99m} Tc]Tc(III)NS ₃ L3] (C3).....	181
5.3.3.1	Síntesis del precursor [[^{99m} Tc]Tc(III)EDTA].....	181
5.3.3.2	Síntesis del complejo 3 (C3).....	181
5.4	Síntesis del trazador [¹⁸F]F-FEET	184
5.4.1	Síntesis del trazador [¹⁸ F]F-FEET partiendo de L6	184
5.4.2	Síntesis del trazador [¹⁸ F]F-FEET partiendo de M	187
5.4.2.1	Síntesis del [¹⁸ F]F-PRE-FEET	187
5.4.2.2	Síntesis manual del [¹⁸ F]F-FEET – Reacción de Huisgen in situ	190
5.4.2.3	Síntesis del [¹⁸ F]F-FEET –en el módulo automatizado de síntesis.....	196
5.5	Caracterización fisicoquímicos de los trazadores	197
5.5.1	Estabilidad en el medio de reacción.....	197
5.5.2	Estabilidad en plasma.....	197
5.5.3	Lipofilicidad.....	198
5.5.4	Unión a proteínas plasmáticas	201
5.6	Evaluación <i>in vitro</i>.....	202
5.7	Docking Molecular	210
5.8	Evaluación <i>in vivo</i> de los trazadores	217

5.8.1	Biodistribución en animales normales.....	217
5.8.2	Biodistribución en animales portadores de tumores inducidos	219
6	CONCLUSIONES.....	220
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	223
8	BIBLIOGRAFÍA.....	227

1 ABREVIATURAS

Abreviatura

RE	Receptor de estrógeno
SPECT	Tomografía computada por emisión de fotón único
PET	Tomografía de emisión de positrones
ADN	Ácido desoxirribonucleico
$t_{1/2}$	Tiempo de semidesintegración
[¹⁸F]FES	16 α -[¹⁸ F]fluoro-17 β -estradiol
PRQ	Pureza Radioquímica
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
MS	Espectroscopía de Masa
IR	Espectroscopía Infrarroja
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
CUDIM	Centro Uruguayo de Imagenología Molecular
DMF	Dimetilformamida
R	Rendimiento
TBAF	Solución de fluoruro de tetrabutilamonio
THF	Tetrahidrofurano
TFA	Ácido trifluoroacético
NS₃	2-[Bis (2-mercaptoetil) amino] etanotiol
DMSO	Dimetilsulfóxido
UPP	Unión a proteínas plasmáticas
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
COSY	Correlation Spectroscopy (Espectroscopía de correlación bidimensional Protón/Protón)
HSQC	Heteronuclear Simple Quantum Correlation (Espectroscopía de correlación bidimensional Protón/Carbono)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation (Correlación heteronuclear a enlaces múltiples)
BOC	terc-butiloxicarbonilo
TLC	Cromatografía en capa fina

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Cáncer de mama

El estudio del cáncer comenzó en la revolución biológica del siglo XX. Esta revolución nos ha dado muchos aportes, entre ellos conocimientos de la doble hélice de ADN, de la genética y la herencia, de cómo las células crecen y se dividen, cómo se unen para formar tejidos y cómo los tejidos se desarrollan bajo el control de genes específicos [1].

Inicialmente los tumores habían sido considerados cuerpos extraños que de alguna manera habían echado raíces en el cuerpo de un paciente afectado. Ahora, se tiene mucha información de diferentes tipos de tumores e inclusive se conoce que los mismos pueden extenderse a nuevos sitios del organismo (metástasis). Dicho de una manera sencilla, se ha llegado a la conclusión que los tumores son generados por células que han perdido la capacidad de ensamblarse y crear tejidos de forma y función normales [1].

La organización celular ha hecho posible la evolución de una extraordinaria diversidad de tejidos. Gran parte de esta plasticidad en el diseño puede atribuirse al hecho de que los componentes básicos de la construcción de tejidos y órganos (células individuales) están dotados de una gran autonomía y versatilidad. La mayoría de los tipos de células en el cuerpo tienen un genoma que les da la capacidad de proliferar y participar en la morfogénesis de los tejidos (la creación de la forma). Esto hace posible el mantenimiento de los tejidos adultos a lo largo de la vida de un organismo. Dicho mantenimiento puede implicar la reparación de heridas y el reemplazo de células que han sufrido desgaste después de largos períodos de servicio [1].

Los genes pueden sufrir algunos cambios. Estos genes cambiados o mutados pueden generar alteraciones en los programas de crecimiento celular, y estos a su vez pueden dar lugar a la aparición de grandes poblaciones de células que ya no obedecen las reglas que rigen la construcción y el mantenimiento normal del tejido [1].

A pesar de que el organismo tiene mecanismos para prevenir esto, las células cancerosas de alguna manera aprenden a prosperar. Mientras que las células normales se programan cuidadosamente para participar en la construcción de los diversos tejidos que hacen posible la supervivencia del organismo, las células cancerosas tienen una agenda bastante diferente y más enfocada, parecen estar motivadas a hacer más copias de sí mismas [1].

En resumen, el cáncer es una enfermedad genética causada por cambios en los genes que controlan la forma como funcionan nuestras células, especialmente la forma como crecen y se dividen. Esta enfermedad se ha convertido en un problema de salud, ya que es una de las causas principales de muerte en todo el mundo. Durante 2020 hubo casi 10 millones de fallecimientos debido a esta enfermedad. [2].

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente entre las mujeres, ya que afecta a 2,1 millones de mujeres cada año, y también causa la mayor cantidad de muertes relacionadas con el cáncer entre las mujeres. En 2018, se estima que 627,000 mujeres murieron de cáncer de mama, es decir, aproximadamente el 15% de todas las muertes por cáncer entre mujeres [3].

En Uruguay, el cáncer de mama tiene la tasa de incidencia y mortalidad más alta (Figura1). Según cifras de la Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer en el período 2013-2017 se registraron anualmente un promedio de 1933 nuevos casos de cáncer de mama y fue la causa de muerte de 679 mujeres por año en el mismo período [4].

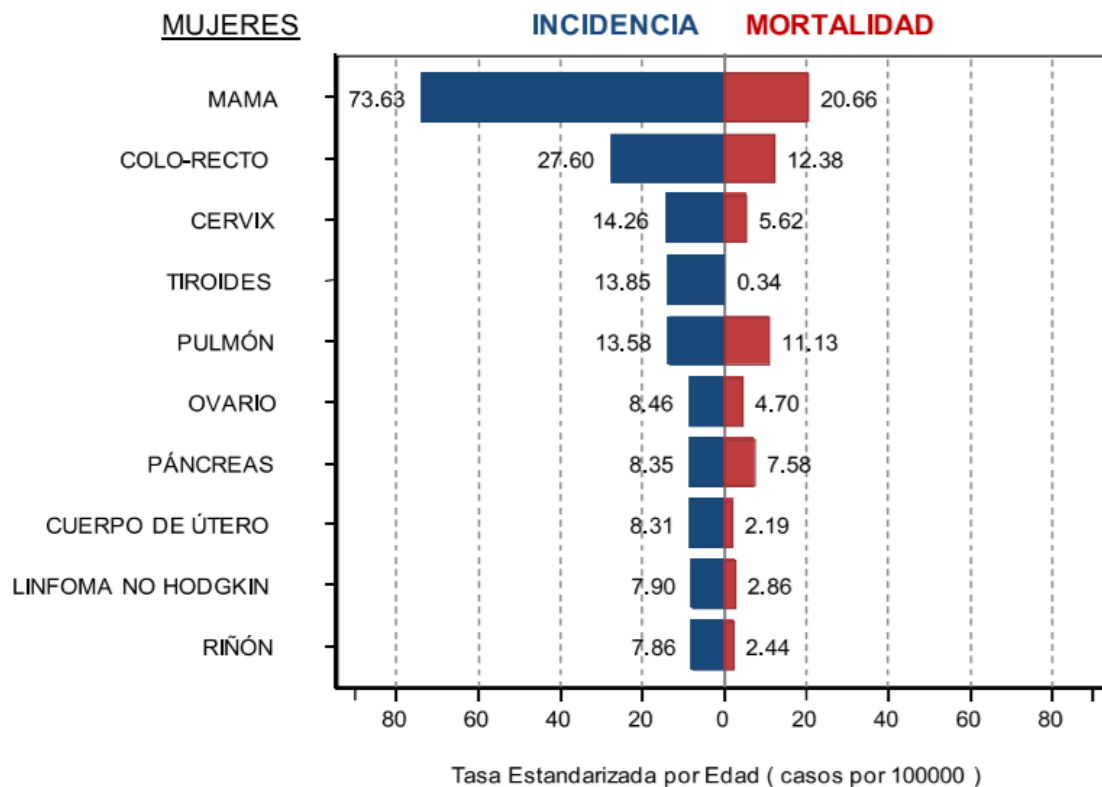


Figura 1: Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en mujeres. Período 2013-2017.

Cuando se comenzó a estudiar el cancer no se contaba con información sobre las alteraciones moleculares dentro de las células que conducen a la aparición de tumores malignos. A pesar de los avances extraordinarios en el conocimiento de las alteraciones moleculares que producen la aparición de tumores malignos, se ha avanzado relativamente poco en la explotación de estos conocimientos para prevenir y tratar la enfermedad. La mayoría de los tratamientos contra el cáncer de uso generalizado hoy en día se desarrollaron antes de 1975, cuando el conocimiento detallado de los mecanismos genéticos y bioquímicos de la patogénesis del cáncer no estaba completamente desarrollado [1].

La información sobre los mecanismos moleculares y celulares de la patogénesis del cáncer permite investigar nuevas formas de tratar la enfermedad de manera efectiva [1]. Esto ha llevado a la identificación de nuevos blancos moleculares y el desarrollo de nuevas formas de diagnóstico y terapias basados en los mismos.

En el cáncer de mama existen varias características tumorales que se resumen en la Figura 2 y que son candidatas para el desarrollo de trazadores específicos del tumor [5].

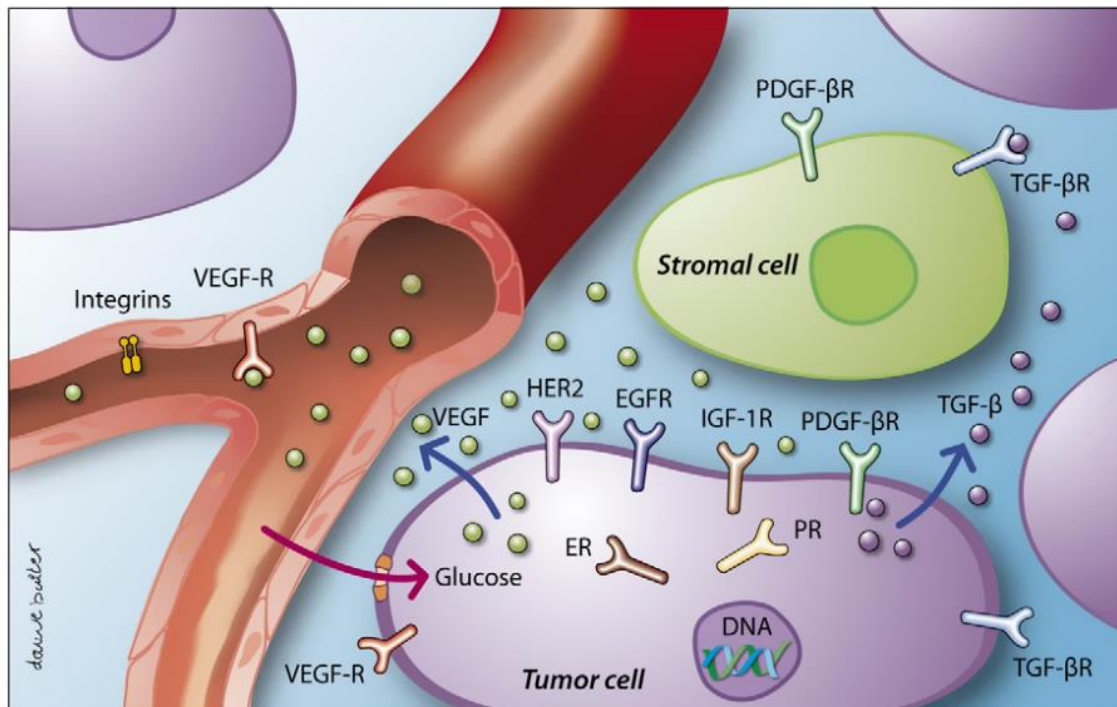


Figura 2: Potenciales blancos moleculares para el desarrollo de trazadores específicos de tumores de mama.

Si uno desea enfocarse en fenómenos generales, se puede visualizar el metabolismo de la glucosa o la síntesis de ADN, los que se encuentran aumentados en células tumorales en comparación con células normales [5].

Asimismo, el microambiente tumoral es muy complejo. Además de las células epiteliales neoplásicas, junto al tumor se encuentran varios tipos de células del estroma. Estas células del estroma incluyen fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliales, pericitos, células del músculo liso, adipocitos, macrófagos, linfocitos y mastocitos. La presencia de estas numerosas células puede explicarse si comprendemos cómo funcionan los tejidos normales. Estos son arquitectónicamente complejos y mantienen sus estructuras y funciones gracias al intercambio continuo de señales entre células, mediante la denominada señalización heterotípica. Muchas de las interacciones heterotípicas que operan en los tejidos normales siguen desempeñando un papel importante en la biología de los tumores [1]. En el caso del cáncer de mama se ha visto expresión del

receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor del factor-1 (IGF-1R) y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas β (PDGF- β R). Todos estos receptores que están involucrados en las señales heterotípicas se han convertido en objetivos interesantes para desarrollar nuevas formas de diagnóstico y de tratamiento [5].

Por otra parte, las células endoteliales, que se unen para formar los revestimientos de las paredes de los capilares y los vasos sanguíneos más grandes, así como los conductos linfáticos, representan un componente vital del estroma normal y neoplásico. Cuando las células carecen de acceso adecuado al oxígeno liberan factores angiogénicos que estimulan el crecimiento de capilares; este proceso es conocido como angiogénesis (Figura 3). Una vez que los capilares se ensamblan y se vuelven funcionales, proporcionan nutrientes esenciales y oxígeno a las células tumorales [1].

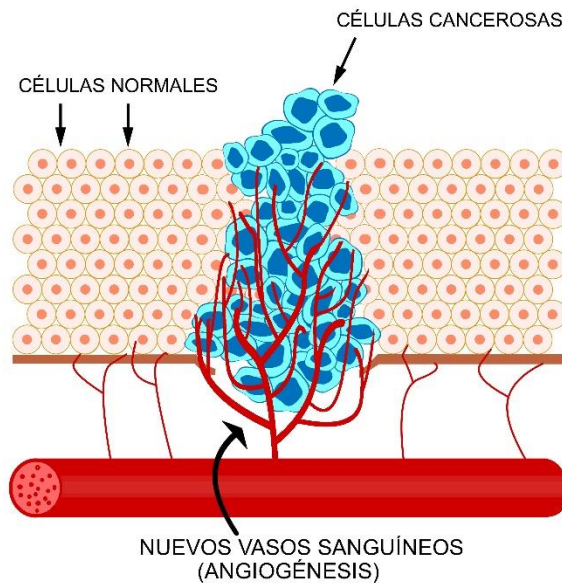


Figura 3: Esquema del proceso de angiogénesis en un tumor

En cáncer de mama se ha visto que las células tumorales excretan factores de crecimiento, como el crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) en el microambiente tumoral y, por lo tanto, los receptores involucrados en la angiogénesis (receptores VEGF, α V β 3,

integrinas, fibronectinas, endostatinas) pueden ser nuevos blancos moleculares [5].

Las hormonas sexuales juegan un papel importante en el desarrollo y crecimiento de cáncer, especialmente en cáncer de mama y próstata. El modo de acción de estas hormonas sexuales es la activación del receptor hormonal correspondiente en las células tumorales. El receptor unido a la hormona actúa como un factor de transcripción y activación de vías de señalización que inducen la proliferación y crecimiento tumoral. Debido al papel fundamental de las hormonas sexuales y sus receptores en la progresión del cáncer de mama y próstata, se han desarrollado terapias endócrinas, que tienen como objetivo interferir con las vías mediadas por el receptor hormonal al reducir el nivel de la hormona o bloqueo del receptor hormonal [6]. En el caso del cáncer de mama los receptores hormonales más relevantes son el receptor de estrógeno (RE) y el de progesterona [5,6].

El RE, es un receptor nuclear que juega un papel muy importante, tanto en el factor pronóstico como en el objetivo terapéutico. La expresión del RE se encuentra en solo el 6-10% de las células epiteliales de mama normales, mientras que en el 70% de los cánceres de mama primarios existe sobreexpresión de este receptor. Los tumores de mama con receptor de estrógeno positivo (RE+) generalmente responden a la terapia hormonal antiestrogénica, mientras que los tumores con RE negativo (RE-) requieren otro tipo de tratamiento. [7,8,9,10].

La terapia endocrina del cáncer de mama fue informada por primera vez en 1896 por Sir George Beatson, un cirujano británico que describió que la ooforectomía podría conducir a una regresión tumoral. En la década de 1960 el RE fue identificado por Toft, Gorski y Jensen y desde entonces la terapia hormonal ha sido dirigida a este receptor. Actualmente el tamoxifeno es el principal fármaco que se utiliza para la terapia hormonal. Conocer la presencia del RE en los tumores de mama permite una predicción más precisa de la respuesta a la terapia hormonal [9,10].

Una de las herramientas utilizadas para estudiar la expresión de este receptor es la biopsia. Una biopsia es un procedimiento diagnóstico que consiste en la

extracción de una muestra de un tumor. Sin embargo, los tumores son generalmente heterogéneos, por lo que una pequeña muestra de tejido puede no representar la biología exacta de ese tumor. Además, las biopsias son invasivas, conllevan algunos riesgos inherentes, pueden ser dolorosas, pueden perturbar el microambiente tumoral y pueden pasar por alto las partes más importantes del tumor. En este sentido, la Imagenología Molecular a través de la Medicina Nuclear puede proporcionar una alternativa, permitiendo obtener una imagen de la totalidad del tumor *in vivo*. Los métodos de imagen molecular son ciertamente complementarios a la biopsia y además presentan muchas ventajas, son mínimamente invasivos, permiten la recolección de los datos a lo largo del tiempo, se puede evaluar la respuesta a la terapia, proporcionan información funcional y abarcan grandes volúmenes de tejido (todo el cuerpo en la mayoría de los casos) [11].

2.2 Radiofármacos de diagnóstico

Un radiofármaco se puede definir como una sustancia química que contiene átomos radiactivos dentro de su estructura y es apta para ser administrada en seres humanos con fines de diagnóstico o terapia [12]. Los radiofármacos se administran en cantidades de trazas y no tienen efecto farmacológico, sino que es la energía emitida en el decaimiento la responsable de su función [13]. En resumen, un radiofármaco es una molécula que posee un átomo radiactivo, la cual mediante diferentes mecanismos se acumula selectivamente en el órgano o tejido de interés. Dependiendo del tipo de átomo radiactivo o radionucleido tendremos un radiofármaco de diagnóstico o de terapia (Figura 4).

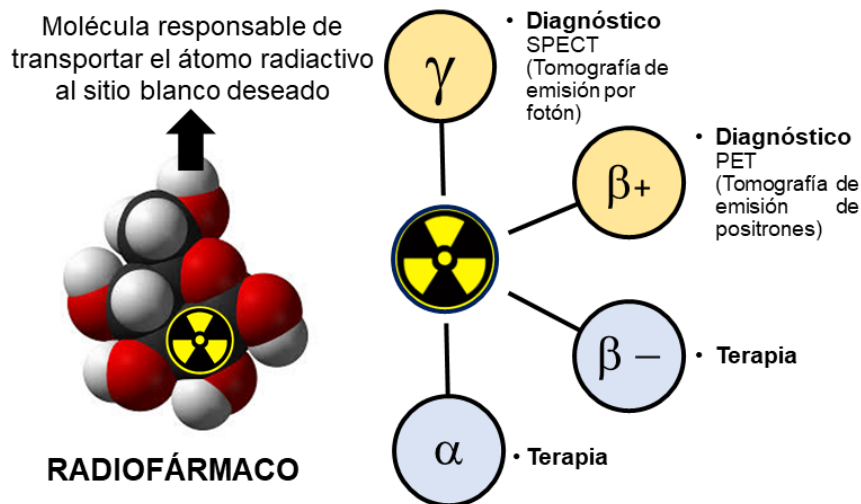


Figura 4: Esquema general de un radiofármaco

Los procedimientos diagnósticos consisten en administrar en forma sistémica (Figura 5-B) un radiofármaco que contenga un radionucleído emisor γ o emisor $\beta+$ cuya radiación de alto poder de penetración es detectada externamente (Figura 5-C). La radiación gamma emitida por los radiofármacos de diagnóstico escapa fácilmente del cuerpo, lo que permite la detección y medición externas. El patrón de distribución del radiofármaco en un órgano o sistema a lo largo del tiempo permite hacer una evaluación diagnóstica de la morfología y función de los mismos a través de una imagen (Figura 5-D) [13].

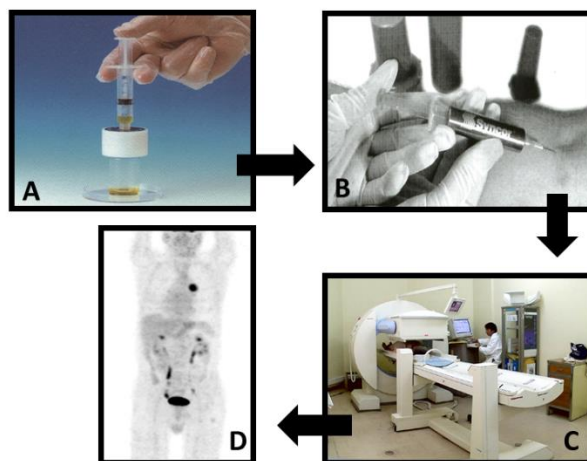


Figura 5: Esquema de un procedimiento diagnóstico de Medicina Nuclear

Dependiendo el tipo de emisor utilizado para estos estudios diagnósticos, la tecnología utilizada para tomar la imagen puede ser SPECT (single-photon emission computed tomography, tomografía de emisión de fotón único) o PET

(positrón emission tomography, tomografía de emisión de positrones). La radiación gama producto de radionucleidos que se desintegran por transición isomérica y captura electrónica interactúa mínimamente con el organismo y es capaz de llegar al detector. De aquí que los radionucleidos emisores γ son los elegidos para el desarrollo de radiofármacos de diagnóstico que serán utilizados con la modalidad SPECT [13]. En la Tabla 1 se muestra una recopilación de los principales radionucleidos utilizados a nivel mundial bajo la modalidad SPECT y de sus propiedades físicas más relevantes [14].

<i>Radionucleido</i>	<i>Período de semidesintegración (horas)</i>	<i>Energía γ (KeV)</i>	<i>Modo de decaimiento</i>
$[^{99m}\text{Tc}]/\text{Tc}$	6.0	140.5	γ
$[^{111}\text{In}]/\text{In}$	67.31	171.3	CE
		245.4	
$[^{123}\text{I}]/\text{I}$	13.22	159	CE
$[^{201}\text{Tl}]/\text{Tl}$	73.01	167.4	CE

Tabla 1: Principales radionucleidos utilizados a nivel mundial bajo la modalidad SPECT

Existen otros radionucleidos que si bien son emisores de radiación particulada son utilizados para fines de diagnóstico: los radionucleidos emisores β^+ . Son los que se desintegran mediante emisión de positrones que se aniquilan con un electrón del medio a los pocos milímetros del lugar de emisión dando lugar a la aparición de dos rayos gamma de 511 KeV, útiles para diagnóstico (Figura 6-A). Estos radionucleidos son los que se emplean en la modalidad PET. En esta modalidad los fotones de aniquilación emitidos a 180 grados transmiten una señal coincidente cuando se detectan simultáneamente. Los eventos registrados se reconstruyen en una imagen tridimensional que representa la distribución espacial del trazador en el paciente estudiado (Figura 6-B) [13].

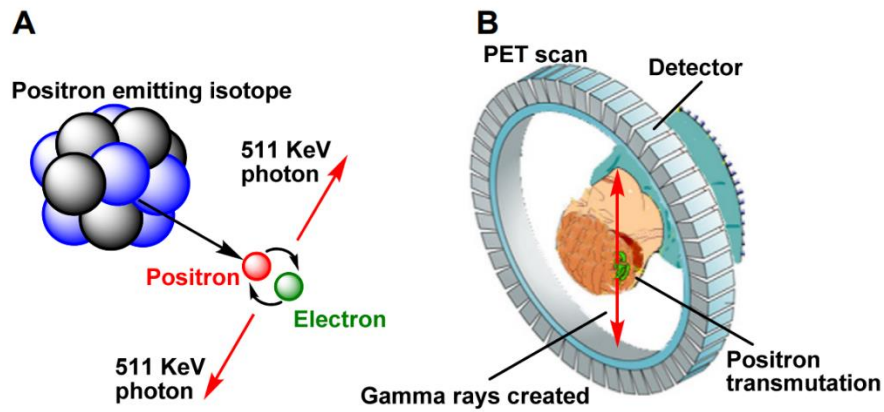


Figura 6: A-aniquilación del positrón, B-detectores en cámara PET [69]

En la Tabla 2 se describen los principales radionucleidos emisores de positrones utilizados a nivel mundial para modalidad PET [14].

<i>Radionucleido</i>	<i>Período de semidesintegración</i>	<i>Promedio energía B+ (MeV)</i>
$[^{11}\text{C}]\text{C}$	20.385 min	0.386
$[^{13}\text{N}]\text{N}$	9.965 min	0.492
$[^{15}\text{O}]\text{O}$	2.037 min	0.735
$[^{18}\text{F}]\text{F}$	109.77 min	0.250
$[^{62}\text{Cu}]\text{Cu}$	9.673 min	1.314
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}$	12.701 h	0.278
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$	67.71 min	0.830
$[^{82}\text{Rb}]\text{Rb}$	76.38 s	1.479
$[^{86}\text{Y}]\text{Y}$	14.74 h	0.660
$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$	78.41 h	0.396
$[^{124}\text{I}]\text{I}$	4.176 d	0.820

Tabla 2: Principales radionucleidos utilizados a nivel mundial bajo la modalidad PET [14]

La principal ventaja de la Medicina Nuclear frente a otras modalidades de Imagenología, tales como la Tomografía Computada (CT) o la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), es la posibilidad de estudiar la funcionalidad de los órganos y no solamente su anatomía, ya que el mecanismo de captación y retención de los radiofármacos depende de dicha funcionalidad. Los estudios de imagen se clasifican en dos grandes tipos, los estudios dinámicos y los estudios estáticos. Los estudios dinámicos requieren que el detector de la cámara se coloque sobre el órgano de interés antes de la inyección del radiofármaco, de modo que la cámara pueda capturar la radiactividad a medida que entra y sale del órgano. Estos estudios proporcionan información funcional a través de la medición de la tasa de acumulación y eliminación del radiofármaco por parte del órgano. Los estudios estáticos se realizan después de que se permite que un radiofármaco se acumule en el órgano de interés. Estos estudios proporcionan información morfológica sobre el tamaño, la forma y la posición de los órganos o la presencia de lesiones que ocupan espacio, receptores y en algunos casos la función relativa [12].

El patrón de distribución del radiofármaco en un órgano varía y depende del órgano particular estudiado y la presencia o ausencia de enfermedad. En algunos estudios, el órgano normal concentra fácilmente el radiofármaco y aparece uniformemente radiactivo o "caliente", mientras que el tejido enfermo excluye el radiofármaco, y las lesiones aparecen como puntos "fríos" dentro de un órgano "caliente". En otros tipos de estudios el órgano normal excluye el radiofármaco; pero el tejido enfermo lo concentra para que las lesiones aparezcan como puntos "calientes" dentro de un órgano "frío". En otros casos, un órgano normal puede acumular el radiofármaco, pero el tejido enfermo puede concentrarlo en mayor grado debido al aumento de la función o la sobreexpresión de receptores o en menor grado debido a la disminución de la función o disminución de receptores [12].

Las imágenes funcionales que se obtienen con los estudios de Medicina Nuclear a menudo carecen del detalle anatómico necesario para la localización precisa de la lesión, lo que puede disminuir la confianza del médico tratante en la interpretación de la imagen y conducir a interpretaciones inciertas o erróneas. Durante algún tiempo la solución a este problema se encontró al usar un software de fusión que permite fusionar las imágenes de Medicina Nuclear con las

imágenes anatómicas por ejemplo CT o RMN, adquiridas como estudios separados. Sin embargo, las diferencias en la posición del paciente, los cambios de intervalo en la posición de los órganos (es decir, gas intestinal, vejiga) entre los estudios y los artefactos respiratorios o de movimiento pueden hacer que la alineación precisa de las imágenes sea desafiante y no siempre exitosa [16]. Es por esto que se han desarrollado equipos híbridos SPECT/CT y PET/CT, de manera de poder obtener imágenes funcionales y estructurales del mismo paciente en el mismo momento (Figura 7). La fusión de imágenes permite imponer un marco anatómico estructural a las imágenes funcionales, brindan puntos de referencia anatómicos para identificar con precisión el foco de absorción anormal y las estructuras que contienen actividad normal, y permite visualizar detalles de la anatomía de los órganos normales y enfermos [17].

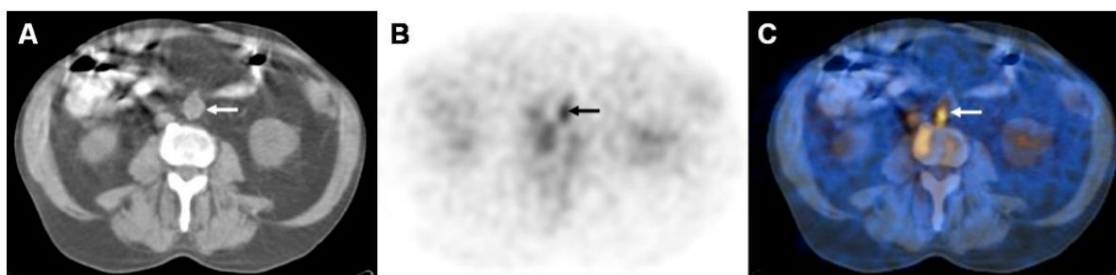


Figura 7: Imagen de CT (A), imagen de SPECT (B), imagen obtenida al fusionar A y B (C) de un mismo paciente.

El nacimiento de la Medicina Nuclear en Uruguay está estrechamente ligado a la fundación y desarrollo del Centro de Medicina Nuclear (CMN) del Hospital de Clínicas en el año 1962 [15]. Uruguay cuenta con SPECT desde el año 1982 cuando este centro recibió el equipamiento a través del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), hecho que significó un importante avance en Medicina Nuclear en nuestro país. Desde el 2010 Uruguay cuenta con tecnología PET gracias a la apertura del Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM). Actualmente el país cuenta con 9 centros de Medicina Nuclear con modalidad SPECT ubicados 7 en la capital y 2 en el interior del país y un único centro PET ubicado en Montevideo.

El desarrollo de un potencial radiofármaco implica varias etapas que se muestran en la Figura 8 y que se describirán brevemente a continuación.

En primer lugar, es importante realizar un estudio exhaustivo del proceso patológico que se desea diagnosticar o tratar para así encontrar el blanco molecular al cual va a estar dirigido el trazador. Para el caso del cáncer de mama ya se detallaron anteriormente en el texto algunos ejemplos de posibles blancos moleculares.

Otra de las decisiones a tomar es la selección del radionucleido de trabajo. Aquí se debe tener en cuenta si el fin del trazador es de diagnóstico o de terapia, el período de semidesintegración del radionucleido involucrado, disponibilidad y costos.

La siguiente etapa es el diseño de la molécula a marcar con el radionucleido previamente seleccionado. Esta molécula, generalmente posee dos partes, una parte biológicamente activa que llegará al blanco molecular y una parte que incluirá átomos para poder unir el radionucleido seleccionado. Generalmente se debe sintetizar dicha molécula a partir de reactivos comerciales. En esta etapa se realiza la elucidación estructural de la molécula utilizando herramientas como espectroscopia de resonancia magnética nuclear, espectroscopia infrarroja y espectroscopia de masas.

El siguiente paso es la incorporación del átomo radiactivo, lo que comúnmente se denomina marcación. En esta etapa se deben optimizar parámetros como cantidad de ligando o precursor, cantidad de radionucleido, tiempo, temperatura, pH, entre otros, así como desarrollar un método que permita evaluar la pureza radioquímica (PRQ) de la molécula marcada. Generalmente los métodos seleccionados para determinar la PRQ son de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

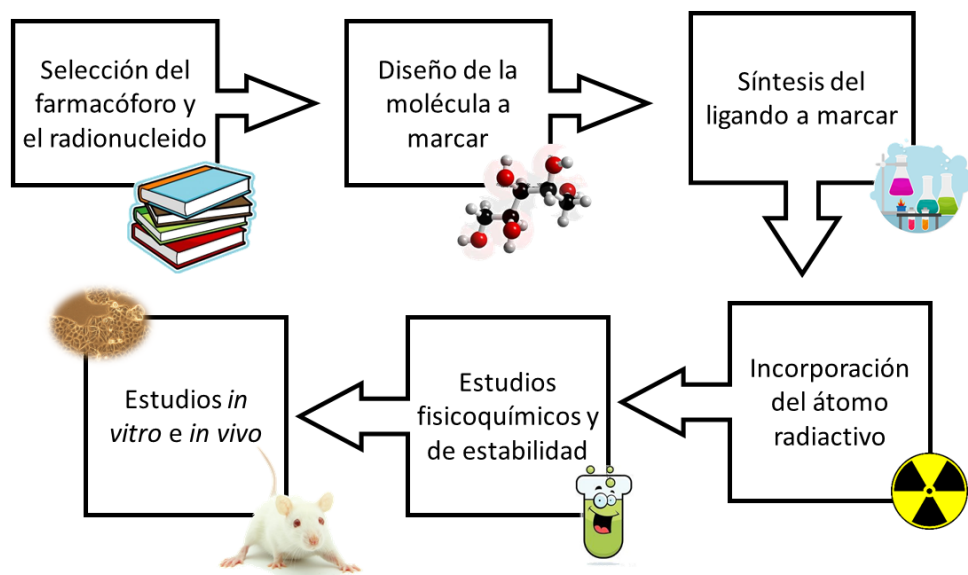


Figura 8: Etapas involucradas en el desarrollo de un radiofármaco

Si el compuesto radiactivo es obtenido con buen rendimiento y adecuada pureza, será evaluado a fin de determinar su potencialidad como trazador. La caracterización fisicoquímica generalmente incluye la determinación de la estabilidad del trazador a lo largo del tiempo, así como su estabilidad en medios biológicos como el plasma. También se evalúa su unión a proteínas plasmáticas y su lipofilidad, factores relevantes para la llegada del trazador al sitio blanco. La evaluación biológica *in vitro* consiste en trabajar con líneas celulares de manera de determinar el porcentaje de unión del compuesto en estudio al blanco molecular de interés. La evaluación biológica *in vivo* se realiza en primer lugar en animales normales a fin de establecer la distribución biológica, con especial atención al comportamiento farmacocinético en sangre, las vías de eliminación y órganos de acumulación. Posteriormente se podrá trabajar con animales portadores de la patología a la que el trazador está dirigido, de manera de conocer la acumulación del trazador en el sitio blanco.

2.3 Radiometales y química del $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$

Los radionucleidos metálicos son particularmente interesantes para el desarrollo de radiofármacos debido a la variedad de propiedades nucleares (tipo de radiación, energía de sus fotones gamma o partículas beta, período de semidesintegración) y las posibilidades de unión a distinto tipo de moléculas utilizando su química de coordinación [16,17]. La tabla que se encuentra a continuación muestra los radiometales más utilizados para diagnóstico y terapia en la actualidad (Tabla 3) [18].

<i>Radionucleido</i>	<i>Modo de decaimiento</i>	<i>Período de semidesintegración (horas)</i>	<i>Usos</i>
$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$	γ	6.0	Diagnóstico
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}$	EC + $\beta+$ (61.5 %), $\beta+$ (17.6%) $\beta-$ (38.5%)	12.7	Diagnóstico y Terapia
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$	$\beta+$ (89.1%) EC (100%)	1.1	Diagnóstico
$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$	EC + $\beta+$ (100%) $\beta+$ (22.7%)	78.4	Diagnóstico
$[^{90}\text{Y}]\text{Y}$	$\beta-$	63.8	Terapia
$[^{111}\text{In}]\text{In}$	EC	67.9	Diagnóstico
$[^{153}\text{Sm}]\text{Sm}$	$\beta-$, γ	46.5	Terapia
$[^{188}\text{Re}]\text{Re}$	$\beta-$	17.0	Terapia
$[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$	$\beta-$, γ	88.8	Terapia

Tabla 3: Principales radiometales utilizados en Medicina Nuclear

La marcación se realiza en la mayoría de los casos a través de la formación de complejos o compuestos de coordinación. En un compuesto de coordinación, un átomo central es coordinado por una o más moléculas las cuales actúan como

base de Lewis, formando enlaces de coordinación con el átomo central, que actúa como ácido de Lewis. Los átomos donadores en el ligando están directamente enlazados al átomo central [19].

Diversos factores afectan el estado de oxidación final del metal en el complejo: la naturaleza del reductor y del ligando, el pH y la temperatura. El factor de mayor influencia es la naturaleza de los grupos donadores presentes en el ligando. Los ligandos, que actúan como bases de Lewis en la formación del complejo, se clasifican según los criterios de Pearson, de acuerdo con su dureza. Ligandos duros son aquellos que presentan grupos donadores de electrones de pequeño tamaño, y en general, retienen carga negativa sobre ellos. Por el contrario, ligandos blandos presentan mayor tamaño y menor densidad electrónica. Los mismos criterios pueden aplicarse en la clasificación del metal, que actúa como ácido de Lewis. Además, se debe tener en cuenta que un ácido duro de Pearson formará preferentemente complejos estables con bases también duras [20].

Los radiometales utilizados en Radiofarmacia poseen diferentes químicas de coordinación y por lo tanto requieren diferentes átomos donadores para completar la esfera de coordinación. El sistema quelante seleccionado tiene un impacto significativo en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los complejos obtenidos. Por esta razón, es usual modificar el entorno de coordinación alrededor del radiometal, cambiando los sistemas quelantes o mediante el uso de varios coligandos si es necesario para modular las propiedades del trazador en desarrollo [16,21].

En la década de 1980 la investigación radiofarmacéutica se centró en el desarrollo de radiotrazadores de perfusión, cuya biodistribución refleja el flujo sanguíneo regional de órganos como son el corazón y el cerebro. A medida que el tiempo pasó la investigación se ha centrado más en el uso de ligandos radiomarcados específicos para algún blanco molecular [16].

La Figura 9 muestra dos estrategias generales para el diseño de radiofármacos metálicos destinados a algún blanco específico [16]. Cabe destacar que la marcación con metales de moléculas capaces de interaccionar con sistemas biológicos de alta especificidad constituye un gran desafío, ya que es necesario introducir un metal completamente ajeno a las moléculas biológicas sin alterar

sus propiedades [21]. Idealmente, la afinidad de un ligando específico por su diana biológica no debería modificarse después de la incorporación del radiometal [18].

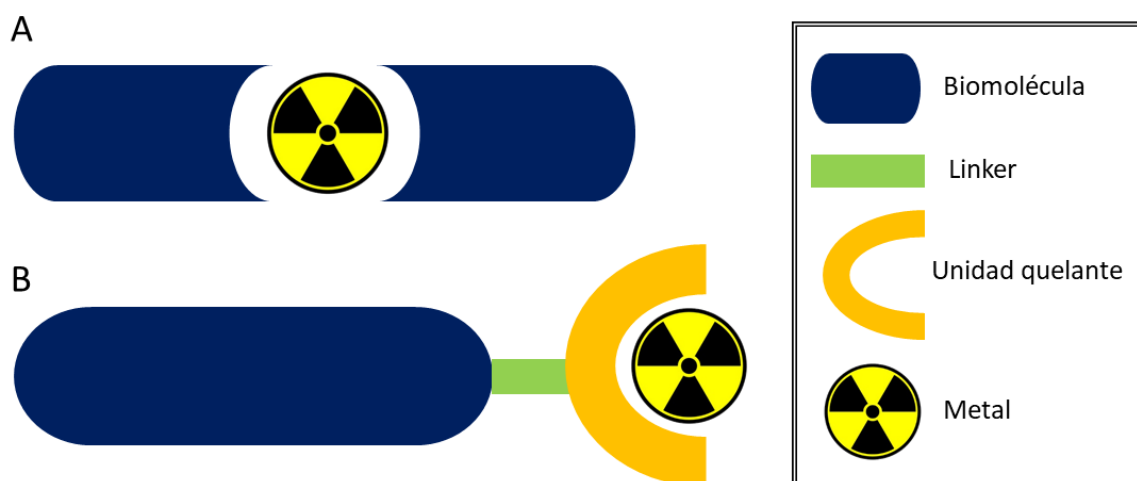


Figura 9: Estrategias de diseño de radiofármacos metálicos. A: Integrated approach. B: Pendant approach

La primera estrategia es el “integrated approach” (Figura 9-A) que consiste en simular mediante el complejo de coordinación la estructura del compuesto bioactivo. En este enfoque las partes individuales no son activas en la unión al receptor, sino que todas las partes se disponen de tal manera que todo el complejo metálico se convierte en una molécula de alta afinidad por el sitio blanco [16, 20]. La Figura 10 muestra una aplicación interesante de este enfoque en la que se ha intentado desarrollar un complejo que simula la estructura de una hormona esteroidea como es el estradiol. Desafortunadamente, el complejo mostró una afinidad muy baja por el receptor involucrado. Este método es desafiante y los ejemplos son raros ya que, para las moléculas pequeñas, en la mayoría de los casos la afinidad del receptor disminuye significativamente. Este enfoque puede ser adecuado para especies de alto peso molecular en las que se puede minimizar el impacto del tamaño del complejo metálico [18].

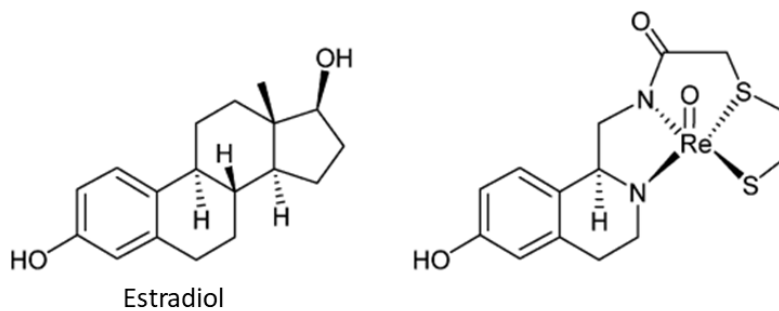


Figura 10: Diseño de radiofármacos- Enfoque integral

La segunda estrategia es el “pendant approach” o enfoque bifuncional (Figura 9-B). Este es el método más utilizado para incorporar radiometales a biomoléculas de interés. En este enfoque se utiliza un agente bifuncional capaz de quelar el metal involucrado por un lado y unirse a la biomolécula por otro. Las biomoléculas pueden ser anticuerpos monoclonales, péptidos, proteínas o moléculas pequeñas [16,20,21]. Cuando la biomolécula a marcar es lábil y no puede quedar expuesta a las condiciones duras (pH, temperatura) necesarias para la coordinación se utiliza el enfoque “prelabeling approach” que se esquematiza en la Figura 11. El “prelabeling approach” implica el marcado del agente bifuncional con el radiometal, la activación de este agente bifuncional para ser *a posteriori* conjugado con la biomolécula que debe tener un grupo funcional adecuado para permitir la misma [18,22].

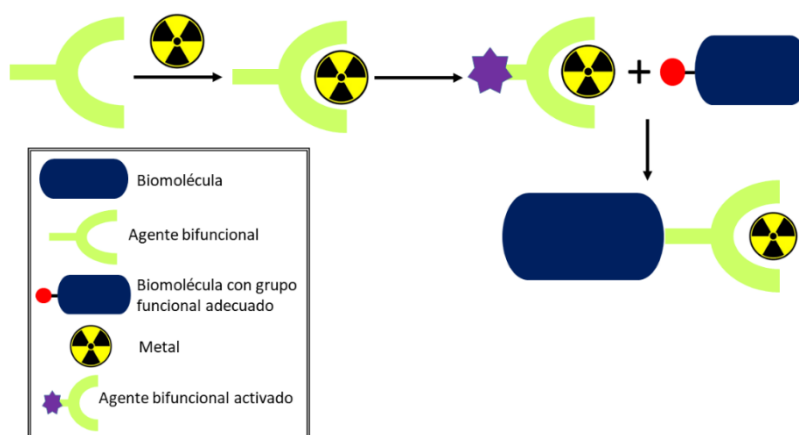


Figura 11: “prelabeling approach”

Lo mas usual en Radiofarmacia es sintetizar un ligando que contiene la biomolecula y los átomos donadores de electrones para coordinar con el metal.

La Figura 12 muestra algunos ejemplos de reacciones químicas utilizadas a estos efectos [18].

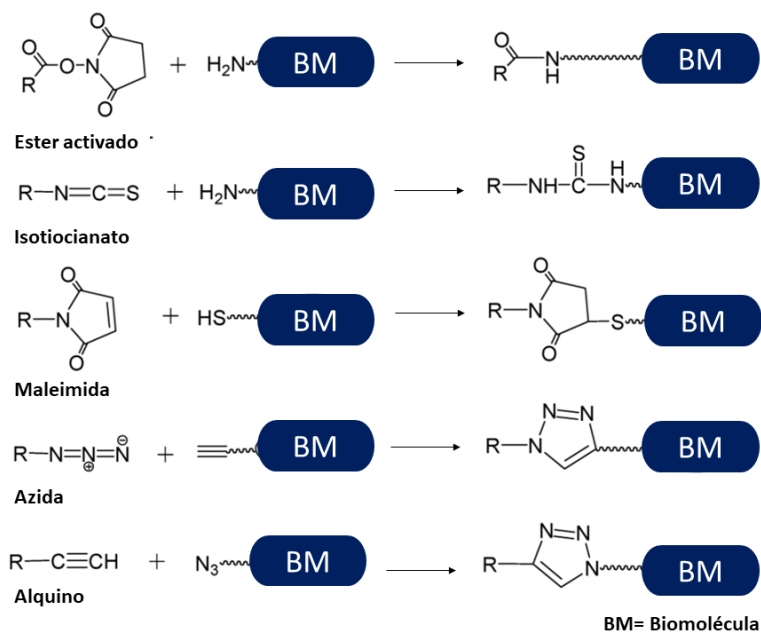


Figura 12: Reacciones de conjugación entre quelantes bifuncionales activados y biomoléculas

Una vez obtenido ese ligando se procede a realizar la reacción de marcación con el radiometal seleccionado (Figura 13) [18,22].

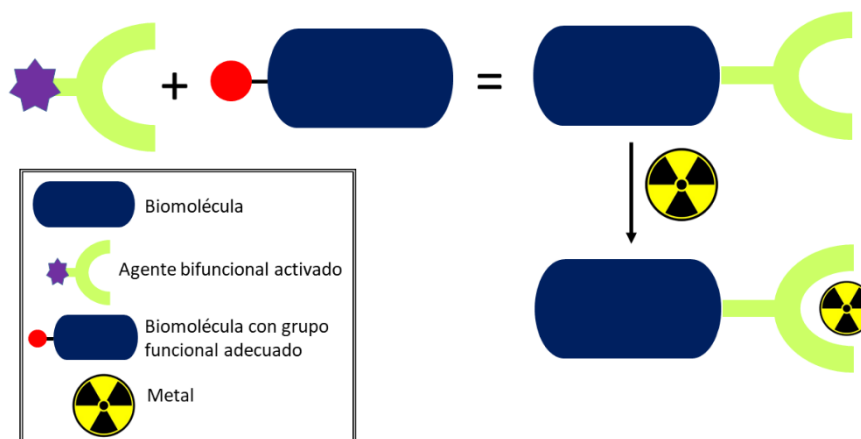


Figura 13: Marcación de biomoléculas utilizando pendant approach

Casi el 80% de todos los radiofármacos utilizados en Medicina Nuclear diagnóstica son compuestos marcados con $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ [16]. La existencia del Tecnecio fue anunciada por Mendeleiev en 1869 y finalmente descubierto y caracterizado por C. Perrier y el premio nobel E.Segré en 1937 [23]. Dado que

en ese momento este elemento estaba exclusivamente disponible en cantidades traza en láminas de Molibdeno pasó algún tiempo antes de que se pudiera comenzar la exploración de su química a nivel macroscópico. Los primeros informes sobre la química del Tecnecio en mayor escala aparecieron a principio de los años cincuenta, cuando el ^{99}Tc Tc se obtuvo a partir del análisis de los combustibles nucleares ya usados. Durante mucho tiempo el tecnecio se consideró simplemente un elemento artificial "exótico" y no se le prestó demasiada atención. Esto cambió por completo cuando se descubrieron las propiedades muy favorables del isómero metaestable de ^{99}Tc Tc para fines de diagnóstico [24].

El tecnecio es el elemento 43 de la Tabla Periódica. Existen 21 isotopos que van desde el ^{90}Tc Tc a ^{110}Tc Tc, siendo todos ellos radiactivos. El $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Tc ha logrado una amplia aplicación en la Medicina Nuclear diagnóstica debido a sus propiedades nucleares ideales para la obtención de imágenes: emisión γ pura con alto rendimiento de fotones, energía de 140 keV capaz de detectarse y medirse externamente con alta eficiencia mediante detectores de NaI(Tl) y período de semidesintegración de 6 horas, compatible con el tiempo requerido para la preparación de los radiofármacos y el tiempo necesario para realizar el estudio de Medicina Nuclear. A las propiedades nucleares favorables se debe agregar la fácil disponibilidad a partir de generadores de ^{99}Mo Mo/ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Tc [22, 23].

Desde el punto de vista químico, el tecnecio es un metal de transición cuya configuración electrónica del átomo neutro es $(\text{Kr})4d^6 5s^1$. Puede presentar estados de oxidación entre -1 y +7. Las formas reducidas del Tc presentan niveles d incompletos y forman fácilmente compuestos de coordinación, en los que el metal deficiente en electrones se enlaza a átomos o grupos de átomos capaces de donar electrones [21,22,23]. El primer paso para la marcación con Tc es generalmente la reducción del Tc (VII), ya que la mayoría de los complejos con utilidad diagnóstica contienen el metal en estados de oxidación entre +5 y +1. (excepciones destacables: el propio ion pertecneciato y el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Tc-S coloidal en que el Tc se encuentra en estado de oxidación +7 bajo forma de Tc_2O_7) [20,21,22]. Los agentes reductores más utilizados en la actualidad son el cloruro estannoso (SnCl_2) y el borohidruro de sodio (NaBH_4).

Diversos factores afectan el estado de oxidación del metal en el complejo: la naturaleza del reductor y del ligando, el pH y la temperatura [21,25]. Además, los experimentos han demostrado que algunos ligandos pueden producir complejos con tecnecio en un estado de oxidación específico, mientras que otros ligandos producen complejos con tecnecio en más de un estado de oxidación. Por ejemplo, la reducción del TcO_4^- con cloruro estannoso en presencia del ligando tetradentado ciclám da lugar a la formación de un complejo con el tecnecio en estado de oxidación 5, mientras que el mismo reductor con un alquilisonitrilo, el TBI, como ligando origina un compuesto de Tc (I) (Figura 14-A) [21]. El ligando difenilfosfino etano forma un complejo con Tc (V) cuando la reducción tiene lugar a temperatura ambiente y bajo pH, mientras que si se incrementa la temperatura el Tc estará en estado de oxidación III y si se aumentan tanto pH como temperatura obtendremos Tc (I) (Figura 14-B) [21].

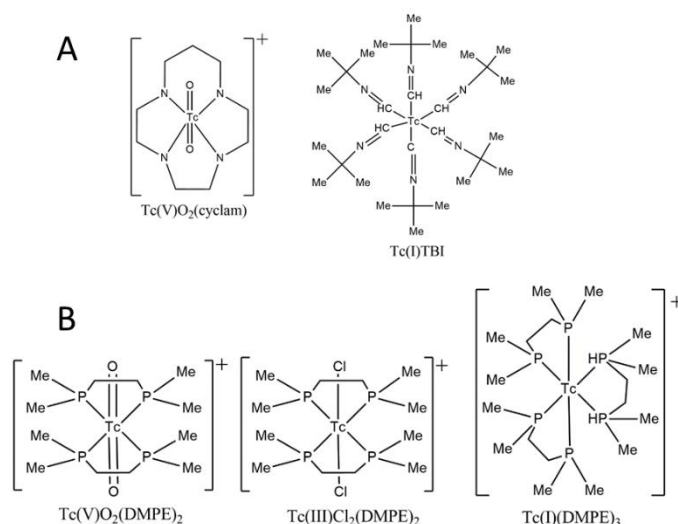


Figura 14: A-influencia del ligando en el estado de oxidación del metal, B- influencia de la temperatura y el pH en el estado de oxidación del metal

Sin duda el factor de mayor influencia en el estado de oxidación del metal es el ligando. En estados de oxidación altos (+5, +4) la alta carga del centro metálico convierte al Tc en un ácido duro. La estabilidad se logra por coordinación con bases duras, como los grupos oxo, nitruro o nitreno. Estos grupos se unen directamente al átomo metálico formando un núcleo o core en el que quedan aun sitios de coordinación disponibles para unión a los ligandos. Estos cores son relativamente inertes, no siendo alterados, en general, ni por la formación del

complejo, ni por eventuales reacciones de sustitución de ligandos. Por otro lado, el Tc en estados de oxidación más bajos (+3, +1) es un ácido blando y por lo tanto se une preferentemente a bases blandas que contienen aceptores π como fosfinas, arenos o isonitrilos [21,25].

Para la Radiofarmacia los estados de oxidación más relevantes son el +1, +3 y +5. En la Figura 15 se resumen los principales cores asociados a cada estado de oxidación.

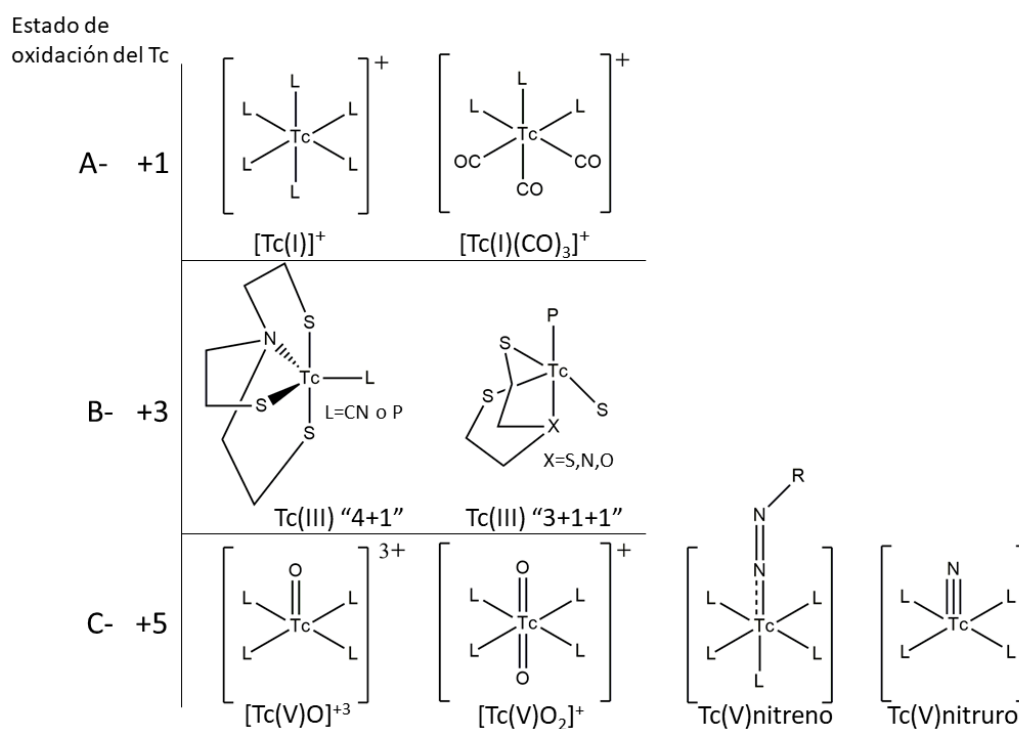


Figura 15: Principales cores de Tc

Tecnecio (I)

El tecnecio en estado de oxidación +1 (Figura 15-A) presenta una configuración d^6 , la que debe ser estabilizada por ligandos deficientes en electrones como fosfinas, difosfinas e isonitrilos, todos ellos dadores σ y aceptores π . Un ejemplo es el radiofármaco [^{99m}Tc]Tc-Sestambi (Cardiolite®), utilizado como trazador de perfusión miocárdica. Se trata de un complejo que contiene seis moléculas del ligando monodentados 2- metoxiisobutilisonitrilo (Figura 16-A) [20,21,22,24,25]. Otro core que ha cobrado especial importancia es el Tc(I)-tricarbonílico o $[Tc(CO)_3]^+$. Se trata de un core que contiene al metal en estado de oxidación +1 (Figura 15-A) coordinado y estabilizado por 3 moléculas de monóxido de

carbono. En 1998, el grupo del Dr. Roger Alberto propuso la formación a baja presión del acuocomplejo tricarbónico de Tc(I) *fac*[[^{99m}Tc]Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ (Figura 16-B), el que puede ser utilizado como precursor para obtener una gran variedad de potenciales radiofármacos. Se trata de un complejo en el cual tres de las posiciones de coordinación son ocupadas por los grupos carbonilo fuertemente unidos al metal. El enlace de coordinación entre el metal y los grupos carbonilo es muy estable debido a que estos ligandos son dadores σ y aceptores π . El intenso campo de los ligandos resultante, conjuntamente con la configuración electrónica d^6 del metal, provoca una significativa estabilización del estado de oxidación +1 y evitan que éste pueda sufrir nuevas reacciones de óxido-reducción. El resto de las posiciones de coordinación disponibles están ocupadas por tres moléculas de agua débilmente unidas. Éstas pueden ser reemplazadas por ligandos que posean una combinación de átomos donadores con alta afinidad por el metal [21,22,25-30]. Existe una amplia gama de posibles grupos donadores para completar la esfera de coordinación de este core, desde grupos duros e hidrofílicos basados en ácidos carboxílicos y aminas alifáticas, hasta otros blandos y lipofílicos, preferentemente aminas aromáticas. También los grupos tiol, tioéter o fosfina se coordinan adecuadamente con el precursor tricarbónico. Los ligandos que contienen este tipo de grupos no solamente son simples de sintetizar, sino que también aparecen en muchas moléculas biológicamente activas, en particular en el aminoácido histidina presente en muchas proteínas y péptidos [25].

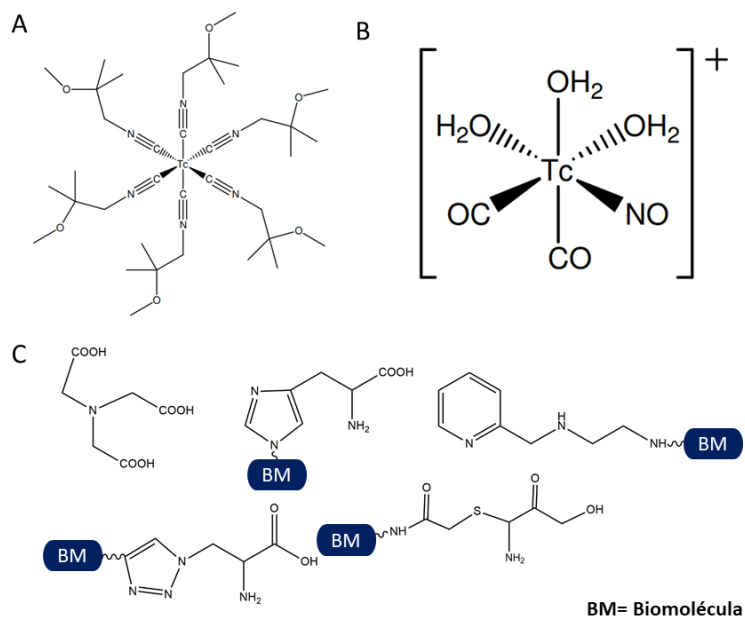


Figura 16: A- ^{99m}Tc]Tc-Sestambi (Cardiolite®), B- $[\text{fac-}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$, C- ligandos tridentados adecuados para la formación de complejos de Tc(I)-tricarbonílicos.

La Figura 16-C muestra ligandos tridentados adecuados para la sustitución de las 3 moléculas de agua del complejo precursor. Estas estructuras pueden unirse químicamente a variedad de biomoléculas. Este sistema ha sido utilizado en la marcación de ligandos para receptores del sistema nervioso central, receptores de andrógenos en cáncer de próstata (Figura 17-A), agentes para imágenes miocárdicas, agentes intercalantes de DNA, péptidos (Figura 17-B), entre otros [30-34]. Nuestro grupo de trabajo tiene experiencia en el desarrollo de este tipo de complejos con quelantes tridentados conteniendo nitrógeno, oxígeno o azufre como donadores de electrones. En la Figura 17 se muestra un complejo de ^{99m}Tc]Tc(I)tricarbonílico análogo de la glucosa (C) y un complejo de ^{99m}Tc]Tc(I)tricarbonílico para la evaluación de la hipoxia tumoral (D), ambos desarrollados y evaluados por nuestro grupo [35,36].

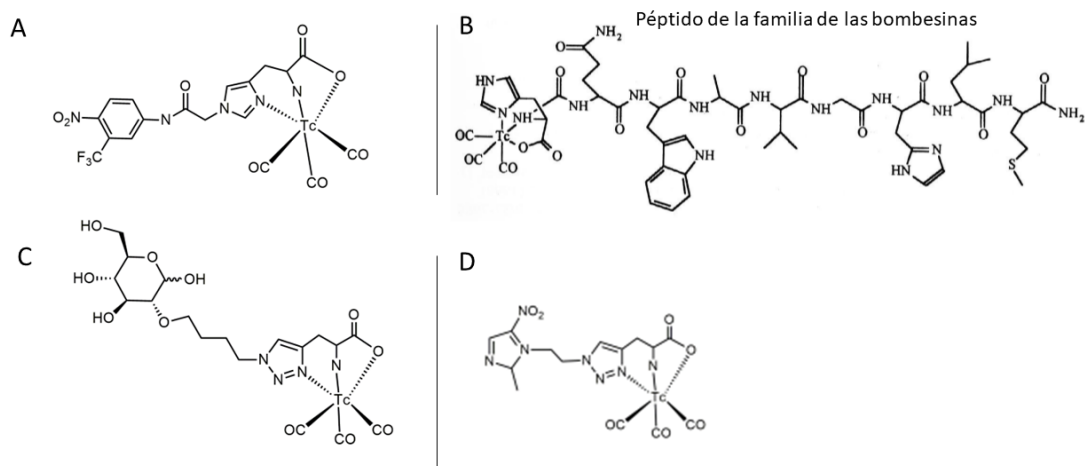


Figura 17: Ejemplos de complejos del tipo $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{I})$ tricarbónicos

Un estudio sistemático sobre la influencia de la denticidad de los ligandos sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los compuestos tricarbónicos ha demostrado que el uso de ligandos bidentados no es del todo adecuado para la preparación de compuestos estables, ya que la presencia de una molécula de agua lábil en el compuesto final favorece la inestabilidad *in vivo* por intercambio con grupos funcionales presentes fundamentalmente en las proteínas. El resultado es una depuración más lenta y un aumento de la actividad retenida en riñones o hígado. La Figura 18-A muestra un complejo de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{I})$ tricarbónico que posee un ligando bidentado derivado del nitroimidazol y una molécula de agua para completar la esfera de coordinación, este complejo fue desarrollado por nuestro grupo y demuestra lo antes expuesto [25,36]

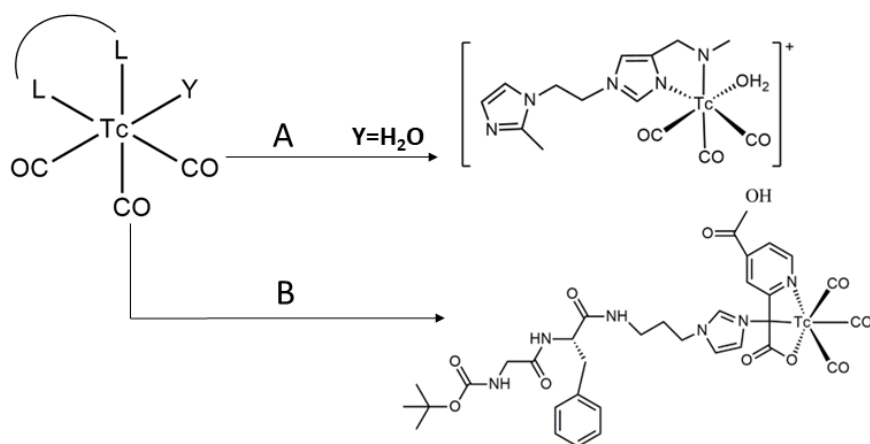


Figura 18: Complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{I})$ tricarbónicos del tipo 2+1

Otra posibilidad es la preparación de complejos tricarbónicos mixtos de tipo 2 +1, en los cuales las 3 moléculas de agua del precursor son sustituidas por la acción simultánea de un ligando bidentado (por ejemplo, etilendiamina, histamina o 2-picolilamina) y uno monodentado (isonitrilo, imidazol, etc) (Figura 18-B) [37,38] Este nuevo concepto aporta una mayor versatilidad y flexibilidad al diseño.

Otra posibilidad más reciente ha sido la introducción de ciclopentadienilos (Cp) derivatizados como potenciales ligandos para la preparación de complejos de ^{99m}Tc conteniendo el core *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$. El ciclopentadienilo ofrece varias ventajas que lo hacen potencialmente aplicable a la preparación de radiofármacos: es pequeño, tiene bajo peso molecular, imita a los anillos de fenilo y forma complejos de tricarbonilo tipo piano-taburete pequeños y estables con tecnecio y renio. Las síntesis de los ligandos conteniendo Cp multifuncionales (Figura 19-A) se basa en la reacción de Hatanaka donde una sal de trifenilfosfina con sustituyentes R reacciona con α -bromocetonas también con sustituyentes R en condiciones suaves y con buenos rendimientos [22,25,26,39]. En la Figura 19-B se muestra la estructura de estos complejos y algunos ejemplos de esta estrategia para la formación de complejos de ^{99m}Tc con moléculas de pequeño tamaño [39] así como también estructuras de mayor tamaño, como péptidos [22,40].

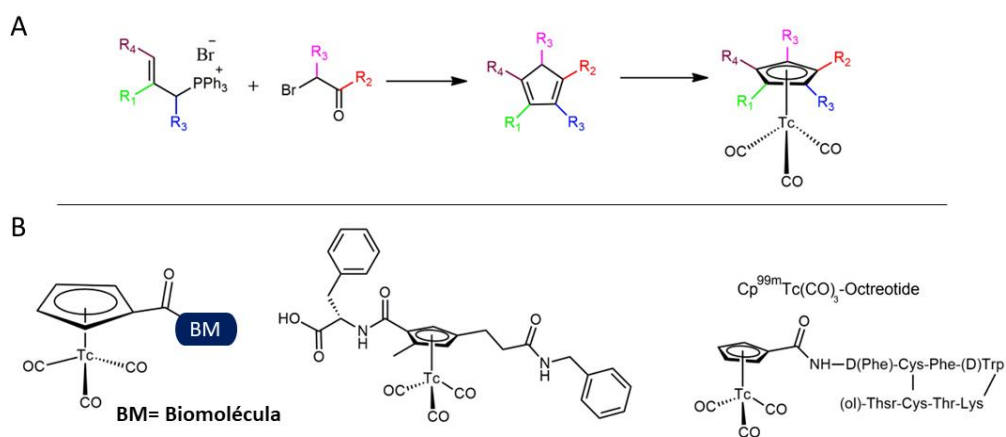


Figura 19: A- reacción de Hatanaka para la síntesis de ligandos Cp multifuncionales, B- estructura y ejemplos de los complejos Cp.

Tecnecio (III)

El tecnecio en estado de oxidación +3 (Figura 17-B) es un ácido blando y por tanto se une preferentemente a bases blandas que contienen grupos aceptores π , principalmente fosfinas o isonitrilos. En este estado de oxidación las estructuras formadas son penta o hexacoordinadas, dependiendo de los ligandos empleados. Los complejos de Tc(III) no contienen grupos oxo o nitrido en su estructura, lo que confiere una menor polaridad a la molécula final. En este tipo de complejos, el centro metálico quedaría más protegido por los grupos donadores de electrones sufriendo una menor sustitución *in vivo* y por lo tanto presentando en teoría una mayor estabilidad [25,41,42]. Un radiofármaco de segunda generación sería el único ejemplo de este tipo de complejos aplicado a la Radiofarmacia. El Teboroxime (CardioTec®) es un complejo lipofílico neutro utilizado para imágenes de perfusión miocárdica (Figura 20-A) [22,23].

Dentro de los complejos de Tc(III) se ha explorado el concepto de complejos mixtos 3+1+1 o 3+2. Los primeros complejos mixtos de Tc(III) que se estudiaron fueron los 3+1+1 (Figura 20-B). Estos están formados por un ligando tridentado del tipo NS₂ (coordina al radiometal por un nitrógeno alifático y dos tioles), una fosfina monodentada y un tiol monodentado. Si bien en la teoría este tipo de complejos da la posibilidad de acoplar la biomolécula a uno de los ligandos monodentados y emplear el otro para modificar las propiedades fisicoquímicas del complejo final, en la práctica estos complejos resultaron inestables *in vivo* debido a la presencia de dos ligandos monodentados. La solución planteada a este problema entonces fue pasar al empleo de los complejos 3+2 (Figura 20-C). La estructura formada en este caso resultó más estable, pero las dificultades aparecieron al momento de realizar la funcionalización de los ligandos polidentados, lo que resultaba bastante difícil de realizar.

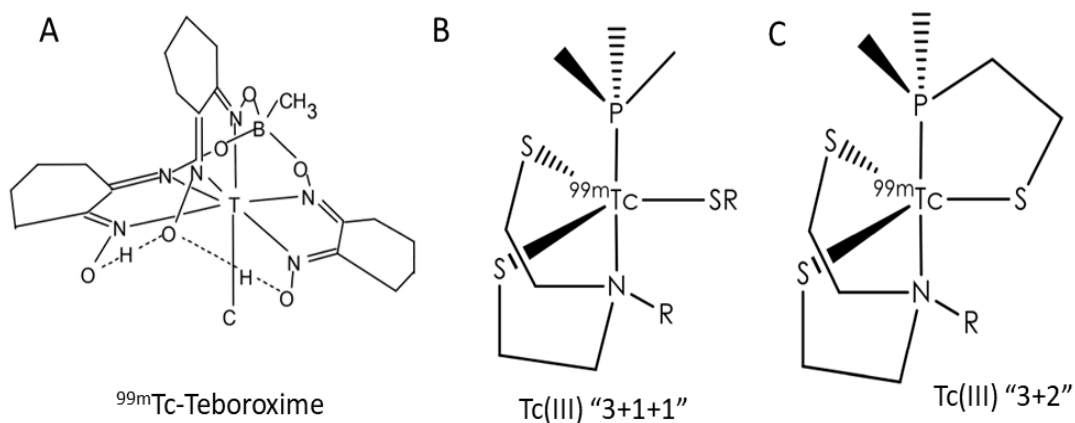


Figura 20: A- [^{99m}Tc]Tc-Teboroxime, B y C complejos de Tc(III)

Por este motivo ha cobrado gran importancia la alternativa de emplear complejos 4+1 (Figura 21-A), basados en el sistema donador NS_3/CN o NS_3/P , (NS_3 : 2,2',2'' nitrilotris-etanol). Este tipo de complejos permiten funcionalizar la biomolécula a través del ligando monodentado e introducir grupos hidrofílicos en la estructura del ligando tetradentado (OH, carboxilos o azúcares) lo que permite aumentar la hidrofiliidad del compuesto final y modular su farmacocinética y excreción. Estos complejos se caracterizan por ser no polares, libres de átomos de oxígeno, poseen elevada estabilidad y estructuras bien definidas. Además, el átomo de [^{99m}Tc]Tc se encuentra blindado por el arreglo de los átomos donadores de electrones, lo que lo hace estable frente al intercambio de ligandos como la cisteína o glutatión, así como también en presencia de medios biológicos [25,41,43-48].

En comparación con el core monooxo (muy usado en radiofármacos que se encuentran en rutina clínica), en donde el [^{99m}Tc]Tc se encuentra en estado de oxidación +5, la disposición espacial de ligando y coligando en este tipo de complejos es tal que actúa como blindaje estérico para el metal, tal como se muestra en la Figura 21-B, evitando su interferencia con la unión ligando-receptor, motivo por el cual la influencia del metal en el comportamiento biológico del complejo final será mucho menos importante.

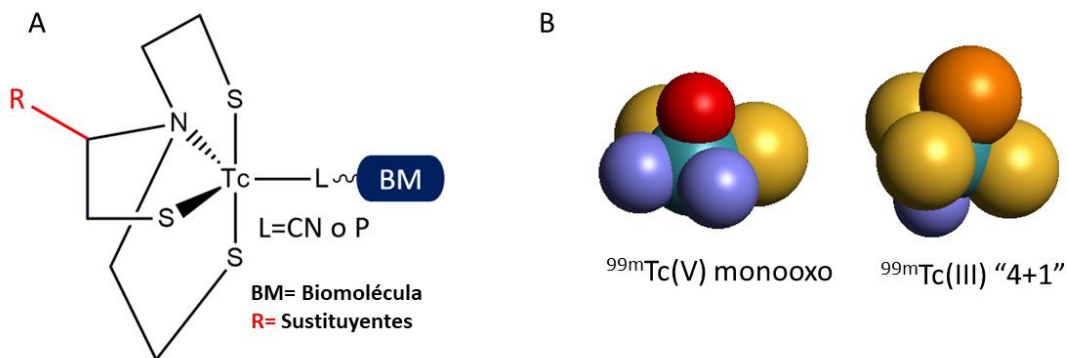


Figura 21: A- complejos $^{99m}\text{Tc}[\text{Tc(III)}]$ "4+1", B- disposición espacial de ligando y coligando en cores de $^{99m}\text{Tc}[\text{Tc(V)}]$ monooxo y $^{99m}\text{Tc(III)}[\text{Tc}$ "4+1"

Si bien la aplicación de estos complejos en el desarrollo de potenciales radiofármacos no se ha difundido ampliamente, el grupo de investigación de Pietzsch *et al.* [41,43-49] lo ha utilizado para la marcación de diversos tipos de péptidos, ácidos grasos, etc. Estos complejos presentan una elevada lipofilicidad debido a las características de los ligandos empleados, la cual puede ser modificada adicionando grupos funcionales R hidrofílicos al ligando tetradentado. La Figura 22-A muestra un ejemplo de aplicación de este concepto a la marcación de un péptido de la familia RGD (Arg-Gly-Asp) con potencialidad para imágenes de neoangiogénesis tumoral. El complejo contiene el péptido de la familia RGD incorporado en el isonitrilo monodentado y el ligando tetradentado NS_3 el cual posee sustituyentes R hidrofílicos $(\text{COOH})_3$ para modular las propiedades del complejo final [48]. Nuestro grupo junto con el grupo del Dr. Pietzsch ha desarrollado dos complejos del tipo $^{99m}\text{Tc}[\text{Tc(III)}]$ 4+1 que se muestran en la Figura 22-B destinados a la evaluación de hipoxia tumoral. En este tipo de complejos puede apreciarse que la biomolécula se ha incorporado en el isonitrilo monodentado y se utiliza como ligando tetradentado el NS_3 sin sustituyentes [49].

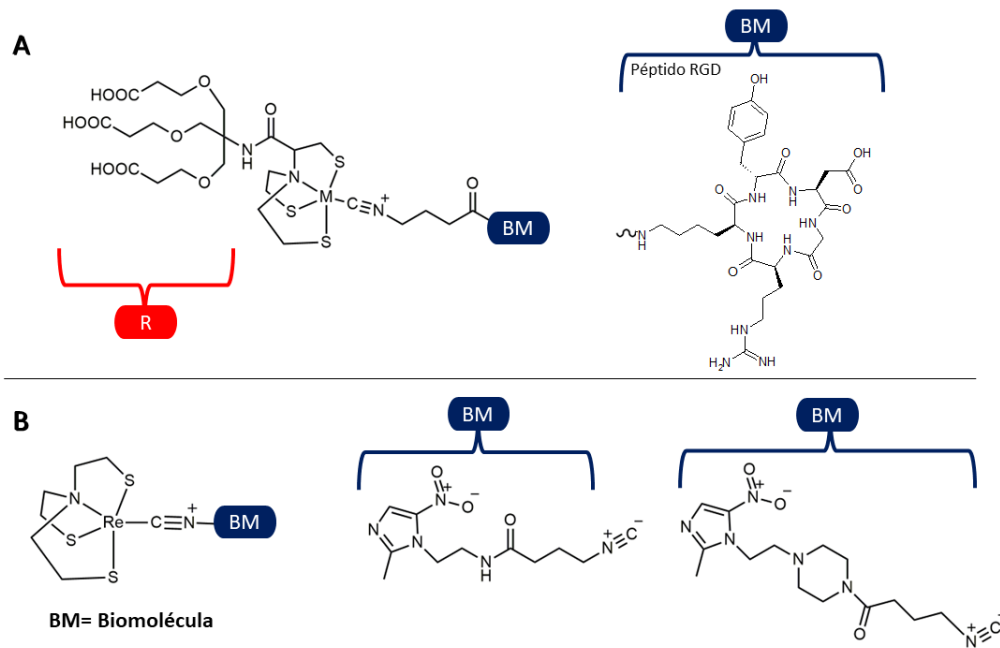


Figura 22: A- complejo de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc(III)}4+1$ derivado del peptido RGD, B- complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc(III)}4+1$ para hipoxia tumoral

Tecnecio (V)

A pesar de la variedad de estados de oxidación que puede adoptar el Tc, en la mayoría de los compuestos de rutina clínica se encuentran bajo el estado de oxidación +5 (Figura 15-C), generalmente bajo la forma del core monooxo $[\text{Tc(V)O}]^{+3}$. Algunos ejemplos en Medicina Nuclear son el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HMPAO}$, o el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-ECD}$ [50,51], ambos radiofármacos utilizados para evaluación de perfusión cerebral. Sus estructuras pueden verse en la Figura 23. Cabe destacar que los sistemas de átomos donadores utilizados en estos radiofármacos, en especial el N_2S_2 del ECD son muy importantes dentro de los oxo complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc(V)}$ [22,23,25].

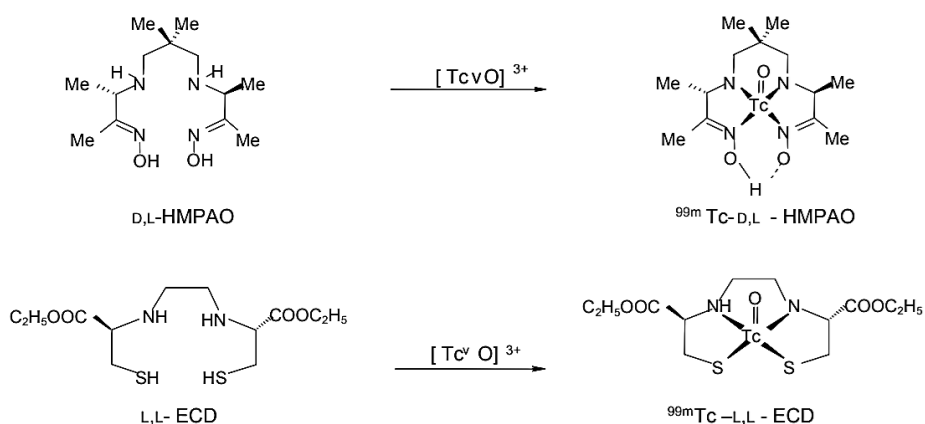


Figura 23: Estructuras del $[^{99m}Tc]Tc$ -HMPAO y $[^{99m}Tc]Tc$ -ECD

Con el avance de la Imagenología Molecular fue necesario contar con radiofármacos que permitieran estudiar procesos bioquímicos *in vivo* a través del marcado de ligandos biológicamente relevantes. El uso del core Tc(V)-oxo con los sistemas quelantes N_2S_2 , derivados de mercaptoacetiltriglicina NS_3 o de propilenaminoximas N_4 se ha investigado para marcar moléculas bioactivas. Por ejemplo, moléculas de bajo peso molecular, anticuerpos y péptidos. Un ejemplo exitoso de radiofármacos de tercera generación con este core es el $[^{99m}Tc]Tc$ -TRODAT que se muestra en la Figura 24. Este radiofármaco es un análogo de la cocaína y se utiliza para imagenología de receptores dopaminérgicos [52].

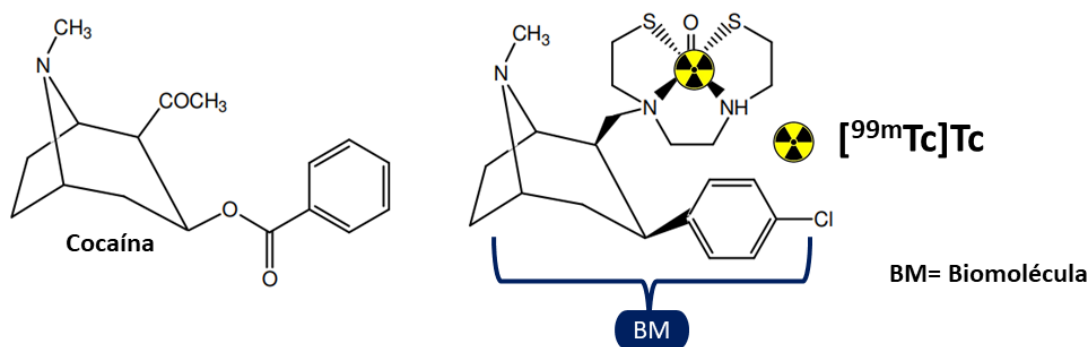


Figura 24: Estructura de la cocaína y del radiofármaco $[^{99m}Tc]Tc$ -TRODAT

Las unidades quelantes estudiadas para el desarrollo de biomoléculas marcadas con $[^{99m}Tc]Tc$ se muestran en la Figura 25 [53]. Una limitación importante durante este trabajo fue la incapacidad de producir trazadores de alta actividad específica que se puedan utilizar para mapear los receptores de péptidos, que están presentes en concentraciones relativamente pequeñas.

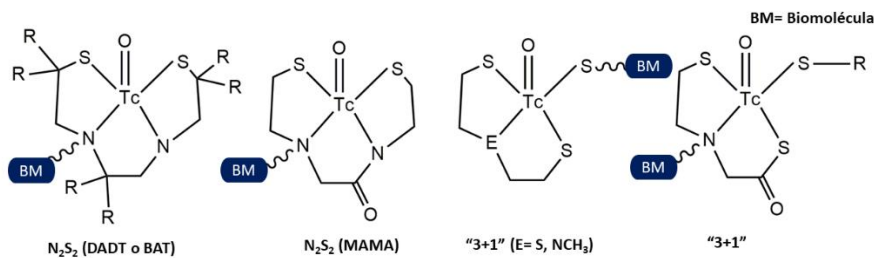


Figura 25: Tipos de complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc(V)}$ monooxo estudiados

Luego de estos inconvenientes se desarrolló un nuevo “core” de Tc para la marcación de biomoléculas proteicas, el Tc (HYNIC) (hidrazidonicotinamida). El Tc se encuentra en estado de oxidación +5 y un grupo nitreno se une directamente al metal constituyendo el core. El grupo amino terminal del HYNIC se puede conjugar con el extremo carboxiterminal de una proteína o péptido. En este “core” quedan 5 posiciones de coordinación disponibles que deben ser ocupadas por 1 o más coligandos (Figura 26-A). Una diversidad de moléculas han sido usadas como coligandos y los estudios coinciden en señalar que la naturaleza de las mismas tiene un efecto significativo en la estabilidad y biodistribución del compuesto marcado. Los coligandos más comúnmente empleados en las marcaciones con HYNIC son la tricina (tris(hidroximetil)metilglicina) o el EDDA (ácido etilendiamino-N,N'-diacético) (Figura 26-B) [22,25,54-59]. El core Tc-HYNIC ha sido empleado en la marcación de una diversidad de biomoléculas: IgG, péptidos análogos a la somatostatina, péptidos RGD, bombesinas, etc. Los productos resultantes suelen obtenerse con alta actividad específica y en general son relativamente hidrofílicos lo que favorece su depuración. Las principales limitaciones son la posibilidad de formación de múltiples isómeros, el desconocimiento de la estructura exacta de las especies formadas y el hecho que los complejos resultantes suelen ser cargados negativamente por lo que es inviable utilizarlos para compuestos que deban atravesar barreras biológicas como la barrera hematoencefálica (Figura 26-C) [59].

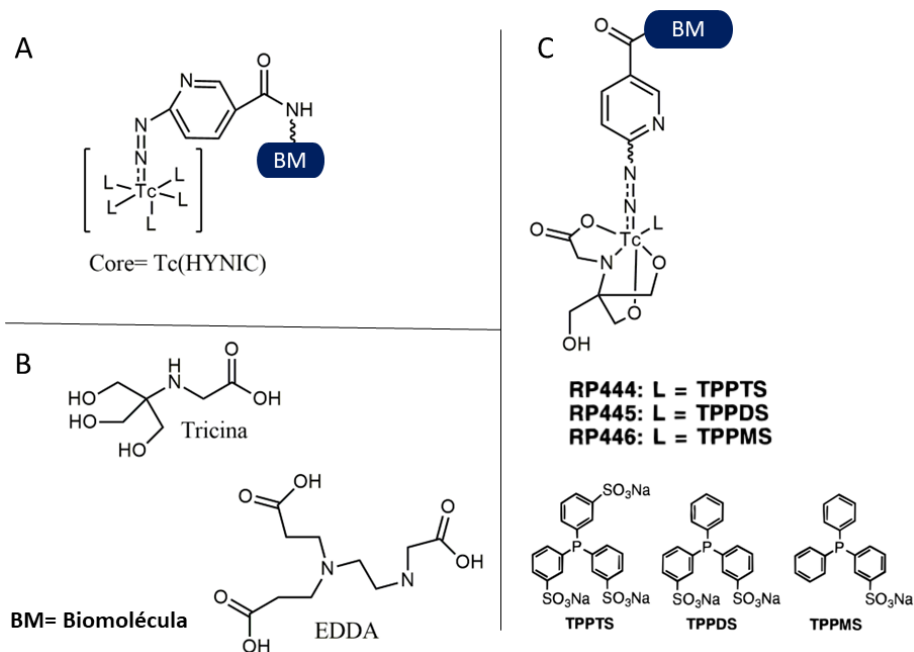


Figura 26: A- core Tc-HYNIC, B- coligandos mas utilizados, C- ejemplo de marcación de biomoléculas

El “core” Tc(V) nitruro es destacable dentro de los compuestos de Tc(V). Estos compuestos inicialmente desarrollados por Baldas *et al.* [60], se caracterizan por la presencia de un triple enlace terminal tecnecio -nitrógeno que deja 4 posiciones de coordinación disponibles para la unión al ligando. Las mismas pueden llenarse mediante 2 ligandos bidentados iguales o diferentes, dando lugar a complejos simétricos o asimétricos, respectivamente. Los complejos simétricos completan la esfera de coordinación del “core” con 2 moléculas de un ligando bidentado que sea donador π , generalmente ditiocarbamatos o fosfotioles, formando una estructura de pirámide de base cuadrada o bipirámide trigonal (Figura 27-A) [61,25]. Debido al impedimento estérico muy fuerte generado por el triple enlace Tc-N que es muy rico en electrones, generalmente la unión de 2 moléculas bidentadas es más favorable que la unión de una única molécula potencialmente tetradentada ya que en escala trazadora la primera ocurre en forma mucho más rápida. Los nitrurocomplejos asimétricos, en cambio, requieren la combinación de dos ligandos: uno pseudotridentado de tipo aceptor π , generalmente heterodifosfinas de estructura PNP, con un coligando bidentado que sea donador π (Figura 27-B) [62,25].

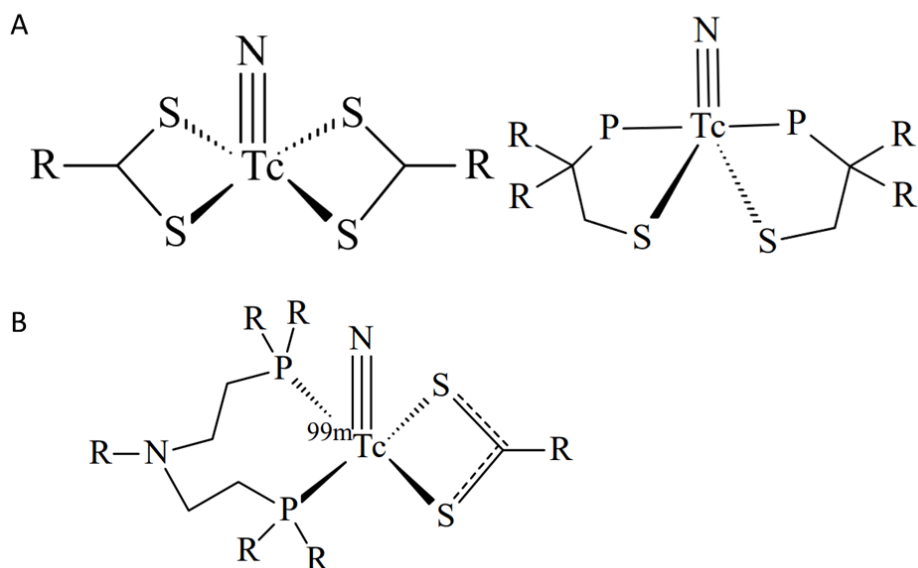


Figura 27: A- nitruro complejos simétricos, B- nitruro complejos asimétricos

Desde el punto de vista práctico la preparación de los complejos conteniendo el “core” $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{V})\text{N}$ se realiza en medio fisiológico mediante una reacción en 2 etapas: reducción de pertechnetato en presencia de un donador de grupos N^{3-} (prácticamente cualquier hidrazina o similar conteniendo la unidad $>\text{N}-\text{N}<$ puede ser usada como fuente de nitruros), seguida de sustitución por el o los ligandos adecuados. Uno de los reactivos más usados como fuente de nitruros es la dihidrazida succínica debido fundamentalmente a su alta solubilidad en agua y baja toxicidad. [25].

Varios complejos nitridos de $\text{Tc}(\text{V})$ tanto simétricos como asimétricos han presentado interesantes propiedades. Por ejemplo, Pasqualini *et al.* [61] del grupo de Duatti desarrolló una familia de complejos simétricos, donde se emplean dos ligandos bidentados del tipo ditiocarbamato para formar el complejo final. El $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{NOEt})_2$ (Figura 28-A) fue uno de los complejos que demostró una alta calidad en imágenes miocárdicas.

Dentro de los complejos de nitrido asimétricos Boschi *et al.* [63] del grupo de A. Duatti, desarrolló una familia de trazadores para los receptores de benzodiazepinas. Los mismos, poseen un ligando bidentado derivado de la benzodiazepina y una fosfina bidentada para completar la esfera de

coordinación. La Figura 28-B muestra tres de los trazadores desarrollados [25,64,65].

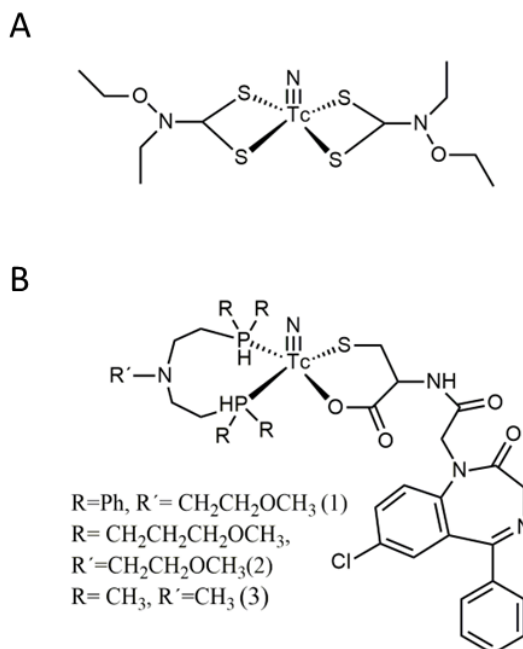


Figura 28: A-complejo simétrico de Tc(V) nitrido, B-complejo asimétrico de Tc(V) nitrido

Los complejos de ^{99m}Tc Tc conteniendo el core Tc(V)N también han sido aplicados en la marcación de biomoléculas proteicas a través del aminoácido cisteína. Dicho aminoácido es un ligando muy adecuado que permite la formación de nitruro complejos asimétricos uniéndose en forma muy estable al fragmento $[[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{N})(\text{P}\sim\text{P})]^{2+}$. La unión puede darse en 2 formas: a través de los grupos donores NH_2 y S^- (Figura 29-A) o a través de los grupos O^- y S^- (Figura 29-B). Es de destacar que en el primer caso el complejo final presenta carga positiva mientras que en el segundo resulta neutro. Estas reacciones son altamente específicas y ocurren en forma cuantitativa de forma que cualquier péptido que contenga cisteína en forma suficientemente accesible para unirse al Tc podría marcarse utilizando este “core”. Normalmente el péptido que desea marcarse se derivatiza agregando una cisteína, la que se une a través de su grupo amino terminal dando quedando disponibles los donores O,S o a través de su ácido carboxílico terminal transformándose en un potencial donador de tipo N,S [25].

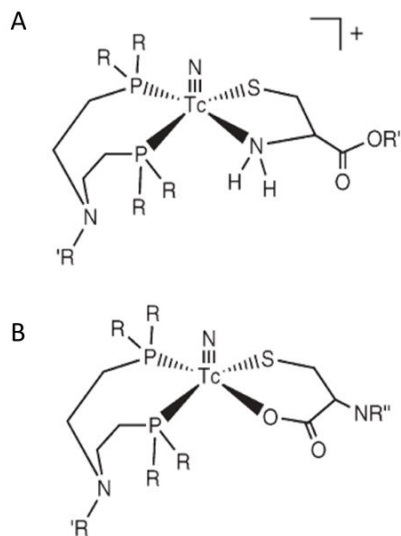


Figura 29: Unión de la cisteína al core de Tc(V)

Giglio *et al.* [66] de nuestro grupo, ha desarrollado complejos de Tc(V) simétricos para evaluación de la hipoxia tumoral.

Otra posibilidad es generar complejos asimétricos de tipo “3 + 1” formados por la combinación de un ligando tridentado donador π conteniendo el set de átomos donores [S, N, S] y un ligando monodentado aceptor π de tipo PR₃ (Figura 30) [25, 67]. La ventaja principal de este nuevo tipo de nitrurocomplejos radica en la posibilidad de utilizar como coligandos monofosfinas disponibles comercialmente y de adecuada estabilidad.

Cardoso *et al.* [68] de nuestro grupo de trabajo ha desarrollado un potencial radiofármaco [^{99m}Tc]Tc aplicando este concepto (Figura 30-B). El trazador esta destinado a los receptores del Neuropeptido Y tipo 1 (NPY) sobreexpresados en algunos tipos de cáncer de mama. La secuencia de aminoácidos del péptido incluye los 9 aminoácidos del extremo C-terminal del NPY, que según la literatura son los responsables de la actividad biológica. Adicionalmente, se añadieron cisteína y ácido marcaptoacético para formar el conjunto de átomos donadores NSS para la coordinación con el radiometal a través de la formación de un complejo de [^{99m}Tc]Tc-nitrido “3+1”. La esfera de coordinación se completó con una monofosfina monodentada comercialmente disponible

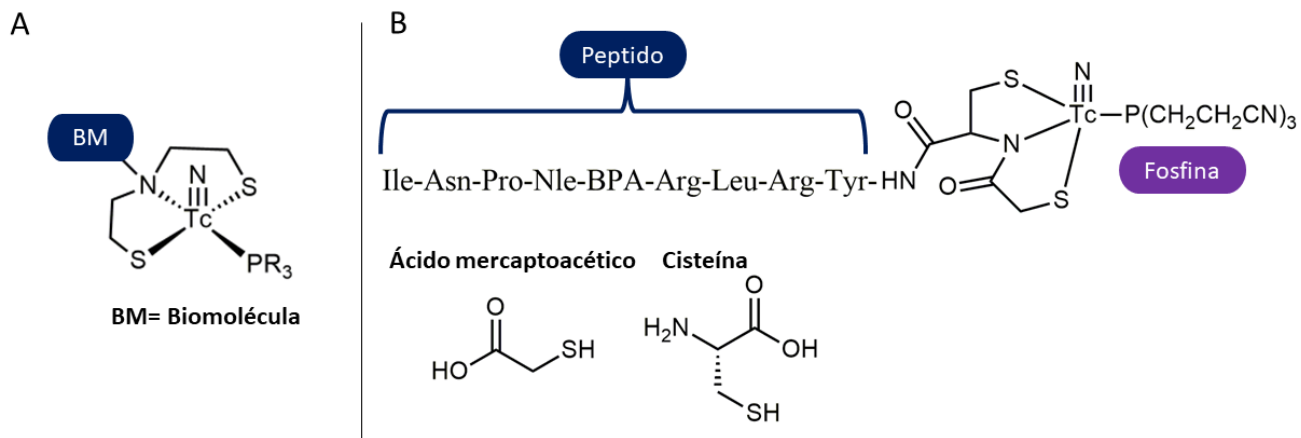


Figura 30: A-complejo de Tc(V) asimétrico “3 + 1”, B-complejo de Tc (V) “3 + 1” destinado a los receptores del NPY

2.4 Química del [^{18}F]

El [^{18}F] es el radionucleido más empleado en PET. Decae emitiendo partículas β^+ a ^{18}O estable con un $t_{1/2}$ de 109.8 min (Figura 31) [23,69].

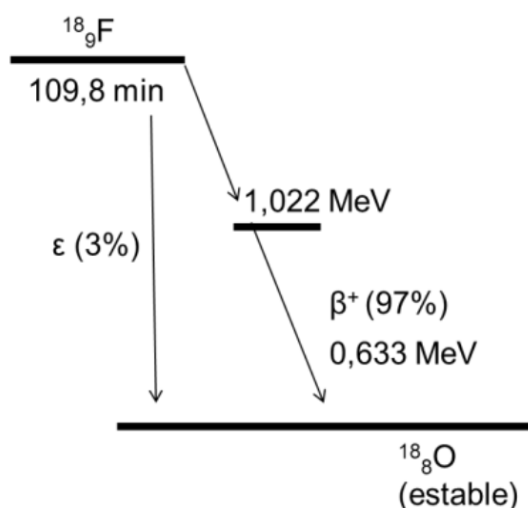


Figura 31: Esquema de decaimiento del [^{18}F]

El [^{18}F] es un radionucleido que ha generado un interés especial debido a sus favorables características físicas y nucleares ya mencionadas, incluyendo el elevado porcentaje de decaimiento β^+ (97%) y la baja energía de la radiación β^+ (máximo 0.635 keV) en comparación a otros radionucleidos empleados en PET, lo que resulta en un corto rango de difusión de la partícula β^+ en un medio biológico (< 2.4 mm) que aumenta la resolución de las imágenes. Puede obtenerse mediante ciclotrón con una elevada actividad molar ya que no hay dilución isotópica como ocurre en las marcaciones con ^{11}C , en donde la dilución isotópica se presenta con el CO_2 gaseoso atmosférico. El $t_{1/2}$ es lo suficientemente largo para permitir desarrollar síntesis en más de una etapa y realizar el control de calidad del radiofármaco previo a la inyección del paciente. Su química es versátil y permite la introducción del mismo en diversos sistemas químicos [70].

El [^{18}F] se preparó por primera vez en un reactor nuclear utilizando carbonato de litio como blanco. En este caso, dos reacciones nucleares simultáneas dan lugar a la producción del [^{18}F]. La primera reacción $^6\text{Li}(n,\alpha)^3\text{H}$, libera un núcleo de tritio (^3H) que reacciona con ^{16}O para formar [^{18}F] a través de la reacción

nuclear $^{16}\text{O}(t,n)^{18}\text{F}$. A pesar de que la primera reacción nuclear tiene una alta sección eficaz (936 barns) la cantidad de producto final ($[^{18}\text{F}]\text{F}$) formado es baja debido a las dos reacciones nucleares sucesivas. Este método de producción ya no se utiliza. En la actualidad, la producción de $[^{18}\text{F}]\text{F}$ se realiza mediante el uso de ciclotrones (Tabla 4) [23,71,72].

Reacción	Blanco	Rango de energía (MeV)	Abundancia natural (%)
$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$	H_2^{18}O	18-4	0.2
$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$	18O2	18-4	0.2
$^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$	Ne, puro Ne +0.1% F ₂	15-0	90.5
$^{16}\text{O}(^3\text{He},p)^{18}\text{F}$	H ₂ O	15-1	99.7
$^{16}\text{O}(^3\text{He},p)^{18}\text{Ne}: ^{18}\text{F}$	H ₂ O	40-15	99.7
$^{16}\text{O}(\alpha, np)^{18}\text{F}$	H ₂ O	40-20	99.7
$^{16}\text{O}(\alpha, 2n)^{18}\text{Ne}: ^{18}\text{F}$	H ₂ O	52-10	99.7
$^{20}\text{Ne}(3\text{He}, ap)^{18}\text{F}$	H ₂ O	40-10	90.5

Tabla 4: Principales reacciones nucleares para la producción de $[^{18}\text{F}]\text{F}$

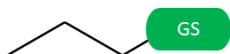
El método de producción condiciona las reacciones químicas que se realizaran *a posteriori*, ya que el $[^{18}\text{F}]\text{F}$ puede obtenerse como $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ acuoso o $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ gaseoso. El $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ gaseoso se obtiene con la última reacción que se muestra en la Figura 34 ($^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$). La obtención como $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ se realiza con la primera reacción que muestra la Tabla 4 $^{18}\text{O}(p, n)^{18}\text{F}$, utilizando $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ (agua enriquecida mayor a 95% con ^{18}O) como blanco. Los átomos de ^{18}O son impactados por protones generando el radionucleido $[^{18}\text{F}]\text{F}$ en forma de $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ y liberando un neutrón. El $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ une a las moléculas mediante reacciones de sustitución nucleofílica, mientras que el F_2 es empleado en reacciones de sustitución electrofílica.

La diferencia clave entre estas dos formas químicas es la actividad específica del $[^{18}\text{F}]\text{F}$ obtenido. En la síntesis de $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ se debe agregar ^{19}F como gas portador para extraer el $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ producido, y como consecuencia se obtiene flúor con baja actividad molar (Aprox. 100 MBq/ μmol). Por otra parte, en la producción de $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ la actividad molar es más alta y ronda en los 600×10^3 MBq/ μmol . Es importante mencionar que la actividad molar elevada es crucial cuando se trabaja con sistemas de baja capacidad de unión (por ejemplo, unión ligando-receptor). El alto rendimiento en la producción mediante el uso del ciclotrón junto con la mayor actividad molar es crucial, motivo por el cual la preparación de la mayoría de los radiofármacos de ^{18}F destinados a un receptor se realiza mediante métodos nucleofílicos [22,23,71,72].

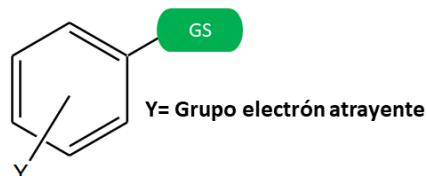
En una reacción de fluoración nucleofílica, el ion $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ rico en electrones (nucleófilo) reemplaza a un átomo o grupo de átomos (grupo saliente) en una posición electrofílica de una molécula. Para que esto ocurra es fundamental que la molécula contenga un buen grupo saliente en una posición electrofílica, así como también que las condiciones de reacción favorezcan el ataque nucleofílico del $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$. Para esto último es necesario realizar el acondicionamiento del nucleófilo y controlar las condiciones de reacción como temperatura y disolvente [73].

La fluoración nucleofílica puede realizarse en compuestos alifáticos (sustitución nucleofílica alifática bimolecular: $\text{S}_{\text{N}}2$), aromáticos ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$) o heteroaromáticos (Figura 32).

Sustitución Nucleofílica alifática



Sustitución Nucleofílica aromática



Sustitución Nucleofílica hetero-aromática

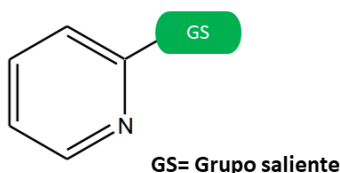


Figura 32: Reacciones de sustitución nucleofílica más conocidas

Las S_N2 suelen ser eficientes y rápidas. Los grupos salientes más comunes son los haluros (Cl, Br, I) y los sulfonil ésteres (triflato, mesilato, tosilato o nosilato). La reactividad del sustrato aumenta de carbono terciario a primario como causa de impedimentos estéricos y de que la sustitución en un carbono secundario puede ir acompañada por una reacción de eliminación no deseada (Figura 33) [69,74,74].

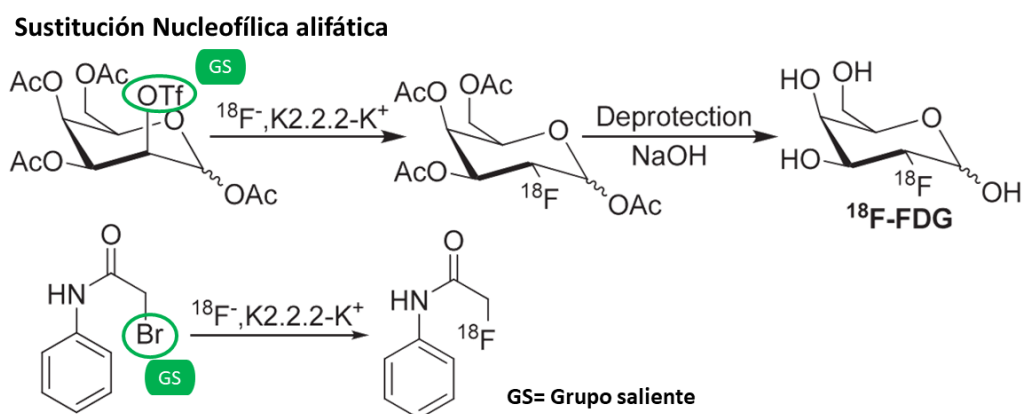


Figura 33: Ejemplos de reacciones de sustitución nucleofílica alifática

En el caso de las S_NAr , los grupos salientes más comunes son F, NO_2 y NMe^+ siendo a su vez necesaria la activación previa del anillo aromático con un grupo electrón atrayente en posición orto o para como el NO_2 , CF_3 o cianuro (Figura 34) [68,73,75].

Sustitución Nucleofílica aromática

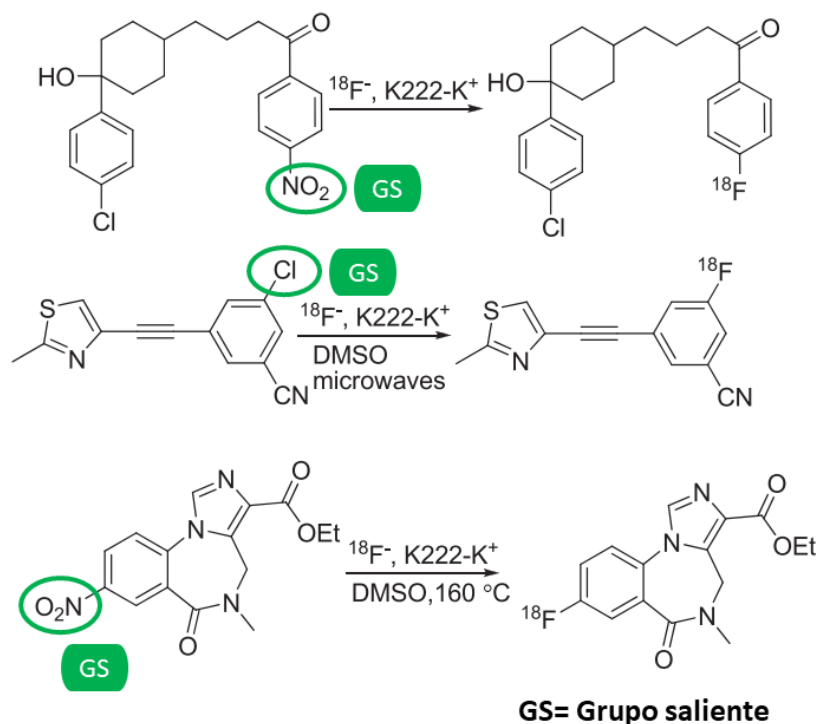


Figura 34: Ejemplos de reacciones de sustitución nucleofílica aromática

Aunque el ion [¹⁸F]F⁻ es un nucleófilo fuerte, en solución acuosa forma enlaces de hidrógeno con moléculas de agua que lo rodean determinando que su reactividad para sustituciones nucleofílicas bimoleculares (S_N2) sea menor. Con el fin de aumentar su reactividad, el [¹⁸F]F⁻ debe ser acondicionado previo a la reacción de sustitución lo que implica su purificación del agua y de otras impurezas (metales con periodos de semidesintegración alto) mediante intercambio iónico y posterior destilación para eliminar el agua (Figura 35-A). El primer paso es el pasaje del [¹⁸F]F⁻ que viene del ciclotrón por una resina de intercambio aniónico, la que permite separar el F⁻ del agua pesada ([¹⁸O]H₂O) y de otras impurezas (en el blanco se forman otros radionucleidos como [⁵⁷Co]Co, [¹⁰⁹Cd]Cd, entre otros). La resina contiene al ión carbonato (CO₃⁻) como contraión, quien es reemplazado por los iones [¹⁸F]F⁻. El [¹⁸F]F⁻ retenido se eluye hacia el reactor con una solución de K₂CO₃ bajo la forma química K[¹⁸F]F. El siguiente paso es la destilación que se realiza formando un azeótropo con CH₃CN. Para mantener las condiciones anhidras, la reacción de [¹⁸F]fluoración del precursor que corresponda debe ocurrir en disolventes orgánicos polares

apróticos (como CH₃CN, DMSO y THF). La solubilidad [¹⁸F]F⁻ en disolventes orgánicos mejora mediante la adición de un catalizador de transferencia de fase como el Kryptofix® 2.2.2 o carbonato de tetrabutilamonio (Figura 35-B), quienes además aumentan la nucleofilia del [¹⁸F]F⁻ al aumentar la distancia de enlace iónico [23,73,75,76].

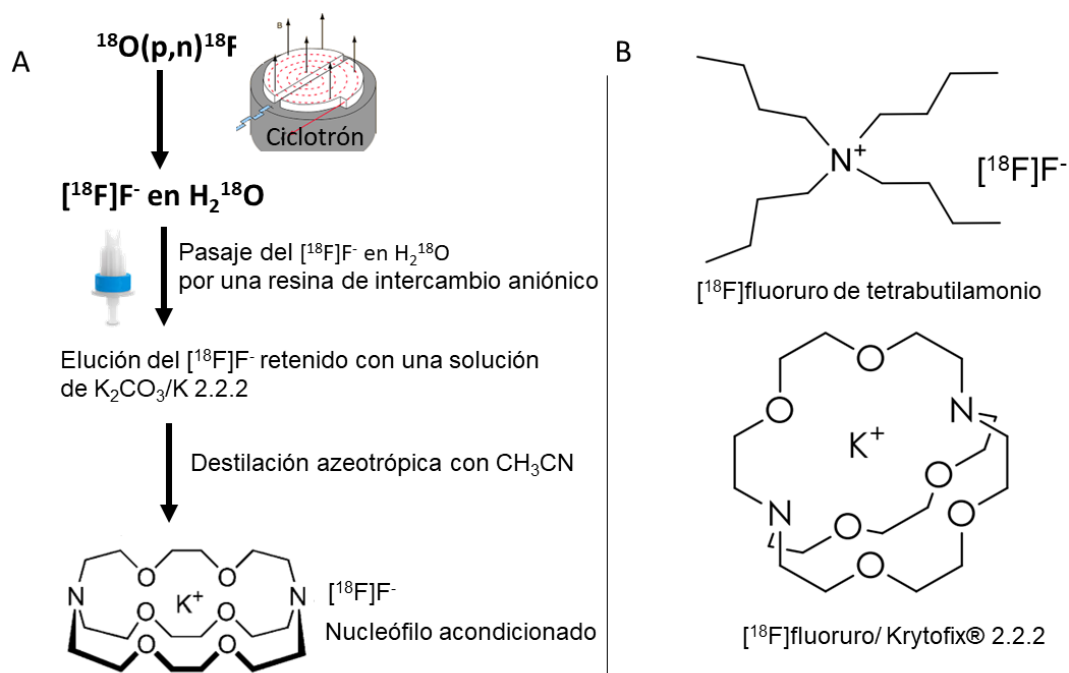


Figura 35: A-acondionamiento del nucleófilo, B- catalizadores de transferencia de fase

El acondicionamiento del nucleófilo debe realizarse en medio básico, ya que de lo contrario se favorece la formación de [¹⁸F]F₂ gaseoso durante la destilación, lo que conduce a una pérdida de la actividad por volatilización. Comúnmente se utiliza el anión carbonato (CO₃⁻) (podría también utilizarse bicarbonato, HCO₃⁻) para generar el medio básico debido a que es una base pobremente nucleofílica y no compite con la reacción S_N2. Un medio débilmente básico es suficiente para evitar la formación de [¹⁸F]F₂ gaseoso, de lo contrario, si el medio es fuertemente básico, pueden formarse productos secundarios indeseados por la descomposición de precursores que sean sensibles al medio básico. Para evitar reacciones secundarias, se necesita optimizar muchos parámetros: 1) la relación catalizador de transferencia de fase/ base/ precursor, 2) temperatura de reacción, 3) elección del grupo saliente. Con una cuidadosa evaluación de estos parámetros, la [¹⁸F]fluoración nucleofílica alifática es usualmente eficiente en

términos de PRQ. Además, las temperaturas requeridas son moderadas (desde temperatura ambiente a los 100 °C) y los tiempos de reacción relativamente cortos compatibles con el $t_{1/2}$ del radionucleido (usualmente hasta los 15 minutos) [72,76].

La preparación de radiofármacos PET en grandes cantidades y de manera rutinaria requiere sistemas de producción especiales para evitar condiciones riesgosas para el personal y el producto de interés. La producción de este tipo de radiofármacos incluye un entorno de alta actividad, con blindajes de plomo voluminosos, intervalos de producción cortos debido al período de semidesintegración de los radionucleidos y una alta capacidad de producción que cumpla con las necesidades clínicas. Además de estos requisitos, la radiosíntesis debe proporcionar un radiofármaco de alta pureza, de forma fiable, eficiente y en condiciones aptas para administrar en forma intravenosa. Para hacer frente a todos estos desafíos, a lo largo de los años, se han desarrollado varios sistemas de producción automatizados de radiofármacos PET [22,77].

Un módulo automatizado es un dispositivo capaz de realizar automáticamente una secuencia de manipulaciones químicas necesarias en la preparación de radiofármacos. Un módulo automatizado puede ser comercial o por encargo. Consta de dos partes ensambladas: una parte mecánica y una unidad de síntesis. La parte mecánica consiste en un conjunto de elementos eléctricos y/o neumáticos, lineales y/o circulares, fuentes de alimentación, bombas, enfriadores, calentadores, sensores para monitorear diferentes parámetros (como temperatura, presión, flujo, radioactividad) o cualquier dispositivo que no esté en contacto directo con productos químicos. La unidad de síntesis es una red interconectada de contenedores en el que reactivos y componentes gaseosos, líquidos y/o sólidos se puede mover, mezclar y/o reaccionar para obtener el producto final. La parte mecánica y la unidad de síntesis están conectadas entre sí. El contacto entre las dos partes. puede ser permanente (dispositivo no desechable) (Figura 36-A) o temporal (dispositivo desechable; llamado 'cassette') (Figura 36-B). Un cassette (Figura 36-C) es una red premontada de contenedores, válvulas y jeringas, destinadas a ser montadas en la parte mecánica del módulo, convirtiéndose en la parte química del mismo. Por lo general son desechables y pueden estar vacíos o contener reactivos Los

desechables presentan la ventaja de que no es necesaria su limpieza luego de cada síntesis y se evita la contaminación cruzada [77,78]. En el caso de los sistemas permanentes, en general las síntesis son mas económicas, pero se requiere rutinas de limpieza y desinfección luego de cada síntesis.

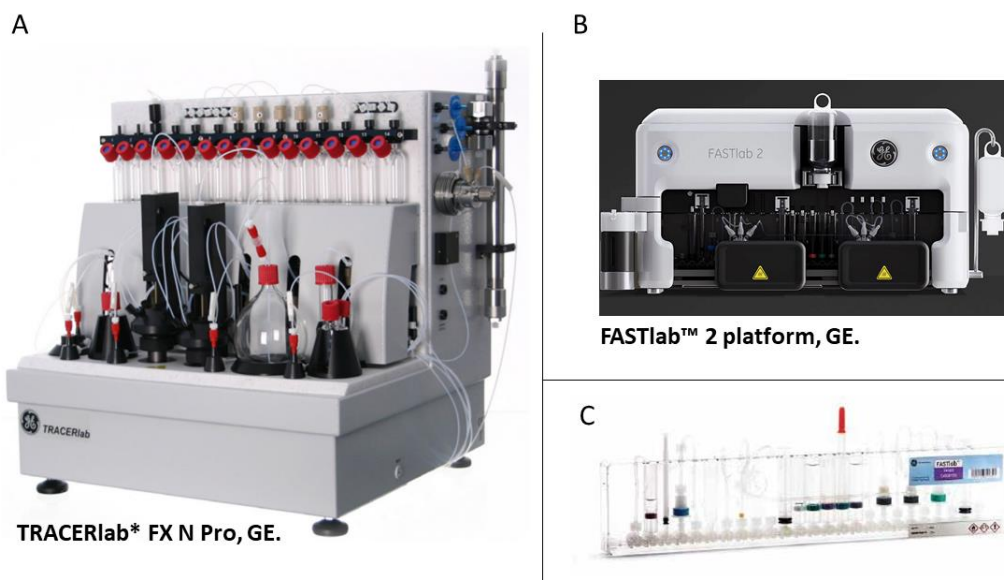


Figura 36: Diferentes módulos automatizados de síntesis

Un sistema de control proporciona una interfaz con la cual el operador interactúa con el módulo. El software gobierna el sistema de control y generalmente es proporcionado por el fabricante del módulo y no es modificable por los usuarios. Es específico para el módulo, pero no necesariamente para un proceso específico. Existe una secuencia específica para cada proceso que corresponde a una lista de instrucciones que el software ejecuta para controlar los distintos pasos realizados durante la preparación de un radiofármaco. Si el software lo permite la secuencia puede ser modificada por el usuario [78].

Los módulos automatizados de síntesis permiten llevar a cabo la síntesis de la molécula marcada, así como su formulación bajo la forma de preparado inyectable de forma rápida y siguiendo criterios de radioprotección y de buenas prácticas de producción.

Los módulos se encuentran dentro de recintos blindados denominados celdas calientes, “hot-cells” que proveen por un lado protección radiológica al operador frente a las altas tasas de dosis que son producto del trabajo con elevadas

actividades de $[^{18}\text{F}]\text{F}$ y una calidad de aire apropiada para la preparación de inyectables (Figura 37) [79].



Figura 37: Celdas blindadas donde se encuentran los módulos automatizados de síntesis

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se utilizó un módulo automatizado de síntesis Synthra RNplus Research (Figura 38). Este módulo es una plataforma de radiosíntesis flexible y completamente automatizada para la investigación de una amplia variedad de péptidos marcados con radiometales y de compuestos marcados con flúor por sustitución nucleofílica. El módulo incluye secuencias sintéticas para radiofármacos ya empleados en rutina como $[^{18}\text{F}]\text{FluoroDOPA}$, $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$, $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$, $[^{18}\text{F}]\text{Fluorocolina}$, $[\text{M}]\text{-DOTATATE}$ y $[\text{M}]\text{-DOTATOC}$ así como también $[^{18}\text{F}]\text{FPP(RGD)2}$. Para cualquier otro compuesto marcado con $[^{18}\text{F}]\text{F}$ la secuencia de síntesis puede ser creada por el usuario de forma relativamente simple y testeada gráficamente mediante una simulación previa a operar. Presenta la posibilidad de funcionar de forma manual o completamente

automatizada. En forma manual es el usuario quien comanda cada paso de síntesis a través de una computadora conectada al módulo, mientras que, en forma totalmente automatizada, el usuario únicamente debe dar inicio a la síntesis, la cual transcurre siguiendo los pasos ya prefijados [80].



Figura 38: Módulo automatizado de síntesis Synthra RNplus Research

La unidad de síntesis de este módulo incluye todos los componentes necesarios para la preparación, marcación, purificación y formulación de compuestos marcados con $[^{18}\text{F}]\text{F}$. También contiene un programa que permite realizar la limpieza tomando los disolventes de manera automática [80].

Los componentes de la unidad de síntesis se describen en la tabla que se presenta a continuación:

<i>Componente</i>	<i>Características</i>
<i>16 Viales contendedores</i>	Químicamente inertes y fáciles de limpiar
<i>2 Reactores</i>	De carbono vítreo, capacidad para 11 mL, sistema de calentamiento integrado (-50 °C a 250 °C)
<i>8 Soportes para cartuchos de extracción en fase sólida</i>	1 para la purificación del [¹⁸ F]F ⁻ que llega desde el ciclotrón, 6 para purificación durante la síntesis con opción de calentamiento y 1 para purificación fina
<i>Cromatógrafo HPLC</i>	Bomba para realizar gradientes cuaternaria, detector y UV con λ variable, posición para dos columnas, inyector automático
<i>1 bomba de vacío</i>	Permite llegar a una presión < a 5 mbar.
<i>6 Detectores de radiación</i>	5 dentro del módulo que permiten tener datos durante la síntesis, 1 fuera del módulo incorporado a la celda caliente que permite medir la A final
<i>Trampa de nitrógeno frío</i>	Permite la recolección de sustancias volátiles radiactivas
<i>Sistema de recolección H₂¹⁸O</i>	Permite recuperar el [¹⁸ O]H ₂ O
<i>Computadora</i>	Cumple con las exigencias de GMP en cuanto a registro de datos, permite controlar el módulo de forma manual o automatizada

Tabla 5: Componentes de la unidad de síntesis del módulo Synthra RNplus Research

En la Figura 39 se muestra la interfaz gráfica que conecta al usuario con el módulo, en donde se señalan los principales componentes nombrados. En rojo se señalan los dos reactores conectados a la bomba de vacío en amarillo y en celeste los cuatro detectores de radiación, dos de los cuales están asociados a los reactores. Se indican en verde las posiciones para colocar los cartuchos de extracción en fase sólida (cartuchos SPE), en fucsia el contenedor que permite recuperar el $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ y en marrón el vial colector final. En naranja se muestran los 16 viales contenedores y en negro los tres viales contenedores para solventes utilizados en la limpieza del módulo. Por último, en violeta se señala el sistema HPLC con válvula de inyección automática y posiciones para dos columnas cromatográficas, se pueden observar los cuatro contenedores para los solventes HPLC (A, B, C y D) [80,81].

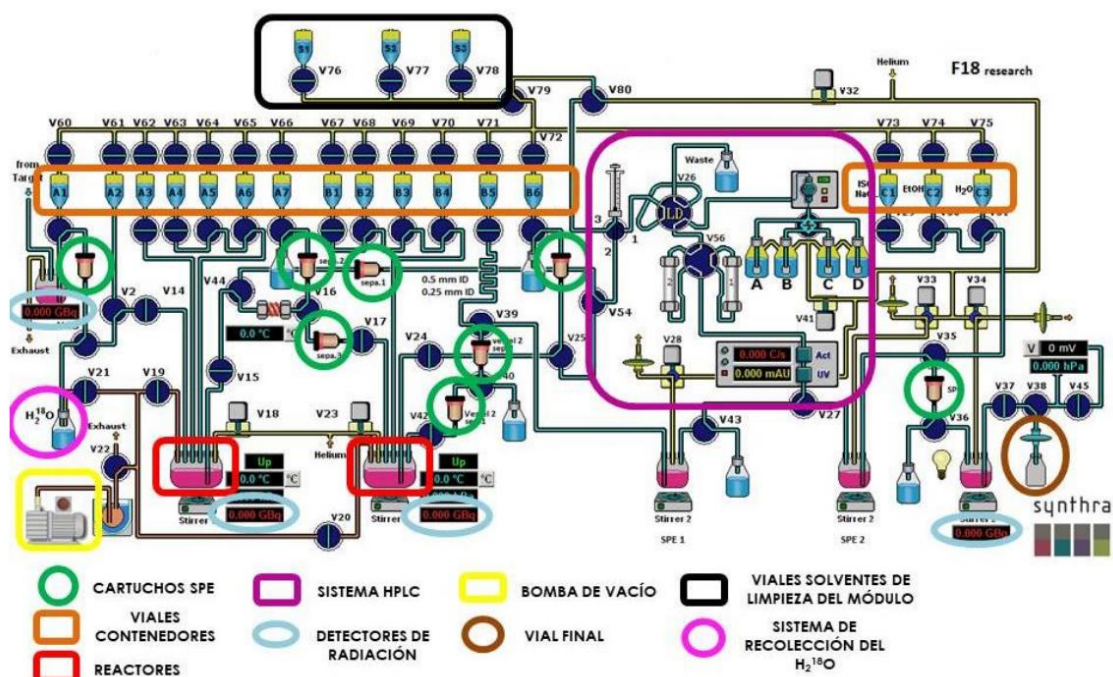


Figura 39: Principales componentes mostrados en la Interfaz gráfica usuario-módulo

El $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ llega a este módulo desde el ciclotrón por el punto A de la Figura 40. Pevio a cualquier marcación con $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ es necesario acondicionar el nucleófilo, para ello el $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ es retenido por un cartucho de intercambio iónico Sep-Pak® QMA Light (Figura 40-B). El $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ retenido se eluye hacia el reactor 1 (Figura 40-C) con una solución de $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{Kryptofix}^\text{®} 2.2.2$ y en este reactor se realiza la destilación azeotrópica correspondiente. Luego de estos pasos el nucleófilo

queda acondicionado para realizar la sustitución nucleofílica en el reactor 1. En el caso de las síntesis hasta reactor que se realizaron durante esta tesis, luego de la marcación con $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ el producto resultante es retirado para su análisis (Figura 40-D).

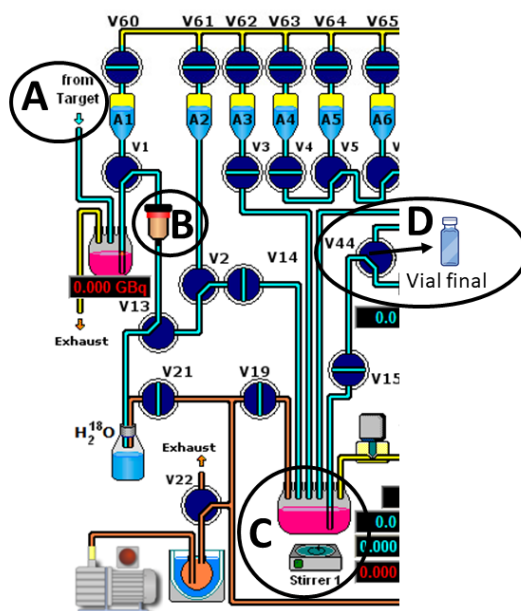


Figura 40: Acondicionamiento del nucleófilo y síntesis hasta reactor en el módulo Synthra RNplus Research

Para el caso de las reacciones de Huisgen que se realizaron en el módulo de síntesis se utilizó prácticamente el módulo completo. El $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ llega a este módulo desde el ciclotrón por el punto A de la Figura 41, el acondicionamiento del nucleófilo se realiza como se mencionó anteriormente utilizando los puntos B y C del módulo (Figura 41). La sustitución nucleofílica se realiza en el reactor 1 (Figura 41-C), mientras que la reacción de Huisgen se realiza en el reactor 2 (Figura 41-D). Finalmente, la purificación del trazador se realiza en la posición E y se transfiere el producto purificado al vial final (Figura 41-F),

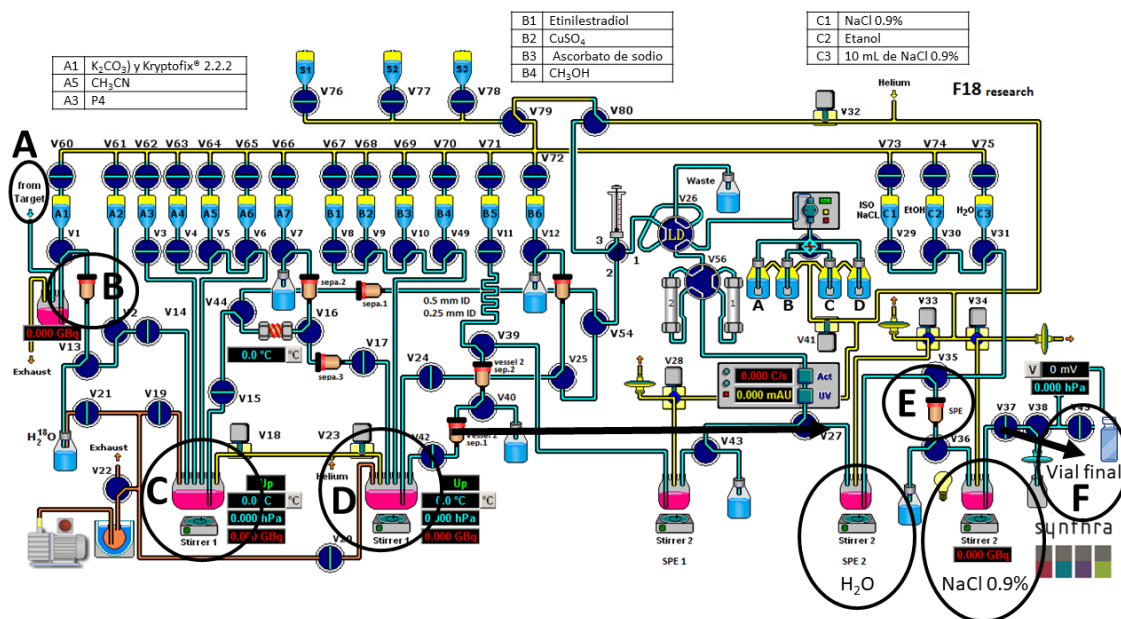


Figura 41: Acondicionamiento del nucleófilo y síntesis utilizando los dos reactores en el módulo Synthra RNplus Research

2.5 Estrógenos y receptor de estrógenos (RE)

Los estrógenos pertenecen a la familia de hormonas esteroides. Estos ejercen profundos efectos sobre el crecimiento, la diferenciación y el funcionamiento de muchos tejidos reproductivos [82], así como también ejercen acciones importantes sobre otros tejidos incluidos los huesos, el hígado, el sistema cardiovascular y el cerebro [83]. Los estrógenos son sintetizados a partir de precursores andrógénicos, como testosterona y androstenediona (Figura 42-A). Las enzimas que intervienen en su conversión a estrógenos constituyen un grupo de aromatasas: el grupo enzimático del citocromo p450 (CYP). Estas enzimas se encuentran en el ovario, el tejido adiposo, los fibroblastos de la piel, la placenta y el cerebro. El ovario es el sitio de mayor concentración y su síntesis es estimulada por la hormona folículo estimulante (FSH). En la posmenopausia, los sitios de metabolización extra-ováricos cobran importancia, fundamentalmente el tejido adiposo y la piel. En este período (transición menopáusica) hay un cambio desde un mecanismo de producción endócrino (estrógenos de producción ovárica) a uno parácrino (síntesis tisular de estrógenos) y la fuente de los precursores andrógénicos necesarios es

compartida entre el ovario y la glándula suprarrenal. La aromatasa tisular, responsable de este último proceso, a diferencia de la ovárica no es regulada por la FSH sino por citoquinas, factores de crecimiento y glucocorticoides [84]. Los estrógenos son derivados químicos del ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano. Posee 4 anillos que se clasifican como A, B, C (ciclohexanos) y D (ciclopentano) [85]. Su estructura esta formada por 18 átomos de carbono, un grupo metilo en la posición 13 del anillo D, un grupo β -hidroxilo (OH) o cetona (C=O) en la posición 17 del anillo D y un grupo hidroxilo (OH) o cetona (C=O) en el carbono 3 del anillo A ((Figura 42-A-B). El estrógeno natural más potente en seres humanos es el estradiol cuya estructura se muestra en la Figura 42-C [86].

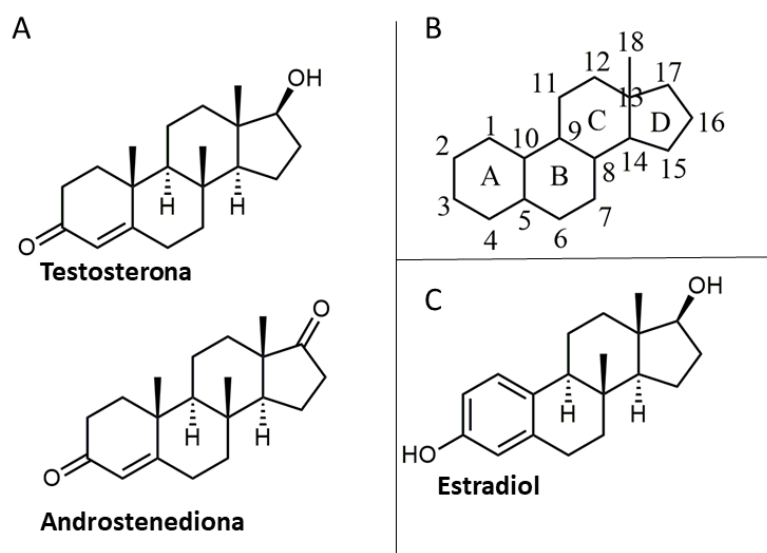


Figura 42: A-precursores andr3gicos, B-estructura qu3mica de los estr3genos, C-estructura del estradiol

En 1958, se descubri3 que las acciones de los estr3genos requerían de la activaci3n de un receptor intracelular, cuya composici3n y estructura fueron determinadas en 1986. Durante mucho tiempo se pens3 que todas las acciones de los estr3genos estaban mediadas por este receptor. En 1996 se confirm3 la teoría de que existe m3s de un receptor para el estradiol y los estr3genos en general [86]. En la actualidad, se han identificado dos receptores de estr3genos conocidos como ER α y ER β , ambos receptores nucleares formados por una sola cadena de 565 y 530 amino3cidos, respectivamente. ER α y ER β son codificados por diferentes genes y su expresi3n varía dependiendo del tipo de tejido. ER α es

expresado predominantemente en órganos reproductivos (útero, mama y ovario), así como en el hígado y en el sistema nervioso central, en tanto que la forma β es expresada mayoritariamente en otros tejidos como hueso, endotelio, pulmones, tracto urogenital, ovario, sistema nervioso central y próstata [82].

La mayor parte de los efectos de los estrógenos en sus órganos blanco se deben a una cadena de eventos celulares conocida como “señalización estrogénica”, la cual es una vía de transducción celular que se inicia con la activación de los RE. Estos receptores poseen una estructura terciaria que incluye cinco dominios funcionalmente distintos designados con las letras “A” a “F” (Figura 43). El dominio C es la parte del receptor que se une al ADN (Dominio de Unión al ADN, DUA) en los elementos de respuesta de sus genes blanco, en tanto que el E corresponde al Dominio de Unión a Ligando (DUL) y es el sitio de reconocimiento y unión a la hormona específica y otras moléculas afines [86].

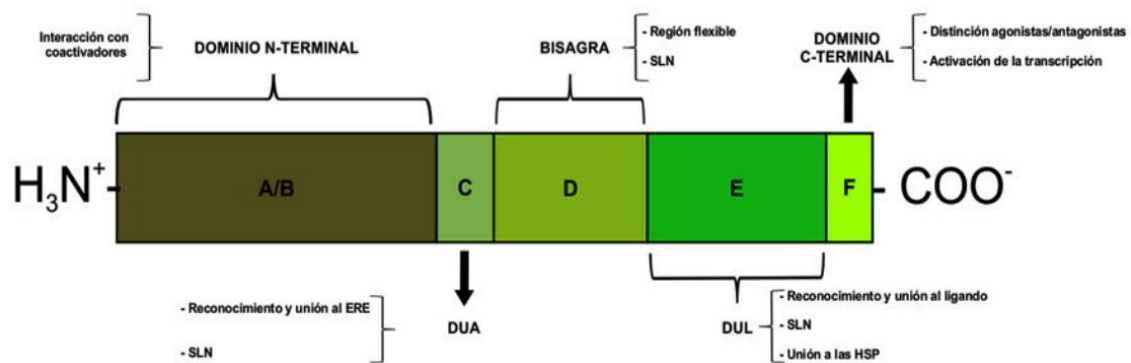


Figura 43: Estructura terciaria del receptor del RE [86]

En ausencia de ligando, los RE permanecen inactivos, ya que se encuentran enlazados a proteínas chaperonas del complejo HSP (Heat Shock Proteins, proteínas de choque térmico), quienes los mantienen en una conformación que oculta sus péptidos señal de localización nuclear (SLN). La unión del receptor con la hormona correspondiente provoca cambios de conformación que lo separan de las HSP y descubren las señales de localización nuclear; posibilitando su traslocación a núcleo y la activación de la transcripción de genes blanco por interacción con sus elementos de respuesta, denominados ERE (Elemento de Respuesta a Estrógenos) (Figura 47). Aquellos genes que cuentan con un ERE en su estructura son clasificados como “sensibles a estrógenos”. Sin

embargo, existen genes que, aun careciendo de ERE, pueden transcribirse mediante señalización estrogénica gracias a un mecanismo indirecto. En este caso los RE interactúan con otros factores de transcripción, provocando su activación y posterior translocación al núcleo, donde a su vez se unen con sus propios elementos de respuesta y provocan la expresión génica (Figura 44). La interacción con otros factores de transcripción es diferente dependiendo del tipo de RE implicado, lo que se ha propuesto como explicación al hecho de que la activación de los RE por los mismos ligandos puede provocar efectos distintos dependiendo del contexto tisular y celular [86].

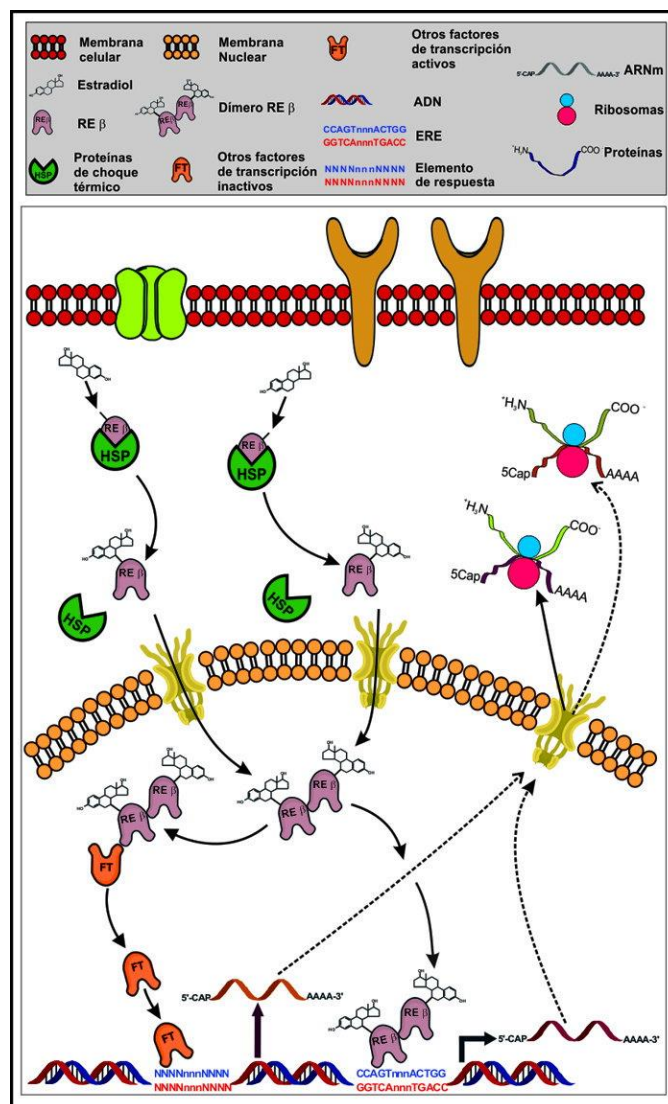


Figura 44: Señalización estrogénica [86]

Si bien el mecanismo principal por el cual el receptor de estrógenos regula el crecimiento y la proliferación celular es por activación del RE dependiente del ligando, en los últimos años se ha descubierto que existen algunos otros mecanismos que no necesitan del ligando para generar una respuesta, o que no se necesita la unión del complejo hormona-receptor a su elemento de respuesta específico sobre el ADN o inclusive se ha visto que es posible que se dé la respuesta activando otras cascadas de transducción de señales. Es claro que todos los mecanismos interactúan entre sí para llevar a cabo la regulación hormonal de un tejido blanco, sin embargo, la regulación de cada uno de estos mecanismos y cómo interactúan entre ellos no se conoce en su totalidad [82].

El RE está implicado en el desarrollo del cáncer de mama. Hasta el momento existen dos hipótesis que explican cómo se relaciona el cáncer de mama con la exposición acumulativa del epitelio mamario a los estrógenos. La primera indica que la unión de los estrógenos al RE estimula la proliferación de células mamarias, aumentando el número de células diana dentro del tejido, y el aumento de la división celular y la síntesis de ADN eleva el riesgo de errores de replicación que puede resultar en la adquisición de mutaciones perjudiciales que alteran los procesos celulares normales, como la apoptosis, la proliferación o reparación del ADN. La segunda hipótesis indica que el metabolismo de los estrógenos conduce a la producción de subproductos genotóxicos que podrían dañar directamente el ADN, resultando nuevamente en mutaciones puntuales. Existe evidencia de que los estrógenos pueden actuar a través de ambos mecanismos para iniciar y/o promover el cáncer de mama [87]. La expresión de RE es un buen pronóstico en pacientes que padecen cáncer de mama. Aproximadamente el 70% de los tumores de mama expresan RE, por lo que son candidatos para terapia anti-hormonal con moduladores selectivos del receptor de estrógenos. Al momento se cuenta con dos recursos farmacológicos para reducir el efecto del estrógeno en las células tumorales: la inhibición de la acción del estrógeno con agentes antiestrogénicos y la prevención de la producción de estrógenos por medio de la inhibición de la enzima aromatasa [82].

Anteriormente se expuso que medir el nivel de expresión de ER en los tumores de mama permite una predicción precisa de la respuesta a la terapia hormonal [9,10]. La Medicina Nuclear permite obtener información sobre las características bioquímicas del tumor estudiando la totalidad de la masa tumoral en forma mínimamente invasiva y evitando error en el muestreo debido a la expresión no homogénea de los receptores [11].

Dado que el objetivo de esta tesis es desarrollar trazadores derivados del estradiol destinados al RE resulta crucial conocer el farmacóforo y tener presente qué grupos funcionales son necesarios para mantener la actividad biológica. El farmacóforo del RE fue descrito por primera vez en 1950 y está formado por los dos grupos hidroxilo separados por un espaciador hidrofóbico [88]. A pesar de que el acomodamiento alrededor del anillo A impone un requerimiento absoluto de que los ligandos tengan un anillo aromático, el restante bolsillo de unión puede aceptar un gran número de diferentes grupos hidrofóbicos. Esto puede ser atribuido al tamaño de la cavidad, quien tiene un volumen (450 Å³) cercano a dos veces el volumen molecular que ocupa el estradiol (245 Å³) [89,90]. La presentación del farmacóforo comúnmente aceptada para un agonista del RE α incluye (Figura 45):

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

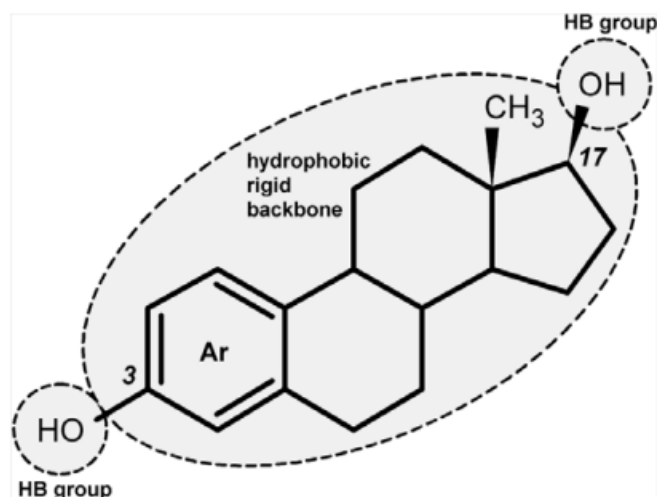


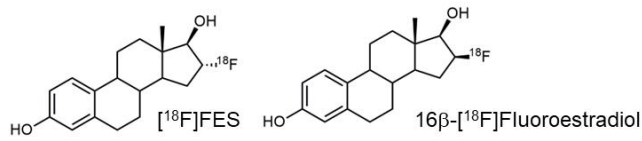
Figura 45: Grupos funcionales necesarios en la molécula de estradiol para mantener la actividad biológica [90]

2.6 Desarrollo de trazadores destinados al RE

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

En 1984 Kieseewetter *et al.* [91]. desarrolló dos trazadores derivados del estradiol que se muestran en la (Figura 46-A). Ambos se obtuvieron con elevada pureza radioquímica y adecuada actividad específica. Uno de ellos, el [^{18}F]FES ha demostrado ser un interesante trazador PET para imágenes de RE en pacientes con cáncer de mama RE+ [6,92]. Actualmente el [^{18}F]FES es sintetizado utilizando módulos automatizados de síntesis en dos etapas (Figura 46-B). La síntesis parte del precursor 3-O-metoxymetil-16 β -epiestriol sulfona e implica en primera instancia la sustitución nucleofílica con el [^{18}F]KF, seguida de una hidrólisis con ácido sulfúrico [6, 93,94]

A Kieseewetter et al.



B

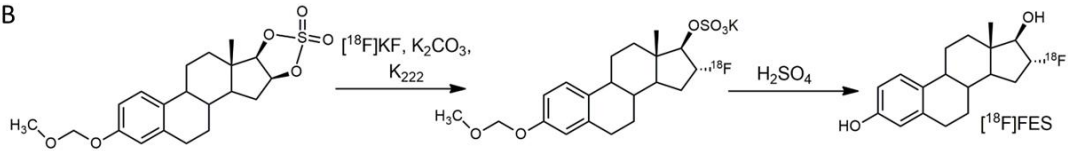


Figura 46: A-trazadores desarrollados por Kieseewetter, B-síntesis actual del $[^{18}\text{F}]\text{FES}$ [91]

La Figura 47 muestra una imagen PET obtenida luego de administrar $[^{18}\text{F}]\text{FES}$ a un paciente, en la misma pueden observarse dos lesiones focales que se señalan con una flecha roja [6].

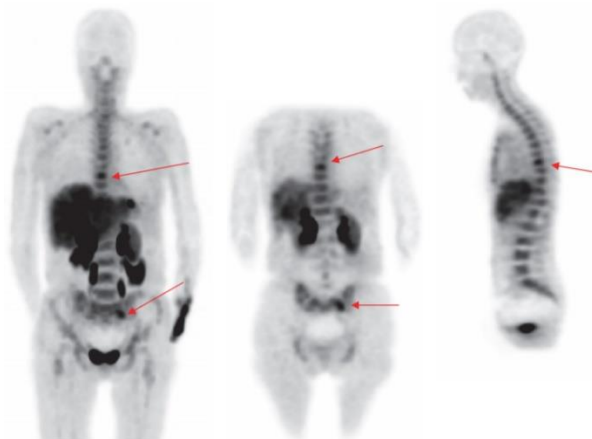


Figura 47: Imagen PET con $[^{18}\text{F}]\text{FES}$

Diversos estudios han demostrado que el $[^{18}\text{F}]\text{FES}$ tiene buena sensibilidad para detectar la captación en tumores primarios como metastásicos y que es una herramienta muy útil para hacer el seguimiento a la terapia hormonal [5,8,95-98]. Sin embargo, el $[^{18}\text{F}]\text{FES}$ presenta algunas limitaciones ya que las metástasis hepáticas no pueden ser detectadas con este método ya que las mismas quedan ocultas debido a la metabolización hepática normal que presenta el trazador. En mayo de 2020 la FDA aprobó su uso como un agente de imagen en PET,

indicado para la detección de lesiones RE+ y como complemento a la biopsia en pacientes con cáncer de mama recurrente [99].

VanBrocklin *et al.* [100] del grupo de Katzenellenbogen sintetizaron análogos de [¹⁸F]FES con el [¹⁸F]F en la posición 16 α que fue el epímero que mostró una mayor afinidad por el RE pero incorporando algunos sustituyentes en el C11 y C17 (Figura 48) con el fin de mejorar su comportamiento biológico. Todos los derivados 17 β -etnil-¹⁸F]FES resultaron en una afinidad de unión al RE significativamente menor. En cuanto a los derivados 17 α -etnil-¹⁸F]FES, la introducción del grupo 11 β -etil, resultó en una mayor afinidad por el RE, pero debido a ser apolar también aumentó la unión inespecífica. Por el contrario, el sustituyente 11 β -metoxi, aumentó la unión al RE pero disminuyó la lipofilidad, con un potencial beneficio en reducir la unión inespecífica [81]. Jonson *et al.* [101] del grupo de Katzenellenbogen desarrollaron 4 derivados 16 β -¹⁸F]fluoroestradiol con sustituyentes en posición 11 β , 17 α y en ambos (Figura 48). El derivado 4 fue el más prometedor, 17 α -etnil-11 β -metoxi-16 β - ¹⁸F]fluoroestradiol (β FMOX), cuya afinidad de unión en útero fue cerca de cuatro veces mayor con respecto al [¹⁸F]FES. La razón de esta mayor afinidad de unión se encuentra en la mayor estabilidad in vivo en comparación al [¹⁸F]FES. Sin embargo, estudios preliminares en pacientes evidenciaron una baja captación en tumores RE+ en comparación con [¹⁸F]FES. Jonson *et al.* [101] demostraron que la actividad inyectada del derivado 4 prácticamente no se redistribuyó desde el sitio de inyección como consecuencia de la baja unión de β FMOX a proteínas plasmáticas [81].

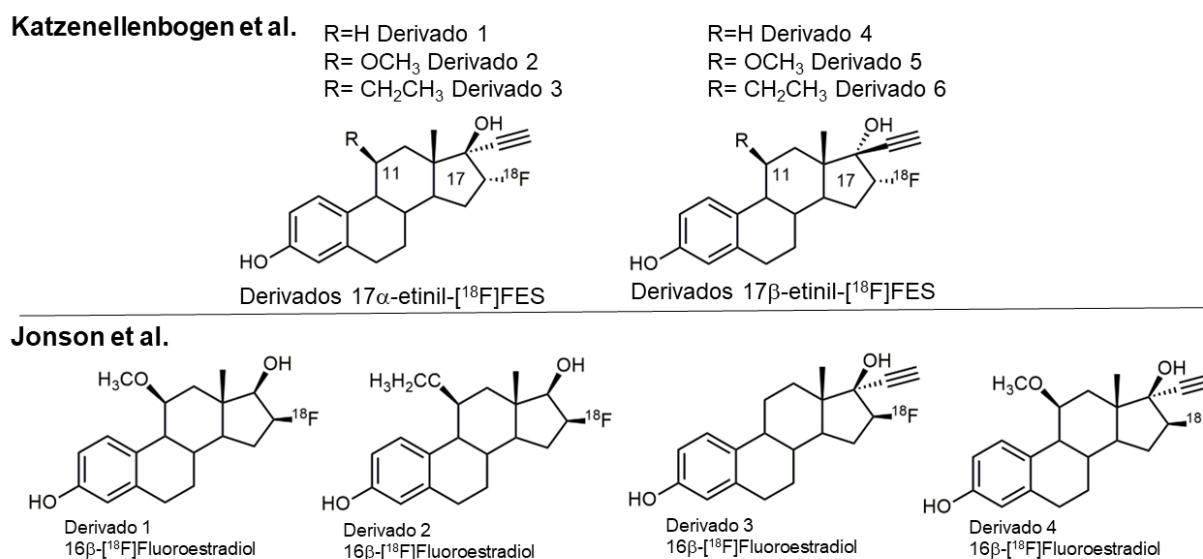


Figura 48: Derivados de estradiol marcados con [¹⁸F]F sintetizados por diferentes grupos [81,100,101]

El grupo de Seimbille *et al.* [102] sintetizaron una serie de derivados de [¹⁸F]FES con modificaciones en el anillo A, tanto en el C2 como en el C4 (Figura 49). Los estudios realizados demostraron que la adición concomitante de un átomo de flúor en el C4 y un grupo 11β-metoximetilo (4-F[¹⁸F]MFES) podría aumentar el potencial de [¹⁸F]FES como radiotrazador para Imagenología Molecular en cáncer de mama debido a la favorable biodistribución observada en modelos animales y su elevada relación blanco/no blanco en comparación al [¹⁸F]FES. Actualmente se encuentra en estudios clínicos, por lo que aun queda trabajo para asegurar su potencial para superar al [¹⁸F]FES [81,102-104]. Este mismo grupo también trabajó en la síntesis de dos derivados 16α-[¹⁸F]-fluorofulvestrant (análogo del antagonista de RE fulvestrant) (Figura 49) El marcado se llevó a cabo en la posición C16, de forma similar a la reportada para la síntesis de [¹⁸F]FES. Cada derivado presentó un estado de oxidación diferente en el átomo de azufre que forma parte de la cadena unida al C7, incluyendo el sulfóxido, sulfona y sulfuro. Los estudios *in vivo* resultaron ser desalentadores; la captación en tejidos RE+ resultó un tercio menor en comparación al [¹⁸F]FES, al mismo tiempo que la captación en tejidos no blanco fue mayor [81,105].

Más recientemente los grupos de Duo Xu *et al.* [106] y Guiqing Liu *et al.* [107] aplicaron la ciclación de Huisgen para desarrollar derivados de estradiol

marcados con [^{18}F]F (Figura 49). La reacción de Huisgen catalizada por cobre (I) consiste en una cicloadición [3+2] entre un alquino terminal y una azida, para dar 1,2,3-triazoles 1,4 disustituídos. Este tipo de química es muy versátil y permite su aplicación en muchos campos como en el desarrollo de potenciales radiofármacos [3]. El grupo de Guiqing Liu et al. [107] ha utilizado los beneficios de la reacción de Huisgen para introducir el grupo AmBF_3 en la estructura del estradiol obteniendo la molécula de interés, pero con [^{19}F]F en su estructura ($\text{AmBF}_3\text{-ES}$). En un paso posterior se incubó el [^{18}F]F y el $\text{AmBF}_3\text{-ES}$ a 100°C durante 20 minutos en solución tampón piridazina-HCl (1,0 M, pH 2.0–2.5) intercambiándose el [^{19}F]F por el [^{18}F]F para generar el trazador de interés. Dicho trazador posee en la posición 17 del estradiol un triazol que en posición 4 tiene una amina cuaternaria. Uno de los sustituyentes de dicha amina es un BF_3 , donde uno de los átomos de Flúor es radiactivo. [^{18}F]F- $\text{AmBF}_3\text{-ES}$ fue sintetizado con éxito en un solo paso y con buen rendimiento. Si bien el trazador presentó adecuada lipofiliencia y unión a RE específica resta realizar una evaluación *in vivo* para determinar su potencialidad.

El grupo de Duo Xu *et al.* [106] plantea en 2018 el desarrollo del trazador [^{18}F]FETE. Para ello realiza la marcación con [^{18}F]F de una molécula de pequeño tamaño conteniendo un grupo tosilo como buen grupo saliente. En un paso posterior, se realiza una reacción de Huisgen utilizando etinilestradiol, CuI como catalizador y DIPEA como base nitrogenada obteniendo [^{18}F]FETE. El trazador posee en la posición 17 del estradiol un triazol que en posición 4 tiene una cadena con 6 carbonos, 2 oxígenos y el [^{18}F]F. El [^{18}F]FETE mostró un alto rendimiento radioquímico y buena estabilidad. En comparación con el [^{18}F]FES, este trazador tiene una lipofiliencia más baja, lo que hace disminuir su metabolismo hepático y la absorción de tejido no objetivo y conducir a mejores relaciones blanco/ músculo. [^{18}F]FETE mostró características favorables *in vitro* y propiedades prometedoras *in vivo* con alta captación específica de tumores RE+, lo que lo convierte en un candidato potente para la obtención de imágenes de RE con PET.

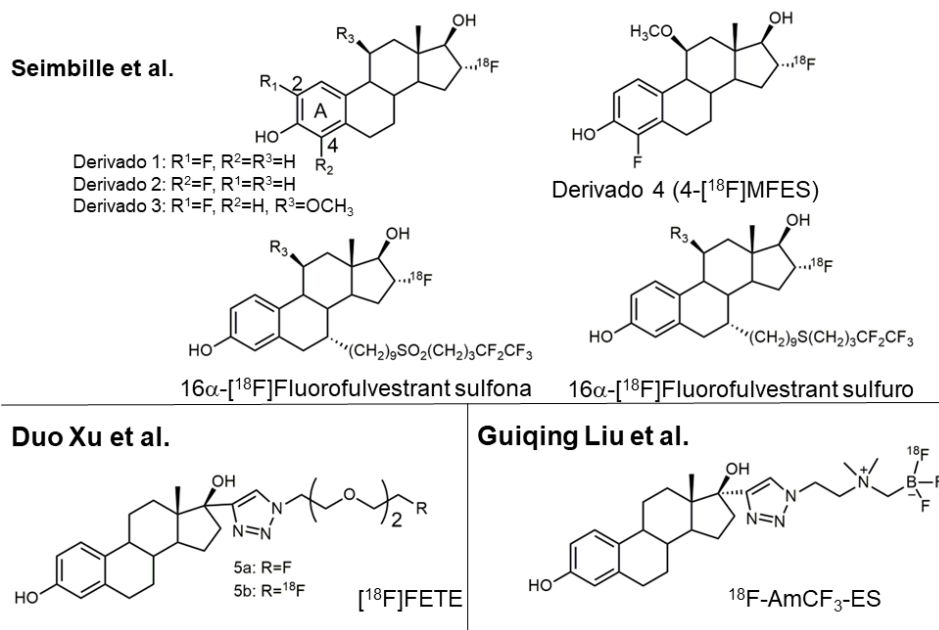


Figura 49: Derivados de estradiol marcados con [¹⁸F]F sintetizados por diferentes grupos

También se han desarrollado compuestos no esteroideos análogos del tamoxifeno que se han marcado con [¹⁸F]F. El tamoxifeno es una de las drogas más comúnmente usada para la terapia endocrina por ser antagonista de los RE. Kieseewetter *et al.* [91] y Yang *et al.* [108-110] han estudiado trazadores derivados del tamoxifeno marcados con [¹⁸F]F sin éxito (Figura 50).

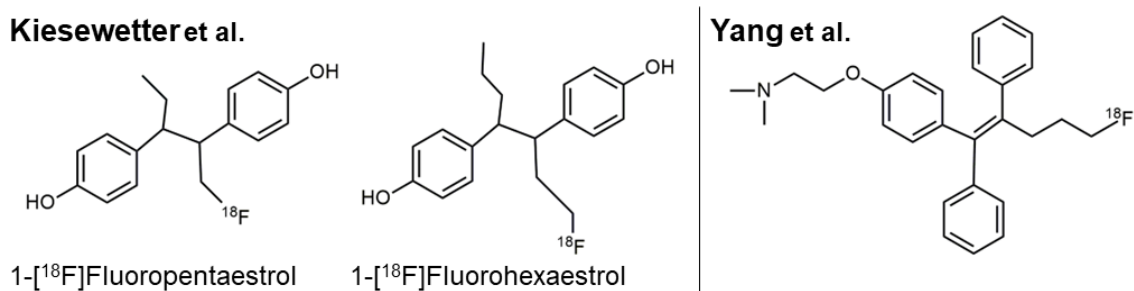


Figura 50: Análogos de tamoxifeno marcados con [¹⁸F]F [91,108-110]

A pesar de que el [¹⁸F]F tiene un gran atractivo en el desarrollo de trazadores destinados al RE para su uso en PET, aun existe un gran interés en el uso del [^{99m}Tc]Tc debido a su química versátil y sus características ideales que ya fueron profundizadas anteriormente.

El diseño de potenciales radiofármacos de [^{99m}Tc]Tc aprovecha la rica química de coordinación del metal que se puede coordinar con una variedad muy grande de quelantes. En muchos casos el desarrollo de los complejos de [^{99m}Tc]Tc comienza sintetizando los análogos de Re estable. Dada las similitudes en las propiedades químicas entre el Re y Tc, dichos complejos son utilizados para estudios estructurales puesto que la concentración de [^{99m}Tc]Tc es muy baja a los niveles de actividad usualmente utilizados, lo que no permite obtener masa suficiente para realizar un estudio estructural. Además, al contarse con isótopos no radiactivos de Re, esto facilita el trabajo durante el desarrollo y caracterización de los compuestos.

Katzenellenbogen y colaboradores fueron los primeros en utilizar el sistema quelante N_2S_2 , un sistema en forma de bisamino-bistirol (BAT) o derivados de monoamina-monoamida (MAMA), así como quelantes N_2S para el diseño de derivados de estrógenos y progestágenos (Figura 51) [111-114]. Los primeros complejos sintetizados por el grupo fueron con el sistema quelante N_2S_2 en forma de bisamino-bistirol (BAT), Si bien este primer sistema mostró una alta afinidad por el sitio blanco, su unión no específica fue muy alta y su biodistribución no fue lo suficientemente selectiva. Es así que los complejos no fueron útiles para su uso en imágenes de tumores de mama. El grupo concluyó que debido a que el sistema conjugado BAT-metal es muy hidrófobo, la alta lipofilicidad de los complejos podría ser la razón principal de su reducción de selectividad hacia el tejido blanco. El grupo se planteó el desafío de mejorar la biodistribución de estos complejos, para lo cual se desarrollaron complejos derivados de estradiol con el sistema quelante N_2S_2 derivados de monoamina-monoamida (MAMA). En comparación con el sistema BAT el sistema MAMA tiene cuatro grupos metilo menos y tiene una función carbonilo en lugar de un grupo metileno lo que provoca una reducción sustancial en la lipofilia. A pesar de los esfuerzos tanto en la serie BAT como en la serie MAMA la alta lipofilicidad y el gran tamaño de los complejos fueron las principales propiedades que influyeron en el comportamiento biológico inadecuado.

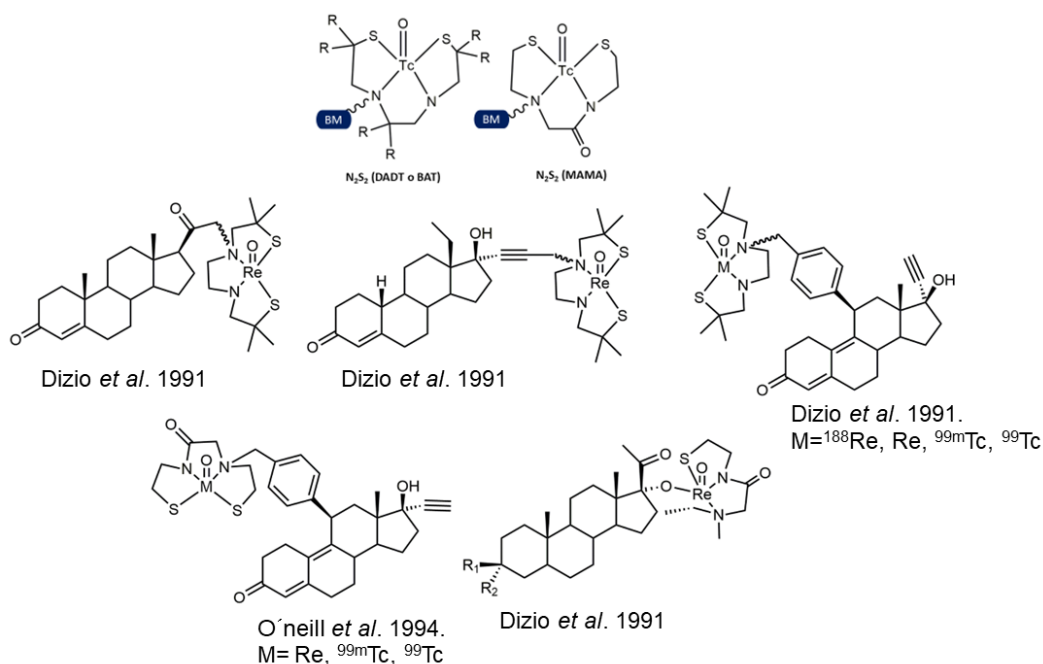


Figura 51: Complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ derivados del estradiol con sistema quelante N_2S_2 o N_2S [111-114]

Más recientemente los grupos de Spies y Johannsen y Wüst desarrollaron complejos derivados de estradiol del tipo “3+1” (Figura 52-A) o “4+1” (Figura 52-B) donde la biomolécula de interés se encuentra ubicada como ligando monodentado mientras que se completa la esfera de coordinación con coligandos tridentados tipo SXS ($\text{X}=\text{N},\text{O},\text{S}$) o tetradentados. Gracias a este enfoque se logró obtener especies menos voluminosas y con posibilidad de incorporar grupos químicos como OH o COOH en el coligando de manera de modular las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los complejos resultantes [111, 115-117]

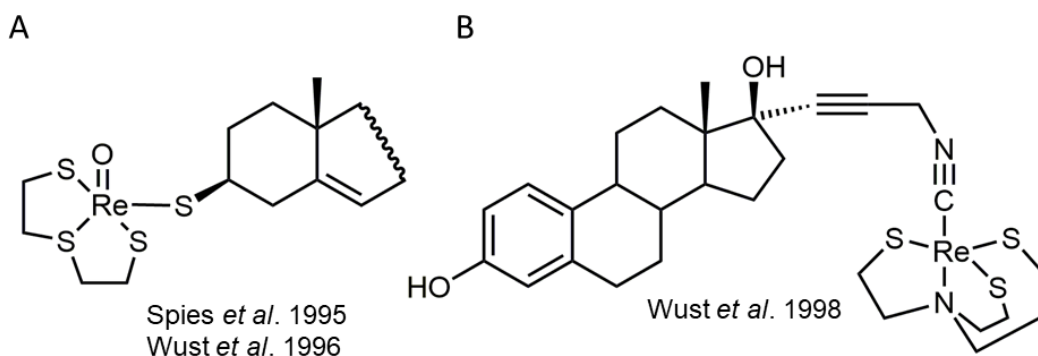


Figura 52: Complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ derivados del estradiol del tipo “3+1” o “4+1” [111, 115-117]

Más recientemente, Skaddan *et al.* [118] diseñaron y sintetizaron una gran variedad de complejos tricarbónicos derivados de estradiol 7 α -sustituidos con Re estable. En primera instancia se centraron en complejos del tipo “3+1” (Figura 53-A) y del tipo Re(CO)₃ ciclopentadienilo (Figura 53-B) los cuales presentaron buena afinidad por el RE pero elevada lipofilidad. Buscando modificar la lipofilidad, se enfocaron en el complejo conteniendo el anillo ciclopentadienilo y diseñaron nuevos ligandos con una cadena lateral conteniendo enlaces éter en lugar de una cadena carbonada [81,111,118].

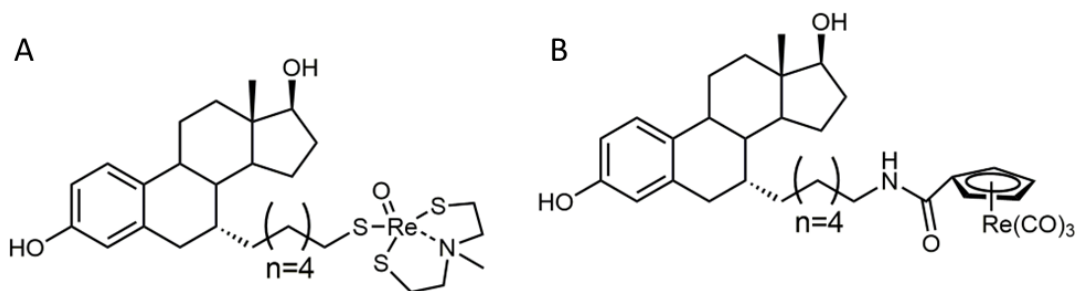


Figura 53: Complejos derivados del estradiol A- del tipo “3+1”, B- del tipo Re(CO)₃ ciclopentadienilo [81,111,118]

Xia *et al.* [119] diseñaron, sintetizaron y evaluaron *in vitro* e *in vivo* un derivado de estradiol conteniendo al ácido dietilentriaminopentaácetico (DTPA) como agente quelante (Figura 54). Con la introducción del DTPA, el grupo buscó aumentar la solubilidad en agua del estradiol para disminuir el metabolismo hepático. El complejo [^{99m}Tc]Tc-DTPA-estradiol demostró tener una unión específica al RE pero presentó una elevada captación en hígado lo cual dificulta su uso en imagenología de los RE [81,119]

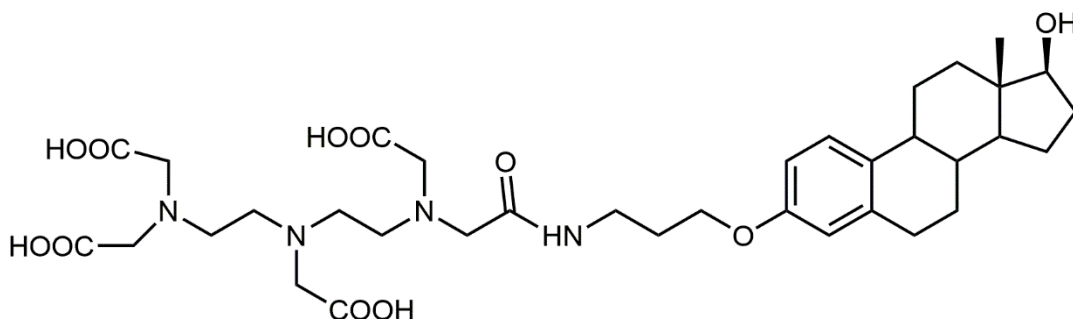


Figura 54: Ligando derivado de estradiol de Xia *et al.* [119]

El grupo de Takahashi *et al.* [120] desarrolló un complejo derivado de estradiol que denominó $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-GAP-EDL}$. Partiendo de la estrona se incorporó una amina en el hidroxilo de la posición 3 del anillo aromático formando el EDL-NH₂ para luego incorporar un péptido glutamato y así formar el GAP-EDL (Figura 55). La marcación se realizó en forma directa incorporando $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ y SnCl_2 a un vial conteniendo el GAP-EDL. El trazador demostró tener afinidad por el RE, además las imágenes SPECT demostraron su utilidad en el diagnóstico de enfermedades RE+ [120].

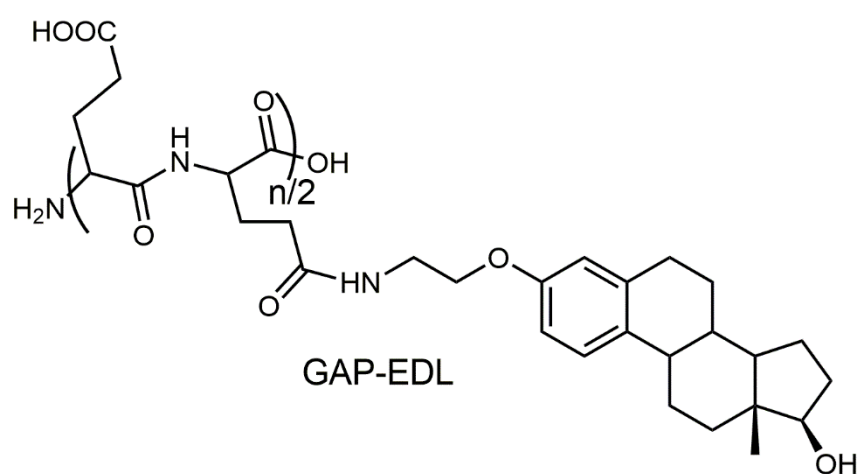


Figura 55: Ligando derivado de estradiol de Takahashi *et al.* [120]

Jaouen *et al.* [121] sintetizaron y evaluaron un complejo de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ análogo del tamoxifeno (Figura 56-A). El complejo posee un grupo ciclopentadienilo como sustituyente del doble enlace en la posición donde el tamoxifeno posee un grupo aromático. Este trazador presentó una unión específica al RE y además se comportó como antiestrógeno con eficacia casi idéntica al metabolito activo del tamoxifeno [81,121]. Bigott *et al.* [122]. reportaron la síntesis y evaluación *in vitro* de análogos de ciclofenilo con el anillo C sustituido (Figura 56-B). En este caso el grupo ciclopentadienilo se encuentra junto a un carbonilo como sustituyente del doble enlace. El doble enlace además posee un metilo como sustituyente y no un etilo como posee el tamoxifeno y existe pérdida de la amina terciaria que posee el tamoxifeno en el hidroxilo del anillo B. El complejo presentó una baja afinidad por el RE por lo cual no se realizaron estudios *in vivo* [81,122].

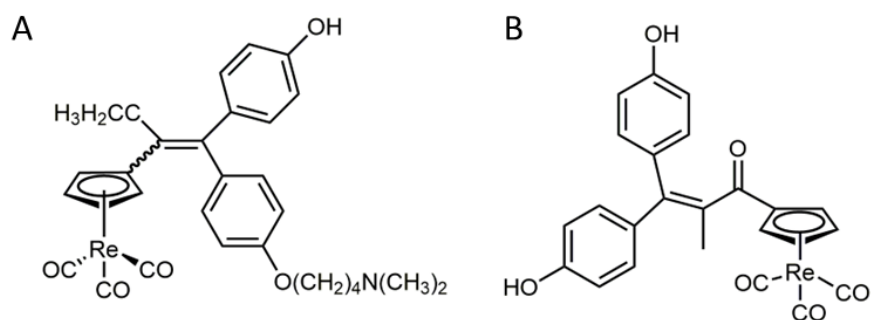


Figura 56: Complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ derivados de tamoxifeno [122]

Todos estos esfuerzos demuestran claramente la influencia del sistema quelante en las propiedades de las biomoléculas marcadas con $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$. En consecuencia, el diseño del quelante adecuado es crucial para obtener la estabilidad biológica y la farmacocinética deseadas para un radiofármaco.

Es por esto que diversos grupos de investigación continúan en la búsqueda de un trazador ideal para imagenología de los RE en cáncer de mama. Asimismo, muchos grupos buscan desarrollar un trazadores de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ destinado a los RE ya que el uso de radiofármacos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ sigue siendo deseable debido a su amplia disponibilidad y bajo costo en comparación con los emisores de positrones como el $[^{18}\text{F}]\text{F}$. Además, el desarrollo de compuestos análogos de $[^{186/188}\text{Re}]\text{Re}$ para la terapia es una ventaja adicional.

Dado que ninguno de los trazadores que se han estudiado han llegado a etapas clínicas, esta tesis plantea el desarrollo de nuevos trazadores de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ y $[^{18}\text{F}]\text{F}$ destinados al RE de manera de mejorar las propiedades de los complejos actualmente disponibles.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es el diseño, síntesis y evaluación de radiotrazadores de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ y $[^{18}\text{F}]\text{F}$ derivados de estradiol, como potenciales radiofármacos para contribuir al diagnóstico de cáncer de mama asociado a receptores de estrógenos (RE) y a la evaluación de la terapia anti-hormonal.

El farmacóforo seleccionado fue el estradiol, agonista de los receptores de estrógenos. Los radionucleidos utilizados para esta tesis fueron el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ y el $[^{18}\text{F}]\text{F}$.

En este trabajo se abordaron cada una de las etapas básicas del desarrollo de un radiofármaco, desde el diseño, la síntesis de los ligandos, las etapas de optimización de la marcación con cada radionucleido, pasando por la evaluación fisicoquímica y biológica.

3.2 Objetivos específicos

- Diseño y síntesis de ligandos derivados de estradiol conteniendo grupos quelantes adecuados para la coordinación con el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$:

Partiendo del etinilestradiol se diseñaron y optimizaron diferentes rutas sintéticas para incorporar átomos donadores de electrones adecuados para la formación de los complejos con el radiometal. Estos grupos fueron seleccionados de acuerdo con el estado de oxidación y al core de Tc que se esperaba obtener (ver esquema de ligandos sintetizados punto 3.3).

- Preparación de los complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$:

Se prepararon complejos del tipo $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{I})\text{tricarbonilo}$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{V})\text{nitrido}$ y $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{III})_4+1$. Durante esta etapa se sintetizaron los precursores adecuados y se optimizaron las condiciones de marcación con $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$, teniendo en cuenta parámetros como cantidad de ligando, cantidad de radionucleido, tiempo, temperatura, etc. Se desarrollaron los métodos de cromatografía líquida de alta

eficiencia (HPLC) para evaluar la pureza radioquímica (PRQ) de las moléculas marcadas.

- Diseño y síntesis de un ligando adecuado para la marcación con [¹⁸F]F:

Se diseñaron y optimizaron diferentes rutas sintéticas de manera de obtener un ligando que contenga la biomolécula y un buen grupo saliente para la sustitución con [¹⁸F]F (ver esquema de ligandos sintetizados punto 3.3).

- Síntesis de un análogo de [¹⁹F]F:

Se optimizó una ruta de síntesis para obtener un compuesto análogo con [¹⁹F]F para ser utilizado como estándar.

- Marcación con [¹⁸F]F:

Se optimizaron las condiciones de marcación con [¹⁸F]F teniendo en cuenta parámetros como cantidad de ligando, cantidad de radionucleido, tiempo, temperatura, etc. Durante esta etapa fue necesario familiarizarse con las plataformas automatizadas de síntesis para la producción de compuestos marcados con [¹⁸F]F. Asimismo, se desarrolló un método de HPLC para la determinación de la PRQ del trazador.

- Estudios fisicoquímicos:

Se determinó la lipofilidad, la unión a proteínas plasmáticas, la estabilidad en el medio de reacción y en plasma humano de todos los radiotrazadores obtenidos.

- Estudios *in vitro*:

Se optimizaron las metodologías para la evaluación *in vitro* de los trazadores desarrollados en células MCF-7 (ATCC® HTB-22) que expresan el receptor de estrógeno. Se realizaron ensayos de captación, ensayos de eflujo y estudios de bloqueo destinados a evaluar la especificidad de la interacción con el receptor.

- Estudios *in vivo*:

En esta etapa se evaluó en primera instancia el comportamiento biológico en animales normales, prestando especial atención en las vías de eliminación,

órganos de acumulación y comportamiento farmacocinético. El trazador que presentó resultados más auspiciosos fue sometido a la evaluación biológica en un modelo animal portador de tumor de mama prestando especial atención a la captación tumoral.

3.3 Esquema de ligandos incluidos en esta Tesis

Ligando (L)

L1	
L2	
L3	
L4	
L5	
L6	

El diseño de los ligandos para marcar con $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ se realizó según el método “pendent approach”, que consiste en añadir a la molécula biológicamente activa una serie de grupos donadores de electrones capaces de coordinar al radiometal. En todos los casos se partió del etinilestradiol (agonista de los RE), se derivatizó la molécula a través del triple enlace terminal haciendo uso de la reacción de Huisgen, teniendo en cuenta no afectar los grupos químicos necesarios para mantener la actividad biológica. El ligando 1 (**L1**) posee un grupo amino, un grupo hidroxilo de ácido carboxílico y un nitrógeno del triazol para coordinar con el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ formando un complejo del tipo $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc(I)}$ tricarbónico. El ligando 2 (**L2**) posee como sistema quelante un grupo ditiocarbamato para la formación de complejos del tipo $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc(V)}$ -nitrido. El ligando 3 (**L3**) contiene un grupo isonitrilo como donador de electrones formando un complejo del tipo $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc(III)}$ 4+1. En dicho complejo se espera que **L3** ocupe una de las posiciones de coordinación, mientras que las restantes 4 posiciones son ocupadas por un coligando.

Continuando con el uso de la reacción de Huisgen y respetando los grupos químicos necesarios para mantener la actividad biológica del farmacoforo se derivatizó el etinilestradiol para obtener los ligandos 4, 5 y 6 (**L4**, **L5**, **L6**). Todos ellos poseen un buen grupo saliente en su estructura para realizar una sustitución nucleofílica con el $[^{18}\text{F}]\text{F}$.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiales

Todos los reactivos y los disolventes utilizados para la síntesis de los ligandos, precursores o estándares fueron de calidad para análisis. Todos los disolventes utilizados para las cromatografías líquidas de alta eficiencia fueron de calidad HPLC. En los casos necesarios los disolventes se secaron previo al uso. Para las síntesis se utilizaron reactivos comerciales Sigma Aldrich, Estados Unidos, Merck, Estados Unidos, entre otros. Parte del etinilestradiol utilizado fue donado por Bayer Schering Pharma, Uruguay. El avance de las reacciones y la pureza de los productos se analizaron mediante cromatografía en capa fina (TLC), utilizando sílica-gel 60F-254 o alúmina 60F-254. El revelado de dichas cromatografías se realizó mediante exposición a luz ultravioleta a 254 nm, exposición a vapores de yodo, tratamiento con solución ácida de *p*-anisaldehído en etanol (con posterior quemado) o con nihidrina (con posterior quemado). Para las purificaciones por columna se utilizó sílica gel (Kieselgel 60, 230-400 mesh) de Sigma Aldrich, Estados Unidos o Alúmina neutra 90 de Macharey-Nagel, Alemania.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN se adquirieron en un equipo Bruker Advance DPX-400 (400 MHz), un equipo Bruker Ascend 400 o en un equipo Bruker DRX500 (500 MHz), utilizando los disolventes deuterados que se indican en cada caso. Los desplazamientos químicos se expresaron en partes por millón (ppm). Las multiplicidades se designaron como: s singulete, d doblete, t triplete, c cuarteto, m multiplete, sa señal ancha. Las secuencias de pulsos de los experimentos HSQC y HMBC utilizadas son las disponibles en el software del equipo. Los espectros de masa (MS) se adquirieron en un espectrómetro de masa Applied Biosystem API 2000 con electrospray (ESI) para la fragmentación. Los espectros Infrarrojo (IR) fueron determinados por transformada de Fourier en un espectrómetro Shimadzu IR-Affinity-1, usando tabletas de KBr.

El gas CO utilizado para la formación del *fac*- $[[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ fue de alta pureza de AGA, Linde, Uruguay. El $\text{Na}[[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_4$ empleado en todas las

marcaciones fue eluído de un generador Tecnonuclear S.A., Argentina (propiedad del Centro de Medicina Nuclear del Hospital de Clínicas).

Para las determinaciones de actividad se empleó una cámara de ionización CAPINTEC CRC5 o ALFANUCLEAR ACT-15P (Propiedad de CUDIM).

El [^{18}F]F fue producido en un Ciclotrón PETtrace 10 de 16.5 MeV (GE, Estados Unidos) (propiedad de CUDIM), mediante la reacción nuclear $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ a partir de [^{18}O]H₂O con un enriquecimiento mayor a 98%, adquirida de Wo Isotop Cop Ltda, China.

La síntesis del trazador de [^{18}F]F se realizó en CUDIM en un módulo automático de síntesis Synthra RNplus Reseach (Synthra GmbH, Alemania) que se encuentra dentro de una celda MIP1-1P 1390 LAF (Comecer, Italia) con un flujo laminar blindado FHR-50 (Comecer, Italia).

Para las medidas de actividad en los ensayos de lipofilicidad, UPP, *in vitro* e *in vivo* se utilizó un espectrómetro de centelleo sólido con cristal de NaI(Tl) de 3x3 pulgadas plano acoplado a un sistema analizador monocanal ORTEC.

El estradiol tritiado (Estradiol [6,7- ^3H (N)]), utilizado para el ensayo *in vitro* fue adquirido a American Radiolabeled Chemicals, Inc, Estados Unidos. Las mediciones de la actividad se realizaron en un contador de centelleo líquido, MicroBetaTriLux Wallac-145.

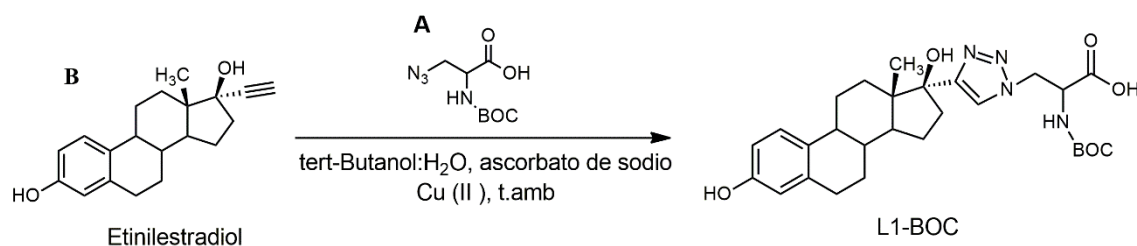
El análisis de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de **C1**, **C2** y **C3** se desarrolló en equipo LC-10 AS Shimadzu. La detección se realizó con un detector de centelleo sólido de cristal de NaI (TI) de 3 x 3 pulgadas.

El análisis de HPLC del [^{18}F]F-PRE-FEET, del [^{18}F]F-FEET y de [^{19}F]F-FEET se desarrolló en un equipo Shimadzu, con horno CTO-10AS VP, Detector de arreglo de diodos SPD-M20A y Bomba LC20AT. La detección se logró con un detector de centelleo sólido Bioscan de NaI (TI) de 1 x 1 pulgadas.

4.2 Métodos

4.2.1 Síntesis de los ligandos

4.2.1.1 17[ácido Boc-2-amino-3-(1H-1,2,3-triazol-1-yl) propanoico]estradiol (**L1-BOC**)



Esquema sintético 1: Síntesis de **L1-BOC**

Una cantidad equimolecular de *N*-BOC-azidoalanina (**A**) (0.20 g, 0.49 mmol) y etinilestradiol (**B**) (0.14 g, 0.49 mmol) se disolvió en *tert*-butanol (9 mL) junto con ácido ascórbico (0.019 g, 0.096 mmol) y acetato de cobre (0.038 g, 0.21 mmol) disuelto en agua (6 mL). La mezcla se dejó reaccionar durante 6 días a temperatura ambiente, protegida de la luz y con atmósfera de nitrógeno. El avance de la reacción se controló por TLC utilizando sílica-gel y una mezcla de disolventes diclorometano:metanol 9:1. Una vez finalizada la reacción, se extrae con acetato de etilo (10 x 10 mL). Se secó la fase orgánica con MgSO₄ anhidro, y se destiló el disolvente a presión reducida. Se obtuvo **L1** como un aceite amarillo.

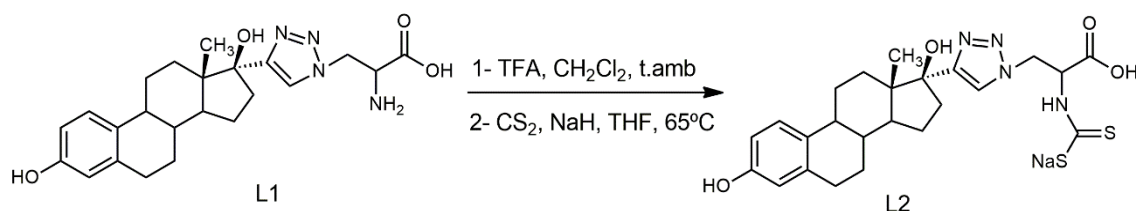
¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ(ppm) = 7.76 (s, 1H), 6.96 (d, 1H), 6.50 (dd, 1H), 6.46 (d, 1H), 4.70 (m, 2H), 2.76 (m, 2H), 2.70 (s, 1H), 2.44 (m, 2H), 1.89 (m, 6H), 1.38 (m, 10H), 1.03 (s, 3H).

¹³C RMN (400 MHz, CD₃OD) δ(ppm): 208.7, 156.1, 154.5, 154.0, 137.4, 131.1, 125.7, 123.2, 114.6, 112.2, 81.8, 79.3, 68.0, 53.1, 50.9, 47.0, 43.4, 39.7, 37.0, 32.8, 29.4, 29.2, 27.3, 26.1, 23.2, 13.5.

MS (ESI, 10 eV) m/z: 524.9 (M⁻) 426.7.

4.2.1.2 17 [sodio (1-carboxi-2-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)etil)etil] ditiocarbamato]

estradiol (**L2**)



Esquema sintético 2: Síntesis de **L2**

L1-BOC (0.20 g, 0.38 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ anhidro (20 mL) y se añadió ácido trifluoroacético (TFA) (361 μ L, 4.68 mmol). La mezcla se dejó reaccionar durante 2 días a temperatura ambiente, protegida de la luz y con atmosfera de nitrógeno. El avance de la reacción se controló por TLC utilizando sílica-gel y una mezcla de disolventes diclorometano:metanol 1:1. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente a presión reducida y con arrastre con tolueno (10 x 10 mL) obteniendo **L1**.

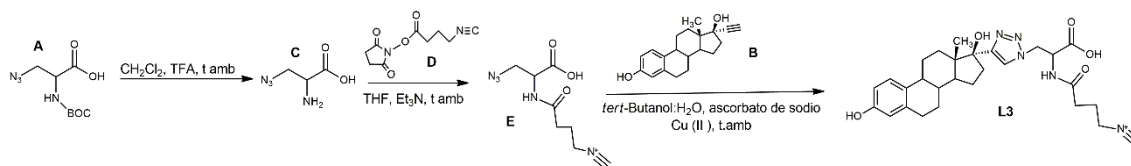
L1 (0.10 g, 0.23 mmol) se disolvió en THF anhidro (10 mL) y se enfrió en baño de hielo. Se añadió CS₂ (0.2 mL, 1.66 mmol) y NaH (0.035 g, 1.46 mmol). Finalizado el agregado de los reactivos se retiró el baño hielo y se mantuvo la reacción a 65°C por dos horas. Transcurrida una hora se agregó nuevamente CS₂ (0.1 mL, 1.66 mmol). El avance de la reacción se controló por TLC utilizando sílica-gel y una mezcla de disolventes diclorometano:acetato de etilo 1:1. Finalizada la reacción se destiló el disolvente a presión reducida a presión reducida obteniendo **L2** como un aceite amarillo.

RMN¹H RMN (400 MHz, (CD₃OD) δ (ppm): 7.59 (H₂₂, s, 1H), 6.96 (H₂, d, 1H), 6.48 (H₁, dd, 1H), 6.41 (H₃, d, 1H), 2.68 (H_{4,5}, m, 3H), 1.7 a 0.9 (sa, 14H), 0.93 (H_{19,20,21}, s, 3H).

MS(ESI, 10 eV) m/z: (M⁺) 503.4

IR(KBr): (CS₂) 1139 cm⁻¹, 1207 cm⁻¹

4.2.1.3 17[5-((1-carboxi-2-(1*H*-1, 2,3-triazol-1-yl) etil) amino)-*N*-metilidine-5-oxopentano-1-amonio] estradiol (**L3**)



Esquema sintético 3: Síntesis de **L3**

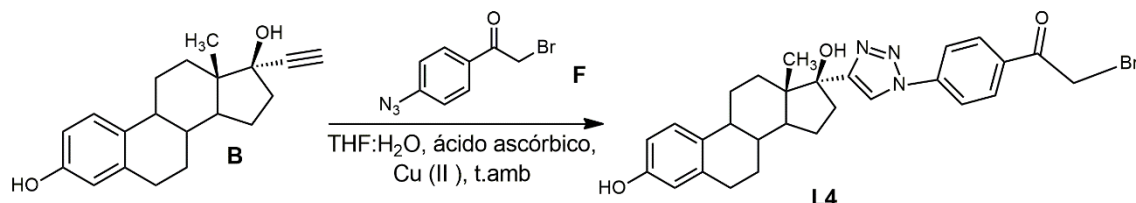
A una solución de *N*-BOC-azidoalanina (**A**) (0.20 g, 0.49 mmol) en CH₂Cl₂ (8 mL) se agregó TFA (1.8 mL, 23 mmol) y se dejó reaccionar por 48 hs a temperatura ambiente. El avance de la reacción se controló por TLC utilizando sílica-gel y una mezcla de disolventes diclorometano:metanol 1:1. Culminado el tiempo de reacción se destiló el disolvente a presión reducida. Sobre el crudo de reacción conteniendo **C** (0.20 g- 1.6 mmol) se añadió THF (6 mL) y Et₃N (3 mL). Finalmente se adicionó el isonitrilo activado [2,5-dioxopirrolidina-1-il 4-isocianobutanoato] (**D**) (0.22 g, 1.0 mmol) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente, protegida de la luz y en atmósfera de nitrógeno durante 19 hs. El avance de la reacción se controló por TLC utilizando sílica-gel y una mezcla de disolventes diclorometano:metanol 1:1. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente a presión reducida.

Una cantidad equimolecular de **E** (0.48 g, 2.0 mmol) y de etinilestradiol (**B**) (0.60 g, 2.0 mmol) en *tert*-butanol (X mL) se incubaron con ácido ascórbico (37 mg, 0.19 mmol) y acetato de cobre (0.087 g, 0.48 mmol) disuelto en agua, durante 6 días a temperatura ambiente, protegidos de la luz y con atmósfera de nitrógeno. El avance de la reacción se controló por TLC utilizando sílica-gel y una mezcla de disolventes diclorometano:metanol 9:1. Una vez finalizada la reacción, se extrae con acetato de etilo (10 x 10 mL). Las fases orgánicas se secaron sobre MgSO₄, y el disolvente se destiló a presión reducida, obteniéndose **L3** (aceite amarillo).

RMN ¹H RMN (400 MHz, (CD₃OD) δ(ppm): 8.07 (H22, s), 7.10 (H2, d, 1H), 6.57 (H1, dd, 1H), 6.50 (H3, d, 1H), 3.33 (H23,25, m, 3H), 2.78 (H4,5, m, 2H), 1.5 a 2.5 (sa, 17 H), 0.89 (H19,20,21, s, 3H).

MS (ESI, 10 eV) m/z: 552

4.2.1.4 17[1-(4-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)fenil)-2-bromoetanone] estradiol (**L4**)



Esquema sintético 4: Síntesis de **L4**

Técnica 1:

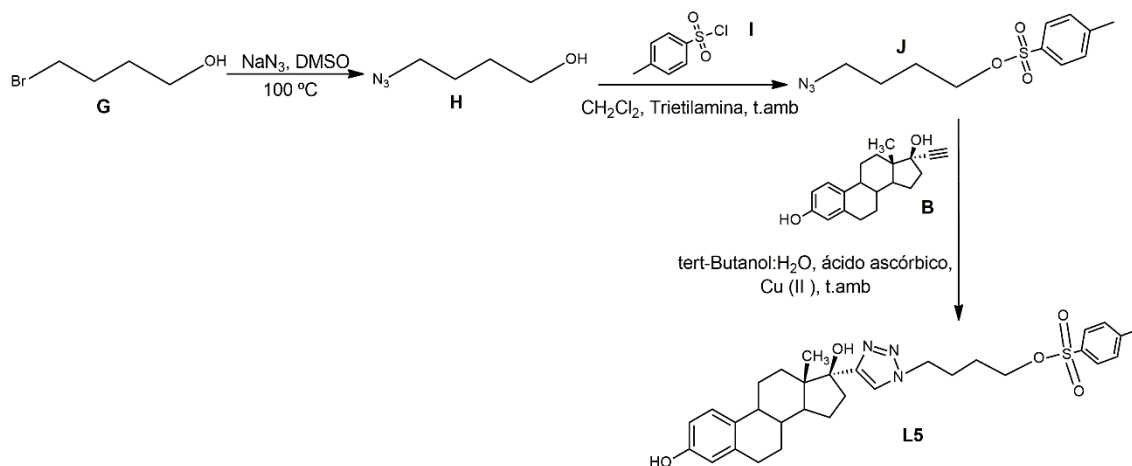
Una cantidad equimolecular de 1-(4-azidofenil)-2-bromoetanona (**F**) (0.12 g - 0,49 mmol) y etinilestradiol (**B**) (0.15 g - 0,49 mmol) en *tert*-butanol (6mL) junto con ácido ascórbico (0.025 g - 0,126 mmol) y acetato de cobre (0.048 g - 0,26 mmol) disuelto en agua (4mL) se incubaron durante 2 días a temperatura ambiente, protegida de la luz y con atmósfera de nitrógeno. El avance de la reacción se controló por TLC utilizando sílica-gel y una mezcla de disolventes hexano:acetato de etilo 7:3. Una vez finalizada la reacción, se extrae con acetato de etilo (10 x 10 mL). Se secó la fase orgánica con MgSO₄ anhidro y se destiló el disolvente a presión reducida. El producto fue purificado mediante columna de sílica (y una mezcla de disolventes compuesta por hexano:acetato de etilo 7:3 para extraer el etinilestradiol y hexano:acetato de etilo 3:7 para extraer a **L4** (aceite amarillo, R=56%).

Técnica 2:

1-(4-azidofenil)-2-bromoetanona (**F**) (0.17 g - 0,71 mmol) y etinilestradiol (**B**) (0.15 g - 0,51 mmol) se disuelven en una mezcla THF:H₂O 3:1 (12mL/4mL). Se incorporó a la reacción 340 μ L de una solución de sulfato de cobre (CuSO₄) en H₂O 4.79% (0.016 g - 0,10 mmol) y 410 μ L de una solución de ascorbato de sodio en H₂O 1M (0.081 g - 0,41 mmol). La mezcla se dejó reaccionar durante 8 días a temperatura ambiente, protegida de la luz y con atmósfera de nitrógeno. El avance de la reacción se controló por TLC utilizando sílica-gel y una mezcla de disolventes hexano:acetato de etilo 1:1 El producto se purificó mediante

columna de sílica y una mezcla de disolventes compuesta por hexano:acetato de etilo 1:1. (aceite amarillo, R=21%).

4.2.1.5 17[4-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)butil 4- metilbencenosulfonato] estradiol (**L5**)



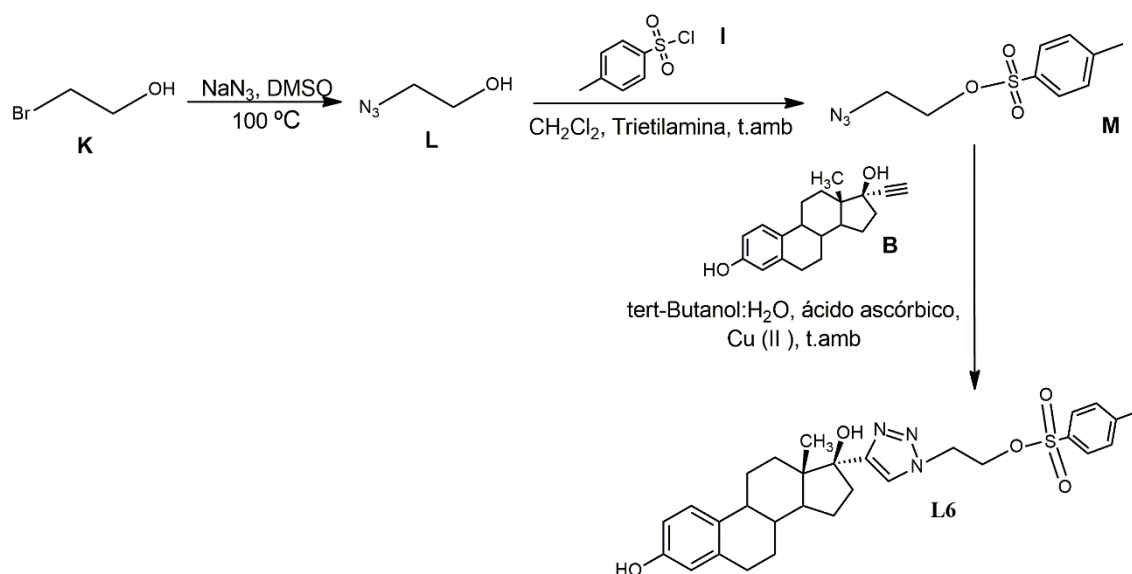
Esquema sintético 5: Síntesis de **L5**

Se hace reaccionar 4-bromobutanol (**G**) (1 g - 6.59 mmol) con azida de sodio (NaN_3) (0.44 g – 6.76 mmol) en dimetilsulfóxido anhidro (DMSO) (30mL). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación continua y atmosfera de nitrógeno a 100°C por dos horas y a temperatura ambiente por 48 hs. El avance de la reacción se controló por TLC utilizando sílica-gel y una mezcla de disolventes hexano:acetato de etilo 7:3. Pasado el tiempo de reacción se eliminaron los disolventes a presión reducida y se realizaron extracciones con eter y agua (10 x 10 mL). Se secó la fase orgánica con MgSO_4 anhidro y se eliminaron los disolventes bajo presión reducida con la ayuda de tolueno (10 x 10 mL) para obtener **H** (aceite amarillo).

La mezcla del producto **H** (0.76 g- 6.54 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (30mL) y Et_3N (0.9 mL- 6.46 mmol) se enfrió a 0°C y se agregó gota a gota una solución de cloruro de metilsulfonilo (**I**) disuelto en CH_2Cl_2 (1.37 g -7.19 mmol). Finalizado el agregado de **I** se retiró la reacción del baño hielo y se mantuvo a temperatura ambiente por 2 días. El avance de la reacción se controló por TLC utilizando sílica-gel y una mezcla de disolventes hexano:acetato de etilo 7:3. La purificación

de **J** se realizó por cromatografía en columna utilizando silica y una mezcla de disolventes compuesta por hexano:acetato de etilo 7:3.

4.2.1.6 17[2-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)etil 4-metilbencenosulfonato] estradiol (**L6**)



Esquema sintético 6: Síntesis de **L6**

Se hace reaccionar 2-bromoetanol (**K**) (1.34 g – 10.95 mmol) con NaN_3 (0.85 g – 13.14 mmol) en DMSO anhidro (30mL). La mezcla de reacción se incubó con agitación continua y en atmosfera de nitrógeno a $100\text{ }^\circ\text{C}$ por 6 horas y 18 horas más a temperatura ambiente. El avance de la reacción se controló por TLC utilizando sílica-gel y una mezcla de disolventes hexano:acetato de etilo 1:1. Pasado el tiempo de reacción se quitaron los disolventes a presión reducida y se realizaron extracciones con éter y agua (10 x 10 mL). Se secó la fase orgánica con MgSO_4 anhidro y se eliminaron los disolventes a presión reducida con la ayuda de tolueno (10 x 10 mL) para obtener **L** (aceite amarillo).

RMN **L** ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.76 (H3,4, m, 2H), 3.38 (H1,2, t, 2H)

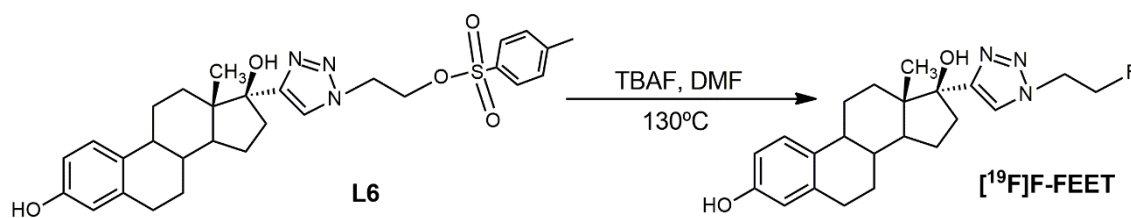
La mezcla del producto **L** (0.87 g- 9.99 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (30mL) y Et_3N (2 mL- 6.46 mmol) se enfrió a 0°C . Se agregó gota a gota una solución de cloruro de metilsulfonilo (**I**) disuelto en CH_2Cl_2 (2.26 g – 11.90 mmol). Posteriormente se retiró la reacción del baño hielo y se mantuvo a temperatura ambiente, con

agitación continua y en atmosfera de nitrógeno por 5 días. El avance de la reacción se controló por TLC utilizando sílica-gel y una mezcla de disolventes hexano:acetato de etilo 7:3. La purificación de **M** se realizó por cromatografía en columna utilizando alúmina y una mezcla de disolventes compuesta por hexano:acetato de etilo 7:3. (aceite amarillo, R>17%).

RMN **M** ¹H (400 MHz, (CDCl₃) δ(ppm): 7.83 (H5,7, d, 2H), 7.38 (H6,8, d, 2H), 4.17 (H3,4, t, 2H), 3.49 (H1,2, t, 2H), 2.46 (H9-11, s, 3H).

Se incubó **M** (0.66 g – 2.73 mmol) y etinilestradiol (**B**) (0.40 g – 1.36 mmol) en *tert*-butanol (6mL) junto con ácido ascórbico (0.011 g - 0,055 mmol) y acetato de cobre (0.020 g - 0,11 mmol) disuelto en agua (4mL). La mezcla se dejó reaccionar durante 6 días a temperatura ambiente, protegida de la luz y con atmósfera de nitrógeno. El avance de la reacción se controló por TLC utilizando sílica-gel y una mezcla de disolventes diclorometano:metanol 1:1. Una vez finalizada la reacción, se extrae con acetato de etilo (10 x 10 mL). Se secó la fase orgánica con MgSO₄ anhidro y se eliminaron los disolventes bajo presión reducida (aceite amarillo).

4.2.2 Síntesis del 17[1-(2-fluoroetil)-1H-1,2,3-triazol] estradiol ([¹⁹F]F-FEET)



Esquema sintético 7: Síntesis de [¹⁹F]F-FEET

Se incubó **L6** (0.05 g – 0.09 mmol) disuelto en DMF anhidro (2.5 mL) con Fluoruro de Tetrabutilamonio (TBAF) (0.030 g – 0.11 mmol) durante 6 horas a 130°C, protegidos de la luz y con atmósfera de nitrógeno. El avance de la reacción se controló por TLC utilizando sílica-gel y una mezcla de disolventes Acetato de etilo: Hexano 8:2. Transcurrido este tiempo se realizaron extracciones con éter y

H₂O (10 x 10 mL). Se secó la fase orgánica con MgSO₄ anhidro y se eliminaron los disolventes bajo presión reducida (aceite amarillo, R>39.6%).

4.2.3 Preparación de los trazadores de [^{99m}Tc]Tc

4.2.3.1 Síntesis del complejo [[^{99m}Tc]Tc(I)(CO)₃L1] (C1)

4.2.3.1.1 Síntesis del *fac*-[[^{99m}Tc]Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺

Una mezcla de 4.0 mg de carbonato de sodio (Na₂CO₃), 20.0 mg de tartrato de Sodio y potasio (NaKC₄H₄O₆) y 7 mg de borohidruro de sodio (NaBH₄) se purga con monóxido de carbono (CO) durante 15-20 min. Se agrega 1 mL de pertecneiato de sodio (Na[^{99m}Tc]TcO₄) (20-30 mCi en 1mL). Se calienta en baño de agua a 60-70°C durante 30 minutos. La PRQ es evaluada por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), fase reversa utilizando una columna Phenomenex C18 Luna 5 μ, 100 A, to 250x4,6 mm, a flujo de 1 mL/mi yn buffer fosfato con trietilamina pH=2,5 (A) y metanol (MeOH) (B) como fases móviles según el gradiente que se muestra a continuación (Tabla 6):

<i>Tiempo (min)</i>	<i>%A</i>	<i>%B</i>
0-3	100	0
3-6	75	25
6-9	66	34
9-20	0	100
20-27	100	0

Tabla 6: gradiente sistema HPLC para el control de la PRQ del *fac*-[[^{99m}Tc]Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ y de **C1**

Finalmente, el precursor tricarbónico se neutraliza con una solución de fosfato diácido de sodio (NaH₂PO₄) 260 mg/ml.

4.2.3.1.2 Síntesis de **C1**

Técnica 1:

Se incubaba N-BOC-azidoalanina (**A**) (65µl solución 1×10^{-2} M), con etinilestradiol (**B**) (50µl solución 1×10^{-2} M), ascorbato de sodio (15µl solución 1×10^{-2} M) y acetato de cobre (7.5µl solución 1×10^{-2} M) durante una hora a 75°C, obteniéndose **L1-BOC**. Se añade ácido trifluoroacético (TFA) (25 µL-0,33 mmol) y se incubaba durante 1 hora a 75 °C. Finalizada la reacción se neutraliza con hidróxido de sodio (NaOH) 0,5 M y NaH_2PO_4 260 mg/ml. Posteriormente, se incubaba la solución de **L1** obtenida con 0,3 ml de solución neutralizada de *fac*- $[[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ (5-14 mCi), por 30 minutos a 75°C. Se controla la PRQ del complejo obtenido mediante HPLC empleando el sistema descrito en 4.2.3.1.1.

Técnica 2:

L1-BOC se incubaba (4 mg-0,0076 mmol, 200 µL de metanol) con TFA (25 µL-0,33 mmol) durante 1 hora a 75 °C. Finalizada la reacción se neutraliza con NaOH 0,5 M y NaH_2PO_4 260 mg/ml. Posteriormente, se añade 0,3 ml de *fac*- $[[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ neutralizado (5-14 mCi), se incubaba por 30 minutos a 75°C. Se controla la PRQ del complejo obtenido mediante HPLC empleando el sistema descrito en 4.2.3.1.1.

4.2.3.2 Síntesis del complejo de $[[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{V})\equiv\text{N L2}$ (**C2**)

4.2.3.2.1 Síntesis del core $[[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{V})\text{nitrido}]$

Se incubaban 5mg de dihidracida succínica disueltos en 0.5 mL de NaCl 0.9%, 0.1mL de SnCl_2 (solución 1mg/mL en H_2O) y $\text{Na}[[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_4$ (5-50 mCi en 0.5-1mL) a temperatura ambiente durante 20 minutos. La PRQ se controla por cromatografía en papel Whatman/acetona (Rf $[[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{V})\text{nitrido}]$: 0, Rf $\text{Na}[[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_4$: 1).

4.2.3.2.2 Síntesis de **C2**

Se disuelven 3 mg de **L2** en 300µL de metanol, se agregan 100µL de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc(V)}$ nitrido (5-14 mCi) y se incuba 30 minutos a 65°C. La PRQ es evaluada por HPLC fase reversa, utilizando una columna Waters C18 10µm de 30 cm, a flujo de 1 mL/min. Los disolventes utilizados son TFA 0.1% en agua (A) y TFA 0.1% en acetonitrilo (CH_3CN) (B) según el siguiente gradiente que se muestra a continuación (Tabla 7):

<i>Tiempo (min)</i>	<i>%A</i>	<i>%B</i>
0-3	100	0
3-22	0	100
22-24	100	0

Tabla 7: gradiente sistema HPLC para el control de la PRQ de **C2**

4.2.3.3 Síntesis del complejo de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc(III)}\text{NS}_3\text{L3}$ (**C3**)

4.2.3.3.1 Síntesis del precursor $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc(III)}\text{EDTA}$

Se disuelven 4 mg de manitol y 4 mg de EDTA en 0.5 mL de agua destilada libre de O_2 . Se agregan 0.1 mL de SnCl_2 (solución de 5mg en 5mL de agua destilada libre de O_2). Finalmente, se añade el $\text{Na}[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4$ (5-50 mCi en 0.5-2 mL) y se deja incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se controla la PRQ utilizando dos sistemas cromatográficos, Whatman/ Acetona (Rf 0: Coloide + precursor, Rf 1: $\text{Na}[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4$) y Whatman/ NaCl 0.9 % (Rf 0: coloide, Rf 1: $\text{Na}[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4$ y precursor).

4.2.3.3.2 Síntesis de **C3**

Se disuelven 1 mg de **L3** y 1 mg del coligando 2-[Bis (2-mercaptoetil) amino] etanotiol (NS_3) en 400 µL de metanol. Se adicionan 0,2 ml de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-EDTA}$

(1-5 mCi), se incubó por 30 minutos a 70 °C. El control de la PRQ se realiza por HPLC fase reversa utilizando una columna Waters C18 10µm de 30 cm a flujo de 1 mL/min. Los disolventes utilizados son TFA 0.1% en agua (A) y TFA 0.1% en acetonitrilo (B) según el gradiente es de 0-100% de B en los 20 minutos de corrida.

4.2.4 Síntesis del trazador [¹⁸F]F-FEET

4.2.4.1 Síntesis del trazador [¹⁸F]F-FEET partiendo de L6

El [¹⁸F]F⁻ (50-150mCi) fue obtenido como solución acuosa, se purificó por intercambio iónico utilizando un cartucho de intercambio iónico Sep-Pak® QMA Light, el cual se eluyó con una solución conteniendo K₂CO₃ y Kryptofix® 2.2.2. Se evaporaron los solventes a presión reducida con corriente de He gaseoso y calentando. Seguidamente se agregó una solución de L6 y se dejó reaccionar durante 20 minutos a 90°C. A continuación, se detallan las posiciones de los reactivos en el módulo automatizado de síntesis Synthra Research:

Posición

Vial A1	Carbonato de potasio (K ₂ CO ₃) (3.5 mg – 0.03 mmol) y Kryptofix® 2.2.2 (15 mg – 0.04 mmol) disueltos en 1mL de la mezcla CH ₃ CN:H ₂ O (9:1)
Vial A5	1 mL CH ₃ CN anhidro
Vial A3	L6 (1 mg – 0.002 mmol) disuelto en 1mL de CH ₃ CN anhidro

Tabla 8: Posiciones de carga del módulo automatizado de síntesis

El control de la PRQ se realiza por HPLC utilizando una columna Phenomenex C18 5µ ODS (1) 80 A (250x4.60) mm y un flujo de 1.5 mL/min. La elución se llevó a cabo con un gradiente con la fase móvil A: TFA 0.1% en agua y B: TFA 0.1% en CH₃CN, según el gradiente de la Tabla 9.

Tiempo (min)	%A	%B
0-10	100	0
10-15	10	90

Tabla 9: gradiente sistema HPLC para el control de la PRQ de [¹⁸F]F-FEET

4.2.4.2 Síntesis del trazador [¹⁸F]F-FEET partiendo de **M**

4.2.4.2.1 Síntesis del [¹⁸F]F-PRE-FEET

El [¹⁸F]F⁻ (228-533mCi) fue obtenido como solución acuosa, se purificó por intercambio iónico utilizando un cartucho de intercambio iónico Sep-Pak® QMA Light, el cual se eluyó con una solución conteniendo K₂CO₃ y Kryptofix® 2.2.2. Se evaporaron los solventes a presión reducida con corriente de He gaseoso y calentando. Seguidamente se agregó una solución de **M** y se dejó reaccionar durante 20 minutos a 90°C. A continuación, se detallan las posiciones de los reactivos en el módulo automatizado de síntesis Synthra Research:

Posición

Vial A1	Carbonato de potasio (K ₂ CO ₃) (3.5 mg – 0.03 mmol) y Kryptofix® 2.2.2 (15 mg – 0.04 mmol) disueltos en 1mL de la mezcla CH ₃ CN:H ₂ O (9:1)
Vial A5	2 mL CH ₃ CN anhidro
Vial A3	M (2 mg – 0.008 mmol) disuelto en 1mL de CH ₃ CN anhidro

Tabla 10: Posiciones de carga del módulo automatizado de síntesis

El control de la PRQ se realiza por HPLC utilizando una columna Phenomenex C18 5μ ODS (1) 80 A (250x4.60) mm y un flujo de 1.5 mL/min. La elución se llevó a cabo con un gradiente binario con la fase móvil A: TFA 0.1% en agua y B: TFA 0.1% en CH₃CN, según el gradiente de la Tabla 11.

Tiempo (min)	%A	%B
0-10	100	0
10-20	10	90

Tabla 11: gradiente sistema HPLC para el control de la PRQ de [¹⁸F]F-PRE-FEET

4.2.4.2.2 Síntesis manual del [¹⁸F]F-FEET – Reacción de Huisgen *in situ*

Se incuban durante 30 min a 80°C el [¹⁸F]F-PRE-FEET (0.0005 mmol, 1 eq), etinilestradiol (0.001mmol-2eq), solución de sulfato de cobre (CuSO₄) 0.45M (0.01 mmol-30eq) y solución de ascorbato de sodio 1.5M (0.05 mmol-100eq) en 300µL de metanol y 100µL de buffer fosfato pH=6 50mM. La purificación de la reacción *in situ* se realizó por extracción en fase sólida mediante un cartucho Sep-Pak® C18 Plus light. El control de la PRQ se realiza por HPLC utilizando una columna Phenomenex C18 5µ ODS (1) 80 A (250x4.60) mm y un flujo de 1.5 mL/min. La elución se llevó a cabo con un gradiente binario con la fase móvil A: TFA 0.1% en agua y B: TFA 0.1% en CH₃CN, según el gradiente de la Tabla 12.

Tiempo (min)	%A	%B
0-10	100	0
10-15	10	90

Tabla 12: gradiente sistema HPLC para el control de la PRQ de [¹⁸F]F-FEET

4.2.4.2.3 Síntesis del [¹⁸F]F-FEET en el modulo automatizado de síntesis

El [¹⁸F]F⁻ (228-533mCi) fue obtenido como solución acuosa, se purificó por intercambio iónico utilizando un cartucho de intercambio iónico Sep-Pak® QMA Light, el cual se eluyó con una solución conteniendo K₂CO₃ y Kryptofix® 2.2.2. Se evaporaron los solventes a presión reducida con corriente de He gaseoso y calentando. Seguidamente se agregó una solución de **M** y se dejó reaccionar durante 20 minutos a 90°C. La mezcla de reacción se transfirió al segundo reactor donde se da la reacción de Huisgen con etinilestradiol, CuSO₄ y ascorbato de sodio a 80°C por 30 min. La purificación se realizó por extracción en fase sólida mediante un cartucho Sep-Pak® C18 Plus light. A continuación, se detallan las posiciones de los reactivos en el módulo automatizado de síntesis Synthra Research:

Posición

Vial A1	Carbonato de potasio (K ₂ CO ₃) (3.5 mg – 0.03 mmol) y Kryptofix® 2.2.2 (15 mg – 0.04 mmol) disueltos en 1 mL de la mezcla CH ₃ CN:H ₂ O (9:1)
Vial A5	1 mL CH ₃ CN anhidro
Vial A3	M (2 mg – 0.008 mmol) disuelto en 1 mL de CH ₃ CN anhidro
Vial B1	Etinilestradiol (5 mg – 0.02 mmol) disuelto en 600µL de CH ₃ OH
Vial B2	CuSO ₄ 0.45M (533 µL– 0.24 mmol) en 100µL de buffer fosfato 50mM pH=6
Vial B3	Ascorbato de sodio 1.5M (533 µL– 0.80 mmol) en 100µL de buffer fosfato 50mM pH=6
Vial B4	1 mL CH ₃ OH
Vial C1	2 mL de NaCl 0.9%
Vial C2	1 mL Etanol
Vial C3	10 mL de NaCl 0.9%
Vial SPE 2	50 mL de H ₂ O
Vial del producto	7 mL de NaCl 0.9%

Tabla 13: Posiciones de carga del módulo automatizado de síntesis

El control de la PRQ se realiza por HPLC utilizando una columna Phenomenex C18 5µ ODS (1) 80 A (250x4.60) mm y un flujo de 1.5 mL/min. La elución se llevó a cabo con un gradiente binario con la fase móvil A: TFA 0.1% en agua y B: TFA 0.1% en CH₃CN, según el gradiente de la Tabla 14.

Tiempo (min)	%A	%B
0-10	100	0
10-15	10	90

Tabla 14: gradiente sistema HPLC para el control de la PRQ de [¹⁸F]F-FEET

4.2.5 Caracterización fisicoquímica de los trazadores

4.2.5.1 Estabilidad en el medio de reacción

Se incubaba el trazador en estudio a temperatura ambiente durante un período de 4 horas. Se extraen muestras a 1,2,3, y 4 horas post- marcado y se determina la PRQ utilizando las condiciones de HPLC optimizadas para cada uno de los trazadores.

4.2.5.2 Estabilidad en plasma

Se incubaba el trazador (100 µL) en estudio en plasma humano (1000 µL) a 37° C. Transcurridas 1, 2,3 y 4 horas se extraen muestras de 200 µL, se precipitan las proteínas por agregado de etanol absoluto frío (200 µL, -15°C), seguida de incubación a -20 °C durante 5 minutos. Se centrifuga la muestra a 100 g (5 minutos, 0° C) y se controla la PRQ del sobrenadante mediante HPLC, utilizando las mismas condiciones en las que fue evaluada la PRQ para cada caso.

4.2.5.3 Lipofilicidad

La lipofilicidad es estudiada a pH 7.4 a través de la determinación del coeficiente de partición octanol/buffer fosfato 0.1M (log P_{o/w}). En un tubo de centrifuga se mezclan 2 mL de octanol y 1.9 mL de buffer fosfato 0.1 M pH=7.4). Se adiciona el trazador a estudiar (100 µL) y se agita en vortex durante 2 minutos. La mezcla es centrifugada por 5 minutos a una velocidad de 5000 rpm. Se toman 2 alícuotas de cada fase (100 µL) y se mide la actividad de cada una de ellas en un contador de centelleo sólido. Se realizan 3 repeticiones de cada experiencia. La lipofilicidad se calcula como:

$$\log P_{o/w} = \left(\frac{\text{cuentas fase orgánica}}{\text{cuentas en fase acuosa}} \right)$$

4.2.5.4 Unión a proteínas plasmáticas

La unión a proteínas plasmáticas (UPP) es determinada mediante exclusión molecular utilizando columnas ilustra MicroSpin G-50 (GE Healthcare, Estados Unidos). Para ello, se incubó un blanco (475 uL de agua destilada + 25 uL del trazador) y una muestra (475 uL de plasma humano + 25 uL del trazador) a 37°C durante 30 y 60 minutos. Transcurrido el tiempo estipulado el buffer de conservación de las columnas es extraído mediante centrifugación durante 1 minuto a 716g y 25uL del blanco o la muestra son sembrados en la columna y centrifugados durante 1 minuto a 716g. Se mide la actividad eluída y retenida en la columna en un contador de centelleo sólido. La UPP se calcula como:

$$UPP_{\text{muestra}} = \left(\frac{\text{cuentas fase eluída}}{\text{cuentas en fase eluída} + \text{cuentas en fase retenida}} \right) \times 100$$

$$UPP_{\text{blanco}} = \left(\frac{\text{cuentas fase eluída}}{\text{cuentas en fase eluída} + \text{cuentas en fase retenida}} \right) \times 100$$

$$UPP_{\text{trazador}} = UPP_{\text{muestra}} - UPP_{\text{blanco}}$$

4.2.6 Evaluación biológica *in vitro* de los trazadores

Para la evaluación biológica *in vitro* de los trazadores se utiliza la línea celular adherente MCF-7 (ATCC® HTB-22TM, Estados Unidos) correspondiente a un adenocarcinoma mamario humano. Las células se cultivan en frascos T-75 (Greiner bio-one, Sigma Aldrich, Estados Unidos) con medio DMEM (A1316, 9050 PanReac AppliChem ITW Reagents, Alemania) suplementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco, ThermoFisher Scientific, Estados Unidos), penicilina 100 U mL⁻¹ (Sigma Aldrich, Estados Unidos) y estreptomina 100 µg mL⁻¹ (Sigma Aldrich, Estados Unidos) a 37 °C y 5% de CO₂.

4.2.6.1 Ensayo de unión

Se incuban las células (monocapa, 1×10^6 células por frasco T-75) con el trazador en estudio (10 μCi , 20 μCi , 50 μCi y 80-100 μCi) durante 1 hora a 37°C y 5% de CO_2 . Transcurrido el tiempo de incubación, se retira el medio de cultivo, se lavan las células dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (10mL) y se tratan con tripsina-EDTA (3 mL, 5 minutos de incubación a 37°C y 5% de CO_2). Se mide la actividad en el sobrenadante (12 mL de medio de cultivo + 20ml de PBS) y la actividad en las células en un contador de centelleo sólido. La unión para cada actividad de trazador se calcula como:

$$\% \text{ Unión} = \left(\frac{\text{cuentas netas en las células}}{\text{cuentas netas en las células} + \text{cuentas netas en el sobrenadante}} \right) \times 100$$

4.2.6.2 Ensayo de unión dependiente del tiempo

Se incuban las células (monocapa, 1×10^6 células por frasco T-75) con el trazador en estudio (con la actividad que presentó mayor % de unión en el ensayo anterior) durante el tiempo estipulado (1,2 y 4 horas para los trazadores de $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}$ y 30 min, 1 hora y 2 horas para el trazador de $[^{18}\text{F}]\text{F}$) a 37°C y 5% de CO_2 . Transcurrido el tiempo de incubación, se retira el medio de cultivo, se lavan las células dos veces con PBS (10mL) y se tratan con tripsina-EDTA (3 mL, 5 minutos de incubación a 37°C y 5% de CO_2). Se mide la actividad en el sobrenadante (12 mL de medio de cultivo + 20ml de PBS) y la actividad en las células en un contador de centelleo sólido. La unión para cada tiempo se calcula como:

$$\% \text{ Unión} = \left(\frac{\text{cuentas netas en las células}}{\text{cuentas netas en las células} + \text{cuentas netas en el sobrenadante}} \right) \times 100$$

4.2.6.3 Ensayo de eflujo

Se incuban las células (monocapa, 1×10^6 células por frasco T-75) con el trazador en estudio (con la actividad que presentó mayor % de unión) durante una hora a 37°C y 5% de CO_2 . Transcurrido el tiempo de incubación, se retira el medio de cultivo el cual se descarta, se lavan las células dos veces con PBS (10mL) descartando estos lavados. Se añade nuevo medio de cultivo (12 mL) y se reincuban las células durante el tiempo estipulado (1,2 y 4 horas para los trazadores de $^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc y 30 min, 1 hora y 2 horas para el trazador de ^{18}F]F). Transcurrido el tiempo correspondiente, se retira medio de cultivo, se lavan dos veces con PBS (10mL) y se tratan con tripsina-EDTA (3 mL, 5 minutos de incubación a 37°C y 5% de CO_2). Se mide la actividad en el sobrenadante (12 mL de medio de cultivo + 20ml de PBS) y la actividad unida a células. El eflujo se expresa como el porcentaje de actividad originalmente absorbida por células que difunde fuera de las células y se recupera en el sobrenadante. El % de eflujo se calcula como se muestra a continuación:

$$\% \text{ Eflujo} = \left(\frac{\text{cuentas netas en las células}}{\text{cuentas netas en las células} + \text{cuentas netas en el sobrenadante}} \right) \times 100$$

4.2.6.4 Ensayo de competencia

Se incuban las células (monocapa, 1×10^6 células por frasco T-75) con concentraciones crecientes del agente competitivo (de 10 a 100 veces más de ligando) y con una cantidad fija del trazador (con la actividad que presentó mayor % de unión) durante una hora a 37°C y 5% de CO_2 . Transcurrido el tiempo de incubación, se retira el medio de cultivo, se lavan las células dos veces con PBS (10mL) y se tratan con tripsina-EDTA (3 mL, 5 minutos de incubación a 37°C y 5% de CO_2). Se mide la actividad en el sobrenadante (12 mL de medio de cultivo + 20ml de PBS) y la actividad en las células en un contador de centelleo sólido. La unión para cada concentración de agente competitivo se calcula como:

$$\% \text{ Unión} = \left(\frac{\text{cuentas netas en las células}}{\text{cuentas netas en las células} + \text{cuentas netas en el sobrenadante}} \right) \times 100$$

4.2.6.5 Ensayo de internalización

Se incuban las células (monocapa, pocillos de 3.5 cm de diámetro) con una cantidad fija del trazador (con la actividad que presentó mayor % de unión) y con una cantidad fija del agente bloqueante (40 veces más de ligando) durante 30 min, 1 hora y 2 horas a 37°C y 5% de CO₂. Transcurridos los tiempos de incubación, se extrae el sobrenadante, se lavan las células con PBS (2mL) y se agrega 1mL de glicina fría 0,05M / 0,1M NaCl, pH=2,8 (4°C). Se deja actuar 5 minutos, posteriormente se extrae el buffer glicina y se colecta dicho contenido en un tubo que corresponde al radiotrazador unido a membrana (U). Se repite este procedimiento 2 veces y se miden las muestras en un contador de centelleo sólido obteniendo U por triplicado. Posteriormente, se lavan las células con PBS (2mL), se tratan con 1mL de NaOH 0.1 N y se extrae el NaOH a un tubo que corresponde al radiotrazador internalizado (I). Se repite este procedimiento 2 veces y se miden las muestras en un contador de centelleo sólido obteniendo I por triplicado. Para medir la actividad total (T) se coloca en un tubo 3mL de NaCl 0.9% y la misma cantidad de trazador utilizada para el ensayo. El % de unión a membrana y el % de Internalización se calculan como se muestra a continuación

$$\% \text{ Internalización} = \left(\frac{I}{T} \right) \times 100$$

$$\% \text{ Unión a membrana} = \left(\frac{U}{T} \right) \times 100$$

4.2.7 Docking Molecular

Para realizar el estudio computacional se utiliza el programa Molecular Operating Environment (MOE) versión 2014.09. Para el modelado y minimización de las estructuras tanto de los trazadores como del estradiol se empleó el campo de fuerza MMFF94X, considerando un gradiente de 0.001(unidades) y un cut off de 8-10. Con estas estructuras minimizadas se elabora una base de datos. Se busca el blanco biológico (RE) en el Protein Data Bank (PDB) , siendo 1QKU (resolución de 3.2 Å y tiene el estradiol como ligando) el más adecuado para este ensayo. Se procede a borrar las moléculas de agua de la estructura proteica y se protona la misma (Protonate 3D, T=310 pH=7.4 Conc=0.152 mol/L, cut off=15,

solvent 80, dielectric 2). Se elimina la molécula de estradiol del RE y se minimiza la estructura utilizando AMBER99 y gradiente 0.05 (unidades). Se seleccionan 3 sitios de unión al receptor utilizando coordenadas denominadas esferas alfa. Se corre el docking molecular con un Placement Alpha triangle, un rescoring 1 Affinity dG, y un retain 50.

4.2.8 Evaluación *in vivo* de los trazadores

Los estudios en animales se realizaron cumpliendo las normas vigentes sobre manejo de animales de experimentación (Ordenanza sobre el uso de animales de experimentación, docencia e investigación universitaria). Los protocolos utilizados en el trabajo de esta tesis han sido previamente aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la CHEA (Comisión Honoraria de Experimentación Animal) para las biodistribuciones en animales normales, o por el Comité de Ética de CUDIM (Centro Uruguayo de Imagenología Molecular), según corresponda.

4.2.8.1 Biodistribución en animales normales

La caracterización biológica de los trazadores fue realizada en ratas Wistar normales hembras de 2-3 meses de edad. Los animales son adquiridos en la Unidad de Reactivos y Biomodelos de experimentación de la facultad de Medicina (URBE).

Los estudios de biodistribución se realizan inyectando **C2** (11-50 μ Ci) por vía intravenosa (3 animales por tiempo) y transcurrido el tiempo de biodistribución establecido (30 minutos, 1 hora y 2 horas post-inyección) los animales son anestesiados con tiopental (6mg por animal) y sacrificados por tracción cervical. Los órganos, tejidos y muestras de interés son extraídos, pesados y su actividad medida en un contador de centelleo sólido.

4.2.8.2 Biodistribución en animales con tumor

Las biodistribuciones en animales con tumor se realizan en ratones *Mus musculus*, Cepa: J:Nu-Foxn^{l_{nu}} Homocigota hembras. Los tumores son inducidos por la inoculación de una suspensión de células MCF-7 (3×10^6) en Geltrex (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos): solución salina tamponada con fosfato (50:50) por vía subcutánea en el flanco izquierdo de los ratones (4-6 semanas de edad). El crecimiento del tumor es estimulado por la aplicación diaria de gel dérmico que contiene estradiol (Oestrogel Servimedica), hasta la semana anterior a la biodistribución. Después de 30 a 45 días, los tumores tienen un tamaño adecuado y los animales son inyectados con **C2** (15-40 μ Ci) por vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola. Transcurrido el tiempo de biodistribución establecido (60 min) los animales son sacrificados por tracción cervical. Los órganos, tejidos y muestras de interés son extraídos, pesados y su actividad medida en un contador de centelleo sólido

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Síntesis de los ligandos

5.1.1 17 [ácido Boc-2-amino-3-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl) propanoico] estradiol (**L1-BOC**)

El ligando 1 (**L1**) posee una parte activa derivada del estradiol y átomos donadores de electrones (el nitrógeno del triazol, el grupo amino y el hidoxilo de ácido carboxílico) que coordinarán con el [^{99m}Tc]Tc a través del core tricarbónico (Figura 57).

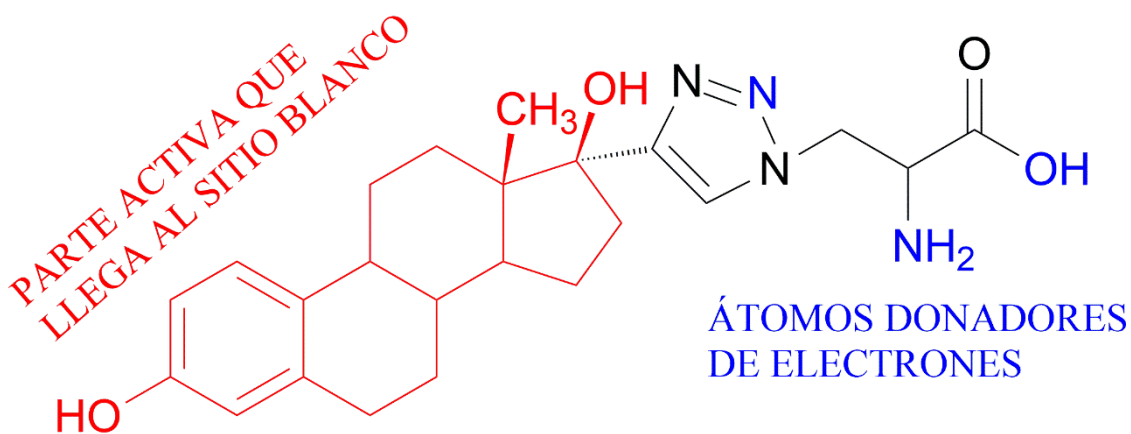


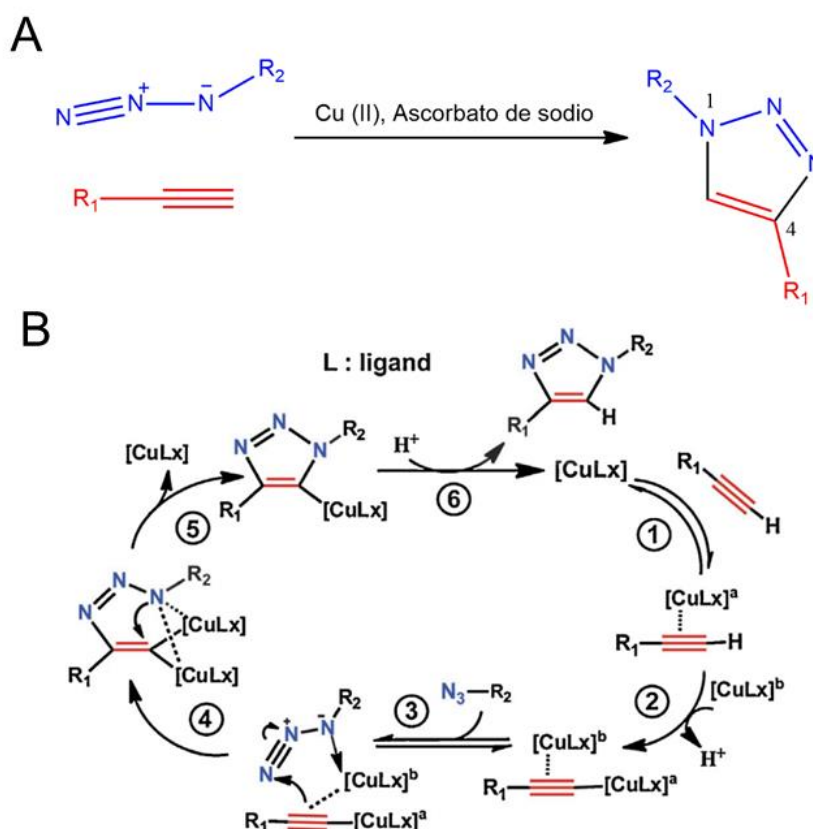
Figura 57: Estructura de **L1**

Para su obtención se planteó una reacción de Huisgen, del tipo de reacciones llamadas “Click Chemistry”. Este término fue utilizado por primera vez en 2001 por Kolb *et al.* [123] del grupo de Sharpless refiriéndose a reacciones orgánicas ideales para la formación de enlaces carbono-heretoátomo. Estas reacciones permiten la conexión de dos moléculas o bloques de construcción de manera fácil, rápida, bajo condiciones suaves, con alto rendimiento, de manera robusta, quimio y estereoselectiva, económica y segura desde el punto de vista ambiental [123-127].

En 2002 Rostovtsev *et al.* [128] del grupo de Sharpless y Tornøe *et al.* [129]. publicaron al mismo tiempo una modificación de la cicloadición de Huisgen, una cicloadición [3+2] que se produce entre un alquino terminal y una azida, resultando en la formación solo 1,2,3-triazoles 1,4 disustituidos (Figura 58-A).

Este tipo de reacciones se conoce como CuAAC ya que son catalizadas por cobre (I), que se genera "in situ" mediante la reducción por ascorbato de sodio de sales de Cu (II) [124,128,129]

Inicialmente Sharpless y colaboradores plantearon un mecanismo de reacción escalonado que involucra un intermediario mononuclear de Cu-acetiluro. Estudios más recientes confirman que dos centros metálicos de Cu están involucrados en el mecanismo de reacción, demostrando que la complejación del alquino por un segundo centro metálico reduce la energía de activación y mejora la reactividad del alquino disminuyendo la densidad de electrones sp en los átomos de carbono facilitando el ataque de azidas [130,131]. El mecanismo de reacción se esquematiza en la Figura 58-B y consta de 6 pasos para llegar al triazol 1,4 disustituido de interés.



B-Imagen tomada del paper Changlong Wang. et al. Coordination chemistry Reviews. 2016; 316:1-20

Figura 58: A- esquema de la cicloadición [3+2] de Huisgen. B-mecanismo de reacción de la reacción de Huisgen catalizada por Cu (I).

El primer uso de las reacciones del tipo CuAAC en Radiofarmacia fue publicado por Kolb. et al [132] y Marik. et al. [133]. Ese mismo año Mindt *et al.* [134] reportaron el primer ejemplo de aplicación de las reacciones CuAAC para radionucleidos metálicos. En su enfoque, este tipo de reacciones se empleó para la síntesis de sistemas de ligandos tridentados para la complejación del $[[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3^-]$ mientras se conjugan simultáneamente a biomoléculas de interés [124,132,133,134].

En general la preparación de biomoléculas que contengan sistemas quelantes tridentados para posterior coordinación con radiometales requiere de síntesis de varios pasos y a menudo estas reacciones carecen de eficiencia y selectividad debido a reacciones cruzadas. En este sentido, la eficiencia de las reacciones CuAAC junto con la facilidad de introducir restos de alquinos y azidas en moléculas mediante métodos sintéticos o bioquímicos proporciona una solución para la obtención de biomoléculas que posean quelantes tridentados [124].

En la Figura 59 se muestra un esquema de las posibilidades existentes siendo R la biomolécula de interés. En la Figura 59-A se puede ver la reacción de biomoléculas funcionalizadas con azidas con agentes bidentados que tienen la función alquino terminal generando sistemas de ligandos tridentados que contienen el triazol 1,4 disustituido, los llamados ligandos de click regulares. En la Figura 59-B la biomolécula posee un alquino y el agente bidentado un grupo azida generando ligandos de click inverso. En ambos casos los ligandos son aptos para coordinarse con sistemas $[\text{M}(\text{CO})_3]^+$, donde M puede ser Tc o Re, destacándose que en el caso de los ligandos click regulares la coordinación se da a través del nitrógeno en la posición 3 del triazol, mientras que para los ligandos click inversos la coordinación se da por el nitrógeno en posición 2 del heterociclo [124].

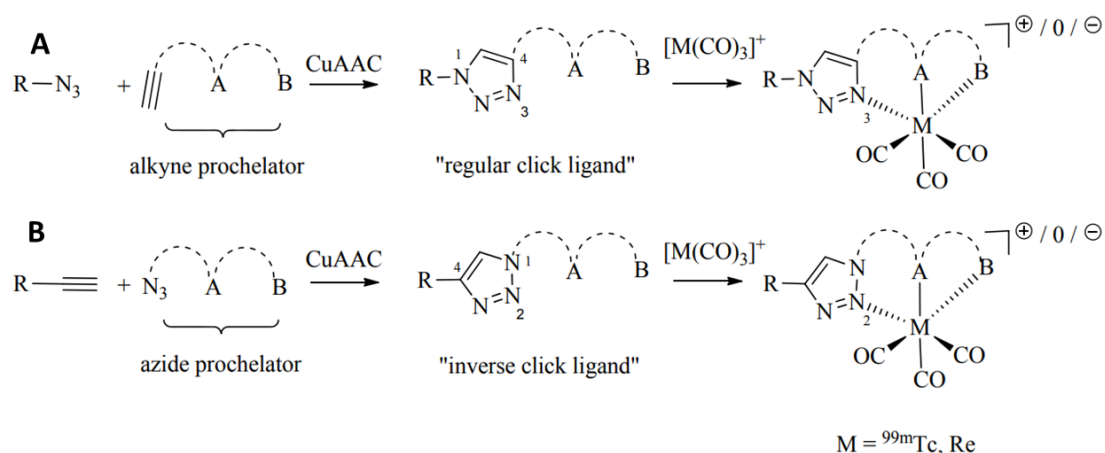
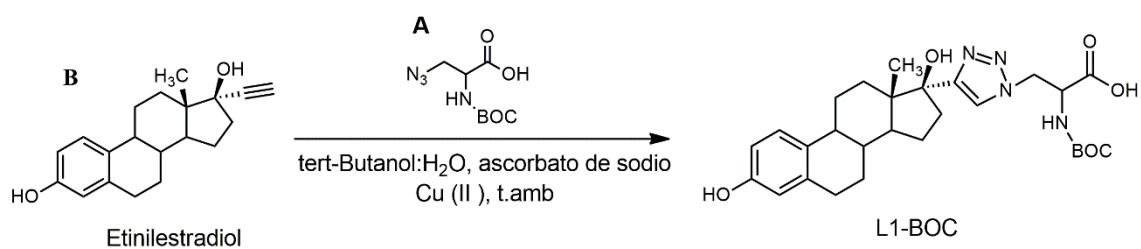


Imagen tomada del paper Christiane A. Kluba y Thomas L. Mindt. *Molecules*. 2013;18:3206-3226

Figura 59: A formación de ligandos click regulares, B formación de ligandos click inverso

La síntesis de **L1-BOC** (Esquema sintético 1) fue realizada mediante una cicloadición "3+2" entre el alquino terminal del etinilestradiol (B) y un azida comercial, la N-BOC-azidoalanina (A). La reacción fue catalizada por Cu(I) generando el triazol 1,4 disustituído necesario para que el nitrógeno del triazol junto con el grupo amino e hidroxilo del agente bidentado coordinen a posterior con el radiometal seleccionado [134,35,36].



Esquema sintético 1: Síntesis de **L1-BOC**

La reacción se realizó incubando a temperatura ambiente, en atmosfera de nitrógeno por 6 días y utilizando una mezcla *tert*-butanol:H₂O como disolventes de reacción. Al finalizar la reacción se realizaron extracciones con acetato de etilo ya el producto de interés es afín por la fase orgánica, mientras que la mayor

parte del ascorbato de sodio y de Cu(II) son afines por la fase acuosa. El Cu(I) se reparte entre ambas fases. La presencia de Cu(I), de ascorbato de sodio y de Cu (II) en el extracto orgánico pueden explicar los rendimientos mayores al 100% obtenidos. Dicho extracto no se purificó ya que las impurezas no interfieren en la etapa de marcación con $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$.

El producto obtenido fue caracterizado por MS y RMN (^1H RMN, ^{13}C RMN, COSY, HSQC, HMBC, DEPT135).

En la Figura 60 se muestra el espectro de masa obtenido mediante ESI-EM (Ionización por Electro spray) en modo negativo. El espectro muestra un ion que tiene una relación m/z de 525 y corresponde al **L1-BOC** (M⁻). Además, hay un fragmento de $m/z=427$ que corresponde a la pérdida del grupo protector BOC.

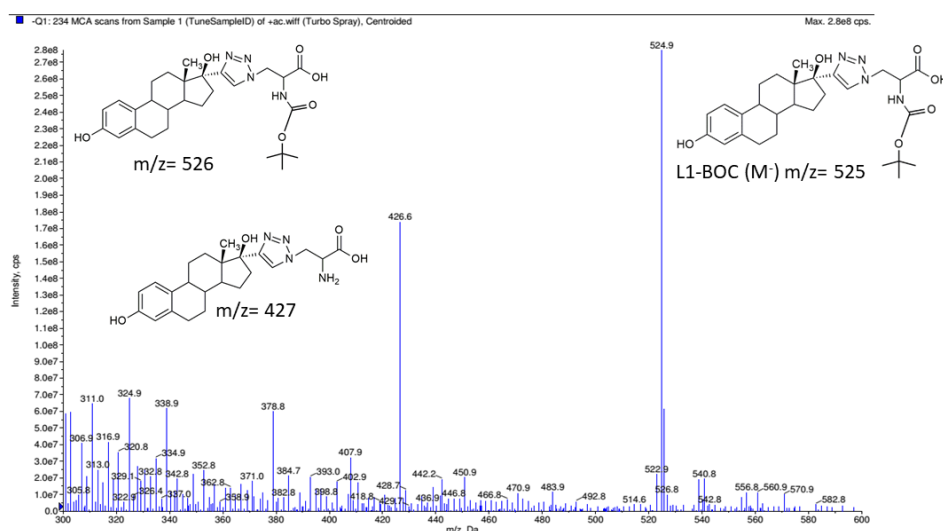


Figura 60: Espectro de Masas de **L1-BOC**

Con el fin de comprender el espectro de RMN obtenido para **L1-BOC** se analizó en primer lugar el espectro de ^1H -RMN del etinilestradiol por ser el reactivo de partida.

La Figura 61 muestra el espectro de ^1H -RMN del etinilestradiol. En dicho espectro se asignó en primera instancia la zona entre $\delta=6.5$ y 8 ppm identificándose tres señales correspondientes a los 3 protones aromáticos de la molécula (H1, H2 y H3). Por otro lado, se identificó la señal del grupo metilo CH_3 , un singlete que integra 3 protones, con un desplazamiento químico de $\delta=0.88$

ppm, como es de esperar para protones metílicos del tipo $\text{CH}_3\text{-C}$, ya que son protones que se encuentran en un carbono de hibridación sp^3 con un 25% de carácter s y por tanto más blindados. Sabiendo que los protones acetilénicos aparecen entre $\delta=2\text{-}3$ ppm en los espectros, se identificó un singulete, que integra un protón, con un desplazamiento químico de $\delta=2.91$ ppm correspondiente al hidrogeno del grupo alquino terminal (H22). Además, se identificaron los protones H4 y H5 mediante el cálculo teórico por la regla de Shoolery a $\delta=2.79$ ppm.

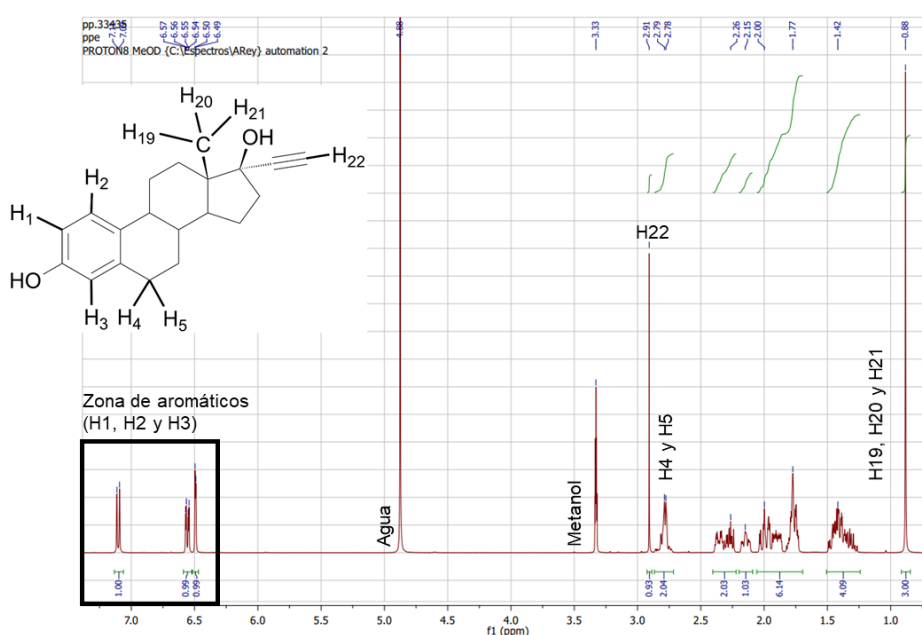


Figura 61: el espectro de ^1H -RMN del etinilestradiol

La Figura 62 muestra el estudio bidimensional de Correlated Spectroscopy (COSY) del etinilestradiol, en el que pueden apreciarse que las señales pertenecientes a los protones aromáticos acoplan entre sí, la señal correspondiente al protón del triple enlace terminal (H22) no acopla con ningún otro protón al igual que la señal correspondiente al CH_3 (H19, H20 y H21). En cambio, la señal de H4 y H5 acopla con otras dos señales, identificando entonces las posibles señales correspondientes a H6 y H7.

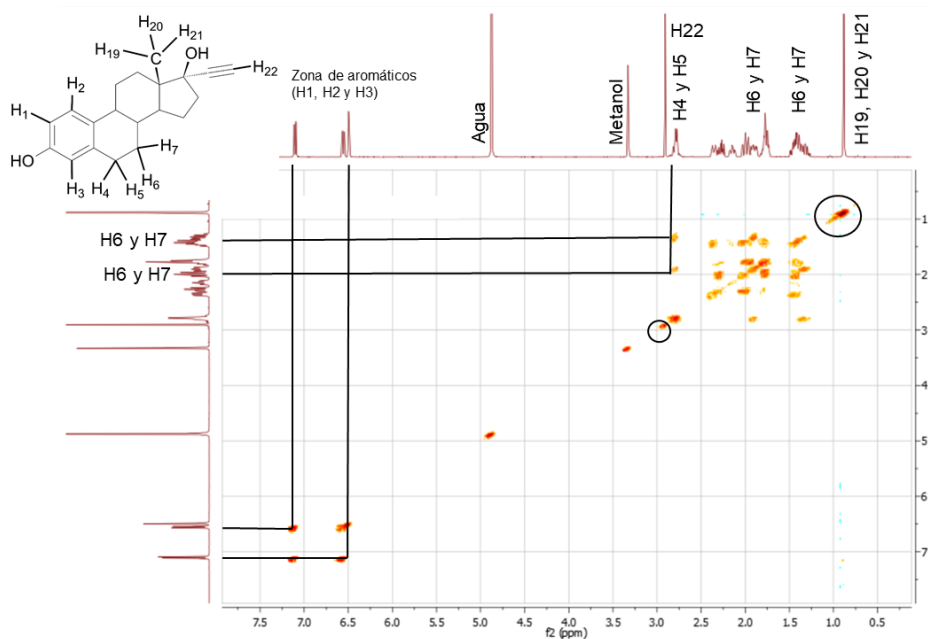


Figura 62: Estudio de COSY para el etinilestradiol

H1 fue identificado sin dificultad en la zona de protones aromáticos ya que es el único doblete de doblete que acopla con dos protones H2 y H3 (Figura 63). Las J para esta señal son 2.7 (meta) y 8,4 (orto). Para la señal que se encuentra en $\delta=7.11-7.09$ ppm el cálculo de J dio un valor de 8,4 correspondiente a un acoplamiento orto, por lo que esta señal corresponde a H2. Para la señal que se encuentra en $\delta=6.49-6.48$ ppm la constante J dio 2.6, correspondiente a un acoplamiento meta, por lo que esta señal corresponde a H3.

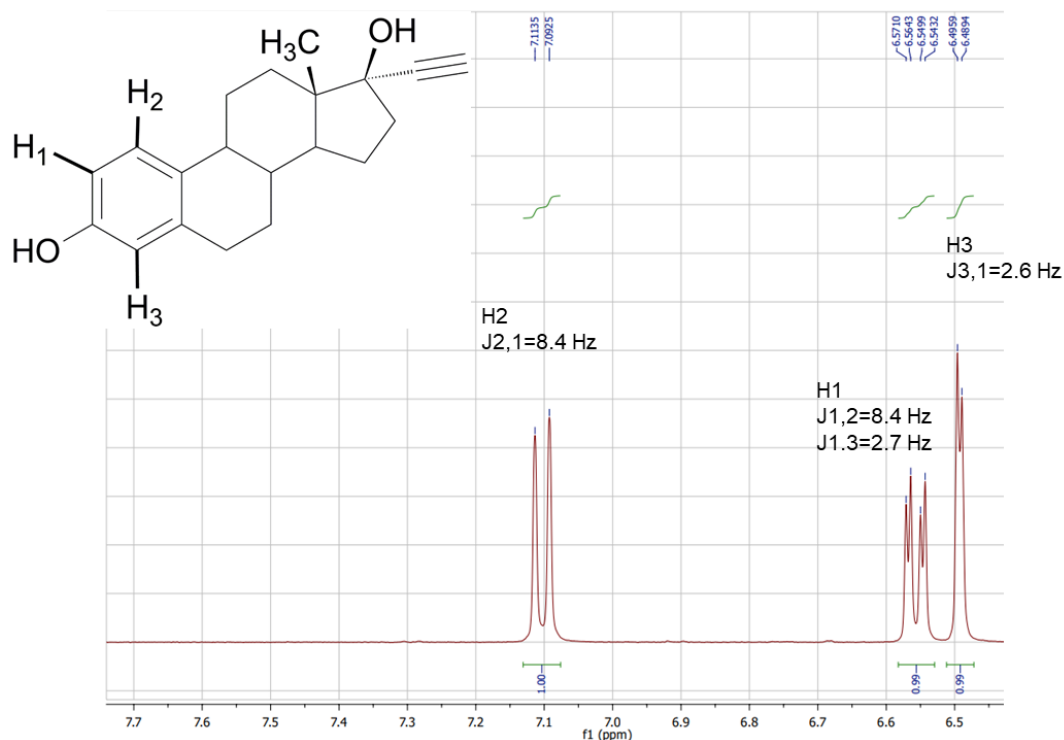


Figura 63: Asignación de señales en la zona de aromáticos

Con el estudio bidimensional Heteronuclear Simple Quantum Coherence (HSQC) se asignaron los primeros carbonos unidos a protones previamente asignados (Figura 64). El HSQC es un experimento que permite la detección de protones que están conectados directamente con carbonos. Las señales correspondientes a CH_2 se verán en rojo y las correspondientes a CH y CH_3 se verán en azul. Es así que la señal en $\delta=11.94$ ppm corresponde al carbono unido al grupo metilo que tiene los protones H19, H20 y H21 y el carbono en $\delta=29.34$ ppm corresponde al carbono unido a los protones H4 y H5. Fue posible además identificar todos los carbonos aromáticos cuyo desplazamiento se encuentra entre 90-170 ppm. El carbono de H1 se encuentra en $\delta=112.38$ ppm, el carbono de H2 en $\delta=114.65$ ppm y el carbono de H3 en $\delta=125.86$ ppm. Las señales en $\delta=137.42$ y $\delta=131.08$ ppm corresponden a carbonos aromáticos (C-Ar) que no tiene unido ningún protón y la señal en $\delta=154.57$ ppm corresponde al carbono aromático unido al grupo OH, por ser la señal menos blindada (C-OH-Ar). Además, pueden identificarse 3 carbonos en $\delta=87.43$, $\delta=78.98$ y $\delta=73.55$ ppm que no tienen ninguna señal en el HSQC, por lo que no tienen protones asociados. Estos son los tres carbonos cuaternarios que posee la molécula (CC,CC, C-OH).

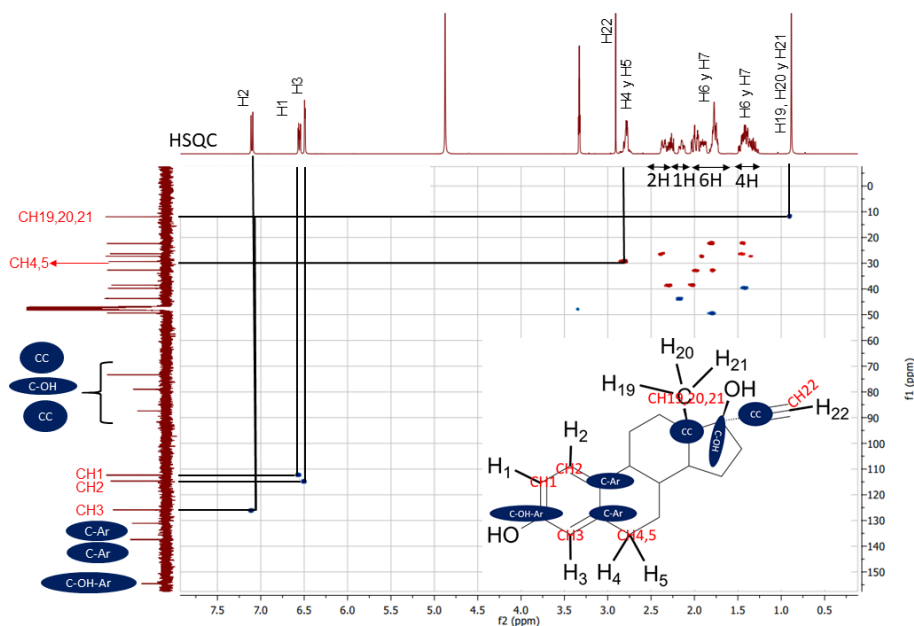


Figura 64: Asignación de los primeros carbonos

El estudio bidimensional Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMBC) es un experimento de detección de protones que muestra los carbonos que se encuentran a 2 o 3 enlaces de distancia de los correspondientes protones. En este tipo de estudios no todas las correlaciones aparecerán, y tampoco con la misma intensidad. Normalmente las señales correspondientes a acoplamiento a 3 enlaces de distancia son más grandes que aquellas a dos enlaces. En la Figura 65 se muestra el HMBC del etinilestradiol en la zona donde salen los protones aromáticos. En la misma puede verse que H2 acopla a tres enlaces con un carbono aromático y a 3 enlaces con el carbono a $\delta=154.57$ ppm, correspondiente al carbono aromático unido al grupo OH. También H2 acopla con otro carbono a $\delta=38.51$ ppm en la zona de C-CH₂-C (de 15 a 45 ppm) aun sin asignar, por lo que se asume que ese carbono corresponde al carbono unido al protón 9 y que acopla a 3 enlaces con H2. En la Figura 66 se muestra el estudio de HSQC permitiendo asignar la señal correspondiente a H9 que es un multiplete que integra 1 protón en $\delta=2.15$ ppm.

En la Figura 65 podemos ver que el protón H1 acopla a dos enlaces con el carbono del protón H2. El protón H3 acopla a 3 enlaces con el carbono en $\delta=29.34$ ppm, correspondiente al carbono unido a los protones 4 y 5 y además acopla a tres enlaces con el carbono del protón 1 y con el carbono aromático en

$\delta=131.08$ ppm. Los protones H1 y H3 acoplan ambos con un carbono aromático en $\delta=131.08$ ppm, por lo que se supone que este carbono es el que está contiguo al carbono de H2.

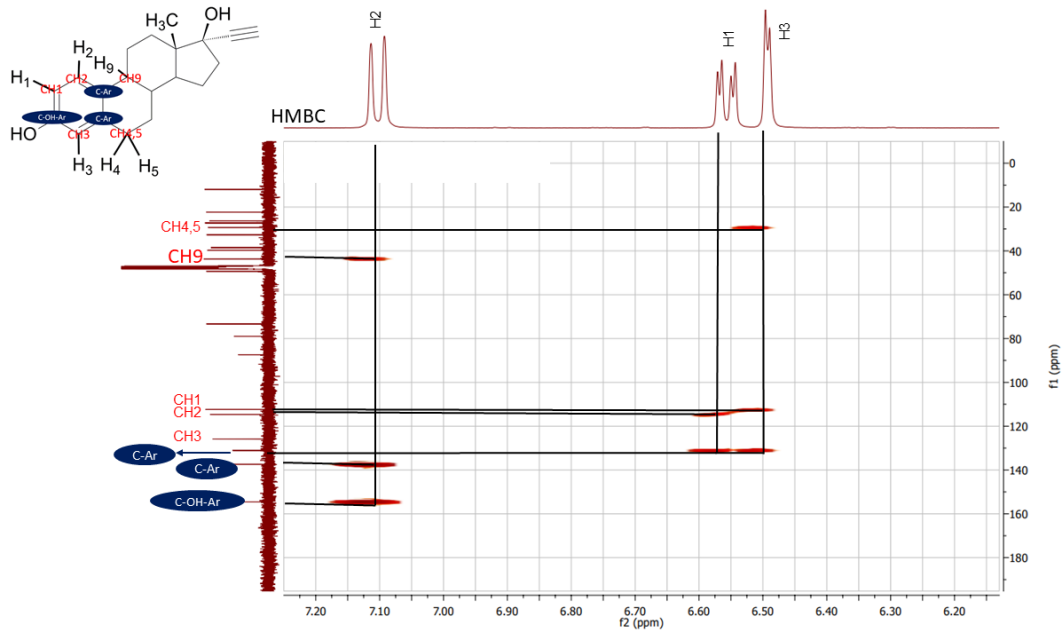


Figura 65: Estudio HMBC de la zona de los aromáticos

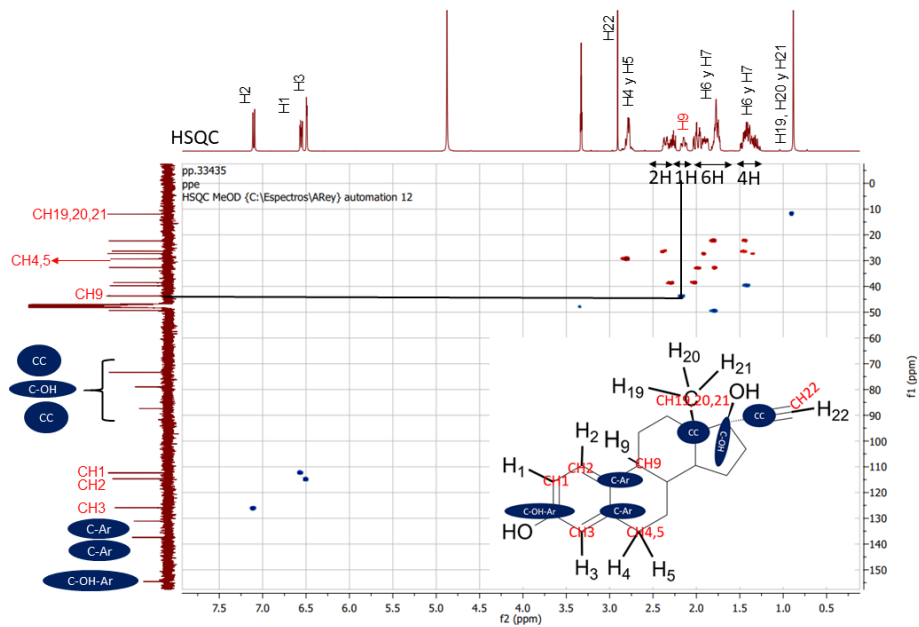


Figura 66: Estudio HSQC, asignación de H9

Si se observa el estudio de HMBC en la Figura 67 se puede apreciar que H22 y H19, H20 y H21 acoplan a tres enlaces con un mismo carbono, que es el carbono unido a OH que se encuentra al lado del triple enlace terminal. Por otro lado, los protones del grupo metilo acoplan con dos carbonos, uno a $\delta=49,36$ ppm y otro a $\delta=32.66$ ppm. Teniendo en cuenta la estructura de la molécula se puede deducir que los carbonos que pueden acoplar a tres enlaces con los metilos son el CH14 y el CH12,13. Si observamos el estudio HSQC de la Figura 68 podemos apreciar que la relación entre la señal del carbono de $\delta=49.36$ ppm y la señal del protón (multiplete en 1,77 ppm que integra 6H) es de color azul o sea que corresponde a un CH, por lo que la única posibilidad es que ese carbono sea el carbono de H14. Asimismo, la señal entre el carbono en $\delta=32.66$ ppm y el multiplete en $\delta=1.77$ es de color rojo o sea que corresponde a un CH₂, por lo que este carbono es el CH12,13.

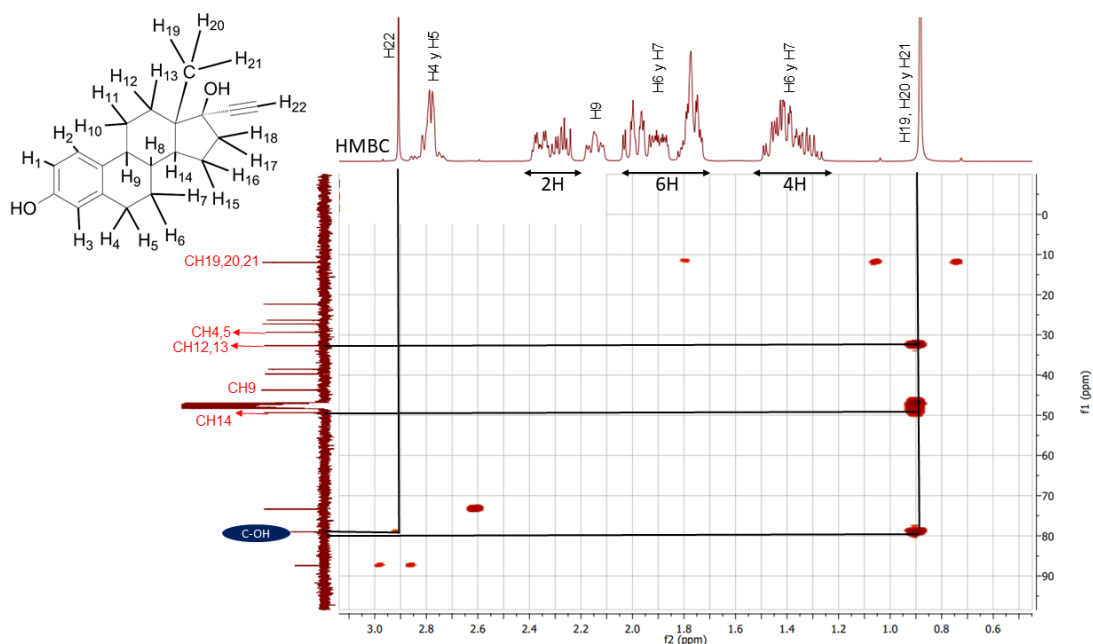


Figura 67: Estudio HMBC, asignación de C H12,13 y CH14

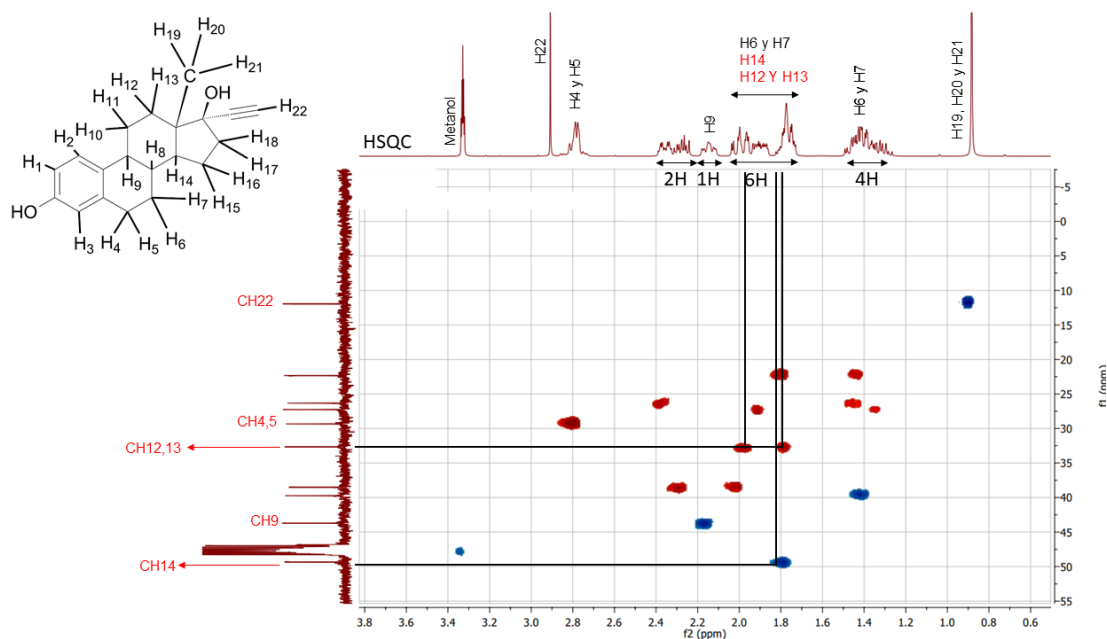


Figura 68: Estudio HSQC, asignación de protones H12,13 y H14

En la Figura 69 se muestra que el protón del triple enlace terminal H22 acopla con uno de los carbonos cuaternarios ($\delta=87.43$ ppm). Este carbono corresponde al que está junto al triple enlace. Por ende, el otro carbono cuaternario que aparece en $\delta=73.55$ es el que se encuentra al lado del grupo metilo. Conociendo esto vemos en la Figura 70 que el carbono en $\delta=87.43$ ppm acopla con un multiplete que se encuentra en $\delta=2.26$ ppm e integra 2H, estos dos protones son H17 y H18. Al conocer esto y observando el estudio de HSQC de la Figura 71 identificamos el carbono de H17 y H18 en $\delta=26.31$ ppm.

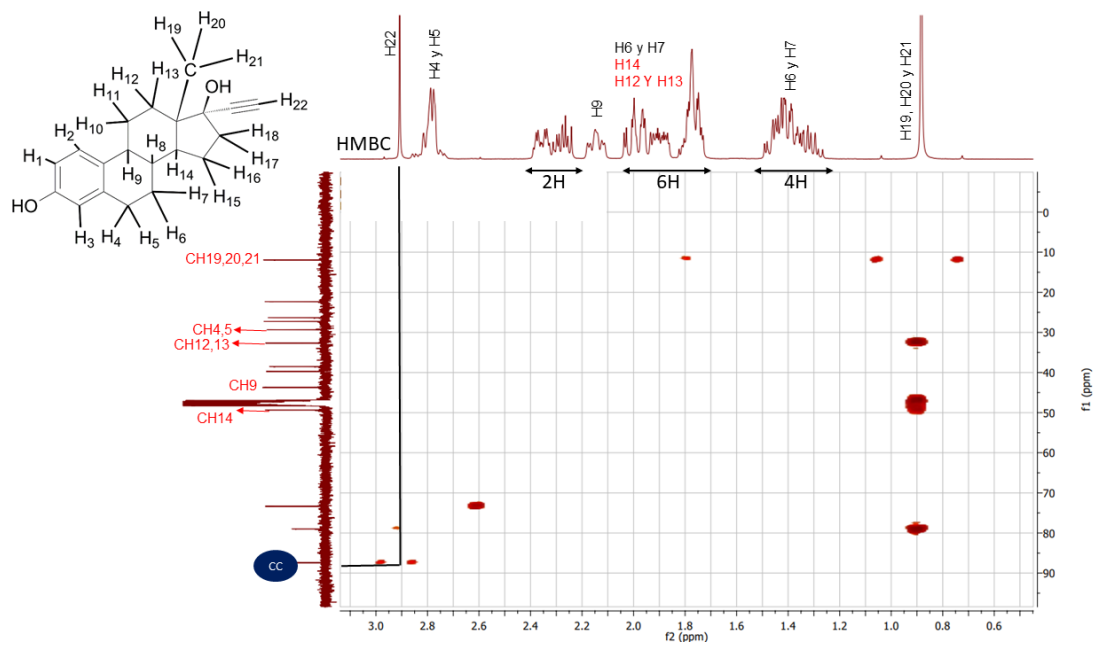


Figura 69: Estudio HMBC, acoplamiento entre el carbono de 87.43 ppm y H22

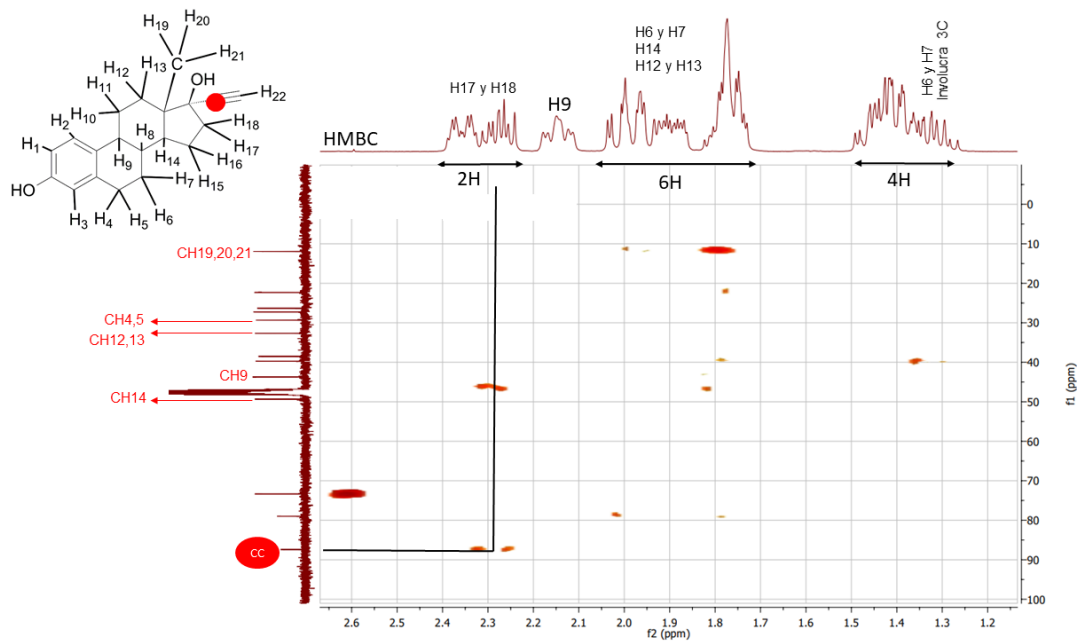


Figura 70: Estudio HMBC, acoplamiento entre el carbono de 87.43 ppm y señal en 2.26 ppm

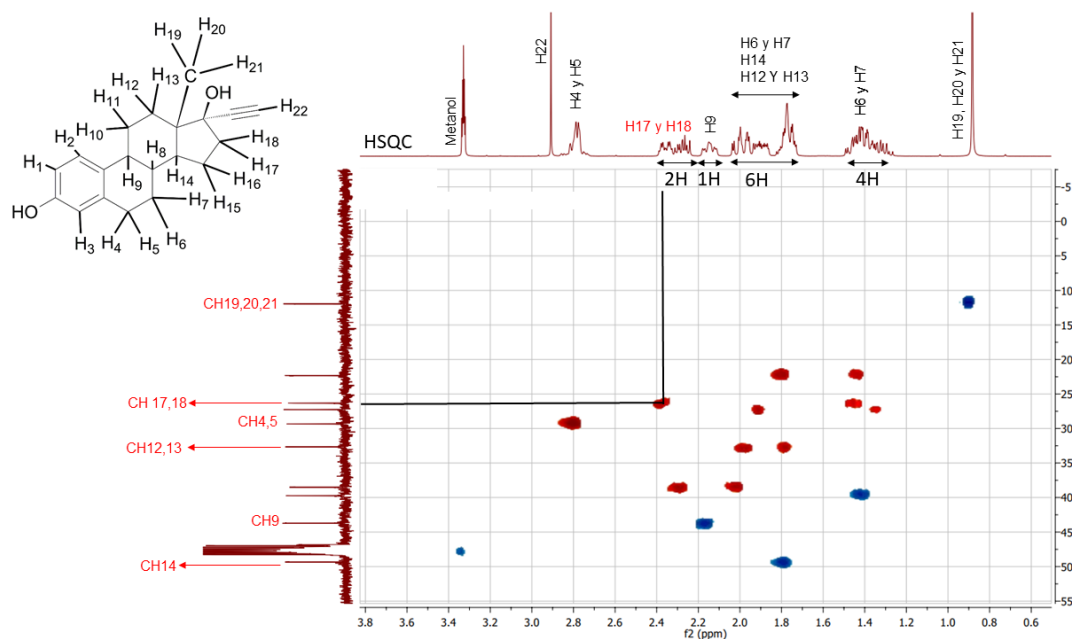


Figura 71: Estudio HSQC, identificación del carbono de H17 y H18

Al estudiar nuevamente el HSQC (Figura 72) no es posible asignar los 5 carbonos restantes. Se observó que el carbono en $\delta=22,33$ ppm acopla con la señal en $\delta=1.77$ y $\delta=1.42$ ppm, al igual que el carbono en $\delta=27.76$ ppm. Los carbonos en $\delta=39.73$ y $\delta=38.51$ acoplan con la señal en $\delta=1.42$ ppm (color azul), por lo que esa señal corresponde a el protón H8, que es el único CH que queda por asignar. En la Figura 73 se muestra el RMN de protón y como queda la asignación de los protones que faltan asignar.

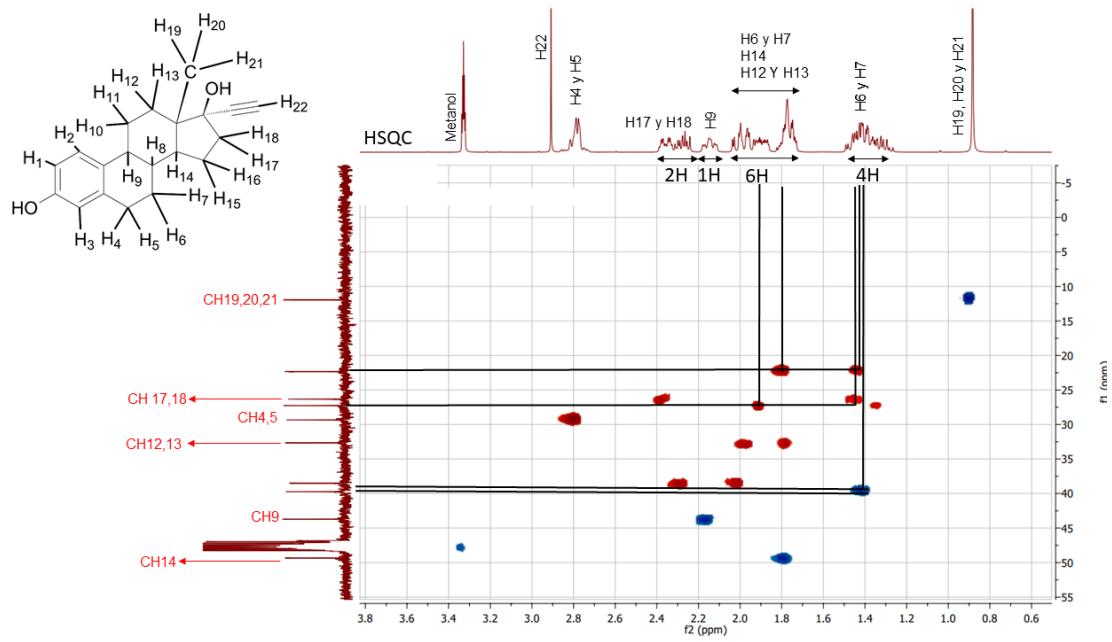


Figura 72: HSQC, últimos carbonos por asignar

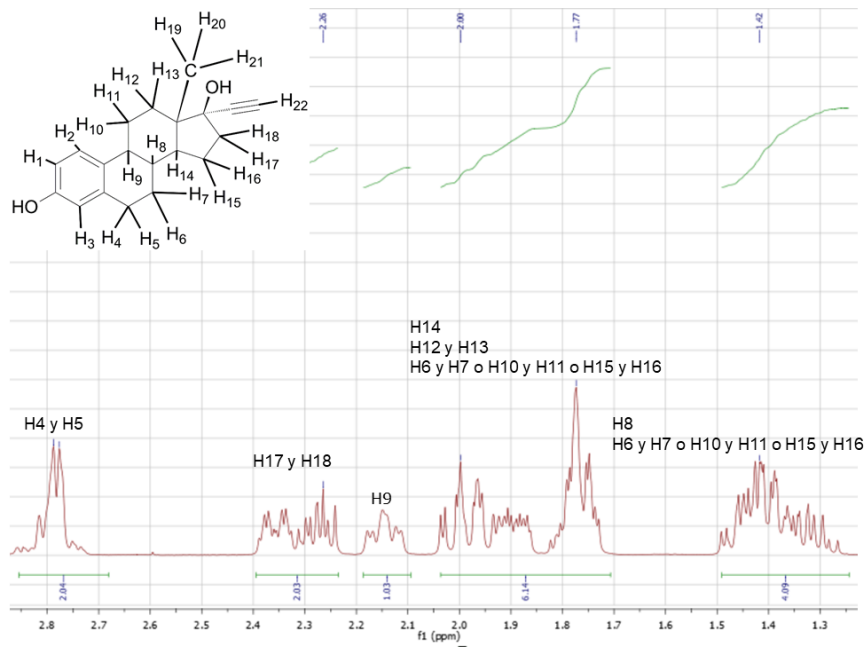


Figura 73: RMN de protón en la zona de CH y CH₂

A continuación, se detallan los RMN de ^1H y ^{13}C con las señales asignadas para el etinilestradiol que es el reactivo de partida y se empleará en el análisis de todo el resto de los compuestos sintetizados:

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 7.1 (H2, d, 1H), 6.56 (H1, dd, 1H), 6.50 (H3, d, 1H), 2.91 (H22, s, 1H), 2.79 (H4 y H5, m, 2H), 2.26 (H17 y H18, m, 2H), 2.15 (H9, m, 1H), 1.77 (H14, H12 y H13, H6, H7 o H10, H11 o H15, H16, m, 6H), 1.42 (H8, H6, H7 o H10, H11 o H15, H16, m, 4H), 0.88 (H19, H20 y H21, s, 3H).

^{13}C RMN (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 154.57 (C-OH-Aromático), 137.3 (C-Aromático), 131.1 (C-Aromático), 125.9 (C- H_3), 114.7 (CH2), 112.4 (CH1), 87.4 (carbono del triple enlace), 79.0 (C-OH), 74.0 (C- CH_3), 49.4 (CH14), 46.9, 43.7 (CH9), 39.7, 38.5, 32.7 (CH12,13), 29.3 (CH4,5), 27.8, 26.3 (CH17,18), 22.3, 11.5 (CH19,20,21).

Ya estudiado el RMN del etinilestradiol, se procedió a evaluar el RMN de **L1-BOC** mostrado en la Figura 74. La forma general del espectro se mantiene, incorporando tres nuevas señales en $\delta=7.76$ ppm, $\delta=4.70$ ppm y $\delta=1.38$ ppm y perdiendo dos señales una en $\delta=2.26$ y otra en $\delta=2.91$ ppm. Como se mencionó anteriormente en el espectro aparece un singulete que integra 1 protón a $\delta=7.76$ ppm, señal que no se encuentra presente en el espectro de etinilestradiol y que corresponde según bibliografía (H del Imidazol sale entre 7.71 y 7.14 ppm) y la experiencia del grupo, al protón del triazol, el H22. Esto indica que la reacción entre la N-BOC-azidoalanina y el etinilestradiol generó el triazol correspondiente de acuerdo con lo esperado. Como en el caso del etinilestradiol, H1 fue identificado sin dificultad a $\delta=6.50$ ppm, ya que es el único doblete de doblete que acopla con dos protones H2 y H3, siendo las constantes de acoplamiento J para estas señales de 2,1 (meta) y 8,2 (orto). Para la señal que se encuentra en $\delta=6.45$ ppm la constante de acoplamiento J arrojó un valor de 2,4, correspondiente a un acoplamiento meta, por lo que esta señal corresponde a H3. Para la señal que se encuentra en $\delta=6.96$ -6.98 ppm el cálculo de la constante de acoplamiento J dio 8,6, un valor correspondiente a un acoplamiento orto asumiendo que esta señal corresponde al protón H2. Fue posible identificar la señal del grupo metilo CH_3 (H19, H20 y H21), un singulete que integra 3 protones, con un desplazamiento químico de $\delta=1.03$ ppm. Asimismo, se identificó una

señal con $\delta=1.38$ ppm que corresponde a los protones metílicos del grupo protector BOC, los protones H26-H34. También se asignaron los protones H4 y H5 a $\delta=2.76$ ppm. Esta señal es un multiplete que integra 3 protones y parece tener un singulete en su interior a 2.70 ppm.

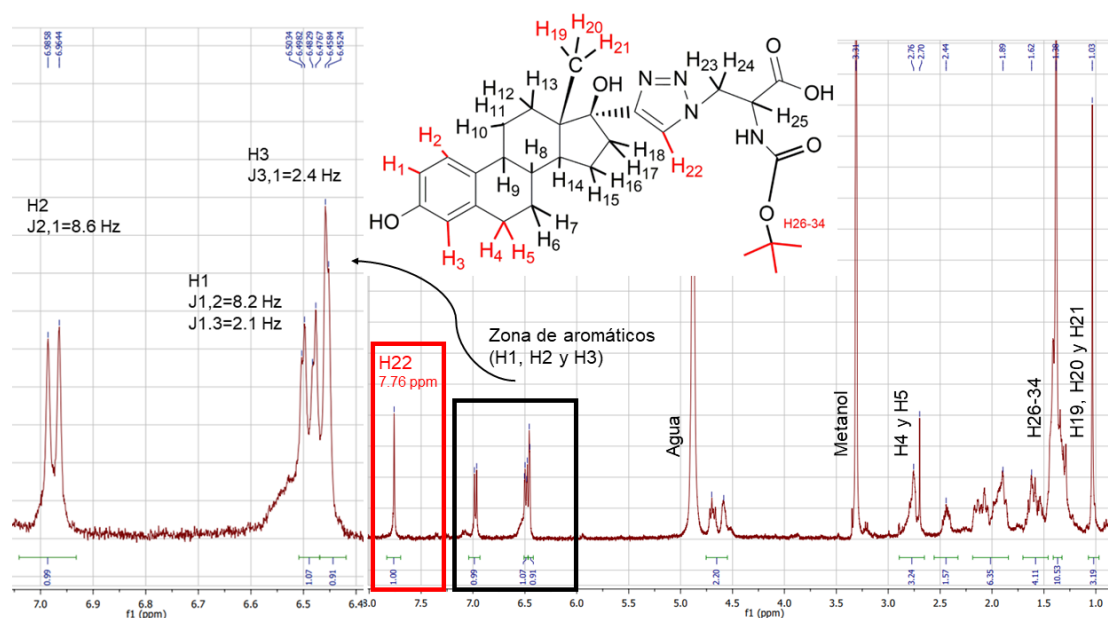


Figura 74: Espectro de ¹H-RMN de L1-BOC

La Figura 75 muestra el estudio de COSY del L1-BOC. En el mismo puede apreciarse que las señales pertenecientes a los protones aromáticos acoplan entre sí, la señal correspondiente al protón del triazol (H22) no acopla con ningún otro protón, al igual que la señal correspondiente al CH₃ (H19, H20 y H21). También puede observarse que la señal con desplazamiento químico de 4.7 ppm no acopla con ningún otro protón. En cambio, la señal de H4 y H5 a $\delta=2.76$ ppm acopla con otras dos señales, identificándose como las señales correspondientes a H6 y H7.

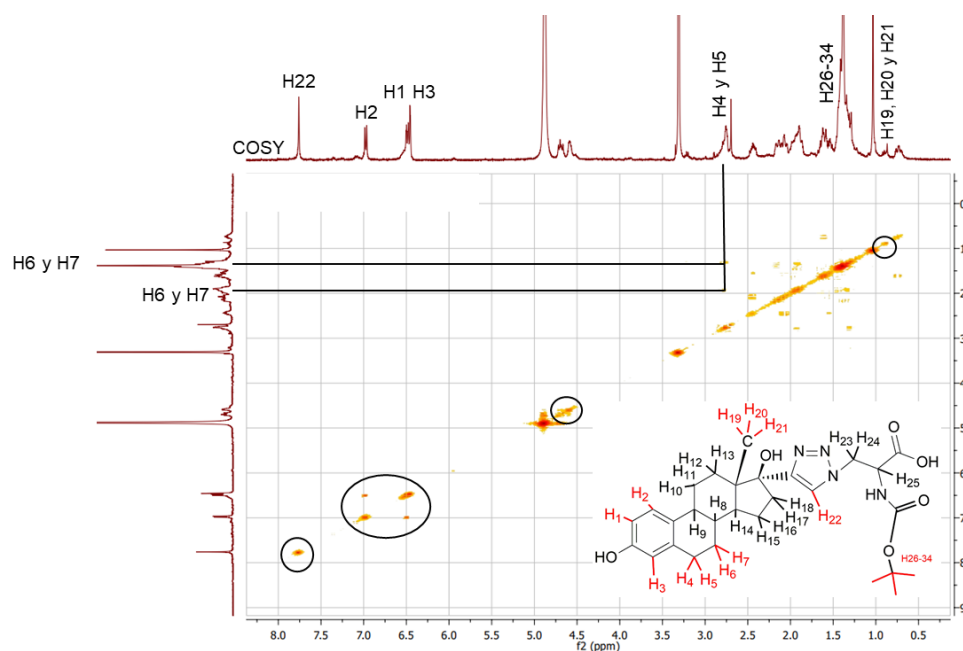


Figura 75: Estudio de COSY de **L1-BOC**

Con el estudio de HSQC se asignaron los primeros carbonos unidos a protones asignados previamente (Figura 76). El carbono de H1 se encuentra en $\delta=112.25$ ppm, el carbono de H2 en $\delta=125.72$ ppm, el carbono de H3 en $\delta=114.62$ ppm y el carbono de H22 en $\delta=123.25$ ppm. Las señales en $\delta=137.42$ y $\delta=131.14$ ppm coinciden con señales presentes en el etinilestradiol y corresponden a carbonos aromáticos (C-Ar) que no tienen unido ningún protón. La señal en $\delta=154.47$ ppm también coincide con el RMN del etinilestradiol y corresponde al carbono aromático unido a el grupo OH (C-OH-Ar).

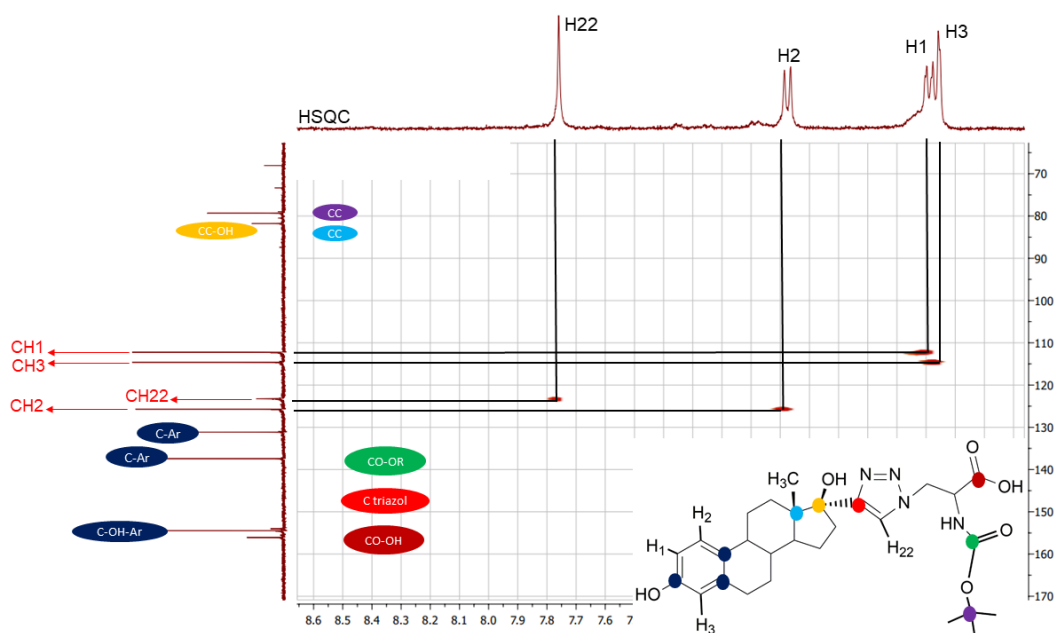


Figura 76: Estudio de HSQC, identificando los primeros carbonos de **L1-BOC**

En el RMN de carbono aparece una señal a $\delta=208.68$ ppm (Figura 77). Es la señal menos blindada del espectro, por lo que se asume que es el carbono del ácido carboxílico (bordo). Además, según bibliografía estos carbonos aparecen entre 155 y 185 ppm.

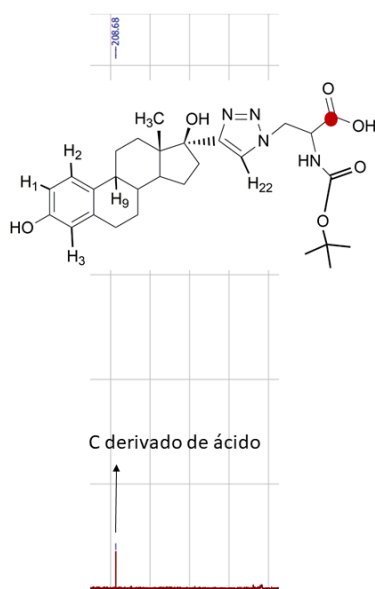


Figura 77: Asignación del carbono del ácido carboxílico

En la Figura 78 se muestra el estudio de HMBC entre 6.4 y 7.8 ppm. Allí puede verse que H22 acopla a dos enlaces con un carbono a $\delta=154.01$ ppm que corresponde al carbono del triazol (rojo). También se observa que H2 acopla con

el carbono aromático en $\delta=137.42$ ppm y a 3 enlaces con el carbono aromático unido a OH en $\delta=154.47$ ppm. H2 acopla también con otro carbono que aparece a $\delta=43.40$ ppm, en la zona de C-CH₂-C (de 15 a 45 ppm), por lo que se asume que corresponde al carbono que tiene el protón 9 y que acopla a 3 enlaces con H2. H1 y H3 acoplan con el mismo carbono aromático en $\delta=131.14$ ppm, por lo que este carbono corresponde al contiguo al carbono de H2. Por ende, el carbono en $\delta=137.42$ acopla a 3 enlaces con H2 y es el contiguo al carbono de H3. El carbono que aparece en $\delta=156.08$ ppm es el carbono del grupo éster (verde) ya que los carbonos de esteres presentan desplazamientos químicos entre 150-190 ppm.

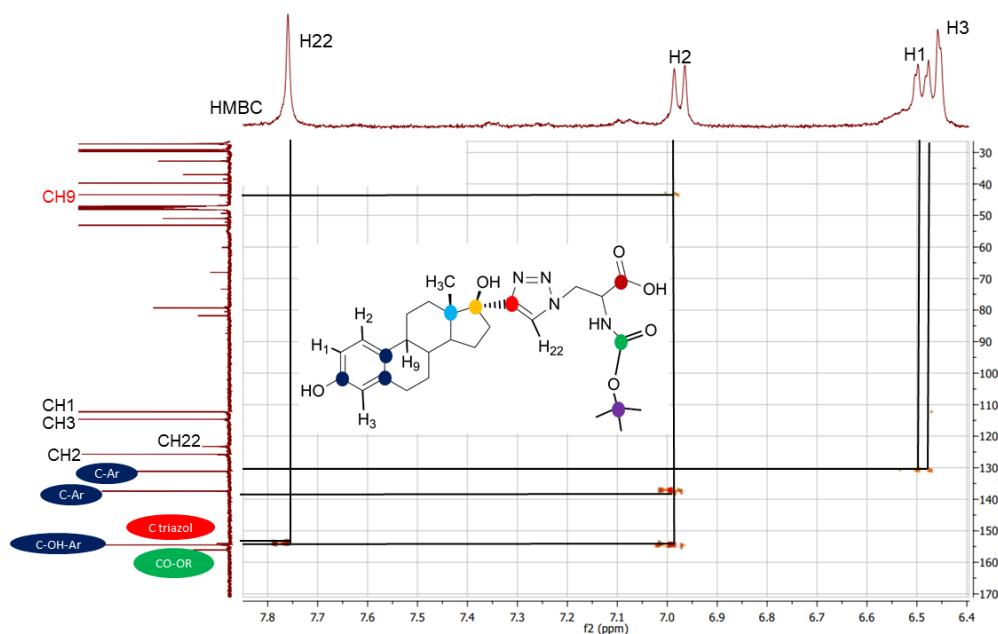


Figura 78: Estudio de HMBC, identificando los primeros carbonos de **L1-BOC**

La Figura 79 muestra el estudio de HSQC de 0.6 a 5 ppm. En primer lugar, fue posible identificar el carbono metílico de los protones H19,20,21 que se encuentra en $\delta=13.50$ ppm y es la más blindada de las señales. Conociendo que el carbono de H9 se encuentra en 43.40 ppm, fue posible identificar H9, este forma parte de la señal que integra 6 protones a los $\delta=1.89$ ppm. Por último, conociendo que los protones H4 y H5 salen en $\delta=2.76$ ppm se pudo asignar el carbono de estos protones que tiene un desplazamiento químico de 29.36 ppm. Para **L1-BOC** se realizó un estudio de DEPT 135 que identifica los diferentes tipos de carbono, los carbonos tipo CH y CH₃ se muestran como señales

negativas en el espectro, mientras que los carbonos tipo CH₂ se muestran como señales positivas en el espectro. Es así que el carbono de H19,20,21 y el carbono de H9 aparecen como señales negativas en el espectro y el carbono de H4,5 aparece como señal positiva en el espectro corroborando el estudio realizado en el HSQC de la Figura 79.

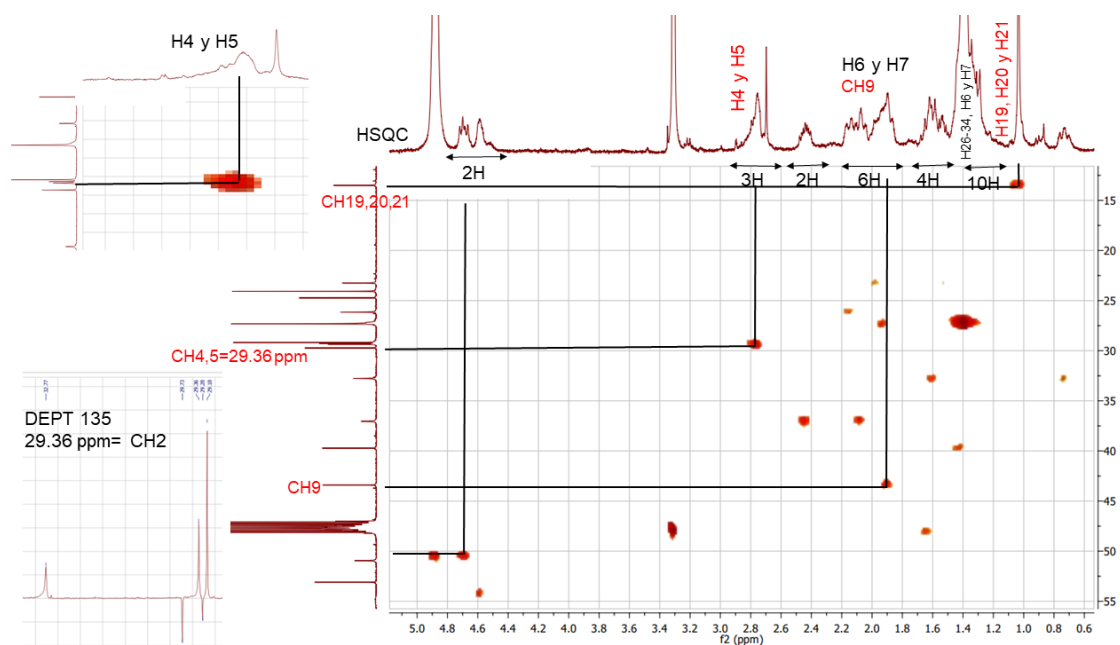


Figura 79: Estudio de HSQC de 0.6 a 5.0 ppm.

En el estudio de HMBC de la Figura 80 se puede observar que la señal de los protones H19,20,21 acopla a tres enlaces con un carbono que se encuentra a los $\delta=81.78$ ppm, confirmando que es el carbono (naranja) del ciclo de 5 miembros que está unido a un grupo OH. Por otro lado, los protones del grupo metilo acoplan con dos carbonos, uno a 47,00 ppm y otro a 32.76 ppm. De acuerdo con la estructura de la molécula, los carbonos que pueden acoplar a tres enlaces con los hidrógenos del CH₃ son el CH14 y el CH12,13. Si observamos el estudio de DEPT 135 la señal de 47 ppm no aparece, pero la señal de 32.76 es una señal positiva confirmando que se trata de un CH₂ y por ende es el carbono de los protones 12,13. La otra señal en 47 ppm corresponde al carbono de H14. La señal en 1.38 ppm acopla con un carbono que se encuentra a los 79.32 ppm. Dicho carbono es el que une los tres grupos metilos y forma parte del éster del grupo protector (violeta). Esto concuerda con las predicciones teóricas realizadas que indican que este tipo de carbonos se encuentran a los 79.5 ppm. El carbono que no está unido a protón que resta

asignar es el carbono que aparece en 68.05 ppm que corresponde al carbono unido al grupo metilo (celeste).

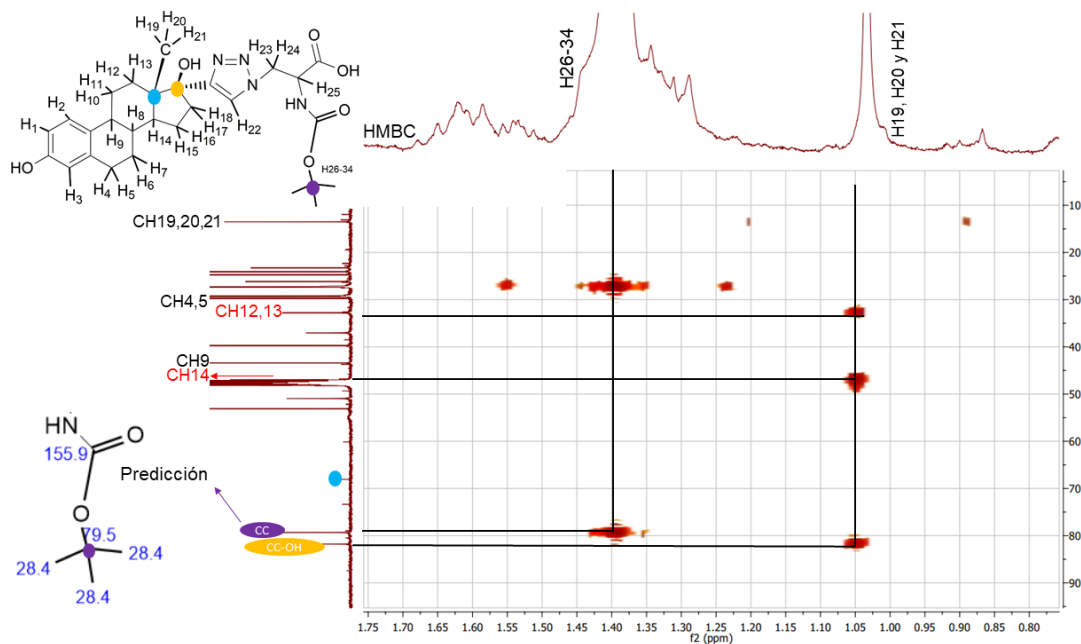


Figura 80: Estudio de HMBC de 0.8 a 1.75 ppm

Habiendo asignado los carbonos de H14 y H12,13 con el estudio de HSQC de la Figura 81 se observó que en el espectro de protón estos carbonos corresponden al multiplete que integra 4 protones en 1.62 ppm.

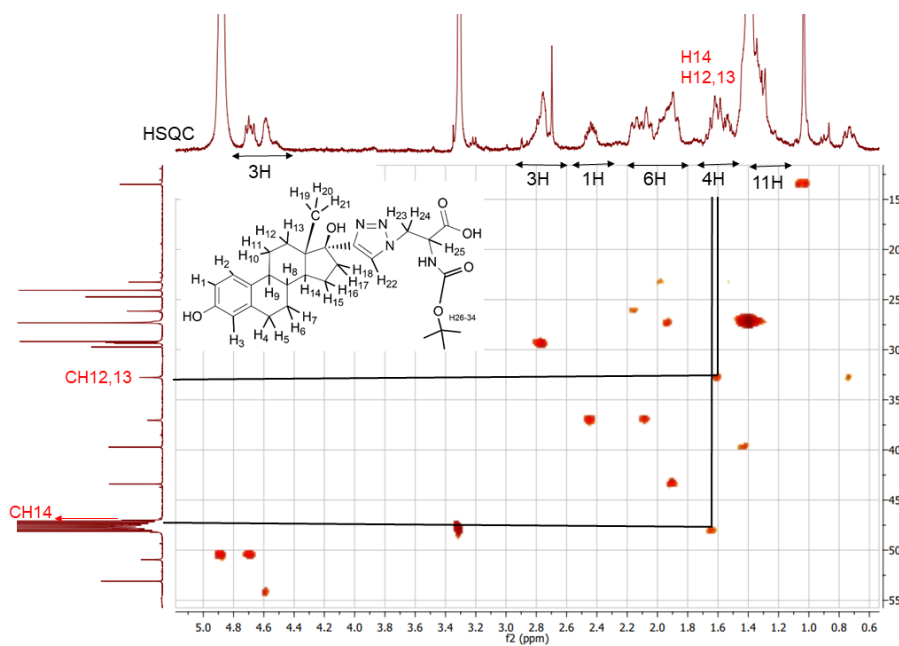


Figura 81: Estudio de HSQC, asignando los protones H14,12,13

El estudio de HMBC de la Figura 82 muestra que el carbono del triazol (rojo) a $\delta=154.01$ ppm acopla con la señal del RMN de protón con desplazamiento de 2.44 ppm que integra 2 protones. El carbono del triazol puede acoplar a tres enlaces con los protones H17,18, por lo que se consideró que la señal en $\delta=2.44$ ppm corresponde a estos protones. Gracias al estudio de HSQC que se muestra en la misma Figura pudo identificarse el carbono de H17,18 que tiene un desplazamiento químico de 37.04 ppm y que en el DEPT 135 es una señal del tipo CH₂.

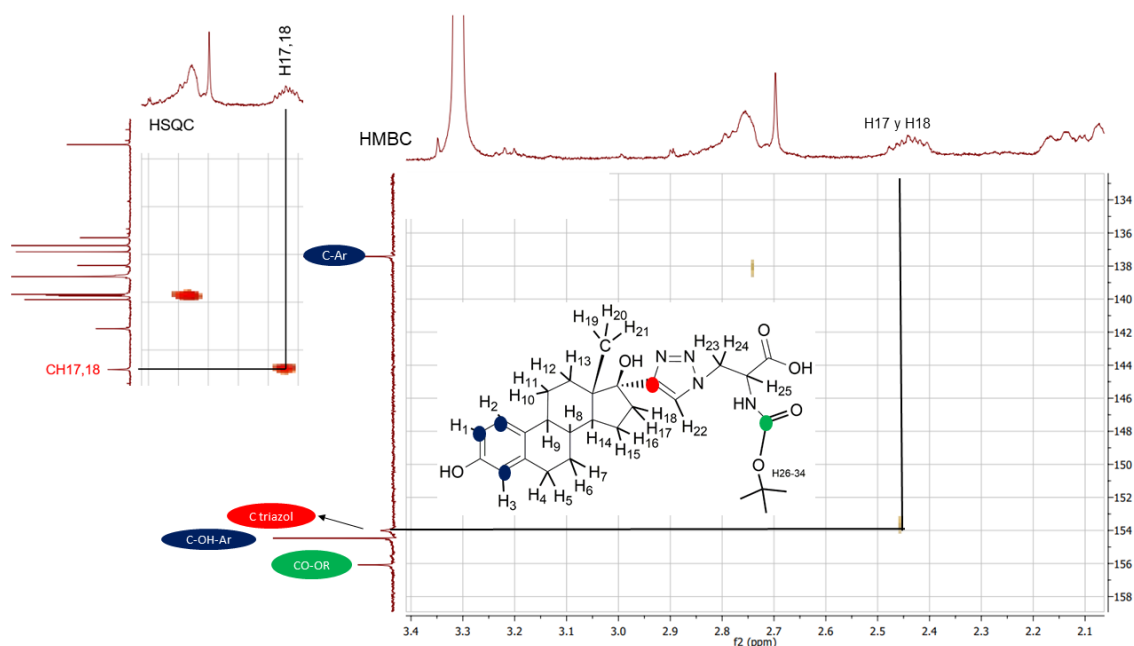


Figura 82: Estudio de HMBC y HSQC para identificar el carbono y los protones 17 y 18

De los carbonos del tipo CH restan por asignar uno con $\delta= 39.72$ ppm y otro con $\delta= 53.09$ ppm. Estas señales pueden corresponder a H8 o H25. Se asumió que el carbono en 39.72 ppm corresponde al carbono de H8 ya que existe una señal con el mismo desplazamiento en el espectro del etinilestradiol. Si se observa el HSQC de la Figura 83 el carbono de H8 acopla con la señal en 1.38 ppm que corresponde a los protones del grupo protector BOC. Por este motivo esta señal integra 10 protones, 9 protones pertenecientes al grupo protector BOC y uno de H8. El carbono de H25 entonces, es el que aparece en $\delta=53.09$ ppm.

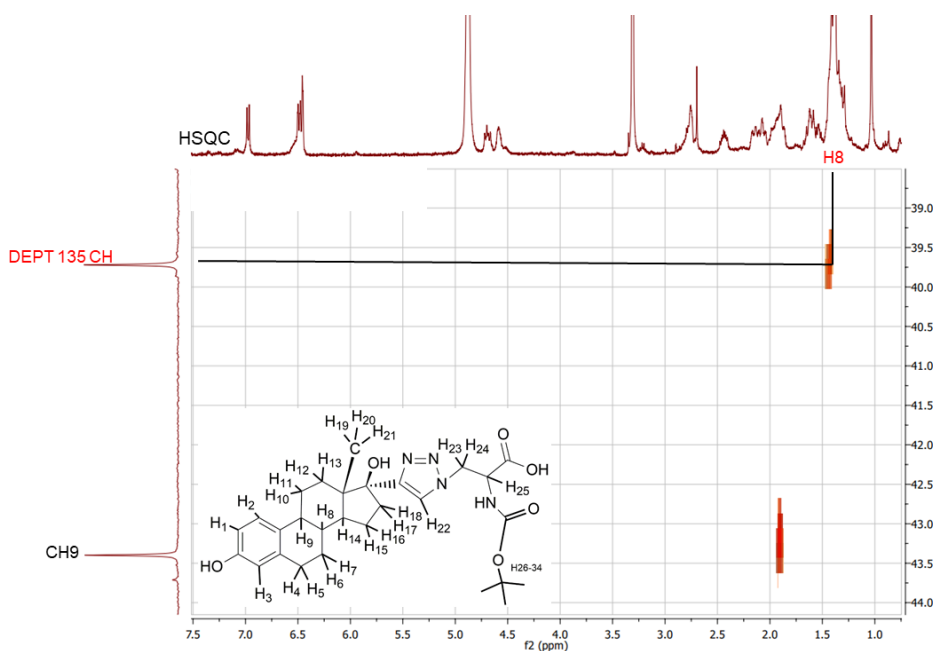


Figura 83: Estudio de HSQC para identificar el H8

De los carbonos del tipo CH₂ restan asignar los carbonos de H10,11, de H6,7, de H15,16 y de H26-34. Si observamos la Figura 84 el carbono en 23.25 y el carbono en 26.15 ppm son señales del tipo CH₂ en el DEPT 135 y acoplan con la señal en el RMN de protón que integra 6 protones y se encuentra a 1.89 ppm. El carbono que se encuentra en 27.31 ppm es una señal del tipo CH o CH₃ y acopla con la señal en 1.89 ppm y tiene un acople muy fuerte con la señal del RMN de protón que se encuentra en 1.38 ppm. Al realizar la predicción teórica de los carbonos metílicos unidos a los protones H26-34 se obtiene un valor de 28.4 ppm, por lo que se asume que el carbono que se encuentra en 27.31 ppm corresponde a estos carbonos metílicos del grupo protector BOC. La otra señal que resta por asignar es un carbono del tipo CH₂ que se encuentra en 29.18 ppm pero no acopla con ninguna señal, por lo que se asume que los carbonos en 23.25, 26.15 y 29.18 ppm corresponden a los protones H10,11, H6,7 y H15,16.

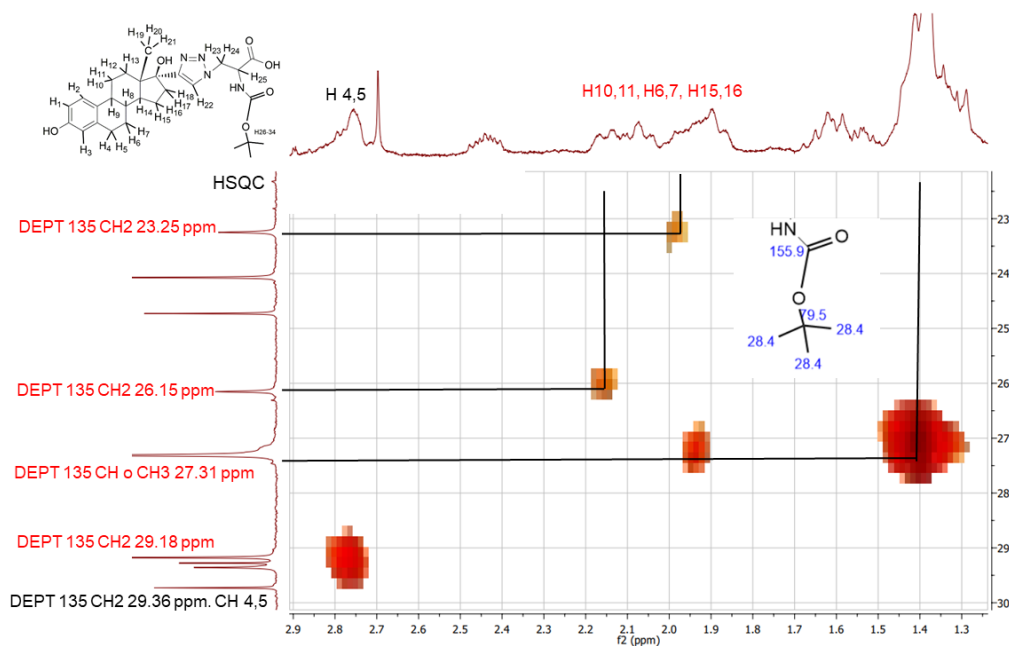


Figura 84: Estudio de HSQC para identificar H10,11, H6,7 y H15,16.

Por otro lado, la señal que se encuentra en 4.70 ppm es una señal que no aparecía en el ^1H -RMN del etinilestradiol, que integra dos protones y que tiene un único carbono asociado a 50.94 ppm del tipo CH_2 , como se muestra en la Figura 85. Se asume que estos protones son los protones H23 y 24 que no están en el etinilestradiol y que según las predicciones teóricas tienen desplazamientos químicos de aproximadamente 4.3-4.1 ppm. Se asume que el carbono en 50.94 ppm es el carbono de H23,24, ya que según las predicciones teóricas tiene un desplazamiento químico de 56 ppm.

La señal que aparece a los 2.70 ppm, un singulete que integra un protón y se asigna al protón H 25. Para descartar que este protón sea el protón del grupo alquino terminal que aparecía en el espectro del etinilestradiol como singulete a $\delta=2.91$ ppm, se observó en el HMBC (Figura 85) que esta señal a los 2.70 ppm y el carbono a $\delta=81.78$ ppm que es el carbono (naranja) del ciclo de 5 que está unido a OH no acoplan, mientras en el etinilestradiol si había un fuerte acople entre estas señales.

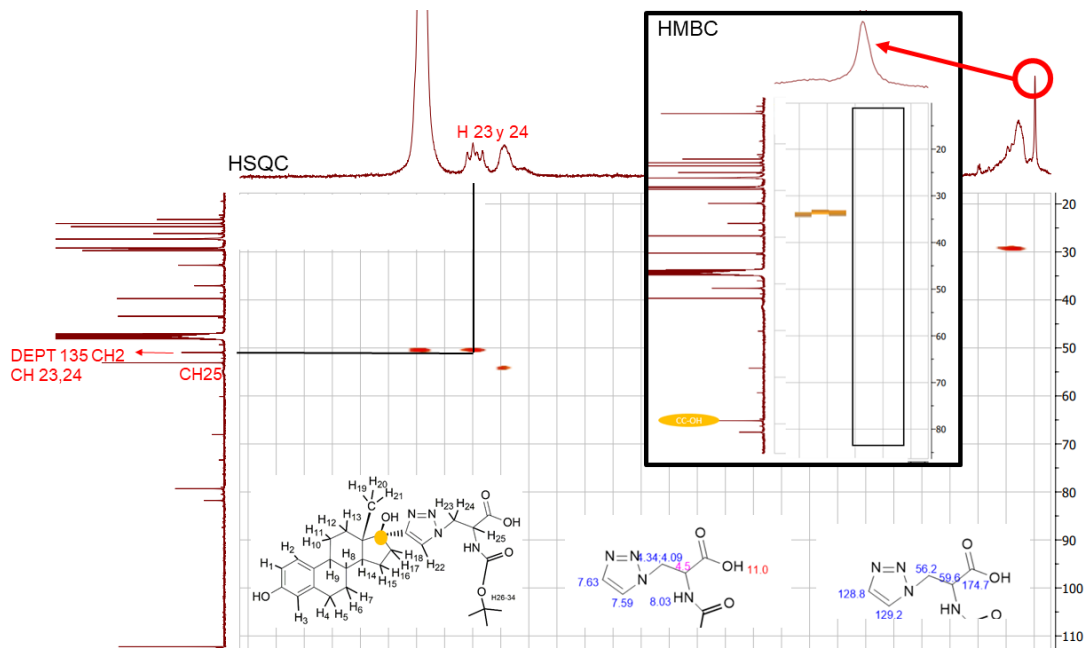


Figura 85: Estudio HSQC, HMBC, asignación de H23,24,25.

En la Figura 86 se muestra la asignación de los protones en el espectro de RMN de protón de **L1-BOC**.

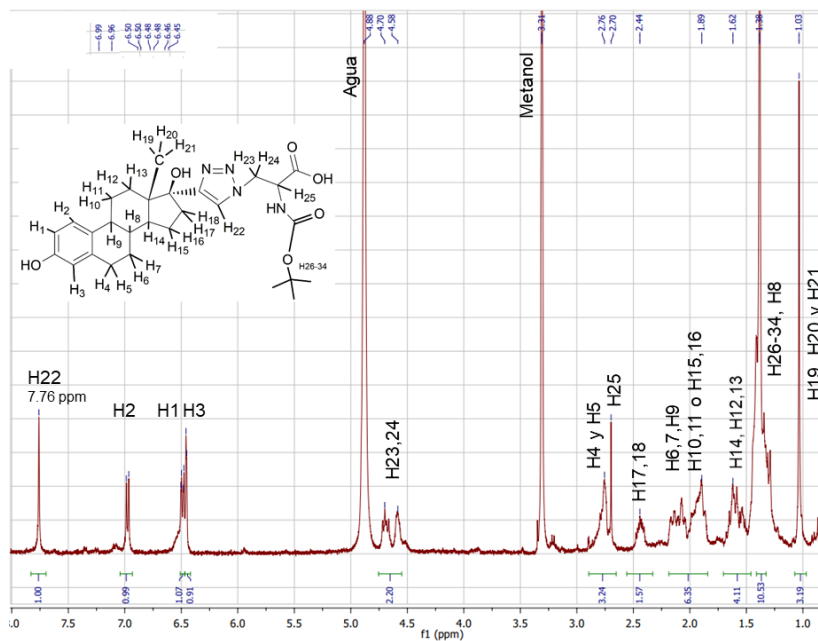


Figura 86: ¹H-RMN del **L1-BOC**

Con todos estos análisis realizados se confirma que la estructura de **L1-BOC** coincide con lo esperado.

5.1.2 17 [sodio (1-carboxi-2-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)etil) ditiocarbamato] estradiol (L2)

El ligando 2 (**L2**) posee una parte activa derivada del estradiol y como sistema quelante un grupo ditiocarbamato que coordinará con el [^{99m}Tc]Tc formando un complejo del tipo [^{99m}Tc]Tc(V)-nitrido (Figura 87).

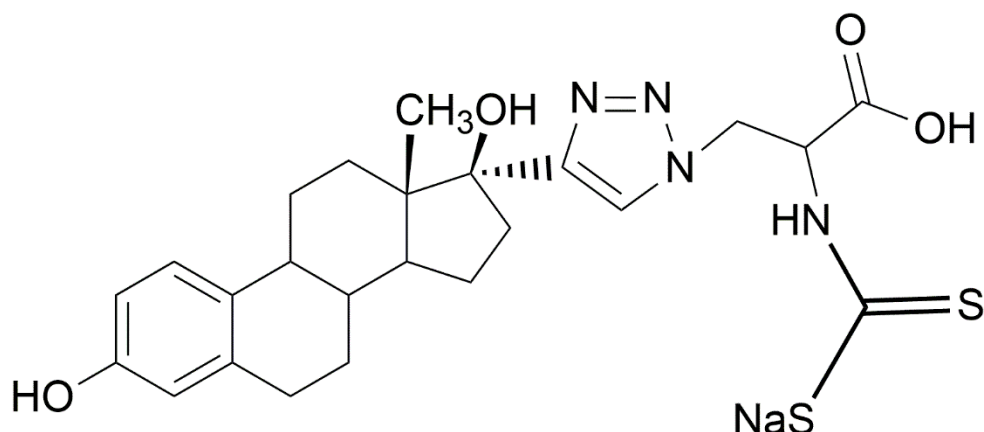


Figura 87: Estructura de **L2**

La síntesis de **L2** se realizó en dos etapas, la desprotección del grupo amino de **L1-BOC** seguida de la formación del grupo ditiocarbamato. La desprotección de una amina protegida con un grupo BOC (terc-butiloxycarbonilo) se realiza mediante hidrólisis del grupo carbamato en condiciones ácidas (Figura 88) [135].

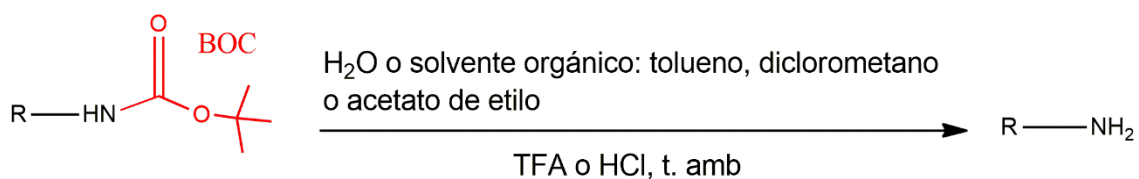


Figura 88: Desprotección de una amina protegida con un BOC

Generalmente el material de partida se disuelve en agua o un disolvente orgánico, como tolueno, diclorometano o acetato de etilo. El ácido clorhídrico concentrado o el ácido trifluoroacético son los ácidos que se suelen usar para este tipo de reacciones. Estas reacciones suelen ser rápidas, se producen a temperatura ambiente y presentan buenos resultados [135].

La segunda etapa de síntesis se realizó según la técnica descrita por Goubert *et al.* [136] levemente modificada e implica el agregado de la función ditiocarbamato a partir de disulfuro de carbono e hidruro de sodio.

Los ditiocarbamatos son los ésteres y sales de los ácidos ditiocarbámicos. Químicamente son carbamatos en los que ambos átomos de oxígeno han sido sustituidos por átomos de azufre. Este grupo es ampliamente utilizado en agroquímicos, productos farmacéuticos, como producto intermedio de síntesis orgánica, como grupo protector en síntesis de péptidos y como quelante en química de materiales. La síntesis de ditiocarbamatos implicó durante mucho tiempo reacciones en condiciones muy duras (uso de fuertes condiciones básicas, altas temperaturas de reacción y tiempos de reacción prolongados) para poder aislar los productos deseados con buenos rendimientos. También se han utilizado métodos alternativos con condiciones de reacción más suaves pero que requieren reactivos tóxicos como el óxido de bis (tributilestaño), aminas secundarias que son más nucleofílicas que las primarias y bases fuertes como el hidróxido de sodio o potasio. En 2007 Goubert *et al.* [136] optimizaron condiciones de reacción para lograr la síntesis de ditiocarbamatos con buenos rendimientos y en condiciones de reacción suaves. Los mejores resultados los obtuvieron realizando la reacción en THF, usando CS₂ y NaH como base (Figura 89). La temperatura tuvo mucha influencia en el rendimiento de reacción. La conversión completa de la amina se logra agregando el disulfuro de carbono y la base a 0°C y luego elevando la temperatura a 65 °C por dos horas. La misma reacción realizada a temperatura ambiente resultó en una disminución importante del rendimiento.

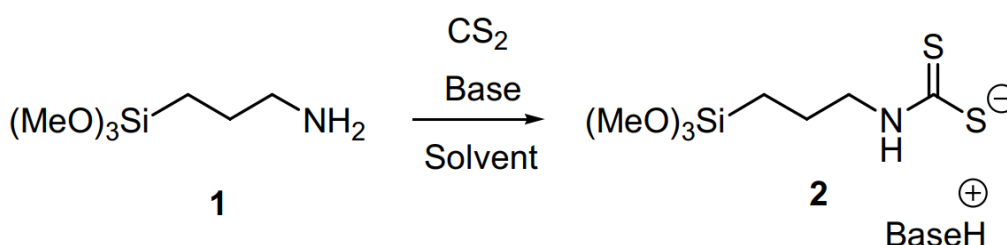
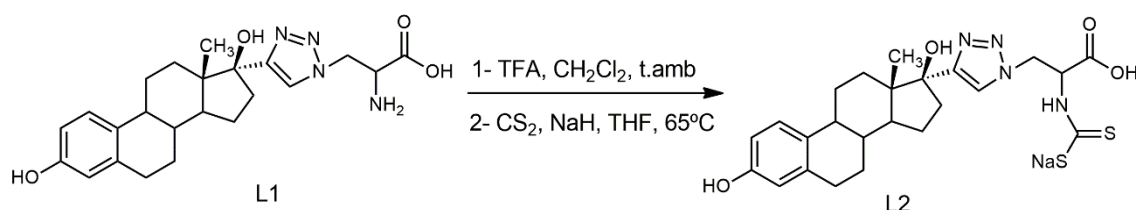


Imagen: Goubert R., et al. Tetrahedron Letter. 2007;48:2113-2116.

Figura 89: Reacción propuesta por Goubert. *et al.* [136]

Nuestro grupo de investigación ya ha trabajado previamente en la síntesis de ligandos que contienen el grupo ditiocarbamato como sistema quelante basándose en la reacción de Goubert. et al. [136] obteniendo excelentes resultados [66].

La síntesis de **L2** partió de **L1-BOC** (Esquema sintético 2), realizándose en primer lugar la desprotección del grupo terc-butiloxicarbonilo (BOC) con TFA en diclorometano seco durante 48 horas a temperatura ambiente y en atmósfera de nitrógeno [135]. Una vez culminada la reacción, el diclorometano se eliminó bajo presión reducida, mientras que el ácido trifluoroacético se eliminó por destilación azeotrópica del crudo de reacción mediante el agregado de tolueno y posterior evaporación a presión reducida obteniéndose **L1**.



Esquema sintético 2: Síntesis de **L2**

La adición de la función ditiocarbamato se realizó partiendo de **L1** disuelto en THF seco y enfriando esta mezcla a 0°C con ayuda de un baño de agua/hielo. Posteriormente se incorporó el CS₂ y el NaH y se mantuvo la mezcla de reacción a 65°C durante 2 horas y media [66]. Finalizada la misma se eliminaron los disolventes a presión reducida obteniendo un sólido marrón oscuro. **L2** se obtuvo con un rendimiento mayor al 100% en todos los casos debido a la presencia de THF que no interfiere en la etapa posterior de marcación con [^{99m}Tc]Tc.

El producto obtenido fue caracterizado por técnicas espectroscópicas. En la Figura 90 se muestra el espectro de masa obtenido mediante ESI-EM (Ionización por Electro spray) en modo positivo. El espectro muestra un ion que tiene una relación m/z de 503.4, valor que coincide con el esperado para el M⁺ de **L2** cuando pierde el contraión sodio.

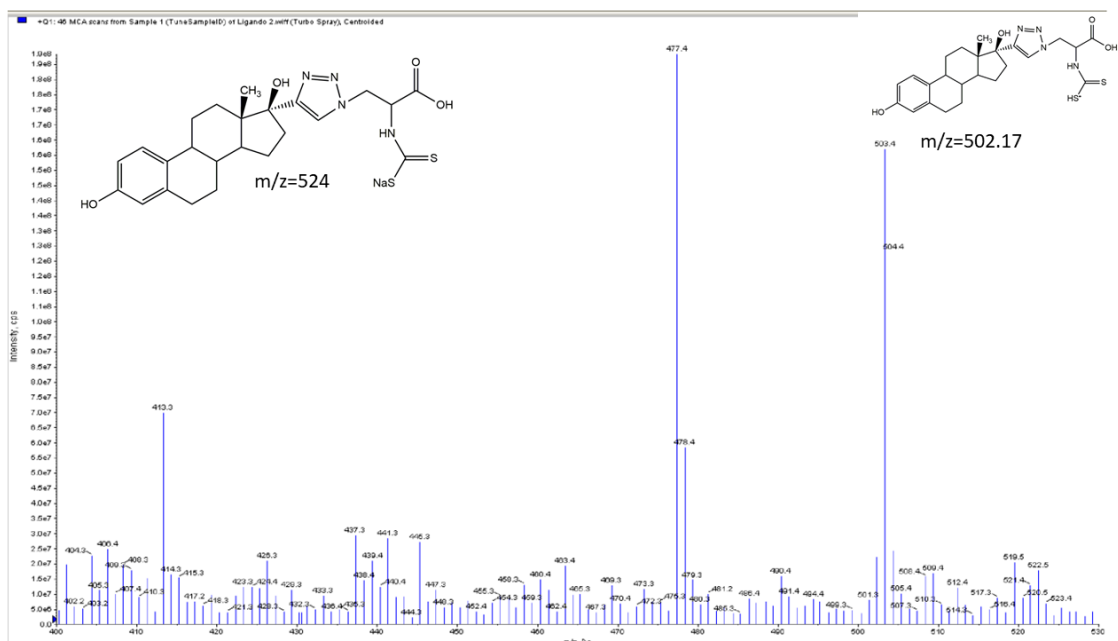


Figura 90: Espectro de Masas de L2

La Figura 91 muestra el espectro infrarrojo de L2, en el cual se destacan 2 bandas, $\nu(\text{CS}_2)_{\text{as}}$ (asymmetric stretch, estiramiento asimétrico) y $\nu(\text{CS}_2)_{\text{s}}$ (symmetric stretch, estiramiento simétrico) (1207 cm^{-1} , 1139 cm^{-1}) características de los ditiocarbamatos [137].

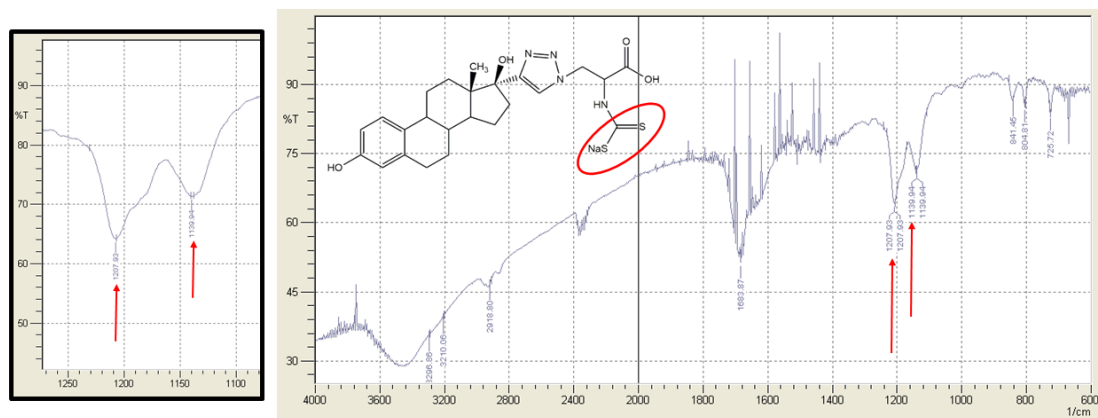


Figura 91: Espectro infrarrojo para L2

Se realizó también el estudio de ^1H -RMN de L2, el que se muestra en la Figura 92. Dicho espectro mantiene el perfil del RMN de L1-BOC ya analizado previamente. Se pudieron asignar los protones H1, H2 y H3 con $\delta=6.48$, 6.94 y 6.41 ppm , respectivamente, por encontrarse entre $\delta=6.5$ y 8 ppm , zona característica de los protones aromáticos. Además, se pudo identificar el protón

del triazol (H22) en 7.59 ppm, la señal del grupo metilo CH₃ (H19, H20 y H21) a los 0.93 ppm y los protones H4 y H5 a $\delta=2.68$ ppm. Se observó, como era esperable, la desaparición de la señal en $\delta=1.38$ ppm que corresponde a los protones metílicos del grupo protector BOC, ya que previo a incorporar la función ditiocarbamato se eliminó este grupo protector. El resto de los protones de la molécula se integraron entre 2.5 y 0.9 ppm.

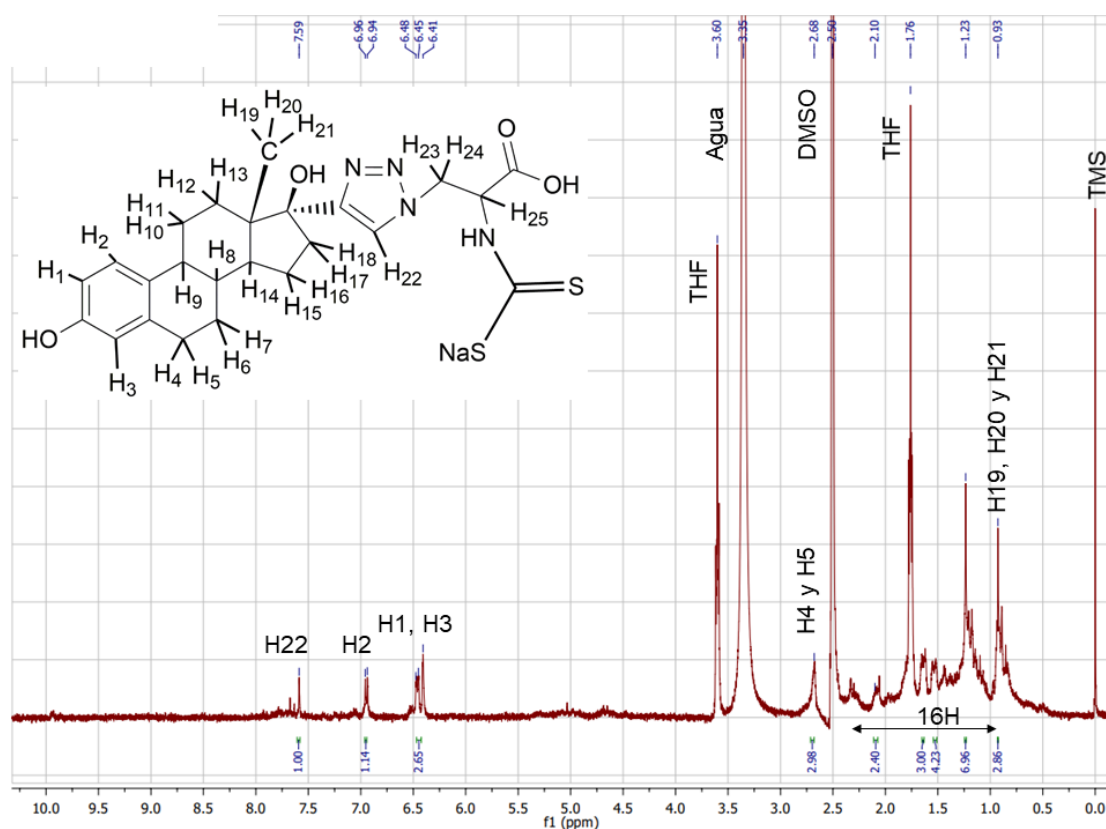


Figura 92: ¹H-RMN del **L2**

Con todos estos resultados se confirma que la estructura de **L2** coincide con lo esperado.

5.1.3 17[5-((1-carboxi-2-(1*H*-1, 2,3-triazol-1-yl) etil) amino)-*N*-metilidine-5-oxopentano-1-amonio] estradiol (**L3**)

El tercer ligando (**L3**) (Figura 93) contiene un grupo isonitrilo como donador de electrones para coordinar con el [^{99m}Tc]Tc, formando un complejo del tipo [^{99m}Tc]Tc(III) 4+1. En dicho complejo se espera que **L3** ocupe una de las

posiciones de coordinación, mientras que las restantes 4 posiciones son ocupadas por un coligando el 2-[Bis (2-mercaptoetil) amino] etanotiol (NS₃).

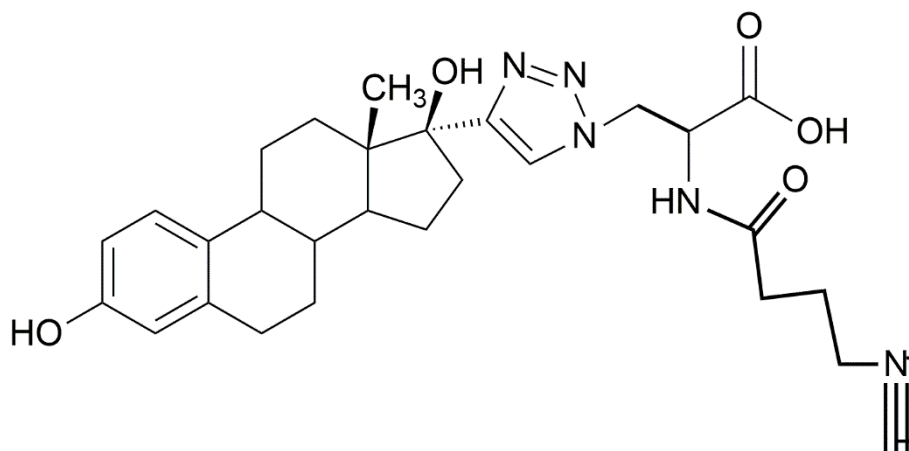
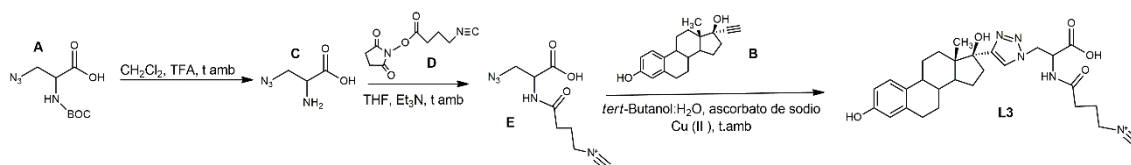


Figura 93: Estructura de **L3**

Para obtener este ligando se plantea una secuencia de síntesis que consta de varios pasos, los que se muestran en el esquema sintético.



Esquema sintético 3: Síntesis de **L3**

El primero paso de síntesis partió de la N-BOC-azidoalanina (Esquema sintético 3-A) e implicó la desprotección del grupo BOC con TFA en diclorometano seco durante 48 horas a temperatura ambiente y en atmósfera de nitrógeno [135].

Para comprobar que la desprotección fue efectiva se realizó un ¹H-RMN del reactivo de partida la N-BOC-azidoalanina (**A**) y de **C**.

En la Figura 94 se muestra el espectro de ¹H-RMN de **A**, en él que pueden observarse varias señales correspondientes a la sal que acompaña este aminoácido protegido y cuatro señales propias del aminoácido. Los protones H35 y H36 de la sal son diferentes al resto de los protones del ciclohexano, ya que acoplan tanto con los protones del ciclohexano como con el protón de la amina que une ambos ciclos. Por este motivo, esta señal se presenta como un multiplete que integra 2 protones a $\delta=3.20$ ppm. Por otro lado, la sal posee 20 protones del tipo CH₂, los que se encuentran en ambos ciclohexanos. Estos

protones corresponden a las señales entre 1.24 y 2.10 ppm. De acuerdo a la estructura del aminoácido, y dada nuestra experiencia previa en la síntesis y análisis espectroscópico de **L1-BOC**, se identifica la señal del grupo protector BOC en $\delta=1.47$ ppm que integra 9H. El protón H25 aparece en $\delta=4.14$ ppm e integra 1 protón y los protones H23 y H24 aparecen como multipletes en el entorno de $\delta=3.65$ ppm. La asignación fue confirmada por estudios bidimensionales.

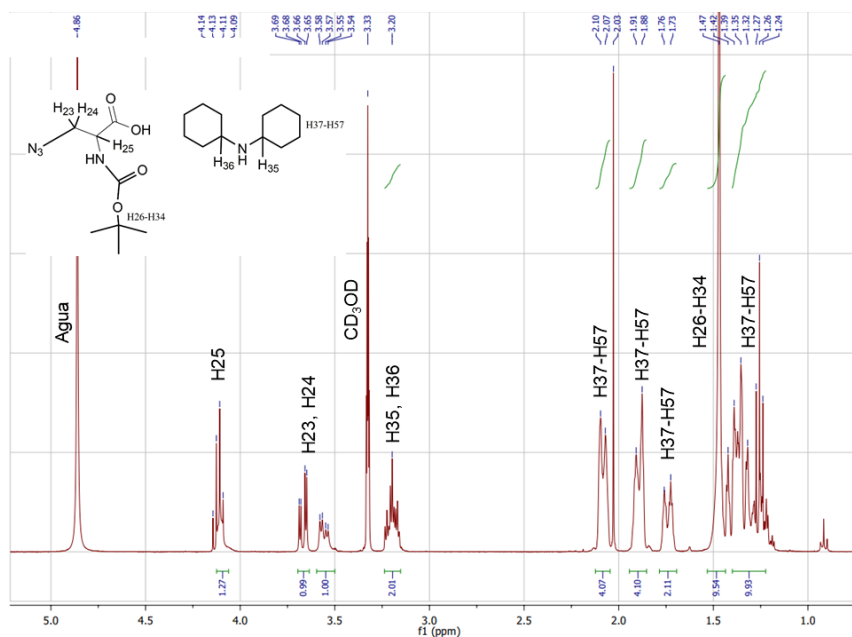


Figura 94: Espectro de ^1H -RMN de la N-BOC-azidoalanina (**A**)

La Figura 95 muestra el espectro de **C** en él puede observarse la desaparición de la señal en $\delta=1.47$ ppm correspondiente al grupo protector BOC, mostrando que la desprotección con TFA se produjo correctamente. Las señales de los protones H23 y H24 se encuentran como multiplete en $\delta=3.97$ ppm y la señal de H25 se encuentra en $\delta=4.12$ ppm. La asignación fue confirmada por estudios bidimensionales

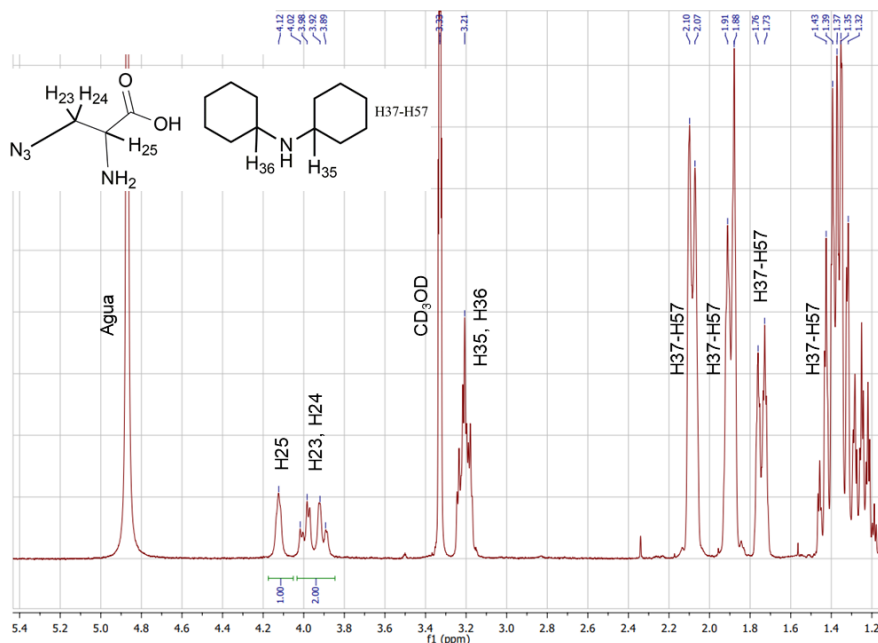


Figura 95: Espectro de ¹H-RMN de **C**

El siguiente paso para obtener **L3** es una reacción entre **C** y un isonitrilo activado (**D**) (Esquema sintético 3) proporcionado por el grupo del Dr. Hans-Jürgen Pietzsch del Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Alemania. La reacción se realizó utilizando como disolvente el diclorometano anhidro, en medio básico, a temperatura ambiente y atmósfera de nitrógeno durante 19 horas.

Se realizó un espectro de ¹H-RMN de **E** para comprobar el acoplamiento entre **C** y el isonitrilo activado **D**. La Figura 96 muestra el ¹H-RMN de **E**, en él puede verse que la señal de H₂₃, H₂₄ y H₂₅ aparece como un multiplete que integra 3 protones en $\delta=3.34$ ppm y se incorporan dos nuevas señales; un singulete en $\delta=2.19$ ppm que integra 4 protones y corresponde a los protones H₂₆-H₂₉ y un triplete en $\delta=1.33$ ppm que integra 2 protones y según predicciones corresponde a H₃₀ y H₃₁.

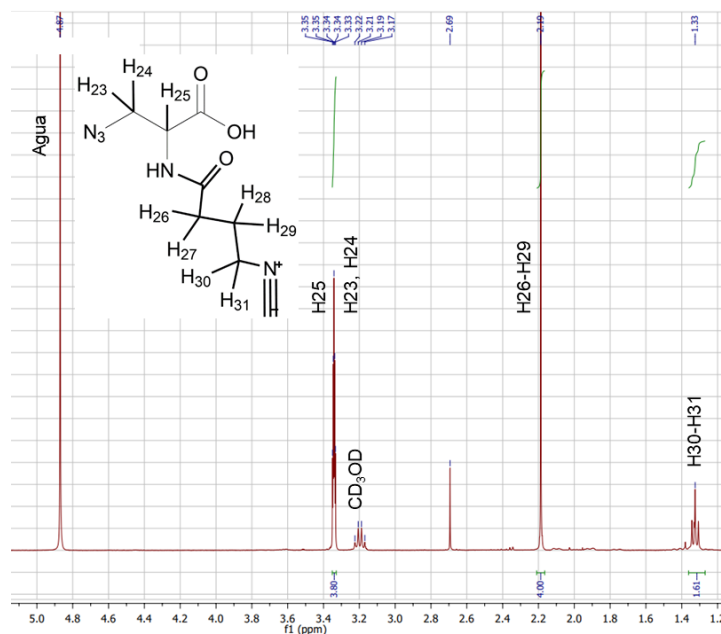


Figura 96: Espectro de ^1H -RMN de **E**

El último paso de síntesis consistió en una reacción de Huisgen entre el triple enlace del etinilestradiol y el grupo azida de **E**. Esta reacción fue catalizada por Cu(I) que se generó in situ por acción del ácido ascórbico en presencia de sales de Cu(II) [134,35,36]. La reacción se realizó a temperatura ambiente, en atmosfera de nitrógeno por 6 días, utilizando una mezcla *tert*-butanol:H₂O como disolventes. Al finalizar la reacción se realizaron extracciones con acetato de etilo, el producto de interés es afín por la fase orgánica, mientras que la mayor parte del ascorbato de sodio y de Cu(II) son afines por la fase acuosa. En cambio, el Cu(I) se reparte entre ambas fases. La presencia de Cu(I), de ascorbato de sodio y de Cu (II) en el extracto orgánico pueden explicar los rendimientos mayores al 100% obtenidos. Dicho extracto no se purificó ya que las impurezas no interfieren en la etapa de marcación con [$^{99\text{m}}$ Tc]Tc.

En la Figura 97 se muestra el espectro de masa obtenido mediante ESI-EM (Ionización por Electrospray) en modo negativo, el que muestra un ion que tiene una relación m/z de 521.8 y corresponde al L3 (M⁻).

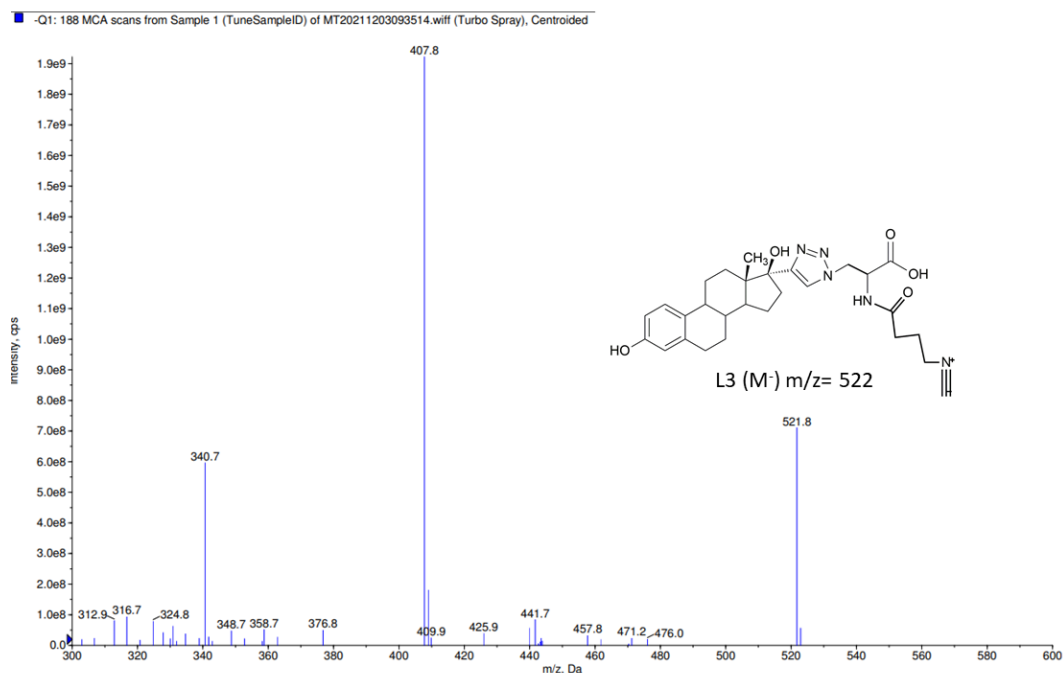


Figura 97: Espectro de Masas de **L3**

La Figura 98 muestra el ^1H -RMN de **L3** en CD_3OD . En el mismo se pudieron asignar las señales correspondientes a los protones H1, H2 y H3 en $\delta=6.57$, 7.10 y 6.50 ppm, respectivamente. Además, se pudo asignar la señal del protón del anillo triazólico (H22) en $\delta= 8.07$ ppm, indicando que la reacción de Huisgen entre el etinilestradiol y **E** fue exitosa. La señal del grupo metilo CH_3 (H19, H20 y H21) aparece como un singulete que integra 3 H, con un desplazamiento químico de $\delta=0.89$ ppm y los protones H4 y H5 a $\delta=2.91$ ppm. Los protones H23, H24 y H25 de **L3** se asignan a la señal en $\delta=3.33$ ppm (multiplete que integra 3 protones) por similitud con el espectro de **E**. En el caso de los protones H26-H29 aparecen junto con los del estradiol con un desplazamiento químico en el entorno de los $\delta=2.19$. Los protones H30 y H31 seguramente aparezcan dentro del pico de disolvente a los $\delta=1.33$ ppm.

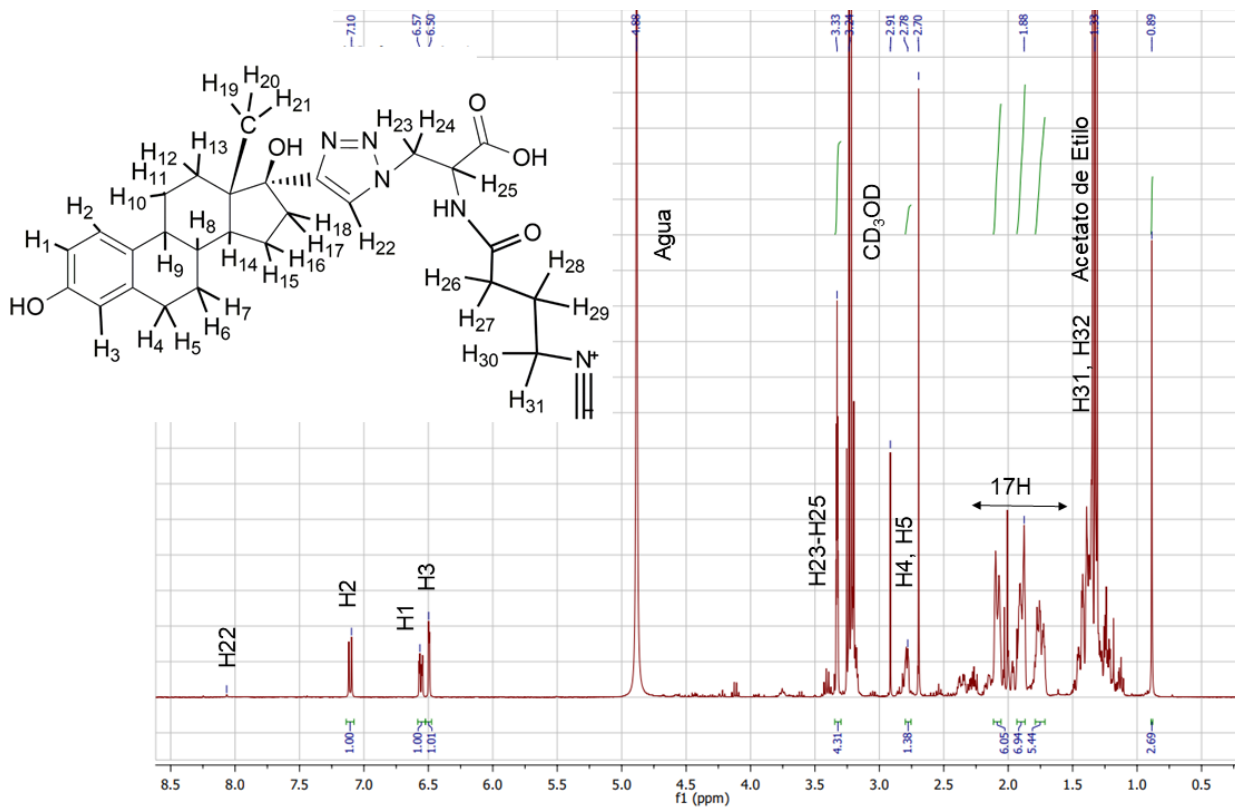


Figura 98: Espectro de ^1H -RMN de **L3**

Con todos estos análisis realizados se confirma que la estructura de **L3** coincide con lo esperado.

5.1.4 17[1-(4-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)fenil)-2-bromoetanon] estradiol (**L4**)

El ligando **4 (L4)** que será utilizado para la marcación con $[^{18}\text{F}]\text{F}$ posee un átomo de Br como grupo saliente y se muestra en la Figura 99.

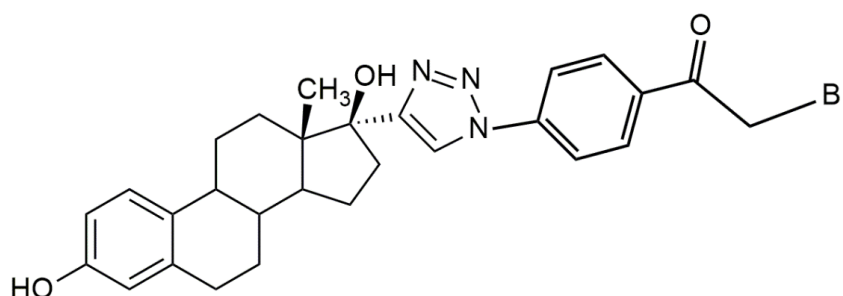
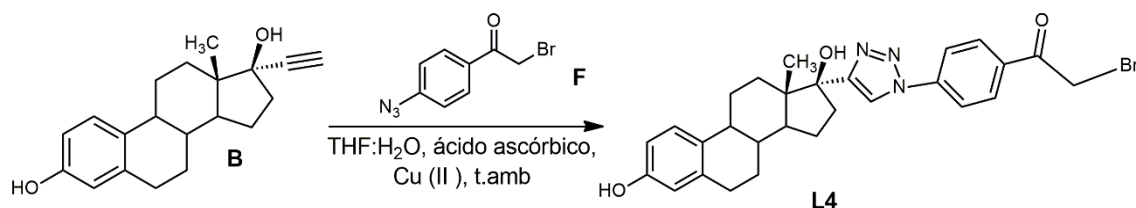


Figura 99: Estructura de **L4**

La síntesis de **L4** fue realizada mediante una cicloadición “3+2” entre el alquino terminal del etinilestradiol (Esquema sintético 4-B) y una azida comercial, la 1-

(4-azidofenil)-2-bromoetanonona (Esquema sintético 4-F) para formar un anillo de triazol 1,4 disustituido [134,35,36].



Esquema sintético 4: Síntesis de **L4**

La reacción se realizó a temperatura ambiente, en atmosfera de nitrógeno, utilizando una mezcla *tert*-butanol:H₂O como disolventes. Si bien se había formado un producto de R_f menor al etinilestradiol, presuntamente el producto de interés, a los dos días la reacción permanecía sin avanzar por lo que se realizaron extracciones con acetato de etilo. El extracto orgánico presentó un rendimiento mayor al 100% debido a la presencia de sales y de etinilestradiol. El producto de interés se purificó por columna. En primera instancia se utilizó una mezcla de solventes mas apolar para extraer el etinilestradiol y al aumentar la polaridad de la mezcla se extrajo el producto de interés con un rendimiento de 56%.

Para poder comprender mejor el ¹H-RMN del producto de interés se comparó con el RMN de protón del reactivo de partida 1-(4-azidofenil)-2-bromoetanonona y del etinilestradiol (analizado en la discusión de la síntesis de **L1-BOC**, sección 5.1.1).

En la Figura 100 se muestra el ¹H-RMN de la 1-(4-azidofenil)-2-bromoetanonona (**F**). En el mismo, se encontraron varias señales en la zona correspondiente a protones aromáticos, 2 de las cuales aparecen en $\delta=8.12$ y 7.97 ppm y son dobletes e integran 2 protones cada una, por lo que se asignan a los protones H1-H4. Se calculó la constante de acoplamiento J de ambos dobletes encontrando que ambos corresponden a un acoplamiento orto. Con este dato y con los datos de la predicción teórica se asignó la señal en $\delta=8.12$ ppm a los protones H2 y H4. H2 posee un acoplamiento orto con H3 y H4 posee un acoplamiento orto con H1. La señal en $\delta=7.97$ ppm corresponde a los protones H1 y H3. H1 posee un acoplamiento orto con H4 y H3 posee un acoplamiento

orto con H2. El estudio bidimensional COSY que se muestra en la Figura 101 confirma que estas señales acoplan entre sí. Los protones H5 y H6 deben aparecer en $\delta=4.06$ ppm según predicciones teóricas. Por lo tanto, la señal en $\delta=4.76$ ppm que aparece como un singlete que integra dos protones se asigna a H5 y H6. Si se observa el estudio de COSY, esta señal no acopla con ningún otro protón lo cual confirma la consideración realizada. Observando el RMN de protón de la Figura 100 se ve que el reactivo de partida no está puro, ya que existen varias señales extras marcadas en rojo.

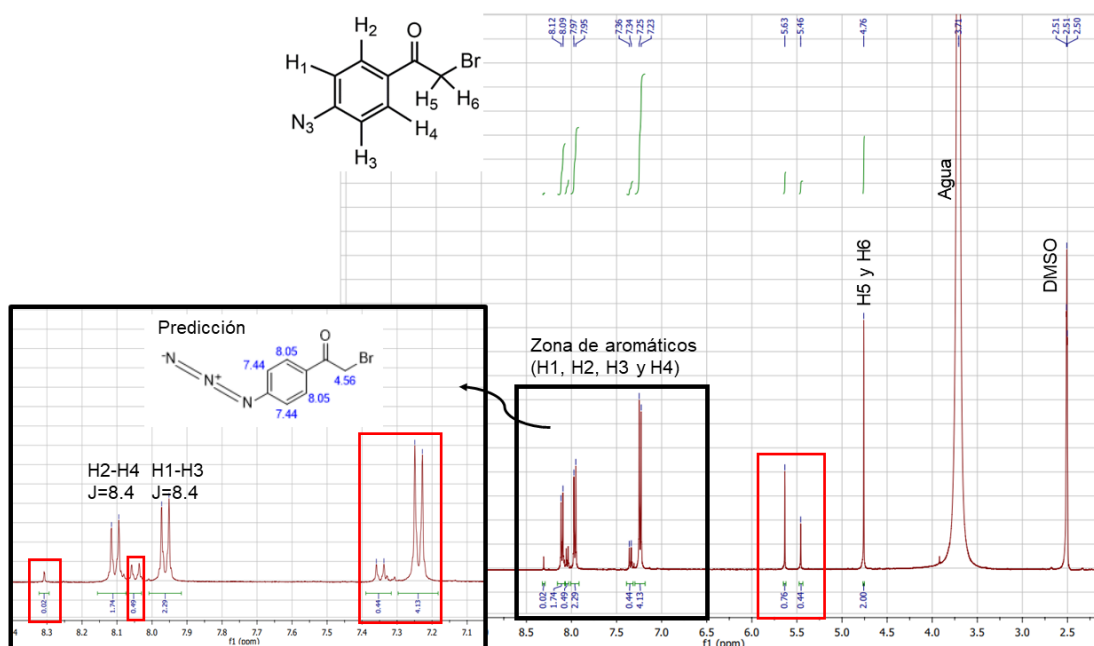


Figura 100: $^1\text{H-RMN}$ 1-(4-azidofenil)-2-bromoetanol (**F**)

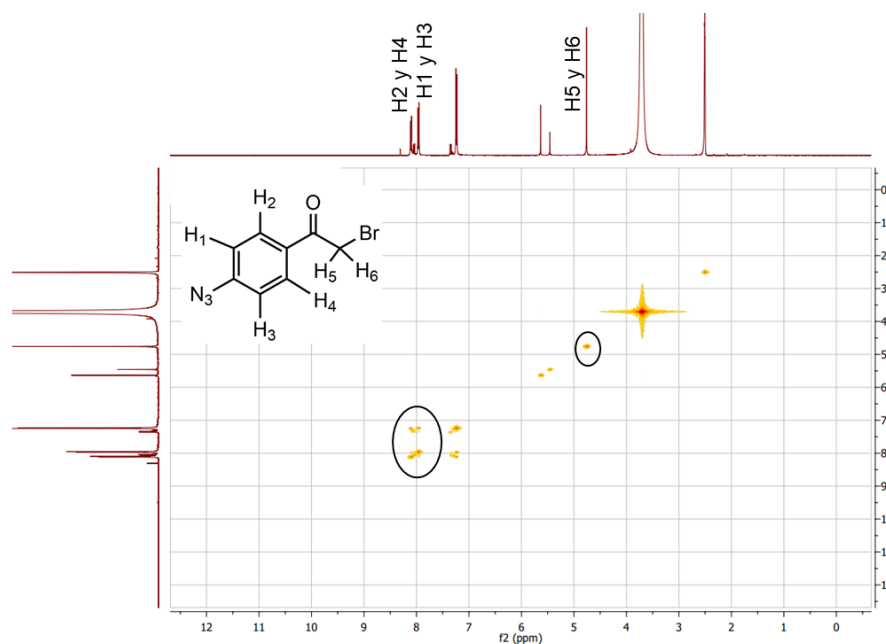


Figura 101: Estudio de COSY 1-(4-azidofenil)-2-bromoetanona (**F**)

A continuación, se detalla el RMN de ^1H de 1-(4-azidofenil)-2-bromoetanona (**F**) con las señales asignadas:

^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ (ppm): 4.76 (H5 y 6, s, 2H), 7.96 (H1 y H3, d, 2H), 8.10 (H2 y H4, d, 2H).

Conociendo los RMN de los reactivos de partida se procedió a analizar el ^1H -RMN de **L4**, el que se muestra en la Figura 102. En el mismo puede visualizarse la señal de los protones metílicos a $\delta=0.97$ ppm, un singulete que integra 3 protones. Se identificaron los protones H4 y H5 a $\delta=2.70$ ppm. Por otro lado, puede verse un singulete a $\delta=8.13$ ppm que corresponde a H22 (protón del anillo triazol), pero integra 2 protones y no un protón como era de esperar. Se observa también la desaparición del protón del triple enlace terminal del etinilestradiol (s, 1 H, $\delta=2.91$ ppm). Estas 2 observaciones parecen indicar que la reacción se produjo exitosamente. Sin embargo, al observar la zona del espectro donde aparecen los protones aromáticos solo se encuentran los protones aromáticos correspondientes al etinilestradiol (H1, H2 y H3) y no se observan claramente los protones procedentes del fenilo de la azida (H23-26). Observando en detalle el RMN de protón de la Figura 102 existen asimismo algunas señales extras marcadas en rojo que no pueden ser atribuidas a ningún tipo de protón de la

molécula **L4**. Todo esto lleva a concluir que ni la reacción, ni la purificación fueron exitosas, por lo que se busca alguna alternativa para la síntesis **L4**.

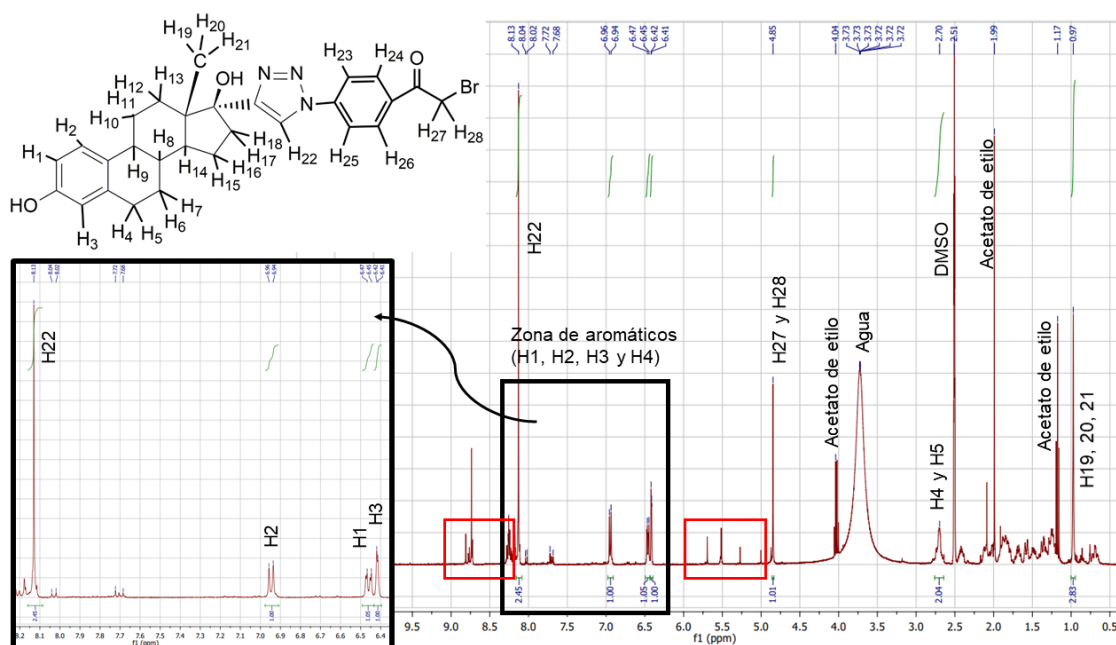
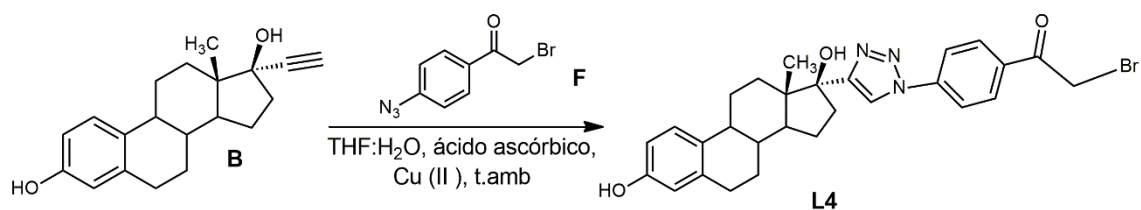


Figura 102: ¹H-RMN de **L4**

En la búsqueda bibliográfica solo se encontró la referencia de Tosh *et al.* [138], quien utiliza la 1-(4-azidofenil)-2-bromoetanova (**F**) (Esquema sintético 4-F) en una reacción de Huisgen. El grupo de Tosh realiza la reacción utilizando exceso de la azida, más equivalentes de ascorbato de sodio y menos equivalentes de la sal de Cu(II). La sal de cobre que se utiliza es sulfato en vez de acetato. La reacción se realiza en una mezcla de disolventes THF:H₂O 3:1 y con agitación durante toda la noche. El producto de interés se purifica por cromatografía en columna. En consecuencia, se cambiaron las condiciones de reacción entre el etinilestradiol (Esquema sintético 4-B) y 1-(4-azidofenil)-2-bromoetanova (Esquema sintético 4-F) según la técnica descrita en 4.2.1.4-Técnica 2. El tiempo de reacción fue de 8 días, ya que a las 24 hs había un avance mínimo e la misma.



Esquema sintético 4: Síntesis de **L4**

Transcurrido dicho lapso, si bien el consumo de los reactivos no había sido total se eliminaron los disolventes bajo presión reducida obteniéndose un crudo de reacción con rendimiento mayor al 100% debido a la presencia del producto de interés, de sales y de parte de los reactivos de partida. Se realizó una purificación por columna, extrayendo en primer lugar la azida **F**, el etinilestradiol y por último el producto de interés con un rendimiento del 21%.

Se realizó un ^1H -RMN en $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ que se muestra en la Figura 103, en el cual puede visualizarse la señal de los protones metílicos a $\delta=0.97$ ppm, un singulete que integra 3 protones. Los protones H4 y H5 corresponden al multiplete que integra 2H a $\delta=2.70$ ppm. Por otro lado, puede verse un singulete a $\delta=8.13$ ppm que corresponde al H22, el protón del anillo triazol, pero integra 3 protones y no un protón como era de esperar. Se puede observar que no existe la señal correspondiente al protón del triple enlace del etinilestradiol (singulete a $\delta=2.91$ ppm). Al observar la zona del espectro donde aparecen los protones aromáticos solo se encuentran los correspondientes al etinilestradiol (H1, H2 y H3) y no los protones procedentes del fenilo de la azida (H23-26). Además, aparecen algunas señales extras marcadas en rojo que no pueden ser atribuidas a ningún tipo de protón de la molécula **L4**. En función de los resultados obtenidos se puede concluir que ni la reacción, ni la purificación fueron exitosas, por lo que se decide buscar alguna alternativa sintética para obtener un ligando adecuado para la marcación con $[^{18}\text{F}]\text{F}$.

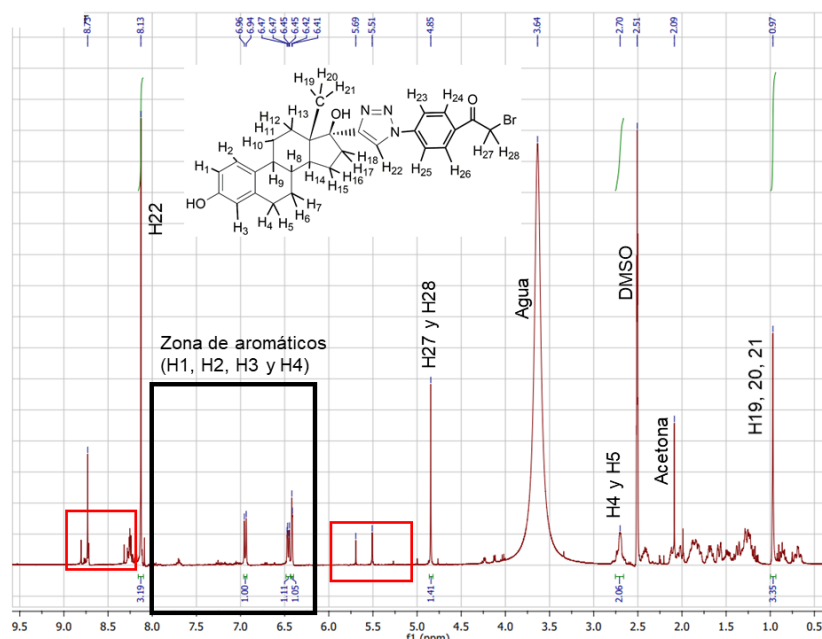


Figura 103: ^1H -RMN de **L4** según síntesis de Tosh. *et al.* [136]

5.1.5 17[4-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)butil 4- metilbencenosulfonato] estradiol (**L5**)

En la síntesis de **L4** se utilizó 1-(4-azidofenil)-2-bromoetanol, el cual es muy reactivo, pudiendo generar productos secundarios no deseados. Por este motivo se decidió ensayar la síntesis de un nuevo ligando derivado de estradiol utilizando 4-bromobutanol, producto menos reactivo que el anterior. En la Figura 104 se muestra la estructura del ligando 5 (**L5**).

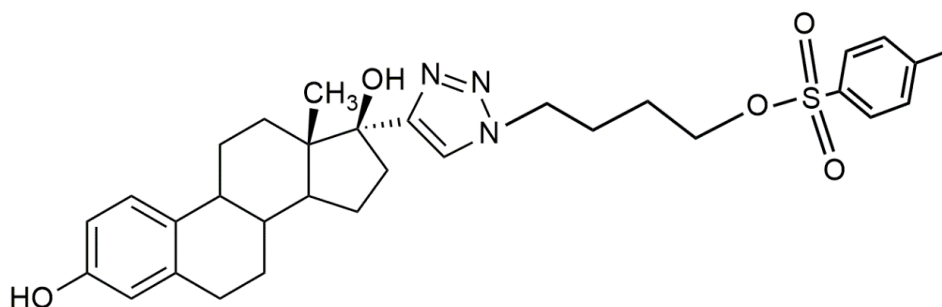
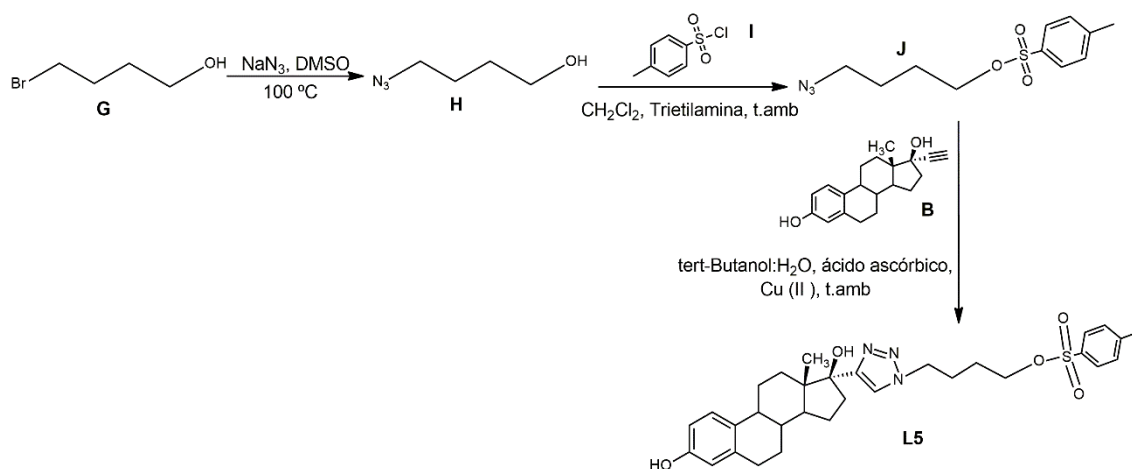


Figura 104: Estructura de **L5**

La síntesis de **L5**, que se muestra en la Figura 113, implicó la sustitución del bromo del 4-bromobutanol (Esquema sintético 5-G) [139] por un grupo azida,

seguida por la incorporación del grupo tosilo y por último una reacción de Huisgen entre la azida de **J** y el triple enlace terminal del etinilestradiol.



Esquema sintético 5: Síntesis de **L5**

El producto **H** fue obtenido con un rendimiento de 56% luego de una extracción entre éter y agua.

La asignación de las señales de $^1\text{H-RMN}$ de **H**, se realizó por comparación con el correspondiente al 4-Bromobutanol (**G**) (Figura 105). Las 2 señales en $\delta=3.67$ y 3.41 ppm, que son multipletes que integran 2 protones cada una, se asignaron mediante aproximaciones teóricas a los protones H1 y H2 y H7 y H8, respectivamente. En la zona de $\delta=1.8$ ppm aparecen tres señales como multipletes que integran 2 protones cada una, dos de las cuales se atribuyen a los protones H3-H6, mientras que se considera que la tercera correspondería a una impureza, al igual que la señal que aparece en 6.51 ppm.

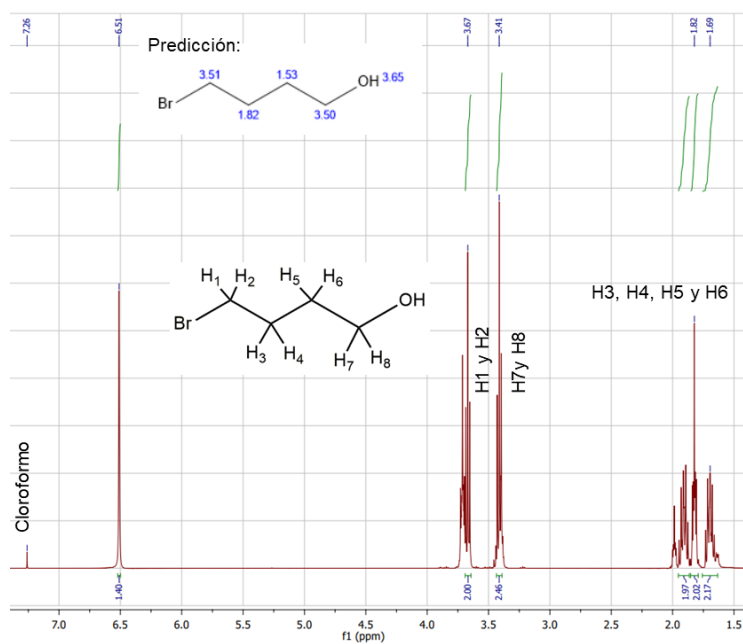


Figura 105: ^1H -RMN de 4-Bromobutanol (G)

En el ^1H -RMN de H (Figura 106) aparecen 2 señales en $\delta=3.69$ y 3.34 ppm que son multipletes que integran 2 protones cada una, las que de acuerdo a aproximaciones teóricas corresponden a los protones H7 y H8 y H1 y H2, respectivamente. En la zona de $\delta=1.68$ ppm aparece una señal que integra 5 protones, que corresponde a los protones H3-H6.

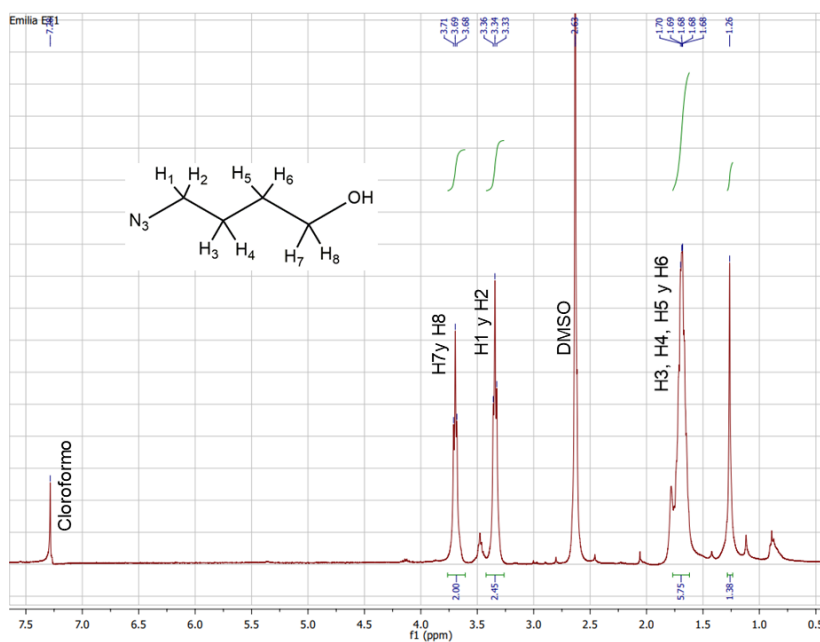


Figura 106: ^1H -RMN de H

El segundo paso de reacción (Esquema sintético 5) se realizó según la técnica ya usada por nuestro grupo previamente [140], basada en la publicación de Hay *et al.* [141]. La purificación de **J** se realizó inicialmente por cromatografía en columna utilizando sílica como soporte, sin tener éxito. No fue posible purificar **J** del reactivo de partida **I**. Además, aparecieron nuevas no identificadas por lo que se supuso que el producto sería ser inestable en sílica. Esta presunción fue confirmada con el ^1H -RMN. que se muestra en la Figura 107.

El singulete a $\delta=1.26$ ppm que integra 3 protones corresponde a los protones del grupo metilo (H13-15). En el producto **H** los protones H1 y H2 aparecían en 3.34 ppm, los protones H7 y H8 en 3.69 ppm y los protones H3-H6 en 1.68 ppm. En este espectro tenemos varias señales que podrían corresponder a estos protones: un triplete en 4.06 ppm que integra 1 H, un triplete en 3.27 ppm que integra 1 H, un doblete en 2.50 ppm que integra 3H y un singulete que integra 3H en 2.46 ppm. No existe ninguna señal cerca de 3.34 ppm que integre 2 protones y pueda corresponder a H1 y H2 y tampoco existe señal en 4.04 ppm que integre dos protones y corresponda a H7 y H8. Además, en la zona correspondiente a los protones aromáticos se observan más señales que las esperables. En suma, el producto obtenido tras la purificación no sería **J**.

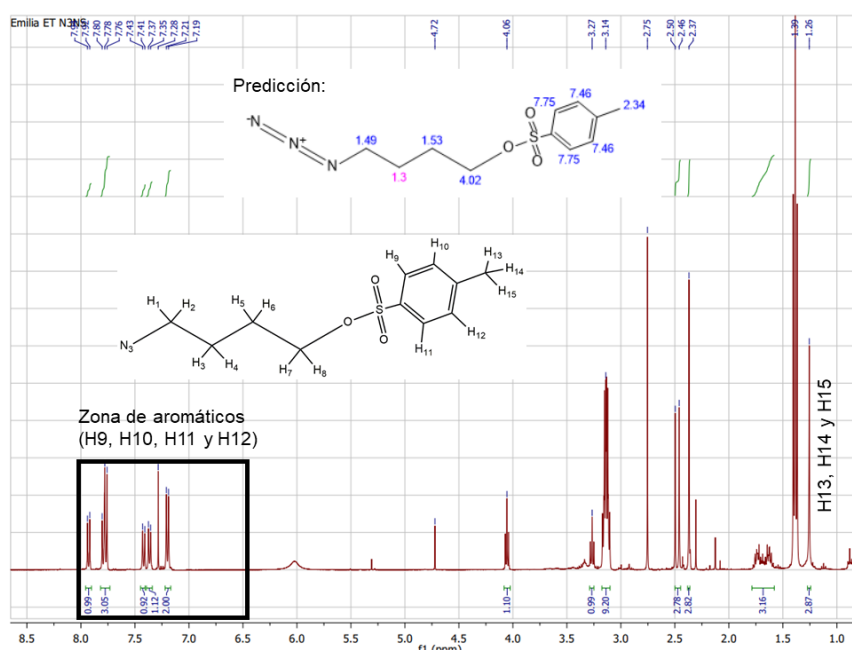


Figura 107: ^1H -RMN de **J**

En función de los resultados obtenidos se plantea la síntesis de un nuevo precursor para marcación con [^{18}F]F, **L6** (Figura 117).

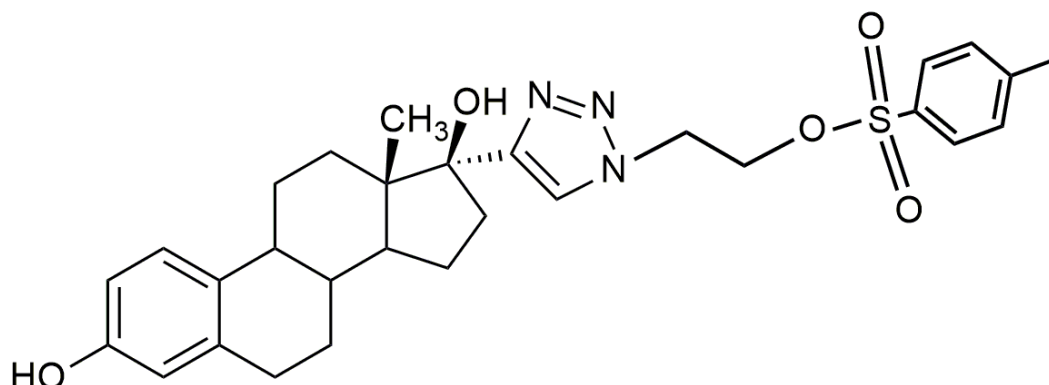
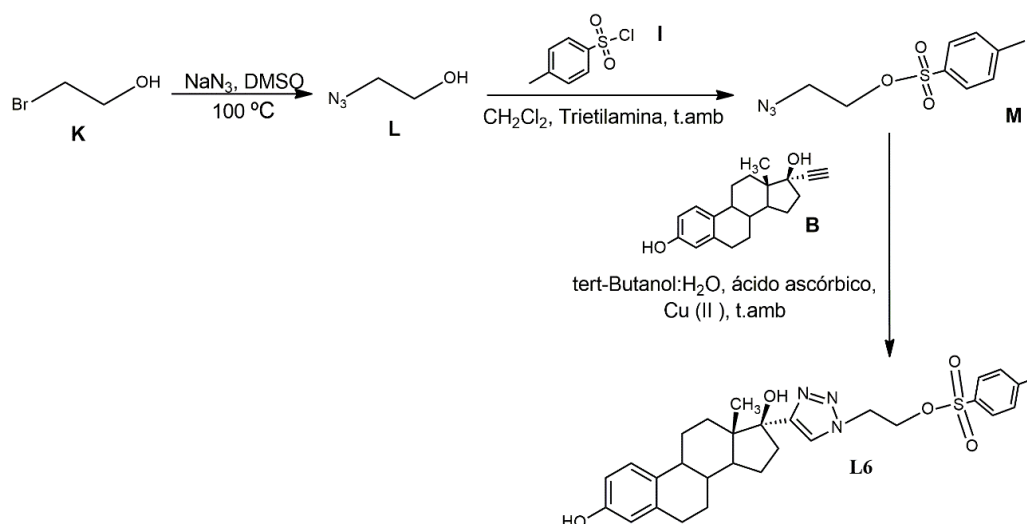


Figura 108: Estructura de **L6**

5.1.6 17[2-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)etil 4-metilbencenosulfonato] estradiol (**L6**)

Dado que en el momento no fue posible obtener 4-bromobutanol se decidió utilizar todo el conocimiento generado en las síntesis de **L5** para la síntesis del ligando 6 (**L6**) emplenado 2-bromoetanol (Esquema sintético 6).

Para la síntesis de **L6** se partió del 2-bromoetanol (Esquema sintético 6-K) reactivo comercialmente disponible. El primer paso de reacción implicó la sustitución del bromo por el grupo azida para obtener **L**; como segundo paso se realizó la incorporación del grupo tosilo como buen grupo saliente para obtener **M** y por último una reacción de Huisgen entre la azida de **M** y el triple enlace terminal del etinilestradiol para obtener **L6**.



Esquema sintético 6: Síntesis de **L6**

El primer paso de reacción se realizó basándose en la técnica de Berta *et.al*[139] obteniéndose **L** con un rendimiento mayor al 90%.

El espectro de ^1H -RMN del producto **L**, se analizará en comparación con el del el 2-Bromoetanol (**K**) (Figura 109). Dicho espectro muestra dos señales que integran 2 protones cada una, lo cual concuerda perfectamente con lo esperado para este tipo de moléculas.

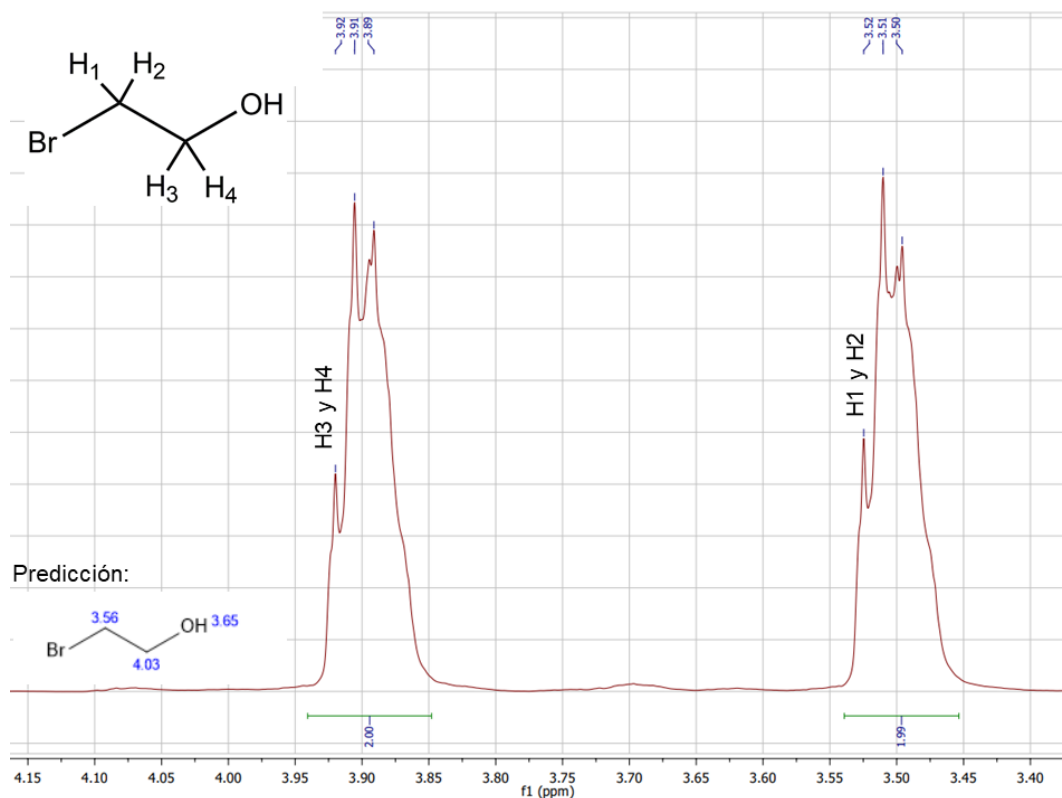


Figura 109: ^1H -RMN de 2-Bromoetanol (**K**)

El ^1H -RMN de **L** (Figura 110) muestra dos señales, una en $\delta=3.38$ ppm corresponde a los protones H₁ y H₂, mientras que la señal en 3.76 ppm corresponde a los protones H₃ y H₄.

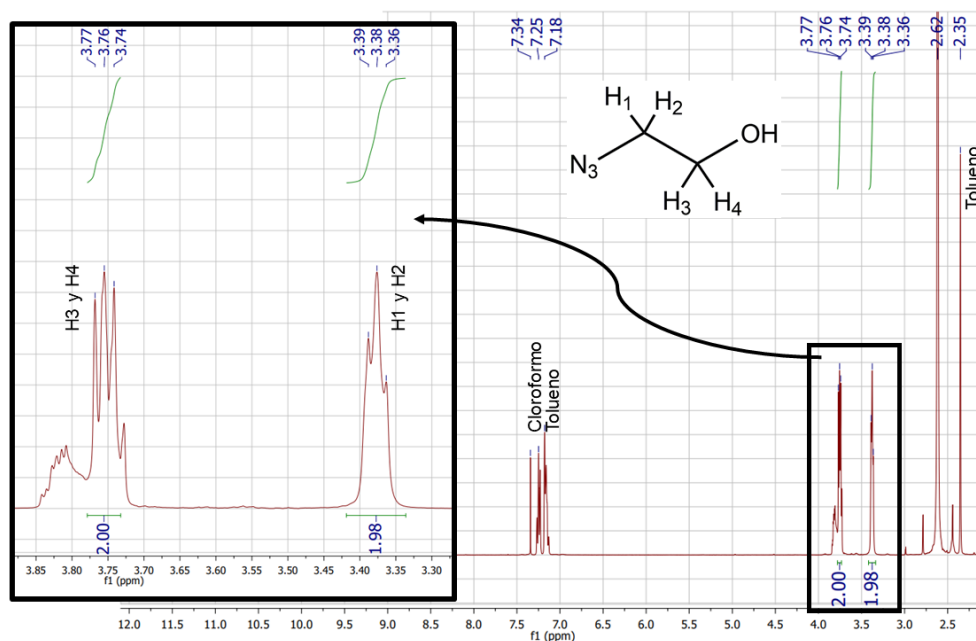


Figura 110: ^1H -RMN de **L**

La incorporación del grupo tosilo (Esquema sintético 6) se realizó según la técnica de Hay *et al.* [141]. Transcurridos cinco días de reacción y aunque el reactivo de partida **I** no se había consumido completamente, se constató la presencia de una nueva especie de menor R_f , el cual fue purificado por cromatografía en columna, utilizando alumina como soporte alúmina obteniéndose **M** con un rendimiento de 17%.

La Figura 111 muestra el ^1H -RMN del producto **M**. En el mismo pueden observarse dos tripletes que integran dos protones cada uno, uno a $\delta=3.49$ ppm y el otro a $\delta=4.17$ ppm. Según la regla de Shoolery los protones H1 y H2 salen a menor desplazamiento químico, mientras que los protones H3 y H4 se ven menos blindados y salen a mayor desplazamiento químico. Por lo tanto, la señal en $\delta=3.49$ ppm corresponde a los protones H1 y H2, mientras que la señal en 4.17 ppm corresponde a los protones H3 y H4. En el espectro aparece una señal a los $\delta=2.46$ ppm, un singlete que integra 3 protones y corresponde a los protones metílicos H9-H11. En la zona de los protones aromáticos aparecen dos dobletes que integran dos protones cada uno. La constante de acoplamiento J de ambos dobletes es de 8 correspondiente a un acoplamiento del tipo orto. Con este dato y con los datos de la predicción teórica se asigna la primera señal en 7.83 ppm a los protones H5 y H7. H5 acopla orto con H8 y H7 acopla orto con

H6. La señal en 7.38 ppm corresponde a los protones H6 y H8. H6 acopla orto con H7 y H8 acopla orto con H5. El estudio de COSY que se muestra en la Figura 112 confirma que estas señales acoplan entre sí.

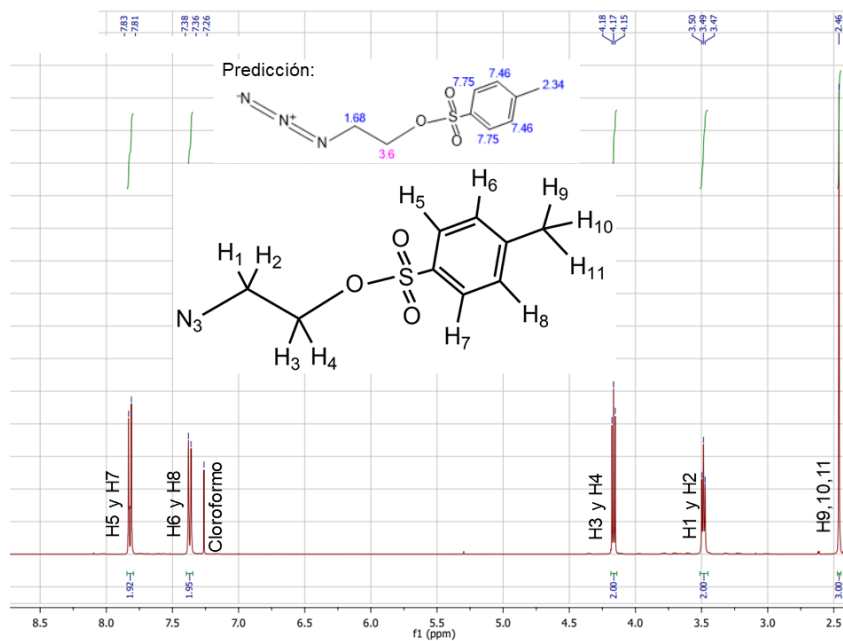


Figura 111: ¹H-RMN de **M**

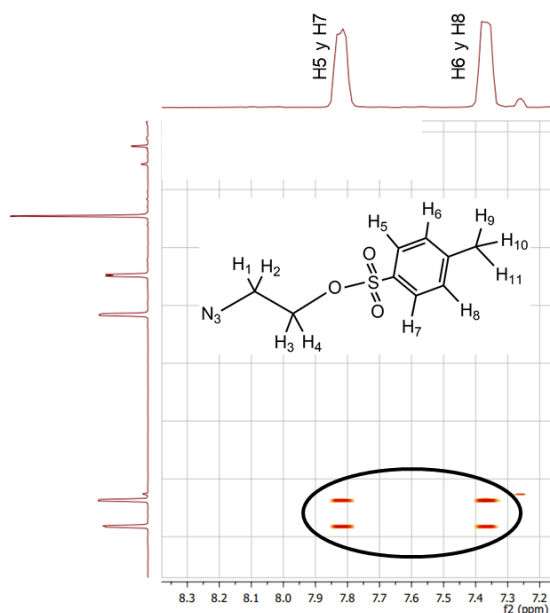


Figura 112: Estudio de COSY de **M** en la zona de aromáticos

El último paso para la síntesis de **L6** fue una reacción de Huisgen, entre el alquino terminal del etinilestradiol (Esquema sintético 6) y la azida de **M** [134,35,36].

Transcurrido 6 días de reacción se realizaron extracciones con acetato de etilo obteniéndose **L6** con un rendimiento mayor al 100%, debido a la presencia de etinilestradiol (el cual no se había consumido completamente) y sales en el crudo de reacción.

La Figura 113 muestra el espectro de ^1H -RMN de **L6**. En el espectro se observa una señal de tipo singulete que integra 1 protón a $\delta=7.52$ ppm. Esta señal no aparece en el espectro de etinilestradiol y corresponde según bibliografía al H22 del anillo triazol, confirmando el éxito de la reacción. Fue posible identificar la señal del grupo metilo CH_3 (H19, H20 y H21), un singulete que integra 6 H, con un desplazamiento químico de $\delta=0.88$ ppm. Esta señal tiene el doble de integración esperada para **L6**, debido a la presencia de etinilestradiol. También se puede observar un singulete que integra 3 protones a $\delta=1.05$ ppm que corresponde a los protones metílicos del **L6** (H31-H33). Se identificaron los protones H4 y H5 como la señal multiplete que integra 4H a $\delta=2.80$ ppm (desplazamiento químico teórico $\delta=2.74$) también con el doble integración. Además pudo identificarse un singulete que integra un protón a $\delta=2.61$ ppm, que corresponde al protón del triple enlace terminal del etinilestradiol, en cuyo espectro aparecía en $\delta=2.91$ ppm.

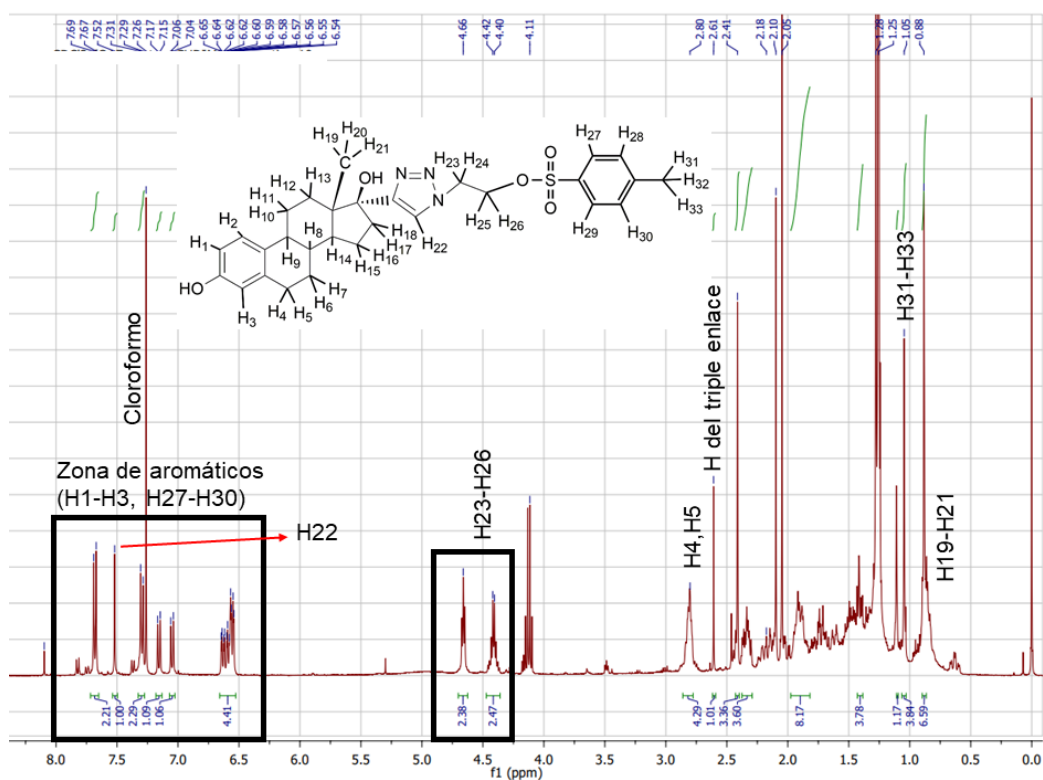


Figura 113: ^1H -RMN de **L6**

Además, fue posible identificar como se muestra en la Figura 114 el patrón de protones aromáticos del etinilestradiol (doblete para H2, doblete de doblete para H1 y doblete para H3). Este patrón se encuentra repetido en el espectro, ya que 3 protones pertenecen a **L6** y tres al etinilestradiol. Además, se encontró el patrón de protones aromáticos de **M**, un doblete que integra dos protones a los $\delta=7.31$ ppm correspondiente a H28 y H30 y un doblete que integra dos protones a los $\delta=7.69$ ppm correspondiente a H27 y H29.

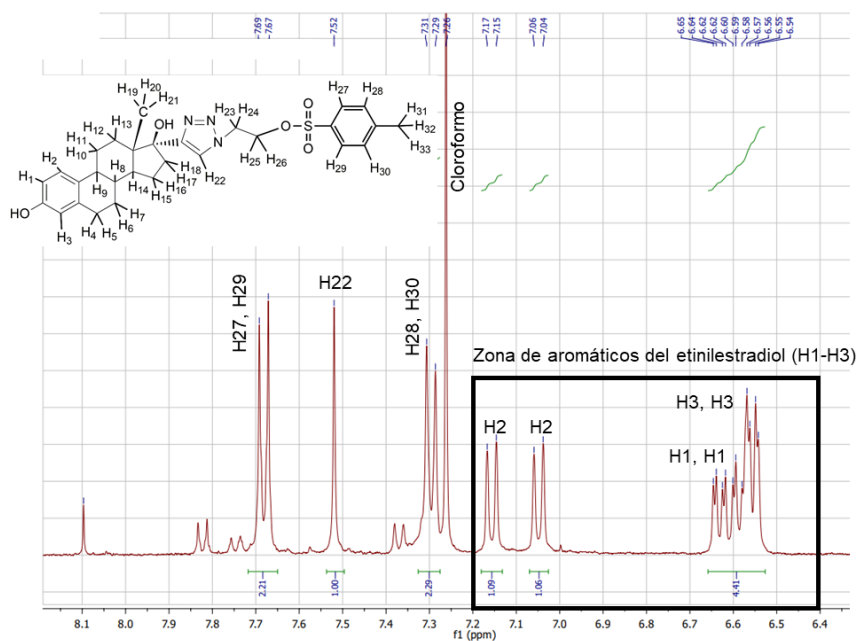


Figura 114: ^1H -RMN de **L6** zona de protones aromáticos

Como se muestra en la Figura 115 fue posible identificar los protones H23-H26. La señal en $\delta=4.42$ ppm corresponde a los protones H23 y H24, mientras que la señal en $\delta=4.66$ ppm corresponde a los protones H25 y H26.

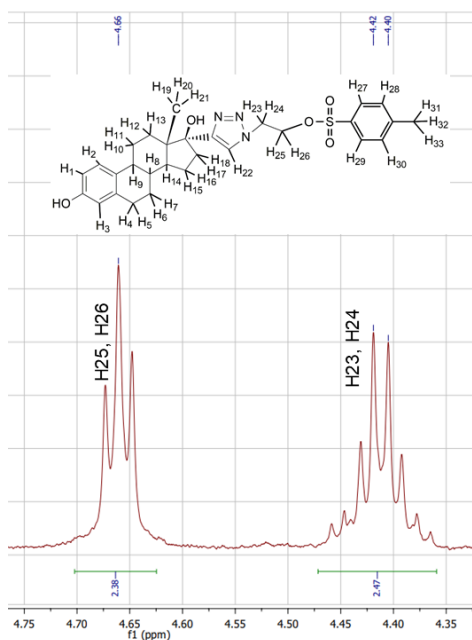
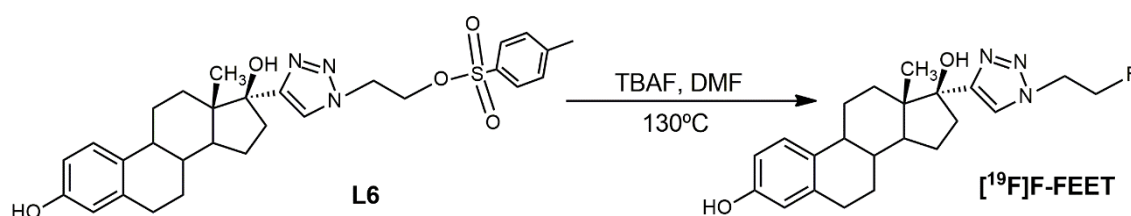


Figura 115: ^1H -RMN de **L6**, identificación de los protones H23-H26

Los espectros analizados muestran claramente que el ligando **6** no se encuentra puro, razón por la cual se decidió intentar una nueva estrategia sintética y simultáneamente iniciar la optimización de la marcación con $[^{18}\text{F}]\text{F}$ utilizando este ligando.

5.2 17[1-(2-fluoroetil)-1*H*-1,2,3-triazol] estradiol ($[^{19}\text{F}]\text{F-EEET}$)

La síntesis del $[^{19}\text{F}]\text{F-EEET}$, análogo no radiactivo del $[^{18}\text{F}]\text{F-EEET}$ se muestra en el Esquema sintético 7. Para ello se sustituyó el grupo tosilo de **L6** por $[^{19}\text{F}]\text{F}$ utilizando TBAF [142].



Esquema sintético 7: Síntesis de $[^{19}\text{F}]\text{F-EEET}$

A la hora de reacción se constató que **L6** no se había consumido completamente. Mayores tiempos de reacción no mostraron mayor avance de la misma. Se realizaron extracciones con éter y agua, extrayéndose el producto de interés y el reactivo de partida en la fase orgánica. El rendimiento de reacción fue mayor al 100% debido a la presencia de **L6**.

La Figura 116 muestra el espectro de $^1\text{H-RMN}$ del ($[^{19}\text{F}]\text{F-EEET}$). Las señales obtenidas resultaron de muy baja intensidad y no se encontró el patrón esperado.

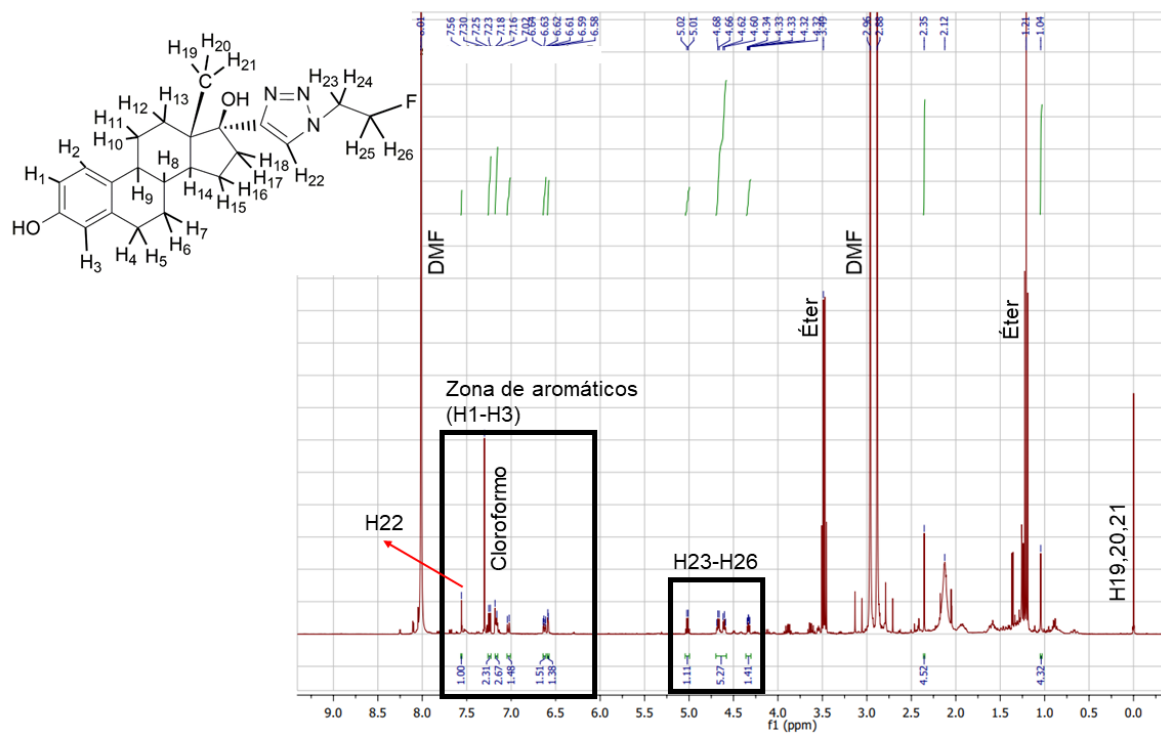


Figura 116: ¹H-RMN del 17[1-(2-fluoroetil)-1H-1,2,3-triazol] estradiol ([19F]F-FEET)

Sin embargo, fue posible concluir que la reacción de fluoración se produjo, ya que al observar las señales correspondientes a H23, H24, H25 y H26 vemos un cambio drástico entre el espectro de **L6** y el que se está analizando. En **L6** aparece un cuarteto en $\delta=4.42$ ppm que corresponde a los protones H23 y H24 y un triplete en $\delta=4.66$ ppm que corresponde a los protones H25 y H26. En el caso del estándar como se muestra en la Figura 117 aparecen dos señales, un multiplete en 4.35 ppm correspondiente a H23 y H24 y un segundo multiplete en 4.68 ppm correspondiente a H25 y H26. Cabe destacar que el ¹⁹F es activo en RMN y se comporta como un pequeño “imán” acoplado con los protones adyacentes. Por este motivo, las señales contiguas al Flúor (H23-H26) acoplan no solo con los protones adyacentes sino también con el flúor, obteniéndose multipletes para estos protones.

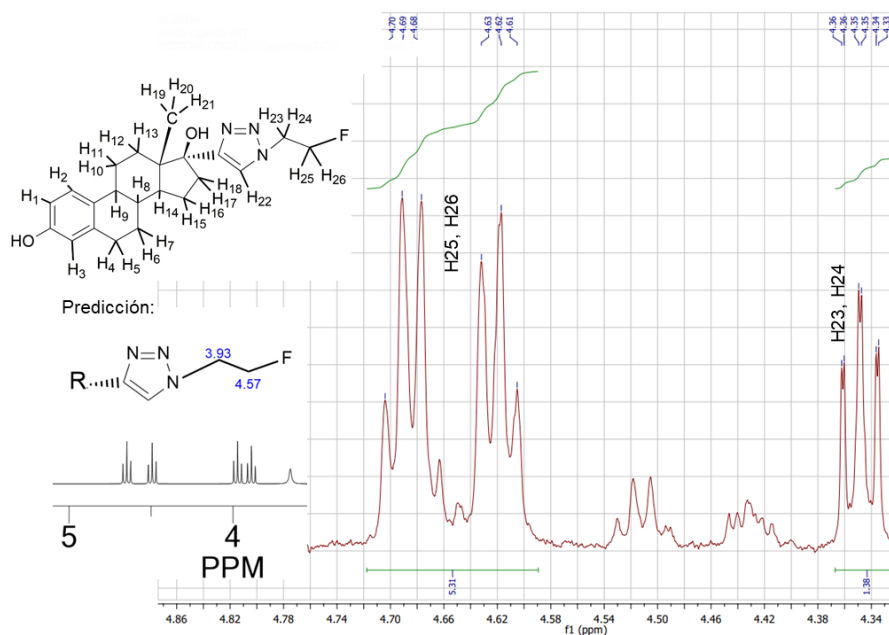


Figura 117: ^1H -RMN del Estándar, asignación H23-H26

Debido a las anomalías del ^1H -RMN y para constatar la presencia del producto de interés, se realizó una espectrometría de masas del crudo de reacción mediante ESI-EM (Ionización por Electrospray) en modo positivo. El espectro muestra un ión con una relación m/z de 385 correspondiente al compuesto ^{19}F F-FEET (M^+).

5.3 Preparación de los complejos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Tc

5.3.1 Síntesis del complejo $[[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{I})(\text{CO})_3\text{L1}]$ (**C1**)

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

La síntesis del complejo 1 del tipo $^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{I})$ tricarbonílico fue desarrollada por sustitución de **L1** con el complejo precursor $fac\text{-}[[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$. El mismo se obtuvo por reducción de pertecneiato de sodio en presencia de CO (g) en un medio fuertemente alcalino dado por el tartrato de sodio y potasio ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) y el carbonato de sodio (Na_2CO_3) y utilizando borohidruro de sodio como reductor [27,28,29] (Figura 118).

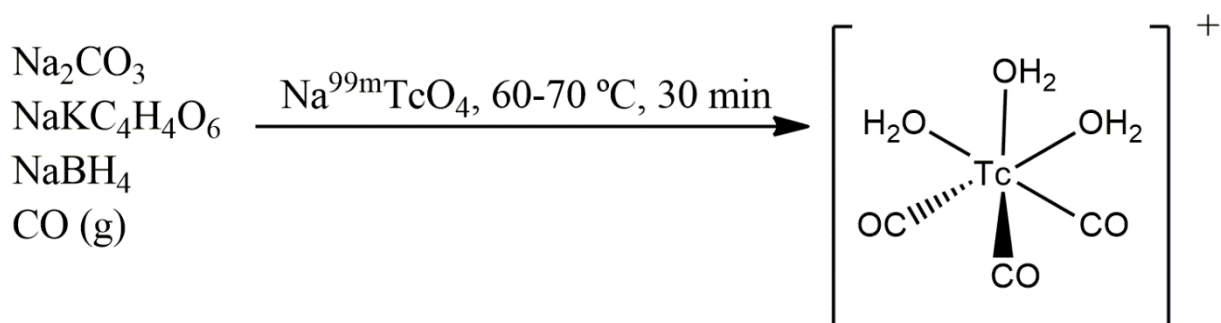


Figura 118: Síntesis del precursor *fac*[[^{99m}Tc]Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺

Este precursor puede obtenerse también empleando un kit comercial, el cual contiene boranocarbonato de sodio (Na₂BH₃CO₂) que actúa como dador de CO “in situ” y como reductor, en presencia de carbonato de sodio para dar el medio alcalino [143,144]. Ambas reacciones se basan en el mismo principio, solamente cambia la forma de suministrar el CO y el reductor. Además, ambas son capaces de generar el precursor con alto rendimiento a presión atmosférica.

El procedimiento tradicional de preparación de este tipo de complejos requería altas presiones y altas temperaturas. Mientras que en este caso, la reacción puede realizarse a presión atmosférica y a temperaturas de entre 75-100 °C debido a la baja concentración del metal y a la alta afinidad del centro metálico para capturar 3 moléculas de CO, como forma de estabilizar el estado de oxidación +1.

La PRQ del precursor fue controlada por HPLC utilizando el sistema descrito en la sección 4.2.3.1.1. El perfil cromatográfico obtenido (Figura 119) muestra que la reacción ocurrió de forma cuantitativa, ya que se obtuvo una única especie de PRQ mayor al 90%, con un tiempo de retención entre los 4-5 min que corresponde al acuo-complejo deseado [27,28,29]

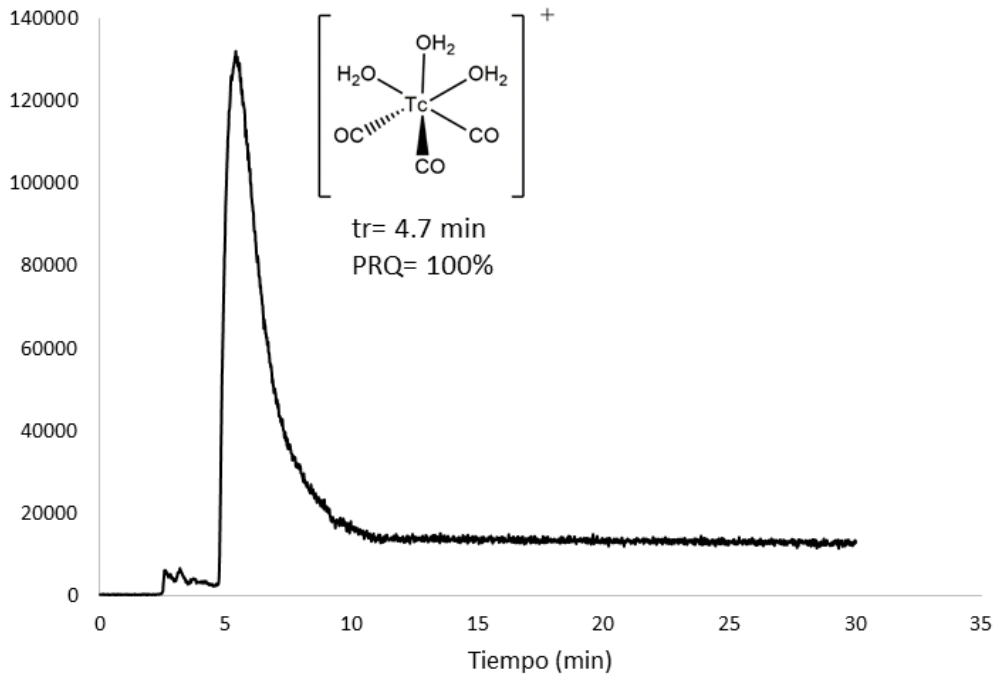


Figura 119: Perfil cromatográfico obtenido para el complejo $fac[[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$

El pertecneiato es una potencial impureza en la síntesis del precursor por ser un reactivo de partida. Esta especie presenta un tiempo de retención de 11.4 min en idénticas condiciones cromatográficas (Figura 120).

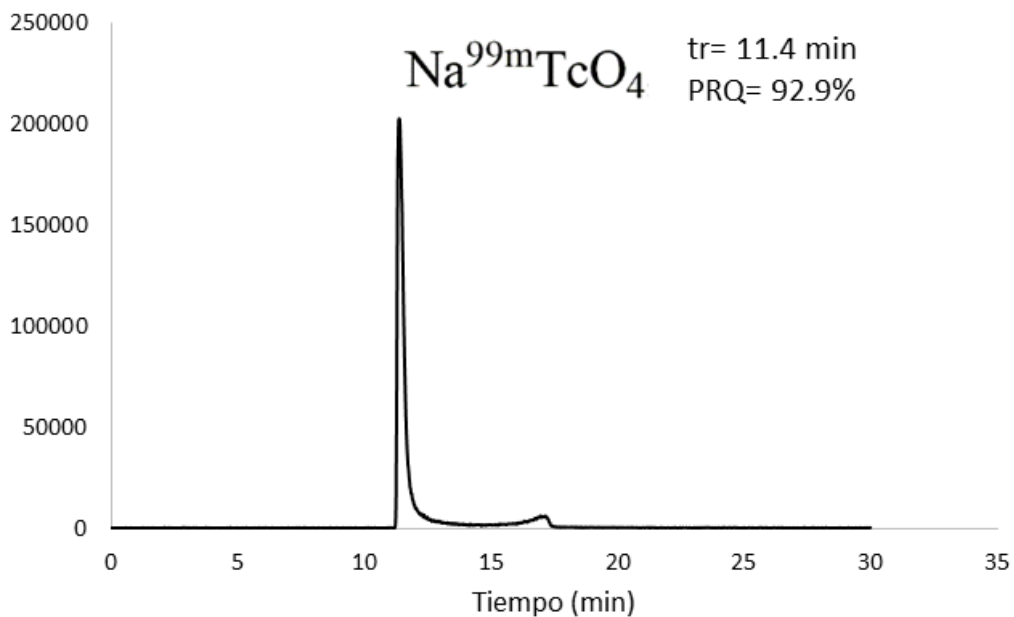


Figura 120: Perfil cromatográfico obtenido para el pertecneiato de sodio

5.3.1.2 Síntesis de **C1**

La preparación de **C1** se realizó usando dos estrategias diferentes. La primera implicó la síntesis del ligando protegido **L1-BOC** a través de una reacción de Huisgen realizada *in situ*. La reacción *in situ* consiste en realizar la reacción sin una etapa de purificación previo a la marcación. La reacción *in situ* al igual que la reacción en gran escala genera un triazol 1,4 disustituido y fue catalizada por Cu(I). Transcurrido el tiempo de reacción, se realizó la desprotección por hidrólisis con ácido trifluoroacético (TFA). Finalmente, se realizó la sustitución obteniéndose **C1** (Figura 121) [134,135].

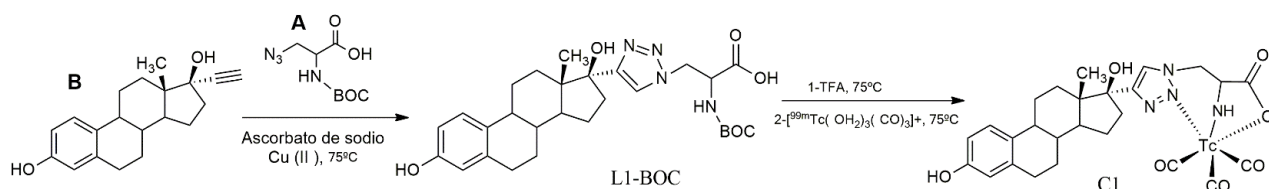


Figura 121: Primera estrategia para la obtención de **C1**

La PRQ de **C1** se evaluó por HPLC. Se obtuvo una especie mayoritaria con un tiempo de retención de 20 min que se adjudicó a **C1**. La PRQ osciló entre 60-80%, siendo las impurezas encontradas el precursor tricarbónico y el pertecneciato (Figura 122).

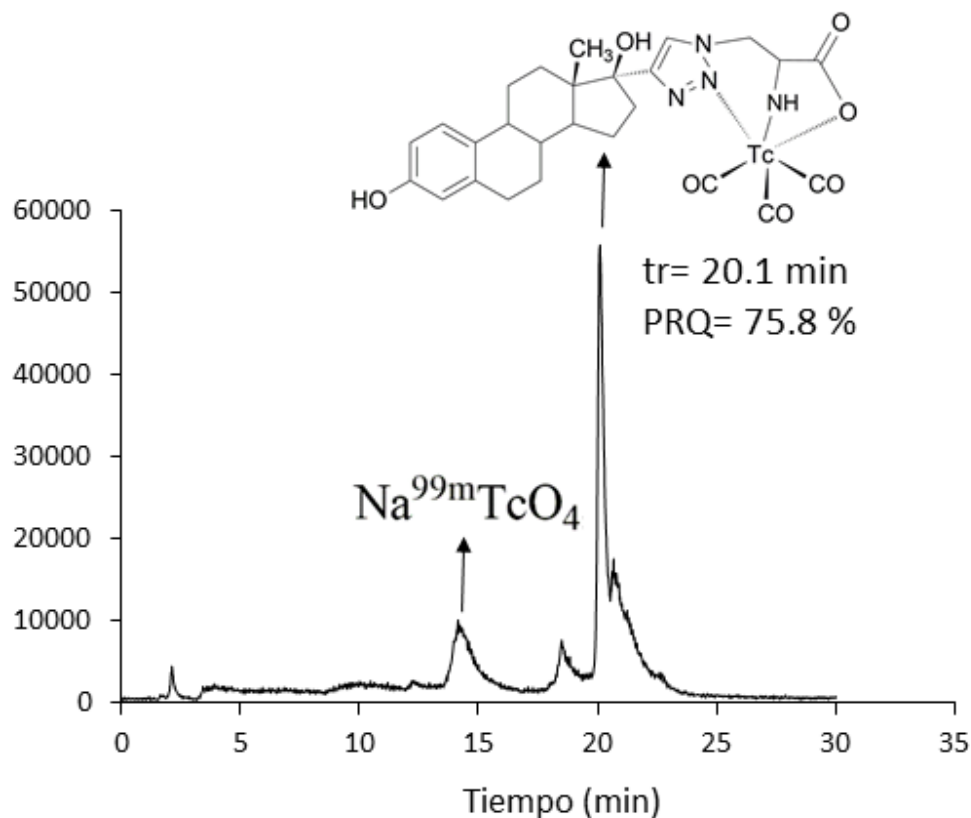


Figura 122: Perfil cromatográfico obtenido para **C1** con la primera estrategia

Intentando mejorar el rendimiento de marcación se utilizó una estrategia alternativa, que se muestra en la Figura 123. Se partió del ligando **L1-BOC** ya sintetizado como se muestra en la sección 5.1.1 [134,35,36] y se realizó la desprotección *in situ* [135], de manera de dejar libre el grupo amino necesario para la coordinación con el radiometal. Finalmente, se realizó la neutralización de la mezcla y se procedió a la sustitución con el $fac[[^{99m}Tc]Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$.

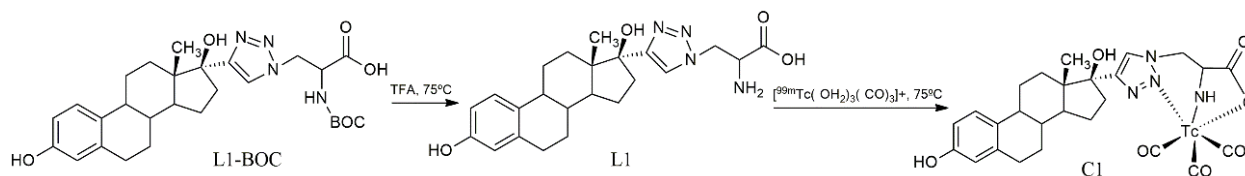


Figura 123: Segunda estrategia para la obtención de **C1**

A fin de mejorar el rendimiento de la reacción fue necesario optimizar algunos parámetros mostrados en la Tabla 15. **L1-BOC** fue disuelto en metanol ya que la disolución fue completa, el disolvente está disponible en el laboratorio y es

fácil de eliminar bajo atmosfera de nitrógeno si fuera necesario para algún tipo de ensayo. La temperatura de reacción se seleccionó en base a la literatura [35,36]. La desprotección de **L1-BOC** se realizó variando la cantidad de TFA utilizada, obteniendo el mejor resultado con 25 μL (43 eq). La masa de **L1-BOC** seleccionada fue de 4mg, ya que el aumento de la misma no mejoró la PRQ. El tiempo de la reacción de sustitución seleccionado fue de 30 min, ya que no hay cambio significativo en la PRQ por aumento del tiempo.

<i>Parámetro a optimizar</i>		<i>PRQ C1 (%)</i>
<i>Cantidad de TFA</i>	6 μL	80.1
	25 μL	81.3
<i>Masa de L1-BOC</i>	1 mg	37.2
	4 mg	60-80
	8 mg	64.8
<i>Tiempo de reacción</i>	30 min a 75°C	97.2
	60 min a 75°C	95.3

Tabla 15: Optimización de la marcación con $^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc para obtener **C1**

A pesar de la optimización realizada la PRQ no mejoró. En todos los casos la impureza obtenida fue el pertechnetato de sodio (Figura 124-A). Por lo tanto, para realizar los estudios fisicoquímicos, de estabilidad, *in vitro* e *in vivo* fue necesario purificar por HPLC de manera de obtener un complejo de PRQ mayor al 90% (Figura 124-B). La única ventaja de este procedimiento fue la disminución de la cantidad de horas de trabajo en el laboratorio.

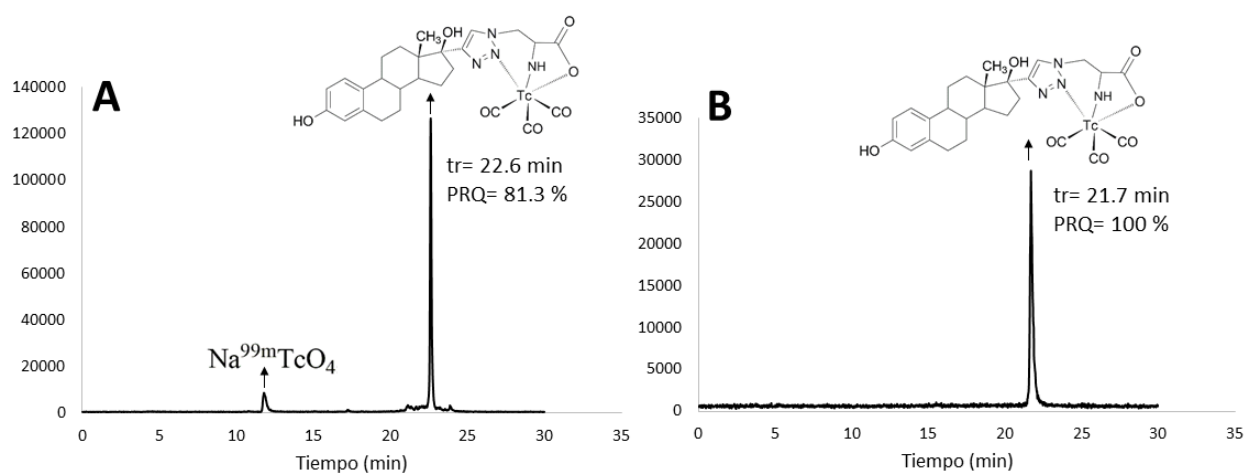


Figura 124: A: perfil cromatográfico obtenido para **C1** con la segunda estrategia, B: **C1** purificado

La estructura propuesta para **C1** se muestra en la Figura 125. Como puede verse el ligando derivado de estradiol posee un hidroxilo de ácido carboxílico, un nitrógeno aromático del grupo 1,2,3-triazol y un nitrógeno alifático de la amina primaria que son grupos donores de electrones adecuados para la coordinación con el core tricarbónilico. Es posible afirmar este tipo de coordinación ya que existe numerosa bibliografía que lo avala [28,29,35,36].

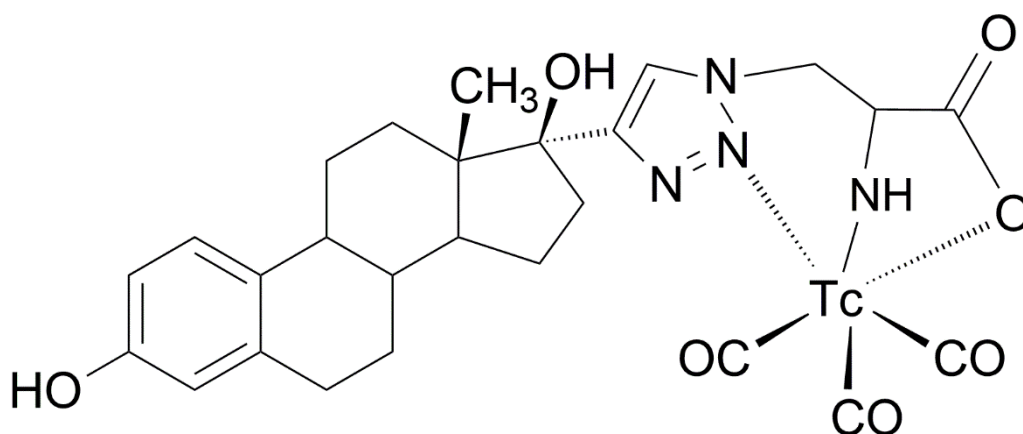


Figura 125: Estructura propuesta para **C1**

5.3.2 Síntesis del complejo de $[[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{V})\equiv\text{N L2}]$ (**C2**)

5.3.2.1 Síntesis del core $[[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{V})\text{nitrido}]$

La síntesis del complejo 2 fue desarrollada por sustitución de **L2** con el precursor conteniendo el core $[[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{V})\text{nitrido}]$.

La preparación del precursor se realizó en medio acuoso empleando SnCl_2 como reductor y dihidracida succínica (SDH= $\text{H}_2\text{NNHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$) como fuente de nitrógeno. Se emplea dihidracida succínica debido a que tiene una muy buena solubilidad en agua y una baja toxicidad. La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente y en 20 minutos de incubación. La PRQ del precursor fue controlada por cromatografía en papel y fue mayor al 90% en todos los casos.

5.3.2.2 Síntesis de **C2**

C2 se obtuvo incubando **L2** disuelto en metanol con el precursor previamente sintetizado (Figura 126).

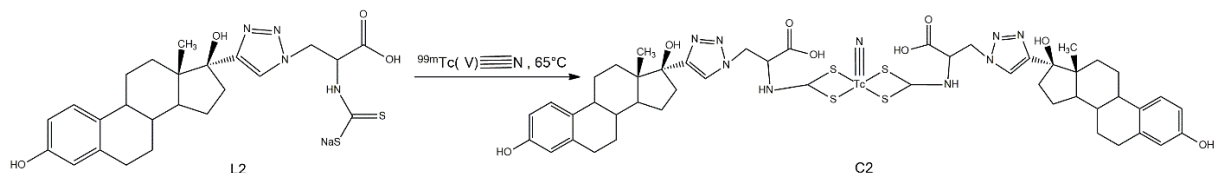


Figura 126: Síntesis de **C2**

Se optimizaron algunos parámetros mostrados en la Tabla 16. La masa de **L2** seleccionada fue de 3 mg y la temperatura de reacción fue de 65°C ya que la PRQ fue de 100% en estas condiciones.

<i>Parámetro a optimizar</i>		<i>PRQ C2 (%)</i>
<i>Masa de L2</i>	1 mg	54
	3 mg	100
	10 mg	100
<i>Temperatura de reacción</i>	30 min a 75°C	100
	30 min a 65°C	100

Tabla 16: Optimización de la marcación con $^{99m}\text{Tc}[\text{Tc}]$ para obtener **C2**

Se obtuvo una única especie con una PRQ mayor al 90% y un tiempo de retención de 11.7 min (Figura 127).

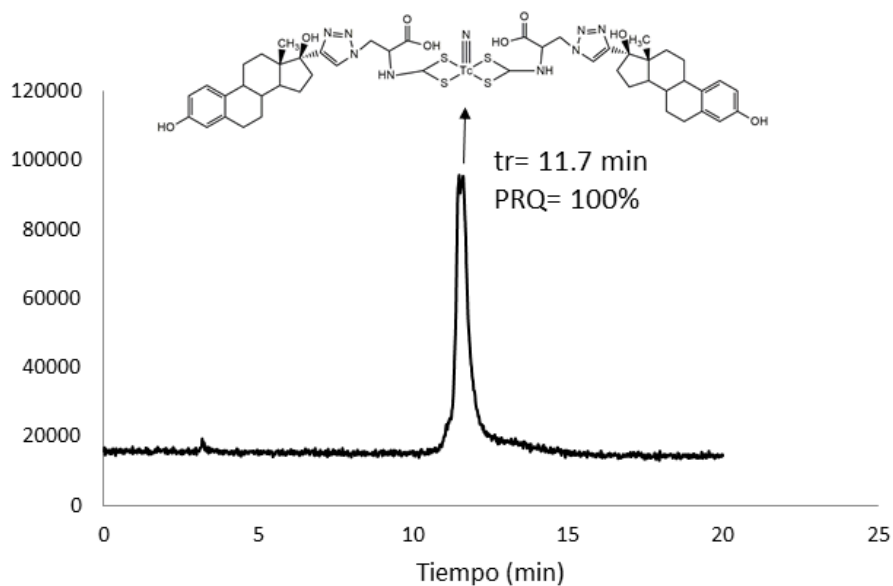


Figura 127: Perfil cromatográfico obtenido para **C2**

La estructura propuesta para **C2** se muestra en la Figura 128. El ligando posee un grupo ditiocarbamato que proporciona dos átomos donadores de electrones (C=S, C-S) para coordinar con el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$, formándose un complejo simétrico ya que los electrones del doble enlace C=S y el enlace C-S (ambos grupos del ditiocarbamato) son equivalentes por deslocalización de los mismos. En los complejos simétricos se completa la esfera de coordinación del “core” con 2 moléculas del ligando bidentado (**L2**). [60,61,66].

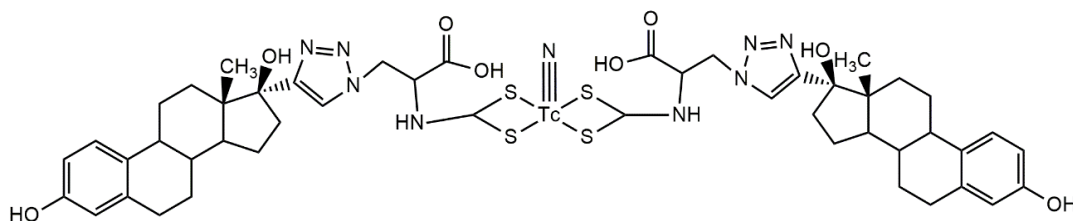


Figura 128: Estructura propuesta para **C2**

5.3.3 Síntesis del complejo de [^{99m}Tc]Tc(III)NS₃L3 (**C3**)

5.3.3.1 Síntesis del precursor [^{99m}Tc]Tc(III)EDTA

La síntesis del complejo de [^{99m}Tc]Tc(III) 4+1 se realizó por sustitución utilizando [^{99m}Tc]Tc(III)EDTA] como precursor. En este tipo de complejos el ligando actúa como monodentado y la esfera de coordinación se utilizó un coligando tetradentado, el 2-[Bis (2-mercaptoetil) amino] etanotiol (NS₃).

La síntesis del precursor [^{99m}Tc]Tc(III)-EDTA se realizó en medio acuoso utilizando SnCl₂ como reductor. La reacción es muy rápida y transcurre a temperatura ambiente obteniéndose el compuesto de interés con una elevada PRQ [49]. El control de la misma fue realizado por cromatografía en papel, de acuerdo con lo descrito en la sección 4.2.3.3.1, obteniéndose un valor superior al 90% en todos los casos [49].

5.3.3.2 Síntesis del complejo 3 (**C3**)

C3 fue obtenido por reacción de **L3** y NS₃ disueltos en metanol con el precursor [^{99m}Tc]Tc-EDTA (Figura 129).

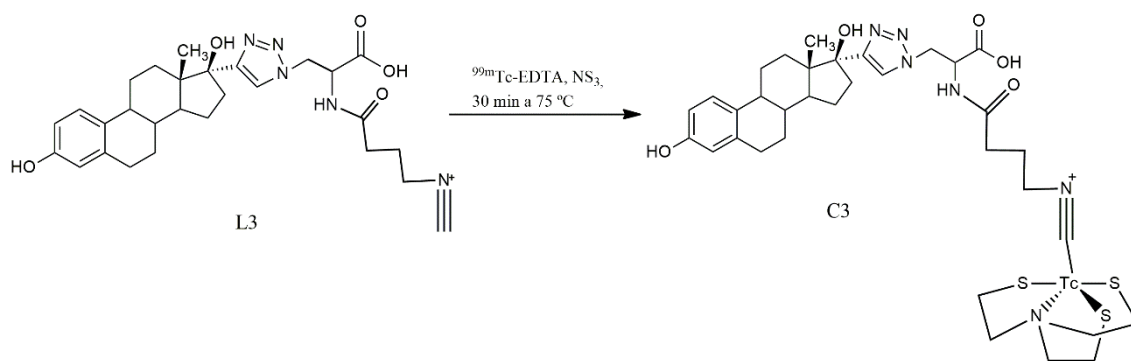


Figura 129: Síntesis de **C3**

Se optimizaron algunos parámetros, los que se muestran en la Tabla 17. Se varió la masa de **L3**, seleccionándose el valor de 1 mg, ya que se obtuvo una PRQ de 69% que permaneció invariable al aumentar la masa del ligando. También se varió la masa de NS₃, concluyéndose que la relación molar ligando 1/coligando 3 generaba el producto con la PRQ más alta, permaneciendo el valor incambiado

al aumentar la masa de NS₃. La temperatura y tiempo de reacción fueron seleccionadas debido a la experiencia previa del grupo [49].

<i>Parámetro a optimizar</i>		<i>PRQ C2 (%)</i>	<i>Observaciones</i>
<i>Masa de L3</i> <i>(2 mg de NS₃)</i>	20 mg	69%	-
	1 mg	69%	-
<i>Masa de NS₃</i> <i>(1 mg de L3)</i>	0.3mg	29%	Relación molar L3-NS ₃ 1-1
	0.5mg	32%	Relación molar L3-NS ₃ 1-1.5
	1mg	59%	Relación molar L3-NS ₃ 1-3
	4mg	58%	Relación molar L3-NS ₃ 1-10

Tabla 17: Optimización de la marcación con [^{99m}Tc]Tc para obtener **C3**

La sustitución del precursor con **L3** y NS₃ da lugar a varias especies como se muestra en el cromatograma de la Figura 130-A. La especie mayoritaria presentó un de tr= 13.98 min y una PRQ de 69%. Para realizar los estudios posteriores se purificó la especie de interés por HPLC obteniéndose el cromatograma de la Figura 130-B.

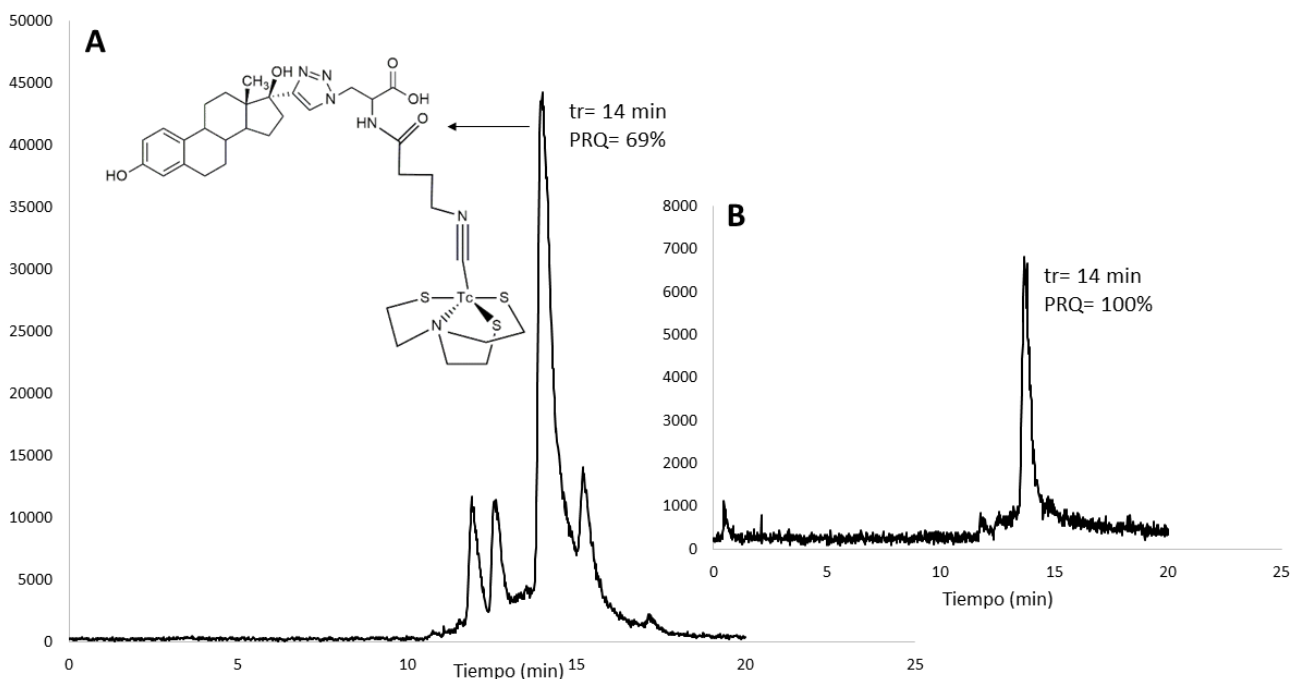


Figura 130: A-perfil cromatográfico obtenido para **C3**, B-**C3** purificado

La estructura propuesta para **C3** se muestra en la Figura 131. El ligando **L3** posee un isonitrilo como grupo donador de electrones, el cual ocupa una posición en la esfera de coordinación, mientras que las 4 posiciones restantes son ocupadas por un coligando el 2-[Bis (2-mercaptoetil) amino] etanotiol (NS_3).

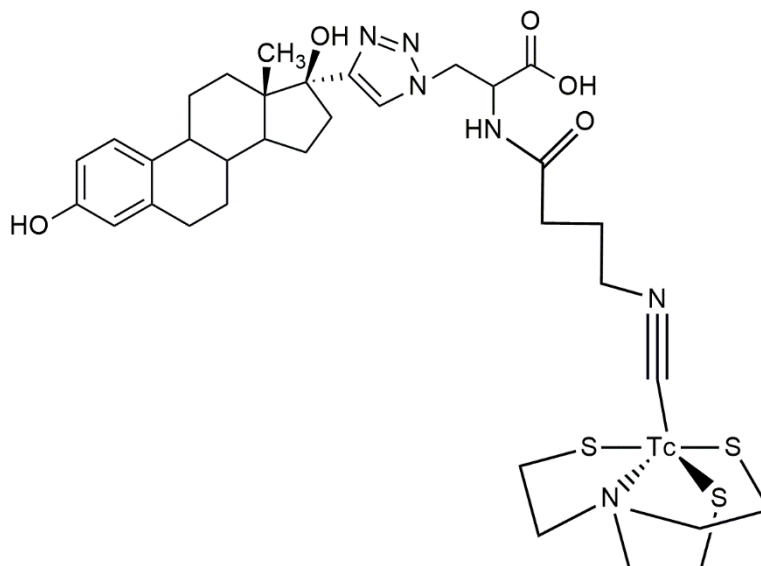


Figura 131: Estructura propuesta para **C3**

Los complejos $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{III})\ 4 + 1$ formados por un ligando tetradentado y un isonitrilo monodentado presentan alta estabilidad debido al efecto quelato.

Además, se facilita la introducción de biomoléculas a través del ligando monodentado. La opción de funcionalizar el ligando monodentado simplifica las estrategias sintéticas en relación a funcionalizar una molécula polidentada. Además, es posible modular las propiedades fisicoquímicas y por ende la farmacocinética del complejo resultante modificando el coligando tetradentado.

Es destacable que la disposición espacial de ligando monodentado y el coligando tetradentado es tal que actúa como blindaje estérico para el metal, evitando que este interfiera en las propiedades biológicas del ligando [45-49].

5.4 Síntesis del trazador [^{18}F]F-FEET

El trazador de [^{18}F]F propuesto se obtuvo a través de una reacción de Huisgen incorporando en posición 17 del estradiol un anillo triazólico, que en posición 4 posee una cadena carbonada con el [^{18}F]F (Figura 132). Se decidió trabajar con este ligando siguiendo la estrategia sintética previamente utilizada en la preparación de los ligandos para marcación con [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc.

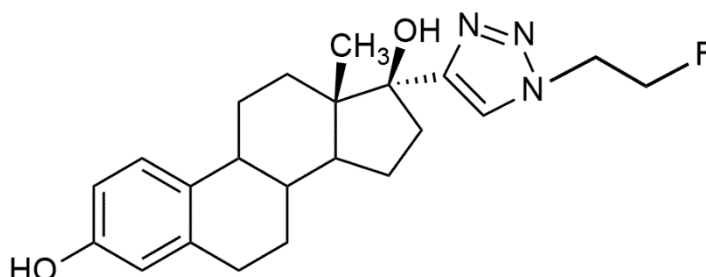


Figura 132: Estructura del trazador de fluor propuesto [^{18}F]F-FEET

5.4.1 Síntesis del trazador [^{18}F]F-FEET partiendo de L6

El [^{18}F]F-FEET fue preparado a partir de L6 mediante sustitución nucleofílica con el [^{18}F]F. La misma se realizó en un módulo automatizado de síntesis Synthra RNplus Research (Figura 133).

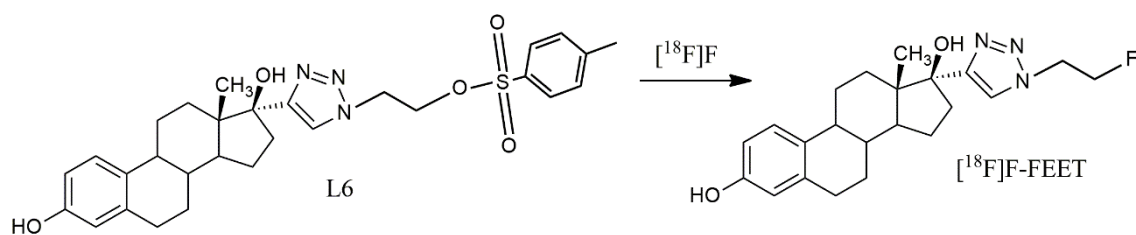


Figura 133: Síntesis del $[^{18}\text{F}]\text{F-FEET}$ partiendo de L6

Durante esta etapa se optimizó un sistema HPLC adecuado, descrito en la sección 4.2.4.1 para determinar el tiempo de retención y la PRQ del trazador de interés, así como los tiempos de retención de L6 y el fluoruro.

La Figura 134-A muestra el perfil cromatográfico de L6, observándose una única especie de $t_r=11.1$ min. El cromatograma del $[^{19}\text{F}]\text{F-FEET}$ (Figura 134-B) muestra varias especies, siendo la principal la que aparece a un $t_r=9.6$ min. El fluoruro, aparece como una única especie a $t_r=1.7$ min (Figura 134-C).

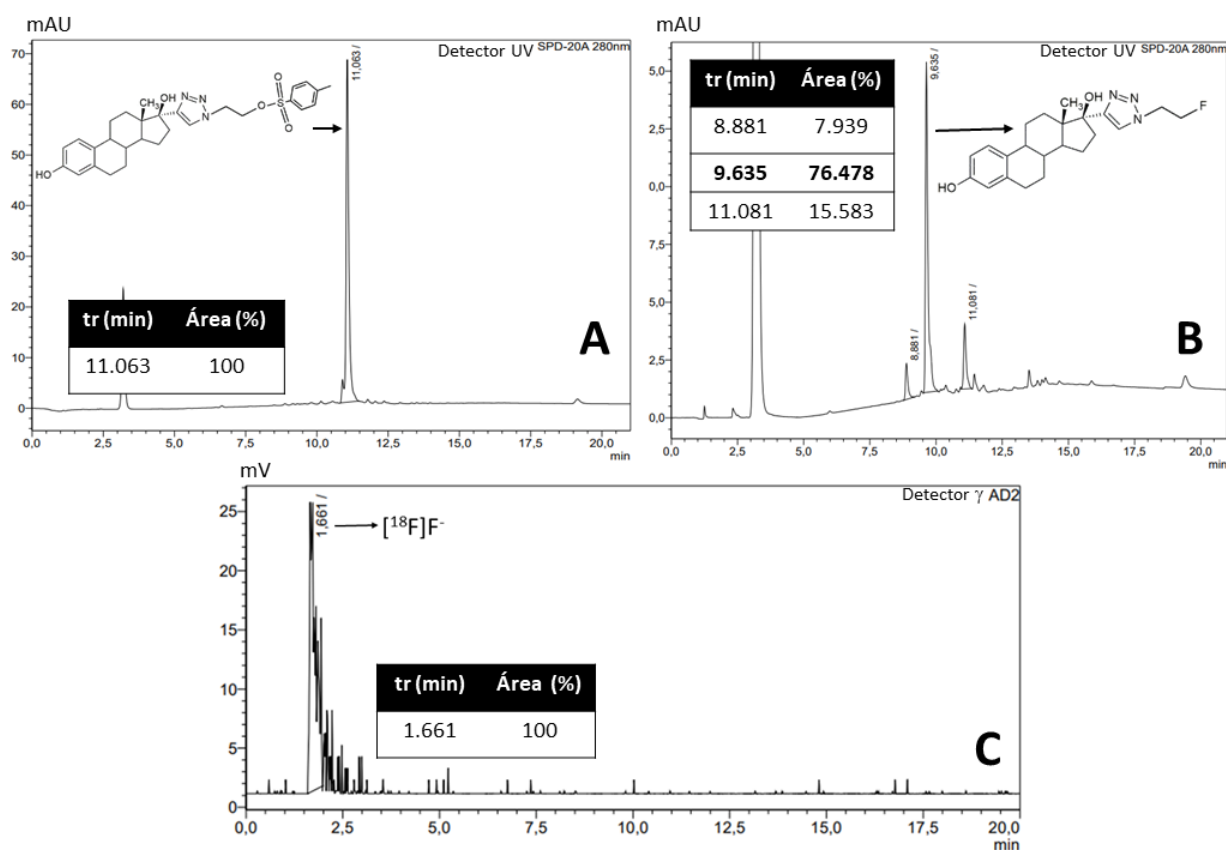


Figura 134: Perfiles cromatográficos de A-L6, B- $[^{19}\text{F}]\text{F-FEET}$, C-Fluoruro

Las condiciones para la primera marcación con $[^{18}\text{F}]\text{F}$ realizada en forma automática fueron seleccionadas tomando como base la experiencia previa del

grupo en este tipo de marcaciones [81]. Para ello, se utilizaron 5mg del ligando, CH₃CN anhidro como disolvente, 15 mg de Kriptofix y 3.5 mg de carbonato de potasio y un tiempo de 30 min de reacción a 100°C (A=376 mCi). La solución obtenida tenía un color marrón, y el análisis cromatográfico de la misma mostró la presencia de fluoruro como única especie radiactiva mientras que el cromatograma UV evidenció la presencia de varias especies, por lo que se asumió que **L6** se descompuso. Por este motivo se realizaron diferentes pruebas de estabilidad del ligando (Tabla 18) a fin de establecer condiciones donde el ligando no sufriera descomposición. Se encontró que, al disminuir la masa de carbonato de potasio a 1 mg, **L6** no se descomponía.

Las marcaciones realizadas en estas condiciones (1-4) se resumen en la Tabla 15. En todos los casos se utilizó 1mg de **L6**, 15mg de Kriptofix y 1mg de K₂CO₃ mientras que se variaron los disolventes, así como los tiempos y temperaturas de reacción.

<i>n=1</i>	<i>L6 - disolvente</i>	<i>Tiempo/ Temperatura</i>	<i>Actividad (mCi)</i>	<i>Rendimiento (%)</i>
<i>Marcación 1</i>	1 mg-DMSO	30 min/50°C	280	1.6
<i>Marcación 2</i>	1mg- DMSO	20 min/80°C	341	1.5
<i>Marcación 3</i>	1mg- THF	20 min/60°C	228	0.2
<i>Marcación 4</i>	1mg-DMSO	2 min/150°C	533	1.4

Tabla 18: Condiciones de marcación de **L6** con [¹⁸F]F

En las marcaciones (1-4) el rendimiento de la especie de interés fue muy bajo, obteniéndose una gran cantidad de fluoruro. En la Figura 135-A se muestra el perfil gamma obtenido para la marcación 1, en el cual se observa una gran cantidad de fluoruro y una especie con tiempo de retención de 9.9 min que corresponde al [¹⁸F]F-FEET. Además, aparece una especie con tr= 5.7 min que se repite en todas las marcaciones realizadas y es una impureza de identidad desconocida. En el perfil cromatográfico UV a 280 nm de esta marcación (Figura 135-B) se puede observar la descomposición de **L6**, ya que aparecen varias especies, coincidiendo solo una de ellas con el tiempo de retención del ligando.

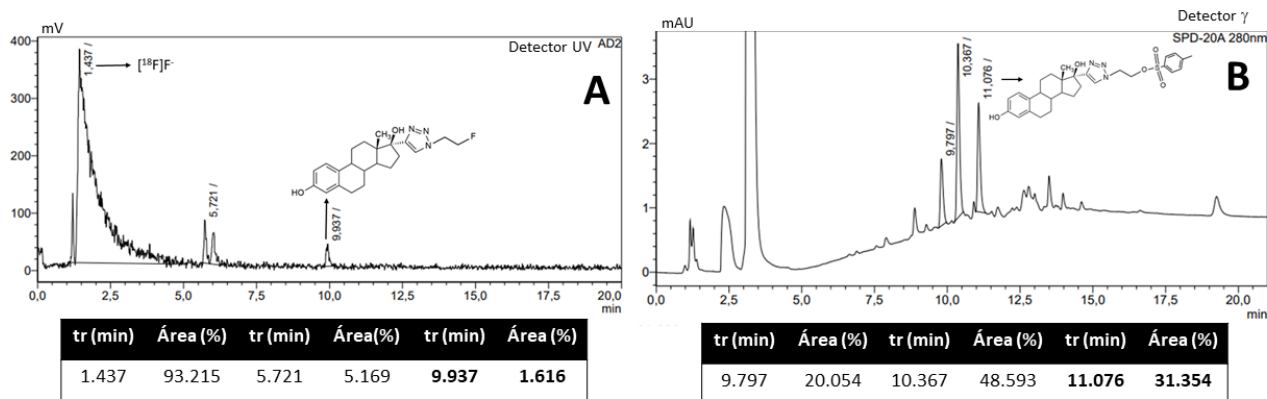


Figura 135: Perfiles cromatográficos de la marcación

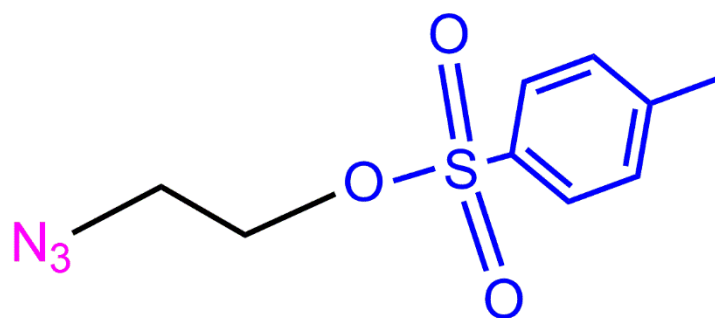
En virtud de los bajos rendimientos obtenidos se decidió utilizar una nueva estrategia para obtener el trazador $[^{18}\text{F}]\text{F-FEET}$.

5.4.2 Síntesis del trazador $[^{18}\text{F}]\text{F-FEET}$ partiendo de **M**

La cicloadición de Huisgen y otras reacciones de la llamada “química click” están recibiendo un interés creciente en el campo de la Radiofarmacia como nuevas estrategias para obtener moléculas biológicamente activas radiomarcadas, en particular con $[^{18}\text{F}]\text{F}$. Las condiciones de marcación convencionales con $[^{18}\text{F}]\text{F}$ son relativamente duras, por lo que no son adecuadas para la marcación de biomoléculas lábiles. Para superar este conflicto, varios grupos plantean incorporar el $[^{18}\text{F}]\text{F}$ a una molécula pequeña que posteriormente se unirá a biomoléculas en condiciones más suaves [133, 145-149]. Esta estrategia fue utilizada para superar el problema de descomposición de **L6**.

5.4.2.1 Síntesis del $[^{18}\text{F}]\text{F-PRE-FEET}$

La estrategia planteada para obtener el $[^{18}\text{F}]\text{F-PRE-FEET}$ (Figura 136) parte de un intermediario de reacción, el 2-azidoetil 4-metilbencensulfonato (**M**) que posee un grupo azida para llevar a cabo la reacción de Huisgen e incorporar la biomolécula (Figura 136).



BUEN GRUPO SALIENTE

Figura 136: Estructura de el 2-azidoetil 4-metilbenceno sulfonato (**M**)

La fluoración de **M** genera el [¹⁸F]F-PRE-FEET por sustitución del grupo tosilo por [¹⁸F]F (Figura 137-A). El sistema cromatográfico utilizado para determinar el tr de **M** y la PRQ del [¹⁸F]F-PRE-FEET es el optimizado en la sesión 5.4.1. El perfil cromatográfico (UV a 280nm) de **M** muestra una única especie de tr=11.1 min (Figura 137-B).

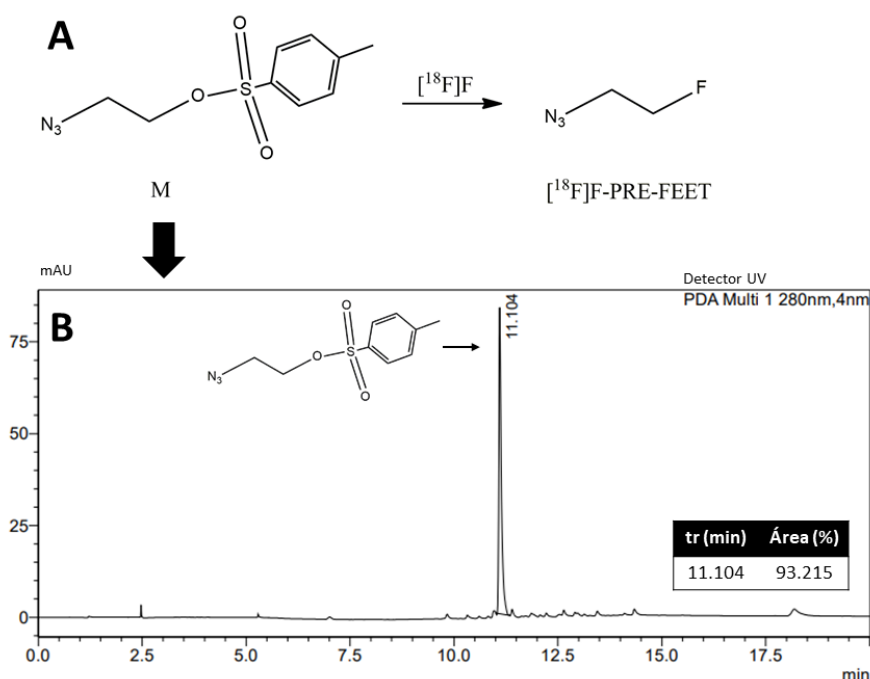


Figura 137: A- síntesis del [¹⁸F]F-PRE-FEET partiendo de **M**, B- perfil cromatográfico de **M**

Las marcaciones con [¹⁸F]F se realizaron en el módulo automatizado de síntesis Synthra RNplus Research bajo condiciones seleccionadas basándose en

bibliografía y en la experiencia previa del grupo [69,75,81]. Las marcaciones se realizaron a 90 °C por 20 minutos, usando 3.5 mg de Kryptofix y 3.5 mg de K₂CO₃. La actividad de los marcados varió entre 50 y 150 mCi. La masa de **M** requerida para lograr un rendimiento mayor al 90% fue de 2 mg (Tabla 19) ya que al disminuir la masa de **M** a 1mg el rendimiento disminuye considerablemente.

	<i>M- disolvente</i>	<i>Rendimiento (%)</i>
<i>Marcación 1 (n>5)</i>	2 mg-CH ₃ CN	> 90%
<i>Marcación 2 (n=2)</i>	1 mg- CH ₃ CN	68.8%

Tabla 19: Condiciones de marcación de **M** con [¹⁸F]F.

En la Figura 138 se muestra el perfil cromatográfico obtenido en las marcaciones con [¹⁸F]F utilizando 1mg de **M** (Figura 138-A) y 2 mg de **M** (Figura 138-B). Como puede apreciarse el cromatograma B muestra una única especie de tiempo de retención 9.9 min correspondiente al [¹⁸F]F-PRE-FEET.

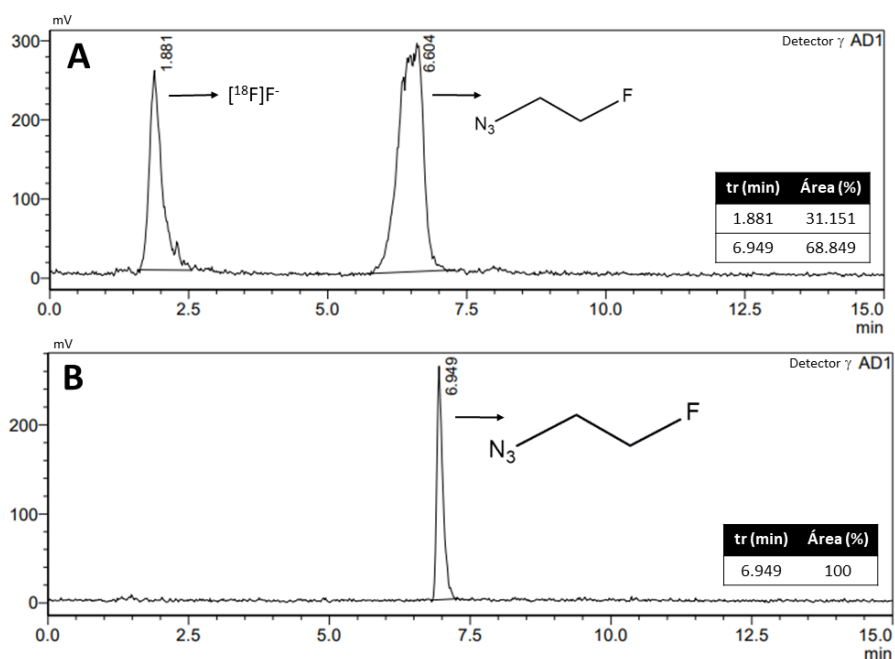


Figura 138: perfil cromatográfico obtenido en las marcaciones con [¹⁸F]F utilizando A-1mg de **M**, B-2mg de **M**

5.4.2.2 Síntesis manual del [¹⁸F]F-FEET – Reacción de Huisgen *in situ*

Una vez obtenido el precursor fluorado [¹⁸F]F-PRE-FEET con adecuado rendimiento (>90%) se acopló el etinilestradiol para obtener el radiotrazador de interés (Figura 139)

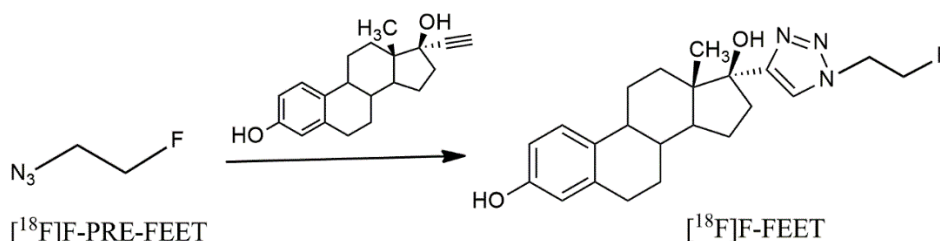


Figura 139: Síntesis del [¹⁸F]F-FEET partiendo de [¹⁸F]F-PRE-FEET

Este acoplamiento se realizó utilizando las condiciones descritas en la sección 5.3.1.2, incubando el etinilestradiol en exceso con el precursor fluorado durante una hora a 75°C y utilizando Cu (I) como catalizador (Tabla 20). El acoplamiento no se produjo, ya que el perfil cromatográfico muestra una especie mayoritaria correspondiente al precursor fluorado. (Figura 140).

	<i>n</i> =1	<i>eq</i>	Condiciones
¹⁸ F-PRE-FEET		1	
Etinilestradiol (sol. 1x10 ⁻² M)		1.6	1 hora a
Ascorbato de sodio (sol. 1x10 ⁻² M)		0.3	75°C
Acetato de cobre (sol. 1x10 ⁻² M)		0.6	

Tabla 20: primeras condiciones de Click Chemistry *in situ*

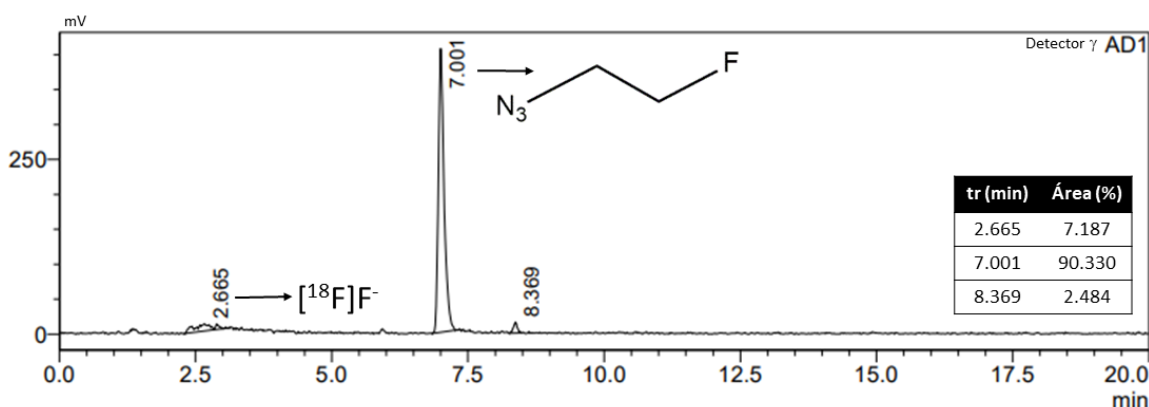


Figura 140: Perfil cromatográfico obtenido para la primera reacción de Huisgen *in situ* ensayada

Este resultado negativo puede deberse a que la reacción de Huisgen es lenta y requiere muchas horas para completarse. Esto es un inconveniente importante en el caso de radionucleidos de corto período de semidesintegración como el [^{18}F]F [150].

Una alternativa para el uso de la reacción de Huisgen en la síntesis de productos marcados con [^{18}F]F puede ser lo descrito por Marik *et al.* [133] en 2006 en la obtención [^{18}F]F-Fluoropéptidos. Para ello una serie de [^{18}F]F-fluoroalquinos se hicieron reaccionar con péptidos que contenían un grupo azida agregando Cu(I) bajo la forma de CuI como catalizador y ácido ascórbico para evitar la oxidación del mismo por el oxígeno atmosférico, en vez de generarlo por reducción de CuSO₄. Asimismo, es importante utilizar una base nitrogenada como N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) para facilitar la desprotonación del hidrógeno terminal del alquino que ocurre durante el segundo paso de la reacción. Cuando se utiliza Cu (II) la reacción se da en un medio acuoso siendo el agua quien favorece la desprotonación. Además, es necesario utilizar un exceso importante de catalizador en comparación con una reacción convencional [133, 145-149].

En la Tabla 21 se muestran las condiciones de reacción ensayadas según Hausner *et al.* [146], Marik *et al.* [133] y Evans *et al.* [149]. En todas ellas se usó Cu (I) como catalizador bajo la forma de CuI y DIPEA como base. Los parámetros que se variaron fueron la masa de los reactivos, los tiempos y las temperaturas de reacción.

Aplicando este concepto y utilizando una relación molar 10:1 de etinilestradiol/ [^{18}F]F-**PRE-FEET**, 3:1 de catalizador y un exceso importante de ascorbato de sodio y de base, 15 min de reacción a temperatura ambiente se obtuvo la especie de interés con un rendimiento de 31% (Tabla 21-condición nº 1). Aumentando el tiempo de reacción sin variar la temperatura se aumentó el rendimiento hasta un 95% (Tabla 21-condición nº 2 y 3). En las condiciones ensayadas se observó la presencia de un precipitado, lo cual no sería compatible con el desarrollo del trazador en una plataforma automatizada de síntesis, ya que las soluciones se transfieren mediante tubuladuras de pequeño calibre obturándose por la presencia de precipitados. La búsqueda de condiciones que permitan trabajar en forma totalmente automatizada permitiría la síntesis con mayores niveles de

actividad de una forma más segura para el operario. Es así que se decidió disminuir la masa de etinilestradiol, por ser el reactivo más insoluble y aumentar la temperatura de reacción para favorecer la disolución de este, utilizando una relación molar 5:1 de etinilestradiol/ compuesto fluorado y manteniendo igual el resto de los reactivos. En estas condiciones (15 minutos a 80°C) se obtuvo un rendimiento de 69% (Tabla 21-condición nº 4), mientras que al aumentar el tiempo a 30 min el rendimiento llegó al 94% (Tabla 21-condición nº 5). Nuevamente se observó la presencia de un precipitado. Por este motivo se realizó la reacción utilizando 0.03 eq del producto fluorado, 1 equivalente de etinilestradiol y de Cu (I) y además se disminuyó la masa de ascorbato de sodio y de base utilizada y se incubó por un tiempo de 30 min a temperatura ambiente, obteniéndose un rendimiento de 85% (Tabla 21-condición nº 6). Debido a que continuaba existiendo un precipitado, se variaron las condiciones, pero esta vez utilizando un exceso importante de etinilestradiol y menos cantidad de catalizador, de base y de ascorbato, obteniéndose luego de los 20 minutos a 60° un rendimiento de 4% (Tabla 21-condición nº 7 y 8) [133,146,149].

<i>nº</i> (<i>n=1</i>)		<i>eq</i>	<i>Condiciones</i>	<i>Rendimiento (%)</i>
1	[¹⁸ F]F-PRE-FEET	0.1	10 min a T ambiente	31.1
	Etinilestradiol	1		
	Ascorbato de sodio	31		
	CuI	3		
	DIPEA	31		
2	[¹⁸ F]F-PRE-FEET	0.1	45 min a T ambiente	81.2
	Etinilestradiol	1		
	Ascorbato de sodio	31		
	CuI	3		
	DIPEA	31		
3	[¹⁸ F]F-PRE-FEET	0.1	65 min a T ambiente	98.7
	Etinilestradiol	1		
	Ascorbato de sodio	31		
	CuI	3		
	DIPEA	31		
4	[¹⁸ F]F-PRE-FEET	0.1	15 min a 80°C	69.3
	Etinilestradiol	0.5		
	Ascorbato de sodio	31		
	CuI	3		
	DIPEA	31		
5	[¹⁸ F]F-PRE-FEET	0.1	30 min a 80°C	94.0
	Etinilestradiol	0.5		
	Ascorbato de sodio	31		
	CuI	3		
	DIPEA	31		

6	[¹⁸ F]F-PRE-FEET	0.0	30 min a T ambiente	84.8
		3		
	Etinilestradiol	1		
	Ascorbato de sodio	10		
	CuI	1		
7	DIPEA	10	20 min a 60°C	4.2
	[¹⁸ F]F-PRE-FEET	1		
	Etinilestradiol (solución 1x 10 ⁻² M)	1.6		
	DIPEA (sol. 1x 10 ⁻² M)	3.6		
8	CuI (sol. 1x 10 ⁻² M)	1.2	30 min a 60°C	3.9
	[¹⁸ F]-PRE-FEET	1		
	Etinilestradiol (sol. 1x 10 ⁻² M)	1.6		
	DIPEA (sol. 1x 10 ⁻² M)	3.6		
	CuI (sol. 1x 10 ⁻² M)	1.2		

Tabla 21: condiciones de reacción de Huisgen *in situ* ensayadas empleando CuI

En la Figura 141 se muestra el perfil cromatográfico obtenido en las reacciones de Huisgen “in situ” que utilizan CuI. En el mismo puede observarse la presencia de una especie mayoritaria a los 10.3 min que corresponde al [¹⁸F]F-FEET y una impureza a los 6.9 min que corresponde al reactivo de partida.

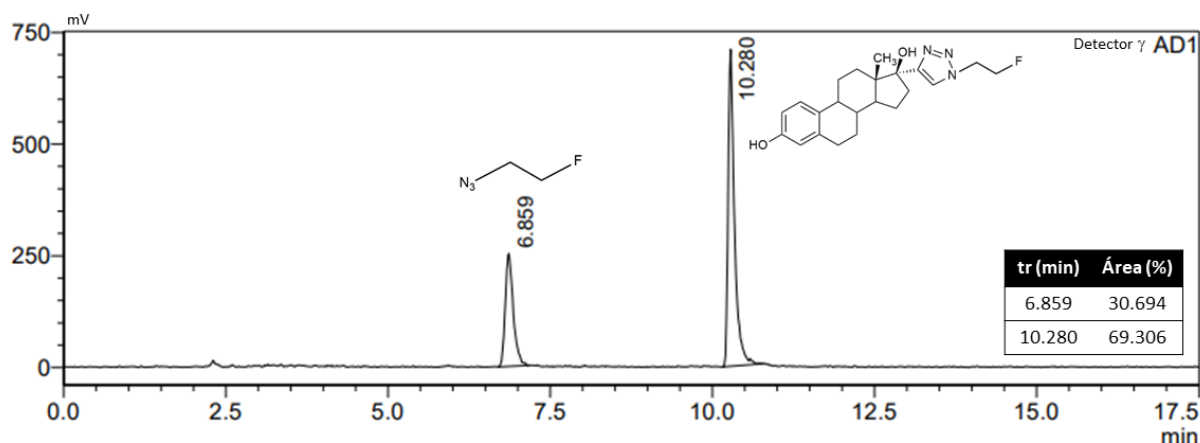


Figura 141: Perfil cromatográfico obtenido para las reacciones de Huisgen ensayadas que utilizan CuI

Si bien las reacciones *in situ* permitían obtener el trazador de interés con un buen rendimiento, no fue posible obtener una reacción sin precipitado, por lo que se decidió utilizar reactivos mas solubles, en concordancia con lo reportado por Glaser *et al.* [147] quien utiliza Cu(II) bajo la forma de CuSO₄.

En este caso se utilizó metanol para disolver el etinilestradiol y una temperatura de 80°C, se varió la masa de los reactivos y los tiempos de reacción (Tabla 22). Inicialmente se utilizó una relación molar 6:1 entre el etinilestradiol y el compuesto fluorado, 9 eq de CuSO₄ y 30 eq de ascorbato de sodio, se dejó reaccionar 15 min a 80°C obteniendo un rendimiento de 6% (Tabla 22-condición nº 1). Aumentando los equivalentes de CuSO₄ y de ascorbato de sodio a 30 y 300 respectivamente y dejando fija la masa de etinilestradiol y del compuesto fluorado el rendimiento es de 55 % (Tabla 22-condición nº 2). Al aumentar el tiempo a 30 minutos el rendimiento aumenta considerablemente hasta 85% (Tabla 22-condición nº 3). Esta última condición presentaba un precipitado, aunque de menor magnitud que con la estrategia sintética anterior. Al bajar la cantidad de etinilestradiol variando los equivalentes de catalizador y reductor se lograron condiciones de reacción sin presencia de precipitado. El mejor rendimiento se obtuvo al utilizar el doble de equivalentes de etinilestradiol en relación al compuesto fluorado, 30 equivalentes de CuSO₄, 100 equivalentes de ascorbato de sodio, 30 minutos a 80°C. El rendimiento obtenido bajo estas condiciones es de 41% (Tabla 22-condición nº9) (Figura 142).

<i>nº</i> (<i>n=1</i>)		<i>eq</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>Rendimiento (%)</i>
1	[¹⁸ F]F-PRE-FEET	1	15	5.7
	Etinilestradiol	6		
	CuSO ₄ (0.45M)	9		
	Ascorbato de sodio (1.5M)	30		
2	[¹⁸ F]F-PRE-FEET	1	15	54.8
	Etinilestradiol	6		
	CuSO ₄ (0.45M)	30		
	Ascorbato de sodio (1.5M)	300		
3	[¹⁸ F]F-PRE-FEET	1	30	84.8
	Etinilestradiol	6		
	CuSO ₄ (0.45M)	30		
	Ascorbato de sodio (1.5M)	300		
4	[¹⁸ F]F-PRE-FEET	1	15	35.3
	Etinilestradiol	2		
	CuSO ₄ (0.45M)	30		

	Ascorbato de sodio (1.5M)	300		
5	[¹⁸ F]F-PRE-FEET	1	30	73.0
	Etinilestradiol	2		
	CuSO ₄ (0.45M)	30		
	Ascorbato de sodio (1.5M)	300		
6	[¹⁸ F]F-PRE-FEET	1	15	3.8
	Etinilestradiol	2		
	CuSO ₄ (0.45M)	30		
	Ascorbato de sodio (1.5M)	30		
7	[¹⁸ F]F-PRE-FEET	1	30	6.2
	Etinilestradiol	2		
	CuSO ₄ (0.45M)	30		
	Ascorbato de sodio (1.5M)	30		
<i>n</i> ^o (<i>n</i> =1)		<i>eq</i>	<i>Tiempo</i> (<i>min</i>)	<i>Rendimiento</i> (%)
8	[¹⁸ F]F-PRE-FEET	1	15	15.2
	Etinilestradiol	2		
	CuSO ₄ (0.45M)	30		
	Ascorbato de sodio (1.5M)	100		
9	[¹⁸ F]F-PRE-FEET	1	30	41.2
	Etinilestradiol	2		
	CuSO ₄ (0.45M)	30		
	Ascorbato de sodio (1.5M)	100		
10	[¹⁸ F]F-PRE-FEET	1	15	20.1
	Etinilestradiol	2		
	CuSO ₄ (0.45M)	30		
	Ascorbato de sodio (1.5M)	50		
11	[¹⁸ F]F-PRE-FEET	1	30	41.7
	Etinilestradiol	2		
	CuSO ₄ (0.45M)	30		
	Ascorbato de sodio (1.5M)	50		

Tabla 22: Condiciones de reacción de Huisgen *in situ* ensayadas empleando CuSO₄

En la Figura 142 se muestra el perfil cromatográfico obtenido (Tabla 22-condición nº9). Se observa presencia de una especie mayoritaria a los 10.3 min que corresponde al $[^{18}\text{F}]\text{F-FEET}$, una impureza a los 6.7 min que corresponde al reactivo de partida el $[^{18}\text{F}]\text{F-PRE-FEET}$ y fluoruro a los 2.6 min. La purificación del producto de interés se realizó por extracción en fase sólida mediante un cartucho Sep-Pak® C18 Plus light obteniendo una única especie de PRQ>90% y tiempo de retención de 10.3 min.

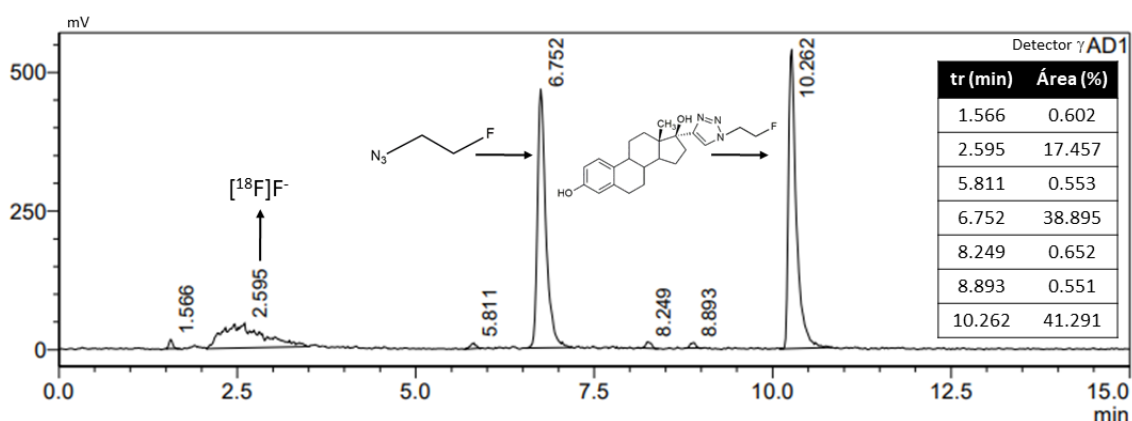


Figura 142: Perfil cromatográfico obtenido para la reacción nº 9

5.4.2.3 Síntesis del $[^{18}\text{F}]\text{F-FEET}$ –en el módulo automatizado de síntesis

El trazador $[^{18}\text{F}]\text{F-FEET}$ fue sintetizado posteriormente en el módulo Synthra RNplus Research. Como se muestra en la Figura 143-A, la síntesis parte de **M** y el grupo tosilo se sustituye por el flúor radiactivo en el reactor 1 del modulo obteniendo el $[^{18}\text{F}]\text{F-PRE-FEET}$. La solución del reactor 1 se transfiere al reactor 2 donde se produce la reacción de Huisgen para obtener el $[^{18}\text{F}]\text{F-FEET}$. La purificación final se realizó por extracción en fase sólida mediante un cartucho Sep-Pak® C18 Plus light. El sistema de HPLC utilizado para el control de la PRQ fue el optimizado en la sección 5.4.1. La Figura 143-B muestra el perfil cromatográfico obtenido, en el mismo puede observarse una única especie de tiempo de retención 10.3 min y PRQ de 100% correspondiente al trazador de interés.

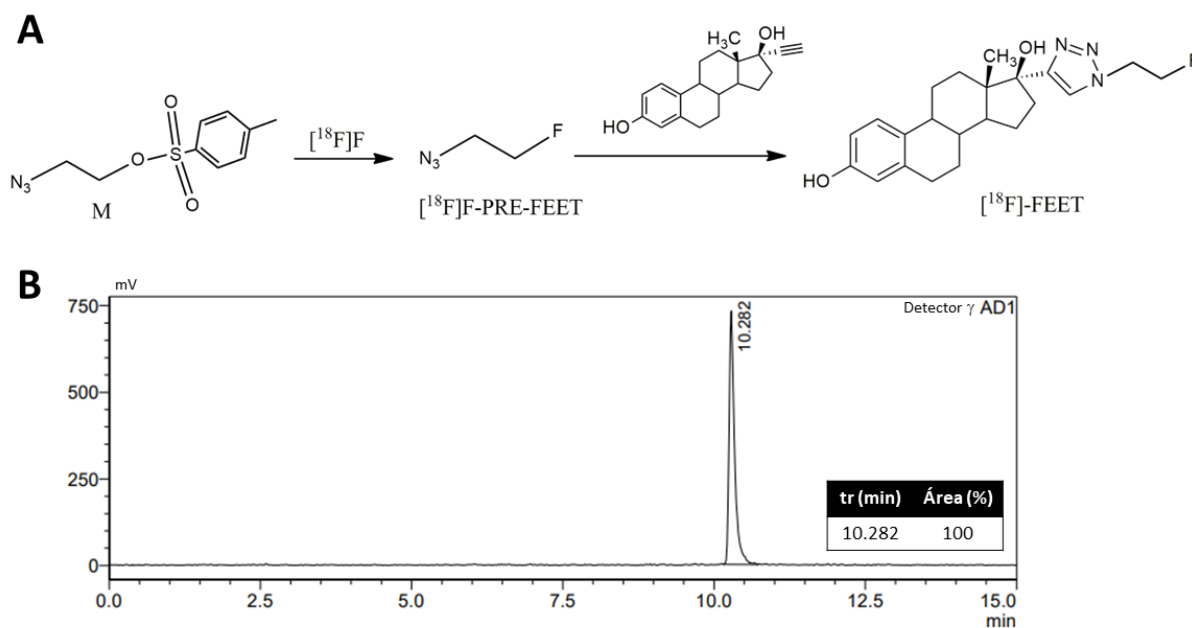


Figura 143: A-síntesis del $[^{18}\text{F}]\text{F-FEET}$ en modulo automatizado, B- perfil cromatográfico

5.5 Caracterización fisicoquímicos de los trazadores

5.5.1 Estabilidad en el medio de reacción

La estabilidad en medio de reacción de los radiotrazadores desarrollados se evaluó determinando la variación de la PRQ mediante el sistema HPLC optimizado hasta 4 horas luego del marcado. La PRQ fue mayor al 95% con respecto al valor inicial en todos los casos durante todo el período evaluado.

5.5.2 Estabilidad en plasma

La misma se estudia a fin de predecir la estabilidad de los trazadores desarrollados frente a un medio fuertemente competitivo como es el biológico. El método implica la incubación de la muestra con un pool de plasma humano a 37 °C y el control de la PRQ a diferentes tiempos utilizando el sistema de HPLC optimizado para cada trazador. Para esto, es necesario precipitar las proteínas

plasmáticas y por lo tanto, solamente se determina la estabilidad de la fracción libre del complejo.

Todos los trazadores evaluados resultaron ser estables (PRQ mayor a 95% con respecto al valor inicial) en plasma hasta las 4 horas de estudio.

5.5.3 Lipofilicidad

Se determinó la lipofilicidad para todos los trazadores en estudio (Tabla 23) a través del coeficiente de partición entre un buffer fosfato 0.1M pH= 7,4 y octanol.

<i>Lipofilicidad (Log P)</i>	
<i>(n=2-3)</i>	
C1	1,3 ± 0,1
C2	0.8 ± 0,1
C3	0,5 ± 0,1
<i>[¹⁸F]F-FEET</i>	1.8 ± 0,1

Tabla 23: Valores de lipofilicidad de los trazadores en estudio

La lipofilicidad es un parámetro muy importante en un radiofármaco ya que la misma condiciona muchos parámetros de interés biológico. Los trazadores en estudio no poseen un transportador que les permita atravesar la membrana celular, por lo que su llegada al citoplasma se produciría mediante difusión pasiva a través de la membrana. Para ello, el trazador debe tener una lipofilia adecuada de modo de favorecer ese pasaje, la cual está determinado por la ley de Fick:

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

en donde la cantidad del complejo que atraviesa la membrana depende del coeficiente de partición octanol/buffer (K), la difusión (D), el área (A), el espesor de la membrana (h) y las concentraciones hacia ambos lados de la misma (C_i: interior, C_e: exterior).

Por otra parte, la lipofilia no debe ser excesivamente alta, porque en ese caso el trazador tendría una baja eliminación renal y una alta eliminación hepatobiliar. Además, presentará una lenta depuración de los tejidos no blanco. Por estos motivos los valores de logP entre -0.5 y 2 a pH = 7.4 se consideran óptimos para

un buen pasaje a través de una membrana biológica y una adecuada biodistribución [151,152].

Todos los trazadores en estudio son lipofílicos y neutros, en concordancia con las estructuras propuestas. Asimismo, los valores de lipofilicidad obtenidos (Tabla 23) se encuentran en el rango adecuado para la penetración de membranas biológicas, lo cual en este caso es de gran importancia ya que el RE se encuentra en el núcleo celular.

C1 es un complejo de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc(I)}$ tricarbonílico siendo uno de los complejos más lipofílicos desarrollados durante la presente tesis doctoral. Este trazador posee en su estructura los anillos derivados de estradiol y además un anillo 1,2,3- triazol que podría estar incidiendo en este resultado.

C2 es un complejo $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc(V)}\equiv\text{N}$ simétrico que posee tanto dos moléculas de estradiol como dos anillos triazólicos por centro metálico, por tanto, se espera una lipofilicidad elevada. Sin embargo, **C2** posee una lipofilicidad bastante baja en comparación con el resto de los trazadores desarrollados lo cual puede atribuirse a que posee dos grupos ácidos carboxílicos, ionizables al pH del estudio.

C3 exhibió la lipofilia más baja, lo que concuerda con la bibliografía [41, 43, 45-49] que indica que la preparación de complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc(III)}$ 4+1 podría ser una buena estrategia para reducir la lipofilia global. Además, al igual que **C2**, **C3** posee un grupo ácido carboxílico, ionizable al pH del estudio, que debe incidir en esta propiedad.

La influencia del anillo triazólico en la lipofilicidad del complejo resultante ha sido observada en otros estudios con ligandos sintetizados a través de la reacción de Huisgen. Por ejemplo, en el trabajo de Fernández *et al.* [36] de nuestro grupo, se observa este fenómeno, complejo 1 ($\text{LogP}=-0.44$) y 2 ($\text{LogP}=-0.75$) (Figura 144). [36,153].

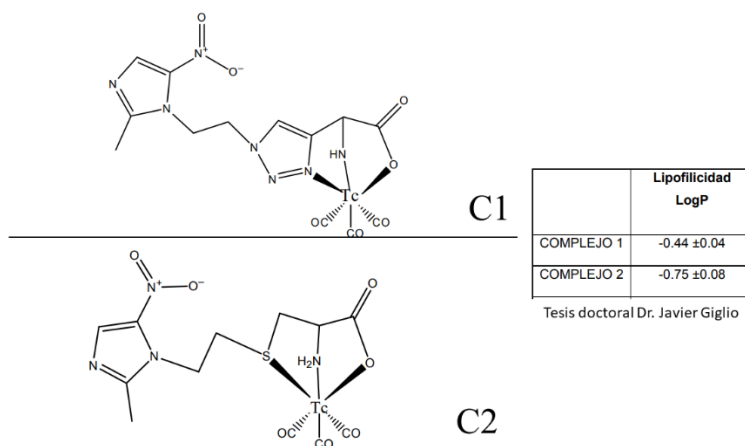


Figura 144: Influencia del anillo triazolico en la lipofilicidad de un complejo [36,153]

En el caso de los complejos $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc(III)}\ 4+1$ es posible modular la lipofilicidad modificando el coligando. Como ejemplo en la Figura 145 se muestran dos complejos de este tipo desarrollados por nuestro grupo de trabajo, donde se añadieron grupos ácidos carboxílicos al coligando NS_3 . Como puede observarse la lipofilicidad se ve disminuida en comparación a **C3**, disminuyendo muy abruptamente [81].

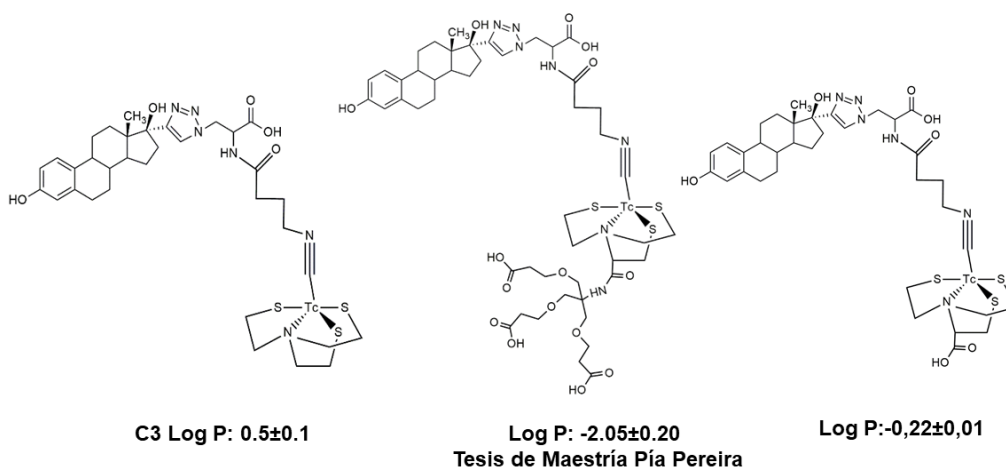


Figura 145: Complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc(III)}\ 4+1$ desarrollados por el grupo

El trazador [¹⁸F]F-FEET es el que posee mayor lipofilia. El mismo posee los anillos derivados de estradiol, un triazol y una cadena carbonada en su estructura que podrían estar influyendo en esta propiedad.

No obstante, en todos los casos la lipofilidad de los trazadores en estudio es mucho menor que la del estradiol natural [154].

5.5.4 Unión a proteínas plasmáticas

La unión a proteínas plasmáticas (UPP) se determinó por cromatografía de exclusión molecular. La UPP es un parámetro muy importante que determina la farmacocinética del potencial radiofármaco. En general la depuración sanguínea es generalmente más lenta para aquellos compuestos que presentan elevada UPP. Si el trazador presenta un valor elevado de UPP, no se encontrará disponible para permear hacia las células y tendrá una lenta depuración sanguínea [155].

En la Tabla 24 se muestra la UPP de los trazadores en estudio. Estos valores corresponden a la media de todos los datos experimentales, ya que la unión a las proteínas no varió significativamente con el tiempo.

	<i>UPP (%) (n=2-3)</i>
C1	33 ± 11
C2	41 ± 9
C3	46 ± 6
[¹⁸ F]F-FEET	58 ± 7

Tabla 24: Valores de unión a proteínas plasmáticas de los trazadores en estudio

Es importante considerar que la unión a proteínas puede deberse a dos factores. Por un lado, la estructura y propiedades biológicas del ligando pueden generar elevada afinidad por las proteínas plasmáticas, como es el caso de muchos fármacos y algunas sustancias endógenas como lípidos, vitaminas y hormonas transportadas fisiológicamente por las proteínas plasmáticas. Este es el caso del

estradiol y las hormonas relacionadas se unen a la globulina fijadora de testosterona estradiol (Te-BG) y a la albúmina en más del 90% [155-158]. Por otra parte, una alta unión a proteínas puede deberse a una baja estabilidad del complejo, lo cual lleva a una transquelación del metal. Esto significa que el ligando es desplazado por grupos donadores de electrones de las proteínas quedando el radionucleido unido a ellas.

Los trazadores en estudio poseen una UPP alta, pero significativamente menor que la biomolécula de partida, el etinilestradiol que posee una UPP de $98,3 \pm 0,6$ según la bibliografía [159].

5.6 Evaluación *in vitro*

Los cultivos celulares son modelos caracterizados y homogéneos que permiten realizar una evaluación primaria del comportamiento del radiofármaco a nivel celular y molecular. Una de las principales ventajas del cultivo celular es que puede controlarse el entorno fisicoquímico (pH, temperatura, CO₂, etc). Además, es posible contar con un cultivo homogéneo a lo largo del tiempo. Por otro lado, los cultivos pueden someterse a cantidades más bajas de los productos a ensayar en comparación con los ensayos *in vivo* donde el 90% de la muestra se pierde por excreción y distribución a tejidos distintos al tejido blanco de estudio, sumado a que se evita el trabajo con animales de experimentación con todas las consideraciones éticas que ello implica. Las principales desventajas del cultivo celular es que habrá diferencia con los estudios *in vivo*, ya que los cultivos celulares derivan de la disociación de células de una geometría tridimensional y su propagación sobre un sustrato bidimensional, perdiendo algunas interacciones y características de la histología del tejido. Asimismo, se necesita personal altamente capacitado y se requiere una observación exhaustiva de las características de la línea celular para detectar posibles cambios en la misma. El cultivo celular es una herramienta que permite un tamizaje inicial de nuevos trazadores destinados a un tejido blanco en particular sin la presencia de las barreras biológicas que se encuentran *in vivo* de modo de seleccionar los mejores candidatos para posteriores estudios [160].

La línea MCF-7 (ATCC® HTB-22TM) fue aislada por primera vez en 1970 del tejido epitelial mamario de una mujer caucásica. El nombre MCF deriva de Michigan Cancer Foundation, lugar en donde se desarrolló la línea celular y se agrega el número siete debido a que fue la séptima línea celular desarrollada por el investigador Herbert D. Soule. La popularidad de la línea celular MCF-7 para las investigaciones en cáncer de mama refleja su fidelidad en muchos aspectos clínicos de esta enfermedad, en particular en el cáncer de mama RE+. Una de las contribuciones más importantes de la línea celular MCF-7 ha sido en el estudio del RE α , ya que es una de las pocas líneas en expresar niveles sustanciales del mismo, imitando a la mayoría de los cánceres de mama invasivos [160-162].

El primer ensayo que se realizó fue el estudio de unión de los diferentes trazadores a las células variando la actividad del trazador (10 μ Ci, 20 μ Ci, 50 μ Ci, 80 μ Ci, 100 μ Ci). Este ensayo se realiza para seleccionar la actividad con la que cada trazador obtiene el % de unión más alto. Se espera que a medida que se aumenta la actividad el % de unión aumente hasta hacerse constante. Este fenómeno se debe a que el trazador va aumentando la ocupación de los receptores disponibles hasta que todos ellos se encuentren ocupados, momento a partir del cual el valor de la unión se hace constante. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 25. Como puede observarse, en algunos casos el % de unión aumenta y luego disminuye (**C2**, [¹⁸F]F-FEET) y en otros casos al aumentar la actividad del complejo disminuye el % de unión (**C1 y C3**). Esto puede deberse a que al aumentar la actividad del trazador exista un aumento del número de interacciones inespecíficas y esta actividad se pierda durante los lavados quedando en la fracción libre. El grupo de Bigott-Hennkens *et al.* [163] sugiere que las concentraciones de radioligando deben mantenerse bajas para maximizar la precisión y exactitud de los estudios. Es así que para cada trazador se seleccionó la actividad más baja posible para continuar con los siguientes ensayos.

	C1 (%) (n=3)	C2 (%) (n=3)	C3 (%) (n=3)	[¹⁸ F]F-FEET (%) (n=3)
10 μ Ci	1.9 \pm 0.2	4.7 \pm 1.1	3.2 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2
20 μ Ci	1.4 \pm 0.6	6.1 \pm 1.3	2.1 \pm 0.2	1.3 \pm 0.4
50 μ Ci	1.8 \pm 0.3	2.1 \pm 0.7	1.3 \pm 0.2	1.3 \pm 0.2
80 μ Ci	1.2 \pm 0.3	-	-	-
100 μ Ci	-	1.8 \pm 0.7	1.6 \pm 0.1	1.0 \pm 0.2

Tabla 25: Ensayo de unión variando la actividad del trazador

El segundo ensayo realizado fue el estudio de la variación en el porcentaje de unión de los trazadores en función del tiempo de incubación. Para los trazadores de [^{99m}Tc]Tc se evaluó la variación del % de unión a una hora, 2 horas y 4 horas de incubación, mientras que para el trazador de [¹⁸F]F se hizo los 30 min, una hora y 2 horas de incubación.

	C1 (%) (n=3)	C2 (%) (n=3)	C3 (%) (n=3)	[¹⁸ F]F-FEET (%) (n=3)
30 min	-	-	-	0.60 \pm 0.04
1 hora	1.8 \pm 0.3	6.0 \pm 1.3	3.3 \pm 1.3	0.6 \pm 0.1
2 horas	2.0 \pm 0.2	6.8 \pm 0.5	3.8 \pm 0.2	1.0 \pm 0.5
4 horas	2.2 \pm 0.2	7.8 \pm 2.3	4.3 \pm 0.3	-

Tabla 26: Ensayo de unión variando el tiempo de incubación

Como muestra la Tabla 26 el % de unión no varió significativamente con el tiempo. El promedio de los resultados obtenidos para cada trazador se muestra en la Tabla 27.

% de unión (n=4)	
C1	2.0 \pm 0.2
C2	6.7 \pm 0.8
C3	3.7 \pm 0.5
[¹⁸ F]F-FEET	0.8 \pm 0.2

Tabla 27: % de Unión de los trazadores a células MCF-7

A fin de estudiar la especificidad de la unión de los trazadores al receptor se realizó el ensayo de competencia. Para ello, se incubaron las células MCF-7 dejando fija la actividad del trazador y variando la concentración del ligando no radiactivo. Se espera que al aumentar la cantidad del agente bloqueante el % de unión disminuya hasta hacerse constante. Este ensayo se realizó solo para **C1**,

C2 y **C3**, ya que el [¹⁸F]F-FEET no mostró unión significativa a las células MCF-7.

Es preciso señalar que para los primeros ensayos de competencia realizados se intentó utilizar etinilestradiol como ligando competitivo por ser su estructura muy similar al estradiol natural. Sin embargo, esto fue imposible en la práctica debido a la escasa solubilidad de este. El mismo problema se encontró con otros derivados del estradiol como el benzoato de estradiol, motivo por el cual se decidió utilizar como agente competitivo el propio ligando correspondiente a cada trazador en una relación 50:1 con el utilizado en la marcación. En la Tabla 28 se muestran los resultados obtenidos para el ensayo de competencia.

L*	C1 (%) (n=3)	C2 (%) (n=3)	C3 (%) (n=3)
0	2.0 ± 0.2	6.7 ± 0.8	3.3 ± 0.3
x50	1.8 ± 0.4	2.0 ± 0.3	2.2 ± 0.2

*Cantidad de ligando expresado como múltiplo de la cantidad de ligando frío en un marcado convencional

Tabla 28: Estudio de competencia

En el caso de **C1** el % de unión no disminuye significativamente al realizar el estudio, lo cual indica que **C1** no tiene una interacción específica con el receptor involucrado. **C2** es el complejo que presenta el mayor porcentaje de unión específica con el RE ya que se observa un 70 % de disminución de la unión. Asimismo, en el caso de **C3** el % de unión disminuye un 33%.

Para conocer la cantidad del trazador unido a receptor liberado fuera de las células en función del tiempo se realizó el ensayo de eflujo. El % de eflujo se define entonces como la cantidad de actividad originalmente unida a las células que se libera y se recupera en el sobrenadante [106]. Los tiempos analizados fueron de 1 hora, 2 horas y 4 horas para los trazadores de [^{99m}Tc]Tc.

	C1 (%) (n=3)	C2 (%) (n=3)	C3 (%) (n=3)
1 hora	56.1 ± 4.8	26.7 ± 2.3	63.2 ± 0.2
2 horas	57.2 ± 5.6	48.5 ± 4.8	61.8 ± 0.7
4 horas	55.6 ± 3.4	62.6 ± 2.3	63.5 ± 0.5

Tabla 29: % de eflujo en células MCF-7 para cada trazador

Como se muestra en la Tabla 29, el 56% de la actividad inicialmente unida de **C1** se libera y este % permanece incambiado con el aumento del tiempo. En cambio, **C2** solo liberó el 26.7% de la actividad retenida a la hora. En este caso, el % de eflujo si varía con el tiempo llegando al 63% a las 4 horas de incubación. **C3** es el trazador que tiene el mayor % de eflujo, solo un 37% de la actividad incubada queda retenida en las células.

Dado que **C2** es el trazador que presentó los mejores resultados en cultivo celular se realizó adicionalmente un estudio de internalización. En la Figura 146 se muestran los resultados obtenidos para este ensayo. Como puede verse, a los 30 minutos de incubación **C2** se internaliza en un 84% valor que aumenta hasta 94% a los 60 minutos. Sin embargo, posteriormente parte de lo internalizado se vuelve a externalizar resultado coincidente con el estudio de eflujo.

Este estudio confirma que **C2** atraviesa la membrana plasmática llegando al sitio blanco, mientras que el estudio de competencia sugiere que la unión al RE es específica.

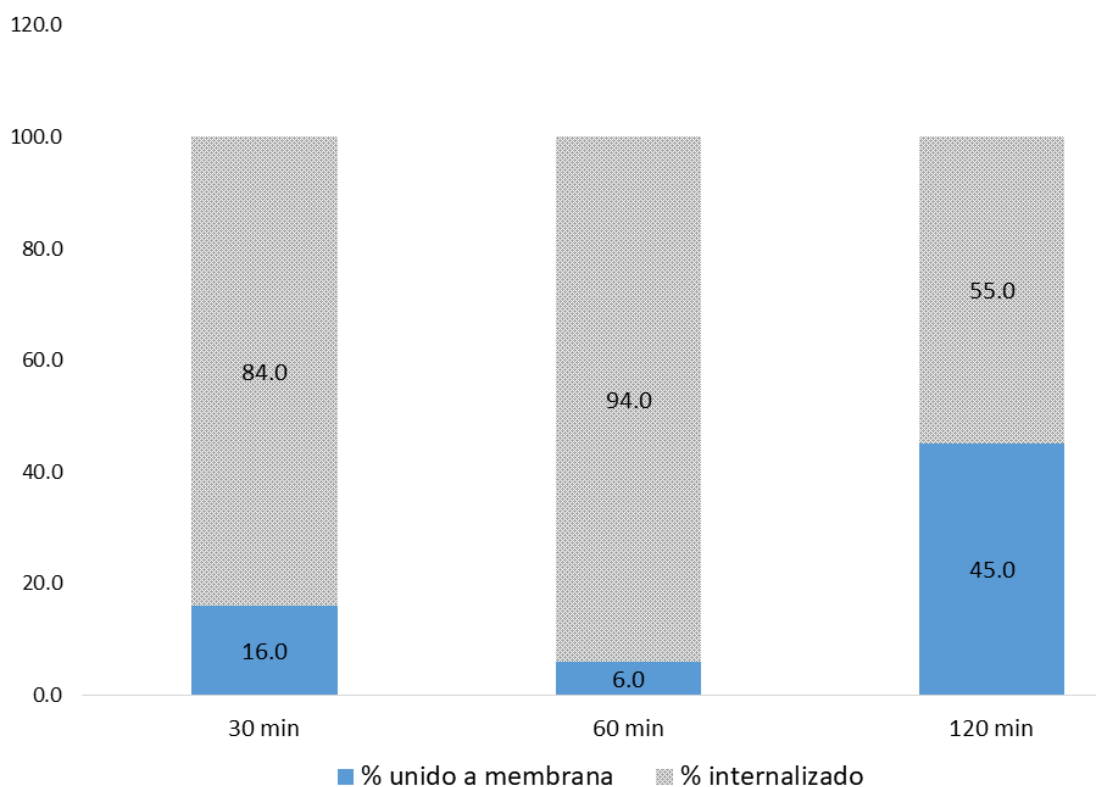


Figura 146: Resultados estudio de internalización para **C2**

Para validar el procedimiento experimental se realizó el ensayo de unión en idénticas condiciones utilizando estradiol tritiado comercial (Estradiol [6,7-³H(N)]), ya que el estradiol es el ligando natural del RE y en consecuencia su captación por las células de cáncer de mama se considera como referencia. El % de unión obtenido fue de (6.6 ± 1.4) % [164]. Por otro lado, en el marco de la tesis de Maestría de la Q.F.Ma. Pía Pereira [81] se optimizó la producción y se realizaron estudios *in vitro* del [¹⁸F]F-FES (16 α -[¹⁸F] fluoro-17 β -estradiol – ¹⁸F-fluoroestradiol) en idénticas condiciones que en esta tesis doctoral. El [¹⁸F]F-FES, radiofármaco de referencia en la actualidad para Imagenología molecular en RE, presenta un % de unión en células MCF-7 de (6.3 ± 1.3) %.

Como muestra la Figura 147 **C1** posee una baja unión en células MCF-7 en comparación con la molécula natural que llega a los receptores de estrógenos y con el [¹⁸F]F-FES. Este trazador posee un anillo triazólico el cual podría estar interfiriendo con la unión al receptor. **C3** posee un % de unión intermedio. Si bien posee un triazol en su estructura también posee un grupo ácido carboxílico libre el cual podría influir positivamente en la unión al receptor. **C2** posee un % de unión prácticamente igual al del estradiol tritiado y el [¹⁸F]F-FES. La elevada unión a células MCF-7 podría explicarse teniendo en cuenta que **C2** es un complejo simétrico de [^{99m}Tc]Tc(V) \equiv N que lleva dos unidades de estradiol por centro metálico. Este resultado concuerda con lo informado por otros investigadores que han reportado el efecto positivo en la unión de la dimerización o la multimerización [165-167].

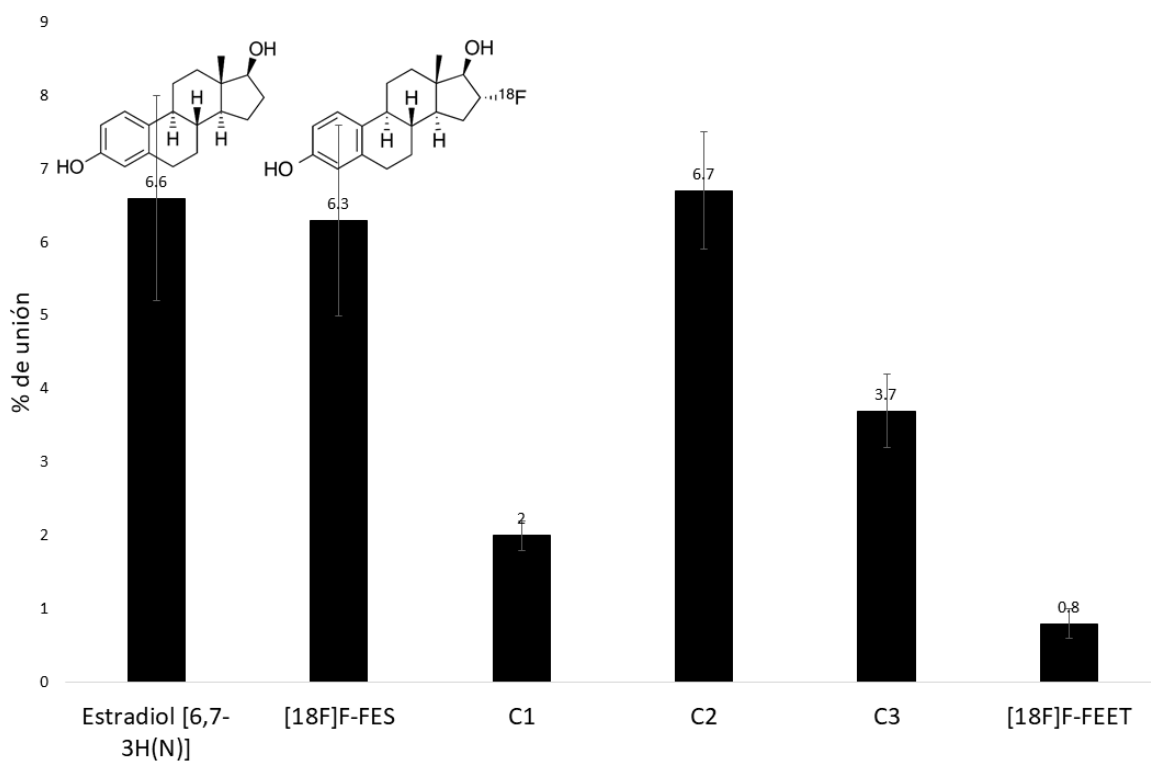


Figura 147: % de Unión del estradiol natural y otros derivados

La Figura 148 muestra un ligando desarrollado por Xia *et al.* [119] y otro desarrollado por Takahashi *et al.* [120]. Como puede observarse ambos ligandos son derivados de estradiol y poseen en el hidroxilo de la posición 3 del anillo aromático un quelante derivado de pentaacetato de dietilentiamina (DTPA) para posterior coordinación con el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$. El compuesto desarrollado por Xia *et al.* [119] presenta un % de unión a células similar al obtenido para **C2**. Sin embargo, el sistema quelante utilizado para la coordinación con el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ da lugar a una mezcla de especies de estructuras no conocidas y que puede variar dependiendo de las condiciones de marcación, lo cual constituye una evidente desventaja [120, 168,169].

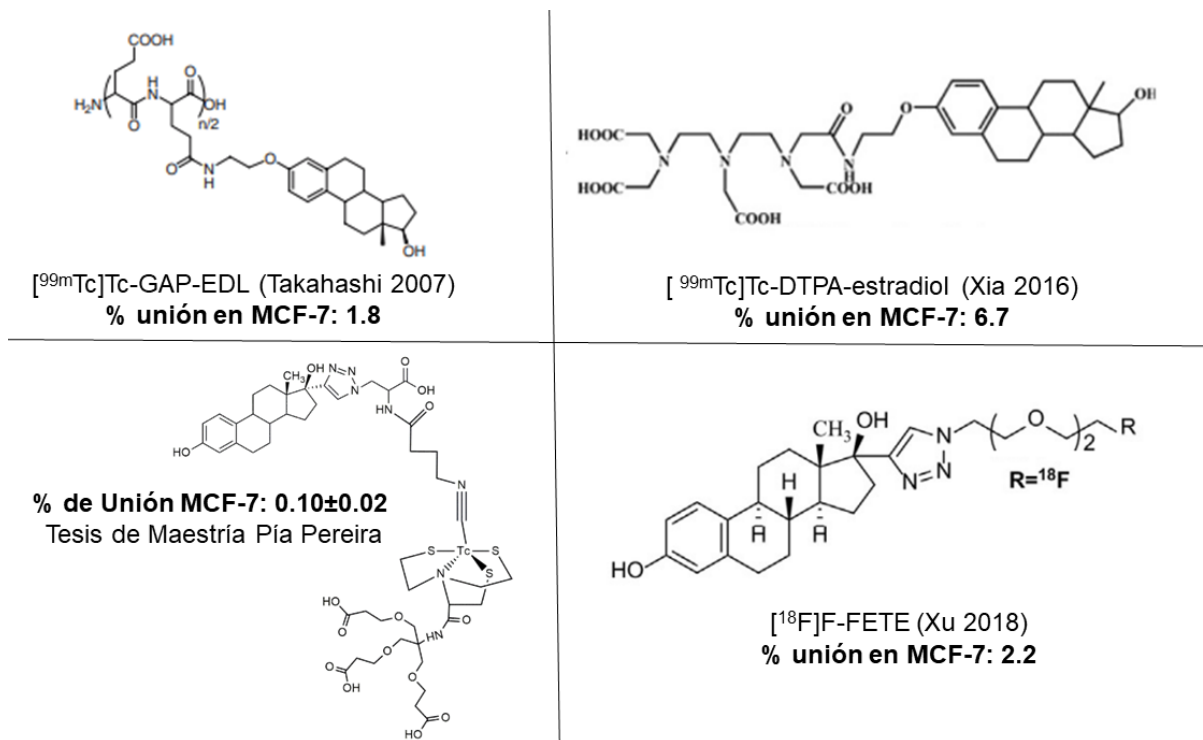


Figura 148: % de unión en células MCF-7 y estructuras de trazadores que aparecen en bibliografía

La Figura 148 además, muestra un complejo [^{99m}Tc]Tc(III) 4+1 desarrollado durante la Tesis de Maestría de Pía Pereira [81]. El ligando monodentado derivado de estradiol es igual al utilizado en C3, mientras que el coligando NS₃ posee 3 ácidos carboxílicos como sustituyentes (NS₃(COOH)₃). El % de unión en células MCF-7 de **C3** (3.7 ± 0.5%) es muy superior al obtenido para este complejo (0.10 ± 0.02 %), demostrando una vez más que el cambio de coligando puede modular las propiedades de los complejos resultantes.

Por otro lado, la Figura 148 muestra un derivado de estradiol [¹⁸F]F-FETE desarrollado por Xu *et al.* [106], muy parecido al [¹⁸F]F-FEET. En ambos casos existe un anillo triazólico en posición 17 del estradiol, el cual podría estar interfiriendo con la unión al receptor. El [¹⁸F]F-FEET posee una cadena de 2 carbonos en la posición 4 del triazol, mientras que el [¹⁸F]F-FETE posee una cadena con 6 carbonos y dos oxígenos. El % de unión a células MCF-7 para los dos trazadores es bajo en comparación con el estradiol natural (6.6 ± 1.4 %) y el [¹⁸F]F-FES (6.3 ± 1.3 %). Si bien en ambos casos se derivatizó el estradiol en posición 17 cuidando de que no se pierda la actividad biológica, la estructura

cambió mucho en comparación con el estradiol natural. En el caso de esta tesis doctoral el diseño del trazador se basó en mantener la estrategia sintética (Reacción de Huisgen) que se venía siguiendo con los complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$. A futuro se buscarán otras estrategias que afecten menos la estructura del trazador en relación al ligando natural del RE.

5.7 Docking Molecular

El docking molecular es un proceso de simulación computacional que tiene como objetivo predecir la conformación, orientación y afinidad de un ligando en un sitio receptor. En los últimos tiempos ha cobrado mucha importancia para el diseño racional de nuevos fármacos, estudiando las mejores interacciones de los posibles candidatos con el sitio blanco. En el caso de esta tesis doctoral se modelaron los complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ derivados de estradiol y el estradiol natural y se determinaron las posibles interacciones de estas moléculas con el RE.

El docking molecular tuvo varias etapas. En primer lugar, se creó una base de datos con los complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ y el estradiol natural. Para ello se modelaron las estructuras con la herramienta builder del programa Molecular Operating Environment (MOE). En el caso de **C2** se colocó una distancia de enlace de 1.2 nm entre el nitrógeno y el tecnecio, ya que el programa no contempla la posibilidad de simular un enlace triple. Para realizar el estudio computacional se tuvo en cuenta que durante el modelado de los complejos y el estradiol estuvieran presentes los grupos funcionales y las estructuras necesarias para que se produzca la interacción con el receptor. Es fundamental la presencia del anillo aromático para las interacciones hidrofóbicas con el receptor. Además, son necesarios los grupos OH en cada extremo de la molécula (el OH en la posición 3 es más crucial para la interacción que el OH en la posición 17). Por otro lado, la distancia entre el OH en posición 3 y el OH en la posición 17 es crucial para la interacción del esqueleto rígido hidrófobo (Figura 149) [90].

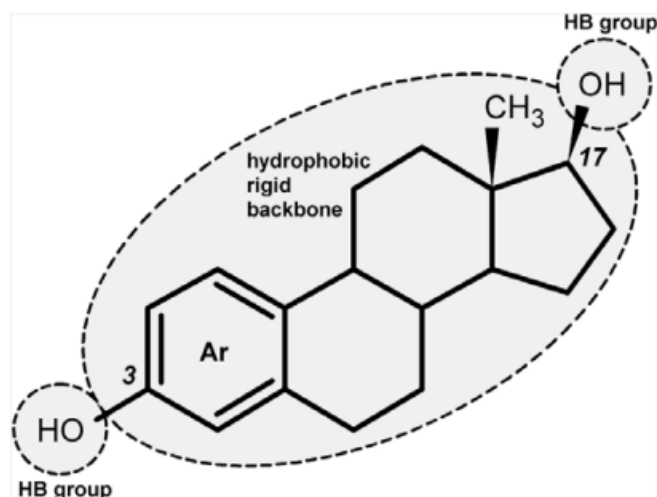


Figura 149: Grupos funcionales y estructuras necesarias para que se dé la interacción con RE

El segundo paso fue la preparación del blanco biológico buscando un modelo adecuado en una base de datos. El modelo seleccionado, que se muestra en la Figura 150, posee 3 cadenas proteicas idénticas con sus correspondientes ligandos, además de moléculas de agua, correspondientes a aguas de cristalización [170,171].

1QKU

WILD TYPE ESTROGEN NUCLEAR RECEPTOR LIGAND BINDING DOMAIN COMPLEXED WITH ESTRADIOL

DOI: [10.2210/pdb1qku/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb1qku/pdb)

Classification: [NUCLEAR RECEPTOR](#)

Deposited: 1999-08-05 Released: 2000-08-18

Deposition author(s): [Ruff, M.](#), [Gangloff, M.](#), [Eiler, S.](#), [Duclaud, S.](#), [Wurtz, J.M.](#), [Moras, D.](#)

Organism: [Homo sapiens](#)

Expression System: ESCHERICHIA COLI

Structural Biology Knowledgebase: [1QKU \(2 models >17 annotations\)](#) [SBKB.org](#)

Experimental Data Snapshot

Method: X-RAY DIFFRACTION

Resolution: 3.2 Å

R-Value Free: 0.275

R-Value Work: 0.216

wwPDB Validation

[3D Report](#) [Full Report](#)

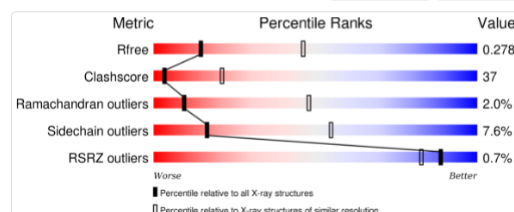


Figura 150: Blanco biológico seleccionado para realizar el docking molecular

Se analizó el blanco biológico seleccionado de manera de determinar si se puede simplificar el sistema y trabajar solo con una de las cadenas proteicas. Observando el diagrama de interacciones superficiales entre las cadenas de la Figura 151 se concluye que entre la cadena A y C se comparten entre 2 y 3 residuos, pero entre la cadena B y C se comparten 26 residuos por lo que se decide no simplificar el sistema a un monómero y trabajar con el sistema tal cual fue cristalizado. Se procedió entonces a borrar las moléculas de agua de cristalización, a borrar los ligandos y a protonar la estructura.

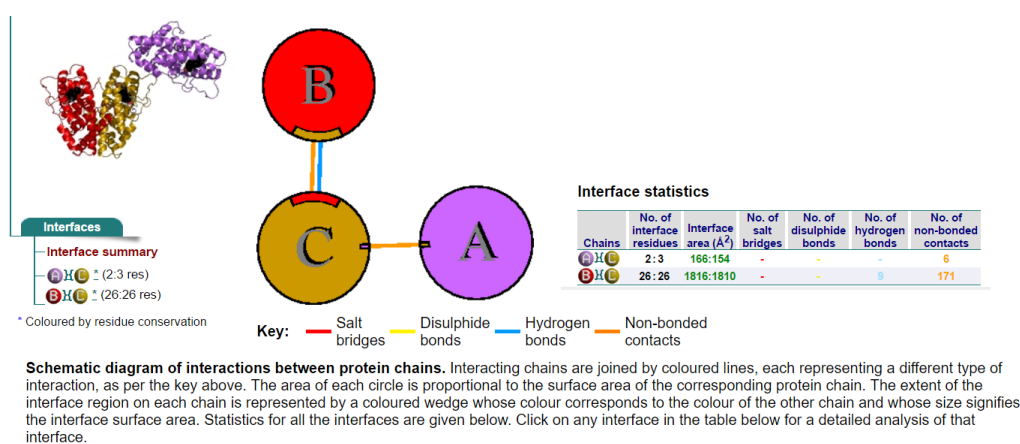


Figura 151: Diagrama de interacciones superficiales entre las cadenas

Todo estudio de docking requiere en primer lugar que el sitio de unión en el receptor sea especificado por el usuario y esto se realizó seleccionando puntos (coordenadas, no átomos) denominadas esferas alfa que son creadas por la aplicación Site Finder en MOE. Se prestó especial atención en los residuos Arg394, His524 y Glu353 del receptor que según bibliografía son los que interactúan con el estradiol (Figura 152) [90]. Cabe destacar que el sitio 1 seleccionado posee los residuos Arg394, His 524 y Glu353 y los sitios 2 y 3 poseen los residuos Arg 394 y Glu 353 pero no poseen el residuo His 524.

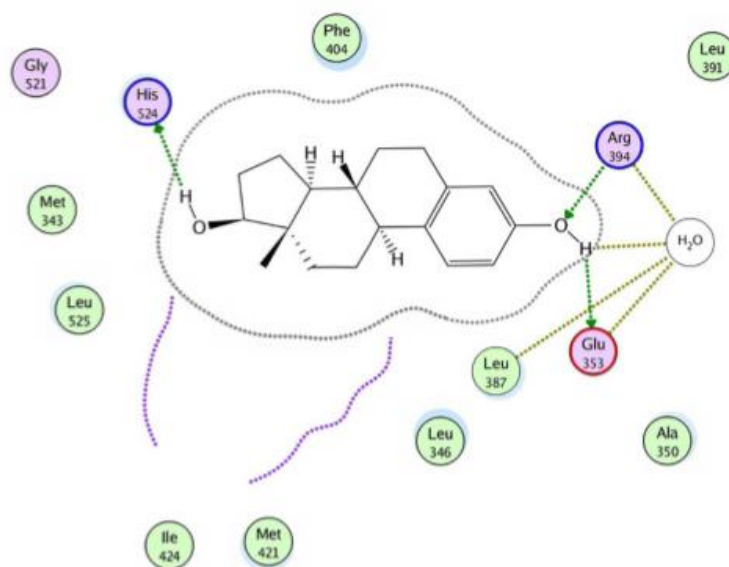


Figura 152: Interacción de los residuos Arg394, His524 y Glu353 con estradiol

Al inicio del docking se van generando distintas posiciones de los ligandos en el bolsillo o receptor en estudio usando los algoritmos de colocación que posee el MOE. Luego se hace la evaluación energética arrojando un resultado de score.

En la Tabla 29 se muestran los resultados de score obtenidos durante los 3 estudios de docking realizados para cada complejo en estudio y para el estradiol. Como puede observarse el docking 2 fue el que arrojó mejores resultados, ya que cuanto más negativo el valor de score mayor es la unión entre el receptor y la molécula en estudio.

	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>Estradiol</i>
<i>Docking 1</i>	-4.8	-3.5	-5.4	-10.8
<i>Docking 2</i>	-5.7	-8.5	-5.9	-9.6
<i>Docking 3</i>	-3.7	6.4	-4.4	-10.1

Tabla 30: Score obtenidos durante el docking molecular

Para el estradiol los tres dockings fueron buenos, lo cual era esperable por tratarse de la molécula natural que interacciona con el receptor. En el caso del docking 1 con un score de -10.7 se puede apreciar una interacción polar del tipo ácida entre el OH en posición 17 y la Glu353 y también una interacción entre el

anillo aromático y un protón de la Leu384. Para el caso del docking 2 (score -9.6) se observa una interacción entre las His524 y el OH en posición 3. Las interacciones encontradas para el estradiol modelado y el RE involucran los aminoácidos His524 y Glu353 tal como indica la bibliografía. También se encontró una interacción con Leu 384 no descrita en bibliografía y no se encontró la interacción esperada con Arg 394 [90] (Figura 153).

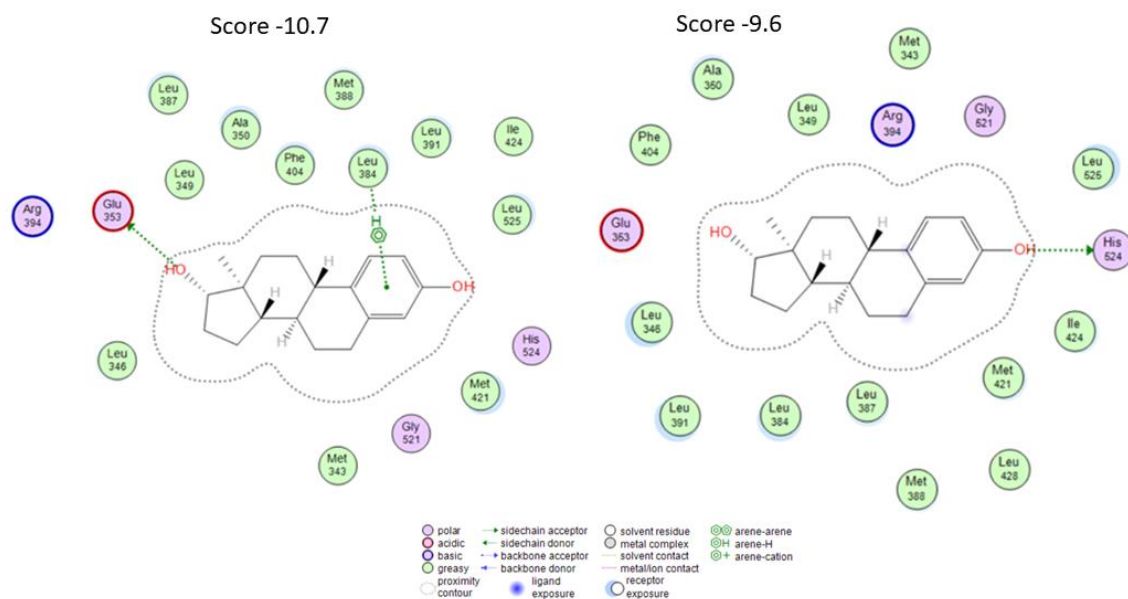


Figura 153: Interacción entre el estradiol y el RE

Para el caso de **C1** el mejor docking fue el segundo. La Figura 154 muestra el resultado de la interacción de **C1** con el RE. En la misma, puede observarse una interacción polar entre un grupo CO con Glu353, una interacción del tipo hidrofóbico entre el OH en posición 3 y un Met343 y por último una interacción hidrofóbica entre el triazol y una Leu391. Luego de este estudio, se puede asegurar que el triazol interacciona de manera hidrofóbica con el receptor. Esta interacción podría afectar negativamente la actividad biológica, ya que **C1** es uno de los trazadores con la menor unión a células MCF-7 determinada experimentalmente.

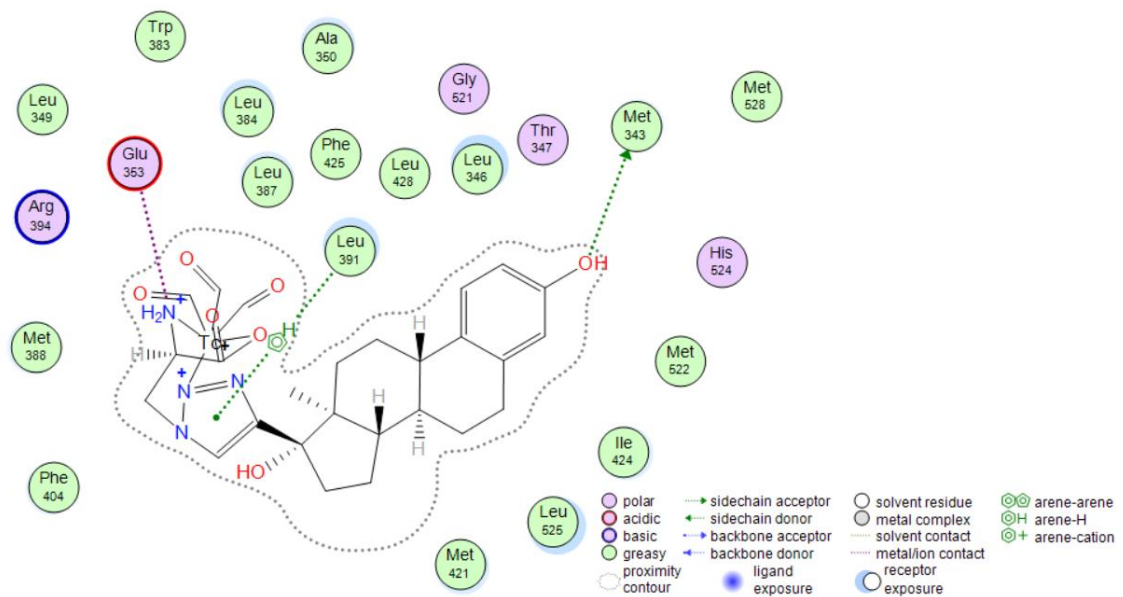


Figura 154: Interacción entre **C1** y el RE

Para el caso de **C2** el mejor docking fue el segundo. Al observar la Figura 155 se puede apreciar que los átomos de S de la unidad quelante interaccionan con el receptor. Adicionalmente, **C2** presenta dos grupos ácidos carboxílicos en su estructura, uno de los cuales interacciona con la HisA516 del RE. Este complejo posee muchas interacciones con el RE lo que podría explicar su alta unión a células MCF7.

Por otro lado, se planteó que la presencia de dos moléculas de estradiol por centro metálico podría aumentar la unión al RE, pero como puede apreciarse en el docking una de esas moléculas queda por afuera del bolsillo del RE, no interaccionando con el mismo. Esto, sin embargo, no va en contra de lo antes expuesto ya que la molécula de estradiol que queda por fuera del bolsillo del RE podría interaccionar con un RE que se encuentre contiguo.

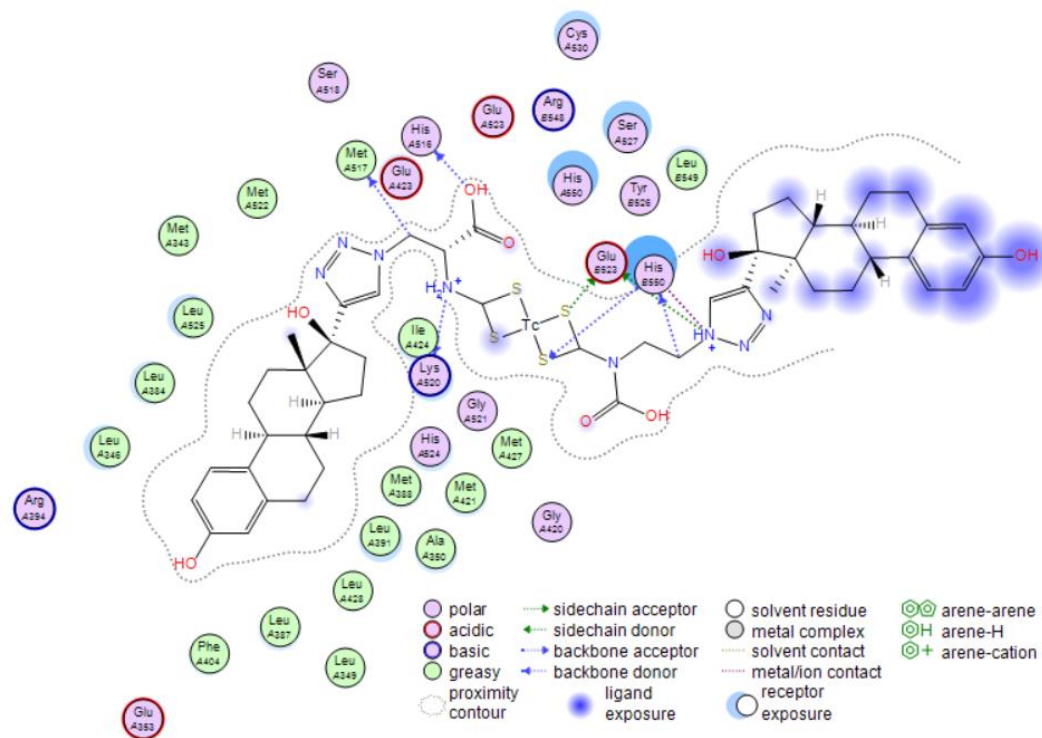


Figura 155: Interacción entre **C2** y el RE

Para el caso de **C3** los docking 1 y 2 presentaron casi el mismo resultado de score. En la Figura 156 pueden apreciarse estos resultados. En el caso del docking de score -5.4 existe una única interacción hidrofóbica del ácido carboxílico de **C3** con un residuo de Pro324, pero se puede ver que la molécula de estradiol queda por fuera del bolsillo del receptor, siendo la unidad quelante la que queda en el bolsillo, lo cual no es muy deseable ya que podría perderse la actividad biológica. En el caso del docking de score -5.9 no hay interacción entre el ácido carboxílico de **C3** y el RE, pero si existen otras interacciones, inclusive interacciones entre el S de la unidad quelante y el receptor, como se había encontrado en el docking de **C2**. Esto podría explicar la unión a células MCF-7 intermedia que posee este trazador. Por otro lado, en este segundo docking la molécula de estradiol queda dentro del bolsillo del receptor mientras que parte del coligando NS_3 queda por fuera del bolsillo, lo cual es mejor que lo que sucede en el docking 1.

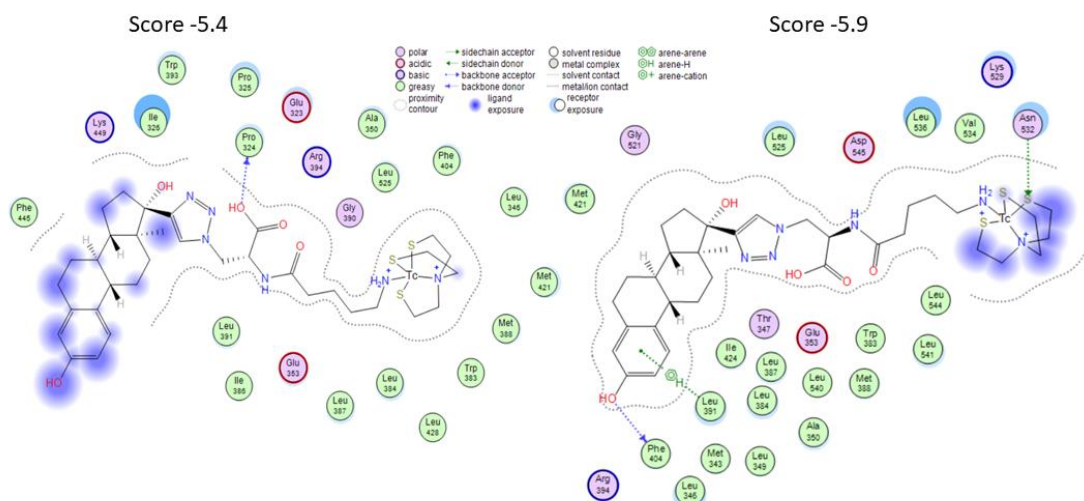


Figura 156: Interacción entre **C3** y el RE

Este estudio de docking es una primera aproximación de cómo sería la interacción de los trazadores con el RE. Dado que la resolución del blanco molecular encontrado es muy baja, lo ideal sería conseguir otro receptor con mejor resolución y volver a realizar los docking para tener una mejor precisión en los resultados.

5.8 Evaluación *in vivo* de los trazadores

5.8.1 Biodistribución en animales normales

El comportamiento *in vivo* fue evaluado solo para **C2**, ya que es el trazador que muestra mejores propiedades *in vitro*. La biodistribución normal se estudió en ratas Wistar hembras de 2-3 meses de edad. Para ello, se inyectó el trazador por vía intravenosa y transcurrido el tiempo de biodistribución establecido (30 minutos, 1 hora y 2 horas post-inyección) los animales fueron anestesiados y sacrificados por tracción cervical. Los órganos, tejidos y muestras de interés fueron extraídos, pesados y su actividad medida en un contador de centelleo sólido.

En la Tabla 31 se muestran los resultados obtenidos. Como puede observarse **C2** presenta una baja actividad tiroidea (0.03 ± 0.02 a las 2 horas) lo que indica una reoxidación insignificante coincidente con la buena estabilidad observada *in vitro*. La actividad en sangre disminuye a lo largo del tiempo estudiado siendo de

8.3 ± 0.7 a los 30 minutos, 6.1 ± 3.6 a la hora y 5.1 ± 2.5 a las 2 horas. La captación en el hígado es significativa (13.0 ± 1.3 a las 2 horas), lo cual es esperable dada las características fisicoquímicas de este complejo. La excreción se produjo principalmente a través del sistema hepatobiliar (% en los intestinos a las 2 horas 36.4 ± 5.6), siendo la excreción por orina despreciable (0.18 ± 0.28 a las 2 horas).

Órgano	% de Actividad Inyectada		
	30 min	60 min	120 min
Sangre	8.3 ± 0.7	6.1 ± 3.6	5.1 ± 2.5
Hígado	17.7 ± 3.2	13.6 ± 0.7	13.0 ± 1.3
Riñones	1.5 ± 0.5	3.0 ± 1.0	4.0 ± 1.9
Tiroides	0.10 ± 0.16	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.02
Musculo	3.0 ± 2.2	2.2 ± 2.5	1.1 ± 0.3
Estomago	0.5 ± 0.3	1.3 ± 0.3	14.1 ± 2.4
Intestino	26.9 ± 4.9	26.7 ± 8.2	36.4 ± 5.6
Vejiga y orina	0.6 ± 0.4	0.09 ± 0.12	0.18 ± 0.28

Los valores se muestran como el promedio ± D.S

Tabla 31: Resultados de biodistribución normal de **C2**

La Tabla 32 muestra que **C2** presenta una actividad en sangre superior a la actividad del [¹⁸F]F-FES. En cambio, la captación hepática de **C2** es significativamente menor. Lo cual sería una gran ventaja a la hora de realizar una imagen utilizando este trazador [91].

Órgano	% de Actividad Inyectada/ gramo de C2	% de Actividad Inyectada/ gramo de [¹⁸ F]FES
	30 min	30 min
Sangre	0.65 ± 0.02	0.16 ± 0.03
Hígado	1.5 ± 0.3	2.1 ± 0.7

Los valores se muestran como el promedio ± D.S

Tabla 32: Resultados de % de Actividad inyectada/ gramo de **C2** y [¹⁸F]FES

5.8.2 Biodistribución en animales portadores de tumores inducidos

Con el fin de evaluar la potencialidad clínica de **C2** se estudió la biodistribución en ratones nude portadores de tumores inducidos por inoculación con células de cáncer de mama MCF-7. En la Tabla 33 se muestran los valores de % de Actividad/g a los 60 minutos de biodistribución en sangre, músculo y tumor, además de la relación tumor/músculo y tumor/sangre para el trazador en estudio.

% de Actividad / gramo a los 60 min	
	C2
<i>Sangre</i>	2.12 ± 0.05
<i>Músculo</i>	0.16 ± 0.01
<i>Tumor</i>	0.59 ± 0.12
	Relación
<i>Tumor/ Musculo</i>	3.59 ± 0.63
<i>Tumor/Sangre</i>	0.35 ± 0.19

Los valores se muestran como el promedio ± D.S

Tabla 33: Resultados de biodistribuciones en animales con tumores inducidos para **C2**

Se observa que **C2** presenta una relación tumor/músculo cercano a 4. Este valor (3.59±0.63) es comparable con el obtenido para el trazador [^{99m}Tc]Tc-DTPA-estradiol del grupo de Xia *et al.* [119] (3.9±0.7).

Sin embargo, la A /gramo de **C2** en el tumor (0.59 ± 0.12) es casi 4 veces menor que el correspondiente al [¹⁸F]FES (2,20 ± 0,59) en el mismo modelo animal [172].

6 CONCLUSIONES

En este trabajo se desarrollaron 4 nuevos trazadores derivados de estradiol, para Imagenología molecular en cáncer de mama RE+.

Partiendo del etinilestradiol se sintetizaron tres ligandos para marcación con $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ (**L1**, **L2** y **L3**) incorporando átomos donadores de electrones adecuados para coordinar con el radiometal en diferentes estados de oxidación. La estructura de los ligandos fue confirmada por diferentes técnicas espectroscópicas. Se trabajó con diferentes estados de oxidación del metal y diferentes unidades quelantes de manera de poder estudiar su influencia en las propiedades generales de los productos resultantes.

La marcación de **L1** se realizó mediante la formación de un complejo del tipo $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc(I)}$ tricarbonílico, la de **L2** mediante la formación de un complejo $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc(V)} \equiv \text{N}$ y la de **L3** mediante la formación de un complejo $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc(III)}$ 4+1.

Los 3 complejos fueron estables en el medio de reacción y en plasma humano por al menos 4 horas.

Los valores de lipofilicidad obtenidos son concordantes con las estructuras propuestas y se encuentran en el rango adecuado para la penetración de membranas biológicas, propiedad de gran importancia dado que el receptor de estrógenos es un receptor nuclear. **C2** y **C3** tienen las lipofilicidades más bajas, posiblemente debido a la presencia de un grupo ácido carboxílico, ionizable al pH del estudio. Por otro lado, **C1** es el más lipofílico, posiblemente debido a la presencia en su estructura de un grupo triazol.

La unión a proteínas plasmáticas resultó elevada pero este resultado es esperable dado el alto porcentaje de unión a proteínas plasmáticas del estradiol.

Los estudios de unión a células de cáncer de mama mostraron que **C2** y **C3** poseen una unión específica al receptor, mientras que en el caso de **C1** la unión es inespecífica. El % de unión permanece incambiado al aumentar el tiempo y el % de eflujo muestra que **C2** es el complejo que permanece más retenido a las células liberando solo un 27% de su actividad. **C2** es el trazador que presenta la

mejor unión en células MCF7 (6.7 ± 0.8)%, teniendo valores similares al estradiol natural (6.6 ± 1.4)% y al [^{18}F]F-FES, radiofármaco de referencia en la actualidad para Imagenología molecular en RE (6.3 ± 1.3)%.

Los estudios de docking molecular realizados para el estradiol, **C1**, **C2** y **C3** muestran que **C1** es el trazador que tiene menos interacción con el bolsillo del receptor, lo cual concuerda con ser el trazador de [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc que tiene menos unión con las células MCF-7. Por otro lado, el triazol interacciona de manera hidrofóbica con el RE, lo cual podría estar afectando negativamente la actividad biológica. Pudo observarse que **C2** es el trazador que tiene mayor cantidad de interacciones con el bolsillo del receptor, en concordancia con las mejores propiedades. **C3** posee menos interacciones que **C2** y más que **C1** con el bolsillo del receptor, lo cual concuerda con sus valores intermedios de % de unión en células MCF-7.

Los estudios *in vivo* muestran que **C2** presenta mayor actividad en sangre que el [^{18}F]F-FES, mientras que la captación hepática de **C2** es significativamente menor que la del radiofármaco de referencia, posicionando a **C2** como el trazador con las mejores propiedades *in vivo* desarrollado durante esta tesis doctoral.

Las biodistribuciones en ratones portadores de tumores de mama inducidos mostraron una acumulación preferencial del trazador en tumor, con una actividad casi 4 veces mayor que la actividad en el músculo. Sin embargo, el % de A/gramo de tumor es significativamente menor que en el [^{18}F]F-FES.

Los resultados experimentales demuestran claramente la influencia del sistema quelante en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las biomoléculas marcadas con [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc. En consecuencia, el diseño del quelante adecuado es crucial para obtener la estabilidad biológica y la farmacocinética deseadas para un radiofármaco.

Se desarrolló también un trazador de [^{18}F]F ([^{18}F]F-**FEET**). Para ello se sintetizó un precursor (**M**) que contiene el grupo tosilo como buen grupo saliente para poder realizar la sustitución nucleofílica con el [^{18}F]F y además un grupo azida para incorporar la parte biológicamente activa mediante la reacción de Huisgen.

La estructura de **M** fue confirmada por técnicas espectroscópicas. También se sintetizó el análogo no radiactivo [¹⁹F]F (**[¹⁹F]F-FEET**) utilizado en la optimización de la técnica analítica necesaria para la posterior caracterización del trazador.

La marcación de **M** con [¹⁸F]F fue realizada en el módulo automatizado de síntesis con buen rendimiento originando el intermediario **[¹⁸F]F-PRE-FEET**. La reacción de Husigen se realizó de forma manual y de forma automática, siendo el primer reporte de una reacción de este tipo realizada en un módulo automatizado de síntesis. En ambos casos el producto de interés con elevada pureza radioquímica.

El **[¹⁸F]F-FEET** fue estable en el medio de reacción y en plasma humano por al menos 4 horas. Presentó lipofilicidad elevada, lo cual es concordante con su estructura. La misma se encuentra en el rango adecuado para la penetración de membranas biológicas. La unión a proteínas plasmáticas resultó elevada.

El % de unión en células MCF-7 resultó muy bajo en comparación con el estradiol natural y el [¹⁸F]F-FES.

En conclusión, se ha trabajado en todas las etapas básicas del desarrollo de un radiofármaco, desde la selección del farmacóforo, la síntesis de los ligandos y precursores, pasando por el proceso de marcación con [^{99m}Tc]Tc y [¹⁸F]F, de caracterización fisicoquímica y biológica *in vitro* e *in vivo*. Además, fue posible incursionar en la realización de estudios de docking molecular.

Como resultado, se logró un complejo (**C2**) con propiedades comparables al FES como potencial radiofármaco de ^{99m}Tc para Imagenología Molecular de receptores de estrógeno y se adquirió experiencia que podrá ser capitalizada por el grupo en investigaciones futuras sobre este y otros blancos moleculares de interés.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

La Medicina Nuclear es un campo de constante crecimiento y siempre ha estado estrechamente relacionado con el desarrollo de nuevos radiofármacos. El uso de los mismos es una herramienta importante para comprender mejor las patologías y desarrollar tratamientos efectivos. Nuestra experiencia nos ha permitido constatar que la unidad quelante tiene influencia no sólo en las propiedades farmacocinéticas sino también en la interacción con los sistemas biológicos. Es por esto que a futuro pretendo buscar nuevos métodos de coordinación, buscando estrategias novedosas que permitan modificar las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los trazadores de interés. Inicialmente trabajaré en el desarrollo de nuevos trazadores para Imagenología de los RE pero luego pretendo estar atenta a la demanda por parte de los médicos nucleares y trabajar en el desarrollo de nuevos radiofármacos destinados a patologías de interés en el área.

En este sentido se plantean a continuación algunos de los posibles caminos a desarrollar una vez finalizada la tesis doctoral:

El primero de ellos surge de una colaboración con el Dr. Hans-Jürgen Pietzsch del Institute of Radiopharmaceutical Cancer Research en Dresden-Rossendorf, Alemania. El grupo del Dr. Pietzsch se ha especializado en la generación de complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc(III)}$ '4+1' formados por coordinación de un ligando tripodal tetradentado 2,2',2''-nitrotris(etanotiol) y un isonitrilo monodentado [41,43, 45-49, 81]. La disposición espacial de ligando y coligando en este tipo de complejos es tal que actúa como blindaje estérico para el metal, evitando su interferencia con el sistema biológico. Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se trabajó este concepto desarrollando **C3** pero se pretende culminar con los estudios de otro trazador generado en el área que se muestra en la Figura 157. Este trazador posee el mismo ligando derivado de estradiol que **C3** y otro coligando de manera de modular las propiedades fisicoquímicas y biológicas del complejo resultante.

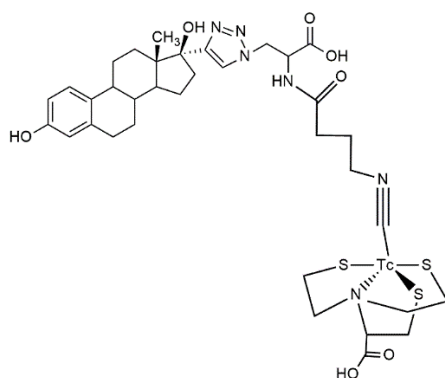


Figura 157: Complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ del tipo 4+1

Adicionalmente, este es un concepto muy interesante que se puede utilizar a futuro para generar una familia de complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}'4+1'$ para cualquier patología de interés, usando un isonitrilo monodentado que contenga la biomolécula y coligandos con diferentes sustituyentes R, modulando las propiedades fisicoquímicas de los complejos y mejorando la llegada del trazador al sitio blanco seleccionado.

La segunda línea que se desea incorporar al grupo se inició durante una pasantía que realicé en el Departamento de Química de la Universidad de Zúrich, Suiza bajo la supervisión del Dr. Roger Alberto. El grupo del Dr. Alberto tiene una destacada experiencia en la síntesis de ligandos que contienen el grupo ciclopentadienilo (Cp). Los ligandos Cp son muy atractivos para el diseño de posibles radiofármacos basados en pequeñas moléculas bioactivas, ya que imita los anillos de fenilo y forma complejos de tricarbonilo tipo piano-taburete pequeños y estables con tecnecio y renio. La síntesis de los ligandos Cp multifuncionales (Figura 158) se basan en la reacción de Hatanaka donde una sal de trifenilfosfina con sustituyentes R reacciona con α -bromocetonas también con sustituyentes R en condiciones suaves y con buenos rendimientos [22,25,26,39].

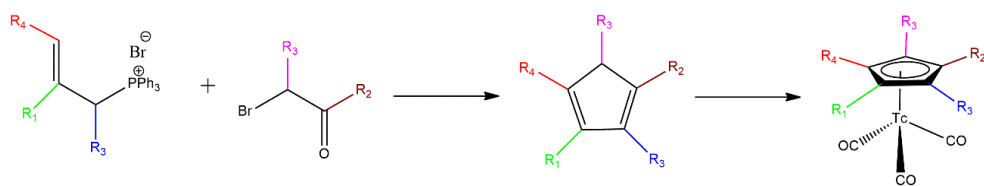


Figura 158: Reacción de formación de los ligandos y complejos Cp multifuncionales.

Se plantea entonces generar un trazador derivado de estradiol utilizando esta química muy novedosa. Asimismo, utilizando esta química se podrá a futuro generar trazadores donde se sustituya alguna de las posiciones R con una biomolécula destinada a un sitio blanco de interés. De igual forma se podrán modificar los sustituyentes R del anillo Cp de manera de encontrar las mejores propiedades fisicoquímicas que aumenten la llegada del trazador al sitio al cual está destinada su acumulación.

Otra estrategia que se plantea es la formación de complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ tricarbónico-NOTA. Los mismos se han comenzado a investigar muy recientemente encontrando excelentes resultados. En este sentido nuestro grupo de trabajo tiene una vasta experiencia en el desarrollo de complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{I})$ tricarbónico con quelantes tridentados que contienen nitrógenos, oxígenos o azufres, como se muestra en la Figura 159-A. La estrategia que se plantea es generar los complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -tricarbónico usando como ligando tridentado el quelante bifuncional macrocíclico NOTA, el cual se funcionalizará para añadir la molécula biológica derivada de estradiol que llegará a los RE (Figura 159-B). Este tipo de complejos pueden usarse a futuro para el desarrollo de nuevos radiofármacos destinados a diversas patologías y para desarrollar estudios comparativos con análogos marcados con ^{68}Ga [173].

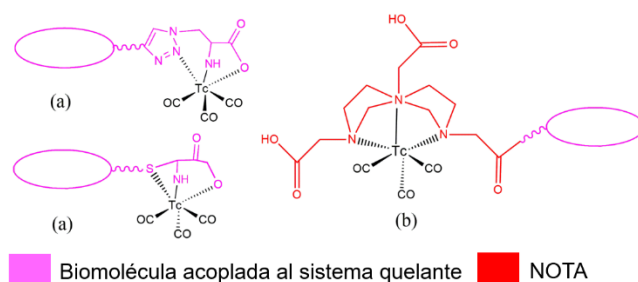


Figura 159: Complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ tricarbónico (a) y $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ tricarbónico-NOTA (b)

Otra alternativa es la formación de complejos '3+1' formados por la combinación de un ligando tridentado donador π conteniendo el set de átomos donores $[\text{S}^-, \text{N}, \text{S}^-]$ y un ligando monodentado aceptor π de tipo PR_3 (Figura 160). En este caso la biomolécula deberá incorporarse en el ligando tridentado. La ventaja principal de

este tipo de nitrurocomplejos radica en la posibilidad de utilizar como coligandos monofosfinas disponibles comercialmente y de adecuada estabilidad [67].

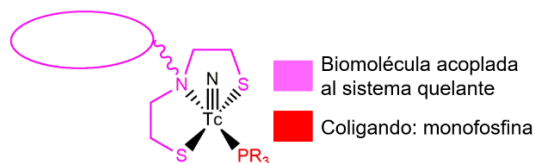


Figura 160: Complejos del tipo '3+1'

Por otro lado, dado que durante la tesis doctoral se desarrolló un radiofármaco de [¹⁸F]F destinado a los RE obteniendo resultados pocos auspiciosos, se pretende a futuro trabajar con [⁶⁸Ga]Ga. El [⁶⁸Ga]Ga es un radiometal PET que se encuentra disponible a través de un generador de [⁶⁸Ge]Ge/[⁶⁸Ga]Ga y por ende es menos costoso y más fácil de obtener que el [¹⁸F]F, que requiere un ciclotrón e instalaciones más costosas y complejas.

Todas estas nuevas estrategias de marcación que se plantean permitirán al grupo de trabajo incorporar nuevos métodos de coordinación, buscando estrategias que permitan modificar las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los trazadores de interés

Por otro lado, será necesario continuar aprendiendo y trabajando en los estudios computacionales para poder utilizar esta herramienta previa al desarrollo de los trazadores en el laboratorio. Asimismo, deseo incursionar en los estudios *in vitro* en receptores aislados para que el grupo cuente con otra herramienta que permita seleccionar a los mejores candidatos para los estudios *in vivo*.

8 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Robert. A. Weinberg. The Biology of Cancer (2007). Garland Science, Taylor & Francis Group. Estados Unidos.
- [2] <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- [3] <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>
- [4] <https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/Situacion-Epidemiologica-del-Uruguay-en-relacion-al-Cancer--Mayo-2021-uc108>
- [5] T.H. Oude Munnin, W.B. Nagengast, A.H. Brouwers, C.P. Schröder, G.A. Hospers, M.N. Lub-de Hooge, E. van der Wall, P.J. van Diest, E.G.E. de Vries. Molecular imaging of breast cancer. *The Breast*. 2009;18:66–73.
- [6] Hormonal Receptors PET-CT. Chapter 13. Erik F. J. de Vries, Andor W. J. M. Glaudemans, Caroline P. Schröder and Geke A. P. Hospers.
- [7] Michel van Kruchten, Elisabeth G E de Vries, Myles Brown, Erik F J de Vries, Andor W J M Glaudemans, Rudi A J O Dierckx, Carolien P Schröder, Geke A P Hospers. PET imaging of oestrogen receptors in patients with breast cancer. *Lancet Oncol*. 2013;14: 465–475.
- [8] François Benard,MD, Ays xe Mavi,MD. Receptor Imaging in Patients with Breast Cancer. *PET Clin*. 2009;4:329–341.
- [9] B Hanstein, S Djahansouzi, P Dall, M W Beckmann¹ and H G Bender. Insights into the molecular biology of the estrogen receptor define novel therapeutic targets for breast cancer. *European Journal of Endocrinology*. 2004;150: 243-255.
- [10] Stephanie Sommer and Suzanne A. W. Fuqua. Estrogen receptor and breast cancer. *Seminars in cancer biology*. 2001;11:339–352.
- [11] KA Kurdziel, G Ravizzini, BY Croft, JL Tatum, PL Choyke & H Kobayashi. The evolving role of nuclear molecular imaging in cancer. *Expert Opin. Med. Diagn*. 2008;7: 829-842.

- [12] Kowalski R., Falen S. Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine. 2nd ed. (2004). American Pharmacists Association. Estados Unidos.
- [13] Yamil Chain, Luis Illanes. Radiofármacos en Medicina Nuclear. Fundamentos y aplicación clínica. Universidad Nacional de la Plata, Editorial de la Universidad de la Plata. (2015).
- [14] Marie Claire Cantone, Cristoph Hoeschen. Radiation Physics for Nuclear Medicine. (2011). Springer. Estados Unidos.
- [15] <http://www.subimn.org.uy/sociedad/historia/>
- [16] Shuang Liu. The role of coordination chemistry in the development of target specific radiopharmaceuticals. Chemical Society reviews. 2004;33: 445-461.
- [17] Shuang Liu . Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. Advanced Drug Delivery Review. 2008;60:1347-1370.
- [18] Sibaprasad Bhattacharyya and Manish Dixit. Metallic radionuclides in the development of diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals. Dalton Transaction. 2011;40:6112-1370, 2011, 40, 6112-6128.
- [19] Catherine E. Housecroft and Alan G. Sharpe. Inorganic Chemistry. Cuarta edición. (2012). Pearson. Inglaterra.
- [20] Repartido teórico Moléculas marcadas con ^{99m}Tc . Dra Ana M. Rey. Área de Radioquímica, Facultad de Química, Montevideo, Uruguay.
- [21] S. Jurisson, D. Berning, Wei Jia, and Oangshe Ma. Coordination Compounds in Nuclear Medicine. Chemical Reviews. 1983;93:1137-1156.
- [22] Kowalski R., Falen S. Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine. 3^{era} ed. (2011). American Pharmacists Association. Estados Unidos.
- [23] Michael J. Welch, Carol S. Redvanly. Handbook of Radiopharmaceuticals. Radiochemistry and Applications. (2003). Wiley. Estados Unidos.
- [24] Roger Alberto, Henrik Braband, and Qaisar Nadeem. Bioorganometallic Technetium and Rhenium Chemistry: Fundamentals for Applications. Chimia. 2020;74:953-959.

- [25] Ana Rey. Aplicación de nuevos cores de Tc al diseño de radiofármacos. Avances en Radiofarmacia. Comité de Radiofarmacia Asociación latinoamericana de sociedades de biología y Medicina Nuclear. 2009.
- [26] Yasushi Arano. Recent advances in ^{99m}Tc radiopharmaceuticals. *Annals of Nuclear Medicine*. 2002;2:79-93.
- [27] Roger Alberto, Roger Schibli, André Egli, and August P. Schubiger. A Novel Organometallic Aqua Complex of Technetium for the Labeling of Biomolecules: Synthesis of $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ from $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ in Aqueous Solution and Its Reaction with a Bifunctional Ligand. *Journal of the American Chemical Society*. 1998;120:7987-7988.
- [28] R. Alberto, R. Schibli, U. Abram, A. Egli, F. F. (Russ) Knapp and P. A. Schubiger. Potential of the " $[\text{M}(\text{CO})_3]^+$ " (M = Re, Tc) Moiety for the Labeling of Biomolecules. *Radiochimica Acta*. 1997;79:99-103.
- [29] Roger Alberto, Roger Schibli, Robert Waibel, Ulrich Abram, August P. Schubiger. Basic aqueous chemistry of $[\text{M}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ (M=Re, Tc) directed towards radiopharmaceutical application. *Coordination Chemistry Reviews*. 1999;190:901-919.
- [30] Elisa Garcia-Garayoa, Peter Blauenstein, Matthias Bruehlmeier, Alain Blanc, Koen Iterbeke, Peter Conrath, Dirk Tourwe and P. August Schubiger. Preclinical Evaluation of a New, Stabilized Neurotensin (8-13) Pseudopeptide Radiolabeled with ^{99m}Tc . *Journal of Nuclear Medicine*. 2002;43(3):374-383.
- [31] Dave R. van Staveren, Robert Waibel, Stefan Mundwiler, P. August Schubiger, Roger Alberto. "Conjugates of vitamin B12 with N ϵ -functionalized histidine for labeling with $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$. Synthesis and biodistribution studies in tumor bearing mice. *Journal of Organometallic Chemistry*. 2004;689:4803-4810.
- [32] Pascal Haefliger, Nikos Agorastos, Annabelle Renard, Guya Giambonini-Brugnoli, Cornelia Marty and Roger Alberto. Cell uptake and radiotoxicity studies of an nuclear localization signal peptide-intercalator conjugate labeled with $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$. *Bioconjugate Chemistry*. 2005; 16(3):582-587.
- [33] Haiyang He, Jennifer E. Morely, Elsa Silva-Lopez, Brienne Bottenus, Maribel Montajano, Glenn A. Fugate, Brendan Twamley and Paul D. Benny. *Synthesis*

and Characterization of Nonsteroidal-Linked $M(\text{CO})_3^+$ ($M=^{99\text{m}}\text{Tc}$, Re) Compounds Based on the Androgen Receptor Targeting Molecule Flutamide. *Bioconjugate Chemistry*. 2009;20:78-86.

[34] Nikos Agorastos, Lubor Borsig, Anabelle Renard, Philipp Antoni, Giampietro Viola, Bernhard Spingler, Philipp Kurz and Roger Alberto. Cell-Specific and Nuclear Targeting with $[M(\text{CO})_3]^+$ ($M=^{99\text{m}}\text{Tc}$, Re)-Based Complexes Conjugated to Acridine Orange and Bombesin. *Chemical European Journal*. 2007;13:3842-3852.

[35] Soledad Fernández, Nancy Crócamo, Marcelo Incerti, Javier Giglio, Laura Scarone and Ana Rey. Preparation and preliminary bioevaluation of a $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -glucose derivative prepared by a click chemistry route. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 2012;55 :274–280.

[36] Soledad Fernández, Javier Giglio, Ana M. Rey, Hugo Cerecetto. Influence of ligand denticity on the properties of novel $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$ -carbonyl complexes. Application to the development of radiopharmaceuticals for imaging hypoxic tissue. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2012;20: 4040–4048.

[37] Stefan Mundwiler, Monika Kündig, Kirstin Ortner and Roger Alberto. A new [2 + 1] mixed ligand concept based on $[^{99(\text{m})}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$: a basic study. *Dalton transactions*. 2004;9: 1320-1328.

[38] [Fabio Zobi](#), [Bernhard Spingler](#) and [Roger Alberto](#). Structure, reactivity and solution behaviour of $[\text{Re}(\text{ser})(7\text{-MeG})(\text{CO})(3)]$ and $[\text{Re}(\text{ser})(3\text{-pic})(\text{CO})(3)]$: "nucleoside-mimicking" complexes based on the fac- $[\text{Re}(\text{CO})(3)](+)$ moiety. *Dalton Transactions*. 2005; 7;(17): 2859-2865.

[39] Angelo Frei, *et al.* Multifunctional Cyclopentadienes as a Scaffold for Combinatorial Bioorganometallics in $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_2\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3)\text{M}(\text{CO})_3]$ ($M=\text{Re}$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$) Piano-Stool Complexes. *Chemistry a European Journal*. 2018; 24(40): 10156–10164.

[40] Todd W. Spradau and John A. Katzenellenbogen. Protein and Peptide Labeling with (Cyclopentadienyl)tricarbonyl Rhenium and Technetium. *Bioconjugate Chemistry*. 1998; 9: 765-772.

[41] Pietzsch H, Gupta A, Syhre R, Leibnitz P, Spies H. Mixed-Ligand Technetium(III) Complexes with Tetradendate / Monodendate NS_3 / isocyanide coordination: A new nonpolar Technetium chelate system for the design of neutral

and lipophilic complexes stable in vivo. *Bioconjugate Chemistry*. 2001;12:538-544.

[42] Sampson C. Textbook of radiopharmacy, theory and practice. 2^o Edición. Gordon and Breach Science publishers (1998).

[43] Hartmut Spies, Matthias Glaser, Hans-Jürgen Pietzsch, F. Ekkehardt Hahn, Thomas Ligger. Synthesis and reactions of trigonal-bipyramidal rhenium and technetium complexes with a tripodal, tetradentate NS₃ ligand. *Inorganic Chimica Acta*. 1995;240:465-478.

[44] Johannsen B. Institute of bioinorganic and Radiopharmaceutical Chemistry. Forschungszentrum Rossendorf. Annual Report 1997.

[45] Mirschink P, Stehr S, Pietzsch H.J., Bergmann R, Pietzsch J, Wunderlich G, Heintz A, Kropp J, Spies H, Kraus W, Deussen A and Walther M. Modified "4 + 1" Mixed Ligand Technetium-Labeled Fatty acids for Myocardial Imaging: Evaluation of Myocardial Uptake and Biodistribution. *Bioconjugate Chemistry*. 2008;19:97-108.

[46] Drews A, Pietzsch H, Syhre R, Seifert S, Varnäs K, Hall H, Halldin C, Kraus W, Karlsson P, Johnsson C, Spies H, Johannsen B. Synthesis and biological evaluation of technetium(III) mixed-ligand complexes with high affinity for the cerebral 5-HT_{1A} receptor and the alpha₁-adrenergic receptor. *Nuclear Medicine and Biology*. 2002;29:389-398.

[47] Seifert S, Künstler J, Schiller E, Pietzsch H, Pawelke B, Bergmann R, Spies H. Novel Procedures for Preparing ^{99m}Tc(III) Complexes with Tetradentate/Monodentate Coordination of Varying Lipophilicity and Adaptation to ¹⁸⁸Re Analogues. *Bioconjugate Chemistry*. 2004;15:856-863.

[48] Künstler J., Seidel G., Bergmann R., Gniazdowska E., Walther M., Schiller E., Decristoforo C., Stephan H., Haubner R., Steinbach J., Pietzsch H. Novel ^{99m}Tc '4+1' peptide conjugates: Tuning the biodistribution by variation of coligands. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010;45:3645-3655.

[49] Javier Giglio, Soledad Fernández, Hans-Jürgen Pietzsch, Sylvia Dematteis, María Morenod, José P. Pacheco, Hugo Cerecetto, Ana Rey. Synthesis, in vitro and in vivo characterization of novel ^{99m}Tc-'4+1'-labeled 5-nitroimidazole derivatives as potential agents for imaging hypoxia. *Nuclear Medicine and Biology*. 2012;39:679-686.

- [50] Vallabhajosula, S., Zimmerman, RE., Picard, M., Stritzke, P., Mena, I., Hellman, RS., Tikofsky, RS., Stabin, MG., Morgan, RA., Goldsmith, SJ. Technetium-99m ECD: a new brain imaging agent: in vivo kinetics and biodistribution studies in normal human subjects. *Journal of Nuclear Medicine*. 1989;30(5):599-604.
- [51] Rudi D. Neirinckx, Lewis R. Canning, Ian M. Piper, David P. Nowotnik, Roger D. Pickett, Richard A. Holmes, Wynn A. Volkert, Alan M. Forster, Peter S. Weisner, Janet A. Marriou, and Sue B. Chaplin. Technetium-99m d,l-HM-PAO: A New Radiopharmaceutical for SPECT Imaging of Regional Cerebral Blood Perfusion. *Journal of Nuclear Medicine*. 1987;28:191-202.
- [52] Mei-Ping Kung, D. Andrew Stevenson, Karl Plossl, Sanath K. Meegalla, Andrew Beckwith, William D. Essman, Mu Mu, Irwin Lucki, Hank R Kung. [^{99m}Tc]TRODAT-1: a novel technetium-99m complex as a dopamine transporter imaging agent. *European Journal of Nuclear Medicine*. 1997;24:372-380.
- [53] Johannsen, B., Pietzsch, H-J. Development of technetium-99m-based CNS receptor ligands: have there been any advances? *European Journal of Nuclear Medicine*. 2002;29:263-275.
- [54] Schwartz, D., Abrams, M., Hauser, M., Gaul, F., Larsen, S., Rauh, D., Zubietas, J. Preparation of Hydrazino-Modified Proteins and Their Use for the Synthesis of ^{99m}Tc-Protein Conjugates. *Bioconjugate Chemistry*. 1991;2:330-333.
- [55] Abrams, M., Juweid, M. Tenkate, C., Schwartz, D., Hauser, M., Gaul, F., Fucello, A., Rubin, R., Strauss, W., Fischman A. Technetium-99m-Human Polyclonal IgG Radiolabeled via the Hydrazino Nicotinamide Derivative for Imaging Focal Sites of Infection in Rats. *Journal of Nuclear Medicine*. 1990;31:2022-2028.
- [56] Liu, S., Edwards, D., Looby, R., Harris, A., Poirier, M., Barrett, J., Heminway, S., Carroll, T. Labeling a Hydrazino Nicotinamide-Modified Cyclic IIb/IIIa Receptor Antagonist with ^{99m}Tc Using Aminocarboxylates as Coligands. *Bioconjugate Chemistry*. 1996;7:63-71.
- [57] Edwards, D., Liu, S., Barrett, J., Harris, A., Looby, R., Ziegler, M., Heminway, S., Carroll, T. New and Versatile Ternary Ligand System for Technetium Radiopharmaceuticals: Water Soluble Phosphines and Tricine as Coligands in

Labeling a Hydrazinonicotinamide-Modified Cyclic Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Antagonist with ^{99m}Tc . *Bioconjugate Chemistry*. 1997;8:146-154.

[58] Purohit, A., Shuang, Liu., Casebier, D., Edwards, D. Phosphine-Containing HYNIC Derivatives as Potential Bifunctional Chelators for ^{99m}Tc -Labeling of Small Biomolecules. *Bioconjugate Chemistry*. 2003;14:720–727.

[59] Liu, S., Edwards, D., Barrett, J. ^{99m}Tc Labeling of Highly Potent Small Peptides. *Bioconjugate Chemistry*. 1997;8:621-636.

[60] John Baldas, John Bonnyman. Substitution Reactions of $^{99m}\text{TcNCl}$. A Route to a New Class of ^{99m}Tc -Radiopharmaceuticals. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 1985;36:133-139.

[61] Roberto Pasqualini, Adriano Duatti, Emmanuel Bellande, Veronique Comazzi, Valerie Brucato, Didier Hoffschir, Daniel Fagret and Michel Comet. Bis(Dithiocarbamate) Nitrido Technetium-99m Radiopharmaceuticals: A Class of Neutral Myocardial Imaging Agents. *The Journal of Nuclear Medicine*. 1994;35:334-341.

[62] Francesco Tisato, Fiorenzo Refosco, Marina Porchia, Cristina Bolzati, Giuliano Bandoli, Alessandro Dolmella, Adriano Duatti, Alessandra Boschi, Christian M. Jung, Hans-Juergen Pietzsch and Werner Kraus. The Crucial Role of the Diphosphine Heteroatom X in the Stereochemistry and Stabilization of the Substitution-Inert $[\text{M}(\text{N})(\text{PXP})]^{2+}$ Metal Fragments (M) Tc, Re; PXP) Diphosphine Ligand). *Inorganic Chemistry*. 2004;43:8617–8625.

[63] Boschi A, Ucelli L, Duatti A. Asymmetrical Nitrido Tc-99m heterocomplexes as potential imaging agents for benzodiazepine receptors. *Bioconjugate Chemistry*. 2003;53:1279-1288.

[64] Banerjee S, Maresca K, Francesconi L, Valliant J, Babich J, Zubieta J. New directions in the coordination chemistry of ^{99m}Tc : a reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design. *Nuclear Medicine and Biology*. 2005;32:1-20.

[65] Boschi A., Bolzati C., Benini E. A Novel Approach to the High-Specific activity labeling of small peptides with the Technetium-99m fragment $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PXP})]^{2+}$ (PXP = Diphosphine ligand). *Bioconjugate Chemistry*. 2001;12:1035-1042.

- [66] Javier Giglio, Soledad Fernández, Ana Rey, Hugo Cerecetto. Synthesis and biological characterisation of novel dithiocarbamate containing 5-nitroimidazole ^{99m}Tc -complexes as potential agents for targeting hypoxia. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011;21: 394–397.
- [67] Alessandra Boschi, *et al...* Rhenium(V) and Technetium(V) Nitrido Complexes with Mixed Tridentate π -Donor and Monodentate π -Acceptor Ligands. *Inorganic Chemistry*. 2012;51: 3130–3137
- [68] María Elena Cardoso, Emilia Tejería, Ana María Rey Ríos, Mariella Terán. Development and characterization of a ^{99m}Tc -labeled Neuropeptide Y short analog with potential application in breast cancer imaging. *Chemical Biology & Drug Design*. 2020;95:302–310.
- [69] Zibo Li, Peter S. Conti. Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010;62:1031-1051.
- [70] Bejot R., Fowler T., Carroll L., Boldon S., Moore J.E., Declerck J., Gouverneur V., Fluorous Synthesis of ^{18}F Radiotracers with the ^{18}F Fluoride Ion: Nucleophilic Fluorination as the Detagging Process. *Angewandte Chemie International*. 2009;48:586-589.
- [71] Production and Quality Control of Fluorine-18 Labelled Radiopharmaceuticals. IAEA-TECDOC-1968. 2021.
- [72] Orit Jacobson, Dale O. Kiesewetter, and Xiaoyuan Chen. Fluorine-18 Radiochemistry, Labeling Strategies and Synthetic Routes. *Bioconjugate Chemistry*. 2015;26:1–18.
- [73] Giglio J. Teórico Marcación con ^{18}F (2017), Curso de Radiofarmacia de la Facultad de Química, UdelaR.
- [74] H.H. Coenen, P.H. Elsinga, R. Iwata, M.R. Kilbourn, M.R.A. Pillai, M.G.R. Rajan, H.N. Wagner Jr., J.J. Zaknun. Fluorine-18 radiopharmaceuticals beyond ^{18}F FDG for use in oncology and neurosciences. *Nuclear Medicine and Biology*. 2010;37:727–740.
- [75] Lisheng Cai, Shuiyu Lu, and Victor W. Pike. Chemistry with ^{18}F Fluoride Ion. *European Journal of Organic Chemistry*. *J. Org.* 2008:2853–2873.

[76] Coenen H., Ermert J. 18F-Labeling innovations and their potential for clinical application. *Clinical and Translational Imaging*. <https://doi.org/10.1007/s40336-018-0280-0>. 2018.

[77] Schubiger, Lehmann, Friebe. *PET Chemistry. The Driving Force in Molecular Imaging*. (2007).

[78] Joel Aerts, James R. Ballinger, Martin Behe, Clemens Decristoforo, Philip H. Elsinga, Alain Faivre-Chauvet, Thomas L. Mindt, Petra Kolenc Peitl, Sergio C. Todde and Jacek Kozirowskik. Guidance on current good radiopharmacy practice for the small-scale preparation of radiopharmaceuticals using automated modules: a European perspective. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 2014;57:615–620.

[79] <https://www.comecer.com/fields/radiopharma/>

[80] <http://synthra.com/products/RNplus-Research.html>

[81] Tesis de Maestría en Química María Pía Pereira. Desarrollo y evaluación de potenciales radiotrazadores para Imagenología Molecular en cáncer de mama. 2021.

[82] Noriega-Reyes Y., McCarron E. L. Correguladores del receptor de estrógenos y su implicación en el cáncer de mamario. *Noriega y Langley, Cancerología* 3. 2008:29-40.

[83] Benita S. Katzenellenbogen, Inho Choi, Regis Delage-Mourroux, Tracy R. Ediger, Paolo G.V. Martini, Monica Montano, Jun Sun, Karen Weis, John A. Katzenellenbogen. Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2000;74:279–285.

[84] Cóppola F., Nader J., Aguirre R. Metabolismo de los estrógenos endógenos y cáncer de mama. *Rev. Med. Urug. Vol 21, versión On-line ISSN 1688-0390* (2005).

[85] Fritz. F. Parl. *Estrogens, Estrogen Receptor and Breast Cancer*. 2002.

[86] José Locía Espinoza, María Elena Hernández Aguilar, Gonzalo Emiliano Aranda Abreu, Fausto Rojas Durán, Jorge Manzo Denes, Genaro Alfonso Coria Ávila, Clara Elena Yerena Aguilar, Abraham Heriberto Soto Cid. El papel de los

estrógenos y sus receptores en la prevención y promoción de enfermedades proliferativas de la glándula prostática. Revista electrónica de Neurobiología. <https://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2013/8/Locia/HTML.html#inicio>.

[87] Ma. Yamilet Noriega-Reyes y Elizabeth Langley McCarron. Correguladores del Receptor de Estrógenos y su Implicación en el Cáncer Mamario. *Cancerología*. 2008;3: 29-40.

[88] Keasling H. H., Schueler F. W. The Relationship between Estrogenic Action and Chemical Constitution in a Group of Azomethine Derivatives. *Journal of the American Pharmaceutical Association*.

[89] Brzozowski A. M., Pike A. C. W., Dauter Z., Hubbard R. E., Bonn T., Engström O., Öhman L., Greene G., Gustafsson J., Carlquist M. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 1997;389: 753-758.

[90] Dessislava Jereva , Filip Frateva, Ivanka Tsakovska, Petko Alova , Tania Pencheva, Ilza Pajeva. Molecular dynamics simulation of the human estrogen receptor alpha: contribution to the pharmacophore of the agonists. *Mathematics and Computers in Simulation*. 2015;133:124-134.

[91] Kiesewetter D.O., Kilbourn M.R., Landvatter S.W., Heiman D.F., Katzenellenbogen J.A., Welch M.J. Preparation of four fluorine-18-labeled estrogens and their selective uptakes in target tissues of immature rats. *J. Nucl.Med*. 1984;25:1212-1221.

[92] Scott Peter J.H., Hockley Brian G. *Radiochemical Syntheses: Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography*, Volume 1. Wiley. 69-80.

[93] Lim J. L., Zheng L., Berridge M. S., Tewson T. J. The Use of 3-Methoxymethyl-16 β , 17 β -Epiestriol-O-CyclicSulfone as the Precursor in the Synthesis of F18 16 α -Fluoroestradiol. *Nuclear Medicine & Biology*. 1996;23:911-915.

[94] Dong Zhou, Mai Lin, Norio Yasui, Mohammed H. Al-Qahtani, Carmen S. Dence, Sally Schwarz, and John A. Katzenellenbogen. Optimization of the preparation of fluorin[19F]F-FEET8-labeled steroid receptor ligands 16alpha-[18F]fluoroestradiol (FES), [18F]fluoro furanyl norprogesterone (FFNP), and

16beta-[18F] fluoro-5alpha-dihydrotestosterone (FDHT) as radiopharmaceuticals. Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals. 2014;57:371–377.

[95] Mark A. Mintun, Michael J. Welch, Barry A. Siegel, Carla J. Mathias, MS S James W. Brodack, Andrea H. McGuire, John A. Katzenellenbogen. Breast Cancer: PET Imaging of Estrogen Receptors. Radiology. 1988; 169:45-48

[96] Lavanya Sundararajan, Hannah M. Linden, Jeanne M. Link, Kenneth A. Krohn, David A. Mankoff. ¹⁸F-Fluoroestradiol. Seminars in Nuclear Medicine. 2007;37:470-476.

[97] Eckelman W. The Application of Receptor Theory to Receptor-binding and Enzyme-binding Oncologic Radiopharmaceuticals. Nuclear Medicine and Biology. 1994;21(5):759- 769.

[98] Heesch A., Maurer J., Stickeler E., Beheshti M., Mottaghy F. M., Morgenroth A. Development of Radiotracers for Breast Cancer – The Tumor Microenvironment as an Emerging Target. Cells. 2020;9(10):2334.

[99] ZIONEXA. Zionexa USA and PETNET solutions announce FDA approval of CERIANNA™ (Fluoroestradiol ¹⁸F). <https://www.zionexa.com/2020/05/27/zionexa-usa-and-petnet-solutions-announce-fdaapproval-of-cerianna-fluoroestradiol-f18/>.

[100] Henry F. VanBrocklin, Kathryn E. Carlson, John A. Katzenellenbogen and Michael J. Welch. 16β([¹⁸F]Fluoro)estrogens: Systematic Investigation of a New Series of Fluorine-18-Labeled Estrogens as Potential Imaging Agents for Estrogen-Receptor-Positive Breast Tumors. Journal of Medicinal Chemistry. 1993;36:1619-1629.

[101] Jonson S.D., Bonasera T.A., Dehdashti F., Cristel M.E., Katzenellenbogen J.A., Welch M.J. Comparative Breast Tumor Imaging and Comparative in Vitro Metabolism of 16α- [¹⁸F]Fluoroestradiol-17β and 16β-[¹⁸F]Fluoromoxestrol in Isolated Hepatocytes. Nuclear Medicine & Biology. 1999;26:123-130.

[102] Seimbille Y., Rousseau J., Bénard F., Morin C., Ali H., Avvakumov G., Hammond G.L., van Lier J.E. ¹⁸F-Labeled difluoroestradiols: preparation and

preclinical evaluation as estrogen receptor-binding radiopharmaceuticals. *Steroids*. 2002;67:765-775.

[103] Paquette M., Lavallée E., Phoenix S., Ouellet R., Senta H., van Lier J.E., Guérin B., Lecomte R., Turcotte E.E. Radiotracer 4FMFES in ER+ Breast Cancer Patients: an Ongoing Phase II Clinical Trial. *Journal of Nuclear Medicine* (2017).

[104] Heesch A., Maurer J., Stickeler E., Beheshti M., Mottaghy F.M., Morgenroth A. Development of Radiotracers for Breast Cancer – The Tumor Microenvironment as an Emerging Target. *Cells* 2020;9:2334.

[105] Seimbille Y., Benard F., Rousseau J., Pepin E., Aliaga A., Tessier G., van Lier J.E. Impact on estrogen receptor binding and target tissue uptake of [18F]fluorine substitution at the 16 α -position of fulvestrant (Faslodex; ICI 182,780). *Nuclear Medicine & Biology*. 2004;31:691-698.

[106] Duo Xu, Rongqiang Zhuang, Linyi You, Zhide Guo, Xiangyu Wang, Chenyu Peng, Deliang Zhang, Pu Zhang, Hua Wu, Weimin Pan, Xianzhong Zhang. 18F–labeled estradiol derivative for targeting estrogen receptor-expressing breast cancer. *Nuclear Medicine and Biology*. 2018;59:48-55

[107] Guiqing Liu, Wei Wang, Jianguo Lin, Ke Li, Gaochao Lv, Xueyu Zhao, Shanshan Wang, Shineng Luo, Ling Qiu. Kit-like 18F-labeling of an estradiol derivative as a potential PET imaging agent for estrogen receptor-positive breast cancer. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2017;312:599–607.

[108] Yang D., Timothy T., Tansey W., Kuang L., Reger G., Cherif A., Wright K.C., Moulton R.G., Tilbury R.S., Chu K., Kim E.E., Wallace S. Halogenated Analogues of Tamoxifen: Synthesis, Receptor Assay, and Inhibition of MCF-7 Cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1992;81(7):622-625.

[109] Yang D., Timothy T., Tansey W., Kuang L., Reger G., Cherif A., Wright K.C., Moulton R.G., Tilbury R.S., Chu K., Kim E.E., Wallace S. Halogenated Analogues of Tamoxifen: Synthesis, Receptor Assay, and Inhibition of MCF-7 Cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1992;81(7):622-625.

[110] Yang D., Kuang L., Cherif A., Tansey W., Li C., Lin W., Liu C., Kim E., Wallace S. Synthesis of [¹⁸F]Fluoroalanine and [¹⁸F]FluoroTamoxifen for Imaging Breast Tumors. *Journal of Drug Targeting*. 1993;1:259-267.

- [111] Franck Le Bideau and Samuel Dagherne. Synthesis of Transition-Metal Steroid Derivatives. *Chemical Reviews*. 2013; 113(10):7793-7850.
- [112] James P. DiZio, Rita Fiaschi, Alan Davison, Alun G. Jones and John A. Katzenellenbogen. Progestin-Rhenium Complexes: Metal-Labeled Steroids with High Receptor Binding Affinity, Potential Receptor-Directed Agents for Diagnostic Imaging or Therapy. *Bioconjugate Chemistry*. 1991;2:353-366.
- [113] James P. DiZio, Carolyn J. Anderson, Alan Davison, Gary J. Ehrhardt, Kathryn E. Carlson, Michael J. Welch, and John A. Katzenellenbogen. Technetium and Rhenium-Labeled Progestins: Synthesis, Receptor Binding and In Vivo Distribution of an 11β -Substituted Progestin Labeled with Technetium-99 and Rhenium-186. *Journal of Nuclear Medicine*. 1992;33:558-569.
- [113] James P. O'Neil, Scott R. Wilson, and John A. Katzenellenbogen. Preparation and Structural Characterization of Monoamine-Monoamide Bis(thiol) Oxo Complexes of Technetium(V) and Rhenium(V). *Inorganic Chemistry*. 1994;33:319-323.
- [114] James P. O'Neil, Kathryn E. Carlson, Carolyn J. Anderson, Michael J. Welch and John A. Katzenellenbogen. Progestin Radiopharmaceuticals Labeled with Technetium and Rhenium: Synthesis, Binding Affinity, and in Vivo Distribution of a New Progestin N₂S₂-Metal Conjugate. *Bioconjugate Chemistry*. 1994;5:182-193.
- [115] Frank Wust, Hartmut Spies and Bernd Johannsen. Synthesis of "3+1" mixed-ligand oxorhenium(v) complexes containing modified 3,17 β -estradiol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 1996;6(22):2729-2734.
- [116] Hartmut Spies and Bernd Johannsen. Functionalization of Technetium Complexes to Make Them Active In Vivo. *Analyst*. 1995;120:775-777.
- [117] Frank Wust, Kathryn E. Carlson, John A. Katzenellenbogen, Hartmut Spies and Bernd Johannsen. Synthesis and binding affinities of new 17 α -substituted estradiol-rhenium "n+1" mixed-ligand and thioether carbonyl complexes. *Steroids*. 1998;63:665-671.

- [118] Marc B. Skaddan, Frank R. Wust and John A. Katzenellenbogen. Synthesis and Binding Affinities of Novel Re-Containing 7α -Substituted Estradiol Complexes: Models for Breast Cancer Imaging Agents. *Journal of Organic Chemistry*. 1999;64:8108-8121.
- [119] Xiaotian Xia, Hongyan Feng, Chongjiao Li, Chunxia Qin, Yiling Song, Yongxue Zhang, Xiaoli Lan. ^{99m}Tc -labeled estradiol as an estrogen receptor probe: Preparation and preclinical evaluation. *Nuclear Medicine and Biology*. 2016;43:89-96.
- [120] Nobukazu Takahashi, David J. Yang, Saady Kohanim, Chang-Sok Oh, Dong-Fang Yu, Ali Azhdarinia, Hiroaki Kurihara, Xiaochun Zhang, Joe Y. Chang, E. Edmund Kim. Targeted functional imaging of estrogen receptors with ^{99m}Tc -GAP-EDL. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2007;34:354-362.
- [121] Jaouen G., Top S., Vessières A., Pigeon P., Leclercq G., Laios I. First anti-estrogen in the cyclopentadienyl rhenium tricarbonyl series. Synthesis and study of antiproliferative effects. *The Royal Society of Chemistry*. 2001:383-384.
- [122] Bigott H. M., Parent E., Luyt L., Katzenellenbogen J.A, Welch M.J. Design and synthesis of Functionalized Cyclopentadienyl Tricarbonylmetal Complexes for Technetium-94m PET Imaging of Estrogen Receptors. *Bioconjugate Chemistry*. 2005;16:255-264.
- [123] Hartmuth C. Kolb, M. G. Finn, and K. Barry Sharpless. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition*. 2001; 40:2004-2021.
- [124] Christiane A. Kluba and Thomas L. Mindt. Click-to-Chelate: Development of Technetium and Rhenium-Tricarbonyl Labeled Radiopharmaceutical. *Molecules*. 2013;18:3206-3226.
- [125] Johannes Notni and Hans-Jurgen Wester. A Practical Guide on the Synthesis of Metal Chelates for Molecular Imaging and Therapy by Means of Click Chemistry. *Chemistry A European Journal*. 2016; 22: 1-10.

- [126] Leila Mirfeizi, Lachlan Campbell-Verduyn , Rudi A. Dierckx, Ben L. Feringa and Philip H. Elsinga. Application of Click Chemistry for PET. *Current Organic Chemistry*. 2013; 17:2108-2118.
- [127] Mathieu Arseneault, Caroline Wafer and Jean-François Morin. Recent Advances in Click Chemistry Applied to Dendrimer Synthesis. *Molecules*. 2015; 20:9263-9294.
- [128] Vsevolod V. Rostovtsev, Luke G. Green, Valery V. Fokin and K. Barry Sharpless. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie*. 2002; 114, 14:2708-271.
- [129] Tornøe, C.W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *Journal of Organic Chemistry*. 2002;67:3057-3064.
- [130] Changlong Wang, Djamila Ikhlef, Samia Kahlal, Jean-Yves Saillard, Didier Astruc. Metal-catalyzed azide-alkyne "click" reactions: Mechanistic overview and recent trends. *Coordination chemistry Reviews*. 2016; 316:1-20.
- [131] Maya Shankar Singh, Sushobhan Chowdhury, Suvajit Koley. Advances of azide-alkyne cycloaddition-click chemistry over the recent decade. *Tetrahedron*. 2016; 72:5257-5283.
- [132] Kolb, H.C.; Walsh, J.C.; Chen, K. Click chemistry method for synthesizing molecular imaging probes. WO2006116629(A2). 2006.
- [133] Jan Marik and Julie L. Sutcliffe. Click for PET: rapid preparation of [¹⁸F]fluoropeptides using CuI catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition. *Tetrahedron Letters*. 2006;47:6681-6684.
- [134] Thomas L. Mindt, Harriet Struthers, Luc Brans, Todor Anguelov, Christian Schweinsberg, Veronique Maes, Dirk Tourwe and Roger Schibli. "Click to Chelate": Synthesis and Installation of Metal Chelates into Biomolecules in a Single Step. *Journal of the American Chemical Society*. 2006;128: 15396-15097.

- [135] Peter G. M. Wuts, Theodora W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, fourth ed, John Wiley & Sons, New Jersey, 2006, Chapter 7.
- [136] Goubert R., Schneider R., Walcarius A. Synthesis of new dithiocarbamate-based organosilanes for grafting on silica. *Tetrahedron Letter*. 2007;48: 2113-2116.
- [137] Hafezeh Nabipour, Shahriar Ghammamy, Shahriar Ashuri, Zahra Shokri Aghbolagh. Synthesis of a New Dithiocarbamate Compound and Study of Its Biological Properties. *The Journal of Organic Chemistry*. 2010;2:75-80.
- [138] Dilip K. Tosh, Moshe Chinn, Lena S. Yoo, Dong Wook Kang, Hans Luecke, Zhan-Guo Gao, Kenneth A. Jacobson. 2-Dialkynyl derivatives of (N)-methanocarba nucleosides: 'Clickable' A3 adenosine receptor-selective agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2010;18:508–517
- [139] Maté Berta, András Dancsó, Anikó Nemes, Zoltán Pathó, Dénes Szabó, József Rábai. Convenient Synthesis of Pure Fluorous Alkyl Azides at Multigram Scale. *Journal of Fluorine Chemistry*. 2016;16:30240-30248.
- [140] Tesis de Maestría en Química. B.C. Soledad Fernández. Desarrollo y evaluación de complejos de metales de transición y ligandos nitroimidazólicos con potencial aplicación en Medicina Nuclear. 2011.
- [141] Michael P. Hay, William R. Wilson, John W. Moselen, Brian D. Palmer and William A. Denny. Hypoxia-Selective Antitumor Agents. 8. Bis(nitroimidazolyl)alkanecarboxamides: A New Class of Hypoxia-Selective Cytotoxins and Hypoxic Cell Radiosensitisers. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1994;37:381-391.
- [142] Tesis de Doctorado en Química Ingrid Kreimerman. Desarrollo y evaluación de radiotrazadores para el estudio y diagnóstico precoz de gliopatías en la enfermedad de Alzheimer, mediante tomografía por emisión de positrones. 2018.
- [143] Thomas L. Mindt, Cristina Müller, Marleen Melis, Marion de Jong and Roger Schibli. "Click-to-Chelate": In Vitro and In Vivo Comparison of a ^{99m}Tc(CO)₃-Labeled N(τ)-Histidine Folate Derivative with Its Isostructural, Clicked 1,2,3-Triazole Analogue. *Bioconjugate Chemistry*. 2008;19:1689–1695.

- [144] G. Ferro-Flores, I.A. Rivero, C.L. Santos-Cuevas, J.I. Sarmiento, C. Arteaga de Murphy, B.E. Ocampo-García, R. García-Becerra, D. Ordaz-Rosado. Click chemistry for [^{99m}Tc(CO)₃] labeling of Lys³–bombesin. *Applied Radiation and*
- [145] Guiqing Liu, Wei Wang, Jianguo Lin, Ke Li, Gaochao Lv, Xueyu Zhao, Shanshan Wang, Shineng Luo, Ling Qiu. Kit-like ¹⁸F-labeling of an estradiol derivative as a potential PET imaging agent for estrogen receptor-positive breast cancer. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2017;312:599-607. 55
- [146] Sven H. Hausner, Jan Marik, M. Karen J. Gagnon, and Julie L. Sutcliffe. In Vivo Positron Emission Tomography (PET) Imaging with an $\alpha v\beta 6$ Specific Peptide Radiolabeled using ¹⁸F-“Click” Chemistry: Evaluation and Comparison with the Corresponding 4-[¹⁸F]Fluorobenzoyl- and 2-[¹⁸F]Fluoropropionyl-Peptides. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008;51:5901-5904.
- [147] Matthias Glaser and Erik Arstad. “Click Labeling” with 2-[¹⁸F]Fluoroethylazide for Positron Emission Tomography. *Bioconjugate Chemistry*. 2007;18:989-993.
- [148] Leila Mirfeizia, Lachlan Campbell-Verduynb , Rudi A. Dierckxa,c, Ben L. Feringab and Philip H. Elsinga. Application of Click Chemistry for PET. *Current Organic Chemistry*. 2013;17:2108–2118.
- [149] Helen L. Evans, Laurence Carroll, Eric O. Aboagye and Alan C. Spivey. Bioorthogonal chemistry for ⁶⁸Ga radiolabelling of DOTA-containing compounds. *Journal of labelled compound and radiopharmaceutical*. 2014;57:291-297.
- [150] Mohan Doss, Hartmuth C. Kolb, James J. Zhang, Marie-José Be´langer, James B. Stubbs, Michael G. Stabin, Eric D. Hostetler, R. Katherine Alpaugh, Margaret von Mehren, Joseph C. Walsh, Michael Haka, Vani P. Mocharla, and Jian Q. Yu. Biodistribution and Radiation Dosimetry of the Integrin Marker ¹⁸F-RGD-K5 Determined from Whole-Body PET/CT in Monkeys and Humans. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2012;53:787-795.
- [151] Xiangli Liu & Bernard Testa & Alfred Fahr. Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation. *Pharmaceutical Research*. 2011;28:962-977.

- [152] John A Arnott & Sonia Lobo Planey. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2012;7:909-921.
- [153] Tesis de Doctorado en Química Javier Giglio. "Diseño, síntesis y evaluación de complejos de ^{99m}Tc conteniendo ligandos nitroimidazólicos, como potenciales radiofármacos con selectividad hacia tejido hipóxico". 2010.[45] Thorsteinn Loftsson. Chapter 4 - Drug Pharmacokinetics After Alternative Routes of Administration. 2015, 105-118.
- [154] Schmidt S, Gonzalez D, Derendorf H. Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J of Pharmaceutical Sciences*. 2010;99:1107-1022.
- [155] Estradiol Catalog NoS1709 Selleckchem. Houston, Texas. <http://www.selleckchem.com/datasheet/Estradiol-DataSheet.html>.
- [156] Erik F. J. de Vries, Andor W. J. M. Glaudemans, Caroline P. Schröder, Geke A. P. Hospers. *Hormonal Receptors PET-CT*. 2010, 213-219.
- [157] Chung-Hsiu Wu, Toru Motohashi,¹ Hany Aly Abdel-Rahman,² George L. Flickinger, And George Mikhail. Free and Protein-Bound Plasma Estradiol-17 β During the Menstrual Cycle. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1976;43(2):436–445.
- [158] Pacifici, G., Viani, A., Rizzo, G., *et al.* Plasma protein binding of ethinyloestradiol: effect of disease and interaction with drugs. *International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology*. 1989;27(7):362–365.
- [159] Wilhelm Kuhnz, Michael Pfeffer and Gaiiriele Al-Yacqub. Protein Binding of the Contraceptive Steroids Gestodene, 3-Keto-Desogestrel And Ethinylestradiol In Human Serum. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1990;35(2):313-318.
- [160] *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. R. Ian Freshney. Capitulo 1, Introduction. Edicion 5. 2005.
- [161] <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx#characteristics>.

- [162] Adrian V. Lee, Steffi Oesterreich, Nancy E. Davidson. MCF-7 Cells— Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2015;107(7):1-4.
- [163] H.M. Bigott-hennkens. S. Dannoon, M.R. Lewis, S.S. Jurisson. In vitro receptor binding assays: general methods and considerations. *The quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2008;52: 245-253.
- [164] Emilia Tejería, Javier Giglio, Leticia Fernández, Ana Rey. Development and evaluation of a $^{99m}\text{Tc(V)}$ -nitrido complex derived from estradiol for breast cancer imaging. *Applied Radiation and Isotopes*. 2019;154: 1-8.
- [165] Huafan Huang, Lei Mei and Taiwei Chu. Synthesis, Radiolabeling and Biological Evaluation of Propylene Amine Oxime Complexes Containing Nitrotriazoles as Hypoxia Markers. *Molecules*. 2012;17: 6808-6820.
- [166] Frédéric Debordeaux, Jürgen Schulz, Catherine Savona-Baron, Puja Panwar Hazari, Cyril Lervat, Anil Kumar Mishra, Colette Ries, Nicole Barthe, Béatrice Vergier and Philippe Fernandez. ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) a potential $\alpha(v)\beta3$ integrin based homobivalent radioligand for imaging neoangiogenesis in malignant glioma and melanoma. *RSC Advances, Royal Society of chemistry*. 2013;74: 60161-60171.
- [167] Feng Wang, Di Fan, Jun Qian, Zhe Zhang, Jianhua Zhu, Jian Chen. Preparation and Biodistribution of Technetium-99m-Labeled Bis- Misonidazole (MISO) as an Imaging Agent for Tumour Hypoxia. *Medicinal Chemistry*. 2015;11 (7): 649-655.
- [168] Chopra, Arvind ; Liang Shan ; Eckelman, William C ; Leung, Kam ; Menkens, Anne E. Important parameters to consider for the characterization of PET and SPECT imaging probes. *Nuclear Medicine and Biology*. 2011; 8:1079-1084.
- [169] Nosco DL, Beaty-Nosco JA. Chemistry of technetium radiopharmaceuticals: Chemistry behind de development of technetium-99m compounds to determine kidney function. *Coordination Chemistry Review*. 1999;184:91-123.
- [170] www.rcsb.org/pdb/home/home.do

[171] <http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>

[172] Ziteng Ding, Xudang Xu, Tiannv Li, Jia Wang, Jin Sun, Lijun Tang. ZR-75-1 breast cancer models to study the utility of ^{18}F -FES by PET imaging. *Translational Cancer Research*. 2021;10(3):1430-1438.

[173] George Makris *et al.* Somatostatin receptor targeting with hydrophilic [$^{99\text{m}}\text{Tc}/^{186}\text{Re}$]Tc/Re-tricarbonyl NODAGA and NOTA complexes. *Nuclear Medicine and Biology*. 2019; 71:39–46