



**Escuela de Graduados**  
Facultad de Medicina – UdelaR

# MARCACIÓN RADIOACTIVA DE ANTICUERPOS ANTI-TN PARA DIAGNÓSTICO Y TERAPIA ONCOLÓGICA

Tesis de doctorado PROINBIO

MSc. Marcos Tassano

Montevideo, noviembre 2024

## Tutores

Director académico: Dr. Eduardo Osinaga

Tutor de especialidad: Dr. Pablo Cabral

Asesor: Dr. Juan Pablo Gambini,

Tesis realizada en:

Centro de Investigaciones Nucleares (CIN) – Facultad de Ciencias – Universidad de la República, Uruguay.



## Agradecimientos

*Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas y entidades que han contribuido al desarrollo y culminación de esta tesis de doctorado. En primer lugar, agradezco a mi director de tesis, tutor de especialidad y asesor, el Dr. Eduardo Osinaga, Dr. Pablo Cabral y Dr. Juan Pablo Gambini respectivamente por sus invaluable guías, paciencia y apoyo a lo largo de este camino. Su experiencia y sabiduría han sido fundamentales para el éxito de esta investigación.*

*A mis compañeros de laboratorio, en especial para Ximena Camacho, Mirel Cabrera, Carolina Perroni y Fernanda García por su camaradería, por ayudarme en trabajos de laboratorios que requerían alta demanda de tiempo, por compartir conocimientos y por los momentos de apoyo mutuo durante los desafíos y éxitos. También quiero agradecer al Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica y al programa de posgrado PROINBIO por brindarme los recursos y el entorno necesarios para llevar a cabo esta investigación.*

*A mis amigos y familiares, en especial para Mariana y mi hijo Franco quienes con su comprensión y paciencia me han apoyado incondicionalmente, especialmente en los momentos de mayor demanda de tiempo en el laboratorio. Un agradecimiento especial a mis padres, por inculcarme el valor del esfuerzo y la perseverancia desde temprana edad.*

*Finalmente, extendo mi gratitud a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a realizar esta tesis.*

# Resumen

En esta tesis se procedió al radiomarcado de ChiTn, un anticuerpo monoclonal quimérico ratón/humano anti-Tn, con yodo-131 ( $^{131}\text{I}$ ) y tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) para evaluar su biodistribución e internalización en células de cáncer de pulmón LL/2 que expresan Tn (Tn+) y en células de tipo salvaje (Tn-). Se observó una acumulación selectiva y una internalización gradual de ChiTn en las células Tn+. La biodistribución en ratones con tumores pulmonares tanto Tn+ como Tn- indicó que la captación de ChiTn radiomarcado dentro de los tumores aumentó con el tiempo. Los experimentos de doble marcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  y  $^{131}\text{I}$  mostraron diferentes patrones de biodistribución, con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  exhibiendo valores más altos en el hígado, bazo y riñones, mientras que  $^{131}\text{I}$  mostró una mayor captación en la tiroides y el estómago. Sin embargo, la captación del tumor no difirió significativamente entre los tumores Tn+ y Tn-. Para mejorar el delivery al tumor, se investigó el uso de Losartan, una droga antihipertensiva conocida por mejorar la perfusión tumoral y el delivery de drogas. Los estudios de biodistribución en ratones pretratados con Losartan revelaron una captación significativamente mayor de ChiTn radiomarcado en tumores Tn+. No se observaron cambios significativos en la captación del anticuerpo control IgG-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Estos hallazgos demuestran que se puede mejorar el delivery y captación al tumor del anticuerpo ChiTn radiomarcado en ratones pretratados con Losartan en tumores pulmonares que expresan Tn. Se destaca el potencial de ChiTn como agente terapéutico para el tratamiento del cáncer y se enfatiza la importancia del Losartan como un tratamiento adyuvante para mejorar la perfusión tumoral y la administración de drogas.

**Palabras clave:** ChiTn,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{131}\text{I}$ , Losartan

## Índice general

Introducción .....	6
1.1 Cáncer .....	6
1.1.1 Contexto mundial del cáncer .....	6
1.1.2 Contexto del cáncer en Uruguay .....	8
1.1.3 Biología del cáncer.....	9
1.1.4 Microambiente tumoral .....	11
1.1.5 Presión intersticial y normalización.....	13
1.1.6 Glicosilación y glicanos en cáncer .....	16
1.1.7 Antígeno Tn .....	18
1.1.8 Modelo celular y tumoral del antígeno Tn en cáncer de pulmón.....	19
1.2 Anticuerpos monoclonales .....	20
1.2.1 Anticuerpos específicos del antígeno Tn (ChiTn) .....	22
1.2.2 Marcación radioactiva de anticuerpos .....	23
1.3 Ensayos <i>In vitro</i> utilizando compuestos radiomarcados para cuantificar internalización celular y unión a membrana .....	26
1.4 Biodistribuciones utilizando radiotrazadores .....	28
1.4.1 Espectrometría gamma .....	30
1.4.2 Espectrometría gamma en biodistribuciones y ensayos <i>in vitro</i> .....	32
1.5 Antecedentes de nuestro grupo de investigación .....	33
Objetivo .....	35
2.1 Objetivos específicos.....	35
Materiales y métodos .....	36
3.1 Derivatización de los anticuerpos .....	36
3.2 Radiomarcado de los anticuerpos.....	36
3.3 Controles de radiomarcado de los anticuerpos, purificación y estabilidad .....	37
3.4 Cultivo celular.....	38
3.5 Unión a la membrana e internalización celular .....	38
3.6 Animales e inducción de tumores .....	39
3.7 Tratamiento con Losartán .....	39
3.8 Estudios de biodistribución .....	40
3.9 Medidas de Radioactividad y análisis estadístico .....	40
Resultados .....	42

4.1 Radiomarcado y controles de calidad <i>in vitro</i> .....	42
4.3 Estudios de Biodistribución .....	44
Discusión .....	49
Conclusiones .....	53
Publicaciones y presentaciones generadas a partir de la tesis .....	54
Bibliografía .....	55

## Introducción

### 1.1 Cáncer

El cáncer es una de las enfermedades más desafiantes y complejas que enfrenta la humanidad, caracterizada por el crecimiento y propagación descontrolados de células anormales en el cuerpo. Aunque se manifiesta de diversas maneras y en diferentes órganos, todos los tipos de cáncer comparten la característica de una proliferación celular irregular que puede invadir tejidos circundantes y diseminarse a otras partes del organismo a través del sistema linfático y sanguíneo (Hanahan, 2022). La incidencia del cáncer ha aumentado en las últimas décadas, constituyendo una prioridad en términos de salud pública debido a su elevado impacto en la calidad de vida de los pacientes y a su gran peso económico en los sistemas sanitarios.

#### 1.1.1 Contexto mundial del cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), fue responsable de 10 millones de muertes en 2020, lo que representa casi una de cada seis muertes (OMS, 2021). Aunque se observa una alta prevalencia de cáncer en los países desarrollados (Figura 1), la OMS estima que más del 70% de las muertes por cáncer ocurren en países de ingresos bajos y medios (OMS, 2021).

El tipo y la incidencia de cáncer varían en diferentes regiones y poblaciones del mundo. Según el informe World Cancer Report de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) de la OMS, los cánceres de mama, pulmón y colorrectal son los más comunes a nivel mundial, pero existen variaciones significativas en la incidencia de estos en diferentes regiones del mundo (IARC, 2020).

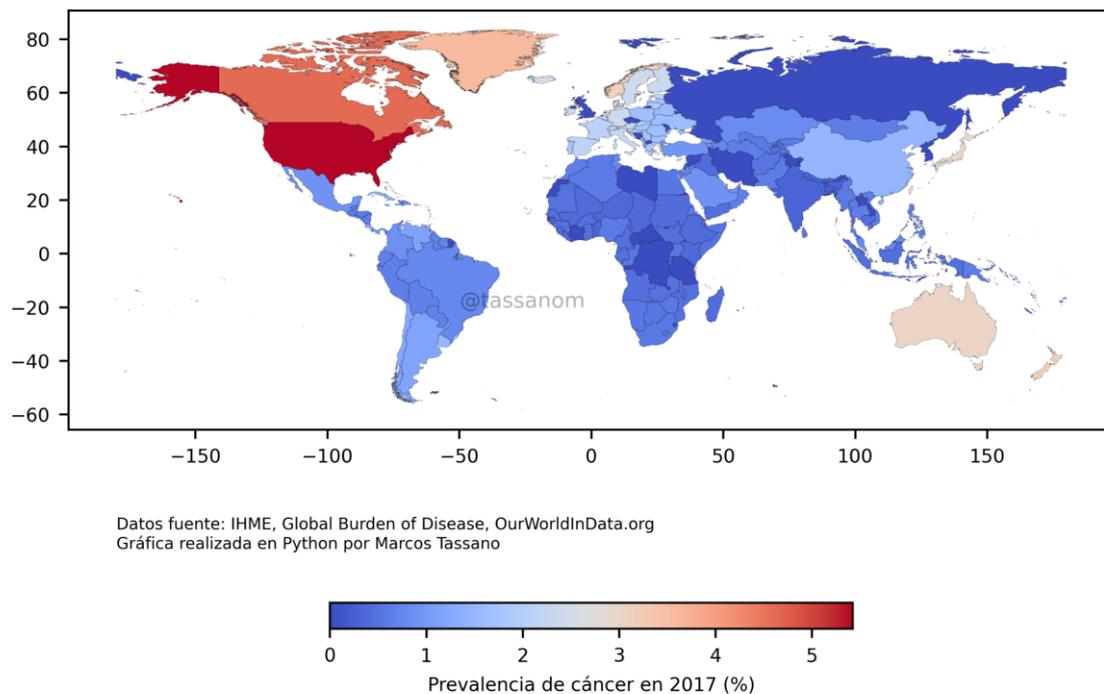


Figura 1. Prevalencia de cáncer en 2017 en los países del mundo.

Además, la incidencia de cáncer está en aumento (Figura 2). Según las proyecciones de GLOBOCAN, se espera que el número de casos aumente en un 47% para el 2040, principalmente debido al envejecimiento y al crecimiento de la población mundial, así como a los cambios en la prevalencia y distribución de los principales factores de riesgo de cáncer, muchos de los cuales están asociados con el desarrollo socioeconómico (Bray et al., 2018).

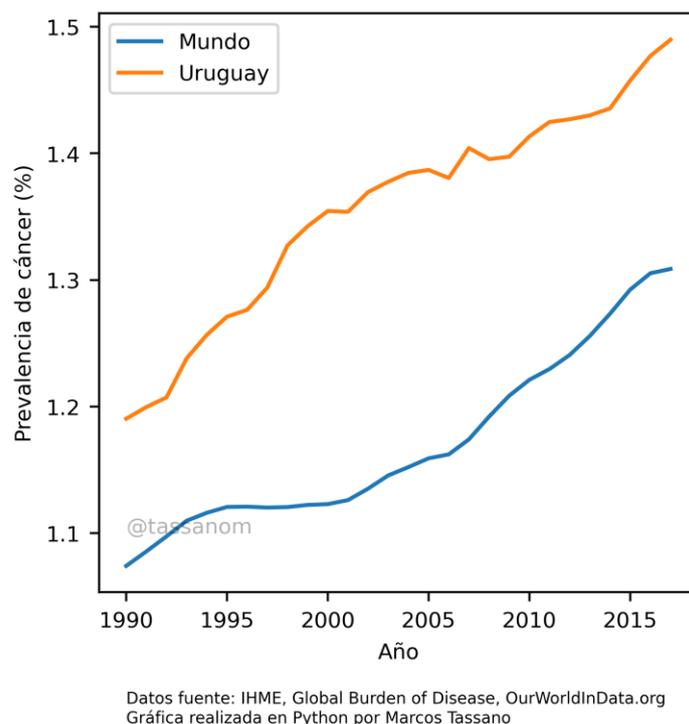


Figura 2. Serie temporal de prevalencia de cáncer a nivel mundial y en Uruguay.

### 1.1.2 Contexto del cáncer en Uruguay

En el contexto uruguayo, el cáncer representa una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. Según el Ministerio de Salud Pública, se estima que aproximadamente 15000 uruguayos son diagnosticados con cáncer cada año, con las formas más comunes de la enfermedad siendo el cáncer de mama en mujeres y el cáncer de próstata en hombres (Figura 3). El cáncer de pulmón también tiene una alta incidencia, vinculada en gran parte al consumo de tabaco (MSP, 2022).

El análisis de la prevalencia del cáncer en Uruguay muestra una tendencia creciente en las últimas décadas (Figura 2), que se refleja en la carga cada vez mayor de la enfermedad en el sistema de atención de la salud. Este aumento puede atribuirse a varios factores, incluido el envejecimiento de la población, las transformaciones en el estilo de vida y la exposición a factores de riesgo conocidos, como el tabaquismo y la obesidad (MSP, 2022).

En Uruguay, la incidencia y mortalidad por cáncer varía considerablemente según el tipo. Algunos de los tipos de cáncer más comunes y su impacto en la salud de la población uruguayana están representados en la Figura 3.

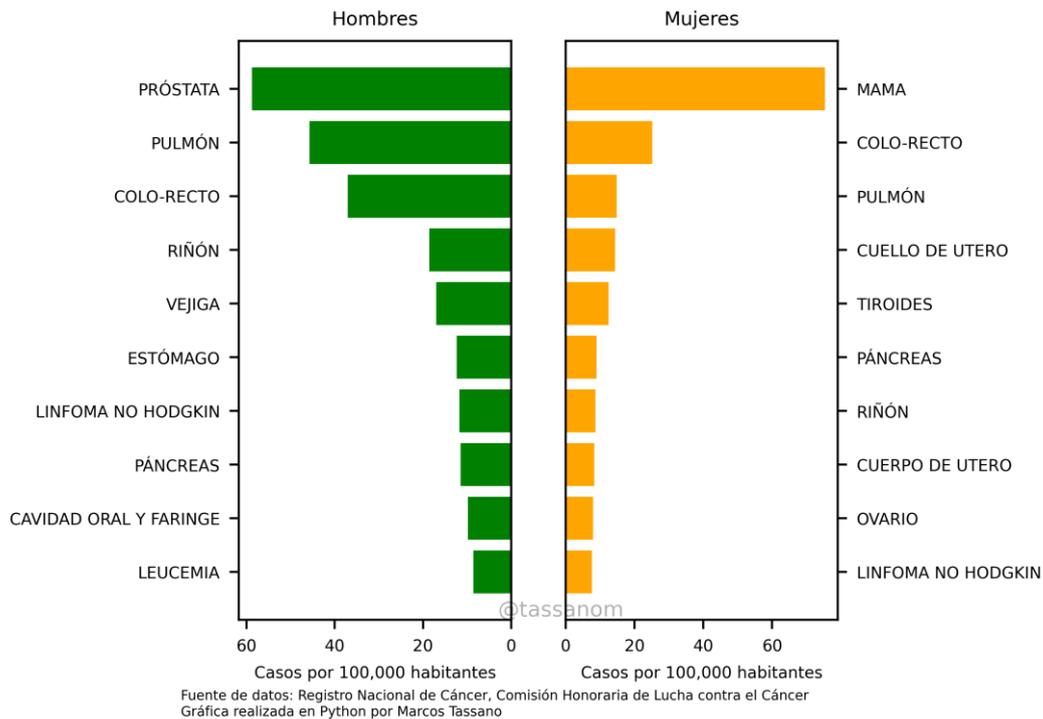


Figura 3. Tipos más comunes de cáncer en Uruguay en hombres y mujeres.

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más comúnmente diagnosticado en mujeres en Uruguay. En 2017, se estimó que hubo más de 2.000 nuevos casos de cáncer de mama en el país, y 600 muertes fueron atribuidas a esta enfermedad (MSP, 2022; CHLCC, 2019).

El cáncer de próstata es el cáncer más comúnmente diagnosticado en hombres uruguayos. Los datos de 2017 indican que más de 1.500 hombres fueron diagnosticados con cáncer de próstata y 600 murieron a causa de esta enfermedad (MSP, 2022; CHLCC, 2019).

Mientras que el cáncer de pulmón es uno de los cánceres más mortales tanto para hombres como para mujeres en Uruguay. Se estima que, en 2017, hubo más de 1.200 nuevos casos y 1.000 muertes por cáncer de pulmón (MSP, 2022; CHLCC, 2019).

### 1.1.3 Biología del cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizado por el crecimiento y la propagación anormal de células. Se considera una enfermedad compleja y multifactorial que implica

alteraciones genéticas y epigenéticas, interacciones con el microambiente celular, y respuestas inmunes y sistémicas modificadas (Hanahan, 2022).

El desarrollo del cáncer se describe como un proceso de múltiples etapas que evoluciona a lo largo del tiempo. Las células normales se transforman en células cancerosas a través de una serie de eventos que alteran su comportamiento. Este proceso incluye la acumulación de mutaciones en genes clave que regulan el crecimiento y la división celular, la apoptosis, la reparación del ADN y la angiogénesis (Vogelstein y Kinzler, 1993).

La biología tumoral también considera la plasticidad de las células tumorales. Esta plasticidad es la habilidad de las células tumorales de alterar sus características fenotípicas y funcionales en respuesta a señales específicas del microambiente o cambios genéticos internos. Esta característica está asociada con la progresión del cáncer, la resistencia al tratamiento y la recaída de la enfermedad (Marjanovic et al., 2013).

Para sintetizar la complejidad de la biología del cáncer, Hanahan (2022) definió seis "hallmarks" o características distintivas del cáncer, que son habilidades adquiridas por las células durante el desarrollo de éste (Figura 4).

Estas son:

- *Auto-suficiencia en señales de crecimiento*: Las células cancerosas tienen la capacidad de estimular su propio crecimiento. En lugar de depender de señales externas, como hacen las células normales, pueden producir sus propias señales de crecimiento.
- *Insensibilidad a las señales de supresión de crecimiento*: En circunstancias normales, las señales moleculares evitan que las células se dividan de manera descontrolada. Las células cancerosas son capaces de ignorar estas señales de inhibición.
- *Evasión de la apoptosis*: Las células normales se someten a un proceso de autodestrucción programado conocido como apoptosis. Las células cancerosas han desarrollado formas de evitar la apoptosis, permitiéndoles sobrevivir y proliferar en lugar de autodestruirse.
- *Potencial replicativo ilimitado*: Las células normales solo pueden dividirse un número limitado de veces. Las células cancerosas, por otro lado, pueden dividirse indefinidamente, lo que conduce a la expansión de la masa tumoral.
- *Angiogénesis sostenida*: Para crecer más allá de un cierto tamaño, los tumores necesitan su propio suministro de sangre. Las células cancerosas tienen la capacidad de estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos, un proceso conocido como angiogénesis.

- *Invasión y metástasis*: Esta es la capacidad de las células cancerosas para invadir tejidos adyacentes y viajar a través del sistema circulatorio o linfático para formar tumores secundarios en sitios distantes.

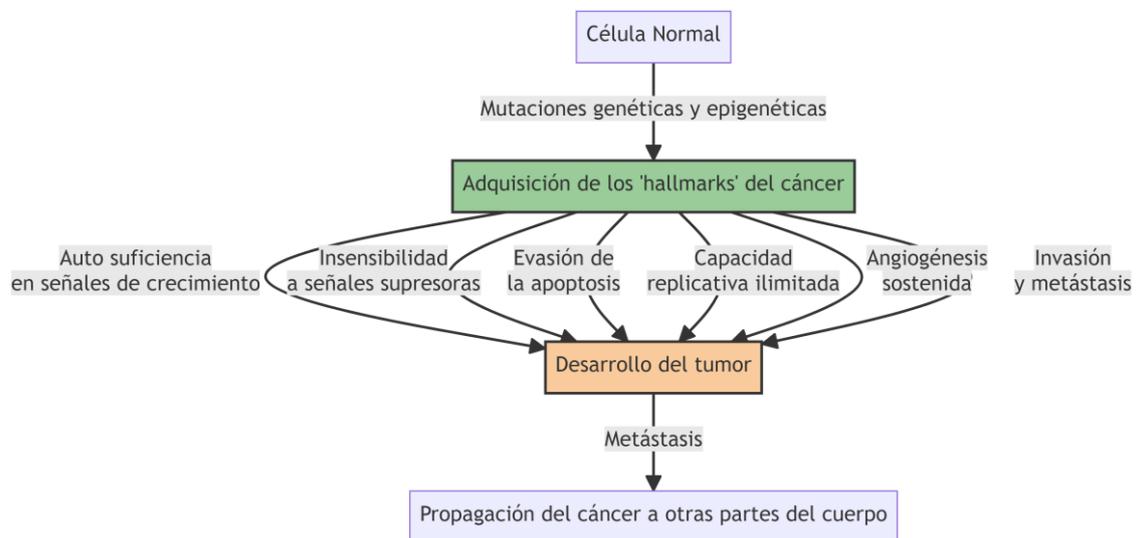


Figura 4. Diagrama de progresión y adquisición de los hallmarks del cáncer.

#### 1.1.4 Microambiente tumoral

El microambiente tumoral es una entidad compleja compuesta por una variedad de células, que incluyen tanto las células cancerosas como las no cancerosas. Las células no cancerosas que contribuyen al microambiente tumoral están representadas por células inmunitarias, fibroblastos y células endoteliales, cada una con su propio papel en la promoción del crecimiento y la progresión del tumor (Balkwill et al., 2012).

Las células inmunitarias, incluyendo linfocitos T y B, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, tienen un papel doble. Pueden atacar y eliminar las células cancerosas, pero también, son manipuladas por las células tumorales para promover la inmunosupresión, ayudando de este modo a las células cancerosas a evadir el sistema inmunitario. Por ejemplo, las células tumorales pueden liberar factores que atraen a los macrófagos y los convierten en un fenotipo pro-tumoral que promueve el crecimiento y la invasión del tumor (Gajewski et al., 2013).

Los fibroblastos, y en particular los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs), son otro componente importante del microambiente tumoral. Estas células son capaces de secretar una variedad de factores de crecimiento y citocinas que promueven el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas. Además, los CAFs pueden remodelar la matriz extracelular para facilitar la invasión y la migración de las células cancerosas, un paso crucial en el proceso de metástasis (Kalluri 2016).

Además de las células, la matriz extracelular y los factores bioquímicos también juegan un papel crucial en el microambiente tumoral. La matriz extracelular proporciona un andamio físico para las células y puede influir en su comportamiento a través de señales mecánicas. La matriz extracelular en los tumores es a menudo más densa y desorganizada que en los tejidos normales, lo que puede facilitar la invasión y migración de las células cancerosas. Además, las células tumorales y las células estromales pueden secretar enzimas que degradan la matriz extracelular, creando vías para la invasión y la metástasis (Lu et al., 2012).

Los factores bioquímicos en el microambiente tumoral, incluyendo factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas, facilitan la comunicación entre las células tumorales y las células estromales. Estas moléculas pueden promover el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas, la angiogénesis, la inmunosupresión, la invasión y la metástasis. Además, pueden contribuir a la resistencia a las terapias anticancerígenas (Quail y Joyce, 2013).

El microambiente tumoral también está marcado por una serie de condiciones físicas únicas que pueden promover la progresión del tumor. La hipoxia, o falta de oxígeno, es una condición común en los tumores debido a su crecimiento rápido y a la formación de vasos sanguíneos anormales. La hipoxia puede promover la agresividad del tumor al inducir la expresión de genes que promueven la supervivencia de las células cancerosas, la angiogénesis y la invasión. La hipoxia también puede contribuir a la resistencia a las terapias, ya que muchas terapias anticancerígenas son menos eficaces en condiciones de bajo oxígeno (Semenza 2012).

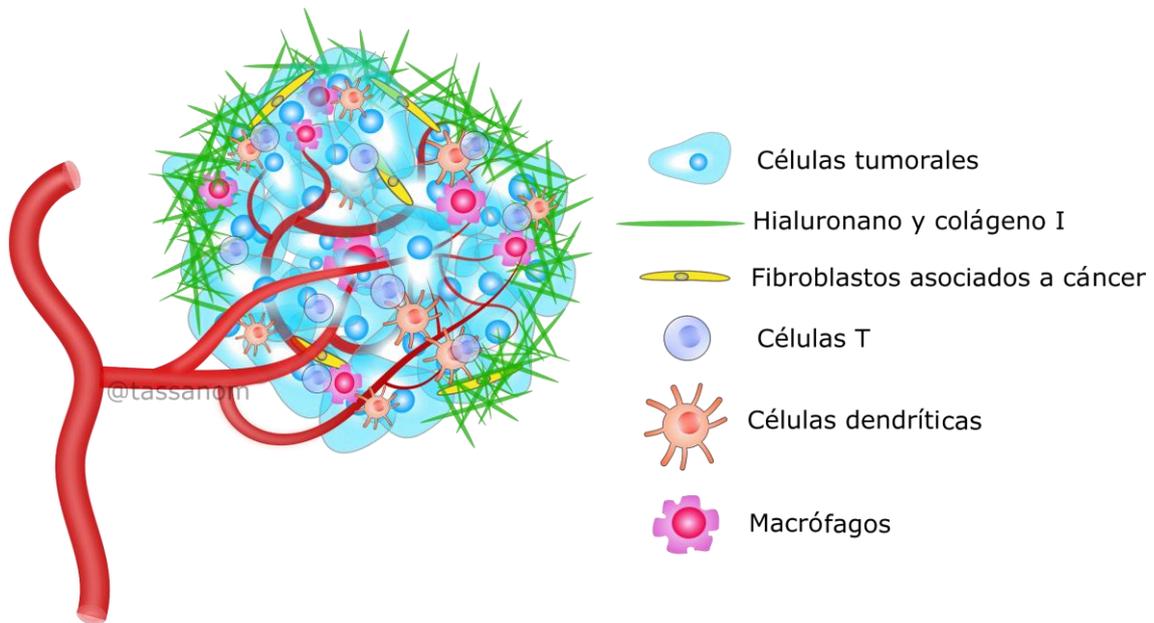


Figura 5. Esquema de un tumor con sus vasos sanguíneos y las células del microambiente tumoral como también la matriz extracelular.

### 1.1.5 Presión intersticial y normalización

La presión intersticial, también conocida como presión tisular, juega un papel crítico en el microambiente tumoral. La presión intersticial se refiere a la presión que se genera dentro de los tejidos por la cantidad de fluido presente. En los tumores, la presión intersticial es mayor que en los tejidos normales debido a una combinación de factores que incluyen un aumento en la producción de fluidos, una disminución en la eliminación y cambios en la matriz extracelular que dificultan la difusión (Provenzano et al., 2009).

Uno de los principales contribuyentes a la alta presión intersticial en los tumores es la angiogénesis, el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos. Los tumores necesitan un suministro de sangre para crecer y, por lo tanto, inducen la angiogénesis. Sin embargo, los vasos sanguíneos en los tumores suelen ser anormales y disfuncionales, con paredes vasculares defectuosas y una falta de vasos linfáticos normales para drenar el exceso de fluido. Como resultado, los fluidos se acumulan en el tumor, aumentando la presión intersticial (Jain, 2013).

La matriz extracelular juega un papel crítico en la generación de la presión intersticial en el microambiente tumoral. La matriz extracelular es una red tridimensional de proteínas y polisacáridos producidos y secretados por las células en un tejido específico. En el contexto del

tumor, la matriz extracelular es con frecuencia remodelada y puede ser más densa y rígida que en el tejido normal circundante (Lu et al., 2012).

La rigidez de la matriz extracelular puede ejercer presión mecánica sobre las células y los vasos sanguíneos dentro del tumor, contribuyendo a una mayor presión intersticial. Además, la matriz extracelular densa puede dificultar la difusión del líquido intersticial, lo que puede dar lugar a un aumento de la presión (Figura 6) (Stylianopoulos et al., 2012).

Por otro lado, la remodelación de la matriz extracelular por parte de las células tumorales y las células estromales puede generar caminos que faciliten la invasión y la migración de las células tumorales. Este proceso puede ser facilitado por la liberación de enzimas que degradan la matriz extracelular, como las metaloproteinasas de matriz (MMPs), por las células tumorales y las células estromales (Egeblad y Werb, 2002).

Es importante señalar que la matriz extracelular no sólo es una estructura física, sino que también proporciona señales bioquímicas a las células. Estas señales pueden influir en una variedad de comportamientos celulares, incluyendo la supervivencia, el crecimiento, la diferenciación y la migración. En el contexto del tumor, las señales de la matriz extracelular pueden promover la supervivencia y el crecimiento de las células tumorales y pueden contribuir a la resistencia a las terapias contra el cáncer (Pickup et al., 2014).

La alta presión intersticial en los tumores tiene varias consecuencias. Puede dificultar la entrega de fármacos al tumor, ya que la presión puede oponerse a la difusión de los fármacos desde los vasos sanguíneos hasta las células tumorales. Esto contribuye a la resistencia de la quimioterapia y a otros tratamientos contra el cáncer (Minchinton y Tannock, 2006). Además, la alta presión intersticial puede promover la invasión y la metástasis al empujar las células tumorales hacia el tejido circundante y los vasos linfáticos y sanguíneos (Stylianopoulos et al., 2012).

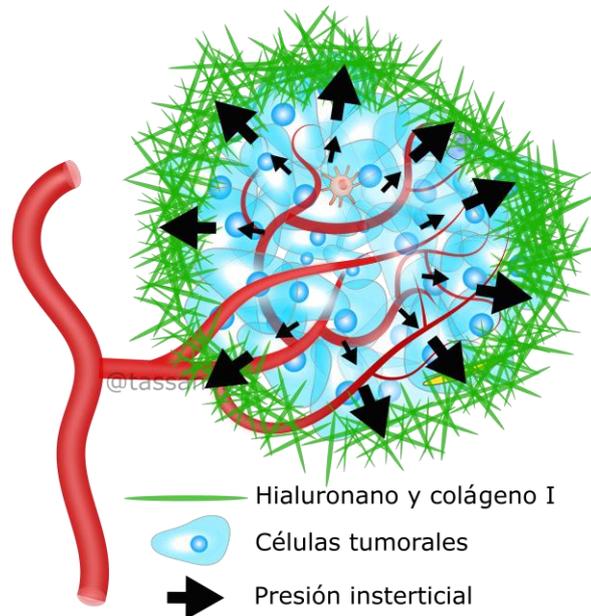


Figura 6. Esquema que simboliza la alta presión intersticial en un tumor con alto contenido de matriz extracelular.

Por lo tanto, es de interés desarrollar estrategias para normalizar la presión intersticial en los tumores como una forma de mejorar la eficacia de los tratamientos contra el cáncer. Estas estrategias pueden incluir fármacos que mejoran la función vascular, disminuyen la producción de fluidos o alteran la matriz extracelular para facilitar la difusión (Jain y Stylianopoulos, 2010).

Se ha estudiado y comprobado el uso de Losartán, como tratamiento adyuvante para mejorar la perfusión tumoral y la administración de fármacos en modelos de ratón de cáncer de mama y páncreas, mediante la reducción del contenido de colágeno y hialuronano dentro de los tumores (Chauhan et al., 2013; Diop-Frimpong et al., 2011; Zhao et al., 2019).

El Losartán es un medicamento bien conocido y ampliamente utilizado en el tratamiento de la hipertensión arterial. Su mecanismo de acción principal se centra en bloquear los receptores de angiotensina II, una hormona que puede aumentar la presión arterial al causar la contracción de los vasos sanguíneos. Sin embargo, más allá de su uso tradicional, recientes investigaciones han develado un potencial terapéutico de Losartán en el contexto oncológico, específicamente en la mejora de la perfusión tumoral y en la optimización de la administración de tratamientos anticancerígenos.

En el entorno tumoral, la elevada presión intersticial puede constituir una barrera significativa para la entrega eficiente de fármacos. Esta barrera es el resultado de una serie de factores que incluyen una matriz extracelular densa y rica en componentes como el colágeno y el hialuronano. Ambos componentes contribuyen a la rigidez de la matriz extracelular y a la creación de un entorno físico que puede dificultar la penetración de medicamentos (Jain y Stylianopoulos, 2010).

El papel del Losartán en este contexto es particularmente intrigante. Según investigaciones lideradas por Chauhan et al. (2013), el Losartán puede influir directamente en la matriz extracelular tumoral al reducir significativamente los niveles de colágeno y hialuronano en el tumor. Esta reducción puede llevar a una matriz extracelular menos densa y rígida, facilitando así la penetración y difusión de fármacos en el tumor.

Además, Diop-Frimpong et al. (2011) encontraron que el tratamiento con Losartán en modelos murinos de cáncer de mama mejoró notablemente la distribución y acumulación de agentes terapéuticos en el tumor. Este estudio, junto con otros similares, sugiere que el Losartán no solo puede actuar como un normalizador de la presión intersticial, sino que también puede optimizar la entrega de terapias anticancerígenas al tumor.

Otro estudio relevante es el de Zhao et al. (2019), donde se demostró que el Losartán mejoró significativamente la entrega de nanomedicamentos en modelos de cáncer de páncreas, una enfermedad conocida por su microambiente tumoral particularmente desafiante y fibroso.

#### 1.1.6 Glicosilación y glicanos en cáncer

La glicobiología es el estudio de los glicanos, también conocidos como carbohidratos o polisacáridos, y su función en los procesos biológicos. Los glicanos pueden existir en forma libre o pueden estar unidos a proteínas (glicoproteínas) o lípidos (glicolípidos). La glicosilación es el proceso por el cual los glicanos se unen a proteínas o lípidos, y es una de las modificaciones post-traduccionales más comunes en biología celular (Varki 2017).

Los glicanos juegan un papel clave en una variedad de funciones biológicas, incluyendo la estructura celular, la señalización celular, la interacción célula-célula y la inmunidad. Los cambios en la glicosilación pueden afectar estas funciones y están asociados con una serie de enfermedades, incluyendo el cáncer (Pinho y Reis, 2015).

En el contexto del cáncer, se ha observado que hay cambios significativos en la glicosilación en las células tumorales en comparación con las células normales. Estos cambios pueden incluir alteraciones en la estructura de los glicanos, en las enzimas que median la glicosilación y en la expresión de las glicoproteínas en la superficie celular (Meany y Chan, 2011).

Los cambios en la glicosilación pueden influir en la progresión del cáncer de varias maneras. Por ejemplo, pueden afectar la adhesión y migración celular, procesos que son esenciales para la invasión y metástasis del cáncer. Los glicanos en la superficie de las células tumorales pueden interactuar con las moléculas de adhesión en las células vecinas o en la matriz extracelular, facilitando la migración de las células tumorales fuera del tumor primario y hacia otros sitios en el cuerpo (Pearce y Läubli, 2016).

Además, los cambios en la glicosilación pueden afectar la inmunidad antitumoral. Algunos glicanos pueden ser reconocidos por las células inmunitarias como señales de evasión, evitando que las células tumorales sean eliminadas por el sistema inmunitario. Otros glicanos pueden proteger a las células tumorales de la inmunidad antitumoral al interferir con la presentación de antígenos a las células T (Rodríguez et al., 2018).

Finalmente, los glicanos pueden desempeñar un papel en la resistencia a la terapia contra el cáncer. Algunos glicanos pueden alterar la señalización y la supervivencia celular, contribuyendo a la resistencia a las terapias dirigidas y a la quimioterapia. Otros glicanos pueden afectar la penetración y la distribución de los fármacos en los tumores, lo que también puede contribuir a la resistencia a la terapia (Kufe 2009).

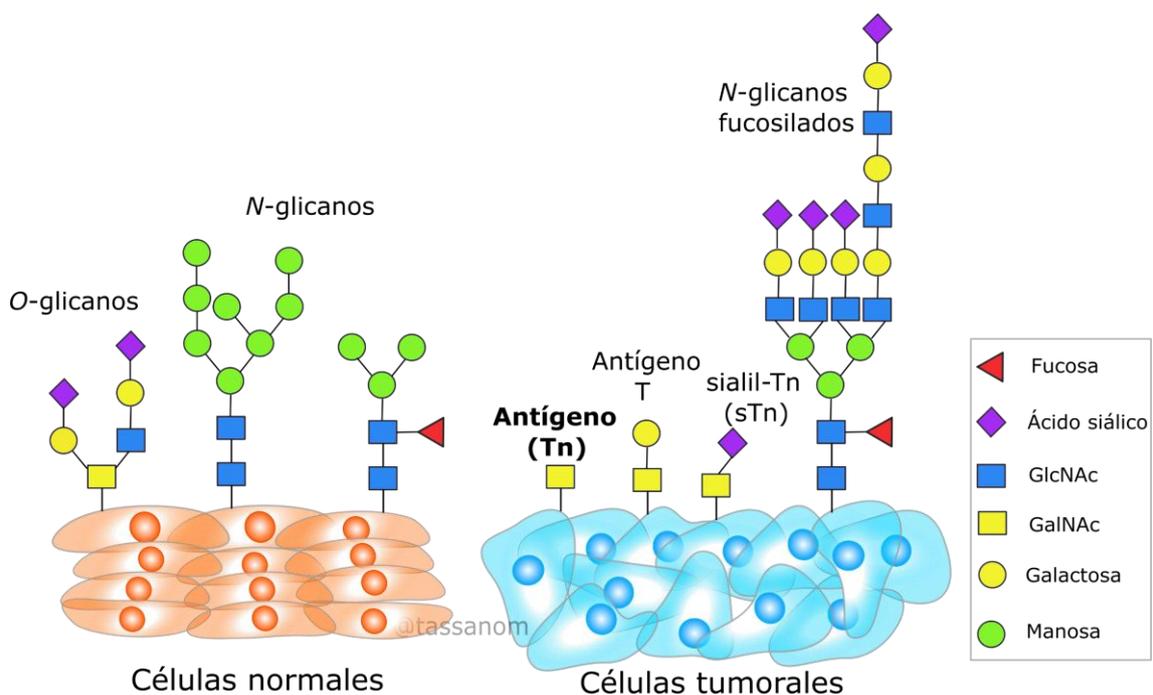


Figura 7. Diferentes cambios de glicosilación en las células cancerosas en comparación con los tejidos sanos. En el panel de la izquierda se muestra el patrón normal de glicosilación, mientras que el de la derecha está asociado a las células cancerosas.

### 1.1.7 Antígeno Tn

El antígeno Tn es una estructura de carbohidratos sencilla, compuesta por una molécula de N-acetilgalactosamina (GalNAc) unida a una serina o treonina de una proteína o péptido (Ju y Cummings, 2002) (Figura 7). Aunque es una estructura de glicosilación básica, su presencia anómala en proteínas es un marcador prominente en varios tipos de cáncer.

Bajo condiciones normales, el antígeno Tn raramente se expresa en células adultas. La síntesis adecuada y la modificación posterior de glicanos O-glicosilados, como el antígeno T, que es una elongación del antígeno Tn, son esenciales en tejidos normales (Brockhausen y Stanley, 2017). La aparición del antígeno Tn en células cancerosas se debe a una interrupción en estos procesos de glicosilación, lo que resulta en la expresión anómala del antígeno Tn en la superficie celular (Figura 8).

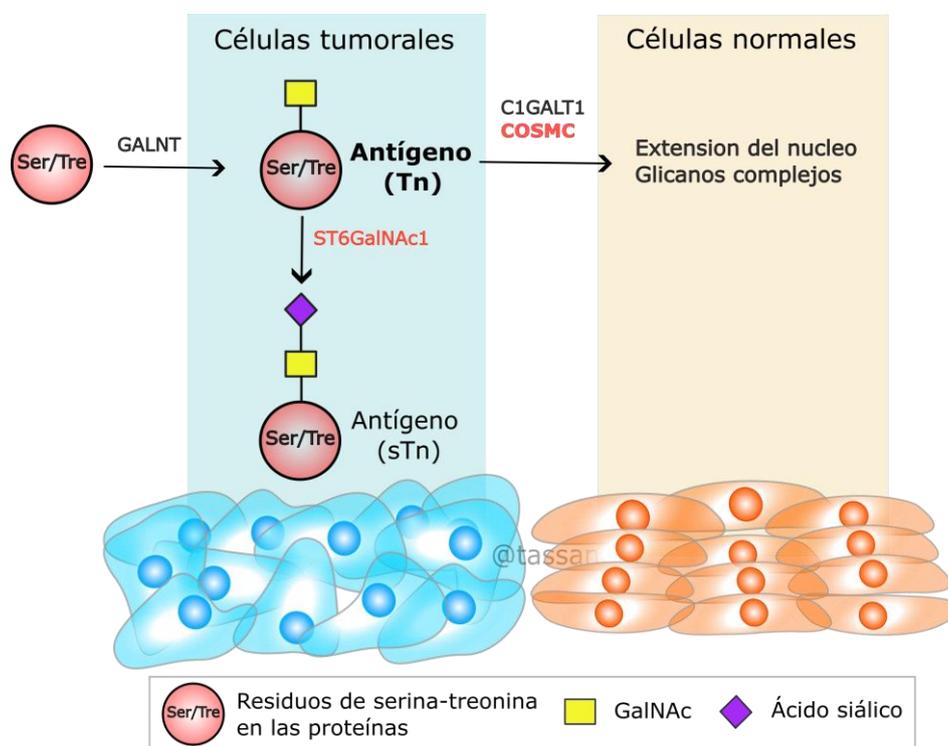


Figura 8. Biosíntesis de antígenos Tn y sTn en células tumorales.

El antígeno Tn se ha detectado en una variedad de tumores malignos, incluidos los de mama, ovario, colon, próstata y otros. Su presencia está correlacionada con un peor pronóstico en muchos casos (Springer 1984).

En el cáncer de pulmón de Lewis (LL/2), el antígeno Tn promueve el crecimiento tumoral, la evasión inmunitaria y la angiogénesis, dando lugar a tumores más grandes y altamente vascularizados (da Costa et al., 2021). Esto puede explicarse por la capacidad de las células LL/2 Tn+ y de los tumores LL/2 Tn+ para producir mayores cantidades de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en comparación con el wild type LL/2 (Tn-) (Larsson-Callerfelt et al., 2017). El VEGF se considera el principal factor de angiogénesis y se ha demostrado que desempeña un papel en la inducción de la síntesis de matriz extracelular y el cambio angiofibrótico en la fibrosis (Kuipe et al., 2008; Zhang y Chu, 2019; Marcos et al., 2011).

Los mecanismos subyacentes de la expresión elevada del antígeno Tn en cáncer no se comprenden completamente, pero se proponen algunas teorías:

- Alteración de las enzimas glicosiltransferasas: Las mutaciones o la regulación negativa de las enzimas que participan en la glicosilación pueden resultar en la formación y presentación inapropiada del antígeno Tn (Pinho et al., 2007).
- Cambios en la maquinaria de glicosilación: Las alteraciones en el entorno del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi en las células cancerosas pueden contribuir a la glicosilación aberrante (Hubert et al., 2011, Sedlik et al., 2016).

La detección del antígeno Tn tiene potencial en la aplicación clínica como marcador tumoral. Su presencia puede ser indicativa de malignidad y ser útil en el diagnóstico y monitorización del cáncer. Además, debido a su ubicuidad en varios tipos de cáncer y su limitada presencia en tejidos normales, el antígeno Tn también presenta un atractivo blanco terapéutico (Sedlik et al., 2016; 11). Las vacunas basadas en el antígeno Tn están siendo investigadas en ensayos clínicos para su potencial en inmunoterapia contra el cáncer (Berois et al., 2022). La presencia anómala del antígeno Tn en las células cancerosas y su relación con la progresión tumoral lo convierten en un marcador y posible blanco terapéutico en oncología.

#### 1.1.8 Modelo celular y tumoral del antígeno Tn en cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es de los más frecuentes en todo el mundo, siendo la principal causa de muertes relacionadas con el cáncer tanto para hombres como para mujeres (Bray et al., 2018). Los tumores pulmonares evaden el sistema inmunológico al promover el reclutamiento y

expansión de leucocitos inmunosupresores (Labani-Motlagh et al., 2020), una capacidad que se asocia con un peor pronóstico de la enfermedad (Dysthe et al., 2020; Manjili y Butler, 2016).

La glicosilación alterada es una característica de la mayoría de los tumores (Freire et al., 2006), incluido el cáncer de pulmón (Liang et al., 2019; Lucchetta et al., 2019). Los antígenos de carbohidratos asociados a tumores han sido implicados en eventos importantes durante la progresión del cáncer (Pinho y Reis, 2015) y en la modulación de las respuestas inmunológicas antitumorales (Pinho y Reis, 2015; Mereiter et al., 2019). Entre estos, el antígeno Tn (N-acetilgalactosamina, GalNAc-O-Ser/Thr), una forma inmadura de O-glicosilación tipo mucina, es expresado por cánceres de mama, pulmón, colon, próstata y páncreas (Fu et al., 2019).

Es interesante destacar que el Tn está asociado con la agresividad del cáncer, mal pronóstico y metástasis en muchos cánceres epiteliales, incluyendo tumores pulmonares (Fu et al., 2019; Ju et al., 2008; Gill et al., 2013).

También es interesante destacar que la glicosilación aberrante en el microambiente tumoral es una característica de la angiogénesis (Cheng y Oon, 2018) y está implicada en la resistencia adquirida a las terapias antiangiogénicas (Chandler et al., 2019; Croci et al., 2018; Croci y Rabinovich, 2014).

Las líneas celulares de carcinoma pulmonar Lewis LL/2 es un tipo de línea celular murina que en su estado tipo salvaje (wild type) no sobreexpresa el antígeno Tn (Tn<sup>-</sup>). Esta línea celular se puede transfectar mediante CRISPR dirigida a Cosmc (c1galt1c1) y generar líneas celulares LL/2 Tn<sup>+</sup> (que sobreexpresan el antígeno Tn) (da Costa et al., 2021).

En este tipo de línea celular de cáncer de pulmón se demostró que el antígeno Tn favorece el crecimiento tumoral, la evasión inmunológica y la angiogénesis, en un proceso mediado por células MGL2<sup>+</sup>. Así, Tn moldea los ambientes inmunológicos y vasculares de los tumores pulmonares a través de mecanismos dependientes de MGL (da Costa et al., 2021).

## 1.2 Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) representan una de las áreas más prometedoras de la terapia médica contemporánea. Desde que Köhler y Milstein describieron por primera vez la producción de anticuerpos monoclonales en 1975 (Köhler y Milstein, 1975), esta tecnología ha avanzado de manera significativa y ahora abarca una amplia variedad de aplicaciones clínicas. Los anticuerpos monoclonales son moléculas de anticuerpos idénticas producidas por un único

tipo de célula del sistema inmunológico, permitiendo el reconocimiento y la unión específica a sustancias particulares. La capacidad de los mAbs para unirse a objetivos específicos ha llevado a su aplicación en el tratamiento de diversas formas de cáncer, trastornos autoinmunitarios, y enfermedades infecciosas (Weiner 2015).

Entre las distintas clases de anticuerpos, la IgG es la más abundante y está ampliamente distribuida en el suero y tejidos. Las moléculas de IgG tienen una forma característica de "Y". Esta forma se debe a su estructura cuaternaria, compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Las dos cadenas pesadas están unidas entre sí mediante puentes disulfuro, y cada cadena ligera está unida a una cadena pesada también mediante puentes disulfuro (Figura 9).

La molécula de IgG se puede dividir conceptualmente en dos regiones funcionales: la región Fab y la región Fc. La región Fab, que consiste en la porción amino terminal de las cadenas pesadas y ligeras, es responsable de la especificidad del anticuerpo al unirse a un antígeno específico. Cada molécula de IgG tiene dos regiones Fab, permitiendo la bivalencia, es decir, la capacidad de unirse a dos moléculas de antígeno simultáneamente (Janeway et al, 2001) (Figura 9).

La región Fc, por otro lado, es la porción carboxilo-terminal de las cadenas pesadas y no se une al antígeno. Esta región es esencial para las funciones efectoras del anticuerpo, ya que puede ser reconocida por diversos receptores celulares, como los de células efectoras como macrófagos, neutrófilos y células NK, así como el sistema del complemento. La interacción de la región Fc con estos receptores y sistemas es crucial para la eliminación de patógenos (Ravetch y Kinet, 1991).

En cuanto a la variabilidad, la región variable se encuentra en la parte distal de la región Fab y es única para cada anticuerpo específico. Esta región es la que permite a los anticuerpos reconocer una vasta diversidad de antígenos. Por otro lado, las regiones constantes (Fc) en las cadenas pesadas y ligeras determinan la clase y subclase del anticuerpo, así como algunas de sus funciones biológicas (Kabat 1991).

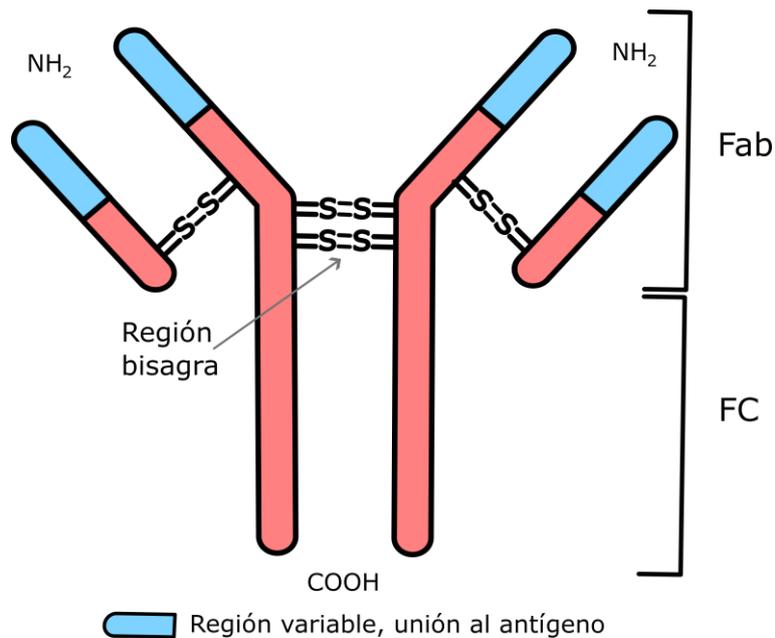


Figura 9. Esquema de la estructura general de un anticuerpo tipo IgG.

En oncología, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales han demostrado ser herramientas eficaces en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, como el trastuzumab utilizado para el cáncer de mama HER2 positivo (Slamon 1989). En el ámbito de las enfermedades autoinmunitarias, han ofrecido nuevas formas de abordar condiciones debilitantes como la artritis reumatoide (Scott et al., 2012). Además, su aplicación en enfermedades infecciosas ha permitido el desarrollo de tratamientos preventivos para patógenos específicos, como el palivizumab en el caso del virus sincitial respiratorio (Johnson et al., 1997).

### 1.2.1 Anticuerpos específicos del antígeno Tn (ChiTn)

Los anticuerpos específicos del antígeno Tn pueden dar lugar a innovaciones en la detección, diagnóstico y tratamiento del cáncer. El antígeno Tn (GalNAc- $\alpha$ -O-Ser/Thr) es una estructura de carbohidrato simple que se encuentra en la superficie de las proteínas y lípidos de la membrana celular. Su sobreexpresión ha sido asociada con muchos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama, colon y próstata (Ju y Cummings, 2002).

El desarrollo de anticuerpos que reconocen específicamente el antígeno Tn ha generado un gran interés en su potencial aplicación en la medicina. Estos anticuerpos pueden ser utilizados como

herramientas de diagnóstico para detectar células que expresen el antígeno Tn, lo que podría ayudar a identificar tumores en etapas tempranas o monitorizar la progresión de la enfermedad (Munkley 2016).

Uno de los retos en el desarrollo de terapias basadas en anticuerpos específicos del antígeno Tn es la potencial toxicidad. Dado que el antígeno Tn también puede estar presente en algunos tejidos normales, es crucial asegurar que los anticuerpos no ataquen a células sanas. La ingeniería de anticuerpos con una alta especificidad y afinidad para el antígeno Tn es esencial para superar este desafío.

Los avances en la biología molecular y la inmunología han facilitado la generación de anticuerpos monoclonales humanizados que presentan una menor inmunogenicidad y una mayor eficacia en modelos preclínicos. Estos avances, combinados con una mejor comprensión de la biología del antígeno Tn, tienen el potencial de cambiar el panorama del diagnóstico y tratamiento del cáncer.

Se han desarrollado varios mAbs dirigidos contra el antígeno Tn con diferentes especificidades, algunos de los cuales han demostrado un aumento en la supervivencia en ratones inoculados con líneas celulares Jurkat (Ando et al., 2008), mamarias (Hubert et al., 2011) y carcinomas pulmonares (Welinder et al., 2011). Además de su capacidad inherente para inhibir el crecimiento tumoral al inducir o estimular el sistema inmunológico (Scott et al., 2012; Vacchelli et al., 2013), la eficacia antitumoral de los mAbs puede potenciarse significativamente mediante la conjugación con fármacos (Chau et al., 2019), oligonucleótidos (Dovgan et al., 2019) o radionucleidos (Steiner y Neri, 2011; Audicio et al., 2011; Camacho et al., 2017; Perroni et al., 2021). Se ha desarrollado un mAb quimérico ratón/humano IgG1 anti-Tn (ChiTn) (Oppezzo et al., 2020) y se ha utilizado como un conjugado anticuerpo-fármaco. Los resultados mostraron que ChiTn se internaliza en células tumorales Tn+ *in vitro* y se acumula selectivamente en el tumor *in vivo* (Sedlik et al., 2016).

### 1.2.2 Marcación radioactiva de anticuerpos

La marcación radioactiva de anticuerpos es una técnica poderosa en la investigación médica y en aplicaciones clínicas. Los anticuerpos, debido a su capacidad para unirse de manera específica a antígenos, ofrecen una plataforma ideal para la administración dirigida de radioisótopos a células o tejidos diana. Esta técnica es especialmente útil en la imagenología médica y en la terapia dirigida para enfermedades como el cáncer.

Algunos radioisótopos son especialmente útiles para la marcación de anticuerpos debido a su vida media adecuada, emisión de radiaciones que pueden ser detectadas externamente y la capacidad de unirse a moléculas complejas sin alterar su función (Steiner y Neri, 2011).

Los radioisótopos comunes utilizados para la marcación de anticuerpos incluyen el tecnecio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ), yodo-131 ( $^{131}\text{I}$ ), Indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), Cobre-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ), Zirconio-89 ( $^{89}\text{Zr}$ ), Lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ), Actinio-225 entre otros (Tabla 1).

Radionucleido	Uso en cáncer	Vida media	Tipo de radiación	Energías principales	Capacidad de penetración en tejidos
$^{99m}\text{Tc}$	Diagnóstico	6.01 h	$\gamma$	140 keV	Media (varios cm)
$^{131}\text{I}$	Terapéutico y diagnóstico	8.02 d	$\beta^-$ , $\gamma$	606 & 364 keV ( $\gamma$ )	$\beta^-$ : 0.6-2 mm; $\gamma$ : varios cm
$^{111}\text{In}$	Diagnóstico	2.80 d	$\gamma$	171 & 245 keV	Varios cm
$^{64}\text{Cu}$	Diagnóstico y terapéutico	12.7 h	$\beta^+$ , $\beta^-$	278 & 657 keV ( $\beta^-$ ), 511 keV (aniquilación)	$\beta^-$ : 0.5-3 mm; 511 keV: varios cm
$^{89}\text{Zr}$	Diagnóstico	78.4 h	$\beta^+$	909 keV, 511 keV (aniquilación)	511 keV: varios cm
$^{177}\text{Lu}$	Terapéutico	6.65 d	$\beta^-$ , $\gamma$	498 keV ( $\beta^-$ ), 208 keV ( $\gamma$ )	$\beta^-$ : 0.5-2 mm
$^{225}\text{Ac}$	Terapéutico	10.0 d	$\alpha$ , $\beta^-$	5.8 MeV ( $\alpha$ )	$\alpha$ : 50-90 $\mu\text{m}$ ; $\beta^-$ : Variable

Tabla 1. Características principales de radioisótopos seleccionados utilizados en la marcación de anticuerpos. La tabla detalla el uso típico en oncología, la vida media, el tipo y energía de radiación, y la capacidad de penetración en tejidos de cada radioisótopo.

El  $^{99m}\text{Tc}$  es un isótopo emisor gamma con una vida media corta de aproximadamente 6 horas, lo que lo hace particularmente útil para la imagenología médica, como la gammagrafía (Duatti 2021). Sus propiedades físicas permiten la obtención de imágenes con alta resolución en técnicas como la tomografía por emisión de fotón único (SPECT). El  $^{99m}\text{Tc}$  se ha utilizado ampliamente para marcar anticuerpos en la detección de tumores, inflamación y otras enfermedades (Duatti 2021).

Por otro lado, el  $^{131}\text{I}$  emite radiación beta, lo que lo hace eficaz para la terapia radiactiva. Cuando se une a anticuerpos que se dirigen específicamente a células cancerosas, el  $^{131}\text{I}$  puede administrar radiación localizada para destruir esas células (Zhang et al., 2022). Además, el  $^{131}\text{I}$  también emite radiación gamma, lo que permite su visualización y seguimiento en el cuerpo.

Esta dualidad hace que el  $^{131}\text{I}$  sea una herramienta poderosa tanto para la terapia como para el diagnóstico (Zhang et al., 2022) (Tabla 1).

La radiomarcación de anticuerpos generalmente implica la utilización de agentes quelantes que facilitan la unión del isótopo al anticuerpo sin afectar la función o especificidad de este. Es esencial que el proceso de marcación no altere de forma significativa la función biológica del anticuerpo para asegurar que el mAb marcado pueda alcanzar su diana de manera efectiva (Sharkey y Goldenberg, 2006).

El ácido 6-hidrazinonicotínico (HYNIC) es un agente quelante bifuncional comúnmente utilizado para preparar péptidos o proteínas marcados con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  con alta eficiencia, bajo condiciones suaves, y es altamente estable *in vivo* (García et al., 2014). De manera similar, para el proceso de oxidación química utilizado en la marcación con  $^{131}\text{I}$ , el yoduro de sodio se convierte en una forma reactiva que puede incorporarse a los grupos tirosina del anticuerpo (Feng et al., 2022).

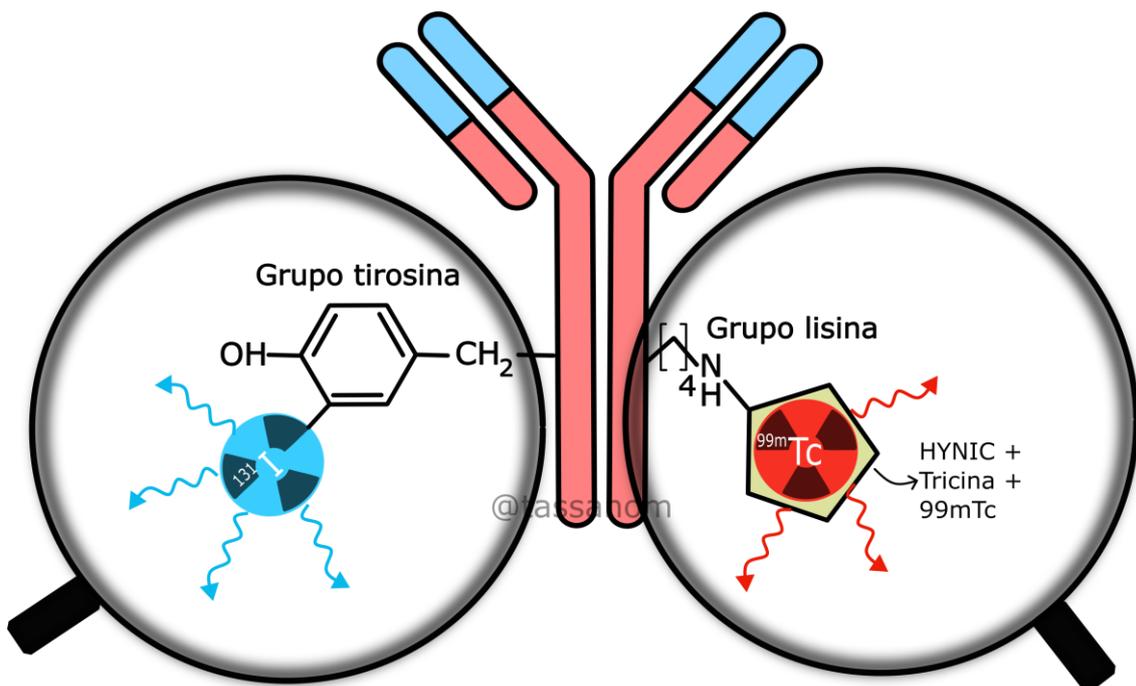


Figura 10. Formas de radiomarcación de anticuerpos con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  y  $^{131}\text{I}$ .

A pesar de las ventajas, existen desafíos con la marcación radioactiva de anticuerpos. Estos incluyen la estabilidad de la radiomarcación, la potencial desnaturalización del anticuerpo y la

toxicidad de la radiación hacia tejidos no diana. Sin embargo, con las técnicas actuales de marcación y purificación, muchos de estos desafíos se han superado con éxito (García et al., 2014).

### 1.3 Ensayos *In vitro* utilizando compuestos radiomarcados para cuantificar internalización celular y unión a membrana

La utilización de compuestos radiomarcados ha transformado significativamente el campo de la investigación biológica y biomédica. Estos compuestos, cuando se emplean en ensayos *In vitro*, brindan una herramienta cuantitativa precisa para analizar diversas funciones celulares, incluida la internalización celular y la unión a la membrana de ciertas moléculas, como los anticuerpos.

El proceso generalmente comienza con la marcación radioactiva de una molécula de interés. Una vez que el compuesto ha sido exitosamente radiomarcado, se puede añadir a los cultivos celulares para iniciar el ensayo.

La internalización celular de anticuerpos y otros ligandos es un proceso fundamental en la comunicación celular y en la respuesta a moléculas externas. Los anticuerpos radiomarcados se unen inicialmente a su antígeno objetivo en la superficie celular. Con el tiempo, la célula puede internalizar este complejo anticuerpo-antígeno, transportándolo al interior de la célula en vesículas endocíticas (Christine et al., 2011) (Figura 11). La cantidad de radioactividad que se encuentra dentro de las células después de ciertos períodos de tiempo indica la eficiencia con la que las células internalizan el anticuerpo (Feng et al., 2022).

Por otro lado, la unión a la membrana se puede evaluar mediante la medición de la radioactividad que permanece asociada con la superficie celular después de lavados exhaustivos para eliminar el compuesto no unido (Torchilin 2014). Esta medida es esencial para comprender qué porcentaje del anticuerpo se une específicamente a su antígeno diana en la superficie celular y qué porcentaje se internaliza.

La cuantificación se puede realizar mediante espectrometría de radiación, que detecta y cuantifica la radiación emitida por los compuestos radiomarcados (Behr y Behe, 2002). Una ventaja de usar radiomarcadores es la precisión y sensibilidad del ensayo, permitiendo detectar pequeñas cantidades de compuestos que se han unido o han sido internalizados por las células.

En resumen, los ensayos *in vitro* que utilizan compuestos radiomarcados han permitido avances significativos en la comprensión de la internalización celular y la unión a la membrana. La

posibilidad de rastrear y cuantificar estas moléculas dentro de las células ofrece perspectivas valiosas sobre cómo las células interactúan con su entorno y cómo estas interacciones pueden ser moduladas o interrumpidas en el contexto de enfermedades o tratamientos.

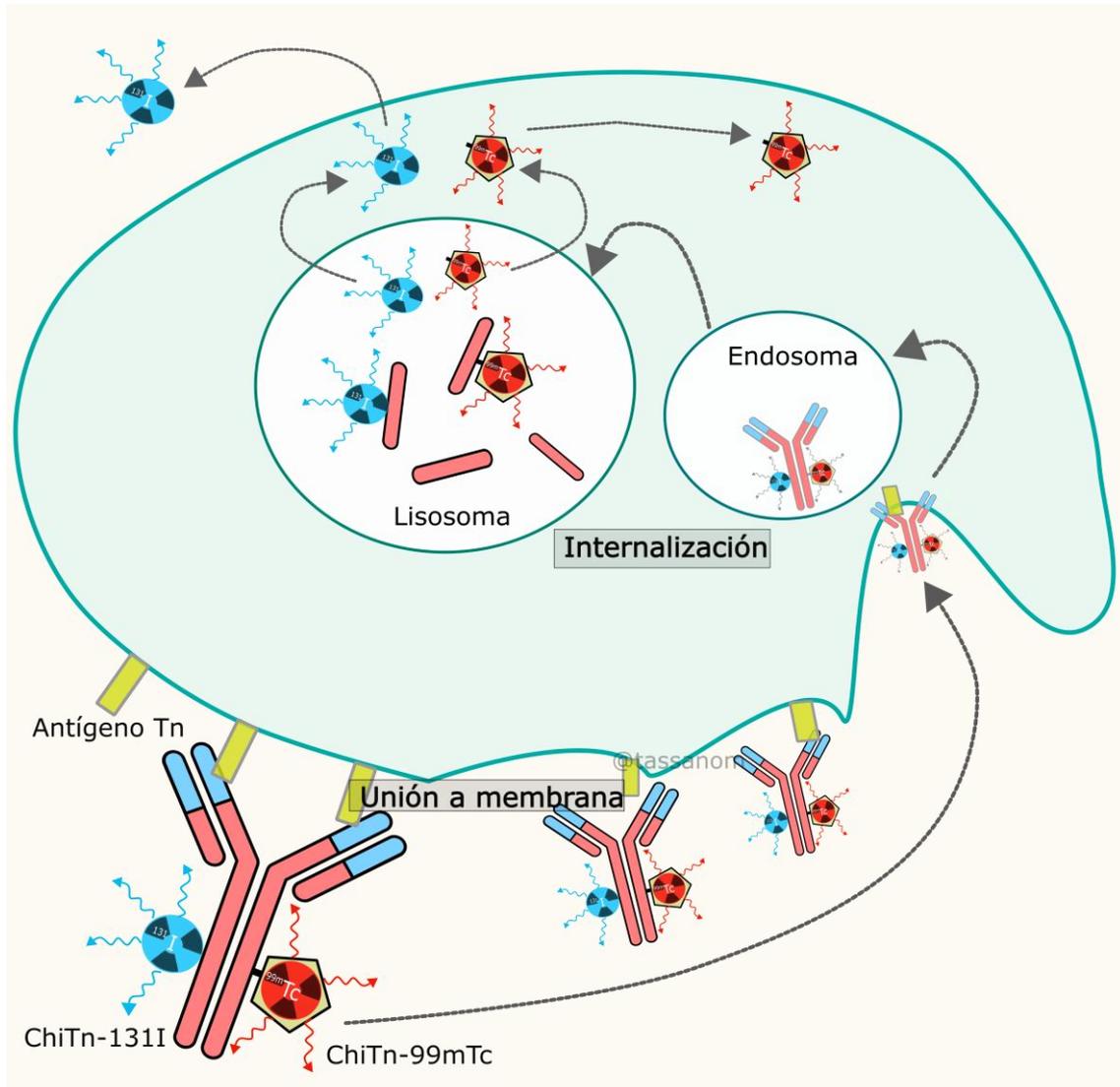


Figura 11. Diagrama esquemático del procesamiento celular de ChiTn radiomarcada con  $^{131}\text{I}$  y/o  $^{99m}\text{Tc}$ . Una vez unidos a Tn, los anticuerpos radiomarcados entran en la célula por pinocitosis. Luego procede a la degradación proteolítica lisosomal. El catabolito radiomarcado,  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-lisina, es residualizante debido a su polaridad o carga y tiende a acumularse dentro de las células. Por el contrario, los catabolitos proteicos marcados con yodo se eliminan rápidamente de las células.

## 1.4 Biodistribuciones utilizando radiotrazadores

La biodistribución de un compuesto dentro de un organismo se refiere al patrón de distribución y acumulación en diferentes tejidos y órganos a lo largo del tiempo. Esta es una métrica crucial en farmacología y medicina nuclear, ya que proporciona información sobre dónde se acumula un compuesto, cuánto tiempo permanece y cómo se excreta. Los radiotrazadores, son compuestos marcados con un isótopo radiactivo, y han sido herramientas esenciales para estudiar la biodistribución debido a su capacidad para ser detectados y cuantificados utilizando técnicas de imagen médica como la tomografía por emisión de positrones (PET) y la gammagrafía. También es posible utilizar mediciones de órgano entero por detectores de yoduro de sodio (NaI) o germanio hiperpuro (HPGe) (Tassano et al., 2021) (Figura 12).

El proceso comienza con la elección de un radiotrazador adecuado para el compuesto de interés. El isótopo radiactivo seleccionado debe tener una vida media compatible con el tiempo requerido para el estudio y emitir radiación detectable que no cause daño excesivo a los tejidos (Phelps 2000) (Tabla 1). Los isótopos más utilizados en estudios de biodistribución incluyen el  $^{18}\text{F}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$  y  $^{15}\text{O}$  para PET y el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{123}\text{I}$ , y  $^{131}\text{I}$  para gammagrafía y mediciones de órgano entero (Cherry et al., 2012).

Una vez que se ha seleccionado un radiotrazador, se administra al organismo y se monitoriza su distribución en el tiempo. Las imágenes obtenidas pueden ser analizadas para determinar la concentración del trazador en diferentes órganos y tejidos, lo que proporciona información sobre la farmacocinética del compuesto, su acceso a diferentes tejidos y su posible acumulación en áreas específicas (Gambhir 2002). Es por lo tanto una herramienta que puede darnos información funcional y no únicamente estructural como otras técnicas, por ejemplo, rayos X. Para el caso de mediciones de órganos enteros, se debe sacrificar el animal, usualmente ratones, y se miden los órganos uno a uno y por separado, obteniéndose medidas de % de actividad inyectada por masa de órgano.

Las técnicas de imagen basadas en radiotrazadores no sólo son valiosas para la investigación preclínica, sino que también desempeñan un papel esencial en la medicina clínica, especialmente en oncología. Por ejemplo, la  $^{18}\text{F}$ -fluorodesoxiglucosa (FDG) es un análogo de la glucosa que se acumula en células con alta actividad metabólica, como las células cancerosas, y se utiliza ampliamente en la detección y seguimiento de tumores mediante PET (Phelps 2000; Jones y Rabiner, 2002).

Sin embargo, la biodistribución utilizando radiotrazadores no está exenta de desafíos. La radiación emitida por el trazador puede presentar un riesgo para el organismo, y la interpretación de los datos puede ser compleja, especialmente si el trazador se metaboliza o se une a proteínas plasmáticas (Saha 2019). Además, es crucial asegurarse de que el radiotrazador no altere la farmacocinética del compuesto de interés (Saha 2019).

A pesar de estos desafíos, la biodistribución utilizando radiotrazadores ha proporcionado información invaluable sobre la dinámica de muchos compuestos en el cuerpo y ha avanzado significativamente nuestra comprensión de la farmacología y la biología de enfermedades como el cáncer. Con el desarrollo de nuevos radiotrazadores y técnicas de imagen más avanzadas, es probable que esta área continúe evolucionando y proporcionando herramientas más potentes para la investigación y la práctica clínica.

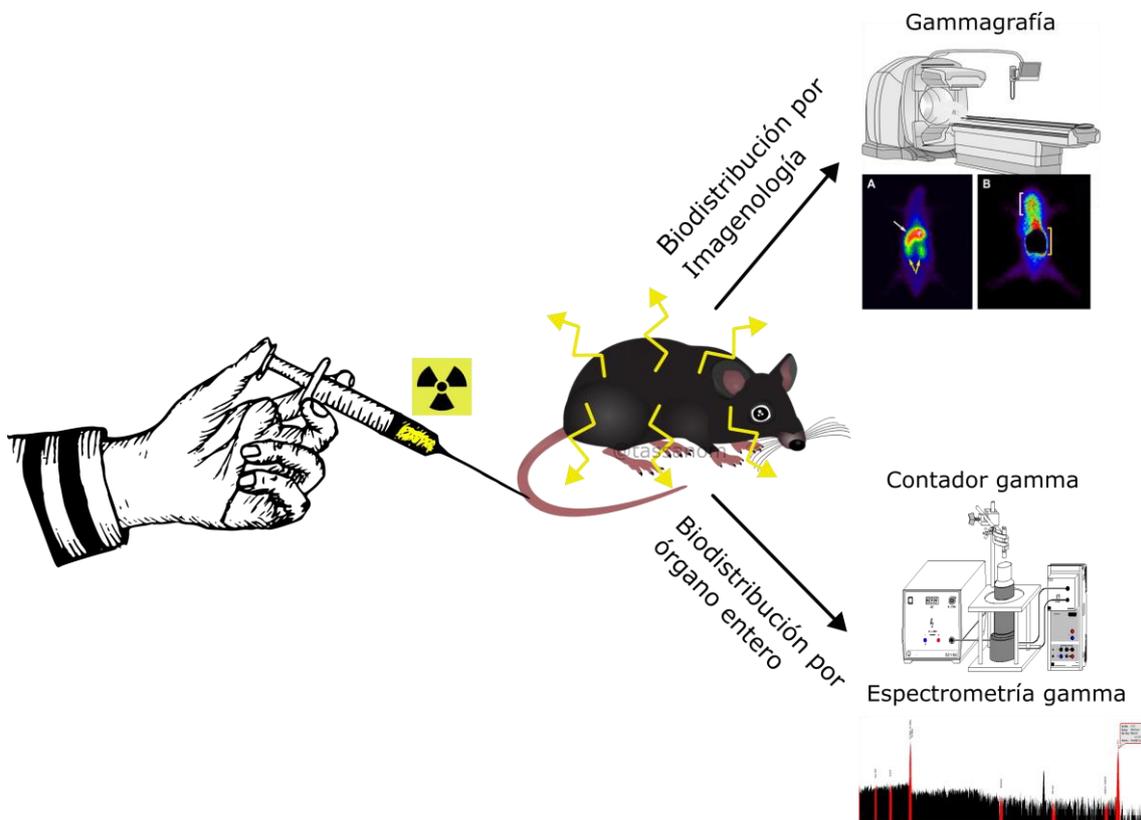


Figura 12. Esquema de un ensayo de biodistribución en un ratón por imagenología o medición de órgano entero.

### 1.4.1 Espectrometría gamma

La espectrometría gamma es una herramienta fundamental en el análisis radioquímico, permitiendo la detección y cuantificación de radiaciones gamma emitidas por materiales radiactivos. Uno de los detectores más avanzados y precisos utilizados en la espectrometría gamma es el detector de Germanio de Alta Pureza (HPGe, por sus siglas en inglés de "High-Purity Germanium") (Figura 13).

El HPGe es especialmente relevante debido a su capacidad de proporcionar alta resolución en las mediciones espectrométricas, lo que permite diferenciar y cuantificar con precisión diferentes isótopos radiactivos que emiten radiaciones gamma en energías cercanas.

Características Principales:

*Alta Resolución:* Una de las ventajas más notables de los detectores HPGe es su excelente resolución energética, típicamente mucho mejor que otros tipos de detectores gamma (Knoll 2010). Esto permite identificar y cuantificar isótopos específicos, incluso cuando sus picos gamma están muy próximos entre sí.

*Eficiencia:* A pesar de que su eficiencia absoluta es generalmente menor que la de otros detectores, su resolución energética compensa esta desventaja, especialmente en aplicaciones que requieren la diferenciación precisa de varias emisiones gamma (Knoll 2010).

*Refrigeración:* Dado que los detectores HPGe deben operarse a temperaturas criogénicas para minimizar la corriente térmica y el ruido electrónico, generalmente se utilizan con sistemas de refrigeración de nitrógeno líquido (Debertin y Helmer, 1988).

*Durabilidad:* Con un mantenimiento adecuado, especialmente en términos de su sistema de refrigeración, estos detectores pueden funcionar durante muchos años sin degradación significativa en su rendimiento.

Aplicaciones:

El HPGe es ampliamente utilizado en diversas aplicaciones, desde el análisis de muestras medioambientales hasta el control de materiales en instalaciones nucleares y la investigación en física nuclear (L'Annunziata 2012; Cabrera et al., 2023). Su capacidad de proporcionar espectros gamma detallados y precisos lo hace una herramienta fundamental en la identificación de fuentes radiactivas desconocidas o en la determinación exacta de la composición isotópica de una muestra.

Consideraciones:

Si bien el HPGe ofrece numerosas ventajas, también presenta ciertos desafíos. Su necesidad de operación a temperaturas criogénicas implica un mantenimiento cuidadoso y constante para evitar el calentamiento del detector. Además, su costo inicial y el costo asociado con el equipo de refrigeración pueden ser relativamente altos.

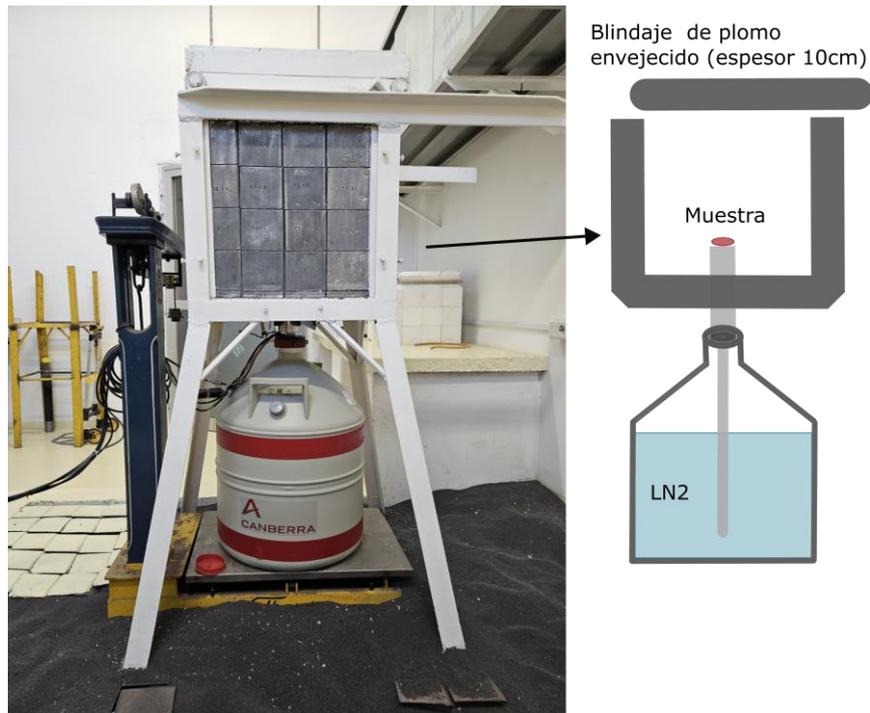


Figura 13. Espectrómetro gamma de HPGe marca Canberra del Laboratorio de radioquímica del Centro de Investigaciones Nucleares.

En el ámbito de la espectrometría gamma, uno de los desafíos cruciales es la mitigación de las interferencias que pueden provenir de las radiaciones de fondo natural o de otras fuentes no deseadas. Para afrontar este desafío, una estrategia significativa ha sido el empleo de blindajes de bajo fondo, especialmente utilizando plomo envejecido, un material altamente eficaz para este propósito (Mrđa et al., 2007) (Figura 13).

El plomo envejecido es un material que ha experimentado un período significativo de decadencia radioactiva, lo que reduce sustancialmente su nivel de radioactividad inherente (Heusser, 2015). Este tipo de plomo puede obtenerse de artefactos antiguos o estructuras sumergidas durante siglos, donde los isótopos radiactivos del plomo han tenido tiempo

suficiente para decaer. Una característica crucial del plomo envejecido es que contiene bajos niveles de plomo-210, un isótopo radiactivo, lo que lo convierte en un material excepcionalmente adecuado para el blindaje en experimentos de espectrometría gamma que requieren niveles bajos de fondo radioactivo (Mrđa et al., 2007). El uso de blindajes de bajo fondo, como el plomo envejecido, permite una detección más precisa de radiaciones gamma de baja energía, que de otro modo podrían ser “oscurecidas” por las señales de fondo. Esto no solo mejora la sensibilidad de los experimentos de espectrometría gamma, sino que también puede expandir las capacidades de detección, permitiendo el análisis de muestras con actividades radioactivas extremadamente bajas.

#### 1.4.2 Espectrometría gamma en biodistribuciones y ensayos *in vitro*

Los estudios de biodistribución (BD) de radiofármacos generalmente se miden en detectores gamma de un solo canal. Los detectores de germanio hiperpuro (HPGe) permiten una detección eficiente y de alta resolución de diferentes energías gamma, lo que a su vez permite la detección simultánea de múltiples emisores gamma. Además, si se dispone de un blindaje adecuado, estos detectores pueden medir con límites de detección muy bajos (Tassano et al., 2021).

En el trabajo de Tassano et al. 2021 (Tassano et al., 2021) se estudió el uso de un espectrómetro gamma HPGe con blindaje de bajo fondo para utilizarlo en estudios de BD y ensayos *in vitro*.

Manteniendo un error <5% en mediciones de 60 segundos, fue posible medir órganos con un límite inferior de detección de: 182 Bq para  $^{99m}\text{Tc}$  (140.5 keV) y 1424 Bq para  $^{131}\text{I}$  (364.5 keV); la actividad mínima detectada fue: 500 Bq.g<sup>-1</sup> (13.5 nCi.g<sup>-1</sup>) para  $^{99m}\text{Tc}$ , y 4500 Bq.g<sup>-1</sup> (121.6 nCi.g<sup>-1</sup>) para  $^{131}\text{I}$ . Para detectar todos los órganos (con un error <5% en 60 segundos), la calibración mínima de actividad inyectada por ratón fue de 0.6 μCi (22.2 kBq) para  $^{99m}\text{Tc}$  y 4.6 μCi (170.2 kBq) para  $^{131}\text{I}$ .

En conclusión, la utilización del espectrómetro gamma HPGe del Centro de Investigaciones Nucleares (CIN) de Facultad de Ciencias, UdelaR comparado con un monocanal Ortec del mismo Centro se obtienen mediciones de ≈1000 veces menos fondo radioactivo. También, es posible detectar diferentes estrategias de radiomarcado, lo que permite estudiar diferentes perfiles de BD simultáneamente. Con un blindaje y detector adecuados, se pueden lograr tiempos de BD mucho más largos, lo que posibilita estudios a largo plazo. También permite reducir el número de ratones involucrados en estudios de BD (Tassano et al., 2021).

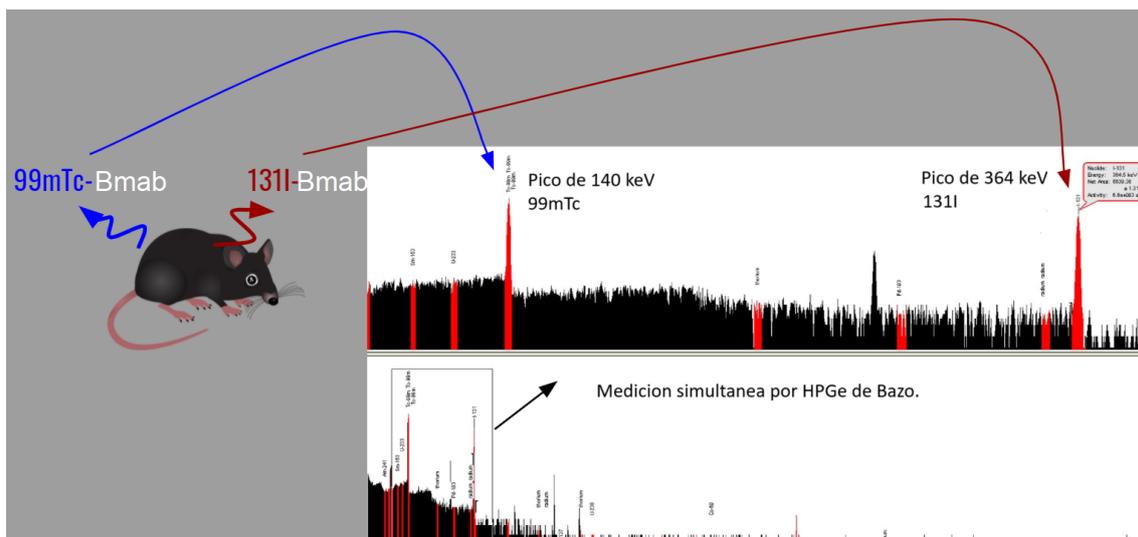


Figura 14. La figura muestra un espectro gamma del HPGe del CIN, en este caso del órgano Bazo, de un ratón previamente inyectado con Bevacizumab (Bmab) radiomarcado con  $^{99m}\text{Tc}$  o  $^{131}\text{I}$ . En el mismo se puede apreciar la diferenciación de los picos de emisión gamma de  $^{99m}\text{Tc}$  y  $^{131}\text{I}$ , lo que permite hacer mediciones simultaneas. Se obtienen perfiles similares con ChiTn radiomarcado.

### 1.5 Antecedentes de nuestro grupo de investigación

El Área de Radiofarmacia comenzó sus actividades con la puesta en marcha del Centro de Investigaciones Nucleares (CIN, 1976) y desde entonces ha tenido una intensa actividad, tanto en investigación como en enseñanza. Esta área lleva a cabo un importante número de líneas de investigación, algunas de las cuales se coordinan con instituciones académicas nacionales e internacionales. Nuestro objetivo es realizar investigaciones básicas, así como su posterior traslación a la clínica. A través de la integración de conocimientos en un entorno interdisciplinario, nos permite lograr una mejor comprensión y enfoque de diversas patologías, en particular las oncológicas, permitiéndonos desarrollar nuevos radiofármacos diagnósticos y terapéuticos.

Algunas de nuestras líneas de investigación son: a) Radiofármacos para terapia y/o diagnóstico; b) Nanotecnología; c) Síntesis de ligandos bifuncionales; d) Marcado radiactivo/fluorescente/híbrido (radiactivo-fluorescente) de anticuerpos, péptidos y pequeñas moléculas; etc.

El desarrollo de estas líneas busca profundizar y/o generar enfoques innovadores para su potencial uso diagnóstico y/o terapéutico, principalmente en el campo oncológico. Estas líneas nos proyectan hacia un campo de investigación líder en el mundo y nos nutren con importantes

contribuciones en términos de intercambio científico nacional, regional e internacional, programas doctorales dirigidos conjuntamente por científicos internacionalmente reconocidos, así como la contribución de equipos y productos sujetos a investigación.

Dentro de la oncología, nuestro grupo de investigación ha centrado su interés en el estudio de nuevas estrategias diagnósticas y/o terapéuticas en melanoma, cáncer de mama, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, entre otras patologías. En el presente proyecto proponemos continuar la investigación en cáncer y expandir nuestros estudios hacia nuevos objetivos de cáncer.

Nuestra relación con varios grupos de investigación de relevancia nacional, especialmente con el Dr. Juan Pablo Gambini de CUDIM, y recientemente también con el Dr. Eduardo Osinaga del Institut Pasteur de Montevideo, y también a nivel internacional nos ha permitido desarrollar numerosos proyectos básico-clínicos en Imagen Molecular Oncológica. De esta manera hemos desarrollado nuevas biomoléculas marcadas con emisores gamma o beta con reconocimiento específico (péptidos, anticuerpos, etc.) por receptores o estructuras específicas. Esto ha resultado en numerosas comunicaciones científicas internacionales en revistas indexadas, donde hemos dado a conocer el desarrollo de nuevas herramientas con las que los oncólogos pueden diagnosticar y/o tratar a sus pacientes. Cabe destacar que este proyecto es innovador, original tanto para nuestro entorno como en el extranjero, con el apoyo de un grupo de investigación de especialistas nacionales e internacionales de excelencia, incluidos en el sistema nacional de investigadores.

## Objetivo

En esta tesis, se busca explorar el potencial de un mAb quimérico ratón/humano anti-Tn de IgG1 (ChiTn) radiomarcado como agente teranóstico para el cáncer.

### 2.1 Objetivos específicos

1. Radiomarcación y controles de radiomarcado de ChiTn y molécula control IgG con  $^{131}\text{I}$  y  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .
2. Evaluar la unión a membrana y la internalización del ChiTn radiomarcado en células LL/2 Tn+ y Tn- (tipo salvaje).
3. Evaluar su biodistribución en ratones inoculados con modelos tumorales LL/2 Tn+ y Tn-.
4. Investigar el uso de Losartan como coadyuvante para mejorar la entrega de ChiTn radiomarcado a los tumores.

## Materiales y métodos

### 3.1 Derivatización de los anticuerpos

El anticuerpo monoclonal quimérico ratón/humano anti-Tn IgG1 (Chi-Tn) (Osinaga et al., 2000) se obtuvo del Laboratorio de Glicobiología e Inmunología tumoral / Institut Pasteur Montevideo. Como molécula de control, se usó una IgG humana (Sigma-Aldrich, USA) sin especificidad antigénica declarada.

La reacción de conjugación se inició añadiendo un ácido N-succinimidil 6-(trifluoroacetil) hidrazinopiridina-3-carboxílico en forma protegida por hidrazino éster succinimidil (NHS-HYNIC-Tfa), sintetizado en nuestro laboratorio (García et al., 2014), luego se añadieron 100 nmol en 7  $\mu$ L de dimetilsulfóxido ((DMSO), J. T. Baker) al ChiTn purificado o IgG control (10 nmol) en un buffer  $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$  de 0.15 M pH 8 y se incubó en oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente (RT). Posteriormente, el ChiTn-HYNIC e IgG-HYNIC se purificaron por cromatografía de exclusión de tamaño utilizando NaCl al 0.9% y una columna Sephadex G-25 (SEC) (PD-10, Amersham Biosciences).

### 3.2 Radiomarcado de los anticuerpos

El radiomarcado de ChiTn-HYNIC o IgG-HYNIC con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  se realizó añadiendo 33.5  $\mu$ mol de tricina, 33  $\mu$ mol de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 5 nmol del conjugado de anticuerpo. Inmediatamente, se añadió una solución de  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min.

El radiomarcado de ChiTn o IgG con  $^{131}\text{I}$  se logró utilizando los tubos de iodación precubiertos Pierce (PPCIT) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), y el protocolo "Ejemplo Protocolo I: El Método Indirecto de Iodinación de Chizzonite" según el manual de Thermo Fisher Scientific 0016379. En resumen, el PPCIT se humedeció con 1 mL de buffer de iodación Tris y se decantó. Luego, se añadieron 10 MBq de  $^{131}\text{I}$  al PPCIT y se activó durante 6 min a RT. A continuación, se añadieron 50  $\mu$ g de ChiTn o IgG y la mezcla de reacción y se incubó durante 10 min a RT.



Figura 3.2. Radiomarcacion de anticuerpos en “celda caliente” del CIN.

### 3.3 Controles de radiomarcado de los anticuerpos, purificación y estabilidad

Ambos radiomarcados se evaluaron en cuanto a su pureza radioquímica mediante 1) SEC equilibrado y eluido con solución salina normal, a un flujo de 1.0 mL/min, y 2) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con una columna Protein-Pak 300 SW de 7.5 mm x 30 cm (Waters, USA) usando modo isocrático con buffer fosfato 0.05 M pH 7.0, flujo de 1 mL/min, equipado con detectores de absorción UV y NaI(Tl) respectivamente.

El radiomarcado con tecnecio-99m se evaluó usando cromatografía de capa fina instantánea (ITLC) con varios sistemas: ITLC-SG (Pall Corporation) combinado con NaCl al 0.9%, ITLC-SG saturado con albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) y EtOH:NH<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O (2:1:5), así como papel Whatman 1 (Whatman International Ltd) con metil etil cetona (MEK).

Para evaluar la integridad de los anticuerpos radiomarcados, se utilizó el mismo sistema HPLC. Los anticuerpos radiomarcados se incubaron en suero a 37°C durante diferentes intervalos de tiempo, seguido de un análisis HPLC para evaluar su estabilidad.

### 3.4 Cultivo celular

La línea celular de cáncer de pulmón murino tipo salvaje (Tn-) LL/2 (ATCC) y las células LL/2 que expresan el antígeno Tn (Tn+) (da Costa et al., 2021) se cultivaron en medio RPMI-1640 (Capricorn Scientific) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Capricorn Scientific), 2 mM de L-Glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (Capricorn Scientific). Todos los cultivos se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y una atmósfera de humedad del 95%.

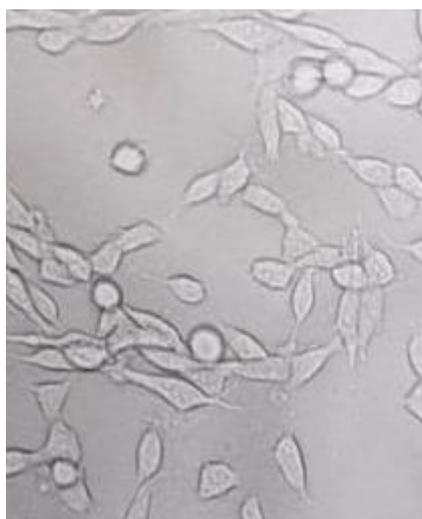


Figura 3.4. Cultivo celular de células LL/2.

### 3.5 Unión a la membrana e internalización celular

El ensayo de unión a la membrana e internalización celular se realizó sembrando  $0.5 \times 10^6$  células Tn- o Tn+ con medio de cultivo en placas de 24 pocillos y permitiendo su crecimiento durante la noche. Después de lavar una vez con medio de cultivo, las células se incubaron con ~4 nM de ChiTn y/o IgG radioconjugados con <sup>99m</sup>Tc y/o <sup>131</sup>I durante 1, 2, 3, 4 (cuadruplicados) y 24 h (octuplicados) a 37 °C.

Luego, el medio de reacción se aspiró y las células se lavaron dos veces con 500 µL de solución salina con buffer fosfato (PBS) fría. Las células se lavaron con una solución tampón ácida fría (buffer glicina 0.2 M pH 2) durante 5 min para eliminar los anticuerpos radioconjugados unidos a la membrana. La fracción de anticuerpos radioconjugada internalizada se obtuvo por lisis con NaOH 1 M durante 5 min. Se midieron las radioactividades unidas a la membrana e

internalizadas y los resultados se analizaron según la sección de Medidas de Radioactividad y análisis estadístico.

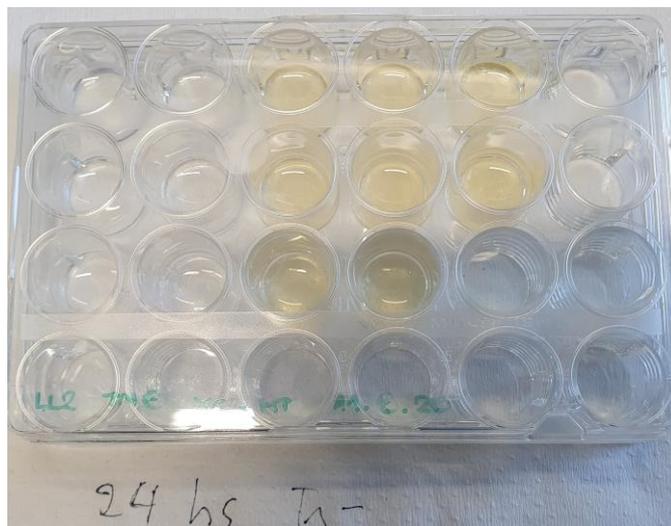


Figura 3.5. Ensayo de unión e internalización celular de ChiTn radiomarcado en células LL/2.

### 3.6 Animales e inducción de tumores

Se compraron ratones hembra C57BL/6 de los Laboratorios URBE (Uruguay). El manejo, cuidado y experimentación con los ratones se realizó de acuerdo con los principios éticos adoptados por el Comité Nacional de Investigación Animal (CNEA, Uruguay) (número de aprobación del procedimiento 240011-001327-18). Células LL/2 Tn- o Tn+ ( $2 \times 10^5/100 \mu\text{L}$ ) se inocularon en la región del flanco de cada ratón a través de inyección subcutánea (s.c.) o intradérmica (i.d.) (5 ratones/grupo). Los animales fueron monitoreados diariamente durante al menos 1 mes, evaluando el crecimiento tumoral.

### 3.7 Tratamiento con Losartán

Las píldoras de Losartán (50 mg/píldora) (Losartán potásico) se trituraron usando un mortero y un mazo, y se disolvieron en PBS para obtener una concentración de 2.5 mg/mL. Las soluciones se filtraron y se almacenaron en un contenedor estéril. Los animales fueron tratados diariamente con una inyección intraperitoneal (i.p.) de Losartán (20 mg/kg) o solución salina (control) durante 9 días (Diop-Frimpong et al., 2011; Chauhan et al., 2013; Zhao et al., 2019). Una vez transcurrido este tiempo de pretratamiento con Losartan, los animales están listos para los estudios de biodistribución.

### 3.8 Estudios de biodistribución

Cuando los tumores alcanzaron un tamaño entre 500-1000 cm<sup>3</sup> (15-20 días), los ratones del mismo grupo recibieron 0.74-3 MBq de ChiTn-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc o IgG-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc (1-4 µg, en 100 µL PBS), y/o aproximadamente 185 kBq de ChiTn-<sup>131</sup>I o IgG-<sup>131</sup>I (1 µg, en 100 µL PBS) purificados por PD10 y a través de la vena de la cola.

Después de 4, 24 y 48 h, los animales fueron sacrificados con anestésicos (xilazina-100 mg/Kg y ketamina-300 mg/Kg). Se recogieron sangre, orina y heces, se extirparon el tumor y órganos seleccionados, se enjuagaron para eliminar la sangre residual, se pesaron y se midió su radioactividad de acuerdo con la sección de *Medidas de Radioactividad y análisis estadístico*. Los resultados se expresaron como porcentaje de dosis inyectada (% ID) y por gramo de tejido (% ID/g).



Figura 3.8. Jaulas metabólicas para ratones. Ensayos de biodistribución.

### 3.9 Medidas de Radioactividad y análisis estadístico

Las mediciones de rayos gamma se obtuvieron utilizando un detector de germanio de alta pureza (HPGe) (Canberra) y un blindaje apropiado de bajo fondo. El HPGe tiene las siguientes características: eficiencia de conteo del 20% (a 1332 keV) y resolución FWHM < 0.85 keV (a 122 keV), lo que permite mediciones simultáneas *in vitro* y/o de biodistribución de múltiples radionúclidos emisores gamma (Knight et al., 2019; Tassano et al., 2021). Los resultados se

informan para  $^{99m}\text{Tc}$  (140.5 keV, 89%) con un límite inferior de detección (LLD) de 110 Bq, y  $^{131}\text{I}$  (364.5 keV, 81.7%) LLD de 1.0 kBq para mediciones de 30 segundos.

Para evaluar la significancia estadística de las diferencias de medianas, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney (MW) con corrección de Bonferroni. Se utilizó la siguiente notación para significancia estadística, ns:  $p \leq 1e^{00}$ ; \*:  $1e^{-02} < p \leq 5e^{-02}$ ; \*\*:  $1e^{-03} < p \leq 1e^{-02}$ ; \*\*\*:  $1e^{-04} < p \leq 1e^{-03}$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 1e^{-04}$ ; además, se aplicó un intervalo de confianza del 95% (CI).

Realice todos los análisis estadísticos y visualizaciones de datos utilizando varios paquetes dentro de Spyder v. 4.1.5 (Raybaut, 2009), un entorno de desarrollo integrado (IDE) para programación científica en Python v. 3.8.5 (Python Software Foundation). Los paquetes utilizados incluyen Pandas (McKinney, W., 2010) para la manipulación de datos, Matplotlib (Hunter, J. D., 2007) para visualización de datos, NumPy (Harris et al., 2020) para cálculos numéricos, Seaborn (Waskom et al., 2021) para visualización avanzada de datos y Statannotations (Charlier et al., 2022) para anotaciones estadísticas.

## Resultados

### 4.1 Radiomarcado y controles de calidad *in vitro*

Tanto el ChiTn como los anticuerpos IgG radiomarcados con  $^{99m}\text{Tc}$  o  $^{131}\text{I}$  fueron purificados y su identidad química fue determinada por SEC, HPLC e ITLC.

El análisis SEC mostró un volumen de retención de los anticuerpos radiomarcados entre 3-4 mL, mientras que el  $^{99m}\text{Tc}$  libre y el  $^{131}\text{I}$  libre mostraron un volumen de retención entre 8-9 mL. El perfil de HPLC mostró tiempos de retención de 8.5, 8.9 y 9.0 min para ChiTn-HYNIC- $^{99m}\text{Tc}$ , ChiTn- $^{131}\text{I}$  y ChiTn no conjugado, respectivamente (Figura 15).

La pureza radioquímica superó el 92% en todos los experimentos. El análisis realizado por ITLC demostró que, dentro del 8% residual, casi dos tercios fueron atribuidos a  $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , mientras que el tercio restante estuvo asociado a  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina.

La estabilidad radioquímica mostró una disminución gradual con el tiempo, con un promedio del 89% (SD 2.1) y 90% (SD 2.08) de anticuerpos que retienen su radiomarcado con  $^{99m}\text{Tc}$  y  $^{131}\text{I}$ , respectivamente, luego de un período de incubación de 48 h en suero a 37 °C (Figura 15, abajo a la derecha). Se obtuvieron resultados similares de pureza y estabilidad radioquímica para IgG-HYNIC- $^{99m}\text{Tc}$ .

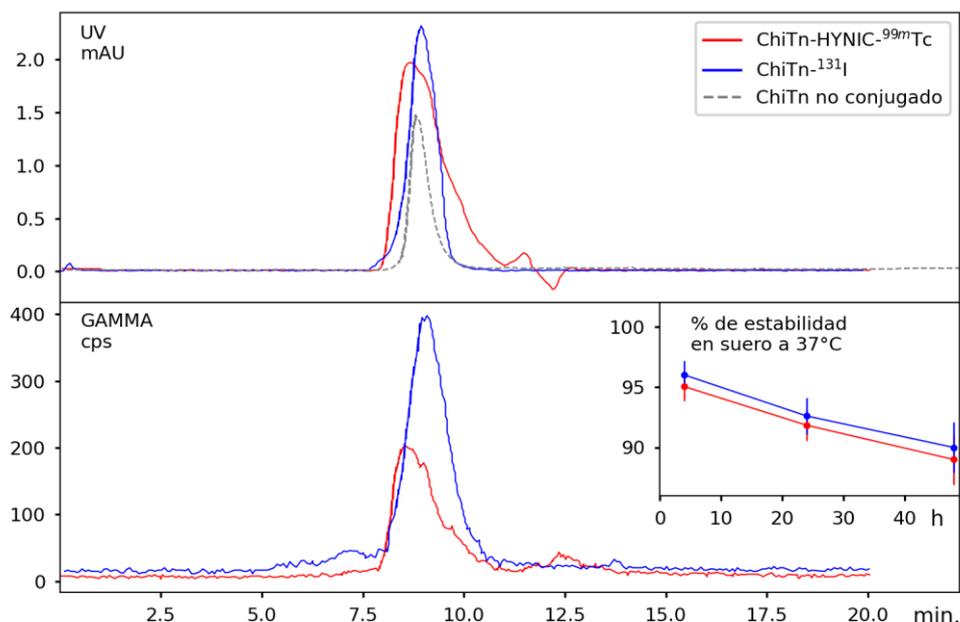


Figura 15. Perfil de HPLC y estabilidad radioquímica *in vitro* del ChiTn radiomarcado. El panel superior muestra el perfil de retención del ChiTn cuando se radiomarca con  $^{99m}\text{Tc}$  (rojo) o  $^{131}\text{I}$  (azul), así como el ChiTn no conjugado (líneas grises y punteadas), midiendo a través de UV a una longitud de onda de 280 nm. El panel inferior ilustra la señal gamma del ChiTn radiomarcado, medida en cuentas por segundo (cps). En el cuadro inferior derecho, el promedio y la desviación estándar (SD) del porcentaje de estabilidad radioquímica del ChiTn radiomarcado a lo largo del tiempo en suero a 37°C.

## 4.2 Unión a membrana e internalización celular

Los resultados de unión a membrana, internalización y la proporción de absorción entre las células LL/2 Tn+ y Tn- para el ChiTn radioconjugado y/o IgG se muestran en la Figura 16. Los datos se encuentran disponibles en <https://zenodo.org/record/8110446>.

Se observó un aumento gradual, dependiente del tiempo, tanto en las actividades unidas a la membrana como las actividades intracelulares para ChiTn-HYNIC- $^{99m}\text{Tc}$  durante el experimento de 24 h a 37 °C (Figura 16A). Este aumento resultó ser significativamente mayor en las células Tn+ en comparación con las células Tn- ( $p \leq 1e^{-04}$  a las 24 h). De manera similar, cuando IgG-HYNIC- $^{99m}\text{Tc}$  y ChiTn- $^{131}\text{I}$  fueron co-incubados, se observó una tendencia similar de aumento gradual para ChiTn- $^{131}\text{I}$ , con actividades significativamente mayores observadas en células Tn+ ( $1e^{-03} < p \leq 1e^{-02}$  a las 24 h). Sin embargo, no se observó ninguna tendencia específica ni diferencias significativas entre las células Tn+ y Tn- al utilizar IgG-HYNIC- $^{99m}\text{Tc}$  (Figura 16B). La captación total asociada a las células de ChiTn-HYNIC- $^{99m}\text{Tc}$  fue aproximadamente un 100% mayor en células Tn+ en comparación con células Tn-, mientras que para ChiTn- $^{131}\text{I}$ , la diferencia fue aproximadamente del 50% (Figura 16C a las 24 h). En contraste, no se observó ninguna diferencia significativa que favoreciera a las células Tn+ para IgG-HYNIC- $^{99m}\text{Tc}$  (Figura 16C).

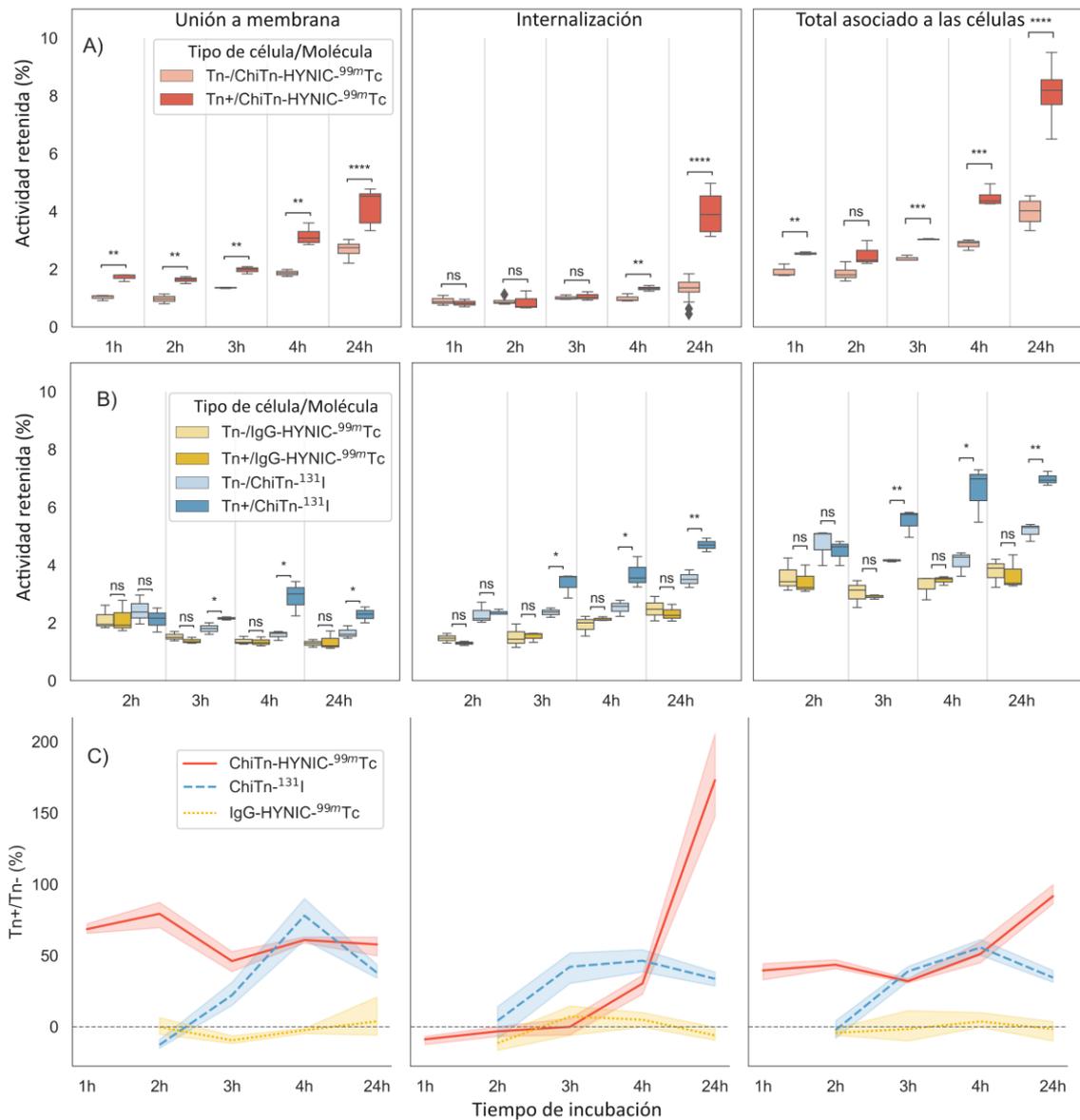


Figura 16. Unión a la membrana, internalización y asociación celular total de anticuerpos radiomarcados en células LL/2 Tn- o Tn+, medidas en diferentes tiempos de incubación. La figura incluye: (A) Diagrama de cajas y prueba U de Mann-Whitney (MW) de ChiTn-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc; (B) Diagrama de cajas y análisis MW de ChiTn-<sup>131</sup>I y IgG-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc co-incubados; y (C) Promedio e intervalo de confianza del 95% (IC) de la proporción de captación (%) entre las células Tn+ y Tn-, para los experimentos A y B, donde los números positivos indican una mayor captación en células Tn+.

### 4.3 Estudios de Biodistribución

Los resultados de la biodistribución de ChiTn-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc en ratones hembra C57BL/6 inoculadas s.c. o i.d. con células LL/2 Tn- o Tn+ obtenidas a las 4, 24, 48 h post-inyección, se

muestran en la Figura 17 y 18. Los datos están disponibles en <https://zenodo.org/record/8110446>.

Un aumento en la captación del tumor Tn+ ocurrió entre las 4 h ( $4.4 \% \pm 1.6$  ID/g) y las 24 h ( $10.5 \% \pm 2.3$  ID/g) post-inyección, permaneciendo estable a las 48 h ( $11.3 \% \pm 2.5$  ID/g). No se encontraron diferencias significativas en la captación entre Tn- y Tn+ o entre tumores s.c. o i.d. Además, no hubo diferencias significativas entre Tn- y Tn+ o entre tumores s.c. o i.d. en lo que respecta a las proporciones de tumor/sangre (T/S) y tumor/músculo (T/M). Los órganos restantes mostraron un perfil típico de biodistribución de anticuerpos, con eliminación hepatobiliar (Figura 17).

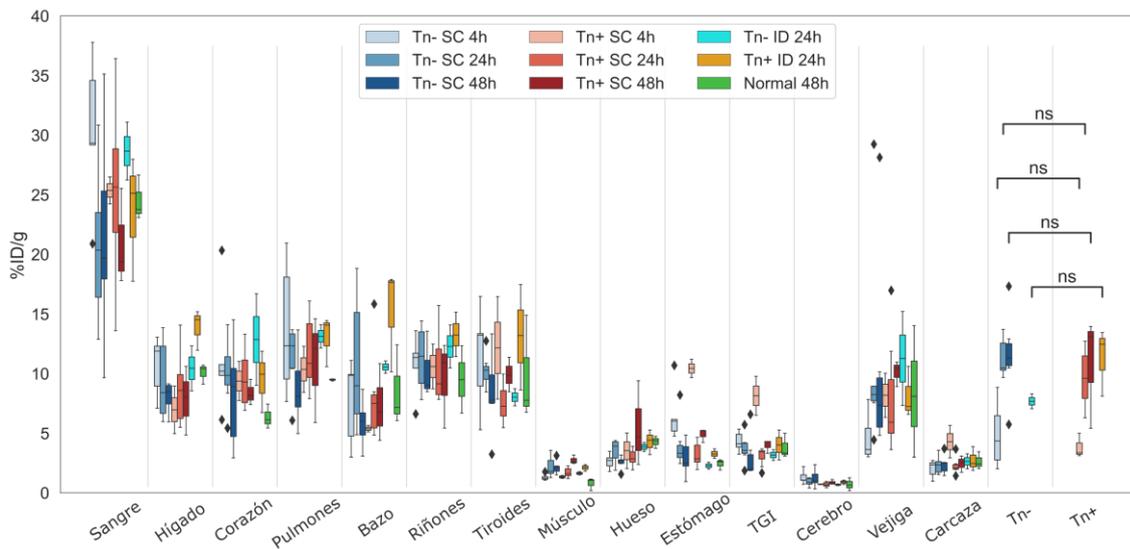


Figura 17. Perfil de biodistribución de ChiTn-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc en ratones con tumores Tn- o Tn+ e inoculaciones subcutáneas (SC) o intradérmicas (ID). Además, se incluyen en el análisis ratones no inoculados (normales). TGI: Tracto gastro intestinal.

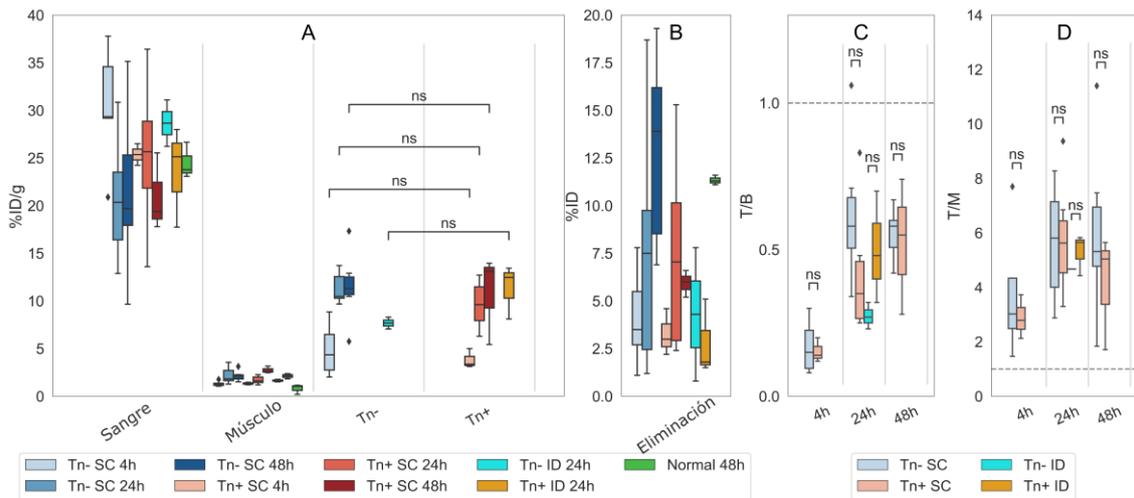


Figura 18. (A) Perfil de biodistribución de ChiTn-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc en sangre, músculo y tumores Tn- o Tn+ inoculados en ratones, mediante inyección subcutánea (SC) o intradérmica (ID), a las 4, 24 y 48 h post-inyección. La figura también muestra los resultados para ratones no inoculados (normales). (B) Porcentaje de la dosis inyectada (% ID) eliminada a través de la orina y las heces. (C y D) Relaciones de tumor/sangre (T/B) y tumor/músculo (T/M), respectivamente.

La biodistribución de ChiTn doblemente marcado con <sup>99m</sup>Tc y <sup>131</sup>I a las 48h post-inyección (Figura 19 arriba) resultó en un perfil con valores más altos para <sup>99m</sup>Tc en el hígado, bazo, riñones y una tendencia a mostrar valores más altos en tumores Tn- y Tn+, aunque esto no fue significativo. El <sup>131</sup>I muestra una alta preferencia por la tiroides y también es significativamente más alto en el estómago. No se encontraron diferencias significativas en las relaciones T/B y T/M. Además, se realizó la biodistribución de la coinyección de IgG-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc y ChiTn-<sup>131</sup>I a las 48 h (Figura 19 abajo). La mayoría de los órganos mostraron un mayor %ID/g de IgG-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc en comparación con ChiTn-<sup>131</sup>I, incluso en el tumor Tn-, pero no en el Tn+. También se encontró una mayor captación en la tiroides por ChiTn-<sup>131</sup>I. No se encontraron diferencias significativas en las relaciones T/B y T/M para ambas biodistribuciones. Todos los valores, excepto para la tiroides, son comparables a la Figura 17 y 18. Datos disponibles en <https://zenodo.org/record/8110446>.

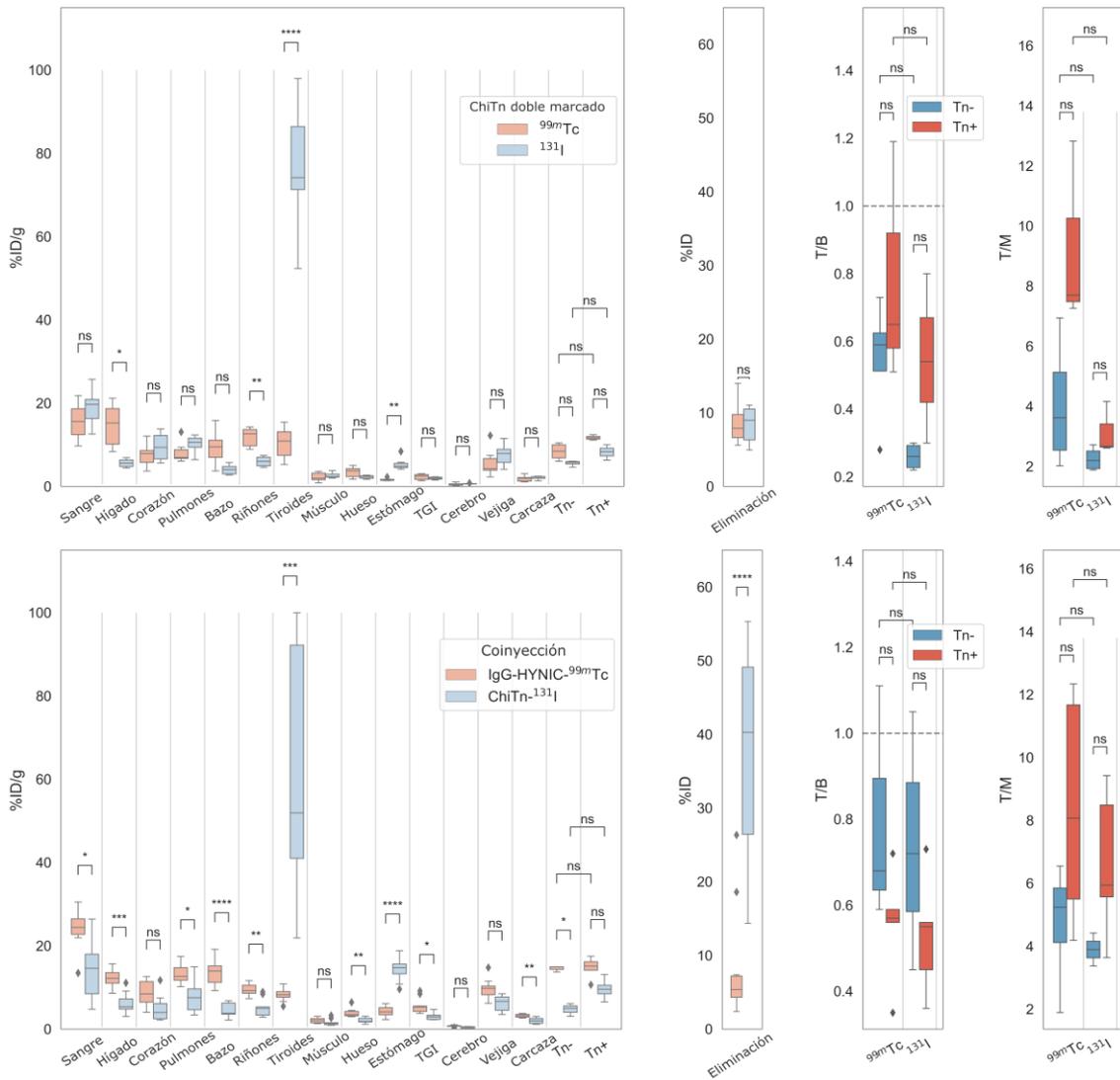


Figura 19. Perfil de biodistribución de ChiTn doblemente marcado ( $^{99m}\text{Tc}$  y  $^{131}\text{I}$ ) (panel superior) y coinyección de IgG-HYNIC- $^{99m}\text{Tc}$  y ChiTn- $^{131}\text{I}$  (panel inferior) a las 48 h, en ratones con tumores subcutáneos (SC) Tn- o Tn+. La figura muestra las proporciones de eliminación (orina + heces), tumor/sangre (T/B) y tumor/músculo (T/M) para cada trazador. TGI: Tracto gastro intestinal.

Finalmente, se muestra la biodistribución de ChiTn-HYNIC- $^{99m}\text{Tc}$  e IgG-HYNIC- $^{99m}\text{Tc}$  a las 48 h en ratones pretratados con Losartán (Figura 20), los datos están disponibles en <https://zenodo.org/record/8110446>.

Aunque el perfil fue similar a las Figuras 17 y 18, interesantemente se observó una mayor captación en los tumores Tn+ que en los Tn- para ChiTn-HYNIC- $^{99m}\text{Tc}$ . Además, se observaron mayores proporciones T/B y T/M entre los tumores Tn+ y Tn- para ChiTn-HYNIC- $^{99m}\text{Tc}$ . No se observaron diferencias significativas entre los tumores Tn+ y Tn- para la molécula control IgG-HYNIC- $^{99m}\text{Tc}$ . Los resultados promedio y su desviación estándar se resumen en la Tabla 2.

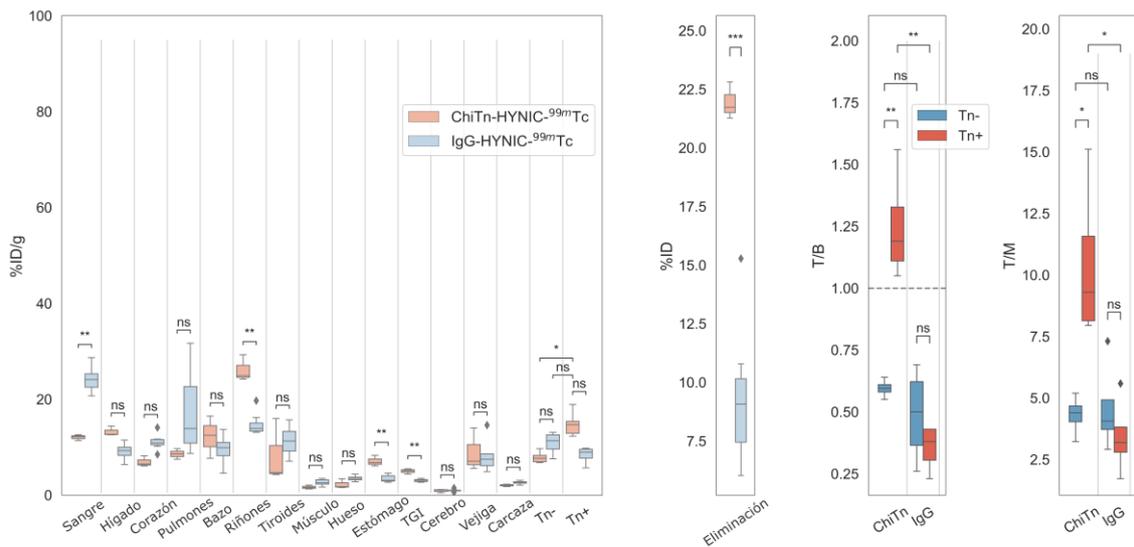


Figura 20. Perfil de biodistribución de ChiTn-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc e IgG-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc en ratones tratados con Losartán, a las 48 h, con tumores subcutáneos (SC) Tn- o Tn+. La figura muestra las proporciones de eliminación (orina + heces), tumor/sangre (T/B) y tumor/músculo (T/M) para ambos trazadores. TGI: Tracto gastro intestinal.

Molécula	Pre-tratamiento	Tn- %ID/g (SD)	Tn+ %ID/g (SD)	Tn- T/B (SD)	Tn+ T/B (SD)	Tn- T/M (SD)	Tn+ T/M (SD)
ChiTn-HYNIC-99mTc	Sin tratamiento	10.3 (± 3.5)	11.3 (± 2.5)	0.5 (± 0.2)	0.8 (± 0.5)	5.2 (± 2.9)	7.7 (± 3.3)
IgG-HYNIC-99mTc	Sin tratamiento	14.5 (± 0.7)	14.7 (± 2.6)	0.8 (± 0.3)	0.6 (± 0.1)	5.7 (± 0.8)	8.4 (± 3.6)
ChiTn-131I	Sin tratamiento	5.2 (± 1.1)	9.1 (± 2.2)	0.5 (± 0.3)	0.5 (± 0.2)	2.7 (± 0.9)	5.3 (± 2.6)
ChiTn-HYNIC-99mTc	Losartan	7.9 (± 1.2)	14.9 (± 2.1)	0.6 (± 0.1)	1.2 (± 0.2)	4.3 (± 0.8)	10.4 (± 3.3)
IgG-HYNIC-99mTc	Losartan	10.9 (± 2.5)	8.4 (± 1.9)	0.5 (± 0.2)	0.4 (± 0.1)	4.6 (± 1.9)	3.4 (± 1.6)

Tabla 2. Resultados totales de biodistribución a 48 h para tumores Tn+ y Tn-, incluyendo promedios de %ID/g, desviaciones estándar, proporciones de tumor/sangre (T/B) y tumor/músculo (T/M).

## Discusión

La administración efectiva de fármacos a los tumores puede verse obstaculizada por varias barreras, tales como barreras físicas, bajos niveles de oxígeno y pH ácido, que impiden la penetración de agentes anticancerígenos (Curti, 1993; Sriraman et al., 2014). Las barreras físicas incluyen el transporte intersticial de anticuerpos en tejidos normales y neoplásicos (Curti, 1993; Libuti et al., 2018). Dichas barreras podrían explicar por qué algunos fármacos, efectivos *in vitro*, no funcionan *in vivo* (Jain, 1994; Anchordoquy et al., 2017). Para abordar esto, investigamos el potencial de Losartán para mejorar la entrega del anticuerpo ChiTn a los tumores Tn+ reduciendo el estrés sólido (Diop-Frimpong et al., 2011; Chauhan et al., 2013; Zhao et al., 2019). Evaluamos el mAb ChiTn radiomarcado con la intención de usarlo como un trazador, pero también como un posible agente teranóstico contra el cáncer.

Los hallazgos experimentales demuestran que la pureza radioquímica de los anticuerpos radiomarcados con  $^{99m}\text{Tc}$  y  $^{131}\text{I}$  se mantuvo consistentemente por encima del 92%, incluso después de un período de incubación de 48 h en suero a 37 °C (Figura 15). Estos resultados están en línea con estudios previos que informaron niveles similares de pureza radioquímica y estabilidad a lo largo del tiempo utilizando la misma metodología de marcado de anticuerpos con  $^{99m}\text{Tc}$  (Camacho et al., 2017; Perroni et al., 2021) y  $^{131}\text{I}$  (Vinod et al., 2021).

Se han observado diferentes capacidades de unión e internalización del mAb ChiTn a líneas celulares tumorales que expresan el antígeno Tn (Hubert et al., 2011; Sedlik et al., 2016; Castro et al., 2021). Además, es rápidamente internalizado por las células tumorales Tn+ y se localiza principalmente en endosomas tempranos (Hubert et al., 2011; Sedlik et al., 2016). Los actuales resultados muestran que la unión a la membrana y la internalización del anticuerpo radiomarcado en las células LL/2 Tn+ y Tn- exhiben cinéticas más lentas que el anticuerpo no radiomarcado, pero son similares a las de otros anticuerpos radiomarcados (Kuo et al., 2018; Camacho et al., 2014). El proceso de marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  involucra la reacción de HYNIC con, por ejemplo, el grupo  $\epsilon$ -amino de las lisinas del anticuerpo (Figura 10) (Meszaros et al., 2010; García et al., 2016). De manera similar, para el proceso de oxidación química utilizado en el marcado con  $^{131}\text{I}$ , el yoduro de sodio se convierte en una forma reactiva que puede incorporarse en los grupos tirosilo del anticuerpo (Figura 10) (Gupta et al., 2014; Feng et al., 2022). Por lo tanto, la modificación por marcado radiactivo puede alterar las propiedades físicas y químicas del anticuerpo, lo cual puede afectar su interacción con las células (Tolmachev et al., 2014).

ChiTn-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc mostró una unión persistente a la membrana después de 24 h, favoreciendo significativamente a las células Tn+ (Figura 16A). Se observó una notable internalización en Tn+ después de 4 h (Figura 16A). ChiTn-<sup>131</sup>I arrojó resultados similares, a diferencia del control IgG-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc, que mostró una unión e internalización mínimas sin diferencias significativas entre Tn+ y Tn- (Figura 16B). La Figura 16C ilustra las disparidades en las proporciones Tn+/Tn-.

Aunque las afinidades intermedias de los anticuerpos radiomarcados pueden obstaculizar la unión y la internalización, estudios de Rudnick et al. han demostrado que los mAbs de baja afinidad pueden penetrar en los tumores sólidos de manera más eficiente (Rudnick et al., 2011). Para investigar la capacidad de captación y retención del ChiTn radiomarcado y IgG en tumores Tn+ y Tn- *in vivo*, realizamos varios estudios de biodistribución.

Los resultados de biodistribución de ChiTn-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc indicaron un patrón de distribución típico para los anticuerpos radiomarcados con <sup>99m</sup>Tc a través de HYNIC, según lo informado por Camacho et al. (2014). El radiotrazador exhibió una lenta depuración en el torrente sanguíneo, hígado, corazón y pulmones, y una captación sostenida en el tumor hasta las 48 h ( $11.3 \pm 2.5$  %ID/g), sin diferencias significativas entre los tumores Tn+ y Tn- o las proporciones T/B y T/M (Figuras 16, 17 y 18). Se observaron resultados similares para inyecciones i.d. y s.c. de células LL/2 Tn+ y Tn- en ratones.

Para evaluar el impacto del método de marcado radiactivo en la biodistribución (Williams, 2014), realizamos una doble marca del anticuerpo ChiTn con <sup>99m</sup>Tc y <sup>131</sup>I. Esto permitió la medición simultánea de la biodistribución utilizando espectrometría gamma (Tassano et al., 2021), minimizando así la variabilidad entre ratones, entre mediciones y en la manipulación (Knight et al. 2019).

El ChiTn doblemente marcado mostró valores más altos para <sup>99m</sup>Tc en hígado, bazo y riñones, con una ligera tendencia a valores más altos en los tumores Tn- y Tn+ (Figura 19 arriba), pero esto no fue significativo. El <sup>131</sup>I mostró una alta afinidad por la tiroides y también fue significativamente más alto en el estómago. Las proporciones T/B y T/M no mostraron diferencias significativas.

Cuando los anticuerpos radioyodados son absorbidos por las células, se descomponen rápidamente en los lisosomas, lo que resulta en la liberación de monoiodotirosina al espacio extracelular. Este metabolito es posteriormente descompuesto por enzimas de desyodación, que liberan yoduro radiactivo libre al torrente sanguíneo (Figura 11) (Press et al., 1996). El radioyoduro es entonces absorbido por cualquier tejido que exprese el simportador de sodio-yoduro (Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>), presente en la glándula tiroides y en el estómago. La degradación lisosomal de

anticuerpos radioyodados conduce a la rápida eliminación del radioyodo de todos los tejidos, excepto aquellos que metabolizan o procesan yodo (Vivier et al., 2018). Este evento conduce a concentraciones de actividad disminuidas dentro del tejido tumoral en comparación con los radiomarcadores residualizantes que emplean el radiometal  $^{99m}\text{Tc}$  (Deyev et al., 2020).

La acumulación del anticuerpo dentro de los tumores, en el escenario ideal, dependería únicamente del antígeno diana específico. Sin embargo, surgen desafíos cuando factores no específicos contribuyen a la captación total del tumor. Un ejemplo es el efecto de permeabilidad y retención mejoradas (EPR), que ocurre debido a una angiogénesis rápida e irregular, resultando en que los anticuerpos extravasen pasivamente al tejido tumoral a través de la vasculatura permeable (Heneweer et al., 2011; Fang et al., 2011). Estas contribuciones no específicas a la captación tumoral pueden variar significativamente entre modelos de tumores, dentro de un solo tumor (heterogeneidad intratumoral), o como resultado de diferentes respuestas al tratamiento (heterogeneidad intertumoral). En consecuencia, la sensibilidad de estas técnicas puede reducirse, aumentando la probabilidad de falsos resultados (Börjesson et al., 2006).

Realizamos un experimento adicional para evaluar la captación no específica comparando la biodistribución de ChiTn- $^{131}\text{I}$  específico de Tn con la de IgG-HYNIC- $^{99m}\text{Tc}$  no específica. La mayoría de los órganos mostraron un mayor % ID/g de IgG-HYNIC- $^{99m}\text{Tc}$  en comparación con ChiTn- $^{131}\text{I}$  (Figura 19 abajo). Esto es esperado ya que la marca radiactiva con  $^{131}\text{I}$  tiende a ser más inestable *in vivo*, llevando a una mayor captación en la tiroides y el estómago, así como una mayor eliminación de los órganos, como se discutió anteriormente. Sin embargo, el tumor Tn+ demostró una captación comparable de ChiTn- $^{131}\text{I}$  a la de IgG-HYNIC- $^{99m}\text{Tc}$ , mientras que se observó una captación reducida en los tumores Tn-. Una vez más, no se notó ninguna ventaja distintiva en la captación para el ChiTn específico de Tn en comparación con el IgG no específico. Esta observación se corrobora por las similitudes en las proporciones tumor/sangre (T/B) y tumor/músculo (T/M) (Figura 19 abajo).

La presencia de estrés sólido puede ser un factor contribuyente que dificulta la entrega eficiente de anticuerpos a los tumores, particularmente en tumores altamente vascularizados como LL/2 Tn+. Estos tumores producen niveles más altos de VEGF en comparación con LL/2 tipo salvaje (Tn-), como demostró da Costa et al. (2021). El VEGF es reconocido como un factor clave en la angiogénesis, capaz de inducir la síntesis de matriz extracelular y promover el cambio angiobrófico en la fibrosis, como documentaron Larsson-Callerfelt et al. (2017), Kuiper et al. (2008),

y Zhang et al. (2019). La matriz extracelular fibrótica contribuye significativamente al estrés sólido elevado dentro de los tumores (Jain et al., 2014).

Para evaluar este fenómeno, se realizaron estudios de biodistribución después del pretratamiento con Losartan, un compuesto conocido por aliviar el estrés sólido en tumores fibróticos (Diop-Frimpong et al., 2011; Chauhan et al., 2013). Investigaciones previas han indicado que el tratamiento con Losartan no altera los niveles de VEGF o la densidad de microvasos. Sin embargo, se ha demostrado que aumenta significativamente el porcentaje de vasos sanguíneos perfundidos (Zhao et al., 2019).

Los valores de % ID/g indican que los perfiles de biodistribución de tejidos normales en los ratones pretratados con Losartan (Figura 20) fueron comparables a los de sus contrapartes no tratadas a las 48 h después de la inyección para tanto IgG-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc como ChiTn-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc, lo cual concuerda con los hallazgos de Chauhan et al. (2013) donde el tratamiento con Losartan no afecta la acumulación en tejidos normales. Sin embargo, se observó una captación ligeramente mayor en los riñones y eliminación a través de la orina y heces para ChiTn-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc (Figura 20). Además, ChiTn-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc demostró una mayor depuración sanguínea en comparación con IgG-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc, como se evidencia en la Figura 20, consistente con los resultados de los estudios previos de biodistribución donde los valores de ChiTn-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc oscilaban entre 15 y 20 % ID/g e IgG-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc entre 22 y 30 % ID/g a las 48 h en el torrente sanguíneo (Figuras 18, 19 y 20).

En ratones pretratados con Losartan, se observó una captación significativamente mayor de ChiTn-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc en tumores Tn+ (%ID/g  $14.9 \pm 2.1$ ) en comparación con tumores Tn- (%ID/g  $7.9 \pm 1.2$ ) ( $p \leq 0.05$ ), como se indica en la Tabla 2 y Figura 20. Sin embargo, no hubo un cambio significativo en la captación de IgG-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc en ninguno de los dos tipos de tumor. Estos hallazgos están respaldados por las proporciones T/B y T/M (Tabla 2 y Figura 20). ChiTn-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc mostró proporciones significativamente más altas a favor de Tn+ sobre los tumores Tn- ( $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.05$ , respectivamente), mientras que IgG-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc no mostró el mismo patrón. Específicamente, la proporción T/B en tumores Tn+ aumentó de  $0.8 \pm 0.5$  en ratones no tratados a  $1.2 \pm 0.2$  en ratones pretratados con Losartan para ChiTn-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc. La proporción T/M también mostró un aumento moderado de  $7.7 \pm 3.3$  a  $10.4 \pm 3.3$ .

Estos valores indican un aumento sustancial en la captación de Tn+ en comparación con Tn- en ratones pretratados con Losartan, con un promedio de 88% de mayor captación en tumores Tn+. Además, hubo una mejora significativa en la proporción T/B, con un aumento del 50%. De manera similar, la proporción T/M mostró un aumento del 35% en tumores Tn+. Todos estos

valores están estrechamente alineados con los hallazgos reportados por Chauhan et al. (2013), donde el tratamiento con Losartan resultó en un aumento del 74% en la acumulación del quimioterapéutico de pequeñas moléculas 5-FU en tumores pancreáticos AK4.4.

Los hallazgos indican que los tumores LL/2 Tn+ exhiben un estrés sólido elevado en comparación con sus contrapartes de tipo salvaje (Tn-). Como resultado, se espera que Losartan sea más efectivo en aliviar este estrés específicamente en tumores Tn+. Además, el ChiTn mAb radiomarcado demuestra una penetración mejorada en este tipo de tumor, permitiendo una mayor interacción con el antígeno Tn. En contraste, el IgG no específico carece de la capacidad de unión específica y posterior internalización en las células tumorales, lo que lleva a una falta de este efecto. Su captación ocurre principalmente a través de la unión no específica o debido a su mayor concentración en el torrente sanguíneo.

## Conclusiones

En conclusión, esta tesis investigó el uso del anticuerpo quimérico anti-Tn de ratón/humano radiomarcado (ChiTn) como un trazador y agente teranóstico de cáncer en combinación con Losartan en ratones con tumores pulmonares que expresan Tn. Se demostró que el ChiTn radiomarcado mostró una mayor unión e internalización en las células tumorales Tn+ en comparación con las células Tn-, generado por su especificidad al antígeno Tn. Además, el tratamiento con Losartan mejoró la captación *in vivo* de ChiTn radiomarcado en tumores Tn+, sugiriendo una captación mejorada por este pretratamiento. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la biodistribución entre los tumores Tn+ y Tn- para la molécula de control IgG no específica radiomarcada.

El estudio proporciona una nueva visión sobre el uso potencial de ChiTn radiomarcado en combinación con Losartan para un delivery mejorado de este anticuerpo radiomarcado hacia los tumores Tn+, lo cual puede tener implicancias clínicas para el tratamiento de cáncer epitelial que expresan el antígeno Tn. Se justifican estudios adicionales para explorar la eficacia teranóstica de este enfoque y optimizar las estrategias de radiomarcado y delivery.

## Publicaciones y presentaciones generadas a partir de la tesis

Publicación en revista internacional arbitrada:

- **Marcos Tassano**, Ximena Camacho, Teresa Freire, Carolina Perroni, Valeria da Costa, Mirel Cabrera, Maria Fernanda García, Marcelo Fernandez, Juan Pablo Gambini, Pablo Cabral, and Eduardo Osinaga. Enhanced Tumor Targeting of Radiolabeled Mouse/Human Chimeric Anti-Tn Antibody in Losartan-Treated Mice Bearing Tn Expressing Lung Tumors. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 2024. Vol. 39, No. 5. <https://doi.org/10.1089/cbr.2023.0138>

Presentación oral y publicación de resumen:

- Simultaneous biodistribution studies of  $^{99m}\text{Tc}/^{131}\text{I}$ -Labeled Antibody with HPGe Gamma Spectrometry. **M TASSANO**, M CABRERA, CAMACHO X, FERNANDEZ.M, GARCÍA, MF, GAMBINI, JP, P. CABRAL. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging (E)*, v.: 48 p.:1 - 648, 2021. European Association of Nuclear Medicine 21 Virtual, 2021.

Presentación oral:

- Simposio de I+D Traslacional en Oncología, Organizado por el CENTRO URUGUAYO DE IMAGENOLOGÍA MOLECULAR (CUDIM), 18 de agosto 2022. Título de la presentación: Marcación radioactiva de anticuerpos Tn para diagnóstico y terapia oncológica. **Marcos Tassano**.
- XXIX Congreso de la Asociación Latinoamericana de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear (ALASBIMN) celebrado en el Hotel Hilton de la ciudad de Buenos Aires (Argentina) del 15 al 18 de noviembre de 2023. Título de la presentación: CAPTACIÓN TUMORAL DEL ANTICUERPO QUIMÉRICO ANTI-Tn HUMANO/RATÓN RADIOMARCADO EN RATONES TRATADOS CON LOSARTAN PORTADORES DE TUMORES DE PULMÓN.

Presentación de poster:

- Jornada Científica del Programa de Investigación Biomédica (Pro.In.Bio), 19 de diciembre 2022. Título del poster: Marcación radioactiva de anticuerpos Tn para diagnóstico y terapia oncológica. **Marcos Tassano**.

## Bibliografía

Anchordoquy TJ., Barenholz Y, Boraschi D, Chorny M, Decuzzi P, Dobrovolskaia MA, Farhangrazi S, Farrell D, Gabizon A, Ghandehari H, Godin B, La-Beck NM, Ljubimova J, Moghimi SM, Pagliaro L, Park JH, Peer D, Ruoslahti E, Serkova NJ, Simberg D. Mechanisms and Barriers in Cancer Nanomedicine: Addressing Challenges, Looking for Solutions. ACS Nano 2017 11 (1), 12-18 DOI: 10.1021/acsnano.6b08244.

Ando H, Matsushita T, Wakitani M, Sato T, Kodama-Nishida S, Shibata K, Shitara K, Ohta S. Mouse-human chimeric anti-Tn IgG1 induced anti-tumor activity against Jurkat cells in vitro and in vivo. Biol Pharm Bull 2008; 31:1739-44; PMID:18758069; <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.31.1739>.

Audicio P., Castellano G., Tassano M., Rezzano MR., Fernandez M., Riva E., Robles A., Cabral P., Balter H., Oliver P. [177Lu]DOTA-anti-CD20: Labeling and pre-clinical studies, Applied Radiation and Isotopes, Volume 69, Issue 7, 2011, Pages 924-928, ISSN 0969-8043, <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2011.01.026>.

Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. J Cell Sci. 2012;125(Pt 23):5591-5596.

Behr, T.M., Behe, M. (2002). Cholecystokinin-B/gastrin receptor-targeting peptides for staging and therapy of medullary thyroid cancer and other cholecystokinin-B receptor-expressing malignancies. Seminars in Nuclear Medicine, 32(2), 97-109.

Berois N, Pittini A, Osinaga E. Targeting Tumor Glycans for Cancer Therapy: Successes, Limitations, and Perspectives. Cancers 2022; 14:645. doi: 10.3390/cancers14030645.

Börjesson PKE, Jauw YWS, Boellaard R, de Bree R, Comans EFI, Roos JC, et al. Performance of immuno-positron emission tomography with zirconium-89-labeled chimeric monoclonal antibody U36 in the detection of lymph node metastases in head and neck cancer patients. Clin Cancer Res 2006;12:2133.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians, 68(6), 394-424.

Brockhausen, I., & Stanley, P. (2017). O-GalNAc Glycans. In *Essentials of Glycobiology* (pp. 113-123). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Cabrera Mirel, Romina Sanabria, Joan González, Pablo Cabral, Samuel Tejeda, Graciela Zarazua, Eva Melgar-Paniagua, Marcos Tassano. Using <sup>137</sup>Cs and <sup>210</sup>Pbex to assess soil redistribution at different temporal scales along with lithogenic radionuclides to evaluate contrasted watersheds in the Uruguayan Pampa grassland. *Geoderma*, Volume 435, 2023, 116502, ISSN 0016-7061, <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2023.116502>.

Camacho X, Longo Machado C, García MF, Gambini JP, Banchemo A, Fernández M, Oddone N, Bertolini Zanatta D, Rosal C, Buchpiguel CA, Chammas R, Riva E, Cabral P. Technetium-99m- or Cy7-Labeled Rituximab as an Imaging Agent for Non-Hodgkin Lymphoma. *Oncology* 3 April 2017; 92 (4): 229–242. <https://doi.org/10.1159/000452419>.

Castro A, Berois N, Malanga A, Ortega C, Oppezco P, Pristch O, Mombrú AW, Osinaga E, Pardo H. Docetaxel in chitosan-based nanocapsules conjugated with an anti-Tn antigen mouse/human chimeric antibody as a promising targeting strategy of lung tumors. *Int J Biol Macromol*. 2021 Jul 1;182:806-814. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.054. PMID: 33857513.

Croci D.O., S.P. Mendez-Huergo, J.P. Cerliani, G.A. Rabinovich, Immune-mediated and hypoxia-regulated programs: accomplices in resistance to anti-angiogenic therapies, *Handb. Exp. Pharmacol.* 249 (2018) 31–61.

Croci D.O., G.A. Rabinovich, Linking tumor hypoxia with VEGFR2 signaling and compensatory angiogenesis: glycans make the difference, *Oncolmunology* 3 (2014), e29380.

Chandler K.B., D.R. Leon, J. Kuang, R.D. Meyer, N. Rahimi, C.E. Costello, N-Glycosylation regulates ligand-dependent activation and signaling of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), *J. Biol. Chem.* 294 (35) (2019) 13117–13130.

Chauhan VP, et al. (2013) Angiotensin inhibition enhances drug delivery and potentiates chemotherapy by decompressing tumour blood vessels. *Nat Commun* 4:2516–2527.

Chau, C. H., Steeg, P. S. & Figg, W. D. Antibody-drug conjugates for cancer. *Lancet* 394, 793–804 (2019).

Charlier F., Weber M., Izak D., Harkin E., Magnus M., Lalli J., Fresnais L., Chan M., Markov N., Amsalem O., Proost S., Krasoulis A., getzze., Repplinger S. (2022). *Statannotations* (v0.5). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7213391>.

Cheng W.K., C.E. Oon, How glycosylation aids tumor angiogenesis: an updated review, *Biomed. Pharmacother.* 103 (2018) 1246–1252.

Cherry, S. R., Sorenson, J. A., & Phelps, M. E. (2012). *Physics in Nuclear Medicine*. Elsevier.

CHLCC. Resumen Estadístico – TODOS LOS CÁNCERES. Incidencia y Mortalidad periodo 2015-2019. Tendencia de la Mortalidad hasta 2020. <https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/RESUMENES-STADISTICOSpara-los-canceres-mas-frecuentes--uc264> [Fecha de consulta: 06/07/2023].

Christine A. St. Pierre, Deborah Leonard, Silvia Corvera, Evelyn A. Kurt-Jones, Robert W. Finberg, Antibodies to cell surface proteins redirect intracellular trafficking pathways, *Experimental and Molecular Pathology*, Volume 91, Issue 3, 2011, Pages 723-732, ISSN 0014-4800, <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2011.05.011>.

da Costa V, van Vliet SJ, Carasi P, Frigerio S, García PA, Croci DO, Festari MF, Costa M, Landeira M, Rodríguez-Zraquia SA, Cagnoni AJ, Cutine AM, Rabinovich GA, Osinaga E, Mariño KV, Freire T. The Tn antigen promotes lung tumor growth by fostering immunosuppression and angiogenesis via interaction with Macrophage Galactose-type lectin 2 (MGL2). *Cancer Lett.* 2021 Oct 10;518:72-81. doi: 10.1016/j.canlet.2021.06.012. Epub 2021 Jun 16. PMID: 34144098.

Debertin, K., & Helmer, R.G. (1988). *Gamma- and X-ray spectrometry with semiconductor detectors*. Elsevier.

Deyev SM., Vorobyeva A., Schulga A., Abouzayed A., Günther T., Garousi J., Konovalova E., Ding H., Gräslund T., Orlova A., Tolmachev V. Effect of a radiolabel biochemical nature on tumor-targeting properties of EpCAM-binding engineered scaffold protein DARPin Ec1, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 145, 2020, Pages 216-225, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.147>.

Diop-Frimpong B, Chauhan VP, Krane S, Boucher Y, Jain RK (2011) Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:2909–2914.

Dovgan, I., Koniev, O., Kolodych, S. & Wagner, A. Antibody-oligonucleotide conjugates as therapeutic, imaging, and detection agents. *Bioconjug. Chem.* 30, 2483–2501 (2019).

Duatti A. Review on <sup>99m</sup>Tc radiopharmaceuticals with emphasis on new advancements, *Nuclear Medicine and Biology*, Volume 92, 2021, Pages 202-216, ISSN 0969-8051, <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2020.05.005>.

Dysthe M., R. Parihar, Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1224 (2020) 117–140.

Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(3):161-174.

Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63:136–51.

Feng, Y., Meshaw, R., McDougald, D., Zhou, Z., Zhao, XG., Jannetti, SA., Reiman RE., Pippen E., Marjoram R., Schaal JL, Vaidyanathan G., Zalutsky MR. Evaluation of an 131I-labeled HER2-specific single domain antibody fragment for the radiopharmaceutical therapy of HER2-expressing cancers. *Sci Rep* 12, 3020 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07006-9>.

Fu C., H. Zhao, Y. Wang, H. Cai, Y. Xiao, Y. Zeng, et al., Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen, *HLA* 88 (6) (2016) 275–286.

Freire T., S. Bay, S. Vichier-Guerre, R. Lo-Man, C. Leclerc, Carbohydrate antigens: synthesis aspects and immunological applications in cancer, *Mini Rev. Med. Chem.* 6 (12) (2006) 1357–1373.

Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol.* 2013;14(10):1014-1022.

Gambhir, S. S. (2002). Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nature Reviews Cancer*, 2(9), 683-693.

García, M.F.; Calzada, V.; Camacho, X.; Goicochea, E.; Gambini, J.P.; Quinn, T.P.; Porcal, W.; Cabral, P. Microwave-assisted Synthesis of HYNIC Protected Analogue for 99mTc Labeled Antibody. *Curr. Radiopharm.*, 2014, 7(2), 84-90.

Gill D.J., K.M. Tham, J. Chia, S.C. Wang, C. Steentoft, H. Clausen, et al., Initiation of GalNAc-type O-glycosylation in the endoplasmic reticulum promotes cancer cell invasiveness, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (34) (2013) E3152–E3161.

Gupta S, Batra S, Jain M. Antibody labeling with radioiodine and radiometals. *Methods Mol Biol.* 2014;1141:147-57. doi: 10.1007/978-1-4939-0363-4\_9. PMID: 24567137; PMCID: PMC4095879.

Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022; 12:31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

Harris, C. R., Millman, K. J., van der Walt, S.J., Gommers, R., Virtanen, P., Cournapeau, D., Wieser, E., Taylor, J., Berg, S., Smith, N. J., Kern, R., Picus, M., Hoyer, S., H. van Kerkwijk, H., Brett, M., Haldane, A., Fernández del Río, J., Wiebe, M., Peterson, P., Gérard-Marchant, P. Sheppard, K., Reddy, T., Weckesser, W., Abbasi, H., Gohlke C., Oliphant, T.E., 2020. Array programming with NumPy, *Nature*. 585, 357–362. DOI:10.1038/s41586-020-2649-2.

Heneweer C, Holland JP, Divilov V, Carlin S, Lewis JS. Magnitude of enhanced permeability and retention effect in tumors with different phenotypes: 89Zr-albumin as a model system. *J Nucl Med* 2011;52:625–33.

Heusser, G. (2015). Low-radioactivity background techniques. *Annual Review of Nuclear and Particle Science*, 45, 543-590.

Hubert P, Heitzmann A, Viel S, Nicolas A, Sastre-Garau X, Oppezco P, Pritsch O, Osinaga E, Amigorena S. Antibody-dependent cell cytotoxicity synapses form in mice during tumor-specific antibody immunotherapy. *Cancer Res*. 2011 Aug 1;71(15):5134-43. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4222. Epub 2011 Jun 22. PMID: 21697279.

Hunter, J. D., 2007. Matplotlib: A 2D Graphics Environment, *Comput Sci Eng*. 9, 90-95. DOI:10.1109/MCSE.2007.55.

IARC Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (2020). *World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention*. Lyon, Francia: IARC.

Jain RK. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. *J Clin Oncol*. 2013;31(17):2205-2218.

Jain RK, Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(11):653-664.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. (2001). *Immunobiology: The immune system in health and disease*. Garland Publishing.

Johnson, S., et al. (1997). Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *The Journal of infectious diseases*, 176(5), 1215-1224.

Jones, T., & Rabiner, E. A. (2012). The development, past achievements, and future directions of brain PET. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(7), 1426-1454.

Ju, T., & Cummings, R. D. (2002). A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1  $\beta$  3-galactosyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 16613-16618.

Ju T., G.S. Lanneau, T. Gautam, Y. Wang, B. Xia, S.R. Stowell, et al., Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc, *Canc. Res.* 68 (6) (2008) 1636–1646.

Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., & Foeller, C. (1991). *Sequences of proteins of immunological interest*. US Department of Health and Human Services.

Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(9):582-598.

Knight JC, Mosley MJ, Kersemans V, Dias GM, P. Allen D, Smart S, Cornelissen B. Dual-isotope imaging allows in vivo immunohistochemistry using radiolabelled antibodies in tumours. *Nuclear Medicine and Biology*, Volume 70, 2019, Pages 14-22, ISSN 0969-8051, <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2019.01.010>.

Knoll, G.F. (2010). *Radiation Detection and Measurement*. John Wiley & Sons.

Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495-497.

Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(12):874-885.

Kuiper EJ, Van Nieuwenhoven FA, de Smet MD, van Meurs JC, Tanck MW, et al. The Angio-Fibrotic Switch of VEGF and CTGF in Proliferative Diabetic Retinopathy. (2008) The Angio-Fibrotic Switch of VEGF and CTGF in Proliferative Diabetic Retinopathy. *PLOS ONE* 3(7): e2675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002675>.

Kuo, WY., Lin, JJ., Hsu, HJ. et al. Noninvasive assessment of characteristics of novel anti-HER2 antibodies by molecular imaging in a human gastric cancer xenograft-bearing mouse model. *Sci Rep* 8, 13735 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32094-x>.

Labani-Motlagh A., M. Ashja-Mahdavi, A. Loskog, The tumor microenvironment: a milieu hindering and obstructing antitumor immune responses, *Front. Immunol.* 11 (2020) 940.

L'Annunziata, M.F. (2012). *Handbook of Radioactivity Analysis*. Academic Press.

Larsson-Callerfelt AK, Andersson Sjöland A, Hallgren O, Bagher M, Thiman L, Löfdahl CG, Bjermer L, Westergren-Thorsson G. VEGF induces ECM synthesis and fibroblast activity in human lung

fibroblasts. *European Respiratory Journal* Sep 2017, 50 (suppl 61) PA1045; DOI: 10.1183/1393003.congress-2017.PA1045.

Liang Y., P. Han, T. Wang, H. Ren, L. Gao, P. Shi, et al., Stage-associated differences in the serum N- and O-glycan profiles of patients with non-small cell lung cancer, *Clin. Proteomics* 16 (2019) 20–30.

Libutti SK, Tamarkin L, Nilubol N. Targeting the invincible barrier for drug delivery in solid cancers: interstitial fluid pressure. *Oncotarget*. 2018; 9: 35723-35725.

Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*. 2012;196(4):395-406.

Lucchetta M., I. da Piedade, M. Mounir, M. Vabistsevits, T. Terkelsen, E. Papaleo, Distinct signatures of lung cancer types: aberrant mucin O-glycosylation and compromised immune response, *BMC Canc*. 19 (1) (2019) 824.

Manjili M.H., S.E. Butler, Role of Tregs in cancer dormancy or recurrence, *Immunol. Invest*. 45 (8) (2016) 759–766.

Marcos, N. T., Bennett, E. P., Gomes, J., Magalhães, A., Gomes, C., David, L., ... & Reis, C. A. (2011). ST6GalNAc-I controls expression of sialyl-Tn antigen in gastrointestinal tissues. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 3, 1443-1455.

Marjanovic, N.D., Weinberg, R.A., & Chaffer, C.L. (2013). Cell plasticity and heterogeneity in cancer. *Clinical Chemistry*, 59(1), 168-179.

McKinney W., 2010. Data Structures for Statistical Computing in Python, *Proceedings of the 9th Python in Science Conference*, 51-56.

Meany DL, Chan DW. Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. *Clin Proteomics*. 2011;8(1):7.

Mereiter S., M. Balmana, D. Campos, J. Gomes, C.A. Reis, Glycosylation in the era of cancer-targeted therapy: where are we heading? *Canc. Cell* 36 (1) (2019) 6–16.

Meszáros LK, Dose A, Biagini SC, Blower PJ. Hydrazinonicotinic acid (HYNIC) – Coordination chemistry and applications in radiopharmaceutical chemistry. *Inorganica Chim Acta* 2010; 363: 1059-69.

Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(8):583-592.

Mrđa D., I. Bikit, M. Vesković, S. Forkapić. Contribution of  $^{210}\text{Pb}$  bremsstrahlung to the background of lead shielded gamma spectrometers. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, Volume 572, Issue 2, 2007, Pages 739-744, ISSN 0168-9002, <https://doi.org/10.1016/j.nima.2006.12.037>.

MSP Ministerio de Salud Pública de Uruguay. (2022). *Cáncer en Uruguay*. Montevideo, Uruguay: MSP.

Munkley, J. (2016). The role of sialyl-Tn in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 275.

OMS Organización Mundial de la Salud (2021). *Cáncer*. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.

Oppezzo P, Osinaga E, Tello D, Bay S, Cantacuzene D, Irigoín F, Ferreira A, Roseto A, Cayota A, Alzari P, Pritsch O. Production and functional characterization of two mouse/human chimeric antibodies with specificity for the tumor-associated Tn-antigen. *Hybridoma*. 2000; 19:229-39. doi: 10.1089/02724570050109620.

Osinaga E, Bay S, Tello D, Babino A, Pritsch O, Assemat K, Cantacuzene D, Nakada H, Alzari P. Analysis of the fine specificity of Tn-binding proteins using synthetic glycopeptide epitopes and a biosensor based on surface plasmon resonance spectroscopy. *FEBS Lett*. 2000 Mar 3;469(1):24-8. doi: 10.1016/s0014-5793(00)01248-5. PMID: 10708749.

Pearce OMT, Läubli H. Sialic acids in cancer biology and immunity. *Glycobiology*. 2016;26(2):111-128.

Perroni, C., Camacho, X., Tassano, M., Garcia, M., Cabrera, M., Fernandez, J, Benech, H Cerecetto, J Gambini, P Cabral. (2021, September). Targeting CD-20 antigen expression in Melanoma with (99m) Technetium-labeled Rituximab. In *EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE AND MOLECULAR IMAGING* (Vol. 48, No. SUPPL 1, pp. S516-S516). ONE NEW YORK PLAZA, SUITE 4600, NEW YORK, NY, UNITED STATES: SPRINGER.

Phelps, M. E. (2000). Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 9226-9233.

Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep*. 2014;15(12):1243-1253.

Pinho, S., Marcos, N. T., Ferreira, B., Carvalho, A. S., Oliveira, M. J., Santos-Silva, F., ... & Reis, C. A. (2007). Biological significance of cancer-associated sialyl-Tn antigen: modulation of malignant phenotype in gastric carcinoma cells. *Cancer letters*, 249(2), 157-170.

Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(9):540-555.

Press OW; Shan D; Howell-Clark J; Eary J; Appelbaum FR; Matthews D; King DJ; Haines AMR; Hamann P; Hinman L; Shochat D; Bernstein ID, Comparative metabolism and retention of lidine-125, yttrium-90, and indium-111 radioimmunoconjugates by cancer cells. *Cancer Research* 1996, 56 (9), 2123–2129.

Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Keely PJ. Matrix density-induced mechanoregulation of breast cell phenotype, signaling and gene expression through a FAK-ERK linkage. *Oncogene*. 2009;28(49):4326-4343.

Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013;19(11):1423-1437.

Raybaut, P., 2009. *Spyder*-documentation. Available Online at: [Pythonhosted.org](http://Pythonhosted.org).

Ravetch, J. V., & Kinet, J. P. (1991). Fc receptors. *Annual review of immunology*, 9(1), 457-492.

Rodriguez E, Schetters STT, van Kooyk Y. The tumour glyco-code as a novel immune checkpoint for immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(3):204-211.

Saha, G. B. (2019). *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. Springer.

Scott, D. L., et al. (2012). The links between joint damage and disability in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 41(2), 122-132.

Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:278-87; PMID:22437872; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3236>.

Sedlik C, Heitzmann A, Viel S, Ait Sarkouh R, Batisse C, Schmidt F, De La Rochere P, Amzallag N, Osinaga E, Opezzo P, Pritsch O, Sastre-Garau X, Hubert P, Amigorena S, Piaggio E. Effective antitumor therapy based on a novel antibody-drug conjugate targeting the Tn carbohydrate antigen. *Oncoimmunology*. 2016 Apr 22;5(7):e1171434. doi: 10.1080/2162402X.2016.1171434. PMID: 27622021; PMCID: PMC5006918.

Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. 2012 Feb 3;148(3):399-408. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.021.

- Sharkey, R. M., & Goldenberg, D. M. (2006). Cancer radioimmunotherapy. *Immunotherapy*, 27(3), 283-288.
- Slamon, D. J., et al. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244(4905), 707-712.
- Slovin, S. F., Ragupathi, G., Musselli, C., Olkiewicz, K., Verbel, D., Kuduk, S. D., ... & Livingston, P. O. (2005). Thomsen-Friedenreich (TF) antigen as a target for prostate cancer vaccine: clinical trial results with TF cluster (c)-KLH plus QS21 conjugate vaccine in patients with biochemically relapsed prostate cancer. *Cancer immunology, immunotherapy*, 54(8), 694-702.
- Springer, G. F. (1984). T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science*, 224(4654), 1198-1206.
- Sriraman SK, Aryasomayajula B, Torchilin VP. Barriers to drug delivery in solid tumors. *Tissue Barriers*. 2014 Jul 22;2:e29528. doi: 10.4161/tisb.29528. PMID: 25068098; PMCID: PMC4106925.
- Steiner, M. & Neri, D. Antibody-radionuclide conjugates for cancer therapy: historical considerations and new trends. *Clin. Cancer Res.* 17, 6406–6416 (2011).
- Stylianopoulos T, Martin JD, Chauhan VP, et al. Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(38):15101-15108.
- Tassano, M., Cabrera, M., Camacho, X., Fernandez, M., Garcia, M., Gambini, J. and Cabral, P., 2021, September. Simultaneous Biodistribution Studies of Tc-99m/I-131 Labeled Antibody with HPGe Gamma Spectrometry. In *EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE AND MOLECULAR IMAGING* (Vol. 48, No. SUPPL 1, pp. S423-S424). ONE NEW YORK PLAZA, SUITE 4600, NEW YORK, NY, UNITED STATES: SPRINGER.
- Tolmachev V, Orlova A, Andersson K. Methods for radiolabelling of monoclonal antibodies. *Methods Mol Biol*. 2014;1060:309-30.
- Torchilin, V. (2014). Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (197), 3-53.
- Vacchelli E, Eggermont A, Galon J, Sautes-Fridman C, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L. Trial watch: monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology* 2013; 2:e22789; PMID:23482847; <http://dx.doi.org/10.4161/onci.22789>.
- Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology*. 2017;27(1):3-49.

Vinod, N., Kim, J.H., Choi, S. et al. Combination of 131I-trastuzumab and lanatoside C enhanced therapeutic efficacy in HER2 positive tumor model. *Sci Rep* 11, 12871 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92460-0>.

Vivier D, Sharma SK, Zeglis BM. Understanding the in vivo fate of radioimmunoconjugates for nuclear imaging. *J Labelled Comp Radiopharm*. 2018 Jul;61(9):672-692. doi: 10.1002/jlcr.3628. Epub 2018 May 14. PMID: 29665104; PMCID: PMC6432633.

Vogelstein, B., & Kinzler, K.W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics*, 9(4), 138-141.

Waskom, M. L., (2021). seaborn: statistical data visualization. *Journal of Open Source Software*, 6(60), 3021, <https://doi.org/10.21105/joss.03021>.

Weiner, G. J. (2015). Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nature reviews Cancer*, 15(6), 361-370.

Welinder C, Baldetorp B, Borrebaeck C, Fredlund BM, Jansson B. A new murine IgG1 anti-Tn monoclonal antibody with in vivo antitumor activity. *Glycobiol* 2011; 21:1097-107; PMID:21470982; <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwr048>.

Zhang, J.; Chu, M. Differential roles of VEGF: Relevance to tissue fibrosis. *J. Cell. Biochem*. 2019, 120, 10945–10951.

Zhang, L., Zhao, S., Jiang, H., Zhang, R., Zhang, M., Pan, W., Sun, Z., Wang, D., Li., J. Radioimmunotherapy study of 131I-labeled Atezolizumab in preclinical models of colorectal cancer. *EJNMMI Res* 12, 70 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13550-022-00939-2>.

Zhao, Y., Cao, J., Melamed, A., Worley, M., Gockley, A., Jones, D., et al. (2019). Losartan Treatment Enhances Chemotherapy Efficacy and Reduces Ascites in Ovarian Cancer Models by Normalizing the Tumor Stroma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116 (6), 2210–2219. doi:10.1073/pnas.1818357116.