



Programa de
Desarrollo de las
Ciencias Básicas



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY

Desarrollo y evaluación de complejos radiometálicos con aplicación en

Medicina Nuclear

María Elena Cardoso Moreno

Tesis de Doctorado

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Doctor

Programa de Posgrado en Química de Facultad de Química.

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

Marzo 2023

El Tribunal de Tesis para María Elena Cardoso Moreno certifica que esta es la versión aprobada de la siguiente tesis:

**Desarrollo y evaluación de complejos radiometálicos con aplicación en
Medicina Nuclear**

Tribunal:

Integrante del tribunal, Dra. Dinorah Gambino

Integrante del tribunal, Dra. Victoria Calzada

Integrante del tribunal, Dra. Guillermina Ferro Flores

Directora de tesis, Dra. Ana María Rey

Directora de tesis, Dra. Mariella Terán

**A mis padres, por su cariño, apoyo y sacrificio en todos estos años,
gracias a ustedes he logrado convertirme en lo que soy.**

**A Mauricio por todo su amor y por acompañarme
cada día a seguir mis sueños y metas.**

Agradecimientos.

Desde muy chica siempre me había interesado la ciencia. Por este motivo, en primer lugar, quiero agradecer a mis dos tutoras, Mariella y Ana, por brindarme la oportunidad de investigar en un área que me cautivó desde 2011 que realicé mi primer curso en el área. Gracias por su apoyo y su por guiarme en este camino.

Gracias a mis familiares y amigos que me han acompañado durante todo este proceso, festejando cada alegría y cada desafío.

He tenido la suerte de encontrar en el laboratorio de Radio unas excelentes compañeras. Emi, Maia Z, Pía, Isa, Maia M, Caro, Jessica, Ivana, Paula, Toti, Romina, gracias por su compañía y ayuda durante estos años en Radio! Gracias a Laurita por toda su ayuda en el trabajo con los animales. A todas, gracias por hacer más divertido cada día de trabajo con ustedes.

Muchas gracias Maia, gran compañera y amiga. Gracias por tu apoyo, cariño, risas y lindas conversaciones! Por más noches de juegos de mesa 😊.

En 2012 conocí a una gran profesora y gran compañera con la cual aprendí a dar clases e investigar, apoyándonos en cada momento siempre buscándole soluciones a nuestros problemas de investigación y de la vida. Muchas gracias Emi por tu apoyo, ayuda y por tu amistad!

Además, quiero agradecer a:

- Eduardo y Javier por recibirme en CUDIM y abrirme las puertas de sus laboratorios para poder realizar esta tesis.
- Kevin, tuve el agrado de trabajar con él durante parte del trabajo de investigación.
- Fátima, no solo por brindarnos muy generosamente el pertecneciato sino también por acompañarme con el trabajo con las células.
- Dra. Daniela Gamenara, Juan Manuel Mesa, Grysette Daher y Agustín Delfino por su trabajo en los ligandos de próstata, sin ellos no había trabajo de tesis.

Agradecimientos institucionales:

- Al Dr. Adriano Duatti de la Universidad de Ferrara en Italia por la gentil donación de la tris-(2-cianoetil)-fosfina.
- CUDIM (Centro Uruguayo de Imagenología Molecular) por permitirme usar sus instalaciones para el desarrollo de los complejos de galio y la donación de galio y las líneas celulares para la realización del trabajo de posgrado.
- Facultad de Química-Universidad de la República por permitirme continuar con mi formación.
- ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) por la beca de maestría (POS_NAC_2016_1_130455) y de doctorado (POS_NAC_2018_1_151604) otorgadas que me permitieron dedicarme a este trabajo.
- Pedeciba-Química (Programa para el Desarrollo de las Ciencias Básicas) por el apoyo económico a través de las alícuotas de dinero anuales y por la financiación del proyecto CSIC Iniciación 1803-348 que me permitieron acceder a reactivos y material para el desarrollo de este trabajo. También por brindarme financiación a través del Programa de Movilidad e Intercambios Académicos (MIA-CSIC) para asistir a congresos los cuales aportaron a mi formación, me ayudaron a divulgar los resultados obtenidos en el transcurso de mi posgrado.
- Centro de Medicina Nuclear del Hospital de Clínicas por la donación de pertecneciato para la realización de este trabajo de tesis.
- Cátedra de Inmunología de Facultad de Química que me permitió utilizar sus instalaciones para la realización de los ensayos biológicos *in vitro*. Y a los integrantes de la cátedra, especialmente a Gustavo Mourglia, Paula Arbildi y Claudio Rodríguez, que me ayudaron con las técnicas y procedimientos nuevos.

Desarrollo y evaluación de complejos radiometálicos con aplicación en Medicina

Nuclear

María Elena Cardoso Moreno

Programa de Posgrado en Química de Facultad de Química.

Universidad de la República

2023

DIRECTORES: Dra. Ana Rey Ríos, Dra. Mariella Terán

Facultad de Química, Universidad de la República

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

El cáncer representa un problema de salud pública a nivel mundial, siendo el de mama y el de próstata las patologías con mayor incidencia en mujeres y hombres, respectivamente. La Medicina Nuclear brinda herramientas tanto para el diagnóstico como para el seguimiento y la terapia de las enfermedades mediante el desarrollo de trazadores específicos, llamados radiofármacos, que interactúan a nivel molecular. Existen diversos radiofármacos utilizados para el diagnóstico de estas patologías (ej.: [¹⁸F]-fluoro-17 β-estradiol, [⁶⁸Ga]Ga-PSMA, [¹⁸F]-fluoro-dihidrotestosterona) sin embargo, todos ellos tienen desventajas por lo que más investigación en el tema es todavía necesaria.

En este trabajo se han desarrollado tres radiotrazadores con potencial aplicación diagnóstica en cáncer de mama y cuatro para cáncer de próstata. Se seleccionaron el [^{99m}Tc]Tc y el [⁶⁸Ga]Ga como radionucleidos para el desarrollo del trabajo dado que ambos son ampliamente utilizados en Medicina Nuclear y disponibles en nuestro país.

Se diseñaron tres ligandos peptídicos partiendo de un derivado corto del Neuropeptido Y (L1, L2, L3) con afinidad por el receptor de NPY tipo 1, añadiendo átomos donadores de electrones para coordinar los radionucleidos, el [^{99m}Tc]Tc y el [⁶⁸Ga]Ga. La marcación de L1 se realizó mediante la formación de un complejo del tipo [^{99m}Tc]Tc(V) nitrato (NPTc1), la marcación con L2 y L3 se realizó mediante formación de complejos con el [⁶⁸Ga]Ga con

el agente bifuncional NOTA (NPGa1, NPGa2). Los tres compuestos se obtuvieron con pureza radioquímica mayor al 90% y exhibieron elevada estabilidad. Los valores de Log P obtenidos corresponden a radiotrazadores hidrofílicos. Sin embargo, esto no influye negativamente en la internalización celular dado que la misma está mediada por el receptor ubicado en la superficie celular. La unión a proteínas plasmáticas (UPP) de NPTc1 fue baja, NPGa1 y NPGa2 moderadas. La evaluación *in vitro* se realizó en células MCF-7 derivadas de cáncer de mama que expresan el receptor de NPY tipo 1. NPTc1 posee una unión de $(3.1 \pm 0.2) \%$, NPGa1 $(6.2 \pm 0.3) \%$ y NPGa2 $(8.0 \pm 0.4) \%$. Cuando las células se incubaron con un exceso de ligando con la finalidad de bloquear los receptores, se observó que la captación disminuye un 30% indicando una unión específica. Todos los complejos fueron internalizados dentro de las células rápidamente, observándose que más del 80% de la actividad ingresa en la primera hora de incubación. En la evaluación biológica *in vitro* NPGa2 demostró ser el radiotrazador con mayor captación y menor porcentaje de externalización $(15.7 \pm 1.2) \%$. Los valores de IC_{50} de los tres complejos se encontraron en el rango nanomolar, aunque, fueron aproximadamente 30 veces mayores en relación con el NPY nativo (2.0 nM). Esta diferencia es atribuible a la pérdida de actividad asociada a la introducción de la unidad quelante y a la formación del complejo con el radiometal. La evaluación biológica *in vivo* en animales normales demostró que los radiotrazadores fueron estables, no se observó captación de NPTc1 en tiroides o estómago, ni captación de NPGa1 o NPGa2 en bazo o pulmones. La vía hepatobiliar fue la principal vía de eliminación de NPTc1 seguida por la vía urinaria. En cambio, para los complejos de galio la excreción es mayoritariamente urinaria, lo cual se encuentra en sintonía con los valores de Log P obtenidos. Los estudios de biodistribución en animales portadores de tumor xenográfico demostraron que NPGa1 y NPGa2 presentaron adecuada captación en tejido tumoral, con una relación tumor/músculo de (3.8 ± 0.4) y (4.7 ± 0.4) respectivamente. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron menores a los reportados para otros radiofármacos basados en péptidos. La principal causa de estos resultados probablemente se deba a que los receptores de NPY tipo 1 son expresados en un orden de magnitud menor respecto a otros receptores, por ejemplo, los receptores de somatostatina o bombesina.

Con el fin de sintetizar potenciales radiotrazadores para Imagenología Molecular de cáncer de próstata, se desarrollaron cuatro ligandos (L4, L5, L6, L7) partiendo de la

estructura de la flutamida, un antagonista del receptor de andrógenos. La marcación de L4, L5, L6 se realizó mediante la formación de complejos del tipo $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{I})\text{tricarbonílico}$ (FLTc1, FLTc2, FLTc3) y la marcación de L7 se realizó mediante la formación de un complejo $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{V})\text{EN}$ (FLTc4). Todos se obtuvieron con elevada pureza radioquímica, fueron estables y lipofílicos con valores adecuados para atravesar la membrana celular. Comparado con la flutamida ($\text{Log } P = 3.35$), todos fueron menos lipofílicos, probablemente por la adición de grupos hidrofílicos para coordinar el tecnecio y en el caso de FLTc2 y FLTc3 por su carga positiva. Presentaron valores de UPP desde 14 a 42%, menores a los valores de la flutamida ($95 \pm 1\%$). FLTc2 y FLTc3 fueron los complejos de menor y mayor valor de unión a proteínas plasmáticas respectivamente, poseen el mismo sistema quelante y difieren solo en la cantidad de átomos de carbono presentes en el espaciador. Al haber un mayor alejamiento entre el quelante y la parte activa de la molécula probablemente exista un menor impedimento estérico que permite interactuar con otras moléculas presentes en el medio, ejemplo las proteínas plasmáticas. En células conteniendo receptores de andrógenos, LNCaP, se observó elevada captación de los complejos, concordante con los valores de $\text{Log } P$ reportados. FLTc2 posee la mayor captación de los complejos estudiados ($55.9 \pm 2.5\%$) y FLTc4 la menor ($19.1 \pm 1.3\%$). Los ensayos realizados utilizando flutamida como competidor concluyeron que hubo una disminución del 50-70% de los valores de captación iniciales. En células que no expresan receptores de andrógenos, PC3, la captación fue menor respecto a la reportada en LNCaP. Por estas razones, se determinó que existe unión específica entre los complejos y el receptor de andrógenos (RA). Los valores de IC_{50} exhibidos por los cuatro radiotrazadores fueron del rango micromolar y dos órdenes de magnitud mayores que la flutamida ($0.9 \mu\text{M}$). Por lo tanto, el agregado de grupos donadores de electrones para la unión al tecnecio resultó en una disminución de la afinidad de unión al RA, influido por la naturaleza de los grupos de átomos donadores de electrones de cada ligando. Entre los cuatro complejos desarrollados, el FLTc2 destacó en elevada captación, presentado un menor eflujo y mayor afinidad de unión. Sin embargo, también fue el radiotrazador con mayor captación en células PC3, probablemente debido a su elevada lipofilicidad.

Como resultado, se obtuvieron 7 complejos metálicos, tres para Imagenología Molecular del receptor de NPY en cáncer de mama y 4 para imagenología de receptores de

andrógenos en cáncer de próstata. Se llevaron a cabo todas las etapas del diseño de un radiofármaco, desde el diseño de los ligandos hasta la evaluación biológica *in vitro* e *in vivo*. Se profundizó en las estrategias de marcación de un péptido con dos radionucleidos metálicos diferentes, el [^{99m}Tc]Tc y el [^{68}Ga]Ga. Además, se trabajó con distintos *cores* de [^{99m}Tc]Tc, permitiendo evaluar como sus diferencias influyen las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los distintos complejos desarrollados. La experiencia y conocimientos adquiridos en este trabajo de tesis son útiles para mejorar las estrategias utilizadas a futuro en el desarrollo de potenciales radiotrazadores para Imagenología Molecular.

Development and evaluation of radiometallic complexes with application in Nuclear Medicine

María Elena Cardoso Moreno

Programa de Posgrado en Química de Facultad de Química.

Universidad de la República

2023

DIRECTORS: Dra. Ana Rey Ríos, Dra. Mariella Terán

Facultad de Química, Universidad de la República

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

Cancer represents a public health problem worldwide, with breast and prostate cancer being the pathologies with the highest incidence in women and men, respectively. Nuclear Medicine provides tools for the diagnosis, monitoring or therapy of diseases through the development of specific tracers, the so-called radiopharmaceuticals, that interact at the molecular level. There are various radiopharmaceuticals used for the diagnosis of these pathologies (e.g.: [^{18}F]-fluoro-17- β -estradiol, [^{68}Ga]Ga-PSMA, [^{18}F]-fluoro-dihydrotestosterone), however, all of them have some disadvantages and further research in this topic is still necessary.

In this work, three radiotracers with potential diagnostic application in breast cancer and four for prostate cancer have been developed. [$^{99\text{m}}\text{Tc}$] Tc and [^{68}Ga]Ga were selected as radionuclides for the development of the work since both are widely used in Nuclear Medicine and available in our country.

Three peptidic ligands were designed starting from a Neuropeptide Y derivative (L1, L2, L3) with affinity for the type 1 NPY receptor by adding electron donor atoms to coordinate the radionuclides, [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc and [^{68}Ga]Ga. Labelling of L1 was carried out by forming a [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc(V) \equiv N complex (NPTc1), labelling with L2 and L3 was carried out by forming complexes with [^{68}Ga]Ga using the bifunctional agent NOTA (NPGa1, NPGa2). The three complexes were obtained with a radiochemical purity greater than 90% and exhibited high stability. Log P values correspond to hydrophilic radiotracers. However, this fact does not negatively influence cell internalization since it is mediated by the receptor located in the cell surface. Plasma protein binding (PPB) of NPTc1 was low,

NPGa1 and NPGa2 showed moderate values. The *in vitro* evaluation was performed in MCF-7 cells derived from breast cancer that express the NPY type 1 receptor. NPYTc1 showed an uptake of $(3.1 \pm 0.2)\%$, NPGa1 $(6.2 \pm 0.3)\%$ and NPGa2 $(8.0 \pm 0.4)\%$. When the cells were incubated with an excess of ligand in order to block the receptors, uptake decreases by 30% indicating specific interaction with the receptors. All the complexes are rapidly internalized within the cells, with more than 80% of the activity entering the cells within the first hour of incubation. NPGa2 proved to be the radiotracer with the highest uptake and the lowest percentage of externalization $(15.7 \pm 1.2)\%$. IC_{50} values were in the nanomolar range, same as the native NPY. However, these values were 30 times greater than the one of NPY (2.0 nM), probably because the derivatization and complexation of the peptides cause a partial loss of activity. *In vivo* biological evaluation was performed in normal animals proving that the radiotracers were stable, negligible uptake of NPTc1 was observed in thyroid or stomach, and also of NPGa1 or NPGa2 in spleen or lungs. The hepatobiliary route was the main route of elimination of NPTc1 followed by the urinary route. On the other hand, for the gallium complexes, the excretion is mainly urinary, which is in accordance with the log P values obtained.

Biodistribution studies in xenographic tumour-bearing animals demonstrated that NPGa1 and NPGa2 showed good uptake in tumour tissue, with a tumour/muscle ratio of (3.8 ± 0.4) and (4.7 ± 0.4) respectively. Nevertheless, the results obtained were lower than those reported for other peptide-based radiopharmaceuticals. The main cause of these results is probably because NPY1r are expressed in a lower order of magnitude than other receptors, for example, somatostatin or bombesin receptors.

To develop potential radiotracers for Molecular Imaging of prostate cancer, four ligands (L4, L5, L6, L7) were designed based on the structure of flutamide, an androgen receptor antagonist. The labelling of L4, L5, L6 was carried out through the formation of $[^{99m}Tc]Tc(I)tricarbonyl$ complexes (FLTc1, FLTc2, FLTc3) and the labelling of L7 was performed by the formation of a $[^{99m}Tc]Tc(V)\equiv N$ (FLTc4) complex. All were obtained in high radiochemical purity, were stable and lipophilic with adequate values to cross the cell membrane. Compared to flutamide (Log P= 3.35), all complexes are less lipophilic probably due to the addition of hydrophilic groups to coordinate the metal and in the case of FLTc2 and FLTc3 due to their positive charge. PPB values were ranging from 14-42%, lower than flutamide values $(95 \pm 1\%)$. FLTc2 and FLTc3 were the complexes with

the lowest and highest binding value to plasmatic proteins, respectively. Both complexes have the same chelating system and differ only in the number of carbon atoms in the spacer. Since there is a greater distance between the chelator and the active part of the molecule, there is probably a lesser steric hindrance that allows interaction with other molecules present in the medium, for example plasma proteins. In cells containing androgen receptors, LNCaP, high uptake of the complexes was observed, consistent with the log P values reported. FLTc2 has the highest uptake of the studied complexes ($55.9 \pm 2.5 \%$) and FLTc4 has the lowest cellular uptake ($19.1 \pm 1.3 \%$). Test carried out using flutamide as competitor concluded that there was a 50-70% decrease of the initial uptake values. In cells that do not express androgen receptors, PC3, uptake was lower compared to values reported for LNCaP. These results indicate that the interaction between the complexes and the androgen receptor (RA) is specific. The IC_{50} values displayed by the four radiotracers were in the micromolar range, two orders of magnitude greater than flutamide ($0.9 \mu\text{M}$). Hence, the addition of electron -donating groups for technetium binding resulted in a decreased binding affinity for RA, negatively influenced by the nature of the groups of electron-donating atoms of each ligand. Among the four developed complexes, FLTc2 stood out for its high uptake, presenting less efflux and greater binding affinity. However, uptake in PC3 cells was the highest, probably it was due to its high lipophilicity.

As a result, 7 metal complexes were obtained, three for Molecular Imaging of NPY receptor in breast cancer and 4 for androgen receptor imaging in prostate cancer. All stages of radiopharmaceutical design were carried out, from ligand design to *in vivo* and *in vitro* biological evaluation. The labelling strategies of a peptide with two different metallic radionuclides, [^{99m}Tc]Tc and [^{68}Ga]Ga, were studied in depth. In addition, we worked with different *cores* of [^{99m}Tc]Tc, allowing to evaluate how their differences influence the physicochemical and biological properties of the different complexes developed. The experience and knowledge acquired in this thesis are useful to improve the strategies used in the future in the development of potential radiotracers for Molecular Imaging.

Índice.

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL CÁNCER.	1
1.2. ABORDAJE DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER.	5
1.3. MEDICINA NUCLEAR.	5
1.4. RADIOFÁRMACOS.	8
1.5. DESARROLLO DE UN RADIOFÁRMACO.	9
1.6. QUÍMICA DEL $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$.	13
<i>Complejos tecnecio (V)-nitruro.</i>	15
<i>Tecnecio (I)-tricarbonílico.</i>	20
1.7. QUÍMICA DEL $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$.	23
<i>Complejos de Ga(III).</i>	24
<i>Agentes bifuncionales.</i>	25
2. OBJETIVO	29
3. DESARROLLO DE LOS COMPLEJOS RADIOMETÁLICOS PARA CÁNCER DE MAMA	30
3.1. INTRODUCCIÓN	31
3.1.1. DESARROLLO DE OTROS POTENCIALES RADIOFÁRMACOS PARA IMAGENOLÓGÍA DEL RECEPTOR DE NEUROPEPTIDO Y TIPO 1.	39
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
• CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LOS COMPLEJOS DERIVADOS DE NPY.	42
• CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DE LOS COMPLEJOS DERIVADOS DE NPY.	43
• CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA <i>IN VIVO</i> DE LOS COMPLEJOS DERIVADOS DE NPY.	43
3.3. PARTE EXPERIMENTAL	44
3.3.1. MATERIALES.	44
3.3.2. MÉTODOS.	46
3.3.2.1. SÍNTESIS DEL PRECURSOR $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc(V)}\equiv\text{NITRIDO}$.	46
3.3.2.2. SÍNTESIS DEL COMPLEJO NPTc1.	46
3.3.2.3. SÍNTESIS DEL COMPLEJO NPGA1 Y NPGA2.	46
3.3.2.4. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LOS COMPLEJOS OBTENIDOS (NPTc1, NPGA1, NPGA2).	47
• LIPOFILICIDAD.	47
• ESTABILIDAD EN EL MEDIO DE REACCIÓN.	48
• ESTABILIDAD FRENTE A PLASMA.	48
• UNIÓN A PROTEÍNAS PLASMÁTICAS.	48
• ESTABILIDAD FRENTE A AGENTES COMPETITIVOS.	49
3.3.2.5. EVALUACIÓN BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DE LOS COMPLEJOS NPTc1, NPGA1 Y NPGA2.	49
• EVALUACIÓN DE CAPTACIÓN CELULAR.	50
• EVALUACIÓN DE INTERNALIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS.	50
• EVALUACIÓN DE EFLUJO.	52
• DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD.	52
3.3.2.6. EVALUACIÓN BIOLÓGICA <i>IN VIVO</i> DEL COMPLEJO NPTc1, NPGA1 Y NPGA2.	53
• EVALUACIÓN EN ANIMALES NORMALES.	53

•	EVALUACIÓN EN ANIMALES PORTADORES DE TUMORES XENOGRÁFICOS.	54
3.3.2.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	54
3.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
3.4.1.	DISEÑO DE LOS LIGANDOS DERIVADOS DE NEUROPEPTIDO Y.	55
3.4.2.	SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS DERIVADOS DEL NPY.	57
•	SÍNTESIS DEL COMPLEJO DE $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ CON L1 (NPTc1).	57
•	SÍNTESIS DEL COMPLEJO DE $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ CON EL L2 O L3 (NPGA1, NPGA2).	59
3.4.3.	CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LOS COMPLEJOS DERIVADOS DE NPY.	62
•	LIPOFILICIDAD	62
•	ESTABILIDAD EN EL MEDIO DE REACCIÓN.	63
•	ESTABILIDAD FRENTE A PLASMA.	64
•	UNIÓN A PROTEÍNAS PLASMÁTICAS.	65
•	ESTABILIDAD FRENTE A AGENTES COMPETITIVOS.	66
3.4.4.	CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DE LOS COMPLEJOS DERIVADOS DE NPY.	68
•	EVALUACIÓN DE LA CAPTACIÓN CELULAR DE LOS COMPLEJOS	68
•	EVALUACIÓN DE INTERNALIZACIÓN CELULAR.	70
•	EVALUACIÓN DE EFLUJO.	72
•	DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD.	73
3.4.5.	CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA <i>IN VIVO</i> DE LOS COMPLEJOS DERIVADOS DE NPY.	76
•	EVALUACIÓN EN ANIMALES NORMALES.	76
•	EVALUACIÓN EN ANIMALES PORTADORES DE TUMORES XENOGRÁFICOS.	78
4.	DESARROLLO DE COMPLEJOS RADIOMETÁLICOS PARA CÁNCER DE PRÓSTATA	81
4.1.	INTRODUCCIÓN	82
4.1.1.	DESARROLLO DE POTENCIALES RADIOFÁRMACOS PARA IMAGENOLOGÍA DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS.	92
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	95
•	SÍNTESIS DE COMPLEJOS DERIVADOS DE LA FLUTAMIDA.	95
•	CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LOS COMPLEJOS DERIVADOS DE LA FLUTAMIDA.	95
•	CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DE LOS COMPLEJOS DERIVADOS DE LA FLUTAMIDA.	95
4.3.	PARTE EXPERIMENTAL	96
4.3.1.	MATERIALES.	96
4.3.2.	MÉTODOS.	97
4.3.2.1.	SÍNTESIS DEL $\text{FAC}-[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$.	97
4.3.2.2.	SÍNTESIS DEL COMPLEJO FLTc1.	97
4.3.2.3.	SÍNTESIS DEL COMPLEJO FLTc2.	97
4.3.2.4.	SÍNTESIS DEL COMPLEJO FLTc3.	98
4.3.2.5.	SÍNTESIS DEL PRECURSOR $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{V})\equiv \text{NITRURO}$.	98
4.3.2.6.	SÍNTESIS DEL COMPLEJO FLTc4.	98
4.3.2.7.	CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LOS COMPLEJOS DERIVADOS DE LA FLUTAMIDA.	98
•	LIPOFILICIDAD.	99
•	ESTABILIDAD EN EL MEDIO DE REACCIÓN.	99
•	ESTABILIDAD FRENTE A PLASMA.	99
•	UNIÓN A PROTEÍNAS PLASMÁTICAS.	99
•	ESTABILIDAD FRENTE A AGENTES COMPETITIVOS.	99

4.3.2.8. EVALUACIÓN BIOLÓGICA IN VITRO EN CÉLULAS LNCAP DE LOS COMPLEJOS FLTc1, FLTc2, FLTc3 Y FLTc4.	100
• ENSAYO DE CAPTACIÓN CELULAR.	101
• ENSAYO DE EFLUJO.	101
• DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD.	101
• EVALUACIÓN BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DEL COMPLEJO FLTc1, FLTc2, FLTc3, FLTc4 EN CÉLULAS PC3.	101
• ENSAYO DE CAPTACIÓN.	101
4.3.2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	102
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	103
4.4.1. DISEÑO DE LOS LIGANDOS DERIVADOS DE FLUTAMIDA	103
4.4.2. SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS DERIVADOS DE FLUTAMIDA	106
4.4.2.1. SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS DE $[^{99m}\text{Tc}] \text{ Tc CON L4, L5, L6. (FLTc1, FLTc2, FLTc3)}$	106
4.4.2.1.1. SÍNTESIS DEL COMPLEJO $[^{99m}\text{Tc}] [\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L4})] . \text{ FLTc1}$	107
4.4.2.1.2. SÍNTESIS DEL COMPLEJO DE $[^{99m}\text{Tc}] [\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L5})]^+ . \text{ FLTc2}$	110
4.4.2.1.3. SÍNTESIS DEL COMPLEJO DE $[^{99m}\text{Tc}] [\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L6})]^+ . \text{ (FLTc3)}$	112
4.4.2.2. SÍNTESIS DEL COMPLEJO DE $[^{99m}\text{Tc}] \text{ Tc CON L7. (FLTc4)}$	114
4.4.2.2.1. FORMACIÓN DEL PRECURSOR $[^{99m}\text{Tc}] \text{ Tc(V) } \Xi \text{ NITRURO.}$	114
4.4.2.2.2. SÍNTESIS DEL COMPLEJO $[^{99m}\text{Tc}] [\text{Tc(V)} \Xi \text{ N L7}]. \text{ FLTc4}$	115
4.4.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS COMPLEJOS OBTENIDOS.	118
• LIPOFILICIDAD.	118
• ESTABILIDAD EN EL MEDIO DE REACCIÓN.	119
• ESTABILIDAD FRENTE A PLASMA.	120
• UNIÓN A PROTEÍNAS PLASMÁTICAS.	121
• ESTABILIDAD FRENTE A AGENTES COMPETITIVOS.	122
4.4.3.1. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DE LOS COMPLEJOS OBTENIDOS.	124
4.4.3.1.1. CAPTACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LOS COMPLEJOS EN CÉLULAS LNCAP Y PC3.	125
4.4.3.1.2. ENSAYO DE EFLUJO.	128
4.4.3.1.3. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD.	129
5. CONCLUSIONES	132

Lista de Tablas.

Número	Descripción
Tabla 1:	Número de nuevos diagnósticos y muertes reportadas en 2020 a causa de las neoplasias más comunes.
Tabla 2:	Ejemplos de radiotrazadores utilizados en investigación o clínica para cáncer de mama.
Tabla 3:	Subtipo y densidad de los receptores de NPY en tejidos.
Tabla 4:	Pureza radioquímica obtenida al variar la masa de ligando correspondiente.
Tabla 5:	Pureza radioquímica obtenida al variar la temperatura de incubación.
Tabla 6:	Variación de la pureza radioquímica con el pH.
Tabla 7:	Valores de log P de los tres complejos estudiados.
Tabla 8:	Estabilidad de los complejos en el medio de marcación.
Tabla 9:	Estabilidad en el plasma de los complejos en estudio.
Tabla 10:	Resultados de unión a proteínas plasmáticas a los 30 y 60 minutos.
Tabla 11:	Estabilidad de los complejos frente a agentes competitivos.
Tabla 12:	Captación de los complejos en estudio en células MCF-7 evaluados a distintos tiempos de incubación.
Tabla 13:	Internalización de los complejos en células MCF-7 a distintos tiempos.
Tabla 14:	Eflujo de los complejos en células MCF-7 a distintos tiempos.
Tabla 15:	Porcentaje de actividad inyectada en los órganos más importantes para los tres complejos.
Tabla 16:	Valores de porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido de los órganos más relevantes.
Tabla 17:	Ejemplos de radiotrazadores utilizados en investigación o clínica para cáncer de próstata.
Tabla 18:	Concentración de los agentes competitivos utilizados.
Tabla 19:	Pureza radioquímica de FLTc1 cuando se modifica la cantidad de masa de ligando y de precursor utilizado.
Tabla 20:	Pureza radioquímica de FLTc2 cuando se modifican la cantidad de masa de ligando y de precursor utilizado.

Tabla 21:	Pureza radioquímica de FLTc2 obtenida al modificar la temperatura de incubación.
Tabla 22:	Pureza radioquímica de FLTc3 cuando se modifican la cantidad de masa de ligando y de precursor utilizado.
Tabla 23:	Pureza radioquímica de FLTc3 obtenida al modificar la temperatura de incubación.
Tabla 24:	Pureza radioquímica de FLTc4 cuando se modifica la cantidad de ligando.
Tabla 25:	Pureza radioquímica de FLTc4 obtenida al variar la temperatura de incubación.
Tabla 26:	Valores de log P de los cuatro complejos.
Tabla 27:	Pureza radioquímica de los complejos a distintos tiempos.
Tabla 28:	Pureza radioquímica de los complejos en el plasma a distintos tiempos.
Tabla 29:	Resultados de UPP de los cuatro complejos a los 30 y 60 minutos.
Tabla 30:	Estabilidad de los complejos frente a agentes competitivos.
Tabla 31:	Valores de captación en células LNCaP evaluados a distintos tiempos.
Tabla 32:	Valores de captación en células LNCaP cuando se incuban con flutamida.
Tabla 33:	Valores de captación en células PC3 evaluados a distintos tiempos.
Tabla 34:	Eflujo de los complejos en células LNCaP a distintos tiempos.
Tabla 35:	Valores de IC ₅₀ de los cuatro complejos.

Lista de Figuras.

Número	Descripción
Figura 1:	Causas de muertes en Uruguay en 2020.
Figura 2:	Incidencia y mortalidad de los distintos tipos de cáncer en población uruguaya discriminado por sexo, en el período 2014-2018.
Figura 3:	Ejemplos de <i>cores</i> utilizados para el desarrollo de radiofármacos.
Figura 4:	Distintas posibilidades de formación de complejos Tc(V) nitruro: complejo homoléptico (A) o complejo heteroléptico (B).
Figura 5:	Estructura de la cisteína.
Figura 6:	Estructura general para los complejos de Tc(V)nitruro del tipo (3+1).
Figura 7:	Ejemplos de fosfinas que pueden ser utilizadas como ligandos monodentados en la formación de nitrurocomplejos del tipo (3+1).
Figura 8:	Molécula de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-N}-(\text{NOEt})_2$.
Figura 9:	Complejos del tipo $[^{99m}\text{Tc}][\text{TcN}(\text{DTC})(\text{PNP})]^+$ desarrollados por Boschi <i>et al.</i>
Figura 10:	Estructura del acuocomplejo <i>fac</i> - $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$.
Figura 11:	Estructura de los complejos tricarbónicos basados en arilpiperizinas desarrollados por Alberto y colaboradores.
Figura 12:	Estructura del $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MIP-1404}$.
Figura 13:	Algunos de los agentes bifuncionales utilizados para el desarrollo de radiotrazadores de galio en Radiofarmacia.
Figura 14:	Estructura de la $[^{18}\text{F}]\text{F-FDG}$.
Figura 15:	Radiotrazadores $[^{18}\text{F}]\text{F-FES}$ (A), $4\text{FM-}[^{18}\text{F}]\text{F-FES}$ (B) y el $[^{18}\text{F}]\text{F-FETE}$ (C).
Figura 16:	Estructuras de: $[^{18}\text{F}]\text{F-FENP}$ (A) y el $[^{18}\text{F}]\text{F-FFNP}$ (B).
Figura 17:	Estructura del ligando 1 (L1).
Figura 18:	Estructura del ligando 2 (R=H) (A) y del ligando 3 (R=COCH ₃).
Figura 19:	Estructura propuesta del complejo de NPTc1.
Figura 20:	Perfil cromatográfico obtenido para NPTc1.
Figura 21:	Variación de la pureza radioquímica con el tiempo de incubación en las marcaciones con los ligandos L2 y L3.
Figura 22:	Captación de los complejos con y sin bloqueo en células MCF-7.

Figura 23: Resultado del estudio de afinidad de unión competitiva.

Figura 24: Radiofármacos: [^{11}C]C-colina (A), [^{18}F]F-fluoroetilcolina (B) y [^{18}F]F-fluorometilcolina (C).

Figura 25: Radiofármaco [^{11}C]C-acetato.

Figura 26: Radiofármaco [^{18}F]-FACBC.

Figura 27: Blancos moleculares de algunos de los radiotrazadores dirigidos al PSMA.

Figura 28: Estructura del [^{68}Ga]Ga-DKFZ-PSMA-11.

Figura 29: Estructura del [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-MIP-1404.

Figura 30: Radiotrazador [^{18}F]F-FDHT.

Figura 31: Antiandrógenos no esteroideos: flutamida (A), nilutamida (B) y la bicalutamida (C).

Figura 32: Ligandos utilizados en la tesis y las estructuras propuestas de los complejos metálicos.

Figura 33: Perfil cromatográfico del *fac*-[$^{99\text{m}}\text{Tc}$][Tc(CO) $_3$ (H $_2$ O) $_3$] $^+$].

Figura 34: Perfil cromatográfico de FLTc1.

Figura 35: Perfil cromatográfico correspondiente a la purificación del complejo FLTc1.

Figura 36: Perfil cromatográfico de FLTc2.

Figura 37: Perfil cromatográfico de la purificación de FLTc2.

Figura 38: Perfil cromatográfico de la purificación de FLTc3.

Figura 39: Perfil cromatográfico de FLTc4 cuando la incubación se lleva a cabo a 100°C.

Figura 40: Perfil cromatográfico de FLTc4 obtenido al optimizar las condiciones de marcado.

Figura 41: Estructura de la histidina.

Figura 42: Resultado de los estudios de competencia de los cuatro complejos desarrollados.

Lista de Ilustraciones.

Número de ilustración	Descripción
Ilustración 1:	Principales pasos de un procedimiento de Medicina Nuclear Diagnóstico.
Ilustración 2:	Principales pasos de un procedimiento de Medicina Nuclear Terapéutico.
Ilustración 3:	Principales etapas para desarrollo de un radiotrazador.
Ilustración 4:	Estrategia del <i>Pendant approach</i> .
Ilustración 5:	Blancos moleculares para el desarrollo de diversos radiofármacos.

Lista de abreviaturas.

OMS	Organización Mundial de la Salud
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CHLCC	Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer
LET	Transferencia lineal de energía
SPECT	Tomografía Computarizada de Emisión de Fotón Único
PET	Tomografía de Emisión de Positrones
RM	Resonancia magnética
TC	Tomografía computarizada
CUDIM	Centro Uruguayo de Imagenología Molecular
ABF	Agentes bifuncionales
DFO	Deferoxamina
HBED-CC	Ácido N,N'-bis[2-hidroxi-5(carboxietil)benzil]etilenediamino-N,N'-diacético
DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetraazacicloodecano-1,4,7,10-tetraacético
NOTA	Ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético
NODAGA	Ácido 2-(4,7-bis(carboximetil)-1,4,7-triazonan-1-il)pentanodioico
KML	Constante de estabilidad termodinámica
DTPA	Ácido N ^α -dietilentriaminopentaacético
EDTA	Ácido etilendiaminoacético
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos
PSMA	Antígeno Prostático Específico de Membrana
RE	Receptor de estradiol
RP	Receptor de progesterona
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
EGFR	Receptores del factor de crecimiento epidérmico
GRPR	Receptores de los péptidos liberadores de gastrina
NPY	Neuropéptido Y
NPYr1	Receptores de Neuropéptido Y tipo 1
NPYr2	Receptores de Neuropéptido Y tipo 2

NPYr4	Receptores de Neuropeptido Y tipo 4
NPYr5	Receptores de Neuropeptido Y tipo 5
TLC	Cromatografía de capa fina
ITLC™ SG	Sílica gel impregnada en fibra de vidrio
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa
MS	Espectrometría de masas
BPA	4-benzoilfenilalanina
MA	Ácido mercaptoacético
RF	Factor de retardo
UPP	Unión a proteínas plasmáticas
PRQ	Pureza Radioquímica
PBS	Buffer fosfato
U	Radiotrazador unido a membrana
I	Radiotrazador internalizado
T	Total de actividad
NLE	Norleucina
PSA	Antígeno Prostático Especifico
IC ₅₀	Concentración inhibitoria mínima

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cáncer.

Cáncer es un término amplio utilizado para designar a un grupo heterogéneo de enfermedades. La Organización Mundial de la Salud (OMS) la define como “un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células que puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo” [1]. El origen de la enfermedad se encuentra en defectos genéticos localizados en el ácido desoxirribonucleico (ADN). Estas alteraciones se traducen en una desregulación del ciclo celular y de los mecanismos de reparación del ADN. Todo esto concluye en una proliferación celular descontrolada, finalmente generando tumores capaces de invadir tejidos u órganos distantes. Representa uno de los desafíos de salud más relevantes de nuestra época dada su elevada incidencia y el alto impacto socioeconómico [2].

En el siglo pasado, las enfermedades infecciosas representaban la principal causa de muerte en la población. Sin embargo, como consecuencia del avance científico en el diagnóstico y el tratamiento mediante el desarrollo de antibióticos, las enfermedades infecciosas ya no son la principal causa de muerte en los países desarrollados. Por este motivo, a partir de la segunda mitad del siglo XX surge un nuevo perfil epidemiológico en la cual las enfermedades no transmisibles, como son las enfermedades cardiovasculares y el cáncer predominan como primeras causas de muerte en la población [2]. Diversos factores contribuyen al aumento de la incidencia del cáncer, donde se destacan el envejecimiento de la población, estilos de vida asociados a hábitos no saludables como el sedentarismo, dieta desequilibrada, consumo de alcohol y tabaco [3].

Una de las principales claves para el tratamiento eficaz del cáncer es establecer un diagnóstico oportuno y específico, ya que esto conlleva a un mejor pronóstico para el paciente. Usualmente, la enfermedad es detectada en etapas avanzadas, cuando existen uno o más órganos comprometidos. Por ende, los métodos para la detección temprana del cáncer son de suma importancia y representan un área activa de investigación

actual.

La detección del cáncer puede ser llevada a cabo mediante diversas técnicas, incluyendo el examen clínico, exámenes de marcadores tumorales u otras pruebas de laboratorio, biopsias o métodos imagenológicos [4]. Ninguna técnica es infalible, todas ellas poseen limitaciones generalmente derivadas de su sensibilidad [5]. Generalmente, se suele utilizar una combinación de pruebas para poder determinar la presencia y localización de un tumor. Por lo tanto, el diagnóstico sigue representando un reto sin una solución concluyente y definitiva.

Según la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer de la OMS, en 2020 más de 19 millones de personas fueron diagnosticadas con esta enfermedad y aproximadamente 10 millones murieron en el mundo. Se estima que para 2040 la carga mundial de cáncer será de unos 28.4 millones de casos nuevos diagnosticados, representando un aumento del 47% con respecto al año 2020. En la Tabla 1 se pueden observar la cantidad de casos nuevos diagnosticados y el número de muertes de las neoplasias más comunes durante el 2020.

Tabla 1: Número de nuevos diagnósticos y muertes reportadas en 2020 a causa de las neoplasias más comunes [3].

Tipo de cáncer	Número nuevos de casos	Número de muertes
Mama	2 261 419	684 996
Pulmón	2 206 771	1 796 144
Próstata	1 414 259	375 304
Colon	1 148 515	576 858
Estómago	1 089 103	768 793
Hígado	905 677	830 180
Cuello uterino	604 127	341 831
Tiroides	586 202	43 646
Linfoma No Hodgkin	544 352	259 793

Como se puede observar, el cáncer de mama femenino ha superado en incidencia al cáncer de pulmón ubicándose en el primer lugar, con un estimado de 2.3 millones de nuevos casos (11.7 %), seguido por el cáncer de pulmón (11.4 %), cáncer colorrectal (10.0 %) y cáncer de próstata (7.3 %). Sin embargo, el cáncer de pulmón sigue siendo la principal causa de muerte por cáncer, con un estimado de 1.8 millones de muertes [3]. Según el Registro Nacional del Cáncer publicado por la Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer (CHLCC) en 2022, Uruguay refleja la situación mundial, observándose que los 4 tipos de cáncer más frecuentes en el país son los mismos que se observan en los países desarrollados, el cáncer de mama, próstata, colo-recto y pulmón. Estas 4 neoplasias constituyen el 48 % de los casos reportados. Con respecto a la mortalidad en Uruguay, se estima que el 25.0 % de las defunciones anuales son a causa de cáncer, como se puede observar en la Figura 1 [6].

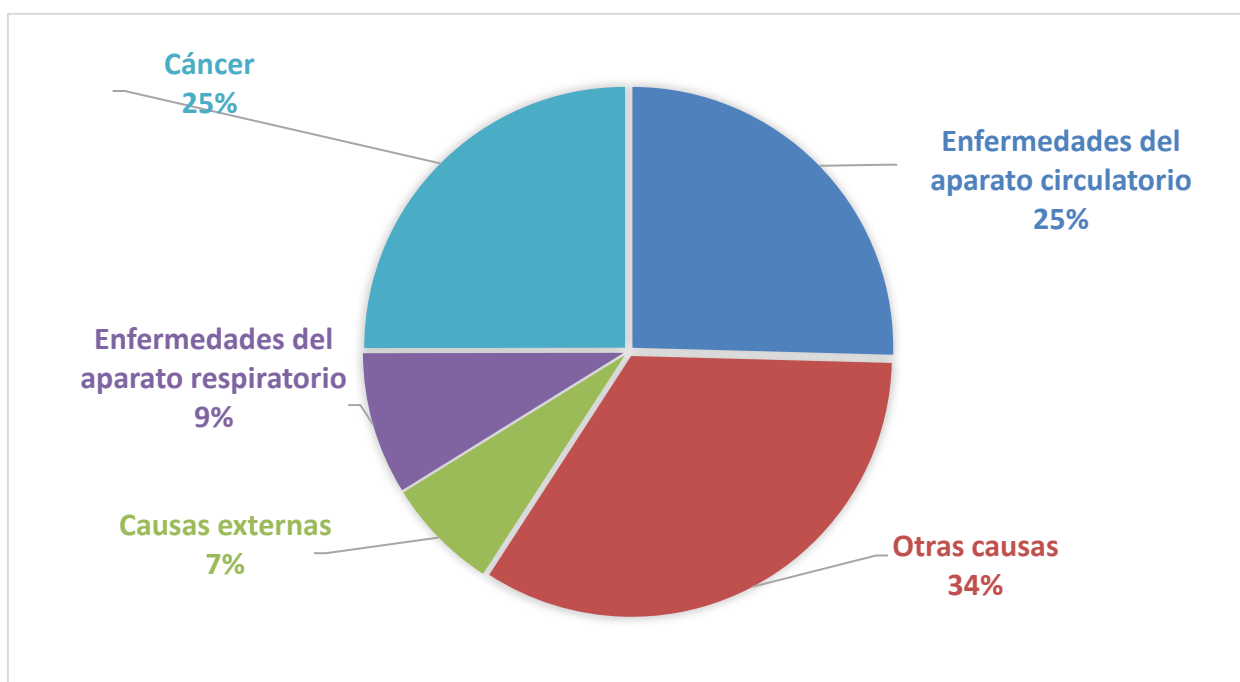


Figura 1: Causas de muertes en Uruguay en 2020.

En nuestro país, el cáncer de mama es la neoplasia de mayor incidencia en mujeres, afectando a 75 mujeres cada 100. 000 habitantes. También constituye la enfermedad

neoplásica con mayor mortalidad en este sexo reportándose 21 defunciones cada 100.000 habitantes. Le siguen en incidencia: el cáncer colorrectal (25 casos/100.000 habitantes), cérvix (14 casos/100.000 habitantes) y pulmón (14 casos/100.000 habitantes).

En hombres, la neoplasia con mayor incidencia es el cáncer de próstata, afectando a 59 hombres cada 100.000 habitantes, seguido por el cáncer de pulmón (46 cada 100.000), colorrectal (37 cada 100.000) y riñón (18 cada 100.000). En cambio, cuando se considera la mortalidad, se puede observar que el cáncer de pulmón (41 casos / 100.000) se encuentra en el primer lugar, seguido por el cáncer colorrectal (18 casos / 100.000) y en tercer lugar el cáncer de próstata (17 casos/100.000).

En la siguiente gráfica se pueden observar la incidencia y mortalidad de los distintos tipos de cáncer observados en hombres y mujeres según los últimos datos reportados por la CHLCC durante el período 2014-2018 (Figura 2).

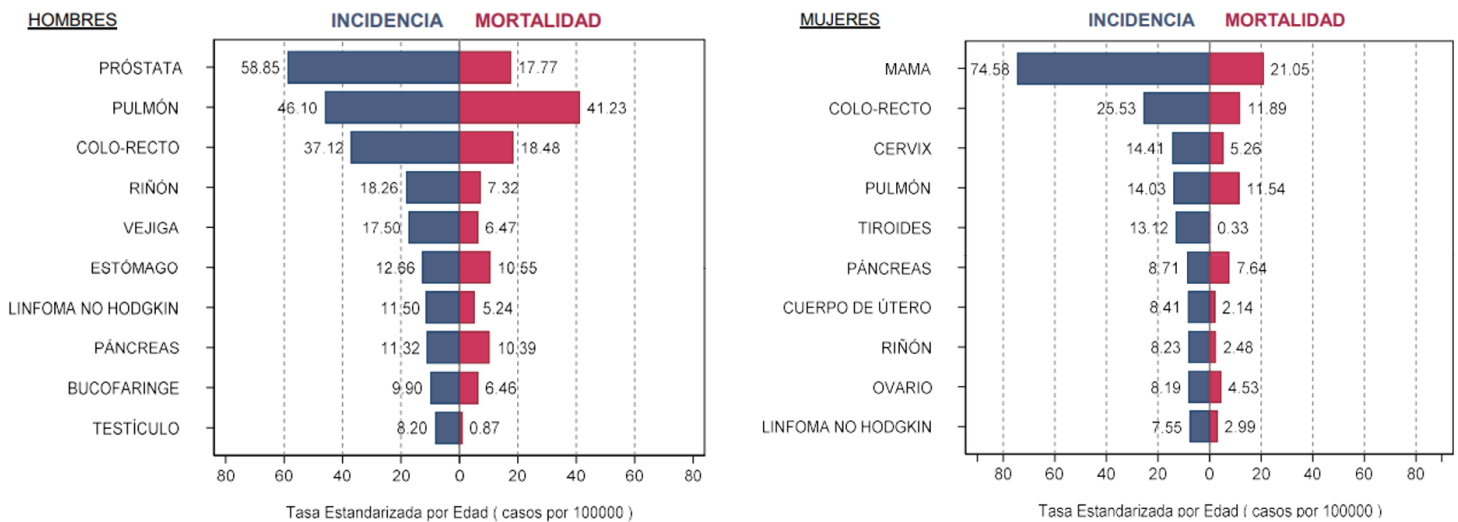


Figura 2: Incidencia y mortalidad de los distintos tipos de cáncer en población uruguaya discriminado por sexo, en el período 2014-2018 [6].

1.2. Abordaje diagnóstico del cáncer.

Actualmente, los métodos imagenológicos juegan un papel primordial en Oncología, ofreciendo información objetiva a la hora de decidir el tratamiento a seguir, determinando la extensión y actividad de la enfermedad. Asimismo, es posible utilizar la Imagenología para monitorear la eficacia de una terapia. Existe un amplio abanico de herramientas imagenológicas que se pueden emplear, entre ellas se encuentran los Rayos X, el Ultrasonido, Tomografía Computarizada (TC) y Resonancia Magnética (RM). Todas se basan en la recepción de emisiones atenuadas de energía que han atravesado los tejidos o se han reflejado o generado en ellos.

Los métodos de imagen pueden ser clasificadas en métodos anatómicos, funcionales o híbridos. Los primeros ofrecen información sobre las estructuras de los diferentes órganos del cuerpo del individuo estudiado. Las imágenes funcionales, aportan datos sobre el funcionamiento y bioquímica de los distintos órganos. Las técnicas híbridas utilizan ambas modalidades, anatómica y funcional, en las cuales se puede establecer un fenotipo estructural, fisiológico y molecular de la patología visualizada. La Imagenología Molecular a través de la Medicina Nuclear, mediante el uso de radioisótopos, permite la obtención de imágenes funcionales que ayudan a un diagnóstico preciso y personalizado [14].

1.3. Medicina Nuclear.

La Medicina Nuclear es una especialidad de la Medicina que utiliza fuentes abiertas de radiación tanto para realizar diagnóstico como tratar diversas enfermedades [7]. Las mismas incluyen el cáncer, enfermedades gastrointestinales, endocrinas, neurológicas, entre otras. Su fundamento diagnóstico se basa en la utilización de sustancias trazadoras radiactivas que se administran al paciente y la posterior evaluación de la distribución de éstas en el organismo.

La ventaja principal frente a otras técnicas, como la RM o la TC, es que brinda la posibilidad de estudiar los cambios que ocurren a nivel celular. Estos suelen preceder a

la aparición de anomalías anatómicas, por lo que la Imagenología Molecular permite la detección de la enfermedad en sus inicios. Además, permite el estudio de la totalidad de la masa tumoral en forma cuantitativa, reproducible y mínimamente invasiva [7]. La Imagenología Molecular utiliza trazadores capaces de interactuar con blancos moleculares específicos, permitiendo un elevado grado de personalización [8]. Para esto, se aprovechan las propiedades de los átomos radiactivos utilizados, radionucleidos, los cuáles sufren un fenómeno de emisión espontánea de partículas o de radiaciones electromagnéticas denominado decaimiento radiactivo. Los radionucleidos decaen mediante emisión de partículas o mediante radiación electromagnética. Los principales tipos de decaimientos conocidos son: alfa (α), beta negativo (β^-), emisión de positrones (β^+), gamma (γ) y captura electrónica (CE). Las radiaciones de los radionucleidos emisores de partículas, α o β^- , poseen muy escasa capacidad de atravesar la materia debido a su bajo poder de penetración. Sin embargo, producen elevada ionización en su trayectoria, dado que poseen elevada transferencia lineal de energía (LET). El LET es la energía entregada por las radiaciones ionizantes en la materia por unidad de recorrido lineal, y es un parámetro muy importante para determinar el daño biológico. Esta ionización genera daños sobre las moléculas esenciales presentes en las células, como por ejemplo el ADN, los daños se acumulan y la célula no es capaz de repararlos, en consecuencia, la célula muere. Estos emisores se utilizan para terapia de diversas enfermedades, en cambio, los radionucleidos emisores gamma y los de positrones son utilizados en diagnóstico dado que las radiaciones electromagnéticas generadas poseen elevado poder de penetración. Las mismas pueden ser detectadas externamente con los equipos correspondientes [8]. Además, son radiaciones con bajo LET dado que producen baja ionización en su recorrido y por tanto pueden utilizarse con seguridad a bajas dosis [9].

Existen dos modalidades que se destacan en la toma de imágenes en Medicina Nuclear, la Tomografía Computarizada de Emisión de Fotón Único (SPECT) y la Tomografía de Emisión de Positrones (PET). La técnica de SPECT utiliza radiofármacos conteniendo emisores gamma y PET utiliza emisores de positrones. Ambas brindan información funcional y metabólica mediante la obtención de imágenes.

La primera, SPECT, se basa en la adquisición de imágenes obtenidas a partir de la desintegración radiactiva de un radionucleido emisor de fotones, con energía idealmente entre 100 y 150 KeV, a través de un sistema conteniendo detectores de radiación. Una secuencia de imágenes planares es adquirida en torno a una órbita predefinida por el equipo, posteriormente éstas son sometidas a un software que reconstruye una imagen tridimensional. El [^{99m}Tc]Tc es el radionucleido principal utilizado para este tipo de adquisiciones. También se pueden utilizar el [^{123}I]I, [^{111}In]In, [^{67}Ga]Ga, entre otros. El SPECT está ampliamente distribuido en todo el mundo, Uruguay cuenta con esta tecnología desde hace varias décadas y en la actualidad existen nueve centros de Medicina Nuclear en los cuales adquieren este tipo de imágenes diagnósticas, 7 de ellos se encuentran en la capital del país y los dos restantes en el interior del Uruguay [10,11].

La Tomografía de Emisión de Positrones se basa en la detección en coincidencia de dos fotones de 511 KeV resultantes del proceso de aniquilación del positrón. La radiación emitida, denominada radiación de aniquilación, constituida por dos rayos gamma emitidos en el mismo sentido pero en direcciones opuestas (180°), interacciona con los detectores ubicados en forma de anillo en el tomógrafo. Dichos detectores son capaces de discriminar los fotones que llegan a dos detectores situados a 180° en forma simultánea mediante un circuito de coincidencia. Posteriormente, se realiza la reconstrucción digital de la información, generándose una imagen tridimensional en la cual se observa la distribución del radiofármaco en el cuerpo del paciente. Los radionucleidos utilizados en la técnica poseen usualmente un período de semidesintegración corto. Los principales ejemplos son: [^{11}C]C, [^{18}F]F, [^{13}N]N, [^{15}O]O [12,13]. La principal dificultad de esta técnica radica en el corto período de semidesintegración de los radionucleidos utilizados, haciéndose necesario producir localmente los mismos ya sea mediante un ciclotrón o sistema generador. En Uruguay se cuenta con un centro que utilizan emisores de positrones para diagnóstico, el CUDIM. En la actualidad, el PET posee mejor resolución espacial y buena corrección de atenuación con respecto al SPECT, brindando mejor calidad de imágenes especialmente para la visualización de estructuras profundas. Sin embargo, el avance tecnológico está llevando a una mejora continua de la calidad de las imágenes SPECT [9].

1.4. Radiofármacos.

Los trazadores radiactivos utilizados en Medicina Nuclear se denominan radiofármacos. Éstos son compuestos radiactivos con calidad farmacéutica que se administran en cantidades trazas y por lo tanto no producen acción farmacológica al interactuar con las biomoléculas del organismo. Éstos permiten realizar un diagnóstico preciso debido al alto grado de personalización obtenido al utilizar radiofármacos que interactúan a nivel molecular con marcadores específicos de cada enfermedad y de cada paciente [14,15].

Generalmente, un estudio diagnóstico consiste en 4 pasos, los mismos se encuentran representados en la siguiente ilustración (Ilustración 1).



Ilustración 1: Principales pasos de un procedimiento de Medicina Nuclear Diagnóstico.

Brevemente, el radiofármaco se prepara siguiendo los procedimientos apropiados, realizando los controles necesarios para asegurar su adecuada calidad. Posteriormente, se administra el trazador al paciente, la vía de administración en general es intravenosa sin embargo no es la única. Luego de que transcurre un tiempo conveniente el

radiofármaco se distribuye en el organismo, se concentra en los sitios de interés. En este punto, se realiza la adquisición de las imágenes mediante el equipamiento adecuado.

En el caso de la terapia, se administra el radiofármaco, el mismo se distribuye en el organismo, acumulándose en el o los sitios de interés. El radionucleido emite partículas que depositan la dosis de radiación localizada en las células blanco produciendo una acción citotóxica en las mismas. Las células por ende mueren, llevando a la destrucción del tejido y eventualmente erradicando la enfermedad. En la siguiente ilustración se pueden observar los principales pasos de un procedimiento de Medicina Nuclear Terapéutica (Ilustración 2).

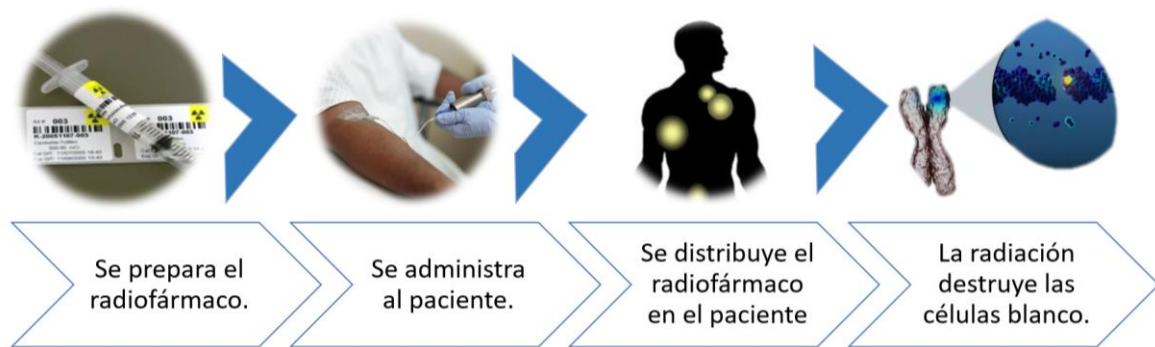


Ilustración 2: Principales pasos de un procedimiento de Medicina Nuclear Terapéutico.

1.5. Desarrollo de un radiofármaco.

El desarrollo de un nuevo radiotrazador abarca distintas etapas: elección del blanco molecular específico, diseño y síntesis de ligandos, introducción del átomo radiactivo en los ligandos y estudios de caracterización fisicoquímica y biológica del trazador. En la siguiente imagen se muestran las etapas de desarrollo de un radiotrazador (Ilustración 3).

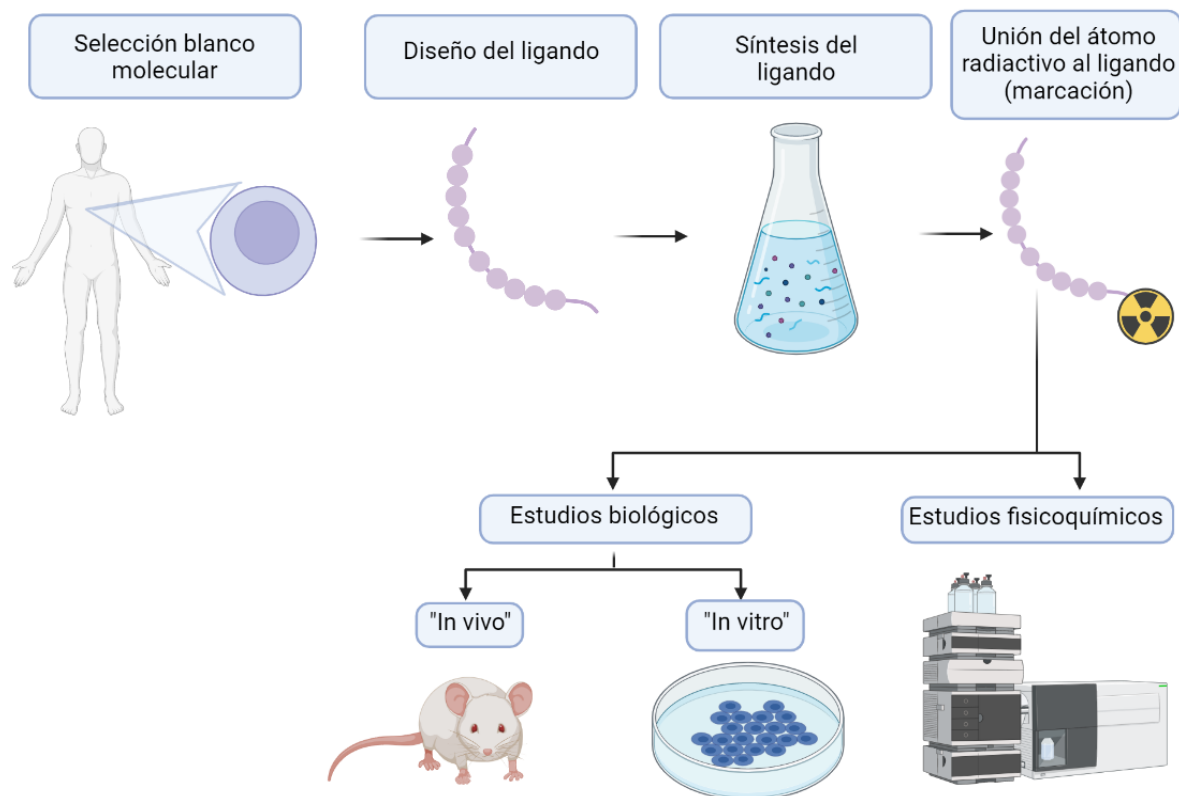


Ilustración 3: Principales etapas para el desarrollo de un radiotrazador.

La primera etapa implica la selección del blanco molecular, el mismo blanco puede ser una molécula, péptido, proteína, receptor, u otras características bioquímicas o metabólicas diferentes a las de las células normales del tejido u órgano al que pertenecen. Posteriormente, se realiza la elección del ligando que debe contener una estructura química con capacidad de unión al blanco molecular y también al átomo radiactivo. Se debe realizar la síntesis del ligando con buena pureza y luego la unión del átomo radiactivo al mismo mediante un proceso denominado *marcación*. El radiotrazador se debe obtener con elevada pureza radioquímica. Posteriormente, se deberán evaluar las propiedades fisicoquímicas y biológicas más relevantes para caracterizar el producto obtenido.

En este trabajo de tesis se utilizaron dos radionucleidos metálicos ($[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ y $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$). Esto implica un desafío en la marcación de moléculas biológicamente activas. Se han desarrollado varias estrategias que permitan la unión de un metal no fisiológico al ligando de interés sin que la coordinación del metal altere la actividad biológica. El método más comúnmente empleado es el llamado *pendant approach* (Ilustración 4) [16].



Ilustración 4: Estrategia del *Pendant approach*.

Este método consiste en añadir a la biomolécula mediante síntesis química de una unidad quelante formada por una serie de grupos capaces de coordinar al metal. El agente quelante generalmente tiene dos o más átomos conteniendo al menos un par de electrones de valencia no compartidos que generan enlaces de coordinación entre el quelante y el ion metálico. En la elección del quelante es necesario considerar las características fundamentales del ion metálico entre ellas el número atómico, carga, radio iónico y características ácido-base de Pearson. Para una óptima coordinación, los grupos funcionales del agente quelante deben adoptar la geometría preferida del ion metálico y además satisfacer los requisitos de coordinación del metal [17].

La cercanía de la unidad quelante con la biomolécula puede alterar la capacidad de unión o interacción de la molécula con su blanco molecular. Por esta razón, es posible

añadir un espaciador, que separe la biomolécula y el quelante para evitar interferencias. Es necesario optimizar el largo del espaciador para disminuir este impedimento estérico. Este, además de contribuir a la conservación de la actividad de la biomolécula puede modificar las propiedades fisicoquímicas generales del radiotrazador, alterando la carga, lipofilidad e hidrofiliidad y por ende el perfil farmacocinético y perfil de biodistribución. El espaciador puede ser una cadena alifática, una secuencia polipeptídica, un polieter, entre otros [16,18,19].

Para el desarrollo de radiofármacos se pueden utilizar agentes bifuncionales (ABF), que son moléculas que tienen en un extremo un agente quelante y en el otro un grupo funcional capaz de conjugar con la biomolécula de elección [20]. Es necesario que el agente bifuncional coordine rápidamente el metal y además que la unión establecida sea cinéticamente estable en presencia de cationes fisiológicos como Ca (II), Fe (III), Zn (II) y Mg (II) entre otros [9,21]. Generalmente en Radiofarmacia se utilizan agentes quelantes multidentados dado que son especialmente efectivos para formar complejos robustos debido al efecto quelato. Este efecto se observa cuando se compara un complejo metálico formado por un ligando polidentado con n átomos dadores, respecto a un complejo formado por n ligandos monodentados comparables. El complejo formado con el ligando polidentado presenta mayor estabilidad con respecto al complejo formado con los ligandos monodentados. En este fenómeno influyen factores termodinámicos y cinéticos, los termodinámicos son principalmente entrópicos ya que la entropía del sistema es mayor cuando se forma el complejo con el ligando polidentado desplazando los n ligandos monodentados. Los factores cinéticos tienen que ver con la cooperatividad al formar el complejo con el ligando. Una vez se coordina uno de los átomos donadores de electrones, la unión de los otros átomos donadores se ve favorecida. También se produce el efecto contrario cuando se disocia el complejo, ya que es más fácil disociar un ligando monodentado que uno polidentado. El mayor número de átomos donadores en el ligando polidentado hace que la disociación de un enlace metal-ligando no resulte en la disociación del complejo, pudiéndose producir, por lo tanto, una nueva recombinación. En el caso de los agentes quelantes macrocíclicos, si un átomo donador de electrones perteneciente a un ligando macrocíclico se disocia del centro metálico, la probabilidad de su rápida re-coordinación

es alta porque el átomo donador disociado (al estar unido a otros átomos coordinados) permanece próximo al centro del metal. Esto genera que los agentes quelantes macrocíclicos posean una elevada estabilidad cinética, mayor con respecto a los quelantes acíclicos [17].

1.6. Química del [^{99m}Tc]Tc.

La gran mayoría de los procedimientos de Imagenología Molecular llevados a cabo alrededor del mundo utilizan el [^{99m}Tc]Tc como el radionucleido de elección. Se ha estimado que se realizan entre 30-40 millones de procedimientos en el mundo por año [8]. También es el radionucleido más utilizado en Uruguay, existiendo a la fecha de escritura de esta tesis 9 clínicas de Medicina Nuclear que realizan procedimientos casi únicamente con este radionucleido. El uso extendido del [^{99m}Tc]Tc en Radiofarmacia se debe a varios factores, por una parte, su modo de decaimiento favorable que incluye emisiones gamma de 140 KeV pueden ser fácilmente detectados con cristales de ioduro de sodio dopados con talio presentes en las cámaras SPECT. Por otra parte, tiene un período de semidesintegración de 6.01 horas, posibilitando la realización de las manipulaciones necesarias para preparar un amplio rango de radiofármacos. Por último, se puede obtener eficientemente y con elevada actividad específica a partir de un sistema generador de [⁹⁹Mo]Mo/ [^{99m}Tc]Tc [22–24].

El tecnecio es un metal de transición cuya configuración electrónica del átomo neutro es [Kr]4d⁶5s¹, por lo que puede presentar estados de oxidación entre -1 y +7. Las formas reducidas del metal presentan niveles *d* incompletos, por lo que tienen la capacidad de formar compuestos de coordinación que cuentan con un átomo central rodeado por un grupo de moléculas o iones llamados ligandos [14,21,25]. Los estados de oxidación más relevantes en Radiofarmacia son el +1, +3 y +5. El tecnecio en estado de oxidación alto (+4, +5) se comporta como un ácido duro debido a la alta carga del centro metálico, en cambio, el metal en estado de oxidación bajo (+1, +3) se comporta como un ácido blando. Dependiendo del estado de oxidación en el cual se encuentre el tecnecio tendrá

afinidad por grupos donadores de electrones considerados como bases duras o blandas según la teoría de Pearson. Las bases duras son aquellas que poseen elevada densidad de carga y baja polarizabilidad. Algunos ejemplos pueden ser los: grupos carbonato, óxido, hidróxido, fluoruro, fosfato. Por el contrario, las bases blandas son aquellas que poseen iones de gran tamaño capaces de polarizarse fácilmente. Ejemplos de estos son las fosfinas, ion ioduro, ion tiocianato.

Dada la gran variedad de estados de oxidación que el tecnecio puede adoptar, son diversas las posibles configuraciones en su primera esfera de coordinación denominados *cores*. Por lo tanto, existen numerosas posibilidades para el diseño de potenciales radiofármacos conteniendo este radionucleido [25]. Los ejemplos más destacados son el Tc-dioxo ($[O=Tc=O]^+$), el Tc-monoxo ($[Tc=O]^{3+}$), el Tc-nitrido ($[Tc\equiv N]^{2+}$), el Tc-nitreno ($[Tc=N=N-R]^{2+}$) y el Tc-tricarbonilo ($[Tc(CO)_3]^+$) (Figura 3). Cada uno de estos núcleos o *cores* se coordinan preferentemente con una clase específica de ligandos [26].

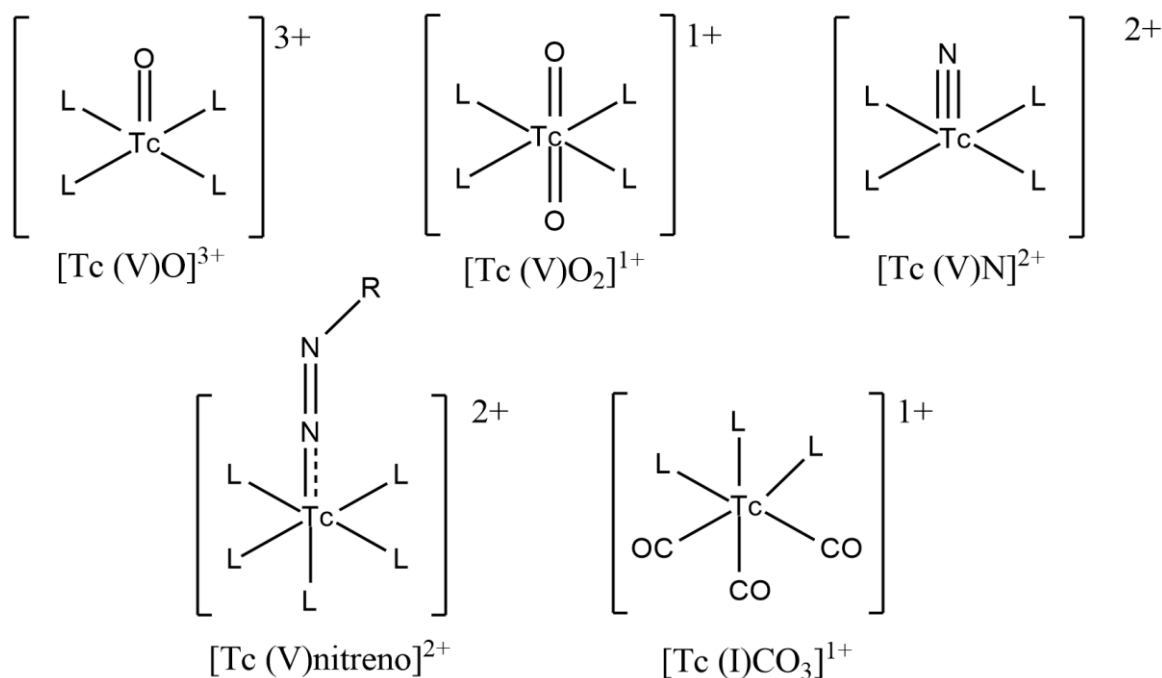


Figura 3: Ejemplos de *cores* utilizados para el desarrollo de radiofármacos.

La preparación de los diferentes radiofármacos de tecnecio comienza en una solución

acuosa de pertechnetato de sodio, forma química disponible en el eluido del generador $[^{99}\text{Mo}]\text{Mo}/ [^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}$. El tecnecio en este estado de oxidación, Tc(VII), no es utilizado generalmente para el desarrollo de radiofármacos, con la excepción del ion pertechnetato y el $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-S}$ coloidal [14,25]. Por esta razón, es necesario reducir el metal a un estado de oxidación menor en el cual preferentemente forme complejos. La reducción puede ser llevada a cabo con diversos agentes reductores como por ejemplo cloruro de estaño (II) (SnCl_2), ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) o borohidruro de sodio (NaBH_4). En presencia de un agente reductor y los ligandos adecuados, el tecnecio puede alcanzar estados de oxidación desde (I) a (VI). De esta manera se pueden obtener complejos con números de coordinación (NC) de 4 a 7, que adoptan diversas formas geométricas, ejemplos, tetraédrico (NC=4) tetragonal piramidal (NC=5), octaédrica (NC=6), pentagonal bipiramidal (NC=7) bipirámide pentagonal (NC=8) [21].

Las estrategias de marcación que han tenido más relevancia en los últimos años han sido la formación de nitrurocomplejos de Tc(V), complejos de Tc(III) y complejos de Tc(I) tricarbónicos. En este trabajo se seleccionaron los complejos de Tc(V) nitruro y de Tc(I) tricarbónicos para la obtención de los radiotrazadores de interés.

Complejos tecnecio (V)-nitruro.

Los complejos Tc(V) nitruro fueron desarrollados inicialmente por Baldas y colaboradores, y según la bibliografía han sido ampliamente utilizados en la formación de trazadores promisorios [27]. Este tipo de complejos posee un triple enlace tecnecio-nitrógeno quedando disponibles cuatro posiciones de coordinación libres para unión de uno o más ligandos [28–31]. La geometría de los complejos resultantes puede ser de pirámide de base cuadrada o bipirámide trigonal, dependiendo de los ligandos utilizados [27]. Debido al impedimento estérico producido por el triple enlace $\text{Tc}\equiv\text{N}$, generalmente la unión de un ligando tetradentado no es favorable, por lo tanto, suelen utilizarse dos ligandos bidentados para ocupar las posiciones de coordinación disponibles. En el caso que se utilicen dos ligandos bidentados iguales, se obtendrán complejos homolépticos.

También se pueden obtener complejos heterolépticos cuando se utilizan dos ligandos diferentes (Figura 4).

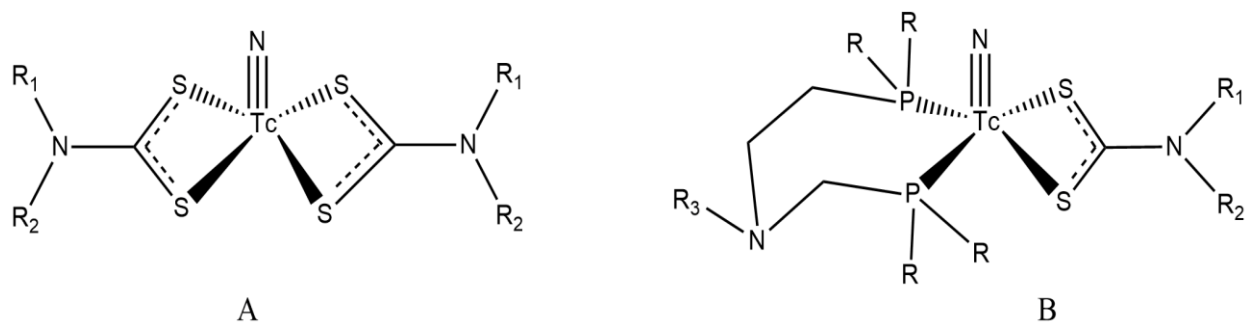


Figura 4: Distintas posibilidades de formación de complejos Tc(V) nitruro: complejo homoléptico (A) o complejo heteroléptico (B).

Para la formación de complejos homolépticos es necesario utilizar un ligando bidentado donador π . Entre los ligandos de esta categoría más frecuentes se encuentran los ditiocarbamatos, ya que los electrones del doble enlace entre el carbono y el azufre y el enlace carbono y azufre (C=S, C-S) son equivalentes por la deslocalización de los mismos (Figura 4-A).

Los complejos heterolépticos requieren la utilización de dos ligandos diferentes. Es posible utilizar dos ligandos bidentados diferentes o bien uno tridentado y uno monodentado pero es necesaria la interacción simultánea de un aceptor π con un donador π para lograr la formación de un complejo Tc(V) nitruro heterolépticos [32]. En la bibliografía se reportan complejos en los cuales uno de los ligandos es un ditiocarbamato y el aceptor π es una aminodifosfina del tipo PNP (fosfato-nitrógeno-fosfato). Los complejos obtenidos suelen presentar muy buenas propiedades, entre ellas se destacan la elevada estabilidad *in vitro* e *in vivo*. Las fosfinas PNP son inestables y el trabajo con ellas implica dificultades muchas veces durante la síntesis, esto derivó a que se desarrollaran nuevas fosfinas estables e hidrosolubles que han sido exitosamente aplicadas para la marcación de grandes y pequeñas moléculas [33]. Otra posibilidad es trabajar con un nuevo tipo de nitruro complejo heteroléptico reportado en bibliografía es el tipo (3+1), en los cuales el tecnecio está coordinado por un ligando tridentado donador π y un ligando monodentado aceptor π .

Se han reportado complejos conteniendo el *core* Tc(V)≡N en la marcación de biomoléculas [27]. Como el tecnecio en este *core* posee elevada afinidad por átomos de azufre como donadores de electrones, resulta particularmente conveniente utilizar péptidos que incluyan cisteína, un aminoácido que contiene un tiol en su cadena lateral, en la posición terminal en la secuencia aminoacídica [28–31]. Este aminoácido puede actuar como ligando bidentado coordinado al metal mediante los átomos de oxígeno del grupo carboxilato y azufre del grupo tiol, o bien mediante nitrógeno del grupo amino terminal y azufre del grupo tiol (Figura 5) [34].

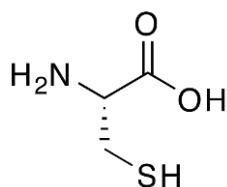


Figura 5: Estructura de la cisteína.

Otra estrategia alternativa para la formación de este tipo de complejos es la adición de aminoácidos o pseudoaminoácidos a la secuencia de la biomolécula con el fin de generar un sistema quelante tridentado conteniendo los átomos de azufre-nitrógeno-azufre (S⁻, N, S⁻) necesarios para generar el complejo Tc-N del tipo 3+1 (Figura 6).

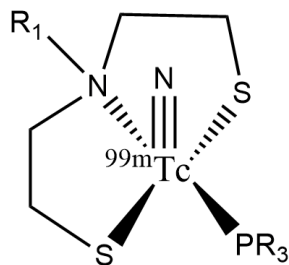


Figura 6: Estructura general para los complejos de Tc(V)nitruro del tipo (3+1).

Para completar la cuarta posición de coordinación disponible en el complejo se puede utilizar como ligando monodentado una fosfina, puede ser una monofosfina terciaria. Algunos ejemplos de estas se pueden ver en la siguiente figura (Figura 7) [32].

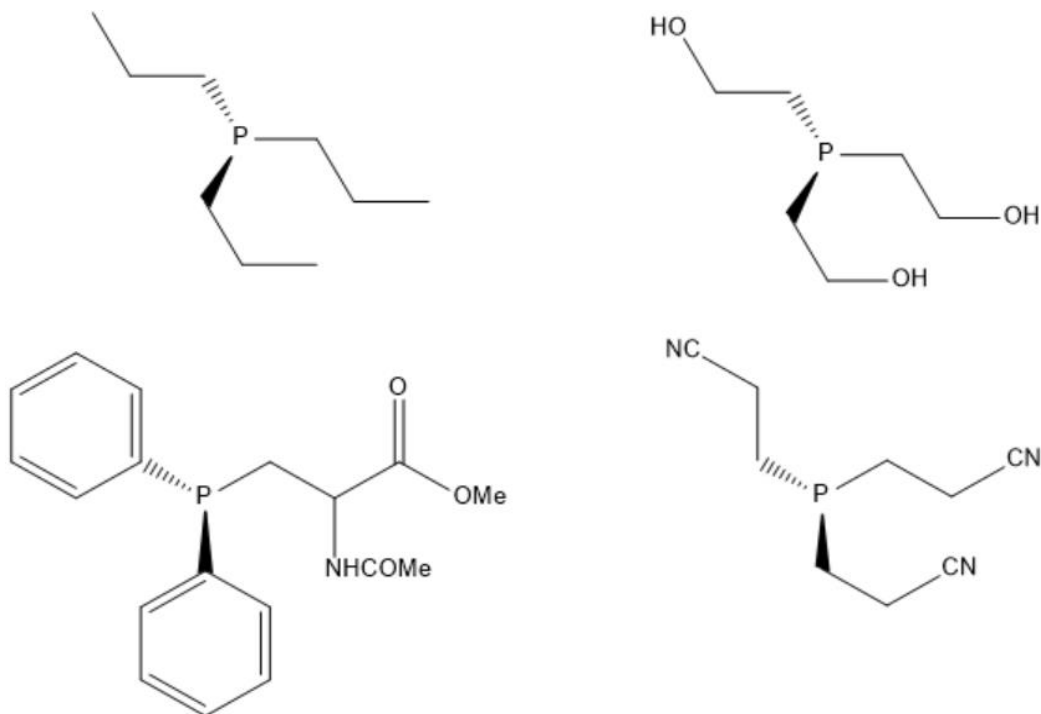


Figura 7: Ejemplos de fosfinas que pueden ser utilizadas como ligandos monodentados en la formación de nitrurocomplejos del tipo (3+1).

Existen radiofármacos desarrollados utilizando el *core* nitruro, un ejemplo es el bis-(N-etoxi,N-etil-ditiocarbamato)nitrido, el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-N}(\text{NOEt})_2$ utilizado como agente de perfusión miocárdica. Este es un complejo neutro, lipofílico y homoléptico en el cual el tecnecio está coordinado por dos unidades de ligando, por medio de los átomos de azufre (S, S') presentes en los grupos ditiocarbamatos (Figura 8).

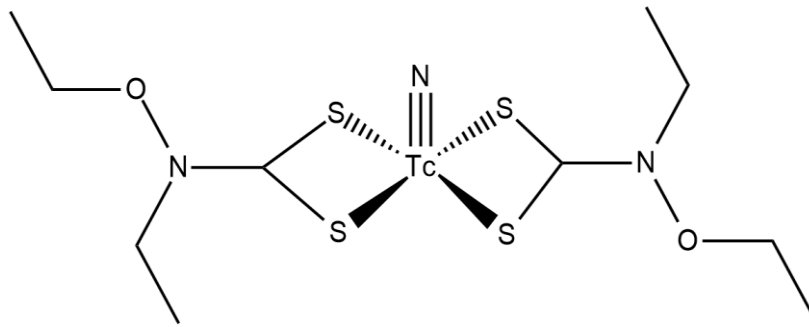
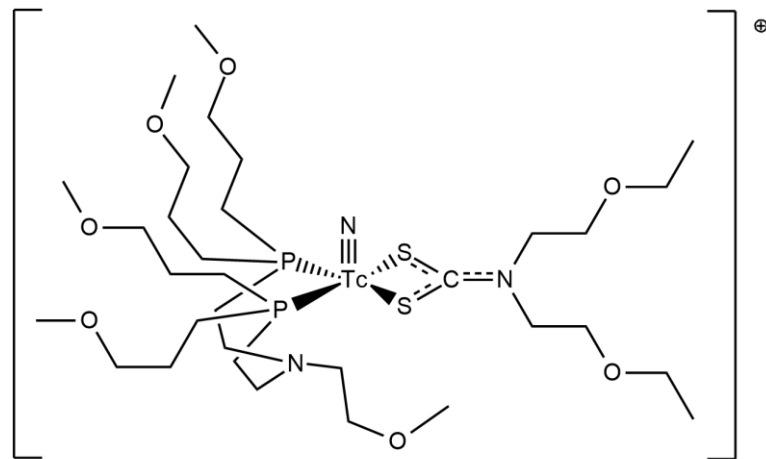
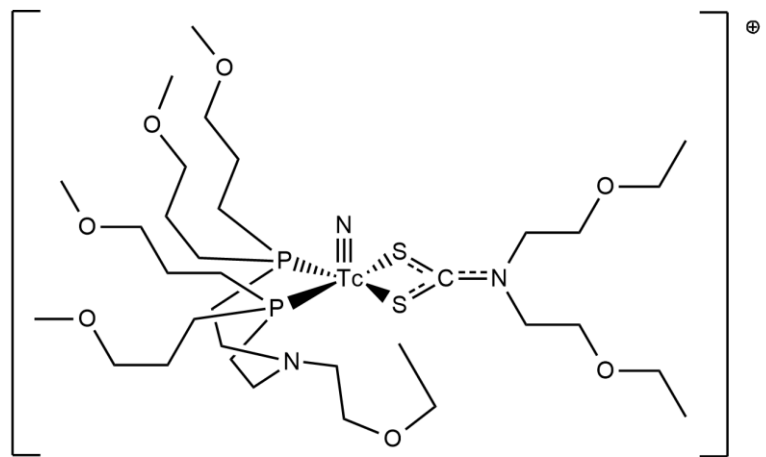


Figura 8: Molécula de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-N-(NOEt)}_2$.

Se han llevado a cabo ensayos demostrando que el radiofármaco posee el mismo comportamiento y propiedades que el cloruro de talio ($[^{201}\text{Tl}]\text{TlCl}$) y los complejos monocatiónicos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$. Este complejo fue el puntapié inicial para el desarrollo de otros agentes de perfusión miocárdica conteniendo el *core* $[\text{Tc(V)}\equiv\text{N}]^{2+}$. Se utilizaron ligandos derivados de ditiocarbamatos como ligando bidentado junto a una bifosfina del tipo PNP, la fórmula general de estos complejos es: $[^{99m}\text{Tc}][\text{TcN}(\text{DTC})(\text{PNP})]^+$. Los complejos obtenidos demostraron una elevada captación en tejido miocárdico, rápida eliminación en sangre y otros tejidos no blanco. Algunos ejemplos de estos radiotrazadores desarrollados se pueden observar en la siguiente figura (Figura 9).



$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{N})\text{DBODC}(3)$



$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{N})\text{DBODC}(5)$

Figura 9: Complejos del tipo $[^{99m}\text{Tc}][\text{TcN}(\text{DTC})(\text{PNP})]^+$ desarrollados por Boschi *et al.*

El $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcN-DBODC3}$ y el $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcN-DBODC5}$ fueron los dos complejos que demostraron propiedades biológicas superiores en comparación con los agentes comúnmente utilizados para la evaluación de la perfusión miocárdica como el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -sestamibi y el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -Tetrofosmin demostrando el potencial del uso de este *core* en radiofarmacia [35].

Tecnecio (I)-tricarbonílico.

Un *core* novedoso para la formación de complejos organometálicos, desarrollado por Alberto y colaboradores, es el *core* tricarbonílico $[\text{Tc}(\text{CO}_3)]^+$. Se trata de un centro

metálico en el cual el metal se encuentra en estado de oxidación (I) y coordinado mediante tres moléculas de CO fuertemente unidas. El enlace de coordinación entre el tecnecio y los grupos CO es muy estable debido a que estos son dadores σ y aceptores π . Debido al intenso campo ligando resultante y la configuración electrónica d^6 de bajo spin del metal se genera una estabilización del estado de oxidación del tecnecio evitando que el metal pueda sufrir posibles reacciones de oxido reducción. Alberto y colaboradores propusieron la formación a baja presión del acuocomplejo tricarbónico de Tc(I) *fac*- $^{99m}\text{Tc}[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ (Figura 10) que puede ser utilizado como precursor para obtener una gran variedad de potenciales radiofármacos [36].

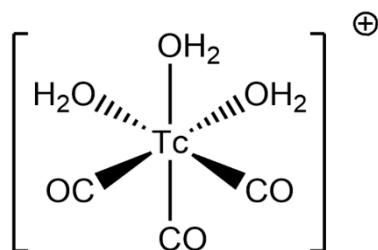


Figura 10: Estructura del acuocomplejo *fac*- $^{99m}\text{Tc}[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$.

En este complejo el resto de las posiciones de coordinación están ocupadas por moléculas de agua débilmente unidas, las que pueden ser reemplazadas por ligandos que posean una combinación de átomos donadores de electrones con alta afinidad por el tecnecio. Una gran ventaja de utilizar este *core* es la gran variedad de ligandos que tienen capacidad de unirse muy eficientemente al Tc(I). Estos pueden ser ligandos conteniendo grupos donadores duros o blandos basados en carboxilos, tioles, tioéteres o fosfinas, aminas alifáticas o aminas aromáticas. En bibliografía, se reportan complejos muy estables formados con el *core* tricarbónico utilizando ligandos como: N-heterociclos aromáticos en combinación con ácidos carboxílicos [37,38]. El ligando utilizado puede ser tridentado o bidentado. Los complejos formados con ligandos tridentados presentan alta robustez y elevada estabilidad principalmente en plasma humano [39]. Sin embargo, se ha podido observar 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 fácilmente sustituible en el complejo final favorece la

inestabilidad *in vivo*, facilitando el intercambio por ligandos presentes en la sangre. Una estrategia para abordar este problema es la preparación de complejos carbonílicos mixtos del tipo 2+1 en los cuales las tres moléculas de agua presentes en el precursor son sustituidas por la acción simultánea de un ligando bidentado y uno monodentado. Este concepto aporta mayor versatilidad y flexibilidad en el diseño de potenciales radiofármacos [40,41]. La primera aplicación de este *core* fue llevada a cabo por Alberto y colaboradores en 1999 [42], quienes desarrollaron una serie de complejos derivados de arilpiperazinas con blanco en los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} (Figura 11).

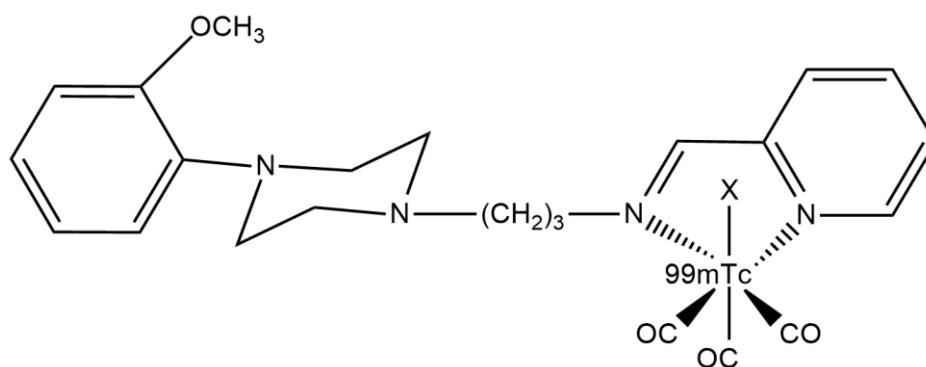


Figura 11: Estructura de los complejos tricarbónicos basados en arilpiperazinas desarrollados por Alberto y colaboradores.

En este trabajo se demostró que era posible aplicar este *core* para el desarrollo de complejos organometálicos para una potencial aplicación en Medicina Nuclear [42]. Sin embargo, el ejemplo más destacado es el radiofármaco desarrollado por Babich y colaboradores, el [^{99m}Tc]Tc-MIP-1404 (Figura 12) [43–46]. Este ha sido estudiado extensamente para la detección de cáncer de próstata. El [^{99m}Tc]Tc-MIP-1404 tiene como blanco los receptores de antígeno prostático específico de membrana (PSMA) sobreexpresados en tejido tumoral prostático. Dada la alta prevalencia del cáncer de próstata en el mundo es de suma importancia contar con un agente de imagen SPECT, ampliamente disponible, rentable y fácilmente sintetizable. Por este motivo, su desarrollo representa un hito para la Radiofarmacia [45,46].

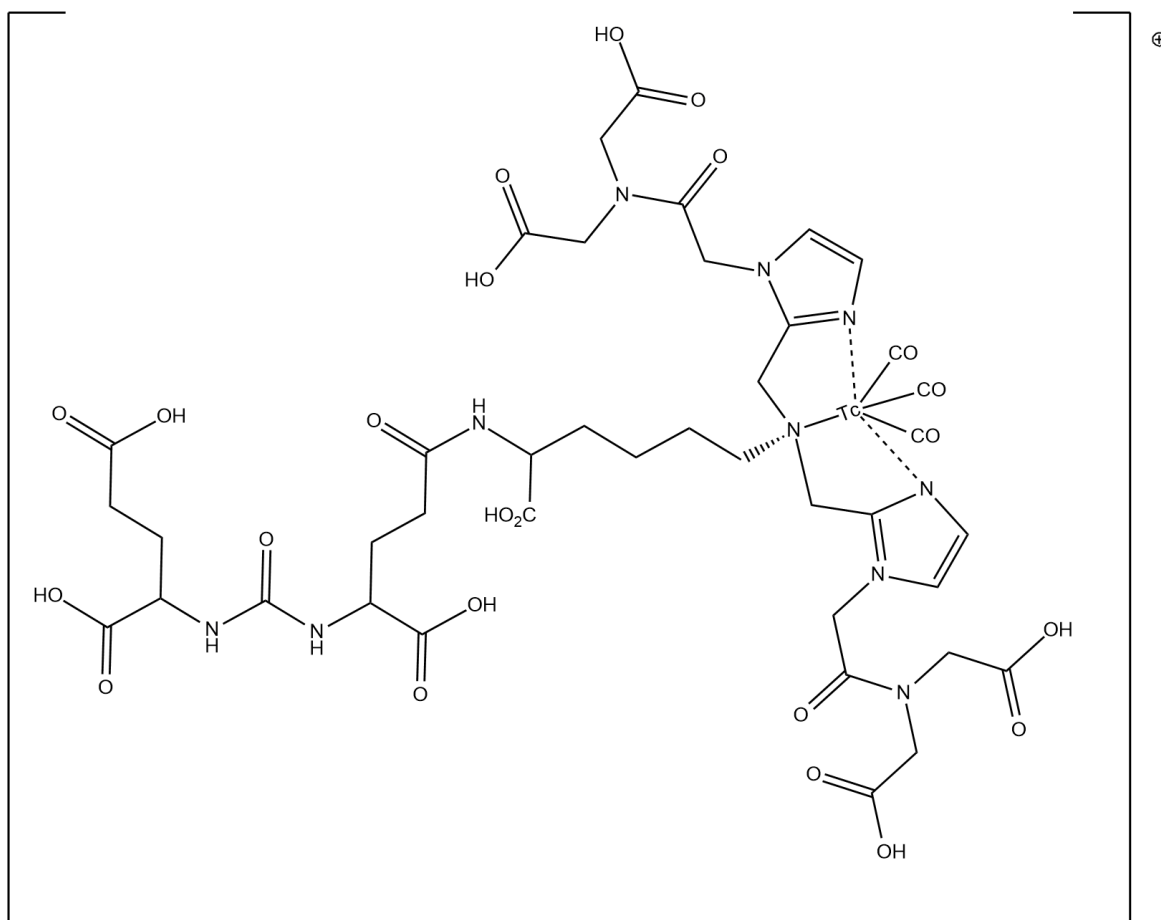


Figura 12: Estructura del $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MIP-1404}$.

1.7. Química del $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$.

El galio es un metal perteneciente al bloque p, grupo 13, junto con el aluminio e Indio. En la naturaleza se presenta en forma de dos isótopos estables: $[^{69}\text{Ga}]\text{Ga}$ y $[^{71}\text{Ga}]\text{Ga}$. En Medicina Nuclear los isótopos más relevantes son $[^{66}\text{Ga}]\text{Ga}$, $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga}$ y $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$. El $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga}$ es un emisor gamma de periodo de semidesintegración de 78 horas, utilizado principalmente en la década de los 70 para estudios de SPECT. Los radioisótopos $[^{66}\text{Ga}]\text{Ga}$ y $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ son emisores de positrones [21]. De estos tres radioisótopos disponibles, el $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ ha adquirido más relevancia en las últimas décadas debido a que sus propiedades lo vuelven de gran utilidad para Imagenología Molecular mediante

PET.

El decaimiento del $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ ocurre a través de emisión de positrones en un 89% con una energía máxima de 1.92 MeV, y un 11% por captura electrónica. El período de semidesintegración es de 68 minutos, lo cual hace que se ajuste a la farmacocinética de muchos péptidos o moléculas pequeñas [10,20,47].

El método más difundido para la obtención del radionucleido es mediante un sistema generador, $[^{68}\text{Ge}]\text{Ge}/[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$. Sin embargo, recientemente también se han desarrollado métodos exitosos para su obtención mediante ciclotrón. En nuestro país se cuenta con generadores de $[^{68}\text{Ge}]\text{Ge}/[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ para la obtención de este radionucleido en el Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM). La gran mayoría de ellos utilizan como eluyente una solución de ácido clorhídrico para separar el Ge (IV) del Ga(III). Por lo tanto, se obtiene el radionucleido en una solución ácida con elevada pureza [48,49].

Complejos de Ga(III).

La configuración electrónica del galio es $[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^2 4p^1$, existiendo dos posibles estados de oxidación: Ga (I) y el Ga(III). En solución acuosa se favorece la formación del ion en estado de oxidación III [50]. El ion Ga(III) totalmente hidratado (ion hexaacuo) es estable solamente en soluciones ácidas (pH menor a 3). A medida que el pH de la solución aumenta, se produce la formación del trihidróxido de galio por hidrólisis. Cuando el galio se encuentra en concentraciones elevadas (superiores a nanomolar) y en ausencia de agentes estabilizantes, el hidróxido de galio precipita. A pH mayores de 7, el sólido se redisuelve como ion $[\text{Ga}(\text{OH})_4^-]$. A pH fisiológico (pH=7.4) el reparto entre la fracción soluble e insoluble es de 49:1, por lo que se puede obtener el anión en solución sin que exista precipitación del hidróxido de galio [48,49].

Según la teoría de Pearson, el ion Ga(III) en solución acuosa se comporta como un ácido fuerte de Lewis y es capaz de formar complejos de coordinación termodinámicamente estables con bases de Lewis no polarizables y altamente iónicas. Los átomos donadores

de electrones preferidos por este catión son oxígenos de carboxilatos o hidroxamatos, nitrógenos de aminas, fósforos de los fosfonatos. Los complejos formados usualmente poseen número de coordinación de 6 y geometría octaédrica, pero también existen complejos reportados en bibliografía con números de coordinación de 4 y 5 [49].

El Ga(III) comparte características con el ion Fe(III), siendo su química de coordinación muy similar. Este hecho es relevante para el desarrollo de radiofármacos dado que el hierro es un elemento abundante *in vivo* y por ende puede competir con los complejos de galio por el sitio de unión al metal. Además, en el plasma existen variadas proteínas capaces de unirse al hierro, por ejemplo, transferrina, ferritina entre otras. Por esta razón, en la formación de radiofármacos conteniendo el ion Ga(III), es necesario utilizar ligandos que formen complejos cinética y termodinámicamente estables *in vivo* particularmente frente a la hidrólisis a pH fisiológico y a reacciones de transquelación con ligandos biológicos. Las constantes de estabilidad de los complejos Hierro-Transferrina ($\log K_1=22.8$ y $\log K_2=21.5$) son más altas en comparación con las constantes de estabilidad de los complejos de galio con transferrina ($\log K_1=20.3$ y $\log K_2=19.3$). Por lo tanto, los radiotrazadores conteniendo Ga(III) deben mostrar una estabilidad superior en comparación con los complejos de Ga-transferrina o ser cinéticamente inertes para que no ocurra transquelación. Existe el riesgo que el galio se libere del complejo y en la sangre se transforme a hidróxido de galio, esto implica que el radiotrazador ya no llegará al tejido blanco correspondiente, sino que podría resultar en una acumulación *in vivo* de galio en los pulmones y el hígado [10,11,49,51]. Por estos motivos, es necesario utilizar agentes quelantes adecuados para el metal.

Agentes bifuncionales.

Como otros radionucleidos metálicos iónicos, el galio no puede ser incorporado en los trazadores mediante unión covalente, como sucede con el [^{18}F]F o el [^{11}C]C. El desarrollo de la gran mayoría de los radiofármacos de [^{68}Ga]Ga utilizados para Imagenología Molecular están basados en la utilización de agentes quelantes bifuncionales mediante la estrategia *pendant approach*.

Los agentes quelantes adecuados para generar complejos estables *in vivo* con Ga(III) deben ser ligandos polidentados, la gran mayoría son hexadentados aunque también pueden ser tetra o pentadentados. Deben contener átomos de oxígeno y nitrógeno actuando como donadores de electrones. Los agentes bifuncionales utilizados comúnmente para el desarrollo de complejos de galio se pueden clasificar en acíclicos y cíclicos, según estos sean de cadena abierta o cerrada respectivamente. En la siguiente figura (Figura 13) se pueden ver algunos de los agentes bifuncionales utilizados comúnmente en el desarrollo de radiotrazadores de [⁶⁸Ga]Ga. Entre ellos se pueden encontrar: deferoxamina (DFO), ácido N,N'-bis[2-hidroxi-5(carboxietil)benzil]etilenediamino-N,N'-diacético (HBED-CC), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclodecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTA), [ácido 2-(4,7-bis(carboximetil)-1,4,7-triazonan-1-il)pentanodioico] (NODAGA) [7,9,16,18,19].

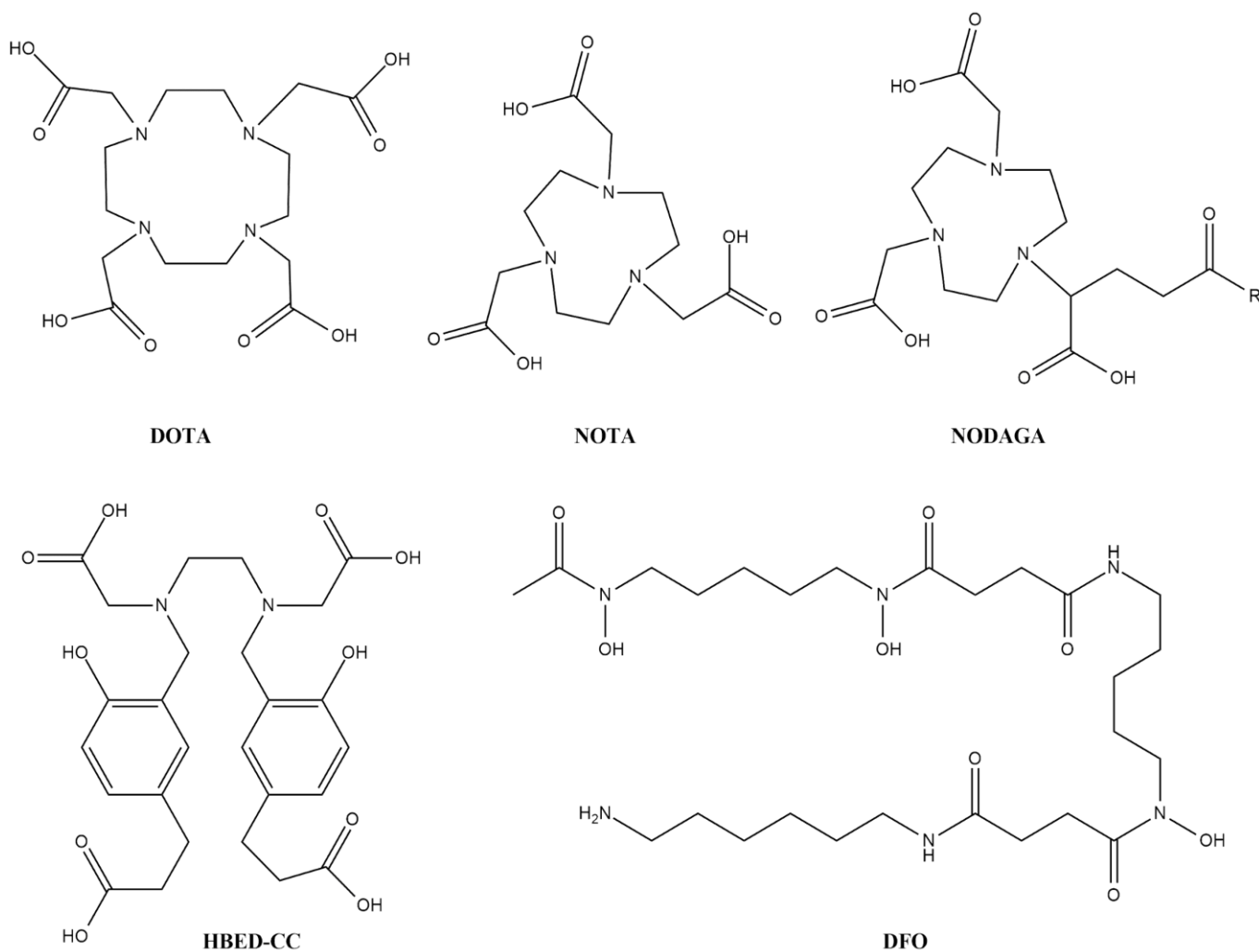


Figura 13: Algunos de los agentes bifuncionales utilizados para el desarrollo de radiofármacos de galio en Radiofarmacia.

Entre los agentes quelantes más utilizados en Radiofarmacia, se encuentran los ABF triaza o tetraaza, muestran una alta selectividad conformacional hacia los iones metálicos. La alta estabilidad termodinámica de los quelatos de Ga(III) con los ligandos triaza cíclicos se debe al buen ajuste del catión en la cavidad del anillo del macrociclo [49]. Esta estabilidad se debe a que el pequeño catión se sitúa o aloja adecuadamente en la cavidad cíclica quedando este aislado de las especies competitivas como por ejemplo la transferrina plasmática. Los más usados para la preparación de complejos de galio, son el DOTA y el NOTA. El DOTA es un agente quelante cíclico tetraaza con un anillo conteniendo cuatro átomos de nitrógeno donadores de electrones y cuatro brazos de ácido carboxílico. Es uno de los agentes quelantes más utilizados dado que forma

complejos muy estables con una amplia gama de metales incluyendo: Ga(III), In(III), Lu(III), Cu(II). El DOTA fue diseñado para metales con mayor radio iónico y mayor número de coordinación que el galio. Por este motivo, la constante de formación del complejo Ga-DOTA ($\log K_{ML} = 21.3$) es menor respecto a otros de los agentes quelantes disponibles reflejando que no es el más adecuado. Estudios estructurales demuestran que el agente bifuncional coordina al metal mediante los cuatro átomos de nitrógeno y dos de oxígeno pertenecientes al carboxilo [7]. Es un agente quelante rápido y eficiente, las marcaciones requieren temperaturas de 95°C y al menos 5 minutos de incubación. Se han desarrollado una diversidad de agentes bifuncionales derivados del DOTA para posterior conjugación con los vectores biológicos (DOTA-tris(t-Bu)éster, DOTA-NHS) [16,18,52,53].

El NOTA es otro agente quelante de la familia de los macrociclos, que contiene un anillo de nueve miembros conteniendo tres aminas y tres ácidos carboxílicos como grupos donadores de electrones. En este caso la coordinación del metal involucra tres átomos de nitrógeno y tres de oxígeno. La cavidad presente en este quelante posee tamaño adecuado para el metal, generando complejos de número de coordinación 6 y geometría octaédrica. Esto se ve reflejado en la constante de formación del complejo Ga-NOTA ($K_{ML} 30.98$), que es más elevada respecto a la del Ga-DOTA [7,53]. Por este motivo, las marcaciones se pueden llevar a cabo a temperatura ambiente con entre 15 y 50 minutos de incubación, aunque también se han utilizado en algunos protocolos de marcación temperaturas más elevadas, por ejemplo 95°C. Además, se han desarrollado derivados de NOTA conteniendo otros grupos para conjugarse con biomoléculas dejando todos los ácidos carboxílicos disponibles para coordinar al galio. un ejemplo es el NODAGA que posee un grupo amida capaz de unirse a biomoléculas [7].

2. OBJETIVO

En esta tesis se propone realizar la síntesis y evaluación de complejos metálicos con potencial aplicación en Medicina Nuclear para las enfermedades oncológicas más prevalentes en Uruguay y el mundo, el cáncer de mama y el de próstata.

Se plantea trabajar con un péptido corto derivado del neuropéptido Y (NPY) con afinidad a NPYr1 para el desarrollo de radiotrazadores para diagnóstico de cáncer de mama utilizando el [^{99m}Tc]Tc y el [⁶⁸Ga]Ga como radionucleidos. Para contribuir al diagnóstico y seguimiento de cáncer de próstata, el farmacóforo seleccionado para el desarrollo de complejos de [^{99m}Tc]Tc es la flutamida antagonista del receptor de andrógenos.

Se estudian varias de las etapas de desarrollo de un radiofármaco, abarcando desde el diseño de los ligandos, síntesis de los complejos hasta el estudio de las propiedades fisicoquímicas y evaluación biológica de los mismos.

3. DESARROLLO DE LOS COMPLEJOS RADIOMETÁLICOS PARA CÁNCER DE MAMA

3.1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama se define como todo crecimiento descontrolado de células presentes en el tejido mamario. Usualmente se origina en células del epitelio de los conductos galactóforos o en las células presentes en los lóbulos del tejido glandular de los senos. Al comienzo de la enfermedad, el cáncer está confinado a una zona específica, generando muy pocos síntomas en la paciente. Sin embargo, al progresar el tumor puede comenzar la aparición de varios síntomas, dado que éste puede invadir tejido mamario circundante, ganglios linfáticos cercanos u otros órganos del cuerpo, concluyendo en una metástasis diseminada [2].

Mundialmente se estima que en 2020 existieron más de 2.3 millones de casos y 685.000 mujeres murieron a causa de esta enfermedad. En Uruguay según datos del Registro Nacional del Cáncer de la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, se diagnostican en promedio unos 2000 nuevos casos por año, por lo tanto, 5 mujeres uruguayas son diagnosticadas de cáncer de mama por día. Es la neoplasia más común en mujeres con una incidencia de 75 mujeres cada 100.000 según datos de 2014-2018 [54]. Cada año mueren más de 700 mujeres por esta causa, convirtiéndola en la neoplasia con mayor mortalidad en mujeres, con dos mujeres fallecidas por cáncer de mama por día [3,54]. La mayoría de los casos suelen darse en mujeres postmenopáusicas, ya que al igual que sucede con otros tipos de cáncer, la probabilidad de desarrollar cáncer de mama aumenta con la edad, y el 77% de los casos se presentan en mujeres mayores de 50 años. En Uruguay aproximadamente un 6% de los casos se presenta en mujeres menores de 40 años y un 1% en hombres. Los factores que aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama pueden ser modificables o no modificables. Los factores no modificables son: el sexo, edad, antecedentes personales y familiares de cáncer de mama y susceptibilidad genética. Entre los factores modificables se encuentran aquellos relacionados al comportamiento y estilo de vida, sobrepeso y obesidad en la postmenopausia, sedentarismo y consumo de bebidas alcohólicas [2,6].

La detección temprana del cáncer de mama incluye el tamizaje y diagnóstico precoz de

la enfermedad. El tamizaje consiste en aplicar una prueba simple, la mamografía, a mujeres asintomáticas para la detección de lesiones precancerosas o en una fase temprana de la enfermedad. La mamografía es un estudio de elevada sensibilidad, en el cual se obtiene una imagen mediante rayos X que permite detectar la enfermedad antes de que sea palpable en un examen físico. En Uruguay, esta prueba está indicada en todas las mujeres asintomáticas entre 50 y 69 años cada 2 años. El diagnóstico precoz consiste en hacer diagnóstico de la enfermedad al inicio de los primeros síntomas, como, por ejemplo: RM, TC o biopsia.

El tratamiento puede ser eficaz cuando se detecta de forma temprana, ya que el grado de extensión de la enfermedad al momento del diagnóstico influye significativamente en la supervivencia. Desde 1980 se han realizado importantes avances en el tratamiento, y en países de ingresos elevados fue posible reducir las muertes de mujeres a causa de esta enfermedad en un 40%. En cambio, en países de bajos y medianos ingresos estas mejoras en las cifras no se han logrado. El tratamiento se basa en muchos factores, que incluyen el tipo de cáncer, estadio y perfil bioquímico del tumor. Por esta razón, las estrategias para mejorar los resultados relativos al cáncer de mama dependen del fortalecimiento y desarrollo de nuevas técnicas que mejoren los procedimientos diagnósticos actuales en función de la biología tumoral.

Los avances científicos llevados a cabo en los últimos años han derivado en el descubrimiento de perfil morfológico, inmunohistoquímico y genético de los tumores, resultando en que los biomarcadores más relevantes en cáncer de mama son el receptor de estradiol (RE), receptor de progesterona (RP), índice de proliferación celular Ki-67 y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Dichos marcadores permiten la caracterización molecular del tumor y su correcta estadificación, siendo esto crítico para el manejo terapéutico del cáncer de mama.

La Medicina Nuclear permite obtener un alto grado de personalización del diagnóstico y permite explorar la presencia de distintos biomarcadores tumorales al utilizar distintos radiofármacos. Además, comparado con otras modalidades diagnósticas (TC, RM, mamografía) la Medicina Nuclear provee información beneficiosa sobre la morfología, estructura, función, perfusión y densidad de receptores [55]. Se han utilizado varios

radiofármacos para la detección del cáncer de mama, entre ellos se encuentran: [^{18}F]F-FDG, [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-sestamibi, [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-Tetrofosmin, o el [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-MDP.

La [^{18}F]-2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa ([^{18}F]F-FDG) es el radiofármaco PET más utilizado en Oncología y a la fecha ha sido el radiofármaco más utilizado para diagnóstico de cáncer de mama (Figura 14) [56].

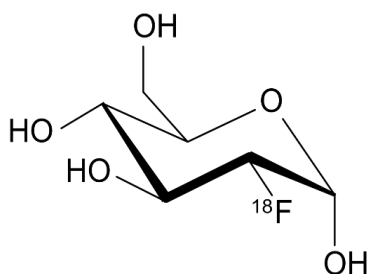


Figura 14: Estructura de la [^{18}F]F-FDG.

Este radiofármaco durante varios años fue utilizado especialmente en la identificación de metástasis en cáncer de mama. La evidencia actual ha demostrado que posee limitaciones como falsos negativos ya sea por las características moleculares o histológicas o falsos positivos por falta especificidad del radiofármaco [57–60]. Este mismo problema se produjo con los demás radiofármacos ([$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-sestamibi, [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-Tetrofosmin o [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-MDP). Por este motivo se continúan los esfuerzos para desarrollar nuevos radiotrazadores capaces de superar las limitaciones de los métodos disponibles, obteniendo las características *in vivo* que son cruciales para el tratamiento personalizado y oportuno del cáncer de mama [55]. Por lo tanto, se han investigado otros blancos moleculares para el desarrollo de radiofármacos específicos para esta enfermedad. En la siguiente imagen (Ilustración 5) se resumen algunos de los blancos moleculares que se han estudiado a lo largo de los años.

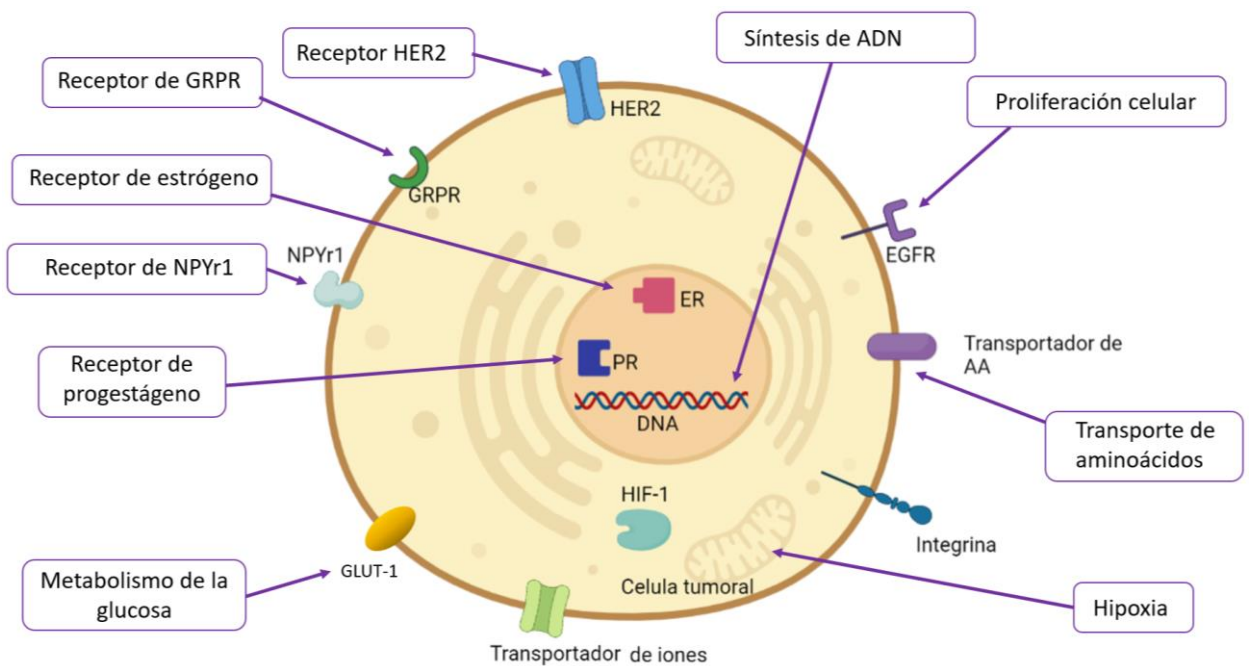


Ilustración 5: Blancos moleculares para el desarrollo de diversos radiofármacos.

Otros potenciales blancos moleculares muy interesantes para el desarrollo de radiofármacos son los receptores celulares. Los receptores son moléculas proteicas que participan en el proceso de comunicación de las células con el exterior, a través de moléculas de señalización por reconocimiento, denominadas ligando. La unión del ligando al receptor genera un cambio conformacional, que se traduce en un mensaje o señalización. Existen algunos receptores que han sido ampliamente estudiados como blancos para Imagenología Molecular en cáncer de mama como ser: receptores de estradiol, de progesterona, receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptores de los péptidos liberadores de gastrina (GRPR), entre otros [61,62].

El receptor de estradiol, descubierto hace más de 60 años, es uno de los más estudiados. Pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares. La expresión de los receptores de estradiol en el tumor de mama es esencial no solo para una correcta caracterización anatómica y patológica de la enfermedad sino también para una posterior elección de la terapia [60,63]. Los tumores que expresan receptores de estrógenos o progestágenos usualmente poseen menor agresividad y mejor prognosis que los tumores que no los

expresan [64]. Sin embargo, no siempre es fácil identificar la presencia de receptores, especialmente en las lesiones secundarias mediante métodos disponibles como la biopsia.

El 16α - ^{18}F -fluoro- 17β -estradiol (^{18}F -FES) ha ganado importancia en el correr de los años dado que permite determinar la presencia de estos receptores *in vivo*, tanto en el tumor primario como en las metástasis (Figura 18). Es un análogo del estradiol, aprobado por la Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos (FDA) en el año 2020. Es útil especialmente en la determinación del grado de respuesta a la terapia antihormonal en pacientes con enfermedad metastásica [65], brindando un método racional para la elección de la terapia. La mayor desventaja de este radiofármaco es su elevada captación del hígado, lo cual puede dificultar la detección de metástasis en ese órgano. Además, posee rápida eliminación en sangre que puede llevar a una baja captación tumoral. También, se han desarrollado otros derivados del estradiol intentando superar estas desventajas, como por ejemplo: 4-fluoro- 11β -metoxi- 16α - ^{18}F -fluoroestradiol (4FM- ^{18}F -FES) y el 1-(2-(2-(2- ^{18}F -fluoroetoxi)etoxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-estradiol (^{18}F -FETE) (Figura 15), sin embargo todavía se encuentran en etapa de estudio [60,66,67].

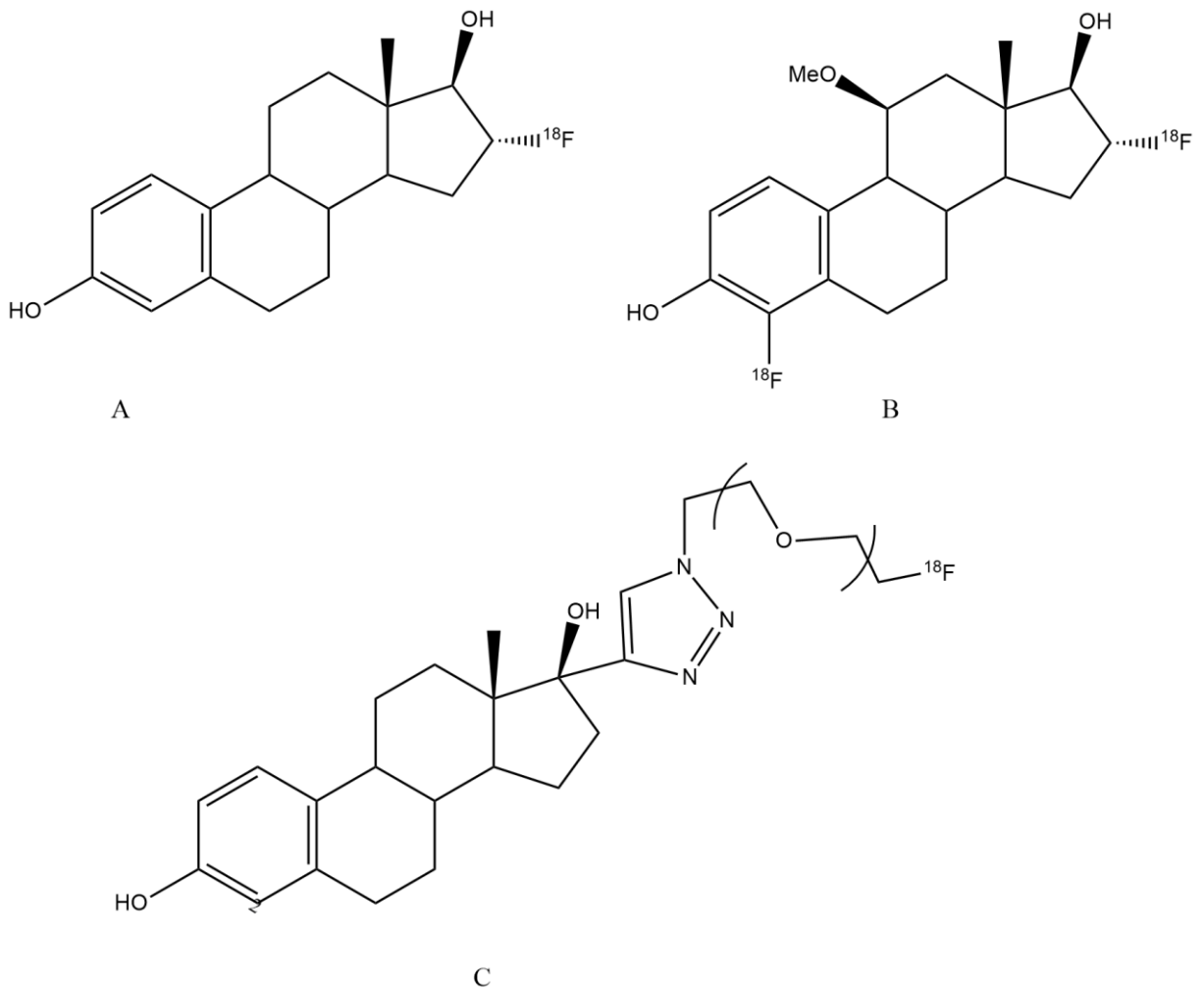


Figura 15: Radiotrazadores $[^{18}\text{F}]\text{F-FES}$ (A), $4\text{FM}-[^{18}\text{F}]\text{F-FES}$ (B) y el $[^{18}\text{F}]\text{F-FETE}$ (C).

Se ha observado que el 50% de los pacientes que poseen sobreexpresión de receptores de estrógenos (RE) tienen además sobreexpresión de los receptores de progesterona (RP). La presencia de éstos también provee información predictiva y pronóstica de la enfermedad, ya que indica al igual que los receptores de estrógenos la posible respuesta a la terapia endocrina [68,69]. Existe una asociación entre los RE y los RP, observándose que la expresión del RE incrementa la expresión de los RP. Los casos en los cuales el RP está presente pero no se encuentra expresado el RE representan menos del 1% de los casos [70]. En consecuencia, resulta ventajoso detectar la presencia de los RP ya que su detección evidencia la presencia de los RE. Esto resulta sumamente útil, especialmente cuando los RE están saturados por la terapia antiestrogénica [71]. La 21-Fluoro-16 α -etil-

19-norprogesterona ($[^{18}\text{F}]\text{F-FENP}$) fue el primer radiotrazador desarrollado con elevada afinidad por dichos receptores [72]. Los estudios realizados demostraron solo que un 50% de los tumores fueron detectables. Como desventaja se observó que el radiofármaco posee elevada lipofilidad y perfil de biodistribución con alta captación en tejido adiposo e hígado. También, se observó liberación del flúor del radiofármaco y por ende captación en los huesos [73,74]. Se han desarrollado otros radiotrazadores, como el 21- $[^{18}\text{F}]\text{-fluoro-16}\alpha,17\alpha\text{-}[(\text{R})\text{-}(1'\text{-}\alpha\text{-furilmetilidene)dioxi]\text{-19-norpregn-4-ene-3,20-diona}$ ($[^{18}\text{F}]\text{F-FFNP}$), que presentó mejores resultados de captación (Figura 16), y en 2021 comenzó a realizarse estudios en fase 2 con buenos resultados preliminares [75,76].

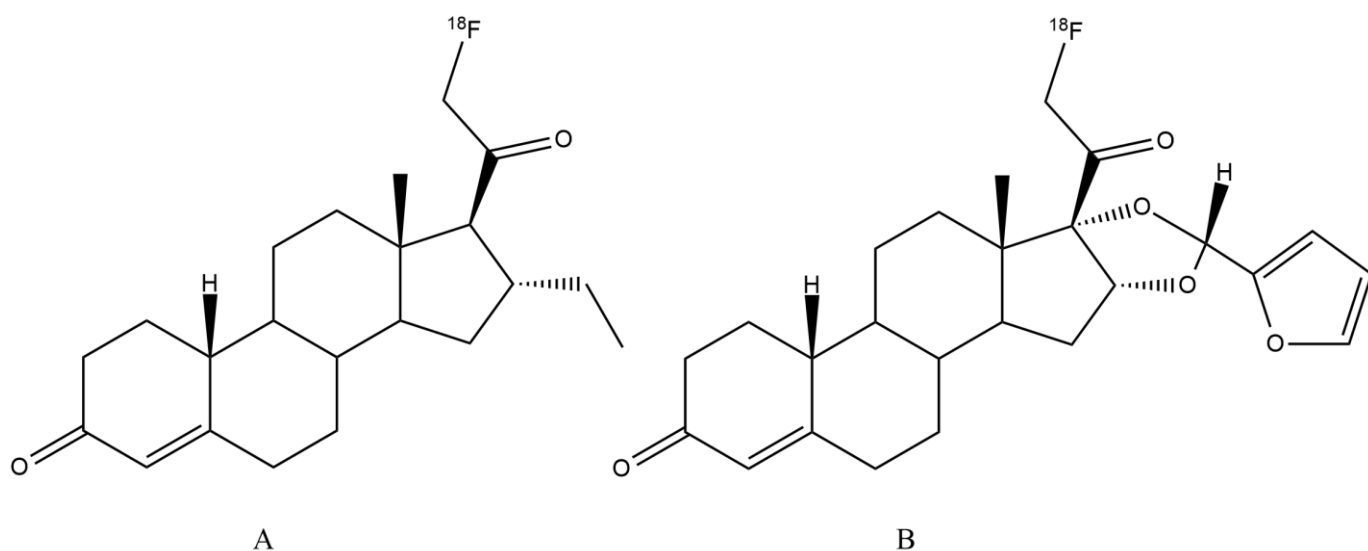


Figura 16: Estructuras de: $[^{18}\text{F}]\text{F-FENP}$ (A) y el $[^{18}\text{F}]\text{F-FFNP}$ (B).

HER2 es un miembro de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), de la familia de las tirosin-quinasas. Este receptor está involucrado en una amplia gama de procesos como proliferación, diferenciación, maduración, angiogénesis, invasión y funciones anti apoptóticas [77]. Los tumores de mama HER2 positivos son más agresivos. El radiotrazador más utilizado para detectar dichos receptores es el $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Trastuzumab}$. El Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal que se une al dominio extracelular de HER2. El radiofármaco es capaz de detectar lesiones primarias y secundarias de cáncer de mama. Es de utilidad para los clínicos para la toma de

decisiones cuando no se puede realizar una biopsia [78–80]. La desventaja es que el blanco molecular no está expresado en todos los casos de tumores de mama. Estos receptores se encuentran sobreexpresados sólo en el 20% de los casos de cáncer de mama. Además, la expresión de estos receptores puede variar durante el tratamiento del paciente [81–83]. Por estos motivos, no es posible utilizar el radiotrazador universalmente para el diagnóstico de esta patología. Se desarrollaron otros radiotrazadores para este blanco molecular, como el: $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTA-trastuzumab}$ y el $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-ABY-002}$. Los problemas que enfrentan es la alta captación en tejido normal, en hígado y riñones. Por esta razón su utilización es limitada [60,84].

Existen otros radiotrazadores que se han utilizado para en la detección de cáncer de mama enfocándose en otros blancos moleculares, entre ellos: anexina V [85,86], caspasas, integrinas, ligando 1 de muerte celular programada, linfocitos infiltrados en tumores, fibroblastos asociados a cáncer [60]. En la siguiente tabla (Tabla 2) se pueden observar algunos ejemplos de radiofármacos estudiados y utilizados para diagnóstico de cáncer de mama.

Tabla 2: Ejemplos de radiotrazadores utilizados en investigación o clínica para cáncer de mama.

Blanco	Radiofármaco
Metabolismo de la glucosa	$[^{18}\text{F}]\text{F-FDG}$
Receptor de estrógeno	$[^{18}\text{F}]\text{F-FES}$, $[^{18}\text{F}]\text{F-Fluorotamoxifeno}$, $4\text{FM-}[^{18}\text{F}]\text{F-FES}$, $[^{18}\text{F}]\text{F-FETE}$
Receptor de progesterona	$[^{18}\text{F}]\text{F-FENP}$
HER2	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Trastuzumab}$, $[^{111}\text{In}]\text{In-Trastuzumab}$
EGFR	$[^{11}\text{C}]\text{C-PD153035}$
Integrinas	$[^{18}\text{F}]\text{F-galacto-RGD}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-TRAP (RGD)3}$, $[^{18}\text{F}]\text{F-Galacto-RGD}$.

3.1.1. Desarrollo de otros potenciales radiofármacos para imagenología del receptor de Neuropéptido Y tipo 1.

De acuerdo con la bibliografía, existe otro blanco molecular interesante para el desarrollo de radiofármacos para diagnóstico de cáncer de mama: los receptores de Neuropéptido Y. Estos receptores han sido relacionados a distintas neoplasias, principalmente tumores endocrinos, epiteliales y embrionarios [87,88], expresándose en tumores de ovario, tumores productores de catecolaminas, carcinoma de riñón, entre otros. En cáncer de mama se da una situación especial porque la expresión de los receptores de NPY es extremadamente alta en comparación con el resto de los tipos de cáncer, por ejemplo, carcinomas de células renales o de ovario, en los cuales la expresión de los receptores es más baja [89]. En el cuerpo humano existen 4 tipos de receptores de NPY, tipo Y1 (NPYr1), Y2 (NPYr2), Y4 (NPYr4), Y5 (NPYr5). En tejido mamario normal, se expresa receptor de tipo 2 [89–91]. En la siguiente tabla se pueden observar los subtipos de receptores y densidad de los receptores de NPY presentes en diversos tejidos (Tabla 3).

Tabla 3: Subtipo y densidad de los receptores de NPY en tejidos [93,96].

Tejido	Subtipo de receptor en tejido normal	Densidad de los receptores	Subtipo de receptor en tumores	Densidad de receptores
Mama	NPYr2	Alta	NPYr 1	Alta
Ovario	NPYr 1 + NPYr 2	Moderado	NPYr 1 + NPYr 2	Moderado
Glándulas Adrenales	NPYr 1	Alto	NPYr 1	Alto
Glía	NPYr 1 + NPYr 2	Alto	NPYr 2	Alto
Riñón	NPYr 1	Moderado	NPYr 1	Moderado
Testículo	NPYr 1 + NPYr 2	Alto	NPYr 1 + NPYr 2	Bajo

En tejido neoplásico mamario y lesiones metastásicas derivadas se evidenció que las células sobreexpresan receptor de NPY tipo 1, o sea de existir una expresión mayor del receptor se observó que el tipo de receptor expresado cambia de tipo NPYr2 a NPYr1. Además de la presencia de los receptores en las células tumorales se observó que los vasos sanguíneos intra y peritumorales también expresan NPYr1. Los receptores de NPY vasculares se expresan en la capa muscular de la pared vascular en alta densidad y son NPYr1 [89]. Estas características convierten a dicho receptor en un excelente blanco para detectar células neoplásicas de cáncer de mama y por este motivo fue elegido para el desarrollo de este trabajo de tesis. El NPYr1 tiene como ligando el NPY, un péptido de 36 aminoácidos de la familia del Polipéptido Pancreático. Es el neurotransmisor más abundante en el cerebro, en el cual se desempeña como modulador del sistema nervioso central y periférico [92]. También actúa como vasoconstrictor y modula la actividad de otros neurotransmisores [87,89,93]. Por lo tanto, es posible desarrollar análogos de NPY selectivos por el receptor tipo 1 como potenciales agentes de diagnóstico tumoral. Existen reportes sobre el desarrollo de agonistas largos de NPY marcados, un ejemplo es el [¹¹¹In]In-DOTA-NPY, en el cual un análogo del NPY se encuentra unido al agente bifuncional DOTA y marcado con indio. El análogo utilizado, [Phe7, Pro34]NPY, cuenta con todos los aminoácidos de la secuencia nativa del NPY con excepción de los aminoácidos en posición 7 y 34 que fueron modificados por una fenilalanina y una prolina para modular la afinidad de unión a los receptores de NPY, aumentando la afinidad por NPYr1 y disminuyendo para NPYr2. Estudios realizados en animales portadores del tumor con células MCF-7 obtuvieron buenos resultados [94–96]. Sin embargo, los péptidos largos poseen una farmacocinética lenta y pueden generar respuesta inmunológica no deseada además de ser caros de sintetizar. Por consiguiente, es conveniente trabajar con péptidos cortos, porque tienen varias ventajas frente a los péptidos largos. Entre ellas se encuentra: que son moléculas de bajo peso molecular, poseen muy baja inmunogenicidad y una farmacocinética favorable. Si se elige un péptido con una elevada afinidad y especificidad por su correspondiente blanco molecular, se puede obtener como resultado un radiotrazador con excelente acumulación en los tejidos blanco y rápida depuración de tejidos no blanco, permitiendo así la posterior toma de imágenes diagnósticas. Otra ventaja importante de los péptidos cortos es que los mismos pueden ser producidos a medida

mediante síntesis en fase sólida. Durante la misma además se puede insertar un agente quelante adecuado y/o espaciador. Una desventaja de los péptidos cortos es su corta vida media biológica, debido a que sufren degradación mediante peptidasas y proteasas endógenas. Sin embargo, existen diferentes estrategias para elevar la estabilidad de los péptidos como, por ejemplo, el agregado de grupos metilo en posiciones terminales del péptido, sustitución de uniones peptídicas, reemplazo de aminoácidos L por aminoácidos D o aminoácidos sintéticos o pseudoaminoácidos, o reemplazo de grupos amino de los aminoácidos por grupos imino [97].

Zwanziger y colaboradores diseñaron 19 péptidos cortos de nueve aminoácidos cada uno derivados del extremo carboxilo terminal del NPY nativo (posición 28 al 36) porque es donde se encuentran los aminoácidos responsables de la unión con el receptor NPYr1. Además, estudiaron la selectividad de unión de dichos péptidos a los distintos tipos de receptores de NPY, la estabilidad metabólica *in vitro*, la capacidad de internalización y activación del receptor. Mantuvieron constantes dos residuos de arginina presentes en las posiciones 33 y 35 de la secuencia aminoacídica del NPY endógeno, esenciales en la unión con el receptor. Los aminoácidos en posiciones 28 y 32 se modificaron por aminoácidos proteinogénicos y no proteinogénicos. También se cambió el aminoácido 34 por un aminoácido no polar y alifático como leucina o norvalina. Como resultado de este estudio se obtuvo un candidato con elevada afinidad por el receptor de NPY tipo 1. El mismo es un péptido de nueve aminoácidos conteniendo la siguiente secuencia: H-Tyr-Arg-Leu-Arg-BPA-Nle-Pro-Asn-Ile-OH [87]. Dadas sus características promisorias, este péptido fue el seleccionado para trabajar durante el desarrollo de esta tesis.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Diseño de tres ligandos derivados del NPY conteniendo grupos quelantes adecuados para coordinación con el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ y el $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$.**

Preparación de tres radiotrazadores utilizando un péptido corto de NPY (H-Tyr-Arg-Leu-Arg-BPA-Nle-Pro-Asn-Ile-OH) conteniendo átomos donadores de electrones adecuados para coordinar al $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ y al $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$.

La estrategia de marcación con tecnecio implica la formación de un complejo $\text{M}\equiv\text{N}(\text{V})$ 3+1 ($\text{M}=\text{}^{99m}\text{Tc}$), mediante la sustitución de un precursor nitrado con el derivado del NPY y la tris-(2-cianoetil)fosfina como ligando monodentado.

En el caso de los radiotrazadores de galio, se trabaja con la secuencia de NPY seleccionada unida al agente bifuncional NOTA a través de una molécula de lisina como espaciador. En este trabajo se estudia si la presencia de una modificación en el espaciador influye en las propiedades más relevantes del trazador.

- **Síntesis de tres complejos radiometálicos derivados del NPY.**

Optimización de la síntesis de los tres complejos metálicos mediante ajuste de las cantidades de ligando, precursor radiactivo, tiempos y temperaturas de incubación. Se utilizan métodos cromatográficos como cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa (RP-HPLC) para resolver, identificar y cuantificar las distintas especies formadas.

- **Caracterización fisicoquímica de los complejos derivados de NPY.**

Evaluación del comportamiento fisicoquímico de los complejos preparados, mediante la

determinación de la estabilidad en el medio de reacción, en plasma humano, lipofilicidad, unión a proteínas plasmáticas y estabilidad frente a agentes competitivos (complejos de Tc: cisteína, complejo de Ga: DTPA).

- **Caracterización biológica *in vitro* de los complejos derivados de NPY.**

Estudio del comportamiento de los complejos sintetizados utilizando células portadoras de receptores de NPY, derivadas de adenocarcinoma mamario humano mediante la evaluación de la capacidad de unión, de internalización, de externalización de los complejos desde las células y de estudios de afinidad de unión competitiva.

- **Caracterización biológica *in vivo* de los complejos derivados de NPY.**

Evaluación del comportamiento de los complejos en animales normales determinando el comportamiento farmacocinético, vías de eliminación y órganos de acumulación. Realización de estudios de biodistribución en un modelo animal portador de tumores inducidos con células MCF-7, determinando el porcentaje de captación de tejido tumoral *versus* el tejido normal (sangre y músculo).

3.3. PARTE EXPERIMENTAL

El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio del Área Radioquímica de Facultad de Química, en el laboratorio del Área Inmunología de Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay y en los laboratorios del Área Química y Biomédico de CUDIM, Montevideo, Uruguay.

3.3.1. Materiales.

Se utilizaron reactivos comerciales (Sigma-Aldrich, Merck, Carlo Erba, Dorwill) de calidad analítica y solventes orgánicos grado HPLC para la síntesis y control de calidad sin posterior purificación. Las soluciones acuosas se prepararon con agua destilada, se filtraron a través de membranas Milipore 0.22 μm , y se desgasificaron en baño de ultrasonido. El $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ empleado en las reacciones de síntesis de los complejos fue eluído de generadores $[\text{}^{99}\text{Mo}]\text{Mo}/[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}$ Tecnonuclear (Argentina), gentilmente donado por el Centro de Medicina Nuclear del Hospital de Clínicas. El $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ empleado en las reacciones de síntesis de los complejos fue eluído de generadores $[\text{}^{68}\text{Ge}]\text{Ge}/[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ - Eckert & Ziegler IGG100 (Alemania), empleando HCl 0.1 M como eluyente, gentilmente donado por el CUDIM.

Para las determinaciones de actividad se emplearon una cámara de ionización CAPINTEC CRC5 y una cámara de ionización CAPINTEC CRC-55t. También se utilizaron detectores de centelleo sólido conteniendo cristal de NaI(Tl) de 2x2 pulgadas, de pozo acoplado a tarjeta multicanal ORTEC y otro con cristal de 3x3 pulgadas, plano, acoplado a un sistema analizador monocanal ORTEC.

Se realizó el control de calidad de las reacciones de síntesis de los complejos mediante cromatografía de capa fina (TLC), utilizando papel Whatman 1 como fase estacionaria o sílica gel impregnada en fibra de vidrio (ITLC™ SG). El control mediante cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa fue realizado utilizando cromatógrafo líquido Shimadzu LC- 10 AS, acoplado a un detector γ PARKEN o un cromatógrafo Shimadzu-UFLC con detectores de arreglo de diodos y gamma en serie. Se utilizaron columnas:

Waters (300 x 3.9 mm, C18, 10 μm , 125 \AA) o Waters DeltaPak (150 x 3.9 mm, C18, 5 μm , 300 \AA).

Los ligandos empleados en la síntesis de los complejos fueron adquiridos en la empresa SIQUIMIA, con pureza mayor a 95%, analizada mediante HPLC de fase reversa (RP-HPLC) y espectrometría de masas (MS). Los péptidos poseen las siguientes secuencias:

- L1: MA-Cys-Tyr-Arg-Leu-Arg-BPA-Nle-Pro-Asn-Ile-OH
- L2: H-Lys(NOTA)-Tyr-Arg-Leu-Arg-BPA-Nle-Pro-Asn-Ile-OH
- L3: Ac-Lys(NOTA)-Tyr-Arg-Leu-Arg-BPA-Nle-Pro-Asn-Ile-OH

Siendo: MA: ácido mercaptoacético, BPA: L-4-benzoilfenilalanina y Ac:CH₃CO. Se utilizó tris(2-cianoetil)fosfina, este reactivo fue sintetizado y donado por el Dr. Adriano Duatti, Universidad de Ferrara, Italia

Para los estudios *in vitro* se utilizaron: una centrífuga refrigerada TLG-16 o una centrífuga Hettich EBA III, un baño de agua Selecta® Precistern, un vortex G-560E (Scientific Industries). Para la determinación de la unión a proteínas plasmáticas se emplearon columnas para cromatografía de exclusión molecular MicroSpin™ G-50 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra).

Para los estudios biológicos *in vitro* se utilizó la línea celular de cáncer de mama MCF-7, adquirida en American Type Culture Collection Cell (ATCC® HTB-22™). Para el mantenimiento de las células en cultivo se utilizaron los medios DMEM (DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium, A1316,9050 PanReac AppliChem, Reactivos ITW), suero fetal bovino (Capricorn Scientific), penicilina G y sulfato de estreptomicina (Sigma-Aldrich), buffer fosfato salino (Sigma-Aldrich), bicarbonato de sodio (ICN Biomedicals, Ohio, EEUU.), tripsina (Sigma Aldrich) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, AMRESCO®). El material plástico para cultivo fue de Greiner Bio-one Cellstar (Greiner). Para la manipulación de las células se trabajó en un flujo laminar NuAire tipo A/B3, para su incubación se empleó una estufa ESCO® CCL-170B-8 y además se utilizó una centrífuga refrigerada Thermo Scientific Sorvall ST16.

3.3.2. Métodos.

3.3.2.1. Síntesis del precursor [^{99m}Tc]Tc(V)≡ Nitrido.

Se añadió dihidracina succínica (SDH = H₂NNHCOCH₂CH₂CONH₂) (1 mg) disuelta en NaCl 0.9% (0.5 mL), solución de SnCl₂ (0.1 mL, 1 mg/mL en agua) y pertecneciato de sodio ([^{99m}Tc] NaTcO₄) (1.35-50 mCi en 0.5-1 mL). Se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. La pureza radioquímica se controló por cromatografía en papel Whatman N°1 utilizando acetona como fase móvil (Rf [[^{99m}Tc]Tc(V)nitrido]: 0, Rf Na[^{99m}Tc]TcO₄: 1).

3.3.2.2. Síntesis del complejo NPTc1.

Se adicionaron L1 (0.1 mL, 1mg/mL), tris(2-cianoetil)fosfina (0.5 mg) y hidroxipropil γ -ciclodextrina (2 mg) disueltos en NaCl 0.9% (0.5 mL) y precursor nitrido (0.25-1.0 mL; 1-15 mCi). Se incubó a 80°C durante 60 minutos. La pureza radioquímica se evaluó por HPLC fase reversa, utilizando una columna Waters C18 de 30 cm a flujo de 1 mL/min. Las fases móviles utilizadas fueron: TFA 0.1% en agua (A) y TFA 0,1% en acetonitrilo (B) según el siguiente gradiente: 0-3 min 100 %A, 3 a 22 minutos 0% de A y de 22 a 24 min 100% de A. Se utilizó una columna Waters 10 μ m C18 de 30 cm, a flujo de 1.0 mL/min. Los solventes empleados fueron Ácido trifluoroacético 0.1% en agua (A) y Ácido trifluoroacético 0.1% en acetonitrilo (B) según el siguiente gradiente: de 0-3 min 100% de A, de 3-22 min 0% de A y de 22 a 24 min 100% A.

3.3.2.3. Síntesis del complejo NPGa1 y NPGa2.

Se agregó una solución (50 μ L, 1 mg/mL) de L2 o L3 disueltos en NaCl 0.9%, acetato de sodio 1.14 M (250 μ L) y [⁶⁸Ga]GaCl₃ (100 μ L, 1.5-2.5 mCi). Se controló el pH y este debe ser de 4.5. Se incubó a 90°C durante 10 minutos. La pureza radioquímica se evaluó por RP-HPLC y cromatografía en capa fina. Se utilizó una columna Waters DeltaPak 5 μ m C18

de 15 cm a un flujo de 1 mL/min. Los solventes empleados fueron Ácido trifluoroacético 0.1 % en agua (A) y Ácido trifluoroacético 0.1% en acetonitrilo (B) según el siguiente gradiente: 0-3 min 95 % A; 3-5 min de 95 a 5 % de A; 5-24 min 5 % A. Complementariamente se controló la pureza radioquímica mediante cromatografía en capa fina utilizando como fase estacionaria sílica gel impregnada en fibra de vidrio (ITLC™ SG) y como fase móvil una mezcla de acetato de amonio 0.15 M y metanol (1:1). (Rf Coloide: 0, Rf complejo, GaCl₃: 1).

3.3.2.4. Caracterización fisicoquímica de los complejos obtenidos (NPTc1, NPGa1, NPGa2).

- **Lipofilicidad.**

La lipofilicidad se estudió a pH 7.4 a través de la determinación del coeficiente de partición octanol/buffer fosfato 0.1 M. Para ello se mezcló en un tubo octanol (2 mL) con buffer fosfato (1.9 mL, 0.1 M pH=7.4) y el complejo (100 µL). Se agitó en vortex durante 2 minutos. La mezcla fue centrifugada por 5 minutos a una velocidad de 5000 rpm. Se tomaron 2 muestras de 100 µL de cada fase y se midió la actividad de cada una de ellas en contador de centelleo sólido, este procedimiento se realizó por triplicado. El cálculo del Log P correspondiente se llevó a cabo como figura en la siguiente ecuación (Ecuación 1).

$$\text{Log } P = \log \frac{\text{Actividad neta en octanol}}{\text{Actividad neta en buffer fosfato pH 7.4 (0.1M)}}$$

Ecuación 1: Cálculo de Log P.

- **Estabilidad en el medio de reacción.**

La estabilidad en medio de reacción se evaluó a distintos tiempos post-marcado determinando la variación de la pureza radioquímica mediante RP-HPLC y/o cromatografía de capa fina utilizando las condiciones previamente descritas según el complejo correspondiente. En el caso de NPTc1 se evaluó la estabilidad a las 0.5, 1,2,4, y 6 horas. En el caso de los complejos de galio, se evaluó a las 0.5, 1,2,3 y 4 horas.

- **Estabilidad frente a plasma.**

Se incubaron el complejo (100 µL) en de plasma humano (900 µL) a 37° C, se retiraron muestras de 200 µL a distintos tiempos. Una vez extraída la muestra, se precipitaron las proteínas con etanol absoluto (200 µL) frío (-15° C), se agitó en vórtex y se incubó a -15° C durante 5 minutos. Se centrifugó la muestra a 15000 rpm durante 5 minutos a 0 ° C y se controló la pureza radioquímica del sobrenadante mediante RP-HPLC utilizando las condiciones descritas anteriormente para cada caso. En el caso del complejo de tecnecio, se evaluó a las 0.5, 1, 2 y 4 horas. En el caso de los complejos de galio, se evaluó a las 0.5, 1, 1.5, 2 horas.

- **Unión a proteínas plasmáticas.**

En un baño de agua a 37°C se incubó un blanco (475 µL de agua destilada + 25 µL del complejo) y una muestra (475 µL de plasma + 25 µL del complejo en estudio) durante 30 y 60 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron muestras (25 µL) del complejo o el blanco según corresponda y se sembraron en una columna MicroSpin G50 y se centrifugó (1 minuto a 4000 rpm). Se midió la actividad libre y retenida en la columna en un contador de centelleo sólido. El ensayo se realizó por triplicado. La unión a proteínas plasmáticas (UPP) tanto del blanco o de la muestra se calculó con la siguiente ecuación (Ecuación 3):

$$UPP = \frac{\textit{Actividad en fase móvil}}{\textit{Actividad en fase móvil} + \textit{Actuvudad en fase estacionaria}} \times 100$$

Ecuación 2: Cálculo de UPP

$$UPP \textit{ del trazador (\%)} = UPP \textit{ de la muestra} - UPP \textit{ del blanco}$$

Ecuación 3: Cálculo de UPP del trazador

- **Estabilidad frente a agentes competitivos.**

Se colocaron el complejo (100 μ L) en estudio con una solución de agente competidor (900 μ L) en exceso. Esta solución se incubó a 37°C y se retiraron muestras de 200 μ L a distintos tiempos y se evaluó la variación de la pureza radioquímica mediante RP-HPLC y cromatografía de capa fina (solo en el caso de los complejos de [⁶⁸Ga]Ga). En el caso del complejo de [^{99m}Tc]Tc se utilizó una solución de cisteína (4.2 x10⁻³ M). Para los complejos de [⁶⁸Ga]Ga se utilizó una solución de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) (7.3 x10⁻³ M). En el caso del complejo de tecnecio, se evaluó la pureza radioquímica a los 0.5, 1, 2 y 4 horas. En el caso de los complejos de galio, se evaluó la pureza radioquímica (PRQ) a los 0.5, 1, 1.5,2 horas.

3.3.2.5. Evaluación biológica *in vitro* de los complejos NPTc1, NPGa1 y NPGa2.

Se cultivó la línea celular MCF-7 (ATCC® HTB-22™) en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (10 %), penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 μ g/mL) en frascos T75 a 37 °C y 5 % de CO₂. Los ensayos fueron realizados utilizando células pertenecientes a pasajes bajos (menores a 25 pasajes). Las células fueron mantenidas en frascos T75 hasta que se obtiene una monocapa celular (equivalente a aproximadamente 7x10⁶

células por frasco, 80-90% de confluencia), momento en el cual pueden ser utilizadas para realizar los ensayos correspondientes.

- **Evaluación de captación celular.**

Se incubaron las células (monocapa, equivalente a aproximadamente 7×10^6 células por frasco, 80-90% de confluencia) con el complejo en estudio (25 μ L, NPTc1: 25 μ Ci, NPGa1 y NPGa2: 20 μ Ci) durante 1, 2 y 4 horas ($n=4$) a 37°C y 5 % de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células dos veces (10 mL) con buffer fosfato (PBS) y se trataron con tripsina-EDTA (3 mL, 5 minutos de incubación a 37°C y 5% de CO₂). Se midió la actividad en el sobrenadante y la actividad en las células en un contador de centelleo sólido. La captación celular del complejo para cada uno de los tiempos se expresó como el porcentaje de la actividad en las células sobre el total de actividad (*Ecuación 4*).

$$\% \text{Captación celular} = \frac{A_{\text{células}}}{A_{\text{células}} + A_{\text{sobrenadante}}} \times 100$$

Ecuación 4: Cálculo de la captación celular.

- **Evaluación de internalización de los complejos.**

Se agregó a las células (monocapa, equivalente a aproximadamente 1×10^6 células por pocillo, 80-90% de confluencia) el complejo (25 μ L, NPTc1: 25 μ Ci, NPGa1 y NPGa2: 20 μ Ci) y una solución de bloqueante en exceso (concentración molar 25 veces mayor frente al complejo marcado). En el caso de los ensayos con el complejo NPTc1, se utilizó como bloqueante el ligando 1 (sin marcar). En el caso de los complejos de galio, se utilizaron los ligandos correspondientes como bloqueantes (L2, L3). Posteriormente, se incubaron las células a 37°C y 5% CO₂. Se estudiaron 3 tiempos de incubación (30, 60 y

120 min). Transcurridos dichos tiempos, se extrajo el sobrenadante, se lavaron las células con buffer fosfato salino (2 mL) y se agregó una solución de glicina fría (1 mL, 50 mM, pH= 2.8, 4° C). Se dejó actuar 5 minutos, posteriormente se extrajo el buffer glicina y se colectó dicho contenido en un tubo que corresponde al radiotrazador unido a membrana (U). Se repitió el procedimiento. Se lavaron las células con buffer de ensayo y se recolectó en el mismo tubo. Luego, se trataron las células con NaOH (1 mL, 0.1 N) y se traspasó el contenido a un tubo el cual contiene el radiotrazador internalizado (I). Se repitió el procedimiento 2 veces. Se midió la actividad presente en el sobrenadante y la actividad unida a las células. A un tubo con NaCl 0.9 % (3 mL) se le agregó la misma cantidad de complejo utilizado en el ensayo de células para medir el total de actividad (T) de referencia. El ensayo se realizó por triplicado y las siguientes ecuaciones representan los cálculos que se realizaron para calcular los porcentajes de internalización y unión a membrana. (Ecuación 5 y 6)

$$\%Internalización = \frac{I}{T} \times 100$$

Ecuación 5: Cálculo del porcentaje de radiotrazador internalizado dentro de las células.

$$\%Unión a Membrana = \frac{U}{T} \times 100$$

Ecuación 6: Cálculo del porcentaje de radiotrazador unido a la membrana celular.

- **Evaluación de eflujo.**

Se incubaron las células (monocapa, equivalente a 7×10^6 células por frasco, 80-90% de confluencia) con una cantidad fija de complejo en estudio (25 μ L, NPTc1: 25 μ Ci, NPGa1 y NPGa2: 20 μ Ci) durante una hora a 37°C y 5 % de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células dos veces con PBS (10 mL), se añadió nuevo medio de cultivo (12 mL) y se re-incubaron las células durante distintos tiempos. En el caso de NPTc1, se incubaron durante 1, 2 y 4 horas. En el caso de los complejos de galio, se incubaron 0.5, 1 y 2 horas. Transcurrido el tiempo correspondiente, se retiró el medio de cultivo, se lavaron dos veces con PBS y se trataron con tripsina-EDTA, se midió la actividad en el sobrenadante y la actividad unida a células. El eflujo se expresó como el porcentaje de actividad originalmente captado por células que difunde fuera de las células y se recupera en el sobrenadante sobre el total de actividad (Ecuación 7). El ensayo se realizó por triplicado.

$$\%Eflujo = \frac{A \text{ sobrenadante}}{A \text{ células} + A \text{ sobrenadante}} \times 100$$

Ecuación 7: Porcentaje de radiotrazador externalizado.

- **Determinación de la afinidad.**

Se incubaron las células (monocapa, equivalente a 7×10^6 células por frasco, 80-90% de confluencia) durante una hora (37°C, 5 % CO₂) con una concentración fija de complejo en estudio (25 μ L, NPTc1: 25 μ Ci, NPGa1 y NPGa2: 20 μ Ci) y con concentraciones crecientes de ligando no marcado (25 μ L, 0-2.8 $\times 10^{-8}$ M) (n=3). Transcurrido el tiempo, se removió el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS. Se trataron las células con tripsina (5 min, 37 °C). Se midió la actividad del sobrenadante y la actividad unida a las células. Con los datos obtenidos se realizó una curva, graficándose el logaritmo en base 10 de la concentración del competidor *versus* el porcentaje de captación del complejo. El valor de IC₅₀ fue calculado mediante análisis de regresión no lineal

utilizando el programa GraphPad Prism.

3.3.2.6. Evaluación biológica *in vivo* del complejo NPTc1, NPGa1 y NPGa2.

La evaluación se realizó en animales adquiridos en la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación de la Facultad de Medicina (UDELAR) teniendo en cuenta las normas vigentes sobre manejo de animales de experimentación (Ordenanza sobre el uso de animales de experimentación, docencia e investigación universitaria). La evaluación en animales normales se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo: N.º 101900-000433-16 aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) y la evaluación en animales portadores de tumor según el protocolo 18081301 aprobado por la Comisión de Ética de CUDIM. Los animales fueron mantenidos en condiciones higiénicas de alojamiento, con ciclos 12:12 horas luz-oscuridad y temperatura de $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$, con comida y agua *ad libitum*.

- **Evaluación en animales normales.**

La biodistribución de los complejos se realizó en ratones BALB/c normales hembras de 8-10 semanas de edad. El complejo [NPTc1: $(55 \pm 5) \mu\text{Ci}$ en 0.1 mL, NPGa1 y NPGa2: $(114 \pm 10) \mu\text{Ci}$ en 0.1 mL] diluido en suero fisiológico se inyectó por vía intravenosa (NPTc1 n=4, NPGa1 y NPGa2 n=3). Transcurrido el tiempo de biodistribución (1 hora) establecido los animales fueron sacrificados por tracción cervical. Los órganos, tejidos y muestras de interés fueron extraídos, pesados y su actividad medida en un contador de centelleo sólido. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de actividad inyectada.

- **Evaluación en animales portadores de tumores xenográficos.**

La evaluación biológica se llevó a cabo en ratones hembra *nude* de 4-6 semanas de edad, portando tumores xenográficos inducidos en el flanco izquierdo (n=3). Una suspensión de células MCF-7 (3×10^6 células) en Geltrex (Gibco) y buffer fosfato (50:50) se inyectó por vía subcutánea en la pata izquierda de los ratones. Se aplicó gel dérmico conteniendo estradiol (Oestrogel) para la estimulación del crecimiento del tumor hasta 1 semana antes de los estudios de biodistribución. Se dejó crecer el tumor hasta que los mismos llegaran una masa promedio de (0.08 ± 0.02) g. El día del estudio, los animales fueron inyectados con el complejo diluido en suero fisiológico (150 ± 10 μ Ci).

Transcurrido el tiempo de biodistribución establecido (1 hora) los animales fueron sacrificados por tracción cervical. Los órganos, tejidos y muestras de interés fueron extraídos, pesados y su actividad medida en un contador de centelleo sólido. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de actividad inyectada (AI), actividad inyectada por gramo de tejido (AI/g) y además se calculó la relación del porcentaje de la actividad inyectada por gramo en tumor/músculo (T/M) y de tumor/sangre (T/S).

3.3.2.7. Análisis estadístico.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, informándose el valor promedio obtenido con un error de dos desviaciones standard. Se realizó test de Student de dos colas de muestras independientes para comparar datos obtenidos mediante grupos de datos, utilizando un nivel de significación menor a 0.05 ($p < 0.05$). La prueba estadística fue utilizada para comparar los valores de UPP, lipofilicidad, resultados de evaluación biológica *in vitro* e *in vivo* de los tres complejos sintetizados. Se utilizó la herramienta informática GraphPad Prism versión 9 (GraphPad Software) para realizar los cálculos de la evaluación de afinidad de unión competitiva.

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1. Diseño de los ligandos derivados de Neuropeptido Y.

El objetivo del trabajo es la preparación de complejos de [^{99m}Tc]Tc y [^{68}Ga]Ga con un péptido derivado de Neuropeptido Y (NPY) con alta afinidad por los receptores de NPY tipo 1. Se decidió trabajar con un péptido de nueve aminoácidos derivado de NPY por las ventajas que poseen los péptidos cortos frente a los largos. El primer motivo es que la mayor eficiencia de marcación se obtiene al trabajar con péptidos pequeños. Además, cuanto más pequeño es el ligando marcado mejores son las propiedades farmacocinéticas del complejo resultante para llegar al sitio del interés. Por último, es que estos son más baratos de sintetizar. El péptido seleccionado es derivado del extremo carboxilo terminal conteniendo desde el aminoácido 28 al 36 del NPY nativo, ya que de acuerdo con la bibliografía ésta es la secuencia biológicamente activa que interacciona con el receptor. La secuencia del péptido (Tyr-Arg-Leu-Arg-BPA-Nle-Pro-Asn-Ile-OH (BPA: p-benzoil-L-fenilalanina, Nle: Norleucina)) posee las siguientes modificaciones con respecto a la secuencia nativa: la prolina ubicada en la posición 30 mejora la unión con el receptor tipo 1 del NPY, mientras que la leucina en posición 34 mejora la helicidad del péptido. Las posiciones 31 y 32 son importantes para las propiedades agonistas del péptido, por lo que se eligieron aminoácidos no proteogénicos como la BPA y Nle para desarrollar un péptido con mejor afinidad por el receptor de NPY de tipo 1 [87].

La combinación de los radionucleidos metálicos al péptido es un desafío ya que es necesario desarrollar métodos que no alteren la actividad biológica de la biomolécula. Esto fue realizado mediante el método del *pendant approach* [16]. En el caso del complejo de tecnecio, en el extremo amino terminal del péptido se agregó una unidad quelante del tipo SNS constituida por una molécula cisteína (provee el átomo de S perteneciente al grupo tiol) unida a una de ácido mercaptoacético (provee los átomos

de N del grupo amino y S del tiol). Por lo tanto, la secuencia del ligando resultante, denominado L1, es: MA-Cys-Tyr-Arg-Leu-Arg-BPA-Nle-Pro-Asn-Ile-OH (Figura 17).

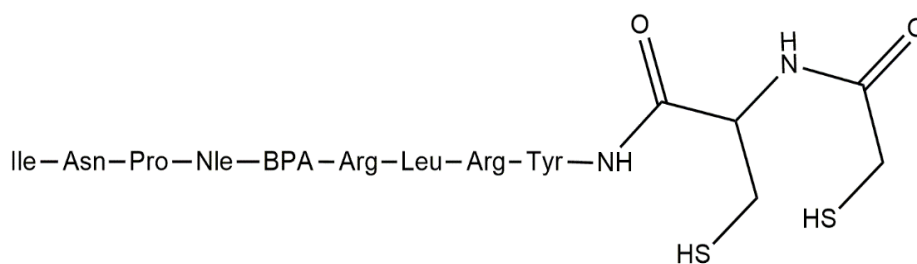


Figura 17: Estructura del ligando 1 (L1).

En el caso de la marcación con galio, se utilizaron dos análogos de NPY, con las siguientes secuencias: L2: H-Lys(NOTA)-Tyr-Arg-Leu-Arg-BPA-Nle-Pro-Asn-Ile-OH , L3: Ac-Lys(NOTA)-Tyr-Arg-Leu-Arg-BPA-Nle-Pro-Asn-Ile-OH (NOTA: ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético, Ac:- COCH₃). Ambos ligandos poseen los mismos 9 aminoácidos que L1 responsables de la unión al receptor de NPY tipo 1. Además, en el extremo amino terminal del péptido se agregó una molécula de lisina que actúa de espaciador y aporta el grupo amino para la unión del agente quelante NOTA. La secuencia aminoacídica de ambos ligandos es idéntica, sin embargo, L3 posee un grupo acetilo (-COCH₃) en el grupo amino de la lisina y L2 posee dicha amina sin acetilar (Figura 18). Se propuso estudiar el efecto producido al introducir un grupo acetilo en el espaciador y como esto afecta las propiedades fisicoquímicas del complejo final.

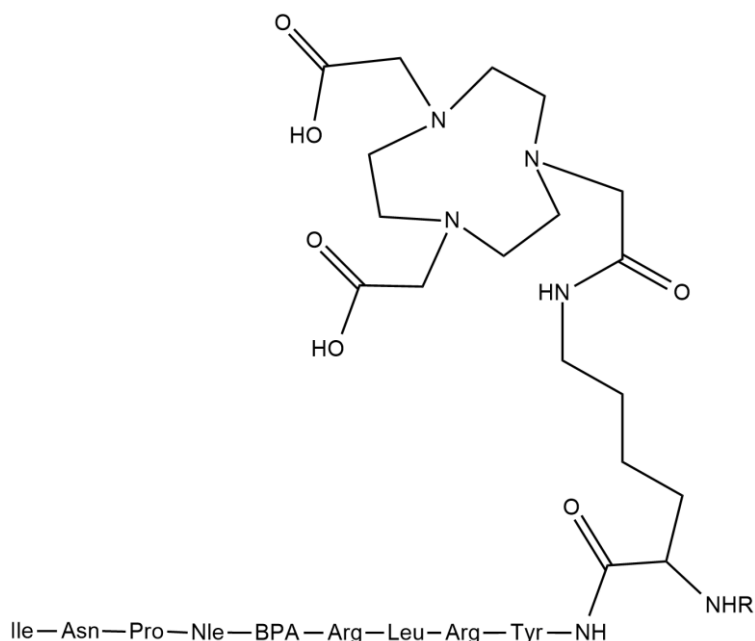


Figura 18: Estructura del ligando 2 (R=H) y del ligando 3 (R= COCH₃).

3.4.2. Síntesis de los complejos derivados del NPY.

- **Síntesis del complejo de [^{99m}Tc]Tc con L1 (NPTc1).**

La síntesis del complejo NPTc1 se realizó en dos pasos, primero la preparación de un precursor conteniendo el *core* [Tc(V)EN] y posterior sustitución con el ligando L1 y el coligando.

La preparación del precursor se realizó en medio acuoso a temperatura ambiente empleando cloruro de estaño (SnCl₂), pertechnetato de sodio ([^{99m}Tc]NaTcO₄) y dihidrazina succínica (SDH= H₂NNHCOCH₂CH₂CONHNH₂). Se utilizó la SDH como donadora de grupos nitruro (N³⁻), dado que ésta presenta una alta solubilidad en medio acuoso y posee baja toxicidad [98]. El SnCl₂ tiene como función reducir el tecnecio de estado de oxidación VII a V. En bibliografía se reporta que la reacción de reducción del tecnecio se lleva a cabo completamente, esto se debe a que el agente reductor se encuentra en exceso frente al tecnecio, y por lo tanto la fracción presente disuelta en la solución acuosa es suficiente para llevar a cabo la reducción del metal del estado de oxidación VII a V. De acuerdo con la bibliografía, el resultante de la reacción no es una

única molécula, sino que se obtienen varias especies químicas intermediarias conteniendo el *core* [^{99m}Tc][$\text{Tc}(\text{V})\equiv\text{N}$]. Sin embargo, cuando se incuban dichas especies con uno o más ligandos que tengan grupos donadores de electrones adecuados para su coordinación, la reacción deriva en un único producto [98]. La formación de los intermediarios conteniendo el *core* seleccionado se controló mediante cromatografía ascendente en papel Whatman 1 y acetona como fase móvil. En la misma, el pertecneciato de sodio presenta un $R_f = 1$ y las especies reducidas un $R_f = 0$. Se requiere una pureza radioquímica superior al 90% para poder proseguir en la siguiente fase de marcación del ligando.

La segunda etapa consiste en sustituir las posiciones de coordinación disponibles con el análogo de NPY y el coligando. El precursor tiene 4 posiciones de coordinación disponibles para la unión al o los ligandos y en este caso se formará un nitrurocomplejo heteroléptico del tipo 3+1, en el cual se completan las posiciones de coordinación disponibles mediante la utilización de un ligando tridentado y uno monodentado. El ligando 1 posee una unidad quelante del tipo SNS que contiene átomos donadores π , como son los átomos de azufre y nitrógeno. El ligando monodentado en esta marcación es la tris(2-cianoetil) fosfina, la cual cuenta con un átomo de fósforo que actúa como aceptor π . El complejo resultante formado es heteroléptico, en la siguiente figura se muestra la estructura propuesta, denominado de ahora en más como NPTc1 (Figura 19).

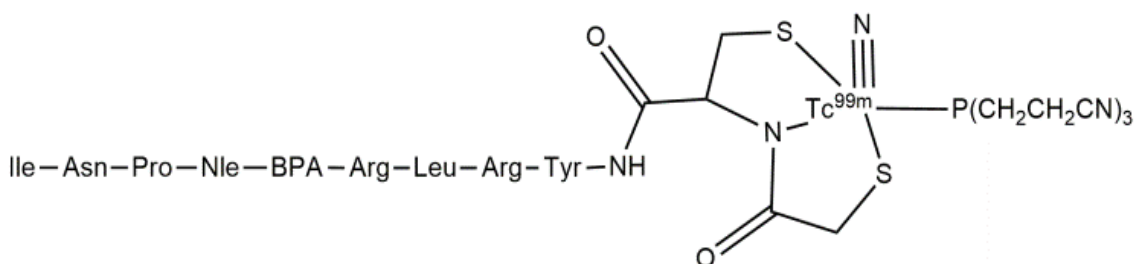


Figura 19: Estructura propuesta del complejo de NPTc1.

La sustitución del precursor con L1 dio lugar a una especie única con una pureza radioquímica mayor al 90% y tiempo de retención en el sistema de RP-HPLC utilizado de 11.7 minutos (Figura 20).

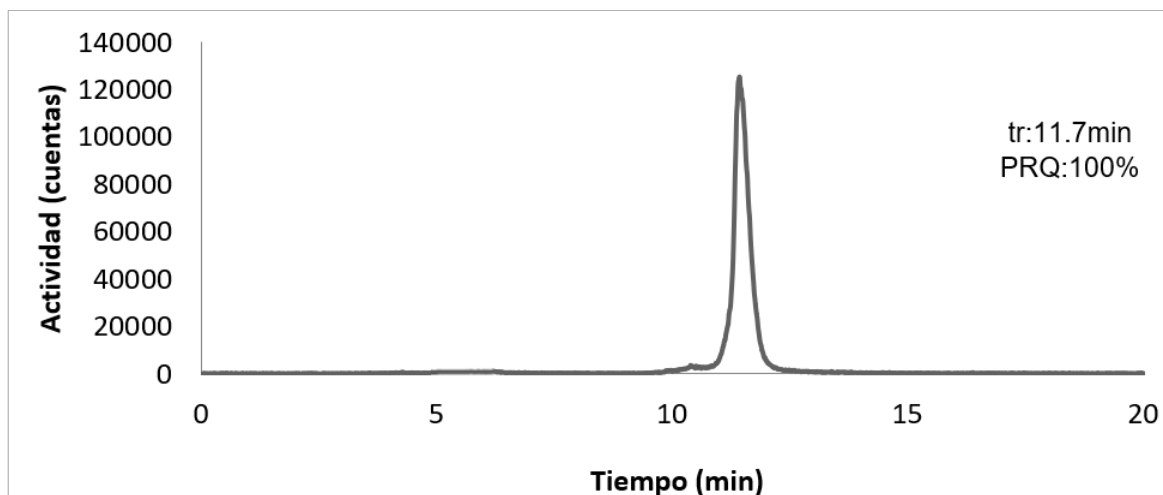


Figura 20: Perfil cromatográfico obtenido para NPTc1.

Dos potenciales impurezas en la reacción de marcación son el pertecneciato y el precursor nitrado siendo este último es el reactivo de partida para la síntesis del complejo. Las especies presentan un tiempo de retención de 5.5 minutos y 2.5-3.1 minutos, respectivamente. No se obtienen ninguna de las impurezas en la marcación.

- **Síntesis del complejo de [⁶⁸Ga] Ga con el L2 o L3 (NPGa1, NPGa2).**

Para la síntesis de los complejos se incubó el péptido correspondiente con el [⁶⁸Ga]GaCl₃ eluido fresco del generador. Se probaron distintos parámetros para optimizar las condiciones de marcado, entre ellos se encuentran: cantidad de péptido, pH, temperatura, tiempo.

Se utilizó cromatografía mediante RP-HPLC para la evaluación de la pureza radioquímica de los complejos de galio, ya que este método permite cuantificar las impurezas, en especial el GaCl₃. Además, es necesario utilizar complementariamente cromatografía en capa fina para la evaluación de la PRQ, ya que este método es capaz de detectar el coloide de galio que se puede formar durante la marcación y que no es observable mediante RP-HPLC. En la siguiente tabla (Tabla 4) se muestran los resultados obtenidos al variar la masa de péptido utilizada.

Tabla 4: Pureza radioquímica obtenida al variar la masa de ligando correspondiente.

Masa de péptido (μg)	PRQ NPGa1 (%)	PRQ NPGa2 (%)
50	65	69
100	>95	>95
150	>95	>95

En la evaluación mediante RP-HPLC se observó que el tiempo de retención de NPGa1 es de 4.961 min y de 4.515 para NPGa2. Los porcentajes de coloide ($R_f = 0$) obtenidos en las reacciones de marcación fueron siempre de 0%, tanto para el NPGa1 y NPGa2. En la tabla se puede observar que al utilizar una masa de ligando del 50 μg , se obtienen valores de PRQ bajos (<95%). Por lo tanto, para ambos complejos es necesario utilizar un mínimo de 100 μg de péptido para obtener una pureza radioquímica óptima, esta cantidad se utilizó siempre con el resto del proceso de optimización de la síntesis de los complejos. También se modificó la temperatura de incubación evaluando dos condiciones, a temperatura ambiente (20 $^{\circ}\text{C}$) y 95 $^{\circ}\text{C}$. Se eligieron estos valores porque según reportes bibliográficos, el NOTA es capaz de coordinar al metal rápidamente a temperatura ambiente. Sin embargo, como se puede observar en la tabla 5, los resultados obtenidos a 20 $^{\circ}\text{C}$ no fueron los esperados ya que se obtuvieron bajas PRQ.

Tabla 5: Pureza radioquímica obtenida al variar la temperatura de incubación.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	PRQ NPGa1 (%)	PRQ NPGa2 (%)
20	76	73
95	>95	>95

Se realizaron las marcaciones a 95 $^{\circ}\text{C}$, temperatura reportada como óptima para la

eficiente marcación de péptidos con agentes quelantes cíclicos como el DOTA [16,52]. Al realizar la incubación en estas condiciones se obtuvieron excelentes resultados, PRQ mayores al 95%. Otro de los parámetros estudiados fue el tiempo de incubación (5, 10 y 15 minutos). El tiempo mínimo para lograr una PRQ adecuada es de 10 minutos (Figura 21). No se observó la presencia de coloide de galio en ninguno de los 3 tiempos estudiados.

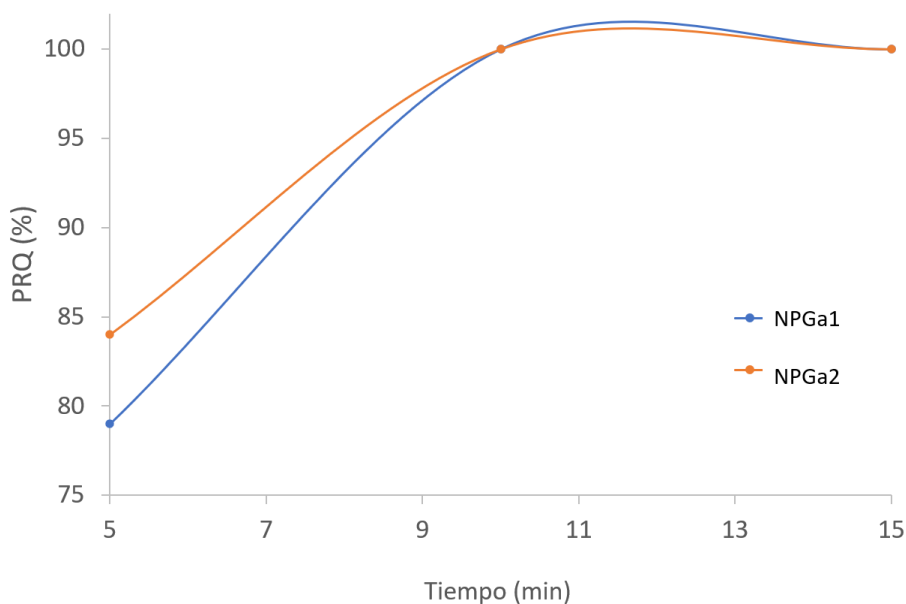


Figura 21: Variación de la pureza radioquímica con el tiempo de incubación en las marcaciones con los ligandos L2 y L3.

El galio en las soluciones acuosas ácidas se encuentra como Ga(III) libre hidratado. A medida que el pH aumenta y en ausencia de estabilizantes se produce la formación de tri-hidróxido de galio por hidrólisis y posteriormente se forma $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$. Los hidróxidos de galio no tienen el metal disponible para formar complejos, por este motivo en el proceso de optimización de los marcados se evaluó la modificación del pH de reacción y su influencia en la PRQ de los complejos. En la siguiente tabla se pueden observar los resultados obtenidos (Tabla 6).

Tabla 6: Variación de la pureza radioquímica con el pH.

pH	PRQ NPGa1 (%)	PRQ NPGa2 (%)
3	75	73
4	86	82
4.5	100	100
5	87	85

El pH óptimo fue de 4.5, obteniéndose una PRQ del 100%, y sin presencia de impurezas. A pH 5, disminuyó la PRQ, por formación de hidróxidos, mientras que a pH 3, se observó la presencia de galio libre hidratado como única impureza.

En resumen, los mejores parámetros para lograr una PRQ adecuada son: 100 μ L de la solución de L2 o L3, 250 μ L de acetato de sodio, 100 μ L de $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ (1.5-2.5 mCi) a un pH de 4.5, incubando 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos.

3.4.3. Caracterización fisicoquímica de los complejos derivados de NPY.

- **Lipofilicidad**

Se determinó la lipofilicidad de los complejos estudiados como el coeficiente de reparto entre *n*-octanol y solución buffer fosfato 0.1 M, pH=7.4. En la siguiente tabla (Tabla 7) se pueden observar los valores obtenidos para los tres complejos.

Tabla 7: Valores de log P de los tres complejos estudiados.

Complejo	Log P
NPTc1	-0.4 \pm 0.1
NPGa1	-3.2 \pm 0.1
NPGa2	-2.6 \pm 0.1

Los valores de lipofilidad obtenidos de los tres complejos corresponden a compuestos hidrofílicos. Ambos complejos de galio presentan valores menos lipofílicos con respecto al complejo de tecnecio. Esto probablemente se debe a la presencia del agente quelante NOTA y el residuo de lisina en la estructura del ligando que poseen grupos hidrofílicos como carboxilato y amino. Como se observa en la tabla, NPGa1 es ligeramente más hidrofílico ($p < 0.05$) que NPGa2 por la ausencia del resto acetilo en el grupo NH_2 de la lisina. Esto se debe a que el grupo de la lisina de NPGa1 es una amina primaria capaz de formar más puentes de hidrógeno con el medio acuoso. NPGa2, en cambio, tiene una amina secundaria, con una sola posibilidad de formar enlaces de hidrógeno con el N-H.

Usualmente, lo deseable es que los valores de Log P obtenidos se encuentren entre -0.5 y 2.0, ya que estos son los óptimos para la difusión pasiva de una molécula dentro de la célula [99], sin embargo, en este caso dado que los complejos fueron diseñados conservando la secuencia aminoacídica responsable de la interacción con el receptor de NPY tipo 1, estos deberían ser capaces de ingresar a las células mediante interacción específica con dicho receptor. Por lo antes mencionado, los valores de Log P no deberían influir negativamente en la captación celular de los complejos ya que el ingreso estaría mediado por la cantidad de receptores de NPY expresados en la superficie celular y no en su capacidad de difundir por las membranas celulares, no obstante, la lipofilidad puede modificar el perfil farmacocinético de cada complejo, vías de eliminación, rapidez de depuración del complejo en sangre y acumulación en tejidos no blanco.

- **Estabilidad en el medio de reacción.**

La estabilidad de los complejos en el medio de reacción a temperatura ambiente se estudió mediante los sistemas descritos en Métodos. En el caso del complejo de tecnecio se estudió hasta las 6 horas. En el caso de los complejos de galio se evaluó la estabilidad hasta las 4 horas debido a su corto período de semidesintegración. Los cromatogramas obtenidos de los 3 complejos no muestran impurezas derivadas de

degradación molecular, siendo las PRQ obtenidas mayores a 90% a todos los tiempos estudiados (Tabla 8).

Tabla 8: Estabilidad de los complejos en el medio de marcación.

Tiempo (h)	PRQ NPTc1 (%)	Tiempo (h)	PRQ NPGa1 (%)	PRQ NPGa2 (%)
0.5	>90	0.5	>90	>90
1	>90	1	>90	>90
2	>90	2	>90	>90
4	>90	3	>90	>90
6	>90	4	>90	>90

- **Estabilidad frente a plasma.**

Se determinó la estabilidad de los complejos cuando son incubados en plasma humano como forma de predecir su potencial estabilidad en el medio biológico. El plasma es un medio competitivo en el cual se pueden encontrar diversas enzimas, proteasas, otros iones metálicos, peptidasas, entre otras, las cuales pueden producir una disminución de la pureza radioquímica de los complejos por modificación del ligando, transquelación o reoxidación del metal. Los complejos de galio se estudiaron durante 2 horas debido a su corto período de semidesintegración, mientras que el de tecnecio se estudió durante 4 horas. En todos los casos, los complejos son estables durante el período estudiado, no se observan especies de degradación o impurezas en los cromatogramas. Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 9.

Tabla 9: Estabilidad en plasma de los complejos en estudio.

Tiempo (h)	PRQ NPTc1 (%)	Tiempo (h)	PRQ NPGa1 (%)	PRQ NPGa2 (%)
0.5	>90	0.5	>90	>90
1	>90	1	>90	>90
2	>90	1.5	>90	>90
4	>90	2	>90	>90

- **Unión a proteínas plasmáticas.**

La unión a proteínas plasmáticas (UPP) es un parámetro relacionado con la capacidad del complejo de atravesar membranas celulares y su farmacocinética. Lo ideal es que los radiotrazadores estudiados presenten valores de UPP moderados, dado que, si el complejo se encuentra unido a las proteínas, no se encontrará disponible para ingresar a las células. Otra desventaja es que la depuración sanguínea de los compuestos con UPP elevada suele ser más lenta. En cambio, si los valores de UPP son muy bajos, la depuración sanguínea será muy rápida lo cual puede impactar negativamente en la acumulación del fármaco en los tejidos blanco.

La unión a proteínas plasmáticas puede originarse por dos fenómenos, uno es que el complejo tenga elevada unión a las proteínas plasmáticas, como son la albúmina o globulinas [100]. Otra opción, es que exista una transquelación del átomo radiactivo que forma el complejo y como resultado el metal queda unido a las proteínas y no al ligando original. En este último escenario, el complejo sufre una descomposición, lo cual no es lo deseado.

El método elegido para la determinación de la unión a proteínas plasmáticas fue mediante una cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna conteniendo gel Sephadex™ G-50. NPTc1 y NPGa2 presentan bajos valores de UPP a ambos tiempos estudiados. Esto implica que la fracción libre es mayor con respecto a la fracción unida a proteínas y que se encuentra disponible para interactuar con las células.

Respecto a NPGa1, a los 60 minutos hay un aumento de los valores de UPP del 27% con respecto a los 30 minutos. Los valores de NPGa1 son mayores con respecto a NPGa2 a ambos tiempos (aproximadamente un 70% mayor). Ambos hechos pueden explicarse a que L2 posee el grupo amino de la lisina desprotegido, no acetilado. Al aumentar el tiempo de incubación del complejo, NPGa1, en el plasma se establecen más interacciones entre el grupo amino y proteínas en el medio y por ende hay un aumento de los valores de UPP. NPGa2 no establece interacciones con las proteínas mediante el átomo de nitrógeno perteneciente a la amina α del aminoácido y como consecuencia presenta un menor porcentaje de UPP [101,102].

Tabla 10: Resultados de unión a proteínas plasmáticas a los 30 y 60 minutos.

Complejo	UPP 30 minutos (%)	UPP 60 minutos (%)
NPTc1	16.9 \pm 0.2	14.2 \pm 0.2
NPGa1	29.3 \pm 0.2	37.4 \pm 0.3
NPGa2	21.2 \pm 0.3	18.9 \pm 0.2

- **Estabilidad frente a agentes competitivos.**

La estabilidad se estudia enfrentando los complejos con un agente competitivo. Este debe ser una molécula que posea la capacidad de coordinar al metal radiactivo mediante los grupos donadores de electrones adecuados y debe encontrarse en una elevada concentración respecto al radiotrazador. En el caso del complejo de tecnecio, se utilizó la cisteína como potencial competidor debido a que se encuentra en el plasma humano formando parte de proteínas, péptidos y además porque posee grupos de átomos donadores de electrones (S, O, N) capaces de coordinar al metal en estado de oxidación V. Esto implica que el aminoácido sea excelente para competir con el complejo (NPTc1) por el metal. Se trabajó con una solución de cisteína (4.2×10^{-3} M, 100 veces de exceso

frente al complejo). En cambio, para los complejos de galio, se utilizó el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA). Este es un agente quelante no cíclico capaz de coordinar el Ga(III) dado que posee átomos donadores de electrones (O, N) presentes en los grupos amino y grupos carboxilato de la molécula. En este caso se trabajó con una solución de DTPA (7.3×10^{-3} M) cuya concentración es 100 veces mayor con respecto a los complejos.

Se evaluó la pureza radioquímica mediante RP-HPLC hasta las 4 horas de incubación en el caso del complejo de Tc. En el caso de los complejos de galio se evaluó la pureza radioquímica mediante RP-HPLC y cromatografía en capa fina hasta las 2 horas de incubación a 37° C.

En todos los casos, se observó que todos los complejos son resistentes a la transquelación *in vitro* ya que la pureza radioquímica de los complejos siempre fue mayor al 90%. Los resultados se pueden observar en la tabla 11.

Tabla 11: Estabilidad de los complejos frente a agentes competitivos.

Tiempo (h)	PRQ NPTc1 (%)	Tiempo (h)	PRQ NPGa1 (%)	PRQ NPGa2 (%)
0.5	>90	0.5	>90	>90
1	>90	1	>90	>90
2	>90	1.5	>90	>90
4	>90	2	>90	>90

3.4.4. Caracterización biológica *in vitro* de los complejos derivados de NPY.

Se realizaron estudios de captación celular, internalización, externalización y afinidad de unión, utilizando la línea MCF-7(ATCC® HTB-22™). Esta línea de células epiteliales adherentes deriva de un adenocarcinoma mamario y sobreexpresa los receptores de NPY tipo 1. De acuerdo con la literatura, se encuentran (38.000 ± 10.000) receptores de este tipo presentes en la membrana celular de cada célula de la línea MCF-7 [103,104].

Las células fueron mantenidas en medio DMEM alto en glucosa. Este medio es una modificación del medio Esencial Basal Eagle (BME) y contiene una concentración 4 veces mayor de aminoácidos y vitaminas respecto a este último. El medio no contiene proteínas, lípidos ni factores de crecimiento por lo que es necesario añadir suero fetal bovino (SFB) en una concentración al 10%. Además, tiene un sistema tampón de bicarbonato sódico (3.7 g/L), por lo que requiere un ambiente con un 5-10% de CO₂ para mantener el pH fisiológico.

- **Evaluación de la captación celular de los complejos**

En el desarrollo de un nuevo radiotrazador es necesario evaluar las características el comportamiento biológicas. Este ensayo se realizó para determinar una captación total y específica por las células. Para esto una pequeña cantidad de radiotrazador se añade a un número elevado de células que expresan el receptor de interés, en este caso NPYr1, una fracción de radiotrazador se une al receptor de interés, y es la denominada unión específica. En cambio, otra fracción puede unirse a otros sitios distintos al receptor de interés, esta unión es la no específica. En este caso el radiotrazador se une a otros componentes de las células, como por ejemplos lípidos de membrana, otros receptores o moléculas presentes en la célula. El radiotrazador restante no se une y permanece en el medio, y es el radiotrazador libre. Con el fin de determinar el porcentaje de trazador

que se une específicamente al receptor, se estudió la captación de los complejos cuando las mismas fueron pre incubadas con un ligando sin marcar, con afinidad por NPYr1, con el fin de saturar los receptores. La concentración del agente bloqueante debe ser elevada para que ocupe los sitios disponibles en los receptores de NPYr1.

Para esto, se incubó el complejo correspondiente con las células durante distintos tiempos (n=3). En el caso del complejo de tecnecio, se incubaron las células durante 1, 2, 4 horas. En cambio, para los complejos de galio, los tiempos de incubación fueron de 0.5, 1 y 2 horas. Los resultados obtenidos para los tres complejos se observan en la tabla a continuación (Tabla 12).

Tabla 12: Captación de los complejos en estudio en células MCF-7 evaluados a distintos tiempos de incubación.

Tiempo (h)	Captación NPTc1 (%)	Tiempo (h)	Captación NPGa1 (%)	Captación NPGa2 (%)
1	2.9 ± 0.2	0.5	6.1 ± 0.3	7.9 ± 0.3
2	3.1 ± 0.2	1	6.1 ± 0.2	8.1 ± 0.4
4	3.2 ± 0.3	2	6.3 ± 0.3	8.0 ± 0.4

Para los tres complejos se observó que el porcentaje de captación no varió significativamente con el tiempo de incubación. Por lo tanto, se realizó el promedio de los datos obtenidos. En el caso de NPTc1 la captación fue de (3.1± 0.2) %, NPGa1 fue de (6.2 ± 0.3) % y para NPGa2 fue de (8.0 ± 0.4) %. Comparado con NPTc1, se puede observar que el valor de captación obtenido de NPGa1 fue el doble, y para NPGa2 fue aproximadamente 3 veces mayor. Entre ambos complejos de galio, NPGa2 obtuvo el mejor resultado.

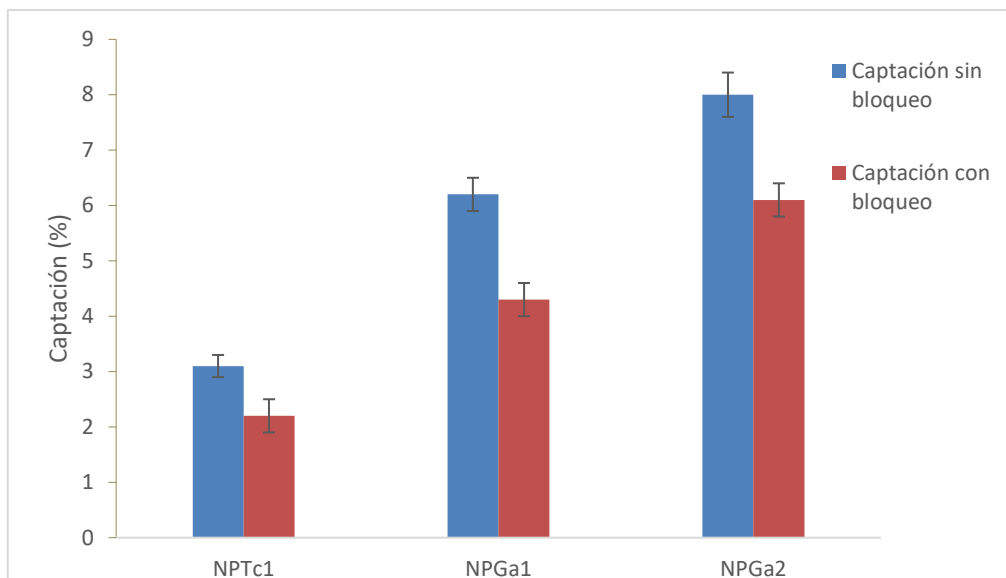


Figura 22: Captación de los complejos con y sin bloqueo en células MCF-7.

Se puede observar que cuando se agregó un exceso de ligando sin marcar (exceso molar de 25 veces), la captación total baja aproximada un 30%, siendo de (2.2 ± 0.2) % para NPTc1 y (4.3 ± 0.2) % para NPGa1. En cambio, para NPGa2 hubo una disminución del 24% respecto a la captación total siendo de (6.1 ± 0.3) %. Al existir una diferencia entre los resultados de captación con y sin bloqueo obtenidos se evidencia la captación específica entre el receptor de NPYr1 y los tres complejos desarrollados. Ambos complejos de galio presentan una mayor unión específica (el doble) con respecto al complejo de tecnecio. Una posible explicación para la diferencia entre las captaciones entre los complejos de tecnecio y los de galio puede deberse a menor impedimento estérico para la unión con el receptor permitiendo una mejor interacción con el mismo. Hay una mayor distancia entre el agente quelante y los átomos que interactúan con NPYr1 en los complejos de galio.

- **Evaluación de internalización celular.**

Los estudios de internalización miden la captación intracelular mediada por un receptor, brindando información sobre la cantidad y velocidad en la que el radiotrazador ingresa dentro de las células. Una baja y lenta captación *in vitro* puede indicar posibles

dificultades en la administración *in vivo*. Por lo contrario, una elevada internalización puede traducirse en buenas características *in vivo* [105]. Los complejos desarrollados derivan de un péptido agonista de NPY, por lo que podrían interactuar con el NPYr1 ubicado en la membrana celular y activarlo derivando en la internalización del radiotrazador.

Se incubaron las células con solución de bloqueo conteniendo el péptido (L1, L2 o L3 según corresponda) sin marcar en una concentración elevada (exceso 25 veces la concentración molar del complejo correspondiente). La solución de bloqueo tiene el fin de saturar los receptores y así determinar la unión específica. Se agrega el complejo, y se incuba por distintos tiempos. En cada tiempo evaluado, se lavan las células con una solución de glicina (50 mM, pH=2.8) para remover el radiotrazador unido a los receptores ubicados en la membrana fosfolipídica de las células. Se recoge esta solución, y luego, se recolectan las células para cuantificar la fracción de radiotrazador internalizado. Con estos datos se calculan los porcentajes de internalización a los 3 tiempos estudiados: 30, 60 y 120 minutos. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla siguiente (Tabla 13).

Tabla 13: Internalización de los complejos en células MCF-7 a distintos tiempos.

Tiempo (h)	Internalización NPTc1 (%)	Internalización NPGa1 (%)	Internalización NPGa2 (%)
0.5	65.6 ± 3.5	35.8 ± 2.3	35.7 ± 2.2
1	84.4 ± 4.1	87.7 ± 2.4	81.2 ± 3.0
2	85.3 ± 3.9	84.6 ± 2.0	83.1 ± 3.1

Se pudo observar que a medida que aumenta el tiempo de incubación, aumenta el

porcentaje de actividad correspondiente a radiotrazador NPTc1 internalizado. NPTc1 presentó una rápida internalización dado que más del 60% de la actividad se encuentra dentro de la célula durante los primeros 30 minutos de incubación, llegando a una meseta entre los 60 y 120 minutos en los cuales la actividad se encuentra en más de 80% (84.8 ± 3.9 %) del complejo internalizado y el (15.2 ± 4.1 %) restante a radiotrazador unido a membrana.

En el caso de los complejos de galio, se obtuvo el mismo perfil de internalización, en el cual luego de 1 hora de incubación se llega a una meseta máxima de internalización. A la media hora de incubación, la actividad internalizada para ambos complejos es de aproximadamente 36%, representa la mitad de porcentaje observado en NPTc1. En cambio, luego de una hora de incubación, se llegó a una meseta en la cual el porcentaje promedio de internalización para NPGa1 fue de (86.2 ± 2.9 %) y (82.1 ± 2.5 %) para NPGa1.

- **Evaluación de eflujo.**

Este ensayo tiene como objetivo conocer qué proporción de radiotrazador internalizado es posteriormente liberado de las células MCF-7, permite evaluar la cantidad y proporción de complejo que es retenido. Una rápida pérdida de radiotrazador puede indicar baja retención *in vivo*, mientras que un bajo eflujo puede traducirse en elevada y larga retención en tejido blanco.

Para ello se incubaron las células durante 1 hora con el radiotrazador, tiempo en el cual se llega a un valor máximo de captación. Luego se remueve el medio de cultivo y se coloca medio nuevo fresco de manera tal que sólo se encuentre el radiotrazador presente en la célula ya sea unido a membrana o internalizado. Posteriormente se incuban las células con medio de cultivo fresco durante distintos tiempos para evaluar el porcentaje de externalización de los complejos estudiados. En el caso del complejo NPTc1, se evaluó el porcentaje de externalización a la 1, 2 y 4 horas. En el caso de los complejos de galio, el ensayo se realizó a las 0.5 1, 2 horas. En la tabla 14 se pueden

observar los resultados obtenidos.

Tabla 14: Eflujo de los complejos en células MCF-7 a distintos tiempos.

Tiempo (h)	Eflujo NPTc1 (%)	Tiempo (h)	Eflujo NPGa1 (%)	Eflujo NPGa2 (%)
1	31.6 ± 2.1	0.5	21.6 ± 1.5	15.1 ± 3.0
2	33.4 ± 3.7	1	25.9 ± 0.8	18.1 ± 2.2
4	28.7 ± 2.2	2	30.5 ± 1.0	14.7 ± 3.2

Para los tres complejos, se observó que el porcentaje de eflujo celular es constante durante el período de tiempo estudiado. En el caso de NPTc1, el mismo tiene un valor promedio de (31.2 ± 4.1%), este valor relativamente bajo que indica que el radioligando posee una buena retención en las células. Ambos complejos de galio presentaron valores de externalización menores respecto a NPTc1. En el caso de NPGa1 el valor de externalización promedio fue de (26.0 ± 1.4 %) siendo casi dos veces mayor que el observado para NPGa2 (15.7 ± 1.2 %). Esta diferencia puede ser explicada por la desprotección del grupo amino de la lisina del ligando, esto hace que esta posición sea reactiva y por lo tanto es capaz de ser externalizado con más facilidad. La acetilación aumenta el tamaño de la cadena lateral y neutraliza la carga positiva del residuo de la lisina, esto introduce impedimento estérico que puede alterar las interacciones proteína-proteína y actividad enzimática [106–108].

- **Determinación de la afinidad.**

Se realizaron ensayos de afinidad de unión competitiva para determinar la concentración de ligando de interés requerido para reducir la unión del complejo en un

50%, IC₅₀ (concentración inhibitoria mínima). Se incubaron las células durante 1 hora con cantidades crecientes del ligando no marcado (concentraciones de 10-100 veces mayores con respecto al complejo) y cantidades fijas de radiotrazador de acuerdo con lo descrito en Métodos, y se calculó el porcentaje de captación obtenido para cada punto. El IC₅₀ se calculó mediante regresión no lineal, graficando el logaritmo de la concentración del competidor versus el porcentaje de captación del complejo.

Al graficar los datos obtenidos se obtiene una curva sigmoidea en la cual, se observan dos mesetas, una inferior y otra superior. La meseta alta, representa la máxima captación celular de complejo, y esto sucede cuando la concentración de ligando es baja y los receptores no se encuentran saturados. En cambio, la meseta inferior, representa la mínima captación del radiotrazador, cuando existe muy elevada cantidad de ligando compitiendo por los sitios de unión del complejo.

El IC₅₀ es el valor de concentración de competidor en el cual ocurre la inhibición del 50% de la unión del complejo con el receptor [105,109]. El IC₅₀ en la curva está dado por el punto en la mitad de ambas mesetas. El valor deriva de datos de captación en referencia a una curva de dosis-respuesta. El IC₅₀ es la referencia más ampliamente utilizada sobre la eficacia de un radiotrazador proporcionando una medida de la potencia de un radiotrazador [110].

El IC₅₀ de NPTc1 fue de (73.2 ± 17.1) nM. En el caso de los complejos de galio, los valores obtenidos fueron de: (70.8 ± 5.6) nM y (66.1 ± 4.6) nM para NPGa1 y NPGa2, respectivamente. No existe diferencia estadísticamente significativa (p < 0.05) entre los valores de IC₅₀ obtenidos.

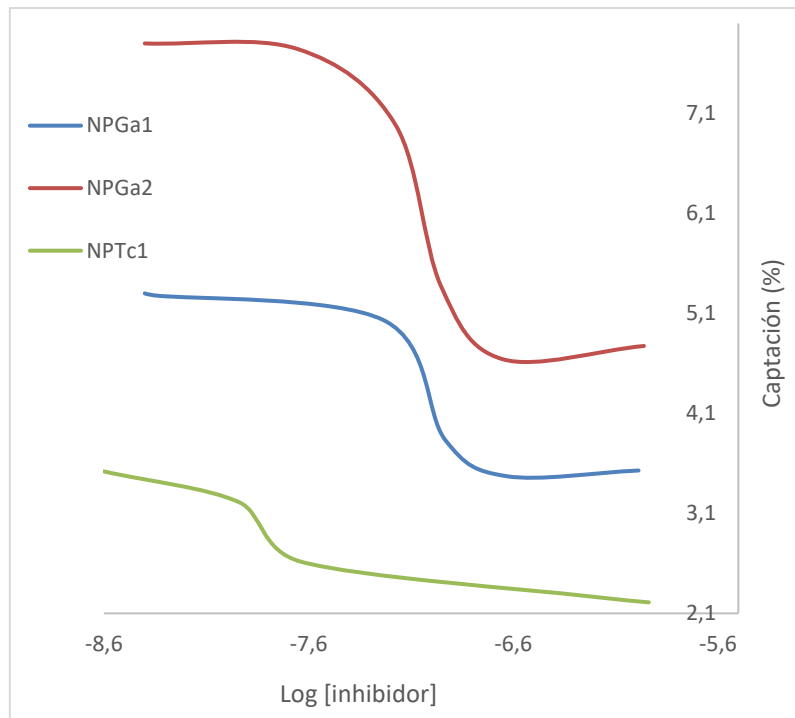


Figura 23: Resultado del estudio de afinidad de unión competitiva.

El desarrollo de los ligandos se realizó a partir de un péptido, el [Pro30, Nle31, Bpa32, Leu34]NPY (28–36) también denominado BVD15, con elevada afinidad por el receptor, cuyo IC_{50} es de 29.7 ± 6.8 nM. Los valores de IC_{50} obtenidos de los tres radiotrazadores son más del doble con respecto al péptido. El agregado de las unidades quelantes para el tecnecio y el galio los responsables de dicha disminución de afinidad, probablemente por impedimento estérico para la unión con el receptor [87].

Existen otros radiotrazadores reportados en bibliografía con afinidad a los NPYr1 marcados con $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$, como el $[\text{Lys}(\text{Ga-DOTA})^4, \text{Bip}^5]\text{BVD15}$ (de ahora en más denominado $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-CCZ01035}$) y el $[\text{Lys}(\text{Ga-DOTA})^4]\text{BVD15}$, (Bip=4,4'-bifenilalanina). Ambos presentaron valores de IC_{50} del mismo rango que los obtenidos por nuestros 3 radiotrazadores (63 ± 25 nM y 25 ± 5.3 nM, respectivamente) [87,111,112].

El NPY nativo, de 36 aminoácidos, reporta un valor de IC_{50} de (2.0 ± 0.4) nM [87]. Aunque los resultados de IC_{50} de los tres complejos estudiados se encuentran en el mismo rango que este, los valores obtenidos son aproximadamente 30 veces mayores. Esta diferencia demuestra que existe una pérdida de actividad asociada a la derivatización del péptido.

Además, confirman que la actividad biológica de los complejos depende de la secuencia peptídica y no tanto del radionucleido o del agente quelante utilizado [87].

3.4.5. Caracterización biológica *in vivo* de los complejos derivados de NPY.

- **Evaluación en animales normales.**

Las biodistribuciones se realizaron en ratones BALB/c según el procedimiento descrito en 3.3.2.6. Este estudio tiene como objetivo evaluar la captación en los diferentes órganos, observar las vías de eliminación de los complejos y estudiar si existe descomposición *in vivo* de los mismos. En la siguiente tabla (Tabla 15) se muestran los resultados de porcentaje de actividad inyectada obtenidos para todos los órganos.

Tabla 15: Porcentaje de actividad inyectada en los órganos más importantes para los tres complejos.

Órgano	NPTc1 (% AI)	NPGa1(% AI)	NPGa2(% AI)
Sangre	2.4 ± 0.4	0.3 ± 0.02	0.21 ± 0.03
Hígado	19.2 ± 1.2	0.50 ± 0.05	2.0 ± 0.1
Bazo	0.4 ± 0.1	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.02
Riñones	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.1	3.3 ± 0.1
Intestino	27.8 ± 2.5	0.3 ± 0.1	1.3 ± 0.3
Músculo	0.4 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Orina + Vejiga	24.8 ± 1.3	96.9 ± 1.3	89.1 ± 2.5
Tiroides	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.004 ± 0.001
Estómago	3.3 ± 1.1	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Vesícula biliar	1.3 ± 0.2	0.010 ± 0.002	0.030 ± 0.001
Corazón	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.001
Pulmón	0.5 ± 0.2	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.02
Hueso	0.3 ± 0.1	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01

NPTc1 mostró una rápida depuración sanguínea ($AI = 2.4 \pm 0.4 \%$). El resultado obtenido está en consonancia con el valor bajo de UPP obtenido a la hora ($UPP_{NPTc1} = 14.2 \pm 0.2 \%$). Además, se observó baja captación tiroidea ($AI = 0.02 \pm 0.01 \%$) y en estómago ($AI = 3.3 \pm 1.1 \%$). Según datos bibliográficos se puede observar que el pertecneciato se acumula en tiroides y estómago. La moderada actividad presente en el intestino ($\%AI = 27.8 \pm 1.3 \%$), en hígado ($AI = 19.2 \pm 1.2 \%$), así como en vejiga y orina ($AI = 24.8 \pm 1.3 \%$) indican que la vía hepatobiliar es la ruta de excreción de preferencia. Aunque NPTc1 mostró un Log P de (-0.4 ± 0.1) indicando que posee comportamiento hidrofílico, la excreción por vía urinaria no es la principal, es la segunda.

En el caso de los complejos de galio, también se observó baja captación en sangre ($NPGa1: 0.3 \pm 0.02 \%$ y $NPGa2: 0.21 \pm 0.03 \%$). Para ambos complejos la ruta de eliminación de preferencia fue a través del tracto urinario (captación de vejiga y orina: $96.9 \pm 1.3 \%$ y $89.1 \pm 2.5 \%$ para NPGa1 y NPGa2, respectivamente). Este resultado era esperable dada la elevada hidrofiliidad de ambos complejos y dado que los péptidos conteniendo el poliaminocarboxilatos como ABF, como el NOTA, resultan en moléculas cargadas cuya excreción a través de la vía urinaria se ve favorecida [113]. Existe una pequeña diferencia del valor de porcentaje de actividad de vejiga y orina entre ambos complejos de galio, NPGa1 y NPGa2, que está dada por la diferencia en estructura. NPGa1, tiene mayor eliminación vía urinaria, un valor de Log P menos lipofílico, el grupo amino desprotegido que brinda una posición de mayor polaridad y capacidad de generar enlaces de hidrógeno en medio acuoso con respecto a NPGa2.

El porcentaje de captación en riñón es bajo para ambos complejos de galio ($NPGa1 = 1.4 \pm 0.1 \%$, $NPGa2 = 3.3 \pm 0.1 \%$). Este es un comportamiento deseable ya que los péptidos suelen sufrir reabsorción tubular [114].

El hígado ($NPGa1 = 0.50 \pm 0.05 \%$, $NPGa2 = 2.0 \pm 0.1 \%$) e intestino ($NPGa1 = 0.3 \pm 0.1 \%$, $NPTc1 = 1.3 \pm 0.3 \%$) poseen muy baja captación de ambos complejos de galio. Los valores de captación obtenidos para bazo ($NPGa1 = 0.10 \pm 0.02 \%$, $NPGa2 = 0.10 \pm 0.02 \%$) y

pulmones (NPGa1= 0.05 ± 0.02 %, NPGa2= 0.06 ± 0.02 %) fueron muy bajos por lo que se deduce que no hubo formación de coloides *in vivo*. Por lo tanto, los complejos son estables *in vivo*.

- **Evaluación en animales portadores de tumores xenográficos.**

La biodistribución en animales portadores de tumores xenográficos se realiza en ratones Nude inoculados subcutáneamente con células MCF-7. Se emplearon estas células debido a que son capaces de generar un tumor sólido, en el cual se expresan receptores de NPY [104]. El procedimiento llevado a cabo para este estudio es el descrito en 3.3.2.6. Luego de inoculadas las células, se esperó 4 semanas hasta que los tumores crecieron hasta alcanzar una masa aproximada de (0.07 ± 0.02) gramos para realizar los estudios de la biodistribución.

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos para los 3 complejos estudiados expresados en porcentaje de actividad inyectada por gramo de órgano ($X \pm \sigma_{N-1}$, $n = 3$). Para el resto de los órganos, los resultados obtenidos son comparables a los obtenidos en la biodistribución de los animales normales y por lo tanto se excluyeron en la tabla.

Tabla 16: Valores de porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido de los órganos más relevantes.

Órgano	NPTc1	NPGa1	NPGa2
Sangre (% AI / g)	1.2 ± 0.3	0.17 ± 0.03	0.15 ± 0.04
Músculo (% AI / g)	0.14 ± 0.03	0.090 ± 0.016	0.055 ± 0.007
Tumor (% AI / g)	0.37 ± 0.05	0.34 ± 0.05	0.26 ± 0.05
T/M	2.5 ± 0.4	3.8 ± 0.4	4.7 ± 0.4
T/S	0.31 ± 0.4	2.0 ± 0.5	1.7 ± 0.5

T/M: relación del porcentaje de la actividad inyectada por gramo entre tumor y músculo.

T/S: relación del porcentaje de la actividad inyectada por gramo entre tumor y sangre.

Con respecto a NPTc1, se puede observar en la tabla 16 que el porcentaje de actividad inyectada por gramo del tumor fue de (0.37 ± 0.05) y el de músculo (0.14 ± 0.03), por lo que T/M es de (2.5 ± 0.4). El T/S da un valor 8 veces menor con respecto a la relación anterior, (0.31 ± 0.4), lo cual es deseable posteriormente si se desean realizar imágenes.

Para los complejos de galio, la captación en tumor (% captación/gramo de tumor) fue de (NPGa1: 0.34 ± 0.05; NPGa2: 0.26 ± 0.05), estos valores son moderados con respecto a las captaciones de otros péptidos radiomarcados utilizados en la clínica. Los valores de T/S o T/M son moderados. La relación entre el tumor/sangre es de (2.0 ± 0.5) para NPGa1 y (1.7 ± 0.5) para NPGa2, ambos resultados son similares para ambos complejos. Sin embargo, los cocientes T/M para NPGa2 (4.7 ± 0.4) son mayores con respecto a NPGa1 (3.8 ± 0.4) y también a NPTc1 (2.5 ± 0.4). Los valores de los 3 complejos son adecuados, pero no son tan elevados como los reportados en literatura para un diagnóstico imagenológico óptimo. Esto probablemente se deba a que la expresión de los receptores de NPYr1 en los tumores de mama son un orden menor con respecto a otros receptores en sus respectivas líneas celulares como son por ejemplo los receptores de somatostatina o bombesina [103,104,115,116].

El radiotrazador [⁶⁸Ga]Ga-CCZ01035 presentó una relación tumor músculo (17.6 ± 4.64),

el valor es aproximadamente 4 veces mayor respecto al obtenido por el NPGa2 desarrollados en esta tesis [111,112].

En resumen, se puede evidenciar que los tres complejos obtenidos poseen elevada estabilidad y buenas propiedades fisicoquímicas. La evaluación biológica demostró que los tres complejos desarrollados tienen una unión específica a los receptores de NPYr1, pero los complejos de galio son los que tienen mejores resultados respecto a la captación en células MCF-7 tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, las relaciones T/M de estos son menores a las reportadas en bibliografía para un diagnóstico óptimo por Imagenología Molecular. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis brindan información valiosa para el aprendizaje, tanto en las técnicas de marcación y en su influencia en las propiedades biológicas, para continuar con el desarrollo de potenciales radiofármacos para imagenología del cáncer de mama.

4. DESARROLLO DE COMPLEJOS RADIOMETÁLICOS PARA CÁNCER DE PRÓSTATA

4.1. Introducción

El cáncer de próstata es una enfermedad heterogénea, producto final de complejas anomalías genéticas y moleculares que derivan en un crecimiento anormal y desordenado de células de la glándula prostática hasta la formación de un tumor. Es una enfermedad muy frecuente en hombres, particularmente entre los 65 y 74 años de edad. Rara vez es diagnosticada en hombres menores de los 40 años, sin embargo, a partir de dicha edad comienza a aumentar el riesgo de desarrollarla.

Los principales factores de riesgo que influyen en el padecimiento de esta enfermedad son antecedentes familiares, factores genéticos, hábitos alimenticios, entre otros. La probabilidad aumenta al doble en particular si un pariente de primer grado fue diagnosticado antes de los 65 años. En caso de existir antecedentes familiares, también pueden encontrarse mutaciones genéticas hereditarias asociadas a la neoplasia, las que generalmente consisten en mutaciones de genes reguladores de la expresión génica (Gen PTEN, Gen TP53) o bien genes supresores de tumores (BRCA1 o BRCA2) [117–120].

Basados en la histología, la gran mayoría de los casos de cáncer de próstata son adenocarcinomas originados en células glandulares. En menor proporción se observan: sarcomas, carcinoma de células transicionales o carcinoma de células pequeñas.

La gran mayoría de los tumores tienden a crecer lentamente y su localización se encuentra limitada a la glándula, suelen ser de bajo riesgo y limitada agresividad, causando pocos síntomas o problemas en los pacientes [121]. En estos casos, la enfermedad puede ser fácilmente controlada, y potencialmente curable y el paciente puede vivir con buena salud y calidad de vida por varios años. Si la enfermedad se encuentra extendida fuera de la próstata, ejemplo huesos, el manejo de la enfermedad se vuelve más complejo, necesitando así herramientas adicionales que permitan evaluar las medidas a tomar para su control y tratamiento.

El cáncer de próstata es la neoplasia con mayor incidencia en hombres. Según cifras de la OMS en 2020 se diagnosticaron más de 1.41 millones de casos nuevos en el mundo.

Se ha observado que los diagnósticos han aumentado drásticamente a partir del 1990, siendo este hecho atribuible a los avances en las tecnologías de detección y realización de pruebas de cribado [3] y a que se han implementado diversas pruebas para su rápida detección. Existen dos tipos de pruebas de cribado utilizadas universalmente: el examen digital rectal y la dosificación del Antígeno Prostático Específico (PSA). El examen rectal lo realizan los médicos para evaluar la glándula prostática a través de la pared anterior del recto con el fin de detectar alguna zona anormal o indurada. Sin embargo, como no se pueden examinar todas las zonas de la próstata, representa una técnica de baja sensibilidad para diagnóstico. El valor predictivo positivo de la misma es de un 5-30% y por esta razón no se recomienda su utilización de forma aislada, sino en conjunto a una combinación de técnicas, como por ejemplo: RM, biopsia, dosificación de PSA o ultrasonido transrectal [122].

El PSA es una proteína de membrana producida por las células prostáticas tanto normales como anormales. La detección de dicha proteína elevada en sangre puede indicar la presencia de una neoplasia, hiperplasia prostática benigna o bien una prostatitis. Además, el nivel de corte de este marcador biológico es de 4 ng/mL, pero es posible perder casos debido a tumores poco diferenciados que no presentan aún una elevación del PSA. Por lo tanto, la Asociación Americana de Urología recomienda que la determinación de PSA debe llevarse a cabo en hombres mayores de 40 años y menores de 70, población con elevado riesgo de padecer dicha enfermedad. También se ha observado que dada la baja especificidad del PSA, el 60% de los pacientes con PSA > 4 ng/mL tendrán una biopsia negativa, aumentando significativamente los costos sanitarios al realizar biopsias innecesarias [123,124]. Sin embargo, cuanto mayor es el valor de este marcador, mayor es la probabilidad de un diagnóstico de cáncer de próstata. Dado que la técnica posee un elevado porcentaje de falsos negativos y su falta de especificidad, la dosificación de este marcador se puede utilizar en conjunto con otras técnicas, pero no en solitario para diagnóstico de la enfermedad.

La biopsia transrectal prostática es un procedimiento recomendado por las guías clínicas para la detección de esta enfermedad. Es considerada el *gold standard* de diagnóstico. En una intervención quirúrgica se realizan de 8-12 tomas de tejido de ambos lóbulos

prostáticos, realizado posteriormente un examen anatomopatológico de las muestras. A pesar de esto, pueden existir limitaciones, ya que el 40% de los casos en los que se detecta un tumor de bajo grado en la biopsia, resultan ser de alto grado al realizar la cirugía posterior [125]. Otra desventaja es que se pueden obtener resultados falsos negativos derivados de la heterogeneidad del tejido prostático al momento de la toma de muestra, por ejemplo, si el tumor está localizado en una zona de difícil acceso dentro de las 8-12 punciones puede no haberse accedido al tumor o haber obtenido material insuficiente. Esto hace necesario repetir la biopsia especialmente en casos donde los análisis clínicos posteriores siguen mostrando un valor de PSA notoriamente elevado, doblando el número de toma de muestras y aumentando la probabilidad efectos no deseados como sangrado o infección prostática.

A pesar de las mejoras en las técnicas para localizar el cáncer de próstata, el 27-53% de los pacientes experimentan un aumento de los niveles de PSA luego del tratamiento primario y la recaída continúa siendo un dilema diagnóstico y terapéutico, especialmente desde que otras modalidades imagenológicas fallan en detectar tempranamente la recaída. Sin embargo, no hay un consenso en la óptima modalidad imagenológica para detección de casos con bajos niveles de PSA y recurrencia baja, por lo que la Imagenología Molecular ha sido aplicada para el manejo de pacientes con cáncer de próstata con recaída bioquímica y nuevos e innovadores radiofármacos han sido propuestos para identificar la carga tumoral con mejor sensibilidad y más precozmente [126].

El avance en la investigación ha permitido profundizar en las bases moleculares de la enfermedad, llevando a la identificación de nuevos blancos moleculares y al desarrollo de terapias contra la enfermedad basados en los mismos, todo lo cual redundará en un beneficio para el paciente. Se han detectado potenciales blancos relevantes para Imagenología Molecular como, por ejemplo: metabolitos (ácidos grasos, aminoácidos), antígenos (PSMA, antígeno de células madre prostáticas), señalización de andrógenos, angiogénesis, hipoxia entre otros [127]. En la siguiente tabla se resumen algunos de los radiotrazadores que se han utilizado para diagnóstico de cáncer de próstata (Tabla 17).

Tabla 17: Ejemplos de radiotrazadores utilizados en investigación o clínica para cáncer de próstata.

Blanco	Radiofármaco
Lipogénesis	[¹¹ C]C-acetato
	[¹⁸ F]F-fluoro acetato
	[¹¹ C]C-colina
Síntesis de ADN	[¹⁸ F]F-FLT
	[¹⁸ F]F-FMAU
Receptor de andrógenos	[¹⁸ F]F-FDHT
GRPR	[⁶⁸ Ga]Ga-DOTA-CHCO-Gly-4-aminobenzyl-Gln-Trp-AlaVal-Gly-His-Leu-Met-NH)
PSMA	[¹¹¹ In]In-capromab pentetido
	[⁸⁹ Zr]Zr-DFO-7E11
Transporte de aminoácidos	[¹¹ C]C-MET
	[¹⁸ F]F-FACBC

Igualmente que para el cáncer de mama, se han utilizado radiofármacos involucrados en el metabolismo de la glucosa, síntesis de ADN, transporte de aminoácidos, síntesis de ácidos grasos para diagnosticar el cáncer de próstata. La [¹⁸F]F-FDG, radiofármaco ampliamente utilizado en oncología, no se utiliza de rutina para el cáncer de próstata. Esto se debe principalmente a que las células malignas de próstata poseen un bajo metabolismo de glucosa *in vivo* y por ende una baja captación de [¹⁸F]FDG. Además, dado que el radiofármaco se acumula en vejiga y riñones, dificulta la detección precisa de la captación de la [¹⁸F]FDG en la próstata.

Los radiofármacos derivados de la colina ([¹¹C]C-colina, [¹⁸F]F-fluoroetilcolina o [¹⁸F]F-fluorometil-colina) han resultado útiles para diagnóstico de esta enfermedad (Figura 24). En las células prostáticas malignas se ha demostrado que existe una elevación de la

fosfatidilcolina, precursor de la colina. Dichos trazadores fueron aprobados por la FDA en 2012 siendo útiles en el diagnóstico de tumores primarios de próstata y en pacientes con recaída bioquímica [126]. Sin embargo, la evidencia indica que la [^{11}C]C-colina tiene bajo desempeño cuando los valores de PSA son menores a 1 ng/mL [128]. Además, no es posible distinguir el cáncer de próstata del tejido hiperplásico, además se observó que la captación *in vivo* no se correlaciona con la proliferación celular, indicando que los procesos metabólicos y hormonales pueden interferir e interactuar con la captación de colina [129].

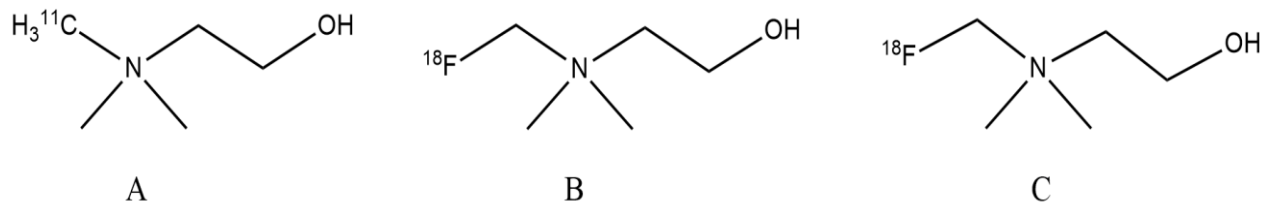


Figura 24: Radiofármacos: [^{11}C]C-colina (A), [^{18}F]F-fluoroetilcolina (B) y [^{18}F]F-fluorometil-colina (C).

El [^{11}C]C-acetato, radiofármaco que evalúa el metabolismo de lípidos en las células, ha demostrado resultados prometedores observándose elevada sensibilidad para detección de recurrencia local y metástasis en nódulos linfáticos (Figura 25). Sin embargo, tiene el mismo defecto que [^{11}C]C-colina, no distingue la hiperplasia prostática benigna del cáncer de próstata [130]. Además, el [^{11}C]C-acetato presenta limitaciones en la detección de pequeñas lesiones o metástasis en ganglios linfáticos especialmente en pacientes con bajos niveles de PSA [131].

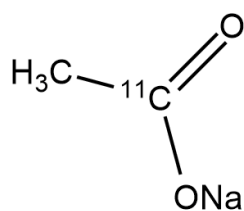


Figura 25: Radiofármaco [^{11}C]C-acetato.

El [^{18}F]-Fluciclovina ([^{18}F]-FACBC), también fue aprobado por la FDA en 2016 (Figura 26), pero su uso está acotado a la re-estratificación de pacientes con cáncer de próstata con recurrencia bioquímica previo al tratamiento. El radiofármaco es un aminoácido sintético no metabolizable o incorporable en proteínas. Su ingreso a las células tumorales se da vía dos transportadores de aminoácidos, el ASCT2 (alanina-serina-cisteína transportador 2) y el LAT-1 (transportadores de aminoácidos neutros). Estos dos transportadores están regulados al alza en cáncer de próstata y muestran un mayor impacto sobre la progresión de la enfermedad a la resistencia a la castración. Según lo reportado en el metaanálisis de Kim *et al.* el radiofármaco presenta moderada sensibilidad en pacientes con niveles de PSA mayores a 0.45 ng/mL [132]. Se observaron limitaciones especialmente para la detección de lesiones óseas y metástasis en nódulos linfáticos [129].

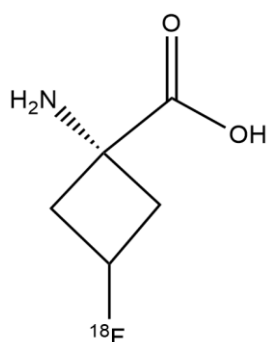


Figura 26: Radiofármaco [^{18}F]-FACBC.

Los trazadores metabólicos carecen de especificidad, siendo posible utilizarlos tanto

para el diagnóstico de cáncer de próstata como otros tipos de cáncer, por lo que se ha intentado elegir moléculas marcadoras específicas de la enfermedad. Estas pueden ser moléculas de superficie celular o receptores que se encuentren en células prostáticas. En este grupo, los blancos más estudiados son el antígeno de membrana específico (PSMA) y el receptor de andrógenos [133].

El PSMA es una proteína transmembrana del tipo II que se encuentra sobreexpresada en células de cáncer de próstata, mientras que en células prostáticas normales y otros tejidos (glándulas salivales) se expresa en bajos niveles [134]. El PSMA es considerado un blanco molecular atractivo para el desarrollo de trazadores dado que su sobreexpresión se correlaciona con factores pronósticos y puede predecir el desarrollo de la enfermedad [46]. Además, es un blanco interesante porque la expresión del antígeno se mantiene inalterada incluso en los casos de cáncer de próstata con tratamiento hormonal [135]. Por mucho tiempo se ha buscado un radiotrazador que sea capaz de detectar este blanco molecular, en la siguiente figura (Figura 27) se pueden observar algunos de los radiofármacos desarrollados hasta el momento.

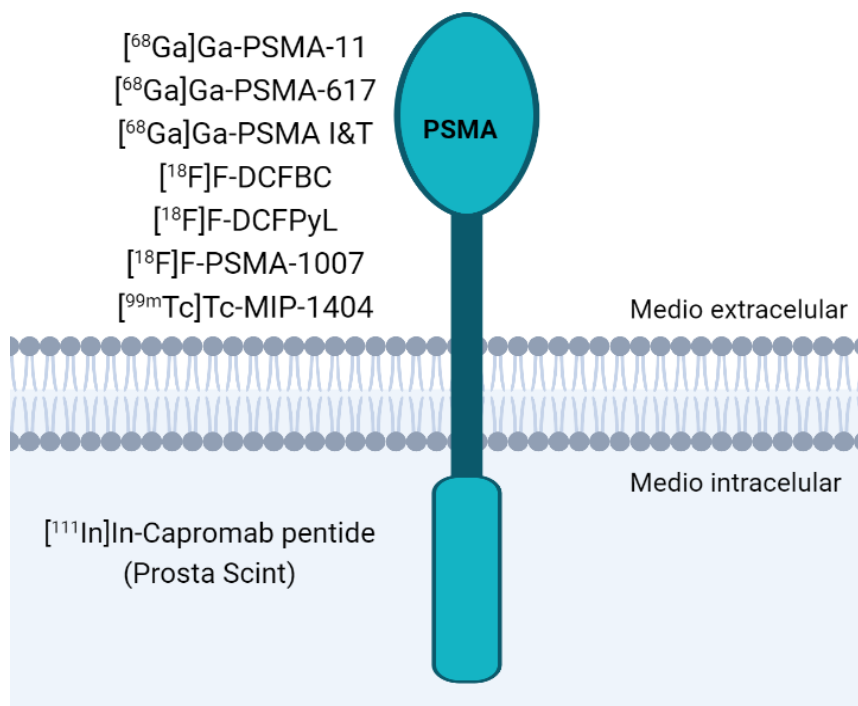


Figura 27: Blancos moleculares de algunos de los radiotrazadores dirigidos al PSMA.

En 1999 la FDA aprobó el primer radiotrazador cuyo blanco molecular es la molécula de PSMA, el [¹¹¹In]In-capromab pendetido (ProstaScint®). A pesar del éxito del radiofármaco en los años 90, se ha observado que el mismo tiene una limitada sensibilidad atribuible a que el blanco molecular sea un epítipo intracelular [135]. Esto llevó a que se desarrollaran radiofármacos dirigidos al epítipo extracelular del PSMA. Por ejemplo, el [⁸⁹Zr]Zr-DFO-J591, otro anticuerpo monoclonal marcado (J591) con un radionucleido emisor de positrones. Este demostró muy buena detección de lesiones en hueso comparado con otros radiofármacos, aunque su exactitud en la detección de lesiones en tejido blanco era muy limitada [136,137].

Desde hace un par de años ha crecido el interés en desarrollar radiotrazadores nuevos basados en inhibidores de este receptor. Los inhibidores de PSMA pueden estar basados en tres familias de moléculas: inhibidores de fósforo, inhibidores a base de tioles o inhibidores basados en la estructura de la urea. Conteniendo como farmacóforo la estructura de la urea, existen diferentes ejemplos en bibliografía, [¹¹C]C-MCG [138], [¹⁸F]F-DCFBC [139], [¹⁸F]F-DCFPyL [140], [¹²³I]I-MIP-1072 [141], sin embargo, los más destacados son el [⁶⁸Ga]Ga-DKFZ-PSMA-11 [142], y el [^{99m}Tc]Tc-MIP-1404 [143]. El [⁶⁸Ga]Ga-DKFZ-PSMA-11 es el primer radiofármaco PET aprobado por la FDA que tiene al PSMA como blanco molecular para su uso tanto en pacientes para el diagnóstico inicial, estadificación de la enfermedad en los cuales se sospecha metástasis o bien aquel con sospecha de recaída [144,145].

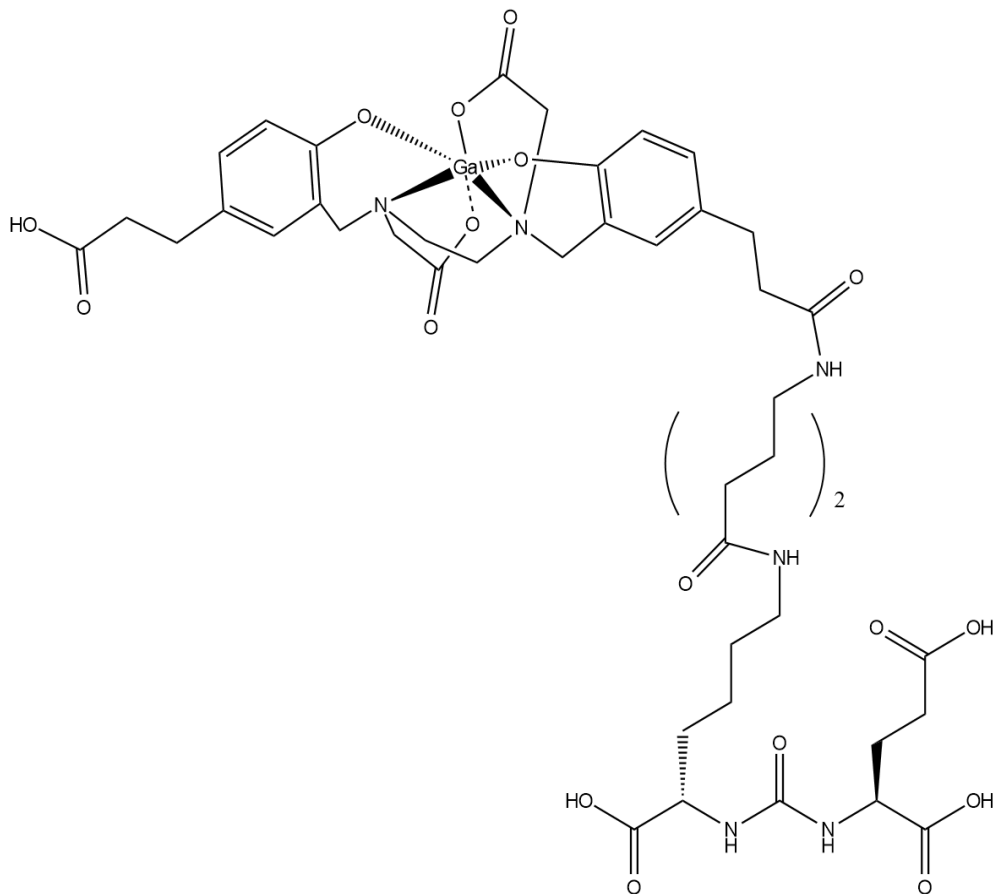


Figura 28: Estructura del $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DKFZ-PSMA-11}$.

Varios estudios demuestran el impacto positivo del uso de este radiofármaco dadas su elevada exactitud, especificidad y sensibilidad con respecto a los métodos disponibles [146]. Sin embargo, el corto período de semidesintegración del radionucleido utilizado hace que esta opción se encuentre disponible solamente en centros PET, imposibilitando la distribución regional del radiotrazador a otras zonas.

El $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-MIP-1404}$ fue desarrollado por Babich y colaboradores [9,46,147], la molécula deriva de los farmacóforos: glutamato-urea-lisina fue marcada con tecnecio utilizando el *core* tricarbónico (Figura 29). Se han llevado a cabo ensayos clínicos en fase 3 que evalúa el desempeño de este radiofármaco en pacientes, demostrando muy buenos resultados, especialmente para imágenes de pelvis debido a que se obtiene baja captación en la vejiga [145].

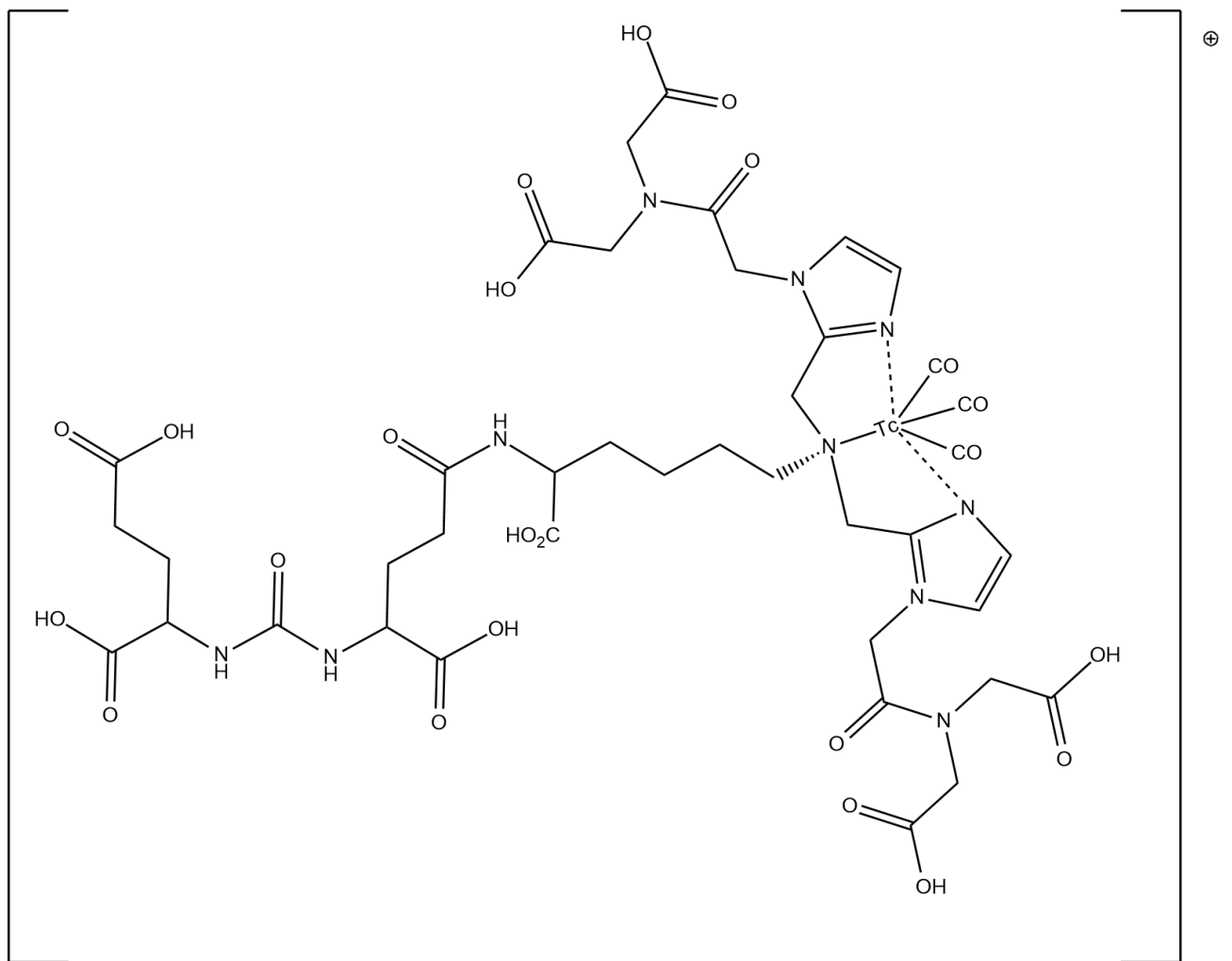


Figura 29: Estructura del $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MIP-1404}$.

La Imagenología Molecular brinda precisión y personalización al diagnóstico de una enfermedad heterogénea. Por lo que la investigación de potenciales blancos moleculares y de nuevos radiofármacos para contribuir su diagnóstico continúa siendo imperioso.

4.1.1. Desarrollo de potenciales radiofármacos para imagenología del receptor de andrógenos.

El receptor de andrógeno, cuyas principales funciones son promover el crecimiento, diferenciación y supervivencia de las células epiteliales, juega un rol fundamental en el cáncer de próstata. Los andrógenos, como la dihidrotestosterona, se unen al receptor generando un complejo que actúa como factor de transcripción, promoviendo la proliferación celular. El 80–90% de los cánceres de próstata son dependientes de andrógenos en su etapa inicial y por este motivo la principal terapia consiste en la inhibición del receptor de andrógenos. Sin embargo, en formas sumamente agresivas de cáncer prostático se evidencia una pérdida de la expresión del RA y son, por tanto, insensibles a la terapia de supresión androgénica. Por este motivo, es crucial determinar la presencia y distribución de los receptores en cada paciente antes y durante la terapia endócrina a fin de lograr una mayor eficacia terapéutica [148].

El desarrollo de radiotrazadores dirigidos a este blanco se ha basado en la estructura de agonistas esteroideos del mismo, destacándose el 16-β-fluoro-5-α-dihidrotestosterona (^{18}F -FDHT) (Figura 30).

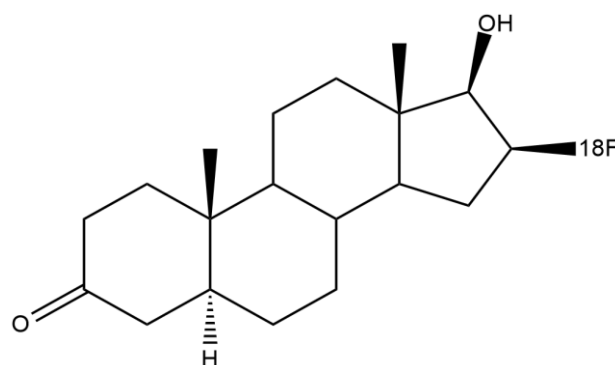


Figura 30: Radiotrazador [^{18}F]F-FDHT.

Este radiofármaco ha mostrado rápida captación y prolongada retención en tumor. Sin embargo, los radiofármacos basados en agonistas esteroideos poseen en general inadecuada selectividad ya que tienen la capacidad de unirse a otros receptores de hormonas esteroideas [149].

Otro enfoque en el diseño de potenciales radiofármacos dirigidos hacia este receptor es mediante la marcación de antagonistas no esteroideos del receptor. Estos antagonistas pueden unirse al receptor bloqueando sus funciones y efectos. Los antiandrógenos no esteroideos son usualmente utilizados para la terapia del cáncer de próstata y entre ellos se encuentran la flutamida, nilutamida y la bicalutamida (Figura 31).

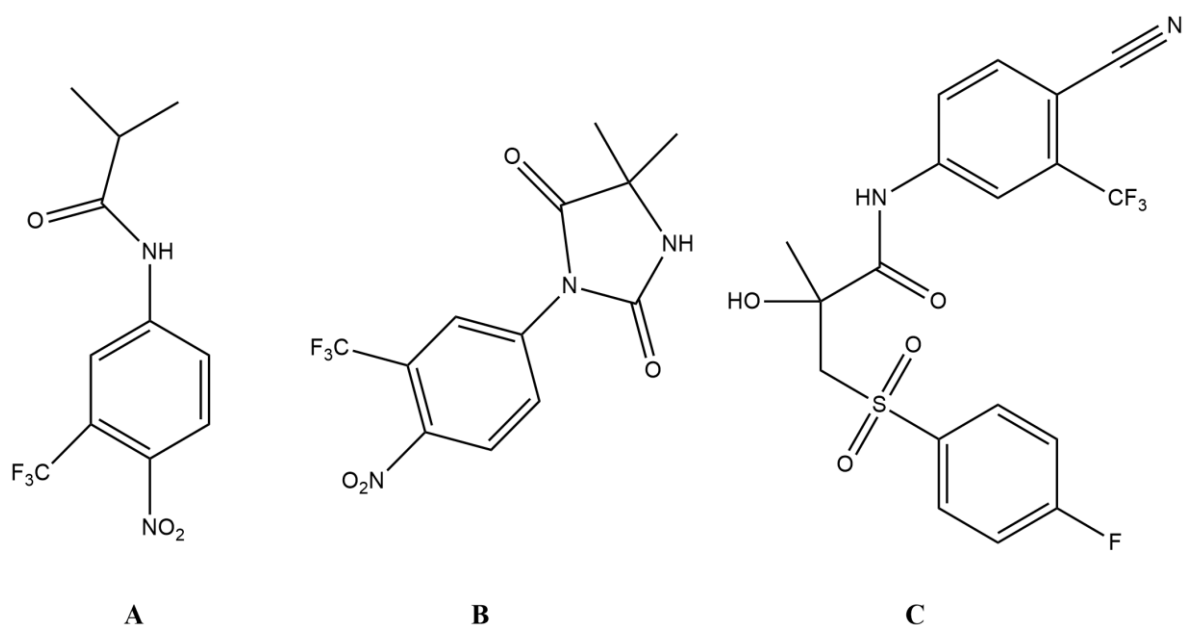


Figura 31: Antiandrógenos no esteroideos: flutamida (A), nilutamida (B) y la bicalutamida (C).

Las estructuras de los tres antiandrógenos previamente mencionados están relacionadas, ya que todos poseen un grupo (trifluorometil)benzeno, fundamental para llevar a cabo su función. El antiandrógeno se une competitivamente al receptor de andrógenos, formando un complejo inactivo receptor-antiandrógeno. Este complejo no permite que el receptor se transloque dentro del núcleo celular, y por ende se inhibe la

síntesis de ADN y proteínas, dando como resultado final disminución del tamaño tumoral. Los tres antiandrógenos poseen excelente especificidad, selectividad y propiedades farmacocinéticas, convirtiéndolos en excelentes farmacóforos para el desarrollo de radiotrazadores para imagenología de los receptores de andrógenos [150].

En bibliografía existen varios ejemplos de antiandrógenos no esteroideos radiomarcados con radionucleidos emisores de positrones como [^{18}F]F, [^{11}C]C o [^{76}Br]Br [151–155]. Los antiandrógenos generalmente estudiados fueron la nilutamida y la bicalutamida. El estudio de radiotrazadores basados en la flutamida marcados con tecnecio es de suma importancia debido a las propiedades favorables y disponibilidad de este radionucleido. He *et al.* preparó un grupo de complejos tricarbonílicos marcados con tecnecio utilizando como base la estructura de la flutamida con elevada pureza y estabilidad. Los ensayos biológicos *in vitro* en células DU-145, línea derivada de cáncer de próstata conteniendo AR, reportaron una baja captación (2%). Concluyeron que, a causa de la derivatización del antiandrógeno, se generaron complejos con polaridad y tamaño diferente a la flutamida, impactando negativamente en la internalización de estos complejos [156]. Otro grupo de investigación sintetizó un complejo [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-ciclopentadieniltricarbonilo con elevada pureza. Los resultados biológicos *in vivo* demostraron una buena captación en próstata, baja actividad en sangre y músculo, pero elevada captación en hígado, glándulas suprarrenales y bazo. La relación próstata/músculo no se vio alterado cuando el receptor es bloqueado con un exceso de acetato de testosterona. Esto indica la captación del radiotrazador no es mediada por el receptor de andrógenos [157]. Moore *et al* realizó un estudio para mejorar la eficiencia de marcación, nuevas estrategias de marcado para generar complejos tricarbonílicos. Realizó una comparación en dos abordajes usando cicloadición Huisgen [3+2], también llamada *click chemistry*, para el desarrollo de ligandos derivados del antiandrógeno. Marcaron exitosamente varias moléculas, sin embargo, el trabajo no realizó evaluación biológica, *in vivo* o *in vitro* [158].

Estos esfuerzos no han conseguido una molécula óptima para la imagenología de los receptores de andrógeno, por lo tanto, representa un área con posibilidades para profundizar el conocimiento.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Síntesis de complejos derivados de la flutamida.**

Optimización de la síntesis de cuatro complejos metálicos derivados de la flutamida con diferentes agentes quelantes para unión del tecnecio.

- **Caracterización fisicoquímica de los complejos derivados de la flutamida.**

Evaluación del comportamiento fisicoquímico de los complejos formados, determinando la estabilidad luego de la purificación, en plasma humano y frente a agentes competitivos como cisteína o histidina. También se evalúa la lipofilicidad y unión a proteínas plasmáticas.

- **Caracterización biológica *in vitro* de los complejos derivados de la flutamida.**

Evaluación del comportamiento biológico *in vitro* de los complejos frente a células portadoras de receptores de andrógenos, estudiando la captación y externalización celular además de estudiar la afinidad de unión competitiva.

Evaluación de la captación celular de los complejos desarrollados en células PC3 que no expresa receptores de andrógenos.

4.3. PARTE EXPERIMENTAL

El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio del Área Radioquímica de la Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

4.3.1. Materiales.

En el punto 3.3.1 se describen los reactivos, solventes, equipos y materiales utilizados. El control mediante RP-HPLC fue realizado utilizando el cromatógrafo con las características descritas en 3.3.1 y las columnas: Waters (300 x 3.9 mm, C18, 10 µm, 125 Å) o Phenomenex C18 Luna (250 x 4.6 mm, C18, 5 µm, 100 Å).

Los ligandos empleados en la preparación de los complejos de [^{99m}Tc]Tc fueron sintetizados por el Área de Química Orgánica de la Facultad de Química. La identidad y pureza de los compuestos fue corroborada por métodos espectroscópicos.

Para los estudios biológicos *in vitro* se utilizaron las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP (ATCC® CRL-1740™) y PC3 (ATCC® CRL-1435™). Para el mantenimiento de las células LNCaP en cultivo se utilizó el medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Capricorn Scientific) Para las células PC3 se utilizó el medio DMEM (A1316,9050 PanReac AppliChem).

Además, para el mantenimiento de ambas líneas celulares se utilizaron los reactivos y materiales descritos en 3.3.1. Para la manipulación de las células se trabajó en un flujo laminar Pachane PA 070, para su incubación se empleó una estufa Labotecgroup y además se utilizó una centrífuga refrigerada Thermo Scientific Sorvall ST16.

4.3.2. Métodos.

4.3.2.1. 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 por último 7 mg de borohidruro de sodio (NaBH₄) fue purgada con monóxido de carbono (CO) durante aproximadamente 15-20 min. Se agregó 1 mL de pertecneiato de sodio (NaTcO₄) (20-30 mCi) y se calentó en baño de agua a 60-70°C durante 30 minutos. La pureza radioquímica se evaluó por RP-HPLC con el siguiente sistema cromatográfico: columna Phenomenex C18 Luna; flujo : 1.0 mL/min; fase móvil: buffer fosfato con trietilamina pH=2.5 (A) y metanol (B) según el siguiente gradiente: de 0-3 min 100% A, de 3-6 min de 100 a 75% de A, de 6-9 min de 75 a 66 % de A, de 9 a 20 min 66 a 0% de A y de 20-27 min de 0-100% A. Previo a la sustitución, el precursor tricarbónico se neutralizó con NaH₂PO₄ (260 mg/mL), en relación precursor: buffer (4:1, v:v), siendo el pH final 7.

4.3.2.2. Síntesis del complejo FLTc1.

El ligando L4 (2-amino-3-(1-(2-((nitro-3-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il) ácido propanoico (de 2 a 6 mg, 3.4x10⁻⁶-1.0x10⁻⁵ mol) disuelto en metanol (300 µL) se incubó con el precursor tricarbónico neutralizado (100-200 µL, 2.0-9.0 mCi) a 75°C durante 30 minutos. La pureza radioquímica del complejo formado (FLTc1) se evaluó por RP-HPLC con el método descrito en 4.3.2.1.

4.3.2.3. Síntesis del complejo FLTc2.

El ligando L5 (2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)-N-4-nitro-3-(trifluorometil)fenil)acetamida) (de 2 a 8 mg, 4.5x10⁻⁶- 1.8x10⁻⁵ mol), disuelto en acetonitrilo (100 µL) se incubó con el precursor tricarbónico neutralizado (100-200

μL , 2.0-9.0 mCi) durante 30 minutos a temperaturas entre 25°C y 65°C. La pureza radioquímica del complejo formado (FLTc2) se evaluó mediante RP-HPLC con el método descrito en 4.3.2.1.

4.3.2.4. Síntesis del complejo FLTc3.

El ligando L6 (6-bis(piridin-2-ilmetil)amino)-N-(4-nitro-3-(trifluorometil)fenil)butamida) (de 2 a 4 mg, 3.9×10^{-6} - 8.0×10^{-6} mol) , disuelto en de acetonitrilo (100 μL) se incubó con el precursor tricarbonílico neutralizado (100-200 μL , 2.0-9.0 mCi) durante 30 minutos a temperaturas entre 25°C y 65°C. La pureza radioquímica del complejo formado se evaluó por RP-HPLC con el método descrito en 4.3.2.1.

4.3.2.5. Síntesis del precursor $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc(V)}\equiv\text{Nitruro}$.

El precursor fue preparado de acuerdo con el método descrito en 3.3.2.1.

4.3.2.6. Síntesis del complejo FLTc4.

El ligando L7 ((2-((4-nitro-3-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)carbamoditioato de sodio) (de 2 a 10 mg, 5.5×10^{-6} - 2.8×10^{-5} mol), disuelto en metanol (200 μL) se incubó con precursor nitrido (200 μL , 1.5-6 mCi) durante 30 minutos a temperaturas entre 25°C y 100°C. La pureza radioquímica se evaluó por RP-HPLC con el método descrito en 3.3.2.1.

4.3.2.7. Caracterización fisicoquímica de los complejos derivados de la flutamida.

Los estudios fisicoquímicos de FLTc1, FLTc2 y FLTc3 se realizaron con el complejo previamente purificado mediante RP-HPLC con el método descrito en 4.3.2.1. En el

caso del complejo FLTc4 no fue necesario realizar una purificación previa.

- **Lipofilicidad.**

La lipofilicidad de los complejos fue evaluada mediante el método que se describe en 3.3.2.4.

- **Estabilidad en el medio de reacción.**

La estabilidad de los complejos FLTc1, FLTc2, FLTc3 se evalúa hasta 6 horas post purificación determinando la PRQ mediante el método de RP-HPLC descrito anteriormente. La estabilidad del complejo FLT4 evaluó hasta 6 horas post-marcado determinando la variación de la pureza radioquímica mediante RP-HPLC utilizando las condiciones previamente.

- **Estabilidad frente a plasma.**

La estabilidad de los complejos cuando estos son incubados en plasma se realizó de acuerdo al método descrito en 3.3.2.4.

- **Unión a proteínas plasmáticas.**

Se evaluó la unión a proteínas plasmáticas mediante el método descrito en 3.3.2.4.

- **Estabilidad frente a agentes competitivos.**

Se incubaron los complejos (100 μ L) con una solución (900 μ L) de agente competidor (ver concentración en Tabla 18) a 37°C. En el caso de FLTc4, se evaluó la estabilidad del

complejo frente a la cisteína como agente competitivo y en el caso de los restantes complejos (FLTc1, FLTc2, FLTc3) se utilizó la histidina como agente competitivo. Se retiraron muestras de 200 µL a la hora, 2 horas y 4 horas y se evaluó la variación de la pureza radioquímica mediante RP-HPLC utilizando los métodos descritos en 4.3.2.1 (FLTc1, FLTc2, FLTc3) y 3.3.2.1 (FLTc4).

Tabla 18: Concentración de los agentes competitivos utilizados.

Complejo	Aminoácido	Concentración del aminoácido (M)
FLTc1	Histidina	5.1×10^{-4}
FLTc2	Histidina	6.3×10^{-4}
FLTc3	Histidina	5.9×10^{-4}
FLTc4	Cisteína	2.7×10^{-4}

4.3.2.8. Evaluación biológica in vitro en células LNCaP de los complejos FLTc1, FLTc2, FLTc3 y FLTc4.

Se utilizó la línea celular adherente LNCaP (ATCC® CRL-1740™) correspondiente a un adenocarcinoma prostático humano. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 condicionado suplementado con suero fetal bovino (10%), penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL) en frascos T75 a 37 °C y 5% de CO₂. Se trabajó con pasajes menores a 25, con células en monocapa (equivalente a aproximadamente 7×10^6 células por frasco, 80-90% de confluencia).

- **Ensayo de captación celular.**

La captación celular se evaluó incubando cada complejo (25 μCi) en estudio a tres tiempos (1,2 y 4 horas) mediante el método descrito en 3.3.2.5.

- **Ensayo de eflujo.**

Se realizó la evaluación del eflujo a tres tiempos (1,2, y 4 horas) de los complejos (25 μCi) según la técnica desarrollada en 3.3.2.5.

- **Determinación de la afinidad.**

El método se describe en 3.3.2.5, utilizando una cantidad fija de complejo en estudio (25 μCi) y con concentraciones crecientes de flutamida (25 μL , 1.2×10^{-7} - 1.2×10^{-7} M, n=3).

- **Evaluación biológica *in vitro* del complejo FLTc1, FLTc2, FLTc3, FLTc4 en células PC3.**

Se utilizó la línea celular adherente PC3 (ATCC® CRL-1435™) correspondiente a un adenocarcinoma prostático humano que no expresa el receptor de andrógeno. Las células se cultivan en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (10 %), penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en frascos T75 a 37 °C y 5% de CO_2 . Se trabajó con pasajes celulares menores a 20, con células en monocapa (equivalente a aproximadamente 7×10^6 células por frasco).

- **Ensayo de captación.**

La captación celular en células PC3 se evaluó incubando cada complejo (25 μCi) en

estudio a tres tiempos (1,2 y 4 horas) mediante el método descrito en 3.3.2.5.

4.3.2.9. Análisis estadístico

Se describe el análisis realizado en 3.3.2.7.

4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1. Diseño de los ligandos derivados de flutamida

Uno de los objetivos de este trabajo fue la preparación de complejos de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ con afinidad por el receptor de andrógenos con potencial aplicación en Medicina Nuclear. Para esto, se seleccionó la flutamida como la molécula de partida para el desarrollo de ligandos derivados de este antiandrógeno no esteroideo. La flutamida es un antagonista muy potente del RA con excelente afinidad. A partir de su estructura, se decidió desarrollar 4 potenciales ligandos, manteniendo los grupos imprescindibles de la misma para mantener la unión con el receptor. De acuerdo con bibliografía, es vital mantener el anillo bencénico conteniendo los sustituyentes atrayentes de electrones presentes en la flutamida, que son el grupo funcional nitro y el trifluorometilo (NO_2 , CF_3) [152,159–161].

Todos los ligandos utilizados fueron sintetizados por el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química. El diseño de los ligandos se realizó según el método *pendant approach*, añadiendo a la biomolécula una serie de grupos donadores de electrones capaces de coordinar al tecnecio. Estructuralmente todos los ligandos comparten con la molécula de flutamida el anillo bencénico con sus sustituyentes y el grupo amida, sin embargo, difieren en los grupos donadores de electrones unidos al carbono α al carbonilo. Tres de los ligandos desarrollados contienen grupos de átomos capaces de coordinar al radiometal a través de la formación de complejos Tc(I) tricarbonílico y uno de ellos para coordinar al tecnecio mediante la formación de complejos conteniendo el core Tc(V) nitruro. Se estudió la influencia de la naturaleza de los complejos formados conteniendo el mismo farmacóforo sobre las diversas propiedades fisicoquímicas y biológicas.

En la siguiente figura se puede observar los 4 ligandos utilizados y las estructuras propuestas de los complejos resultantes.

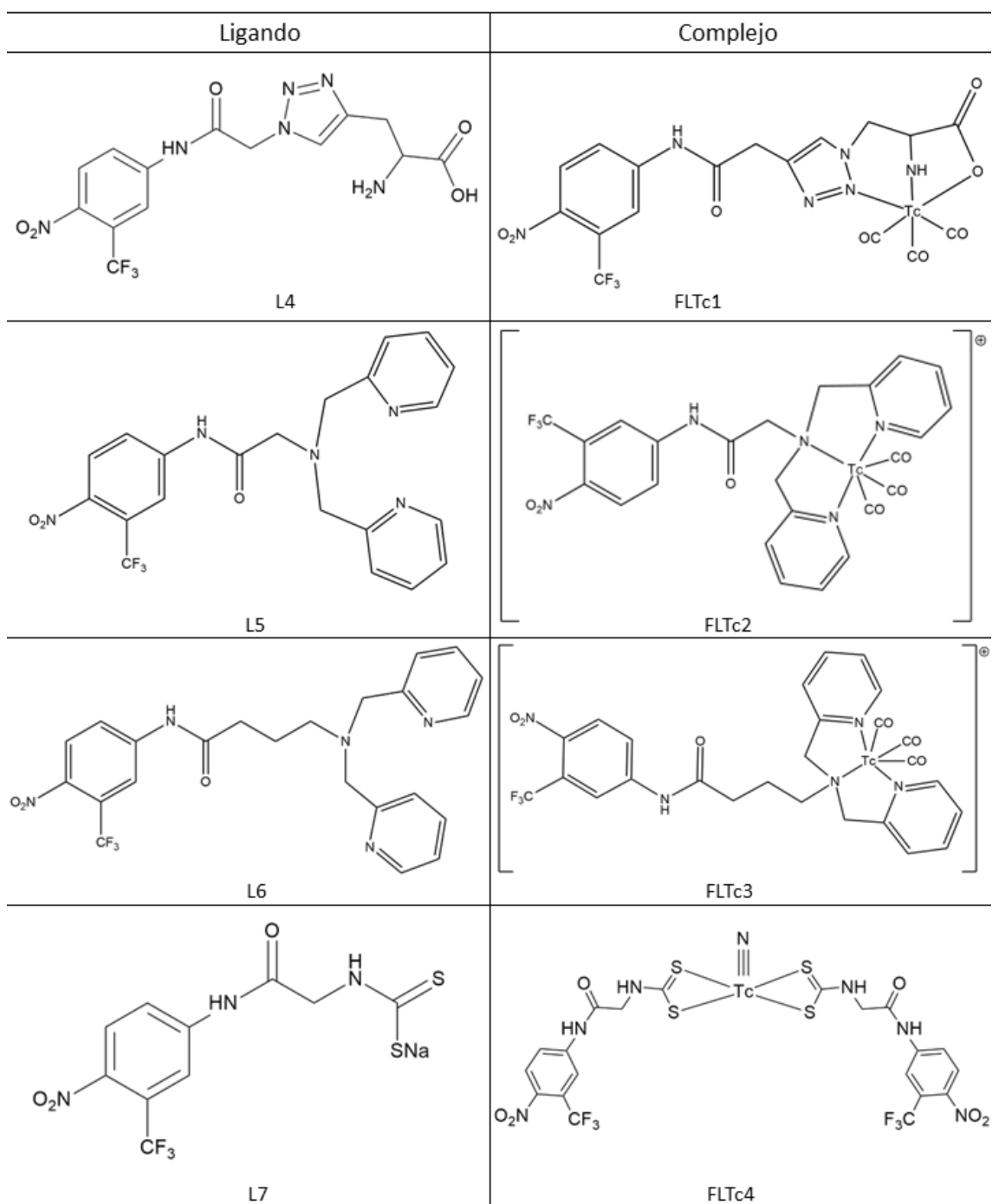


Figura 32: Ligandos utilizados en la tesis y las estructuras propuestas de los complejos metálicos.

El ligando 4 (L4), (2-amino-3-(1-(2-((nitro-3-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il) ácido propanoico, es un ligando tridentado que posee como grupos donadores de electrones un grupo amino, un grupo hidroxilo de ácido carboxílico y un nitrógeno perteneciente triazol.

El ligando 5 (L5) es el (2-(bis(piridin-2-ilmetil)amino)-N-4-nitro-3-(trifluorometil)fenil)acetamida). El quelante es un grupo di(piridin-2-ilmetil)amino, en el cual la coordinación se produce a través de los dos nitrógenos presentes en las piridinas y una amina terciaria. El complejo resultante está cargado positivamente (1+).

El ligando 6 (L6), (6-bis(piridin-2-ilmetil)amino)-N-(4-nitro-3-(trifluorometil)fenil)butanamida), contiene la misma unidad quelante que L5. Sin embargo, se modificó el largo de la cadena hidrocarbonada entre el carbono α respecto al grupo carbonilo y la unidad quelante. La cadena alifática (espaciador) posee tres átomos de carbono. Esta modificación tiene como propósito determinar si el largo del espaciador deriva en diferencias en las propiedades químicas y biológicas de los complejos finales.

L4, L5 y L6, son ligandos tridentados. Todos ellos cuentan con grupos donadores de electrones que según la teoría de Pearson son clasificados como duros, como las aminas alifáticas o grupos carboxilato o blandos como las aminas aromáticas. Por lo tanto, son capaces de coordinar al Tc en estado de oxidación I, mediante la formación de complejos tricarbónicos de Tc(I).

La estrategia de marcación elegida para la formación del complejo FLTc4 es mediante la formación de un complejo $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}\equiv\text{N}$ (V) homoléptico, utilizando un ligando bidentado. Se diseñó el ligando ((2-((4-nitro-3-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)carbamoditioato de sodio), denominado L7. El mismo posee un grupo ditiocarbamato que proporciona dos átomos de azufre donadores de electrones (C=S, C-S) para unirse al metal. Los electrones del doble enlace carbono azufre (C=S) y los del carbono azufre (C-S) son equivalentes por deslocalización, por lo que el complejo resultante es homoléptico, con dos moléculas de ligando por centro metálico [162].

4.4.2. Síntesis de los complejos derivados de flutamida

4.4.2.1. Síntesis de los complejos de [^{99m}Tc] Tc con L4, L5, L6. (FLTc1, FLTc2, FLTc3)

La formación de los tres complejos tricarbonílicos de Tc(I) se produce en dos pasos, el primero consiste en la preparación de un complejo precursor adecuado y posterior sustitución de las posiciones de coordinación lábiles con el ligando correspondiente.

En todos los casos, se utilizó el complejo precursor descrito por Alberto *et al.* El *fac*- $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ contiene al metal en estado de oxidación (I) y posee tres moléculas de monóxido de carbono fuertemente unidas al centro metálico. Las tres posiciones de coordinación restantes están ocupadas por moléculas de agua débilmente unidas al metal que pueden ser sustituidas fácilmente por el ligando de interés. Los tres derivados de la flutamida utilizados son tridentados, por lo que se sustituirán las 3 posiciones lábiles, no quedando moléculas remanentes de agua en el complejo final. Se ha reportado en bibliografía que al utilizar ligandos bidentados los complejos resultantes poseen menor estabilidad *in vivo* y desfavorables características en la distribución biológica. Esto se debe a que la molécula de agua en el complejo final puede ser intercambiada por ligandos presentes en el plasma humano, por ejemplo, por coordinación con grupos funcionales presentes en las proteínas, generando así un nuevo complejo con características químicas y biológicas diferentes al originalmente propuesto [40,41].

El primer paso para la formación de los complejos fue preparar el precursor por reducción del tecnecio en atmósfera de monóxido de carbono. Para ello se utiliza un agente reductor fuerte (borohidruro de sodio, NaBH₄) en un medio fuertemente alcalino generado por tartrato de sodio y potasio y carbonato de sodio. El mismo se obtuvo con una pureza radioquímica mayor al 90% y un tiempo de retención en RP-HPLC de entre 3-4 minutos (Figura 33).

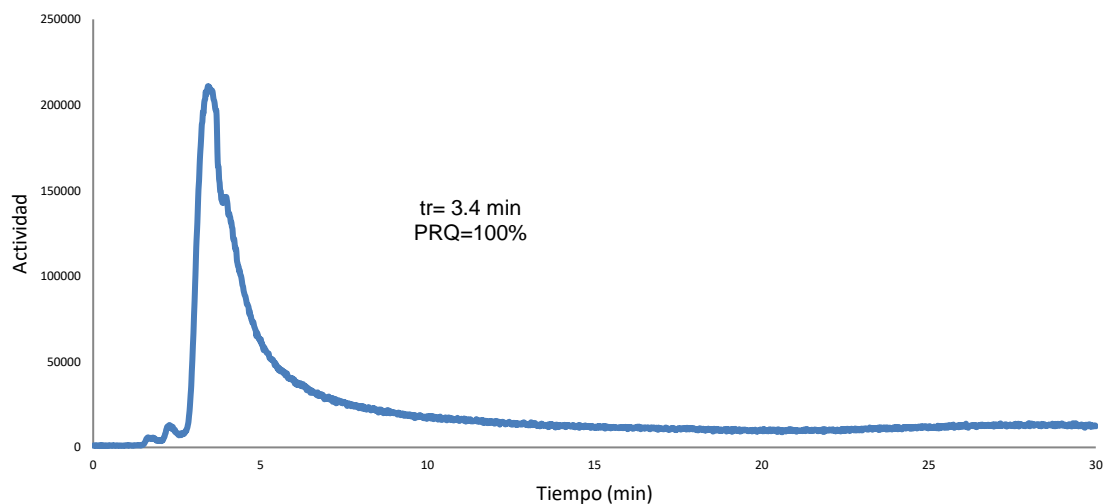


Figura 33: Perfil cromatográfico del $fac-[^{99m}Tc][Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$.

El segundo paso corresponde a la sustitución de las moléculas de agua presentes en el precursor por los átomos donadores de electrones presentes en cada ligando.

4.4.2.1.1. Síntesis del complejo $[^{99m}Tc][Tc(CO)_3(L4)]$. FLTc1

La síntesis del complejo del tipo $[^{99m}Tc][Tc(I)$ tricarbonílico fue realizada por sustitución de L4 (2-amino-3-(1-(2-((nitro-3-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il) ácido propanóico) con el precursor $fac-[^{99m}Tc][Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$. Para optimizar la preparación de FLTc1 se trabajó con diferentes cantidades de ligando (de 2 a 6 mg, 3.4×10^{-6} - 1.0×10^{-5} mol) y de cantidad de precursor (100-200 μ L, 2.0-9.0 mCi). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19: Pureza radioquímica de FLTc1 cuando se modifican la cantidad de masa de ligando y de precursor utilizado.

Cantidad de L4 (mg)	Cantidad de Precursor (μL)	PRQ (%)
2	100	60.3
	200	38.1
3	100	83.8
	200	61.5
5	100	68.8
	200	55.2
6	100	53.9
	200	43.7

Según los resultados detallados en la tabla 19, se observa que la pureza radioquímica obtenida aumenta al incrementar la masa de ligando de 2 a 3 mg en la sustitución. Sin embargo, para masas mayores de 3 mg se observa una disminución de la PRQ. Lo mismo sucede cuando se comparan los marcados realizados con igual cantidad de ligando y distinta cantidad de precursor. La PRQ de las reacciones llevadas a cabo con menor cantidad de precursor siempre fue mayor con respecto a las de 200 μL del *fac*- $^{99\text{m}}\text{Tc}[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$. Por lo tanto, las condiciones óptimas de marcado correspondieron a la incubación de 3 mg de ligando disueltos en 300 μL de metanol y 100 μL de precursor durante 30 min a 75°C. En estas condiciones se observa una especie mayoritaria con una pureza radioquímica entre el 80-85% y tiempo de retención de 21.2 minutos (Figura 34).

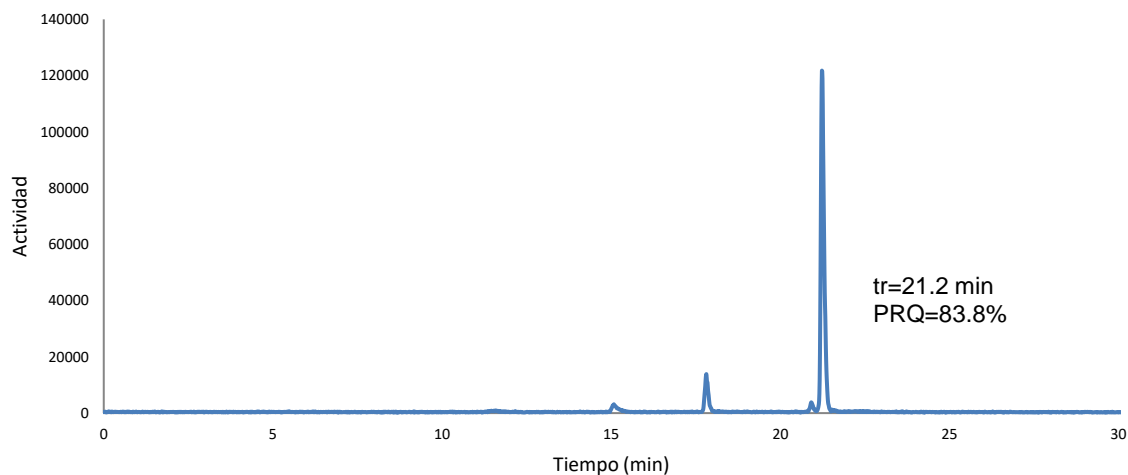


Figura 34: Perfil cromatográfico de FLTc1.

Con el fin de obtener el complejo con una pureza radioquímica superior a 90%, se realizó una purificación del compuesto de interés mediante el sistema de RP-HPLC descrito anteriormente en 4.3.2.1. En la siguiente figura se muestra el cromatograma obtenido luego de la purificación, en el que se observa una sola especie con tiempo de retención de 21.2 min y una pureza radioquímica del 100% (Figura 35). A partir del complejo purificado se realizaron los estudios fisicoquímicos correspondientes.

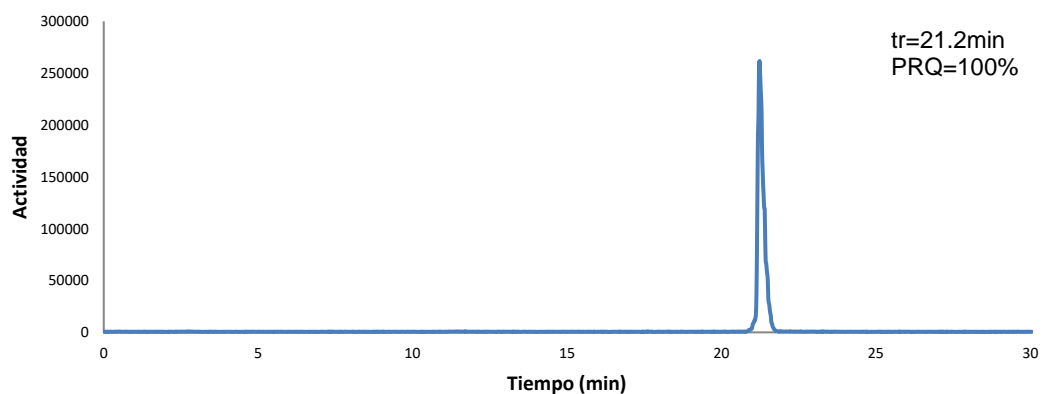


Figura 35: Perfil cromatográfico correspondiente a la purificación del complejo FLTc1.

4.4.2.1.2. Síntesis del complejo de [^{99m}Tc] [Tc(CO)₃(L5)]⁺ . FLTc2

La preparación del FLTc2 se realizó por sustitución de las posiciones lábiles del precursor *fac*-[^{99m}Tc]Tc(CO)₃(H₂O)₃⁺ con L5. Se optimizó la reacción mediante variación de las cantidades utilizadas de ligando y de precursor. En la siguiente tabla se pueden observar los resultados obtenidos.

Tabla 20: Pureza radioquímica de FLTc2 cuando se modifican la cantidad de masa de ligando y de precursor utilizado.

Cantidad de L5 (mg)	Cantidad de Precursor (μL)	PRQ (%)
2	100	33.3
	200	17.8
4	100	53.7
	200	40.4
6	100	26.7
	200	20.1
8	100	23.5
	200	16.8

Las condiciones óptimas de marcación consistieron en incubar 100 μL del precursor tricarbónico con 4 mg de ligando L5 disuelto en acetonitrilo a durante 30 min a 65°C. En esas condiciones la PRQ del pico mayoritario presentó una PRQ de 50-60% y un tiempo de retención de 20.5 minutos.

Asimismo, se evaluó la PRQ con variaciones de la temperatura de incubación (temperatura ambiente, 40°C y 65°C). En todos los casos se incubaron 100 μL del precursor tricarbónico y 4 mg de ligando L5 disuelto en acetonitrilo a durante 30 min.

Los resultados se pueden observar en la siguiente tabla (Tabla 21).

Tabla 21: Pureza radioquímica de FLTc2 obtenida al modificar la temperatura de incubación.

Temperatura de incubación (°C)	PRQ (%)
25	78.7
40	60.8
65	53.7

A medida que aumenta la temperatura de incubación, se observa una disminución de la PRQ del complejo, obteniéndose al incubar a temperatura ambiente un pico mayoritario de pureza radioquímica 75-80% y tiempo de retención de 20.5 minutos (Figura 36).

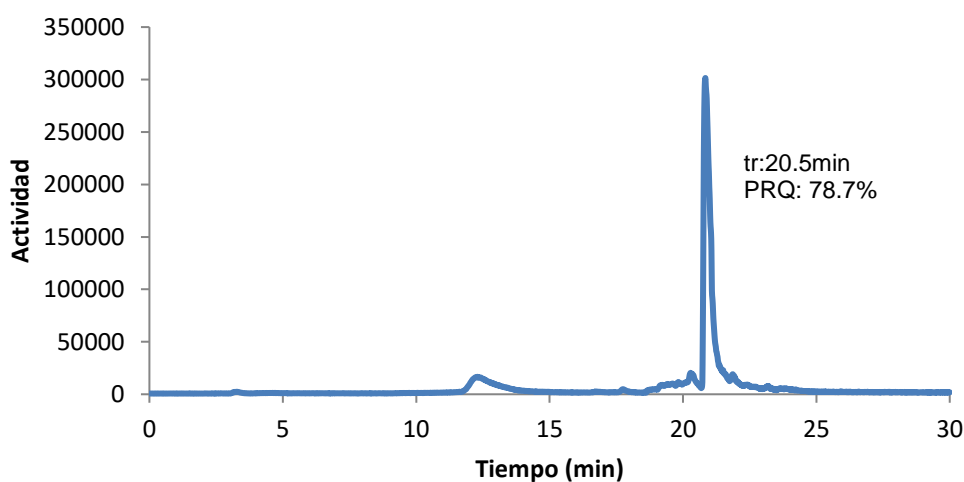


Figura 36: Perfil cromatográfico de FLTc2.

Dado que para la realización de estudios fisicoquímicos es necesario obtener un complejo cuya pureza radioquímica sea mayor a 90%, se procedió como en los casos anteriores a realizar una purificación mediante RP-HPLC (Figura 37).

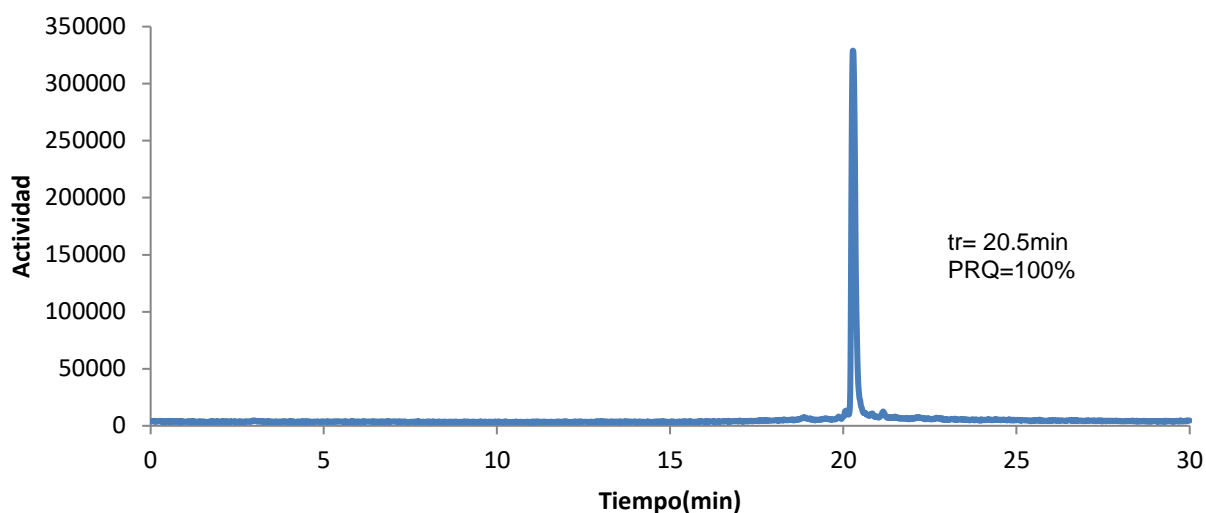


Figura 37: Perfil cromatográfico de la purificación de FLTc2.

Luego de la purificación se obtuvo el complejo con PRQ del 100%, y se procedió a realizar los ensayos fisicoquímicos.

4.4.2.1.3. Síntesis del complejo de [^{99m}Tc] $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L6})]^+$. (FLTc3)

El complejo FLTc3 fue sintetizado incubando el precursor tricarbónico y el ligando L6 disuelto en acetonitrilo a durante 30 min a distintas temperaturas. Se evaluó la pureza radioquímica del complejo obtenido mediante RP-HPLC.

En la siguiente tabla (Tabla 22) se detallan las cantidades de ligando utilizadas cuando se realiza la sustitución utilizando 100 y 200 μL de precursor, incubando a una temperatura fija.

Tabla 22: Pureza radioquímica de FLTc3 cuando se modifican la cantidad de masa de ligando y de precursor utilizado.

Masa L6 (mg)	Cantidad de Precursor (μ L)	Pureza radioquímica (%)
2	100	19.3
	200	11.7
3	100	62.7
	200	55.6
4	100	39.9
	200	31.8

En todos los marcados realizados se observó que la máxima PRQ cuando la cantidad de precursor es de 100 μ L. Cuando se utilizaban 4 mg de ligando, se observó que la PRQ obtenida es aproximadamente la mitad con respecto a la PRQ obtenida al utilizar 3 mg de L6. La PRQ obtenida al utilizar 2 mg de L6 fue muy baja respecto a las anteriores, aproximadamente 19%. Por esta razón, en las marcaciones posteriores se trabajó siempre con 3 mg de ligando.

Se modificó la temperatura de incubación para evaluar si existen cambios en la pureza radioquímica, los resultados en la tabla 23.

Tabla 23: Pureza radioquímica de FLTc3 obtenida al modificar la temperatura de incubación.

Temperatura de incubación ($^{\circ}$ C)	Pureza radioquímica (%)
25	62.7
40	45.8
65	32.3

Al igual que para FLTc2, las mejores marcaciones fueron observadas cuanto menor es la temperatura incubación. Cuando la temperatura es de 65 °C, se evidencia una disminución de la PRQ a la mitad con respecto a la observada cuando se incubaba a temperatura ambiente. Por lo tanto, las mejores marcaciones se llevan a cabo a temperatura ambiente, al igual que se vio para FLTc2.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al modificar las distintas variables, la mayor PRQ se obtuvo incubando 100 µL del precursor tricarbonílico con 3 mg de ligando L6 disuelto en acetonitrilo a durante 30 min a 25°C. En esas condiciones la PRQ del pico mayoritario estuvo entre el 55-66% y tiempo de retención de 21.1 minutos. Al igual que en los casos anteriores fue necesario realizar una purificación mediante RP-HPLC (Figura 38).

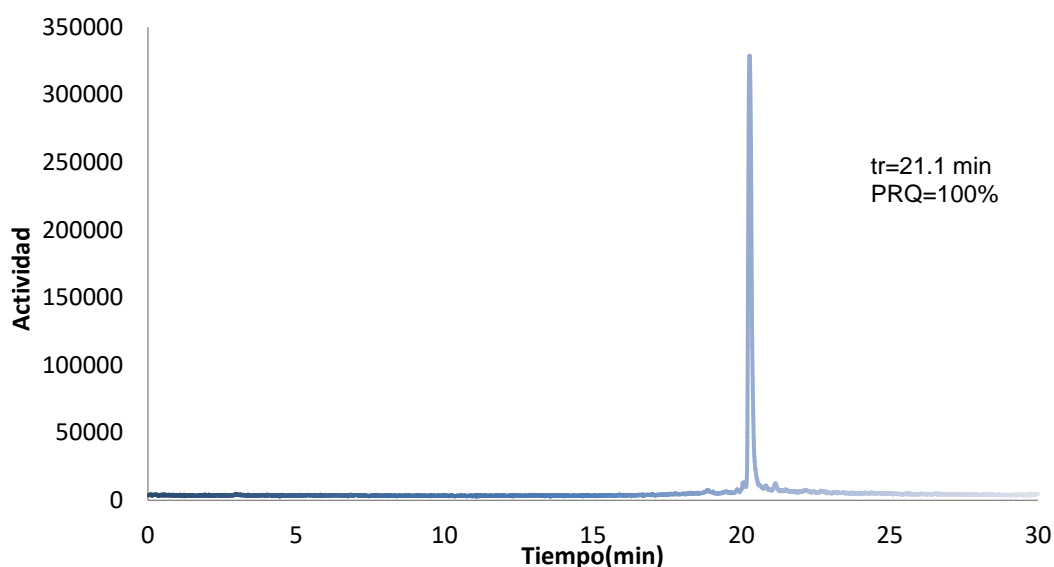


Figura 38: Perfil cromatográfico de la purificación de FLTc3.

4.4.2.2. Síntesis del complejo de [^{99m}Tc]Tc con L7. (FLTc4)

4.4.2.2.1. Formación del precursor [^{99m}Tc]Tc(V) ≡Nitruro.

La síntesis del complejo FLTc4 se realizó en dos pasos, primero la síntesis de un precursor

nitrido conteniendo el *core* [Tc(V)N]⁺³ y posterior sustitución con el ligando.

El precursor se obtuvo en medio acuoso y a temperatura ambiente empleando cloruro de estaño (SnCl₂) como agente reductor, pertechnetato de sodio ([^{99m}Tc]NaTcO₄) y dihidrazina succínica (SDH= H₂NNHCOCH₂CH₂CONHNH₂) como ya se explicó anteriormente en la sección 3.4. La formación del precursor se determinó mediante cromatografía ascendente en papel Whatman 1 y acetona como fase móvil, como se explicó anteriormente. El mismo se obtuvo con una pureza mayor a 90%.

4.4.2.2.2. Síntesis del complejo [^{99m}Tc][Tc(V)EN L7]. FLTc4

La segunda etapa consiste en sustituir las 4 posiciones de coordinación disponibles con el derivado de flutamida correspondiente. El ligando es bidentado ya que posee un grupo ditiocarbamato, el cual coordina al tecnecio mediante sus dos átomos de azufre. El complejo resultante homoléptico, en el cual se unen dos moléculas de ligando por centro metálico, siendo el único de los 4 complejos estudiados con esta característica. Se realizaron marcaciones variando la cantidad de ligando, manteniendo constante la cantidad de precursor, el tiempo y temperatura de incubación. Se trabajó con diferentes cantidades de ligando (de 2 a 10 mg, 5.5x10⁻⁶- 2.8x10⁻⁵ mol). En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos (Tabla 24).

Tabla 24: Pureza radioquímica de FLTc4 cuando se modifica la cantidad de ligando.

Masa de ligando (mg)	PRQ (%)
2	86
4	77
6	74
8	70
10	65

Como se puede observar en la tabla, la mejor marcación se obtuvo utilizando la menor masa de ligando, 2 mg. Sin embargo, la pureza radioquímica obtenida no supera el 90%, por lo que fue necesario ensayar otras variables para obtener la pureza necesaria para continuar con los estudios.

Se varió la temperatura de incubación 25 a 100 °C. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos (Tabla 25).

Tabla 25: Pureza radioquímica de FLTc4 obtenida al variar la temperatura de incubación.

Temperatura de incubación (°C)	PRQ (%)
25	99
50	83
65	74
75	67
100	8

En la tabla se evidencia que a medida que aumenta la temperatura de incubación la pureza radioquímica disminuye. En la siguiente figura se muestra el cromatograma obtenido al incubar 2 mg de ligando disueltos en metanol (200 µL), con precursor (200 µL, 1.5-6 mCi, incubado durante 30 minutos a 100 °C. (Figura 39)

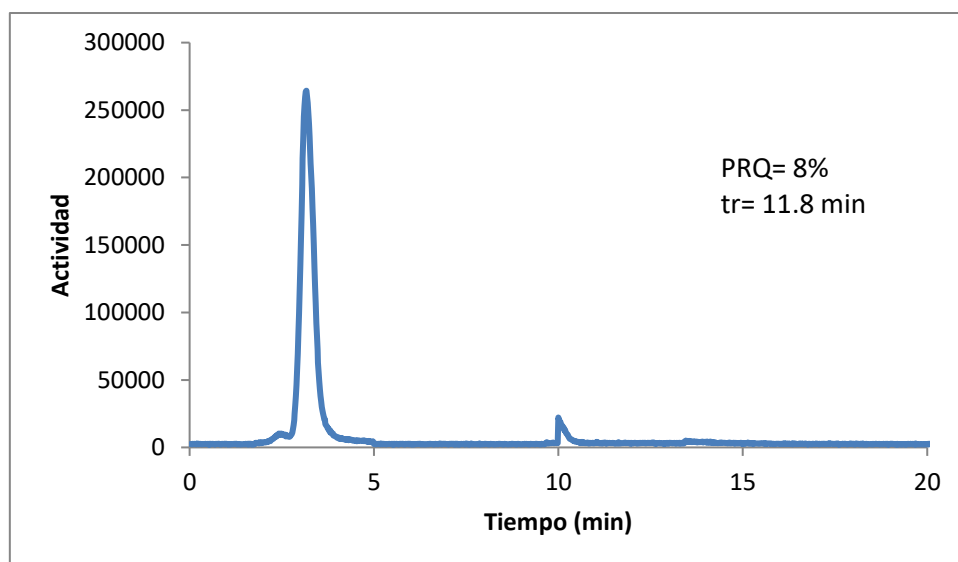


Figura 39: Perfil cromatográfico de FLTc4 cuando la incubación se lleva a cabo a 100 °C.

En el marcado realizado a 100 °C se observaron dos picos, el primero correspondiente al precursor y uno de muy menor tamaño correspondiente a FLTc4 con una pureza radioquímica de 8%. Se observó, además, que la mezcla de reacción tomó una coloración rojiza, sospechándose por tanto que el ligando se descompuso por efecto de la temperatura. En el caso de las marcaciones a 65 y 75 °C, la PRQ fue menor a 74% y se observó que las mezclas de reacción tomaron color ámbar, por lo que también se sospecha de una descomposición de L7. Este fenómeno no se observó en la marcación realizada a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se mantiene incolora y la PRQ fue mayor a 90%. En el cromatograma se observa solo un pico correspondiente al complejo de interés con un tiempo de retención de 11.8 minutos (Figura 39).

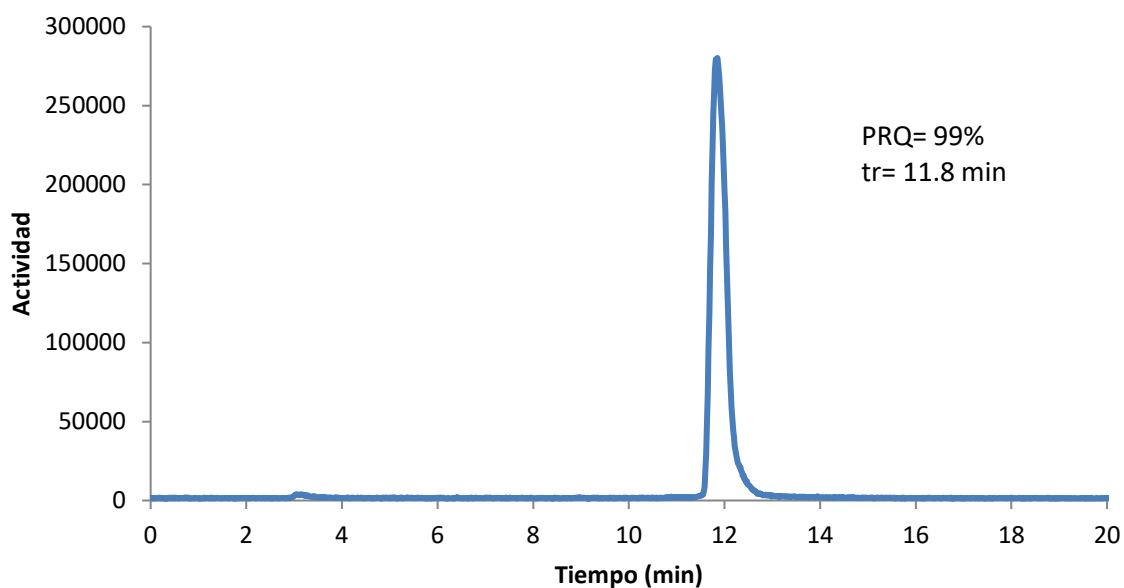


Figura 40: Perfil cromatográfico de FLTc4 obtenido al optimizar las condiciones de marcado.

En consecuencia, la reacción de sustitución se llevó a cabo de la siguiente forma, 2 mg de L7 disueltos en 200 μ L de metanol con 200 μ L de precursor nitrido (1.5-6 mCi) a temperatura ambiente durante 30 minutos. En el caso de este complejo no fue necesario realizar purificación posterior a la sustitución

4.4.3. Caracterización fisicoquímica de los complejos obtenidos.

- **Lipofilicidad.**

Se determinó la lipofilicidad para todos los complejos de tecnecio como el coeficiente de reparto entre n-octanol y buffer fosfato 0.1M, pH=7.4. Los resultados se encuentran en la siguiente tabla (Tabla 26).

Tabla 26: Valores de log P de los cuatro complejos.

	FLTc1	FLTc2	FLTc3	FLTc4
Log P	1.2±0.1	1.5 ± 0.2	1.1±0.1	1.3±0.1

Todos los valores corresponden a compuestos lipofílicos. Entre los cuatro complejos estudiados no hay diferencia significativa de lipofilidad, todos se encuentran en el rango de 1.1-1.5. Los valores obtenidos revelan que estos tienen capacidad de atravesar la membrana celular ya que los valores óptimos de Log P para la difusión en membranas biológicas están entre -0.5 y 2.0 [99]. Esta característica es muy importante ya que el receptor de andrógenos se encuentra dentro de la célula y es necesario que el complejo atraviese la membrana fosfolipídica para poder interactuar con el mismo [163]. Todos los complejos estudiados presentan valores de Log P de casi un tercio del valor reportado en bibliografía para la flutamida (Log P = 3.35), seguramente debido a la presencia de grupos hidrofílicos introducidos para la obtención de los complejos de tecnecio.

- **Estabilidad en el medio de reacción.**

Se evaluó la PRQ en el medio de reacción a temperatura ambiente a distintos tiempos (1, 2, 4 y 6 horas) para cada complejo estudiado. En la siguiente tabla (Tabla 27) se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 27: Pureza radioquímica de los complejos a diferentes tiempos.

Tiempo (h)	PRQ FLTc1 (%)	PRQ FLTc2 (%)	PRQ FLTc3 (%)	PRQ FLTc4 (%)
1	>90	>90	>90	>90
2	>90	>90	>90	>90
4	>90	>90	>90	>90
6	>90	>90	>90	>90

En todos los casos, la PRQ de los complejos obtenidos a los tiempos estudiados fue mayor al 90%. No se observa presencia de impurezas o de productos de degradación. Como resultado, todos los complejos son estables en el medio de reacción al menos hasta las 6 horas.

- **Estabilidad frente a plasma.**

Como ya se explicó en 3.4, se estudió la estabilidad frente a plasma humano de los complejos, ya que este estudio brinda información preliminar sobre la estabilidad *in vivo*. En la tabla 28 se pueden observar los resultados obtenidos a los distintos tiempos estudiados.

Tabla 28: Pureza radioquímica de los complejos en el plasma a diferentes tiempos.

Tiempo (h)	PRQ FLTc1 (%)	PRQ FLTc2 (%)	PRQ FLTc3 (%)	PRQ FLTc4 (%)
1	>90	>90	>90	>90
2	>90	>90	>90	>90
4	>90	>90	>90	>90

Como se muestra en la Tabla 28 los resultados, no se observó la aparición de otras especies químicas o la disminución de la pureza radioquímica de los complejos. Por lo tanto, se puede afirmar que los mismos son estables hasta las 4 horas de estudio siendo resistentes a la posible transquelación o degradación enzimática que pueden sufrir en el plasma.

- **Unión a proteínas plasmáticas.**

El método de elección para la determinación de la unión a proteínas plasmáticas fue mediante cromatografía de exclusión molecular. Se determinó la UPP a los 30 y 60 minutos respectivamente. Los resultados se encuentran en la siguiente tabla (Tabla 29).

Tabla 29: Resultados de UPP de los cuatro complejos a los 30 y 60 minutos.

Tiempo (min)	FLTc1 (%)	FLTc2 (%)	FLTc3 (%)	FLTc4 (%)
30	31.3 ± 1.0	17.0 ± 0.7	41.9 ± 2.1	28.8 ± 1.0
60	39.3 ± 0.8	14.2 ± 0.9	45.1 ± 1.4	31.7 ± 1.0

Los resultados para cada complejo no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$) en los dos tiempos estudiados. Los valores de UPP obtenidos para los cuatro complejos son moderados (14 - 42). Con respecto a la flutamida, que posee un valor de UPP elevado ($95 \pm 1 \%$), todos los complejos presentaron valores claramente menores (entre un 50-86 % menor). Los complejos FLTc1 y FLTc4 poseen valores similares de UPP, ambos aproximadamente al 30% y el complejo con menor valor de UPP es el FLTc2 ($UPP_{prom} = 15.6 \pm 0.8 \%$) y el más elevado es FLTc3 ($UPP_{prom} = 43.5 \pm 1.8 \%$). Ambos complejos, FLTc2

y FLTc3, comparten el sistema quelante del tecnecio y poseen la misma carga neta, la única diferencia entre ellos es la cantidad de átomos entre el carbono α al carbonilo y el quelante. Una posible explicación de esta diferencia se debe a que la molécula de FLTc2 es más pequeña, contiene solo 1 átomo de carbono entre el agente quelante y el carbono α y por ende existe una mayor limitación estérica, dificultando la unión a proteínas plasmáticas. En cambio, al aumentar el largo del espaciador, el agente quelante se aleja del anillo bencénico y por ende disminuye el impedimento estérico, permitiendo la unión a otras moléculas y por ende se obtiene un valor de UPP mayor.

- **Estabilidad frente a agentes competitivos.**

En el plasma existen diversas moléculas tales como aminoácidos, péptidos, proteínas, carbohidratos, entre otros, con afinidad por el metal capaces de desplazarlo de su unión liberando el ligando. Es, por tanto, necesario evaluar la robustez del complejo formado cuando este se encuentra en un medio altamente competitivo con ligandos con excelente afinidad por el metal presente en el complejo. En este caso, se incubó cada complejo en una solución con elevada concentración excesivamente superior a la que se encontraría en el medio fisiológico de un agente competitivo (100 veces de exceso frente al complejo).

En el caso de los complejos tricarbónicos de Tc(I) (FLTc1, FLTc2 y FLTc3), se utilizó una solución de histidina concentrada, ya que es un aminoácido que contiene una cadena lateral de imidazol (Figura 41). Los nitrógenos sp^2 que posee el imidazol son excelentes donadores de electrones para el tecnecio en estado de oxidación I. Cuando la histidina se encuentra formando parte de una cadena peptídica (exceptuando las posiciones carbonilo o amino terminales), el aminoácido es capaz de actuar como un ligando monodentado. En cambio, cuando el aminoácido se encuentra en un péptido en posición amino terminal o libre, se comporta como ligando bidentado, coordinado al metal mediante el nitrógeno del grupo amino α al carbonilo y el nitrógeno en el anillo imidazólico [164].

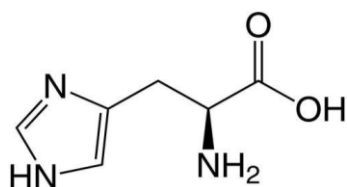


Figura 41: Estructura de la histidina.

En el caso de FLTc4, al ser un complejo Tc(V)EN, es necesario utilizar un agente competitivo capaz de coordinar el tecnecio coordinado mediante el core nitruro. Se utilizó la cisteína, un aminoácido encontrado en el plasma que posee un átomo de azufre de un grupo tiol, uno de oxígeno perteneciente al carboxilato y un nitrógeno perteneciente a la amina como posibles átomos donadores de electrones para el Tc(V). Por estos motivos, la cisteína es excelente para competir con el complejo (FLTc4) por el radiometal y fue utilizado para el estudio de estabilidad.

Con el fin de evaluar la estabilidad frente a estos agentes competitivos, se determinó la pureza radioquímica mediante RP-HPLC hasta las 4 horas de incubación. Como se puede observar en la tabla 30, la pureza radioquímica de los complejos se mantuvo por encima del 90% en todos los tiempos estudiados (1, 2, 4 horas).

Tabla 30: Estabilidad de los complejos frente a agentes competitivos.

Tiempo (h)	PRQ FLTc1 (%)	PRQ FLTc2 (%)	PRQ FLTc3 (%)	PRQ FLTc4 (%)
1	>90	>90	>90	>90
2	>90	>90	>90	>90
4	>90	>90	>90	>90

No se observó presencia de impurezas, como puede ser histidina o cisteína marcadas o liberación de pertecneciato. Esto indica que, en los casos estudiados, los radiotrazadores

son resistentes a la transquelación durante al menos 4 horas.

4.4.3.1. Caracterización biológica *in vitro* de los complejos obtenidos.

Para los ensayos biológicos *in vitro* se trabajó con dos líneas celulares comúnmente utilizadas en el campo de la investigación oncológica, LNCaP y PC3. Se realizaron estudios de captación celular, eflujo, afinidad de unión, utilizando la línea LNCaP, mientras que con la línea PC3 se realizaron estudios de captación de los complejos.

La línea LNCaP es derivada de células de adenocarcinoma prostático humano. Son células epiteliales adherentes capaces de crecer en agregado como también en células aisladas. En el citosol se encuentran receptores de andrógenos y la línea es estable manteniendo las cualidades malignas [165]. Las células fueron mantenidas en medio RPMI 164, que no contiene proteínas, lípidos o factores de crecimiento, utilizando suplementación, usualmente suero fetal bovino (SFB) 10%. Además, utiliza bicarbonato de sodio (2.0 g/L) como sistema amortiguador y por lo tanto es necesario utilizar un ambiente de 5-10% CO₂ para mantener un pH fisiológico [165].

Las células PC3 son derivadas de un adenocarcinoma prostático. Las células son andrógeno independiente, esto implica que éstas no tienen receptores de andrógenos endógenos. Por lo tanto, la línea es utilizada ampliamente en investigación de cáncer de próstata resistente a andrógenos. Se empleó PC3 como blanco para la realización de estudios de captación en células que no expresan el receptor de andrógenos. Estas células fueron cultivadas en medio DMEM alto en glucosa suplementado con SFB (10%), conteniendo un sistema tampón de bicarbonato sódico (3.7 g/L), por lo que requiere un ambiente con un 5-10% de CO₂ para mantener el pH fisiológico [165].

4.4.3.1.1. Captación *in vitro* de los complejos en células LNCaP y PC3.

Se determinó el porcentaje de captación de los complejos en las células LNCaP, los resultados obtenidos para los complejos se observan en la tabla a continuación (Tabla 31).

Tabla 31: Valores de captación en células LNCaP evaluados a distintos tiempos.

Tiempo (h)	Captación FLTc1 (%)	Captación FLTc2 (%)	Captación FLTc3 (%)	Captación FLTc4 (%)
1	23.9 ± 1.2	56.5 ± 1.8	27.8 ± 1.7	18.4 ± 1.3
2	26.9 ± 1.3	54.8 ± 2.4	26.1 ± 1.8	19.9 ± 1.7
4	25.3 ± 0.7	56.4 ± 3.1	25.7 ± 2.2	18.9 ± 1.1

Como se puede observar en la tabla 31, los valores de captación de los cuatro complejos fueron constantes a los 3 tiempos estudiados, por lo tanto, se realizó un promedio de los datos obtenidos para facilitar la discusión. FLTc2 presentó el mayor valor de captación (Captación promedio= 55.9 ± 2.5 %) de los trazadores desarrollados y FLTc4 el menor valor (Captación promedio= 19.1 ± 1.3 %), FLTc1 (Captación promedio= 25.4 ± 1.0 %) y FLTc3 (Captación promedio= 26,0 ± 2.0 %) obtuvieron resultados similares. Todos los valores de captación celular reportados son llamativamente elevados. Se ha observado que esto es una característica de los radiotrazadores lipofílicos porque tienden a unirse no solamente a sus blancos moleculares, sino que también a otras moléculas no específicas presentes en las células con mayor facilidad [109].

A fin de estudiar si la captación es debida a la interacción con el RA se bloquearon dichos receptores con una cantidad elevada de flutamida. En esas condiciones se observó que la captación de los complejos baja aproximadamente entre un 50-68 %. En la siguiente tabla se observan los resultados obtenidos en células LNCaP (Tabla 32).

Tabla 32: Valores de captación promedio en células LNCaP cuando se incuban con flutamida.

Complejo	Captación con bloqueante (%)
FLTc1	12.5±3.1
FLTc2	17.7±4.2
FLTc3	11.3±2.8
FLTc4	9.6±2.4

La flutamida es un antiandrógeno no esteroideo con excelente afinidad por el receptor de andrógenos. Al incubar este fármaco (en elevadas concentraciones) con las células LNCaP RA positivas, la flutamida saturará los receptores. De esta forma es posible calcular la unión específica del radiotrazador con las células.

En este caso, existe una diferencia entre los resultados de captación en células LNCaP incubadas con y sin flutamida. Por esta razón, los resultados evidencian que la interacción observada entre los complejos con el receptor de andrógenos es específica. Para los cuatro complejos se observa una captación menor cuando se saturan los receptores con flutamida, por lo tanto, existe una captación específica.

También se evaluó la captación en células PC3, que no expresan receptores de andrógenos, a tres tiempos diferentes. Los resultados obtenidos se pueden observar en la siguiente tabla (Tabla 33).

Tabla 33: Valores de captación en células PC3 evaluados a distintos tiempos.

Tiempo (h)	Captación FLTc1 (%)	Captación FLTc2 (%)	Captación FLTc3 (%)	Captación FLTc4 (%)
1	14.5 ± 2.4	41.4 ± 2.4	16.9 ± 2.0	10.6 ± 1.4
2	15.2 ± 1.9	39.8 ± 2.8	18.8 ± 2.7	12.0 ± 1.1
4	16.0 ± 1.5	38.9 ± 2.9	17.6 ± 2.1	10.8 ± 0.9

Como se puede observar la captación de los complejos evaluados a distintos tiempos es constante, no se observa variación significativa.

En todos los casos, las captaciones observadas en esta línea celular son inferiores a las reportadas en LNCaP para cada uno de los complejos estudiados. También se puede observar que existe la misma tendencia de captación celular entre los complejos en la línea LNCaP y en la línea PC3, siendo el complejo FLTc2 el de mayor captación (Captación promedio= 40.4 ± 2.7 %), seguido por FLTc3 (Captación promedio= 17.8 ± 2.3 %), FLTc1 (Captación promedio= 15.2 ± 1.9 %) y por último FLTc4 (Captación promedio= 11.1 ± 1.2 %).

FLTc4 es el complejo con menor captación en ambas líneas celulares, pudiéndose deber a que es el de mayor tamaño de los cuatro estudiados. El complejo propuesto posee dos ligandos por centro metálico, por lo que el peso molecular casi el doble con respecto a los demás complejos y puede dificultar la difusión en la membrana fosfolipídica.

Dado que las células PC3 no poseen receptores de andrógenos, los resultados observados en esta línea celular se deben a captación inespecífica. Probablemente la razón de estos valores reportados se debe principalmente a que el ingreso de los complejos en las células es un proceso inespecífico no mediado por proteínas o receptores, sino mediante difusión pasiva. Otro factor que favorece la elevada captación en esta línea celular es la naturaleza lipofílica de los complejos. Como se explicó

anteriormente, los radiotrazadores lipofílicos interactúan con estructuras no específicas de las células con más facilidad [109].

4.4.3.1.2. Ensayo de eflujo.

El objetivo de este ensayo fue determinar cuánto radiotrazador es liberado de las células, permitiendo obtener información sobre la retención celular del compuesto radiactivo. Una liberación rápida y elevada del complejo puede indicar una baja retención *in vivo*.

Brevemente, las células se incubaron durante 1 hora y posteriormente se remueve el medio de cultivo, permitiendo a los complejos ingresar dentro de las células. Posteriormente, se incubaron las células con medio de cultivo fresco durante distintos tiempos: 1, 2, 4 horas. A cada uno de esos tiempos, se determinó el eflujo celular evaluando la cantidad de radiotrazador presente en el medio de cultivo y en las células. Se calculó el porcentaje de eflujo mediante la ecuación 8. Los resultados obtenidos se observan en la siguiente tabla (Tabla 34).

Tabla 34: Eflujo de los complejos en células LNCaP a distintos tiempos.

Tiempo (h)	Eflujo FLTc1 (%)	Eflujo FLTc2 (%)	Eflujo FLTc3 (%)	Eflujo FLTc4 (%)
1	34.2 ± 2.1	18.6 ± 1.6	47.9 ± 1.7	44.4 ± 0.8
2	34.3 ± 2.4	19.9 ± 1.4	49.0 ± 1.5	43.2 ± 1.1
4	33.9 ± 2.2	18.9 ± 1.2	48.4 ± 1.8	42.9 ± 1.2

Para los cuatro complejos se observó que el porcentaje de eflujo es constante durante el periodo de tiempo estudiado. FLTc2 presenta el menor valor (promedio = 19.1 ± 1.4 %) de todos los complejos, indicando que el radioligando posee una buena retención dentro de las células, pudiendo verse reflejada en su buena captación celular. FLTc3 y FLTc4 poseen los mayores valores de eflujo, aproximadamente el doble que FLTc2, indicando que luego que el complejo ingresa a la célula, la mitad se externaliza. En el caso de FLTc1, se observa que casi un tercio de la actividad que ingresa a la célula es externalizada.

4.4.3.1.3. Determinación de la afinidad.

Este ensayo tiene como objetivo la determinación del IC_{50} . Este valor es la concentración de competidor requerido para reducir la unión del complejo al blanco, en este caso el receptor de andrógenos, en un 50%. Por lo tanto, permite comparar la afinidad de los complejos obtenidos por su blanco.

Se incuban las células durante 1 hora con cantidades crecientes de flutamida y una cantidad fija de radiotrazador de acuerdo con lo explicado en la sección 3.3.2.4.3. Se realizó el cálculo del IC_{50} utilizando el software GraphPad Prism 9. Los valores obtenidos de captación celular se grafican versus las concentraciones de flutamida utilizadas en el ensayo. Como se explicó anteriormente, se obtiene una curva sigmoidea, con dos mesetas, encontrándose el IC_{50} en el punto medio de ambas. En la siguiente figura se pueden observar las curvas sigmoideas obtenidas para los 4 complejos (Figura 42).

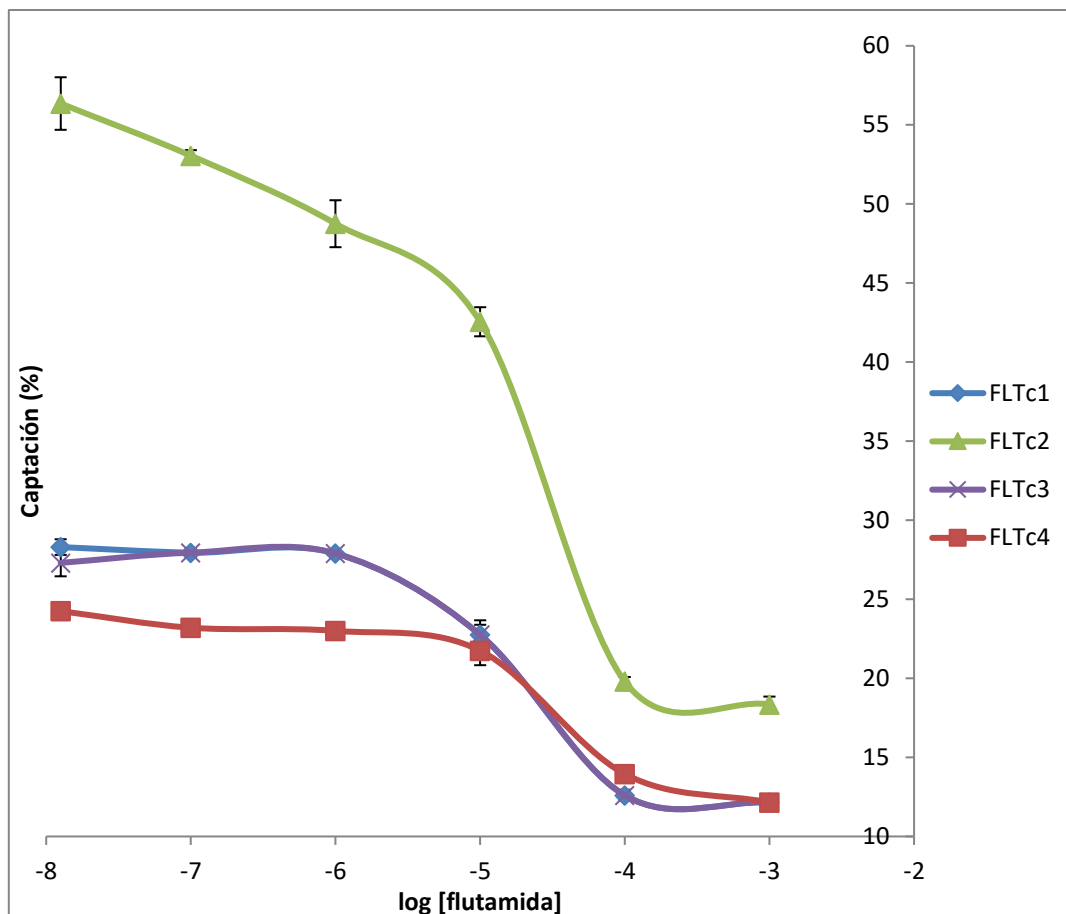


Figura 42: Resultado de los estudios de competencia de los cuatro complejos desarrollados.

Los valores de IC_{50} obtenidos para los complejos se pueden ver en la tabla 35.

Tabla 35: Valores de IC_{50} de los cuatro complejos.

Complejo	IC_{50} (μM)
FLTc1	55.8 ± 7.6
FLTc2	36.8 ± 9.6
FLTc3	41.2 ± 11.2
FLTc4	77.2 ± 10.4

Cuanto menor es el valor obtenido de IC_{50} , mejor es la afinidad de unión del complejo al blanco molecular, porque es menor la concentración del ligando requerida para competir con elevada afinidad por los sitios de receptor. Al comparar los valores de IC_{50} de una familia de complejos estudiados permite posicionar mediante las afinidades relativas al receptor e identificar el o los complejos más promisorios. Para esta familia de complejos se observó que FLTc2 y FLTc3 obtuvieron los valores más promisorios. FLTc1 posee un valor intermedio. FLTc4 es el complejo que posee menor afinidad de los cuatro complejos estudiados tendiendo un valor de casi el doble que FLTc2.

Con respecto a la flutamida, molécula de partida para el desarrollo de estos complejos, todos los complejos poseen un IC_{50} que se encuentran en el rango micromolar al igual que ésta (IC_{50} flutamida= 0.9 μ M). Sin embargo, los valores de IC_{50} reportados reflejan una leve pérdida de afinidad por el receptor de andrógenos. El grupo oxo de la amida presente en los ligandos tiene un papel clave en la unión con el receptor, ya que es capaz de formar enlaces de hidrógeno con una molécula de agua y un oxígeno presente en un residuo de leucina (Leu873) presente en la hélice 11 del RA. La derivatización de los ligandos para introducir los grupos quelantes puede alterar la conformación espacial del farmacóforo dificultando la interacción con el receptor y por ende disminuyendo la afinidad [160].

5. CONCLUSIONES

En este trabajo de posgrado se desarrollaron nuevos trazadores para Imagenología Molecular en cáncer de mama y próstata. Partiendo del neuropéptido Y se desarrollaron tres ligandos, uno para la marcación con $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ (L1) y dos para la marcación de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ (L2, L3). Los ligandos contienen 9 aminoácidos pertenecientes al extremo carboxilo terminal de la secuencia del péptido original del NPY con ciertas modificaciones de la secuencia original convirtiéndolo en un ligando específico para el receptor tipo 1 de NPY. Además, estos ligandos contenían los átomos donadores de electrones adecuados para coordinar cada metal. La marcación de L1 se realizó mediante la formación de un complejo del tipo $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ (V) nitruro. La marcación de L2 y L3 se realizó mediante la formación de un complejo entre el metal y el agente bifuncional NOTA.

Se obtuvieron los 3 complejos con elevada pureza radioquímica, con notable estabilidad en el medio de reacción y en plasma humano, no se observándose productos de descomposición o degradación de los complejos en tiempos estudiados. Los valores de lipofilidad obtenidos concuerdan con las estructuras propuestas, siendo todos ellos hidrofílicos. No es necesario que estos complejos penetren la membrana biológica, ya que el receptor de NPY tipo 1 es un receptor de membrana y los complejos se internalizan dentro de las células como consecuencia de la interacción con el mismo. Ambos complejos de galio resultaron notoriamente más hidrofílicos con respecto al complejo de tecnecio, probablemente debido a la presencia del agente quelante NOTA en su estructura. Entre NPGa1 y NPGa2, se puede observar una diferencia significativa en los valores de Log P, siendo NPGa1 más hidrofílico que NPGa2, debido a la ausencia del grupo acetilo en la amina primaria de la lisina. La amina sin acetilar, presente en NPGa1, posee la capacidad de generar puentes de hidrógenos con las moléculas de agua presentes en el medio, de ahí su mayor afinidad por el medio acuoso con respecto a NPGa2. NPTc1 presentó los valores más bajos de UPP de los 3 complejos estudiados, seguido por NPGa2. Al comparar NPGa1 y NPGa2, se pudo observar que NPGa1 obtuvo un valor de UPP levemente mayor a NPGa2, posiblemente debido a que posee la

capacidad de establecer interacciones con proteínas mediante el átomo de nitrógeno en la amina de la lisina. Al estudiar la estabilidad de los complejos frente a agentes competitivos, se observó que los 3 complejos fueron estables, no se observó transquelación.

Los estudios de unión a células de cáncer de mama mostraron que los tres complejos poseen una captación específica. Todos ellos son internalizados dentro de las células rápidamente, observándose que más del 80 % de la actividad ingresa en la primera hora de incubación. Los valores de captación y eflujo celular permanecen constantes en los tiempos estudiados. NPGa2 tuvo la mayor captación (8.0 ± 0.4 %), y el menor valor de eflujo (15.7 ± 1.2 %), por lo que es el complejo que mantiene la actividad biológica de manera más eficaz. Los resultados obtenidos muestran que la unión reportada es específica, en el rango nanomolar, al igual que el NPY nativo. Los 3 complejos poseen valores estadísticamente similares de IC_{50} , lo que permite deducir que la unión al receptor depende principalmente de la secuencia peptídica y no del radionucleido o método de marcación utilizado.

Además, se evaluó la estabilidad de los complejos *in vivo* y vías de eliminación en animales sanos. Los complejos no sufrieron descomposición *in vivo*. La vía de eliminación principal de NPTc1 es hepatobiliar, en cambio, NPGa1 y NPGa2 presentan excreción principalmente urinaria. Los estudios de biodistribución en animales portadores de tumor xenográfico demostraron que ambos complejos de galio poseen mayor captación en tumor *versus* músculo y también mayor relación tumor/ sangre, con respecto a NPTc1. Los valores obtenidos son adecuados, pero no son tan elevados como los reportados en otros agentes para diagnóstico imagenológico para esta patología seguramente debido a que los receptores NPYr1 son expresados en menor cantidad que otros receptores presentes en otras patologías.

Otro de los objetivos de este trabajo fue el desarrollo de cuatro complejos derivados de la flutamida para Imagenología Molecular de cáncer de próstata. Tomando como base la estructura de la flutamida, antiandrógeno no esteroideo capaz de unirse con elevada afinidad al receptor de andrógenos, se desarrollaron cuatro ligandos conteniendo

átomos donadores de electrones capaces de coordinar el tecnecio. La marcación de L4, L5, L6, fue mediante la formación de complejos del tipo $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{I})$ -tricarbonílico y la marcación de L7 se llevó a cabo mediante la formación de un complejo $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{V})$ -nitruro.

Todos los complejos resultaron estables en el medio de reacción y en plasma humano, no evidenciándose descomposición o degradación durante el tiempo de estudio. Además, fueron estables frente a agentes competitivos por al menos 4 horas, no observándose transquelación. Todos los complejos obtenidos resultaron lipofílicos, con valores de Log P dentro del rango óptimo para la difusión a través de la membrana citoplasmática. Esta característica es muy importante dado que el receptor de andrógenos se encuentra en el citoplasma celular. La unión a proteínas plasmáticas resultó moderada, obteniéndose valores entre 14-42 %. La diferencia encontrada para los diferentes complejos desarrollados se correlaciona con las estructuras y cargas netas de los complejos obtenidos. Todos los complejos presentaron una unión a proteínas significativamente inferior a la flutamida (UPP: 95 ± 1 %). FLTc2 y FLTc3 son los complejos con menor y mayor valor de UPP, respectivamente. Este resultado es coherente con la estructura ya que ambos complejos, poseen el mismo sistema quelante para el tecnecio y diferente largo de la cadena espaciadora. Al aumentar el largo del espaciador, existe un alejamiento del quelante respecto a la parte biológicamente activa de la molécula, por ende, disminuye el impedimento estérico, permitiendo así la interacción con otras moléculas, como proteínas plasmáticas.

Se evaluó también la captación de los complejos en células que expresan el RA (LNCaP) y en otras que no lo expresan (PC3). En la línea LNCaP, se pudo observar que existe una unión específica a las células, ya que la misma puede ser bloqueada por saturación del RA con flutamida. La captación varía según el complejo en estudio, desde 19-55%. FLTc3 posee la captación en LNCaP más elevada y el menor valor de externalización celular. En cambio, FLTc4 presentó el menor valor de captación en células RA positivas, y el mayor valor de eflujo.

Todos los complejos estudiados mostraron una captación significativamente menor en

células PC3 con relación a la observada en LNCaP. Esta captación en células RA-, no es específica y puede deberse a la lipofilicidad de los complejos que les permite ingresar a las células por difusión pasiva y unirse inespecíficamente a estructuras celulares.

Con respecto al IC_{50} , valor que refleja la afinidad de unión del complejo con el blanco molecular, los complejos FLTc2 y FLTc3 presentaron los mejores resultados respecto a los cuatro complejos estudiados. Sin embargo, respecto a otros complejos reportados en bibliografía se observó que poseen menores afinidades por el receptor.

Como resultado de este trabajo de posgrado se obtuvo un trazador, NPGa2, con adecuadas características para su potencial uso en la detección de receptores de NPY tipo 1 presentes en cáncer de mama. Los resultados obtenidos abren las puertas para el desarrollo de nuevos complejos derivados de péptidos y modificar las estrategias de marcación utilizadas.

Con respecto a los complejos de flutamida, se observó que FLTc3 es el trazador que se ha obtenido con mejores características para imagenología de receptores de andrógenos en cáncer de próstata. Es necesario realizar estudios en animales portadores de tumor con el fin de estudiar los perfiles de biodistribución y captación en tejido blanco de los complejos. Además, los resultados obtenidos han representado unos de los primeros acercamientos del grupo de investigación al estudio y desarrollo de radiotrazadores para cáncer de próstata y especialmente en la realización de estudios biológicos *in vitro*. Por lo tanto, la experiencia obtenida brinda información sumamente útil para investigaciones futuras para el desarrollo de potenciales radiofármacos para cáncer de próstata con expresión de receptores de andrógenos.

En conclusión, el trabajo de posgrado presentado abarcó todas las etapas básicas para el desarrollo de un radiofármaco. Se comenzó mediante la selección del farmacóforo, se sintetizaron los complejos, se realizó la caracterización fisicoquímica y biológica *in vivo* e *in vitro*. Además, se trabajó con dos radionucleidos metálicos diferentes, el $[^{99m}Tc]Tc$ y el $[^{68}Ga]Ga$. Por esta razón, fue necesario ahondar en el conocimiento de estos radionucleidos y en las diferentes técnicas para las marcaciones. Además, se profundizó en conocimientos en el área biológica, especialmente en el trabajo con distintas líneas

celulares *in vitro* y manejo de animales de laboratorio. Como resultado global, se cuenta con 7 complejos metálicos completamente evaluados, abriendo las puertas para continuar mediante estas líneas de investigación.

Bibliografía.

- [1] E.S. Gonzalo, *Biología molecular en oncología: lo que un clínico debiera saber*, *Revista Médica Clínica Las Condes*. 24 (2013) 563–570. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(13\)70196-2](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(13)70196-2).
- [2] E. Barrios, M. Garau, *Cáncer: magnitud del problema en el mundo y en Uruguay, aspectos epidemiológicos*, *Anales de Facultad de Medicina (Universidad de La República Oriental Del Uruguay)*. 4 (2017) 9–46.
- [3] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*, *CA Cancer J Clin*. 71 (2021) 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- [4] D. Hanahan, R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: The next generation*, *Cell*. 144 (2011) 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [5] W.A. Berg, L. Gutierrez, M.S. Ness-Aiver, W.B. Carter, M. Bhargavan, R.S. Lewis, O.B. Ioffe, *Diagnostic accuracy of mammography, clinical examination, US, and MR imaging in preoperative assessment of breast cancer.*, *Radiology*. 233 (2004) 830–849. <https://doi.org/10.1148/radiol.2333031484>.
- [6] Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, *Situación epidemiológica del Uruguay en relación al cáncer*, Montevideo, 2022.
- [7] J.S. Lewis, A.D. Windhorst, B.M. Zeglis, *Radiopharmaceutical Chemistry*, Primera edición, Springer Nature Switzerland AG, Cham, 2019.
- [8] N.J. Long, W.-T. Wong, *The chemistry of molecular imaging*, 2015.
- [9] S. Vallabhajosula, *Molecular imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT*, Springer Berlin Heidelberg, 2009. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-76735-0>.
- [10] T.J. Wadas, E.H. Wong, G.R. Weisman, C.J. Anderson, *Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease*, *Chem Rev*. 110 (2010) 2858–2902. <https://doi.org/10.1021/cr900325h>.
- [11] C.F. Ramogida, C. Orvig, *Tumour targeting with radiometals for diagnosis and therapy*, *Chemical Communications*. 49 (2013) 4720–4739. <https://doi.org/10.1039/c3cc41554f>.
- [12] S.L. Pimlott, A. Sutherland, *Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease*, *Chem Soc Rev*. 40 (2011) 149–162. <https://doi.org/10.1039/b922628c>.
- [13] P.W. Miller, N.J. Long, R. Vilar, A.D. Gee, *Synthesis of ¹¹C, ¹⁸F, ¹⁵O, and ¹³N radiolabels for positron emission tomography*, *Angewandte Chemie - International Edition*. 47 (2008) 8998–9033. <https://doi.org/10.1002/anie.200800222>.
- [14] R.J. Kowalsky, S.W. Falen, *Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine*, 2da edición, American Pharmacists Association, Washington D.C., 2004.
- [15] Y. Chain, L. Ilanes, *Radiofármacos en medicina nuclear: Fundamentos y aplicación clínica*, 2015.
- [16] S. Liu, *The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals*, *Chem Soc Rev*. 33 (2004) 445–461. <https://doi.org/10.1039/b309961j>.

- [17] T.I. Kostelnik, C. Orvig, Radioactive Main Group and Rare Earth Metals for Imaging and Therapy, *Chem Rev.* 119 (2019) 902–956. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00294>.
- [18] S. Liu, Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides, *Adv Drug Deliv Rev.* 60 (2008) 1347–1370. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.04.006>.
- [19] S. Bhattacharyya, M. Dixit, Metallic radionuclides in the development of diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals, *Journal of the Chemical Society. Dalton Transactions.* 40 (2011) 6129–6143. <https://doi.org/10.1039/c0dt01398f>.
- [20] C. Morgat, E. Hindie, A.K. Mishra, M. Allard, P. Fernandez, Gallium-68: Chemistry and radiolabeled peptides exploring different oncogenic pathways, *Cancer Biother Radiopharm.* 28 (2013) 85–97. <https://doi.org/10.1089/cbr.2012.1244>.
- [21] M.J. Welch, C.S. Redvanly, *Handbook of radiopharmaceuticals : radiochemistry and applications*, J. Wiley, 2003.
- [22] D. Rattat, A. Verbruggen, H. Berke, R. Alberto, Exploring the nitrosyl-approach: “Re(CO)₂(NO)”- and “Tc(CO)₂(NO)”-complexes provide new pathways for bioorganometallic chemistry, *J Organomet Chem.* 689 (2004) 4833–4836. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2004.09.074>.
- [23] Z. Li, T. Chu, X. Liu, X. Wang, Synthesis and in vitro and in vivo evaluation of three radioiodinated nitroimidazole analogues as tumor hypoxia markers, *Nucl Med Biol.* 32 (2005) 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2005.01.004>.
- [24] K.E. Linder, Y.-W. Chan, J.E. Cyr, M.F. Malley, D.P. Nowotnik, A.D. Nunn, TcO (PnAO-1-(2-nitroimidazole)) [BMS-18132 13], a New Technetium-Containing Nitroimidazole Complex for Imaging Hypoxia: Synthesis, Characterization, and Xanthine Oxidase-Catalyzed Reduction, *J. Med. Chem.* 37 (1994) 9–17.
- [25] Jurisson, D. Berning, W. Jia, O. Ma, *Coordination Compounds in Nuclear Medicine*, *Chem. Rev.* 93 (1993) 1137–1156.
- [26] G. Bandoli, A. Dolmella, M. Porchia, F. Refosco, F. Tisato, Structural overview of technetium compounds (1993-1999), *Coord Chem Rev.* 214 (2001) 43–90.
- [27] A. Duatti, A. Boschi, L. Uccelli, Technetium-99m Nitrido Radiopharmaceuticals with Unprecedented Biological Properties, *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 45 (2002) 135–142.
- [28] J. Baldas, J. Bonnyman, 99mTc-Nitrido Radiopharmaceuticals Based on Nitrogen Heterocyclic Ligands Containing a Thiol Group, *Nucl Med Biol.* 15 (1988) 451–457.
- [29] J. Baldas, J. Bonnyman, The 99mTc-Nitrido complex of tropolone: A highly lipophilic blood labelling agent, *J Radioanal Nucl Chem.* 105 (1986) 267–276.
- [30] J. Baldas, J. Bonnyman, G.A. Williams, Studies of Technetium Complexes. 9. Use of the Tetrachloronitridotechnetate(VI) Anion for the Preparation of Nitrido Complexes of Technetium. Crystal Structure of Bis(8-quinolinethiolato) nitridotechnetium(V), *Inorg Chem.* 25 (1986) 150–153.
- [31] J.C.S. Dalton, J. Baldas, J. Bonnyman, P.M. Pojer, G.A. Williams, M.F. Mackay, Synthesis and Structure of Bis(diethyldithiocarbamate)nitridotechnetium(v) : A Technetium-Nitrogen Triple Bond, *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions.* (1981) 1798–1801.
- [32] A.M. Rey, APLICACIÓN DE NUEVOS CORES DE Tc, Montevideo, n.d.
- [33] C. Bolzati, N. Salvarese, B. Spolaore, A. Vittadini, D. Forrer, S. Brunello, S. Ghiani, A. Maiocchi, Water-soluble [Tc(N)(PNP)]-moiety for room temperature 99m Tc-

- labeling of sensitive target vectors, *Mol Pharm.* 19 (2022) 876–894.
- [34] A. Duatti, C. Bolzati, L. Uccelli, G.L. Zucchini, Literature Highlights - 42* Technetium-99m nitride radiopharmaceuticals, *Transition Metal Chemistry.* (1997) 313–314.
- [35] A. Boschi, L. Uccelli, L. Marvelli, C. Cittanti, M. Giganti, P. Martini, Technetium-99m Radiopharmaceuticals for Ideal Myocardial Perfusion Imaging: Lost and Found Opportunities, *Molecules.* 27 (2022) 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules27041188>.
- [36] R. Alberto, R. Schibli, A. Egli, A.P. Schubiger, U. Abram, T.A. Kaden, A Novel Organometallic Aqua Complex of Technetium for the Labeling of Biomolecules: Synthesis of $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ from $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ in Aqueous Solution and Its Reaction with a Bifunctional Ligand, *Eur. J. Nucl. Med.* 114 (1992) 7987–7988.
- [37] R. Alberto, R. Schibli, U. Abram, A. Egli, R. Knapp, P.A. Schubiger, Potential of the “[M(CO)₃]⁺” (M=Re, Tc) Moiety for the Labeling of Biomolecules, *Radiochim Acta.* 79 (1997) 99–103.
- [38] U. Abram, R. Alberto, Technetium and Rhenium-Coordination Chemistry and Nuclear Medical Applications, *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (2006) 1486–1500.
- [39] International Atomic Energy Agency, Technetium-99m Radiopharmaceuticals: Status and Trends, Vienna, 2009. <http://www.iaea.org/Publications/index.html>.
- [40] S. Mundwiler, M. Kündig, K. Ortner, R. Alberto, A new [2 + 1] mixed ligand concept based on $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$: A basic study, *Journal of the Chemical Society. Dalton Transactions.* 4 (2004) 1320–1328. <https://doi.org/10.1039/b400220b>.
- [41] F. Zobi, B. Spingler, R. 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) 2859–2865. <https://doi.org/10.1039/b503874j>.
- [42] R. Alberto, R. Schibli, A.P. Schubiger, U. Abram, H.J. Pietzsch, B. Johannsen, First application of fac- $[(^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ in bioorganometallic chemistry: Design, structure, and in vitro affinity of a 5-HT(1A) receptor ligand labeled with (^{99m}Tc) , *J Am Chem Soc.* 121 (1999) 6076–6077. <https://doi.org/10.1021/ja990765a>.
- [43] C. Schmidkonz, C. Hollweg, M. Beck, J. Reinfelder, T.I. Goetz, J.C. Sanders, D. Schmidt, O. Prante, T. Bäuerle, A. Cavallaro, M. Uder, B. Wullich, P. Goebell, T. Kuwert, P. Ritt, ^{99m}Tc -MIP-1404-SPECT/CT for the detection of PSMA-positive lesions in 225 patients with biochemical recurrence of prostate cancer, *Prostate.* (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1002/pros.23444>.
- [44] C. Schmidkonz, M. Cordes, M. Beck, T.I. Goetz, D. Schmidt, O. Prante, T. Bäuerle, M. Uder, B. Wullich, P. Goebell, T. Kuwert, P. Ritt, SPECT/CT with the PSMA Ligand ^{99m}Tc -MIP-1404 for Whole-Body Primary Staging of Patients with Prostate Cancer, *Clin Nucl Med.* 43 (2018) 225–231. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000001991>.
- [45] K.P. Maresca, S.M. Hillier, G. Lu, J.C. Marquis, C.N. Zimmerman, W.C. Eckelman, J.L. Joyal, J.W. Babich, Small molecule inhibitors of PSMA incorporating technetium-99m for imaging prostate cancer: Effects of chelate design on pharmacokinetics, *Inorganica Chim Acta.* 389 (2012) 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2012.03.002>.
- [46] S.M. Hillier, K.P. Maresca, G. Lu, R.D. Merkin, J.C. Marquis, C.N. Zimmerman, W.C.

- Eckelman, J.L. Joyal, J.W. Babich, 99mTc-labeled small-molecule inhibitors of prostate-specific membrane antigen for molecular imaging of prostate cancer, *Journal of Nuclear Medicine*. 54 (2013) 1369–1376. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.116624>.
- [47] S. Nawaz, A New Gallium-68 Labelled Imaging Agent for Prostate Cancer, 2013. <https://kclpure.kcl.ac.uk/portal/>.
- [48] D. Shetty, Y.S. Lee, J.M. Jeong, 68Ga-labeled radiopharmaceuticals for positron emission tomography, *Nucl Med Mol Imaging*. 44 (2010) 233–240. <https://doi.org/10.1007/s13139-010-0056-6>.
- [49] H.R. Maecke, J.P. André, 68 Ga-PET Radiopharmacy: A Generator-Based Alternative to 18 F-Radiopharmacy, *Ernst Schering Res Found Workshop*. 62 (2007) 215–242.
- [50] J.M. Zorrilla, J.C. Arencibia, Radiofármacos de galio 68, *Nucleus N*. 51 (2012) 1–5.
- [51] W.R. Harris, V.L. Pecoraro, Thermodynamic binding constants for gallium transferrin, *Physical Chemistry of Macromolecules*. 22 (1983) 206–214.
- [52] E.L. Ramos, S.L. Ramos, C.J. Cortés García, D. Socorro, L. Ramos, Agentes bifuncionales utilizados en la síntesis de radiofármacos, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 44 (2013) 7–23.
- [53] P. Spang, C. Herrmann, F. Roesch, Bifunctional Gallium-68 Chelators: Past, Present, and Future, *Semin Nucl Med*. 46 (2016) 373–394. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2016.04.003>.
- [54] R. Nacional De Cáncer, SITUACION EPIDEMIOLOGICA DEL URUGUAY EN RELACION AL CANCER, 2021.
- [55] A. Heesch, J. Maurer, E. Stickeler, M. Beheshti, F.M. Mottaghy, A. Morgenroth, Development of Radiotracers for Breast Cancer-The Tumor Microenvironment as an Emerging Target, *Cells*. 9 (2020). <https://doi.org/10.3390/cells9102334>.
- [56] I. Peñuelas, I. Domínguez-Prado, M.J. García-Velloso, J.M. Martí-Climent, M. Rodríguez-Fraile, C. Caicedo, M. Sánchez-Martínez, J.A. Richter, PET tracers for clinical imaging of breast cancer, *J Oncol*. 2012 (2012) 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/710561>.
- [57] F. Cardoso, S. Kyriakides, S. Ohno, F. Penault-Llorca, P. Poortmans, I.T. Rubio, S. Zackrisson, L. Switzerland, Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, *Ann. Oncol*. 30 (2019) 1194–1220. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz173/5499075>.
- [58] A. Gennari, F. André, C.H. Barrios, J. Cortés, E. de Azambuja, A. DeMichele, R. Dent, D. Fenlon, J. Gligorov, S.A. Hurvitz, S.A. Im, D. Krug, W.G. Kunz, S. Loi, F. Penault-Llorca, J. Ricke, M. Robson, H.S. Rugo, C. Saura, P. Schmid, C.F. Singer, T. Spanic, S.M. Tolaney, N.C. Turner, G. Curigliano, S. Loibl, S. Paluch-Shimon, N. Harbeck, ESMO Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer ☆, *Annals of Oncology*. 32 (2021) 1475–1495. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.09.019>.
- [59] P.Y. Salaün, R. Abgral, O. Malard, S. Querellou-Lefranc, G. Quere, M. Wartski, R. Coriat, E. Hindie, D. Taieb, A. Tabarin, A. Girard, J.F. Grellier, I. Brenot-Rossi, D. Groheux, C. Rousseau, D. Deandreis, J.L. Alberini, C. Bodet-Milin, E. Itti, O. Casasnovas, F. Kraeber-Bodere, P. Moreau, A. Philip, C. Balleyguier, A. Luciani, F. Cachin, Good clinical practice recommendations for the use of PET/CT in oncology, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 47 (2020) 28–50.

- <https://doi.org/10.1007/s00259-019-04553-8>.
- [60] M. Balma, V. Liberini, M. Racca, R. Laudicella, M. Bauckneht, A. Buschiazzo, D.G. Nicolotti, S. Peano, A. Bianchi, G. Albano, N. Quartuccio, R. Abgral, S.D. Morbelli, C. D'Alessandria, E. Terreno, M.W. Huellner, A. Papaleo, D. Deandreis, Non-conventional and Investigational PET Radiotracers for Breast Cancer: A Systematic Review, *Front Med (Lausanne)*. 9 (2022). <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.881551>.
- [61] M. Graham, Receptor imaging, in: *Molecular Imaging: An Introduction*, Cambridge University Press, 2017: pp. 43–46. <https://doi.org/10.1017/9781107360044.011>.
- [62] M. Schottelius, H.J. Wester, Molecular imaging targeting peptide receptors, *Methods*. 48 (2009) 161–177. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.03.012>.
- [63] S. Loibl, L. Gianni, HER2-positive breast cancer, *The Lancet*. 389 (2017) 2415–2429. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32417-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32417-5).
- [64] M.A. Mintun, M.J. Welch, B.A. Siegel, C.J. Mathias, M.S. James W Brodack, A.H. McGuire, J.A. Katzenellenbogen, Breast cancer: PET imaging of estrogen receptors, *Radiology*. 169 (1988) 45–48.
- [65] C.M. Venema, G. Apollonio, G.A.P. Hospers, C.P. Schröder, R.A.J.O. Dierckx, E.F.J. de Vries, A.W.J.M. Glaudemans, Recommendations and technical aspects of 16 α -[18F]Fluoro-17 β -Estradiol PET to image the estrogen receptor in vivo, *Clin Nucl Med*. 41 (2016) 844–851. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000001347>.
- [66] M. Paquette, É. Lavallée, S. Phoenix, R. Ouellet, H. Senta, J.E. van Lier, B. Guérin, R. Lecomte, É.E. Turcotte, Improved estrogen receptor assessment by PET using the novel radiotracer 18 F-4FMFES in estrogen receptor–positive breast cancer patients: An ongoing phase II clinical trial, *Journal of Nuclear Medicine*. 59 (2018) 197–203. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.194654>.
- [67] D. Xu, R. Zhuang, L. You, Z. Guo, X. Wang, C. Peng, D. Zhang, P. Zhang, H. Wu, W. Pan, X. Zhang, 18F–labeled estradiol derivative for targeting estrogen receptor-expressing breast cancer, *Nucl Med Biol*. 59 (2018) 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2018.01.003>.
- [68] M.E.H. Hammond, D.F. Hayes, M. Dowsett, D. Craig Allred, K.L. Hagerty, S. Badve, P.L. Fitzgibbons, G. Francis, N.S. Goldstein, M. Hayes, D.G. Hicks, S. Lester, R. Love, P.B. Mangu, L. McShane, K. Miller, C. Kent Osborne, S. Paik, J. Perlmutter, A. Rhodes, H. Sasano, J.N. Schwartz, F.C. G Sweep, S. Taube, E. Emilia Torlakovic, P. Valenstein, G. Viale, D. Visscher, T. Wheeler, R. Bruce Williams, J.L. Wittliff, A.C. Wolff, American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer (Unabridged Version), *Arch Pathol Lab Med*. 134 (2010) e48–e72.
- [69] S. Cunha, L. Gano, G. Ribeiro Morais, T. Thiemann, M.C. Oliveira, Progesterone receptor targeting with radiolabelled steroids: An approach in predicting breast cancer response to therapy, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 137 (2013) 223–241. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.04.003>.
- [70] G. Viale, M.M. Regan, E. Maiorano, M.G. Mastropasqua, P. Dell'Orto, B.B. Rasmussen, J. Raffoul, P. Neven, Z. Orosz, S. Braye, C. Öhlschlegel, B. Thürlimann, R.D. Gelber, M. Castiglione-Gertsch, K.N. Price, A. Goldhirsch, B.A. Gusterson, A.S. Coates, Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of

- estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98, *Journal of Clinical Oncology*. 25 (2007) 3846–3852. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.9453>.
- [71] R. Natrajan, B. Weigelt, A. Mackay, F.C. Geyer, A. Grigoriadis, D.S.P. Tan, C. Jones, C.J. Lord, R. Vatcheva, S.M. Rodriguez-Pinilla, J. Palacios, A. Ashworth, J.S. Reis-Filho, An integrative genomic and transcriptomic analysis reveals molecular pathways and networks regulated by copy number aberrations in basal-like, HER2 and luminal cancers, *Breast Cancer Res Treat*. 121 (2010) 575–589. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0501-3>.
- [72] M.G. Pomper, J.A. Katzenellenbogen, M.J. Welch, J.W. Brodack, C.J. Mathias, 21-[18F]Fluoro-16 α -ethyl-19-norprogesterone: Synthesis and Target tissue selective uptake of a progestin receptor based radiotracer for positron emission tomography, *J Med Chem*. 31 (1988) 1360–1363.
- [73] F. Dehdashti, A.H. Mcguire, H.F. van Brocklin, B.A. Siegel, D.P. Andriole, L.K. Griffeth, M.G. Pomper, J.A. Katzenellenbogen, M.J. Welch, Assessment of 21-[18F]Fluoro-16 α -Ethyl-19-Norprogesterone a Positron-Emitting Radiopharmaceutical for the Detection of Progestin Receptors in Human Breast Carcinomas, *The Journal of Nuclear Medicine*. 32 (1991) 1532–1537.
- [74] A. Verhagen, M. Studeny, G. Luurstema, G.M. Visser, C.C.J. de Goeij, M. Sluysen, O.E. Nieweg, E. van der Ploeg, K.G. Go, W. Vaalburg, Metabolism of a [18F]Fluorine Labeled Progestin (21-[18F]Fluoro-16 α -ethyl-19-norprogesterone) in Humans: a Clue for Future Investigations, *Nucl Med Biol*. 21 (1994) 941–952.
- [75] D. Vijaykumar, W. Mao, K.S. Kirschbaum, J.A. Katzenellenbogen, An efficient route for the preparation of a 21-fluoro progestin-16 α ,17 α -dioxolane, a high-affinity ligand for PET imaging of the progesterone receptor, *Journal of Organic Chemistry*. 67 (2002) 4904–4910. <https://doi.org/10.1021/jo020190r>.
- [76] B. O Buckman, T.A. Bonasera, K.S. Kirschbaum, M.J. Welch, J.A. Katzenellenbogen, Fluorine-18-Labeled Progestin 16 α 17 α -Dioxolanes: Development of High-Affinity Ligands for the Progesterone Receptor with High in Vivo Target Site Selectivity, *J Med Chem*. 38 (1995) 328–337.
- [77] E. Hamilton, M. Shastry, S.M. Shiller, R. Ren, Targeting HER2 heterogeneity in breast cancer, *Cancer Treat Rev*. 100 (2021) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102286>.
- [78] P. Carter, L. Presta, C.M. Gormant, J.B.B. Ridgway, D. Hennert, W. Lee, T. Wongt, A.M. Rowlandf, C. Kotts, M.E. Carvert, H.M. Shepard, Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy, *Immunology*. 89 (1992) 4285–4289.
- [79] A.J. Chang, R. DeSilva, S. Jain, K. Lears, B. Rogers, S. Lapi, 89Zr-radiolabeled trastuzumab imaging in orthotopic and metastatic breast tumors, *Pharmaceuticals*. 5 (2012) 79–93. <https://doi.org/10.3390/ph5010079>.
- [80] E.C. Dijkers, T.H. Oude Munnink, J.G. Kosterink, A.H. Brouwers, P.L. Jager, J.R. de Jong, G.A. van Dongen, C.P. Schröder, M.N. Lub-De Hooge, E.G. de Vries, Biodistribution of 89 Zr-trastuzumab and PET Imaging of HER2-Positive Lesions in Patients with Metastatic Breast Cancer, *Clin Pharmacol Ther*. 87 (2010) 586–592. <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.12>.
- [81] D. Harari, Y. Yarden, Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in

- breast cancer, *Oncogene*. 19 (2000) 6102–6114. <http://www.prous.com/herceptin>.
- [82] J. Kreutzfeldt, B. Rozeboom, N. Dey, P. De, The trastuzumab era: current and upcoming targeted HER2+ breast cancer therapies, *Am J Cancer Res*. 10 (2020) 1045–1067. www.ajcr.us/.
- [83] I. Velikyan, P. Schweighöfer, J. Feldwisch, J. Seemann, F.Y. Frejd, H. Lindman, J. Sörensen, Diagnostic HER2-binding radiopharmaceutical, [68 Ga]Ga-ABY-025, for routine clinical use in breast cancer patients, *Am J Nucl Med Mol Imaging*. 9 (2019) 12–23. www.ajnmml.us/ISSN:2160-8407/ajnmml0090104.
- [84] K. Tamura, H. Kurihara, K. Yonemori, H. Tsuda, J. Suzuki, Y. Kono, N. Honda, M. Kodaira, H. Yamamoto, M. Yunokawa, C. Shimizu, K. Hasegawa, Y. Kanayama, S. Nozaki, T. Kinoshita, Y. Wada, S. Tazawa, K. Takahashi, Y. Watanabe, Y. Fujiwara, 64Cu-DOTA-trastuzumab PET imaging in patients with HER2-positive breast cancer, *Journal of Nuclear Medicine*. 54 (2013) 1869–1875. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.118612>.
- [85] S. Hu, D.O. Kiesewetter, L. Zhu, N. Guo, H. Gao, G. Liu, N. Hida, L. Lang, G. Niu, X. Chen, Longitudinal PET imaging of doxorubicin-induced cell death with 18F-annexin v, *Mol Imaging Biol*. 14 (2012) 762–770. <https://doi.org/10.1007/s11307-012-0551-5>.
- [86] X. Li, J.M. Link, S. Stekhova, K.J. Yagle, C. Smith, K.A. Krohn, J.F. Tait, Site-specific labeling of annexin V with F-18 for apoptosis imaging, *Bioconjug Chem*. 19 (2008) 1684–1688. <https://doi.org/10.1021/bc800164d>.
- [87] D. Zwanziger, I. Böhme, D. Lindner, A.G. Beck-Sickinger, First selective agonist of the neuropeptide Y1-receptor with reduced size, *Journal of Peptide Science*. 15 (2009) 856–866. <https://doi.org/10.1002/psc.1188>.
- [88] I.U. Khan, D. Zwanziger, I. Böhme, M. Javed, H. Naseer, S.W. Hyder, A.G. Beck-Sickinger, Breast-cancer diagnosis by neuropeptide y analogues: From synthesis to clinical application, *Angewandte Chemie - International Edition*. 49 (2010) 1155–1158. <https://doi.org/10.1002/anie.200905008>.
- [89] M. Körner, J.C. Reubi, NPY receptors in human cancer: A review of current knowledge, *Peptides (N.Y.)*. 28 (2007) 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.08.037>.
- [90] E.D. Hostetler, S. Sanabria-Bohórquez, H. Fan, Z. Zeng, L. Gantert, M. Williams, P. Miller, S. O'Malley, M. Kameda, M. Ando, N. Sato, S. Ozaki, S. Tokita, H. Ohta, D. Williams, C. Sur, J.J. Cook, H.D. Burns, R. Hargreaves, Synthesis, characterization, and monkey positron emission tomography (PET) studies of [18F]Y1-973, a PET tracer for the neuropeptide Y Y1 receptor, *Neuroimage*. 54 (2011) 2635–2642. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.11.014>.
- [91] M. Langer, R. la Bella, E. Garcia-Garayoa, A.G. Beck-Sickinger, 99mTc-labeled neuropeptide Y analogues as potential tumor imaging agents, *Bioconjug Chem*. 12 (2001) 1028–1034. <https://doi.org/10.1021/bc015514h>.
- [92] X. Pedragosa-Badia, J. Stichel, A.G. Beck-Sickinger, Neuropeptide y receptors: How to get subtype selectivity, *Front Endocrinol (Lausanne)*. 4 (2013). <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00005>.
- [93] J. Li, Y. Tian, A. Wu, Neuropeptide Y receptors: a promising target for cancer imaging and therapy, *Regen Biomater*. 2 (2015) 215–219. <https://doi.org/10.1093/rb/rbv013>.

- [94] D. Zwanziger, U.K. Irfan, I. Neundorf, S. Sieger, L. Lehmann, M. Friebe, L. Dinkelborg, A.G. Beck-Sickinger, Novel chemically modified analogues of neuropeptide Y for tumor targeting, *Bioconjug Chem.* 19 (2008) 1430–1438. <https://doi.org/10.1021/bc7004297>.
- [95] R.M. Soll, M.C. Dinger, I. Lundell, D. Larhammer, A.G. Beck-Sickinger, Novel analogues of neuropeptide Y with a preference for the Y 1-receptor, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 2828–2837.
- [96] M. Kameda, M. Ando, C. Nakama, K. Kobayashi, H. Kawamoto, S. Ito, T. Suzuki, T. Tani, S. Ozaki, S. Tokita, N. Sato, Synthesis and evaluation of a series of 2,4-diaminopyridine derivatives as potential positron emission tomography tracers for neuropeptide Y Y1 receptors, *Bioorg Med Chem Lett.* 19 (2009) 5124–5127. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.07.030>.
- [97] E. Garcia-Garayoa, R. Schibli, P.A. Schubiger, Peptides radiolabeled with Re-186/188 and Tc-99m as potential diagnostic and therapeutic agents, *Nuclear Science and Techniques.* 18 (2007) 88–100. www.sciencedirect.com.
- [98] Laboratory of Nuclear Medicine Fundamentals of Tc-99m Nitrido Chemistry, Ferrara, n.d.
- [99] L. Brunton, B. Chabner, B. Knollman, Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica.*, 2012.
- [100] S. Schmidt, D. Gonzalez, H. Derendorf, Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics, *J Pharm Sci.* 99 (2010) 1107–1122. <https://doi.org/10.1002/jps.21916>.
- [101] G. Vannuruswamy, M.G. Jagadeeshaprasad, K. Kashinath, S.K. Kesavan, S. Bhat, A.M. Korwar, A.D. Chougale, R. Boppana, D.S. Reddy, M.J. Kulkarni, Molecules with: O -acetyl group protect protein glycation by acetylating lysine residues, *RSC Adv.* 6 (2016) 65572–65578. <https://doi.org/10.1039/c6ra11313c>.
- [102] Y. Zhang, Y. Liang, F. Huang, Y. Zhang, X. Li, J. Xia, Site-Selective Lysine Reactions Guided by Protein-Peptide Interaction, *Biochemistry.* 58 (2019) 1010–1018. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b01223>.
- [103] M. Memminger, M. Keller, M. Lopuch, N. Pop, G. Bernhardt, E. von Angerer, A. Buschauer, The Neuropeptide Y Y1 Receptor: A Diagnostic Marker? Expression in MCF-7 Breast Cancer Cells Is Down-Regulated by Antiestrogens In Vitro and in Xenografts, *PLoS One.* 7 (2012) 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051032>.
- [104] H. Amlal, S. Faroqui, A. Balasubramaniam, S. Sheriff, Estrogen up-regulates neuropeptide Y Y1 receptor expression in a human breast cancer cell line, *Cancer Res.* 66 (2006) 3706–3714. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2744>.
- [105] H.M. Bigott-Hennkens, S. Dannoon, M.R. Lewis, S.S. Jurisson, In vitro receptor binding assays general methods and considerations, *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 52 (2008) 245–253.
- [106] X.-J. Yang, V. v. Ogryzko, J. Nishikawa, B.H. Howard, Y. Nakatani, A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A, *Nature.* 382 (1996) 319–324.
- [107] S. Ghosh, B. Padmanabhan, C. Anand, V. Nagaraja, Lysine acetylation of the Mycobacterium tuberculosis HU protein modulates its DNA binding and genome organization, *Mol Microbiol.* 100 (2016) 577–588. <https://doi.org/10.1111/mmi.13339>.

- [108] Y. Xiong, K.L. Guan, Mechanistic insights into the regulation of metabolic enzymes by acetylation, *Journal of Cell Biology*. 198 (2012) 155–164. <https://doi.org/10.1083/jcb.201202056>.
- [109] P. Hein, M.C. Michel, K. Leineweber, T. Wieland, N. Wettschureck, S. Offermanns, Receptor and Binding Studies Radioligand Binding Studies in Cardiovascular Research (Saturation and Competition Binding Studies), in: *Practical Methods in Cardiovascular Research*, 2005: pp. 723–783.
- [110] S.M. Hacker, K.M. Backus, M.R. Lazear, S. Forli, B.E. Correia, B.F. Cravatt, Global profiling of lysine reactivity and ligandability in the human proteome, *Nat Chem*. 9 (2017) 1181–1190. <https://doi.org/10.1038/nchem.2826>.
- [111] C. Zhang, J. Pan, K.S. Lin, I. Dude, J. Lau, J. Zeisler, H. Merkens, S. Jenni, B. Guérin, F. Bénard, Targeting the Neuropeptide Y1 Receptor for Cancer Imaging by Positron Emission Tomography Using Novel Truncated Peptides, *Mol Pharm*. 13 (2016) 3657–3664. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00464>.
- [112] B. Guérin, V. Dumulon-Perreault, M.C. Tremblay, S. Ait-Mohand, P. Fournier, C. Dubuc, S. Authier, F. Bénard, [Lys(DOTA)4]BVD15, a novel and potent neuropeptide Y analog designed for Y1 receptor-targeted breast tumor imaging, *Bioorg Med Chem Lett*. 20 (2010) 950–953. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.12.068>.
- [113] M. Melis, *Radiopeptides for Targeted Tumour Therapy and the Kidney*, Erasmus University Rotterdam, 2010.
- [114] B.M. Koeppe, B.A. Stanton, *Renal Physiology*, 2019.
- [115] P. Singh, E. Draviam, Y.-S. Guo, A. Kurosky, Molecular characterization of bombesin receptors on rat pancreatic acinar AR42J cells, *American Physiological Society*. (1990) G803–G809. www.physiology.org/journal/ajpgi.
- [116] C.-T. Kuan, C.J. Wikstrand, R.E. Mclendon, M.R. Zalutsky, U. Kumar, D.D. Bigner, Detection of Amino-terminal Extracellular Domain of Somatostatin Receptor 2 by Specific Monoclonal Antibodies and Quantification of Receptor Density in Medulloblastoma, *Hybridoma*. 28 (2009) 389–403.
- [117] A.M. de Marzo, W.G. Nelson, W.B. Isaacs, J.I. Epstein, Pathological and molecular aspects of prostate cancer, *The Lancet*. 361 (2003) 955–964. www.thelancet.com.
- [118] S. Wang, A.J. Garcia, M. Wu, D.A. Lawson, O.N. Witte, H. Wu, Pten deletion leads to the expansion of a prostatic stemprogenitor cell subpopulation and tumor initiation, *PNAS*. 103 (2006) 1480–1485. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0510652103.
- [119] B.A.J. Verhage, L.A.L.M. Kiemeny, Inherited predisposition to prostate cancer, *Eur J Epidemiol*. 18 (2003) 1027–1036.
- [120] B. Cox, M.J. Sneyd, C. Paul, D.C.G. Skegg, Risk factors for prostate cancer: A national case-control study, *Int J Cancer*. 119 (2006) 1690–1694. <https://doi.org/10.1002/ijc.22022>.
- [121] H. Jadvar, Molecular imaging of prostate cancer: A concise synopsis, *Mol Imaging*. 8 (2009) 56–64. <https://doi.org/10.2310/7290.2009.00010>.
- [122] C.M. Coley, M.J. Barry, C. Fleming, A.G. Mulley, F. Massachusetts, Early Detection of Prostate Cancer Part I: Prior Probability and Effectiveness of Tests, *Ann Intern Med*. 126 (1997) 394–406. <http://annals.org/pdfaccess.ashx?url=/data/journals/aim/19877/>.
- [123] C.G. Roehrborn, L.K. Black, The economic burden of prostate cancer, *BJU Int*. 108

- (2011) 806–813. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2011.10365.x>.
- [124] J. Smith-Palmer, C. Takizawa, W. Valentine, Literature review of the burden of prostate cancer in Germany, France, the United Kingdom and Canada, *BMC Urol.* 19 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12894-019-0448-6>.
- [125] M. Noguchi, T.A. Stamey, J.E. Mcneal, C.M. Yemoto, Relationship between systematic biopsies and histological features of 222 radical prostatectomy specimens: lack of prediction of tumor significance for men with nonpalpable prostate cancer, *J Urol.* 166 (2001) 104–110.
- [126] A.G. Nappi, C. Ferrari, P. Mammucci, D. Rubini, V. Lavelli, A. Sardaro, A.R. Pisani, G. Rubini, [18F]Fluciclovine PET/CT Improves the Clinical Management of Early Recurrence Prostate Cancer Patients, *Cancers (Basel).* 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/cancers14061461>.
- [127] H. Jadvar, Molecular imaging of prostate cancer: PET radiotracers, *American Journal of Roentgenology.* 199 (2012) 278–291. <https://doi.org/10.2214/AJR.12.8816>.
- [128] L. Michaud, K.A. Touijer, A. Mauguen, M.J. Zelefsky, M.J. Morris, S.K. Lyashchenko, J.C. Durack, J.L. Humm, W.A. Weber, H. Schöder, 11C-Choline PET/CT in recurrent prostate cancer: Retrospective analysis in a large U.S. patient series, *Journal of Nuclear Medicine.* 61 (2020) 827–833. <https://doi.org/10.2967/jnumed.119.233098>.
- [129] H. Jadvar, Molecular imaging of prostate cancer with PET, *Journal of Nuclear Medicine.* 54 (2013) 1685–1688. <https://doi.org/10.2967/jnumed.113.126094>.
- [130] F.O. García-Pérez, S.S. Medina Ornelas, Radiotrazadores empleados en medicina nuclear para el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata, *Gaceta Mexicana de Oncología.* 16 (2017) 41–48. <https://doi.org/10.24875/j.gamo.17000007>.
- [131] M. Schäfer, U. Bauder-Wüst, K. Leotta, F. Zoller, W. Mier, U. Haberkorn, M. Eisenhut, M. Eder, A dimerized urea-based inhibitor of the prostate-specific membrane antigen for 68 Ga-PET imaging of prostate cancer, (2012). <http://www.ejnmires.com/content/2/1/23>.
- [132] S.J. Kim, S.W. Lee, The role of 18F-fluciclovine PET in the management of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis, *Clin Radiol.* 74 (2019) 886–892. <https://doi.org/10.1016/j.crad.2019.06.022>.
- [133] K.M. Emonds, J. v. Swinnen, L. Mortelmans, F.M. Mottaghy, Molecular imaging of prostate cancer, *Methods.* 48 (2009) 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.03.021>.
- [134] A. Ghosh, W.D.W. Heston, Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer, *J Cell Biochem.* 91 (2004) 528–539. <https://doi.org/10.1002/jcb.10661>.
- [135] S.S. Taneja, ProstaScint® Scan: Contemporary Use in Clinical Practice, *Rev Urol.* 6 (2004) S19–S28.
- [136] J.R. Osborne, N.H. Akhtar, S. Vallabhajosula, A. Anand, K. Deh, S.T. Tagawa, Prostate-specific membrane antigen-based imaging, *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.* 31 (2013) 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2012.04.016>.
- [137] N. Pandit-Taskar, D.R. Veach, J.J. Fox, H.I. Scher, M.J. Morris, S.M. Larson, Evaluation of castration-resistant prostate cancer with androgen receptor-axis

- imaging, *Journal of Nuclear Medicine*. 57 (2016) 73S-78S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.170134>.
- [138] M.G. Pomper, J.L. Musachio, J. Zhang, U. Scheffel, Y. Zhou, J. Hilton, A. Maini, R.F. Dannals, D.F. Wong, A.P. Kozikowski, 11C-MCG: Synthesis, uptake selectivity, and primate PET of a probe for glutamate carboxypeptidase II (NAALADase), *Mol Imaging*. 1 (2002) 96–101. <https://doi.org/10.1162/153535002320162750>.
- [139] S.P. Rowe, K.L. Gage, S.F. Faraj, K.J. Macura, T.C. Cornish, N. Gonzalez-Roibon, G. Guner, E. Munari, A.W. Partin, C.P. Pavlovich, M. Han, H.B. Carter, T.J. Bivalacqua, A. Blackford, D. Holt, R.F. Dannals, G.J. Netto, M.A. Lodge, R.C. Mease, M.G. Pomper, S.Y. Cho, 18F-DCFBC PET/CT for PSMA-based detection and characterization of primary prostate cancer, *Journal of Nuclear Medicine*. 56 (2015) 1003–1010. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.154336>.
- [140] Z. Szabo, E. Mena, S.P. Rowe, D. Plyku, R. Nidal, M.A. Eisenberger, E.S. Antonarakis, H. Fan, R.F. Dannals, Y. Chen, R.C. Mease, M. Vranesic, A. Bhatnagar, G. Sgouros, S.Y. Cho, M.G. Pomper, Initial Evaluation of [18F]DCFPyL for Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Targeted PET Imaging of Prostate Cancer, *Mol Imaging Biol*. 17 (2015) 565–574. <https://doi.org/10.1007/s11307-015-0850-8>.
- [141] S.M. Hillier, A.M. Kern, K.P. Maresca, J.C. Marquis, W.C. Eckelman, J.L. Joyal, J.W. Babich, 123I-MIP-1072, a small-molecule inhibitor of prostate-specific membrane antigen, is effective at monitoring tumor response to taxane therapy, *Journal of Nuclear Medicine*. 52 (2011) 1087–1093. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.086751>.
- [142] A. Afshar-Oromieh, E. Avtzi, F.L. Giesel, T. Holland-Letz, H.G. Linhart, M. Eder, M. Eisenhut, S. Boxler, B.A. Hadaschik, C. Kratochwil, W. Weichert, K. Kopka, J. Debus, U. Haberkorn, The diagnostic value of PET/CT imaging with the 68Ga-labelled PSMA ligand HBED-CC in the diagnosis of recurrent prostate cancer, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 42 (2015) 197–209. <https://doi.org/10.1007/s00259-014-2949-6>.
- [143] S. Vallabhajosula, B. Polack, Y.S. Jhanwar, A. Nikolopoulou, T.W. Armor, S.T. Tagawa, D. Scherr, B. Robinson, S.J. Goldsmith, J.W. Babich, PSMA SPECT imaging with 99mTc-MIP-1404 in patients with prostate cancer (PCa): Comparison with Bone scan, CT or MRI, (2014).
- [144] M. Eder, M. Eisenhut, J. Babich, U. Haberkorn, PSMA as a target for radiolabelled small molecules, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 40 (2013) 819–823. <https://doi.org/10.1007/s00259-013-2374-2>.
- [145] P. Shahrokhi, A. Masteri Farahani, M. Tamaddondar, F. Rezazadeh, The utility of radiolabeled PSMA ligands for tumor imaging, *Chem Biol Drug Des*. 99 (2021) 136–161. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13946>.
- [146] U. Hennrich, M. Eder, [68Ga]Ga-PSMA-11: The first FDA-approved 68Ga-radiopharmaceutical for PET imaging of prostate cancer, *Pharmaceuticals*. 14 (2021). <https://doi.org/10.3390/ph14080713>.
- [147] G. Lu, K.P. Maresca, S.M. Hillier, C.N. Zimmerman, W.C. Eckelman, J.L. Joyal, J.W. Babich, Synthesis and SAR of 99mTc/Re-labeled small molecule prostate specific membrane antigen inhibitors with novel polar chelates, *Bioorg Med Chem Lett*. 23 (2013) 1557–1563. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.09.014>.
- [148] C.A. Heinlein, C. Chang, Androgen receptor in prostate cancer, *Endocr Rev*. 25

- (2004) 276–308. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0032>.
- [149] S.Y. Cho, Z. Szabo, Molecular imaging of urogenital diseases, *Semin Nucl Med.* 44 (2014) 93–109. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2013.10.008>.
- [150] O. Jacobson, Y. Bechor, A. Icar, N. Novak, A. Birman, H. Marom, L. Fadeeva, E. Golan, I. Leibovitch, M. Gutman, E. Even-Sapir, R. Chisin, M. Gozin, E. Mishani, Prostate cancer PET bioprobes: Synthesis of [18F]-radiolabeled hydroxyflutamide derivatives, *Bioorg Med Chem.* 13 (2005) 6195–6205. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.06.033>.
- [151] E.E. Parent, C.S. Dence, C. Jenks, T.L. Sharp, M.J. Welch, J.A. Katzenellenbogen, Synthesis and biological evaluation of [18F]bicalutamide, 4-[76Br]bromobicalutamide, and 4-[76Br]bromo- thiobicalutamide as non-steroidal androgens for prostate cancer imaging, *J Med Chem.* 50 (2007) 1028–1040. <https://doi.org/10.1021/jm060847r>.
- [152] O. Jacobson, D. Laky, K.E. Carlson, S. Elgavish, M. Gozin, E. Even-Sapir, I. Leibovitch, M. Gutman, R. Chisin, J.A. Katzenellenbogen, E. Mishani, Chiral dimethylamine flutamide derivatives-modeling, synthesis, androgen receptor affinities and carbon-11 labeling, *Nucl Med Biol.* 33 (2006) 695–704. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2006.05.010>.
- [153] E.E. Parent, C.S. Dence, T.L. Sharp, M.J. Welch, J.A. Katzenellenbogen, Synthesis and biological evaluation of a fluorine-18-labeled nonsteroidal androgen receptor antagonist, N-(3-[18F]fluoro-4-nitronaphthyl)-cis-5-norbornene-endo-2,3-dicarboxylic imide, *Nucl Med Biol.* 33 (2006) 615–624. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2006.04.003>.
- [154] M. Gao, M. Wang, K.D. Miller, Q.H. Zheng, Facile radiosynthesis of new carbon-11-labeled propanamide derivatives as selective androgen receptor modulator (SARM) radioligands for prostate cancer imaging, *Steroids.* 76 (2011) 1505–1512. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.08.005>.
- [155] E.E. Parent, C. Jenks, T. Sharp, M.J. Welch, J.A. Katzenellenbogen, Synthesis and biological evaluation of a nonsteroidal bromine-76-labeled androgen receptor ligand 3-[76Br]bromo-hydroxyflutamide, *Nucl Med Biol.* 33 (2006) 705–713. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2006.05.009>.
- [156] H. He, J.E. Morely, E. Silva-Lopez, B. Bottenus, M. Montajano, G.A. Fugate, B. Twamley, P.D. Benny, Synthesis and characterization of nonsteroidal-linked M(CO)₃⁺(M = ^{99m}Tc, Re) compounds based on the androgen receptor targeting molecule flutamide, *Bioconjug Chem.* 20 (2009) 78–86. <https://doi.org/10.1021/bc8003183>.
- [157] T. Dallagi, S. Top, S. Masi, G. Jaouen, M. Saidi, Synthesis and biodistribution of [99mTc]-N-[4-nitro-3-trifluoromethyl-phenyl]cyclopentadienyltricarbonyltechnetium carboxamide, a nonsteroidal antiandrogen flutamide derivative, *Metallomics.* 2 (2010) 289–293. <https://doi.org/10.1039/b925224j>.
- [158] A.L. Moore, D.K. Buar, L.R. MacGillivray, P.D. Benny, “Click” labeling strategy for M(CO)₃ (M = Re, ^{99m}Tc) prostate cancer targeted Flutamide agents, *Dalton Transactions.* 39 (2010) 1926–1928. <https://doi.org/10.1039/b921413e>.
- [159] Y. He, D. Yin, M. Perera, L. Kirkovsky, N. Stourman, W. Li, J.T. Dalton, D.D. Miller, Novel nonsteroidal ligands with high binding affinity and potent functional activity for the androgen receptor, *Eur. J. Med. Chem.* 37 (2002) 619–634.

www.elsevier.com/locate/ejmech.

- [160] C.E. Bohl, D.D. Miller, J. Chen, C.E. Bell, J.T. Dalton, Structural Basis for Accommodation of Nonsteroidal Ligands in the Androgen Receptor, *J Biol Chem.* 280 (2005) 37747–37754.
- [161] S.M. Singh, S. Gauthier, F. Labrie, Androgen Receptor Antagonists (Antiandrogens): Structure-Activity Relationships, *Curr Med Chem.* 7 (2000) 211–247.
- [162] S. Fernández, J. Giglio, I. Laborda, M. Incerti, A. Rey, Marcación de un derivado de glucosa con ^{99m}Tc mediante la formación de un complejo Tc(V)-nitruro. Estudios preliminares., *Alasbimn Journal.* 52 (2011) 1–8.
- [163] M. Sar, D.B. Lubahn, F.S. French, E.M. Wilson, Immunohistochemical Localization of the Androgen Receptor in Rat and Human Tissues*, *Endocrinology.* 127 (1990) 3180–3186.
- [164] L.D. D’Andrea, I. Testa, M.R. Panico, R. di Stasi, C. Caracò, L. Tarallo, C. Arra, A. Barbieri, A. Romanelli, L. Aloj, In vivo and in vitro characterization of CCK8 bearing a histidine-based chelator labeled with ^{99m}Tc-tricarbonyl, *Biopolymers - Peptide Science Section.* 90 (2008) 707–712. <https://doi.org/10.1002/bip.21041>.
- [165] Thermo Fisher Scientific, RPMI 1640 Medium Product Information Sheet (Pub.No. MAN0018935 2.0), 2022. www.thermofisher.com/.