

"Desarrollo de Nuevos Agentes para Imagenología

Molecular para

Diagnóstico de Cáncer de Mama y Próstata"

Lucía Alfaya Bianchi

Tesis de Doctorado

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Doctor

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química Universidad de la República Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas Agosto 2024

"Desarrollo de Nuevos Agentes para Imagenología Molecular para

Diagnóstico de Cáncer de Mama y Próstata"

Integrante del tribunal, Dr. Javier Giglio Integrante del tribunal, Dr. Omar Alonso Integrante del tribunal, Dr. Williams Porcal

Director de tesis, Dr. Pablo Cabral Director de tesis, Dra. Ximena Aida Camacho

Agradecimientos:

Han pasado casi 9 años desde que comencé el postgrado, y creo que la persona que ahora presenta este trabajo no es la misma que lo inició, a mediados del 2016, adentrándome en ese momento en el campo de la Radiofarmacia, hasta la fecha inexplorado para mí. Como es de esperar, eso llevo a adentrarme a una curva de aprendizaje- en la que todavía me encuentro-pudiendo adquirir conocimientos de una manera significativa, a la vez que tuve que enfrenarme a innumerables problemas, tomar decisiones y defender mis hipótesis y resultados. Considero que describir el crecimiento experimentado desde una perspectiva tanto profesional como personal como "invaluable" se quedaría corto.

Aprendí realmente lo que significa "investigar", con todas sus virtudes y todos sus innumerables defectos. Interiorice a su vez que esto es solo el principio del camino, y que, si bien se siente como estar en la cima de la montaña luego de arduos años de trabajo, desde la cima se puede ver que hay más montañas que conquistar y territorio por explorar. En fin, el camino sigue, inexplorado para el que desee adentrarse en él, con solo su convicción y sus conocimientos como guía. Y los que ya lo hemos transitado, sabemos lo gratificante que es, pero también lo arduo-y a veces solitario- que puede volverse.

En primer lugar, quiero agradecerle enormemente a Ximena y Pablo por ser mis tutores, por aceptar el desafío de entrenar a una persona joven, nueva en el área, con ganas y muchas ideas, pero poco conocimiento.

A Pablo principalmente por la confianza depositada, por dejarme trabajar a mi modo y a mis tiempos (que quizás no siempre fueron los mejores), por entender y escuchar cuando era necesario y apoyar siempre a que siga. A Xime por estar siempre, en la mesada, en la escritura, en cada resultado-bueno, pero especialmente "malo"- siempre animando a que se siga, fomentando a discutir y siempre con un optimismo y confianza (en mí, en la línea de trabajo, en nuestros resultados) por más que yo no siempre la tuviera, Por dejarme ser, siempre escuchar y principalmente dejarme equivocarme.

A mi familia por el apoyo constante en estos años (y a lo largo de mi vida), gracias a esto es que me pude dedicar a hacer y ser esto; investigar y superarme. Por el optimismo y el aguante que hubo que tener-en especial en los últimos años.

A la gente del CIN -Mirel, Marcos, Fernanda, Victoria, Hugo- por el apoyo y la ayuda brindada durante el proceso. Y especialmente a Caro, por el aguante, las charlas y estar en esos experimentos hasta la tarde. A Juampi también por la colaboración, corrección de trabajos y la confianza depositada.

A la gente de CUDIM por lo bien que me acogieron y lo mucho que me enseñaron. A Kevin por su ayuda en los modelos tumorales, a Laura y Andrea por las excelentes imágenes obtenidas y mostradas en toda esta tesis. A la gente del bioterio (Fabiana, Silvana, Erica, Patricia, Leticia) por los animales de experimentación y la continua enseñanza en su cuidado. A Ro y Flor por bancarme en el biomédico y siempre dar para adelante, demostrándome como hacer ciencia de calidad y estar siempre para escuchar y opinar. Por último, a Eduardo, quien me abrió las puertas de la institución, ya que sin su apoyo este trabajo hubiera sido imposible.

Al resto del CUDIM (Maia, Manuela, Natalí, Florencia, Javier, Victoria, Lucia, Andrea, Juan) por el apoyo prestado siempre y los buenos momentos.

En especial, gracias a mis amigos (Vane, Ceci, Eli, Mar, Flo, Xime, Ale y Vivi), quienes bancaron este proceso de tantos años conmigo-siempre en las buenas y en las malas-.

"Desarrollo de Nuevos Agentes para imagenología molecular

para diagnóstico de cáncer de Mama y Próstata"

Lucía Alfaya Bianchi

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2024

DIRECTORES: Dr. Pablo Cabral (Facultad de Ciencias), Dra. Ximena Aída Camacho (Facultad de Ciencias)

La Imagenología Molecular abarca la visualización, caracterización y medición de procesos biológicos a nivel molecular y celular en seres humanos y otros organismos vivos. Incluye la obtención de imágenes en 2-3 dimensiones y su cuantificación temporal, utilizando técnicas como la medicina nuclear y la imagenología óptica. Este campo se traduce en la creación de agentes de imagen moleculares, como sondas (endógenas o exógenas), destinadas a visualizar, caracterizar y medir procesos biológicos en sistemas vivos.

El presente proyecto se propone desarrollar y evaluar agentes de imagen moleculares innovadores para el cáncer de próstata y mama. Esto se logrará mediante el diseño, síntesis y evaluación de nuevos trazadores radiactivos. Se ha identificado una sobreexpresión significativa de los receptores de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (GnRH o LHRH) en ambas neoplasias, lo que motiva la utilización de esta hormona como estrategia novedosa para el desarrollo de agentes de imagen.

Se pretende entonces estudiar y ampliar en la línea de investigación exitosa basada en el LHRH como radiotrazador, empleando tanto al radionucleido [^{99m}Tc]Tc (vía agente bifuncional HYNIC) como al [⁶⁸Ga]Ga (vía DOTA) generando dos nuevos radiofármacos capaces de diagnosticar tanto el cáncer de mama como de próstata. Simultáneamente, se explorará el uso del anticuerpo monoclonal anti el receptor HER2 Trastuzumab (Herceptin) como agente de imagen para el cáncer de próstata, basándonos en la sobreexpresión de este receptor en dicha patología.

En la síntesis, se desarrollaron exitosamente dos radiotrazadores basados en un análogo del péptido LHRH (LHRH(D-Lys6)): el [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) /Tricina/Ácido Nicotínico (NA) y el [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6), ambos con una pureza radioquímica superior al 94%. Ambos demostraron alta estabilidad en condiciones *in vitro* (PBS, suero fetal bovino-SFB-) durante al menos 2-4 h, así como resistencia a competidores del radionucleido. Presentaron marcada hidrofilicidad y baja unión a proteínas plasmáticas.

La evaluación *in vitro*, realizada en diversas líneas de cáncer de mama y próstata, junto con controles negativos, mostró una unión significativa de ambos radiofármacos a estas líneas, demostrándose a su vez su especificidad mediante ensayos de bloqueo con el ligando frío. Los estudios *in vivo* revelaron baja actividad en tiroides y estómago, indicando una reoxidación insignificante, con excreción principalmente renal y baja actividad en sangre. Las biodistribuciones en ratones portadores de tumores demostraron una acumulación preferencial del trazador a nivel tumoral, con una relación Tumor/Músculo mayor a 5 para ambos compuestos. Los ensayos imagenológicos por PET/CT y SPECT/CT confirmaron la visibilidad del tumor en todos los modelos estudiados.

Asimismo, se logró sintetizar un tercer radiofármaco, el [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-Trastuzumab con una pureza radioquímica superior al 90%. Este demostró estabilidad *in vitro* en NaCl 0.9%, SFB y competidores hasta 24 h post-marcación. La evaluación *in vivo* en líneas de cáncer de próstata, mediante unión celular y citometría de flujo, mostró una sobreexpresión moderada a alta del receptor HER2 en las líneas celulares evaluadas hasta 4 h, siendo esta específica. Las biodistribuciones evidenciaron una alta captación en sangre y bazo, conforme a las características de estas moléculas de alto peso molecular. Los ensayos de imagenología SPECT/CT revelaron tumores visibles para los modelos de cáncer de próstata evaluados (LnCap y PC3) hasta 24 h post inyección.

En resumen, se han desarrollado tres innovadores radiofármacos para el diagnóstico imagenológico de cáncer de mama y próstata, siendo los resultados obtenidos altamente prometedores. No obstante, se requiere ampliar los estudios para continuar la caracterización de los complejos.

La experiencia adquirida durante este trabajo será sin duda invaluable para futuras investigaciones sobre este y otros blancos moleculares de interés y la generación de nuevos radiotrazadores basados en estos por parte del grupo de trabajo.

"Development of New Molecular Imaging Agents for the

Diagnosis of Breast and Prostate Cancer."

Lucía Alfaya Bianchi

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

2024

DIRECTORS: Dr. Pablo Cabral (Facultad de Ciencias), Dra. Ximena Aída Camacho (Facultad de Ciencias)

Molecular Imaging encompasses the visualization, characterization, and measurement of biological processes at the molecular and cellular levels in humans and other living organisms. It involves acquiring 2-3 dimensional images and their temporal quantification using techniques such as nuclear medicine and optical imaging. This field translates into the creation of molecular imaging agents, including probes (endogenous or exogenous) designed to visualize, characterize, and measure biological processes in living systems.

The current project aims to develop and evaluate innovative molecular imaging agents for prostate and breast cancer. This will be achieved through the design, synthesis, and evaluation of new radioactive tracers. A significant overexpression of luteinizing hormone-releasing hormone (GnRH or LHRH) receptors has been identified in both neoplasms, motivating the use of this hormone as a novel strategy for the development of imaging agents. The goal is to study and expand the successful research line based on LHRH as a radiotracer, using the radionuclide [^{99m}Tc] Tc (via bifunctional agent HYNIC) and [⁶⁸Ga]Ga (via DOTA) to generate two new radiopharmaceuticals capable of diagnosing both breast and prostate cancer. Simultaneously, the use of the monoclonal antibody against the HER2 receptor, Trastuzumab (Herceptin), will be explored as an imaging agent for prostate cancer capitalizing on the overexpression of this receptor in the pathology.

In the synthesis, two radiotracers based on an analogue of the LHRH peptide (LHRH(D-Lys6)) were developed: [^{99m}Tc] Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricine/Nicotinic Acid

(NA) and [⁶⁸Ga] Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6), both with a radiochemical purity exceeding 94%. Both demonstrated high stability under *in vitro* conditions (PBS, fetal bovine serum-FBS-) for at least 2-4 hours, as well as resistance to radionuclide competitors. They exhibited significant hydrophilicity and low binding to plasma proteins.

In vitro evaluation, conducted on various breast and prostate cancer cell lines, along with negative controls, showed significant binding of both radiopharmaceuticals to these lines, confirming their specificity through cold ligand blocking assays. *In vivo* studies revealed low activity in the thyroid and stomach, indicating insignificant reoxidation, with predominantly renal excretion and low blood activity. Biodistributions in mice bearing tumors demonstrated preferential tracer accumulation in the tumor, with a tumor/muscle ratio exceeding 5 for both compounds. PET/CT and SPECT/CT imaging assays confirmed tumor visibility in all studied models.

Furthermore, the radiopharmaceutical [^{99m}Tc] Tc-HYNIC-Trastuzumab was successfully synthesized with a radiochemical purity exceeding 90%. It exhibited stability in 0.9% NaCl, FBS, and competitors for up to 24 hours post-labeling. *In vivo* evaluation in prostate cancer cell lines, using cellular binding and flow cytometry, showed a moderate to high overexpression of the HER2 receptor in the studied lines; these were also specific. Biodistributions revealed high uptake in blood and spleen, consistent with the characteristics of these molecules with high molecular weight. SPECT/CT imaging assays demonstrated visible tumors for LnCap and PC3 models up to 24 hours post-injection.

In summary, three radiopharmaceuticals have been developed for diagnostic molecular imaging, and the results obtained are promising. However, new and further studies are needed to continue characterizing these complexes.

The acquired experience will be invaluable for future investigations into this and other molecular targets of interest for the research group.

Abreviaturas		16
1-Introducció	ón:	19
1-Cáncer:		19
1.1 Cánc	er de mama:	22
1.1.1	Epidemiologia:	
1.1.2	Clasificación:	
1.1.3	Fisiopatología y Mecanismos moleculares:	
1.1.4	Diagnóstico:	
1.1.5	Tratamiento:	
1.1.6	Rol de la Medicina Nuclear en diagnóstico:	30
1.2 Cá	áncer de Próstata:	
1.2.1	Epidemiologia:	33
1.2.2 C	Clasificación:	33
1.2.3 F	isiopatología y mecanismos moleculares:	35
1.2.4 D	Diagnóstico:	
1.2.5 T	ratamiento:	
1.2.6 R	tol de la Medicina Nuclear en CaP:	40
2-LHRH:		41
2.1: Fund	ciones endógenas del decapéptido LHRH:	41
2.2 LHR	H en cáncer:	43
2.3 Estra	itegias terapéuticas basadas en el LHRH:	45
2.4 LHR	H Como agente de imagenología:	48
3. EGFRs:		50
3.1 Ligar	ndos de la familia:	50
3.2 Rol d	le los EGFRs en el Cáncer:	51
3.3 Trast	tuzumab como ligando de HER2:	53
3.4: Tras	stuzumab en CaP:	54
4-Imageno	logía Molecular:	55
4.1 Princ	cipios básicos de SPECT:	58
4.2 Princ	cipios básicos de PET:	60
4.3 Agen	tes de imagenología molecular:	62

Índice:

4.3.1 Anticuerpos monocionales como agentes de imagen:	62
4.3.2 Péptidos como agentes de imagen:	63
5-Radiofármacos:	65
5.1 Radiofármacos de diagnóstico:	66
5.1.1 Tecnecio-99m	66
5.1.2 Radiofármacos de ^{99m} Tc:	69
5.1.3 Estrategias de marcación con ^{99m} Tc:	
5.1.4 HYNIC como agente quelante bifuncional:	
5.2 Galio 68:	
5.2.1 Marcación con ⁶⁸ Ga:	
5.2.3 Radiofármacos de ⁶⁸ Ga:	
5.2.4 DOTA como agente quelante Bifuncional:	
2-Objetivos	
2.1: Objetivo general:	
2.2: Objetivos específicos:	
3-Generación Radiofármaco de ^{99m} Tc basado en el péptido HYNIC-GSG-LHF Lys6)	RH(D- 80
3.1 Materiales v Métodos:	80
3.1.1 Síntesis de péptido HYNIC-LHRH(D-Lvs6)-GSG:	
3.1 2. Marcación del péptido con [^{99m} Tc]TcO4-:	
3.1.3 Purificación de los complejos [99mTc]TcHYNIC-GSG-LHRH(D-Ly	s6)
3.1.3 Purificación de los complejos [^{99m} Tc]TcHYNIC-GSG-LHRH(D-Ly /Coligando:	s6) 83
3.1.3 Purificación de los complejos [^{99m} Tc]TcHYNIC-GSG-LHRH(D-Ly /Coligando: 3.1.4 Coeficiente de reparto o Log P:	s6) 83 83
 3.1.3 Purificación de los complejos [^{99m}Tc]TcHYNIC-GSG-LHRH(D-Ly /Coligando: 3.1.4 Coeficiente de reparto o Log P: 3.1.5 Estabilidad <i>in vitro:</i> 	s6) 83 83 84
 3.1.3 Purificación de los complejos [^{99m}Tc]TcHYNIC-GSG-LHRH(D-Ly /Coligando: 3.1.4 Coeficiente de reparto o Log P: 3.1.5 Estabilidad <i>in vitro</i>: 3.1.6 Modelos celulares: 	s6)
 3.1.3 Purificación de los complejos [^{99m}Tc]TcHYNIC-GSG-LHRH(D-Ly /Coligando: 3.1.4 Coeficiente de reparto o Log P: 3.1.5 Estabilidad <i>in vitro</i>: 3.1.6 Modelos celulares: 3.1.7 Estudios biológicos <i>in vitro</i> de unión celular: 	s6) 8383848585
 3.1.3 Purificación de los complejos [^{99m}Tc]TcHYNIC-GSG-LHRH(D-Ly /Coligando: 3.1.4 Coeficiente de reparto o Log P: 3.1.5 Estabilidad <i>in vitro</i>: 3.1.6 Modelos celulares: 3.1.7 Estudios biológicos <i>in vitro</i> de unión celular: 3.1.8 Modelos <i>in vivo</i>: 	s6)
 3.1.3 Purificación de los complejos [^{99m}Tc]TcHYNIC-GSG-LHRH(D-Ly /Coligando: 3.1.4 Coeficiente de reparto o Log P: 3.1.5 Estabilidad <i>in vitro</i>: 3.1.6 Modelos celulares: 3.1.7 Estudios biológicos <i>in vitro</i> de unión celular: 3.1.8 Modelos <i>in vivo</i>: 3.1.9 Imágenes SPECT/CT: 	s6)
 3.1.3 Purificación de los complejos [^{99m}Tc]TcHYNIC-GSG-LHRH(D-Ly /Coligando: 3.1.4 Coeficiente de reparto o Log P: 3.1.5 Estabilidad <i>in vitro</i>: 3.1.6 Modelos celulares: 3.1.7 Estudios biológicos <i>in vitro</i> de unión celular: 3.1.8 Modelos <i>in vivo</i>: 3.1.9 Imágenes SPECT/CT: 3.2 Resultados y Discusión 	s6)
 3.1.3 Purificación de los complejos [^{99m}Tc]TcHYNIC-GSG-LHRH(D-Ly /Coligando: 3.1.4 Coeficiente de reparto o Log P: 3.1.5 Estabilidad <i>in vitro</i>: 3.1.6 Modelos celulares: 3.1.7 Estudios biológicos <i>in vitro</i> de unión celular: 3.1.8 Modelos <i>in vivo</i>: 3.1.9 Imágenes SPECT/CT: 3.2 Resultados y Discusión 3.2.1 Síntesis de HYNIC-GSG-LHRH: 	s6)
 3.1.3 Purificación de los complejos [^{99m}Tc]TcHYNIC-GSG-LHRH(D-Ly /Coligando: 3.1.4 Coeficiente de reparto o Log P: 3.1.5 Estabilidad <i>in vitro</i>: 3.1.5 Estabilidad <i>in vitro</i>: 3.1.6 Modelos celulares: 3.1.7 Estudios biológicos <i>in vitro</i> de unión celular: 3.1.8 Modelos <i>in vivo</i>: 3.1.9 Imágenes SPECT/CT: 3.2 Resultados y Discusión 3.2.1 Síntesis de HYNIC-GSG-LHRH: 3.2.2 Marcación con ^{99m}Tc de HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6): 	s6)

3.2.4 Estabilidad <i>in vitro</i> :
3.2.5-Estudios biológicos <i>in vitro</i> de unión celular en líneas de cáncer de mama:
3.2.6-Estudios biodistribución en ratones hembra normales y xenográficos (4T1):
3.2.7-Estudios SPECT/CT en ratones hembra xenográficos (4T1, BT-474, MCF-7):
3.2.8-Estudios biológicos <i>in vitro</i> de unión celular en líneas de cáncer de próstata: 117
3.2.9-Estudios biodistribución en ratones macho normales y xenográficos (LnCap, PC3):
3.2.10-Estudios imagenológicos SPECT/CT en ratones macho Nude portadores de tumores (LnCap, PC3):
3.3 Conclusiones:
4-Generación Radiofármaco de ⁶⁸ Ga basado en el péptido Ahx-DOTA-LHRH(D- Lys6):
4.1 Materiales y Métodos:
4.1.1 Síntesis del péptido DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6):
4.1 2. Marcación del péptido con [⁶⁸ Ga]GaCl ₃ :133
4.1.3 Purificación del radiofármaco [68Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6): 134
4.1.4 Coeficiente de reparto o Log P: 135
4.1.5 Estabilidad in vitro:
4.1.6 Modelos celulares:
4.1.7 Estudios biológicos <i>in vitro</i> de unión celular:
4.1.8 Modelos in vivo:
4.1.9 Imágenes PET/CT: 137
4.2 Resultados y Discusión:
4.2.1 Síntesis del precursor:
4.2.2 Marcación del DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) con [68Ga]GaCl3: 139
4.2.3 Coeficiente de Reparto o log P:143
4.2.4 Estabilidad in vitro:
4.2.5-Estudios biológicos in vitro de unión celular en líneas de cáncer de mama:

4.2.6-Estudios biodistribución en ratones hembra normales y xenográficos (4T1):
4.2.7-Estudios PET/CT en ratones hembra xenográficos (4T1):
4.2.8-Estudios biológicos <i>in vitro</i> de unión celular en líneas de cáncer de próstata:
4.2.9-Estudios biodistribución en ratones macho normales y xenográficos (LnCap, PC3):
4.2.10-Estudios PET/CT en ratones macho Nude portadores de tumores (LnCap, PC3):
4.3 Conclusiones:
5-Generación Radiofármaco de ^{99m} Tc basado en el anticuerpo Trastuzumab (Herceptin):
5.1 Materiales y Métodos:
5.1.1 Conjugación HYNIC-Trastuzumab:
5.1.2 Marcación con ^{99m}Tc de Tfa-HYNIC-Trastuzumab y controles de calidad:
5.1.3. Estabilidad de estabilidad <i>in vitro</i> del complejo [^{99m} Tc]Tc-HYNIC- Trastuzumab:
5.2.4 Conjugación de Trastuzumab con isotiocianato de fluoresceína (FITC): 180
5.2.5 Estudios biológicos <i>in vitro</i> de unión celular:
5.2.6 Análisis por citometría de flujo:
5.2.7 Modelos in vivo:
5.2.8 Imágenes de modelos SPECT/CT en ratones macho Nude portadores de tumores (LnCap, PC3) y ratones Nude hembras portadores de tumores (MCF-7, BT-474).
5.2 Resultados y Discusión [.]
5.1.1 Conjugación HYNIC-Trastuzumab: 184
5.2.2 Marcación con [^{99m} Tc]TcO ₄ - de Tfa-HYNIC-Trastuzumab y controles de calidad:
5.2.3. Estabilidad de estabilidad in vitro del complejo [^{99m}Tc]TcHYNIC- Trastuzumab:
5.3.4 Conjugación de Trastuzumab con isotiocianato de fluoresceína (FITC): 190
5.3.5 Estudios biológicos in vitro de unión celular:
5.3.6 Análisis por citometría de flujo:

5.3.7 Modelos in vivo:	199
5.3.8 Imágenes SPECT/CT:	
5.3 Conclusiones:	205
6-Conclusiones finales:	
7-Perspectivas a futuro:	209
8-Producción bibliográfica durante el período del Doctorado	210
Anexos:	212
Bibliografía	217

Abreviaturas:

ADH: hiperplasia ductal atípica.

ALH: hiperplasia lobular atípica.

AR: Receptor de andrógenos.

CA: carcinoma.

CaP: Cáncer de Próstata.

CDI: carcinoma ductal in situ.

CK: citoquina.

CLI: Carcinoma lobular invasivo.

CT: Tomografía computada.

CUDIM: Centro Uruguayo de Imagenología Molecular.

DCIS: carcinoma ductal in situ.

DOTA: 1, 4, 7,10-tetraazociclodecano-1, 4,7, 10 ácido.

EDDA: ácido etilenodiamina-N-N'-diacético.

ER: Receptor de Estrógenos.

FEA: epitelio plano atípico.

GLUT-1: Transportador de glucosa 1.

GnRH: hormona liberadora de gonadotropina.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 16

HER-1: factor epidérmico de crecimiento humano 1.

HER2: factor epidérmico de crecimiento humano 2.

HYNIC: grupo 6-hidrazinonicotinil.

IDC: carcinoma ductal invasivo.

ILC: carcinoma invasivo lobular.

IM: imagenología molecular.

LCIS: carcinoma lobular in situ.

LHRH: hormona liberadora de hormona leutinizante.

mApocrine: apocrino molecular.

MN: Medicina nuclear.

MRI: Resonancia magnética nuclear.

NA: Ácido Nicotínco.

NCCN: National Comprehensive Cancer Network.

pALH: hiperplasia lobular pleomórfica atípica.

PET: Tomografía de emisión de positrones.

pILC: carcinoma invasivo lobular pleomórfico.

pLCIS: carcinoma in situ pleomórfico lobular.

PR: Receptor de progesterona.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 17

PSA: Antígeno prostático específico.

PSMA: Antígeno prostático de membrana especifico.

QT: Quimioterapia.

SFB: Suero Fetal Bovino.

SPECT: Tomografía computada por emisión de fotón único.

TNBC: Cáncer de mama Triple negativo.

WHO: World Health Organization (Organización mundial de la Salud).

1-Introducción:

1-Cáncer:

El cáncer refiere a un conjunto de más de 100 enfermedades, caracterizada por el crecimiento anormal y descontrolado de algunas de las células del cuerpo; debido a múltiples mecanismos.

La carcinogénesis es un proceso multifactorial, el cual es guiado por alteraciones genéticas y epigenéticas, que alteran la integridad del genoma y permiten que la célula evada mecanismos de control de proliferación, muerte celular y estabilidad de la matriz, entre otras (ver **Figura 1**). Esta división descontrolada es la que genera "tumores", que pueden diseminarse a través del sistema linfático o sanguíneo, en un proceso conocido como metástasis $^{1-3}$.



Figura 1: Señales distintivas del cáncer; microambiente tumoral (centro) y variables que influyen en la aparición cáncer. Extraído de *de León et al*¹.

Como ya se ha mencionado, existen diversos tipos de cáncer, cuya clasificación se debe al órgano u tejido donde se origina (Ej.: Cáncer de pulmón, cáncer de mama, de Colon, de próstata, de piel); si bien cada una de estas presentaciones es un área de trabajo en sí misma, que comprende diversos mecanismos moleculares, subclases, fisiopatología y respuesta clínica entre otras.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 19

Su diagnóstico implica una variedad de métodos, como análisis de sangre, imagenología (radiografía, tomografía, resonancia magnética, etc.) y biopsias, entre otros. El tratamiento depende nuevamente del tipo, la etapa y la ubicación del tumor, así como el paciente en si (edad, sexo, comorbilidades, etc.).

La importancia de dicha patología radica en el hecho que, según la *World Health Organization* (WHO), en el año 2016, esta imparte la mayor carga mundial de discapacidades, tanto en hombres como mujeres, a la vez de ser la segunda causa de mortalidad mundialmente, seguido de la enfermedad cardíaca isquémica; una tendencia que se ha mantenido durante los últimos 20 años. Se estima que, en las próximas 4 décadas, el cáncer sobrepase a la enfermedad cardíaca isquémica, con un aumento de 2.08 (vs 1.76) para el año 2060; por lo cual será la principal causa de mortalidad mundial durante la década siguiente ⁴. La **Figura 2** presenta los últimos datos extraídos de GLOBACAN (2020) tanto en incidencia como en mortalidad a nivel mundial.



Figura 2: Porcentaje de incidencia (arriba) y mortalidad (abajo) en cáncer en mujeres (derecha) y en hombres (izquierda) en todo el mundo en el año 2020. Tomado de ⁵. Notar como Uruguay se encuentra en los extremos superiores, tanto en incidencia como en mortalidad.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 20

Según datos locales de la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer los tumores malignos constituyen la segunda causa de muerte en nuestro país. Se diagnostican anualmente 14000 casos nuevos y más de 8000 uruguayos mueren debido a esta patología anualmente, representando un 25% de las muertes.

Los más frecuentes son el de mama en mujeres y el de próstata en hombres, seguidos por el cáncer de pulmón y el colo-rectal; los cuales en conjunto cuentan con el 50% de las muertes debido a esta patología (ver **Figura 3**) 5 .



Figura 3: Porcentaje de incidencia y mortalidad en cáncer en mujeres (izquierda) y en hombres (derecha) en Uruguay. Notar la importancia del cáncer de mama (tanto en prevalencia como mortalidad) en mujeres y el de próstata en hombres. Datos extraídos de la comisión honoraria de lucha contra el cáncer (2015-2019)⁵.

Excluyendo el cáncer de piel, el cáncer de mama es el más frecuente en Uruguay, registrándose 2000 casos anuales; a la vez de ser la principal causa de muerte por cáncer en mujeres (715 anuales). Por su parte, en hombres observamos como el cáncer de próstata es el principal en incidencia, registrándose 1473 nuevos casos por año, siendo un 20% del total de casos en hombres (excluyendo cáncer de piel no Melanoma). Es a su vez el tercero en mortalidad, luego del de pulmón y colo-rectal, con 570 muertes anuales ⁵.

1.1 Cáncer de mama:

Es la patología oncológica más común en mujeres, y posee una gran heterogeneidad a nivel molecular e histológico; lo cual ha impactado en cuanto a la clasificación, estadificación y conducta clínica. Esto ha llevado en las últimas décadas a la creación de terapias dirigidas biológicamente (Ej.: Trastuzumab), a la vez que se busca reducir los efectos sistémicos adversos de las terapias convencionales (quimioterapia, radioterapia).

Todos los cánceres de mama son generados en las unidades lobulares del conducto terminal del ducto colector. La mayoría de los cánceres de mama, según criterios histológicos corresponden a la variedad ductal invasiva (50-80%), seguido por la variedad lobular invasiva (5-15%); medular (1-7%) y el restante está integrado por tumores bien diferenciados (tubulares, papilares, coloides, adenoide, quísticos) con mejor pronóstico ^{6,7}. El cáncer inflamatorio, independientemente del tipo histológico subyacente, es de peor pronóstico ⁸.

Cabe destacar que en etapas "tempranas" de diagnóstico (cuando el tumor se encuentra contenido en la mama, o solo ha llegado a infiltrar nódulos linfáticos auxiliares), este es considerado como "curable". En la actualidad, terapias multimodales han llevado a aumentar la chance de curación al 70-80% de estos pacientes. Por el contrario, una vez que el tumor es inoperable o se ha diseminado a sitos distales, se considera de grado avanzado (etapa IV); a esta altura puede ser tratado, pero es incurable, siendo las metástasis la principal causa de muerte en la mayoría de los pacientes. En este caso se busca aliviar los síntomas y mantener la calidad de vida. Los principales sitios de metástasis en esta patología son el hueso (67%), los nódulos linfáticos de la axila (30-50%), hígado (40%), pulmones (36.9%), nódulos linfáticos internos de la mama (10-40%), cerebro (12.6%), peritoneo (10%), mama contralateral (6%) y nódulos linfáticos supraclaviculares (1-4%) ⁹.

Como ya se ha mencionado, según la histología y patrón molecular observado, se ha desarrollado una clasificación en subtipos (Ver **Tabla 1**), que a su vez indica una conducta clínica a tener en cuenta ¹⁰.

Al ser considerado un problema global, hay un gran énfasis en lograr una llegada equitativa al diagnóstico, tratamiento multimodal y la generación de nuevos fármacos.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 22

1.1.1 Epidemiologia:

Se estima que, en el año 2018, 2.1 millones de mujeres fueron diagnosticadas con cáncer de mama y que 626679 mujeres fallecieron debido a la patología. Se ha observado un aumento anual de 3.1% en la incidencia, una tendencia que se asume continuará en las próximas décadas^{11,12}; en especial teniendo en cuenta que la mayoría de la población femenina mundial se encuentra sobre los 60 años, lo cual las hace más susceptibles a esta enfermedad. La tasa de muerte también varía según el tipo de cáncer, siendo el que expresa el factor epidérmico de crecimiento humano 2 (HER2) asociado a una mayor tasa de muerte, seguido del triple negativo (TNBC), Luminal A y Luminal B¹³.

La incidencia también varia globalmente, siendo mayor en regiones desarrolladas detectándose principalmente a etapas tempranas y con buena prognosis, que, en regiones en vías de desarrollo, donde a se detecta de forma tardía y con peor sobrevida, siendo por consiguiente las regiones con peor tasa de mortalidad ¹⁴. También se presenta de forma heterogénea según la etnia, presentándose a edades más tempranas en mujeres asiáticas (40-50 años) que en mujeres caucásicas (60-70 años) ^{15–17}. Esta variable también afecta a la biología del tumor, lo que a su vez repercute en la mortalidad.

Aproximadamente, un 10% de los cánceres de mama son heredados; individuos con un pariente de primer grado que padeció de cáncer de mama, tiene un riesgo elevado de padecerlo a edad temprana (menor a los 35 años)^{18,19}. Esto ha llevado al desarrollado de diversos modelos para determinar dicho riesgo en este subtipo de pacientes ²⁰. Los genes más conocidos en cuanto al cáncer de mama hereditario son sin duda los genes BRCA1 y BRCA2, dos genes supresores de tumores de alta penetrancia, que codifican proteínas involucradas en la reparación del ADN, y presentan un patrón autosómico dominante²¹. Mutaciones de BRCA1 y BRCA2 se asocian con un riesgo acumulativo de desarrollar cáncer de mama de 72% y 69% respectivamente a los 80 años²².

También existe esta entidad en hombres, si bien es poco común, siendo menos del 1% de los cánceres de mama diagnosticados, si bien su incidencia ha ido en aumento. Algunos factores

de riesgo son la edad, obesidad, enfermedad, tumores testiculares y mutaciones en el gene BRCA2 (8 veces más riesgo que la población general en desarrollar cáncer de mama).

Usualmente los hombres presentan esta patología a una edad más avanzada, y usualmente es de grado II, expresando receptor de estrógenos (ER), progesterona (PR) y HER 2²³

1.1.2 **Clasificación:**

Como ya se ha mencionado, el carcinoma mamario comprende a un grupo heterogéneo de tumores (tanto en su comportamiento clínico como en su tratamiento y pronóstico). Los cánceres infiltrantes se manejan según criterios clínico-patológicos básicos (edad, tamaño, tipo y grado histológico, compromiso ganglionar); si bien estos criterios son limitantes a la hora de dar un pronóstico, riesgo de recidiva o predecir respuesta a quimioterapia neoadyuvante.

Gracias al gran desarrollo de tecnologías genómicas (microarrays, next generation sequencing) generadas en el siglo XXI; el análisis de patrones de expresión ha sido ampliamente utilizado y documentado, llegándose a encontrar una "firma genética distintiva", en la cual se agrupa esta patología dentro de cuatro clases: Luminal A, Luminal B, HER2 positivo y Triple Negativo (Ver **Tabla 1**)²⁴. Cabe destacar que esta clasificación no es universal, y diversos autores han presentado distintas variedades y subvariedades según los marcadores y criterios clínico-patológicos utilizados.

Luminales HER-2 Triple Negativo Luminal A Luminal B Luminal Enriquecido No Basal-Like Basal-Like Tipo molecular 50% 20% 15% 15% Frecuencia +++ ER ++ ++ +++ (>20%) PR +/-+/-_ HER-2 +++ +++ _ CK 5/6 -+++ _ --HER-1 +++

ш

<14%

ш

Alto

Tabla 1: Clasificación y características de los diversos subtipos moleculares del cáncer mamario según estudios inmunohistoquímicos. Modificado de Horvath et al²⁵

Tesis de Doctorado en Ouímica Universidad De la República, Facultad de Química

1/111

14-30%

1/11

<14%

Lic. Lucía Alfaya 2024

ш

Alto

Ш

Alto

Grado

histológico

Ki-67

Mutaciones		BRCA2		p53 (40-80%)	BRCA1 (85%) P53 (100%)
Formas histológicas	CA tubular, CDI, CLI bajo grado				CDI poco diferenciado, metaplásico, CA medular adenoide quístico, apócrino.
Pronóstico	Bueno	Intermedio	Intermedio	Malo	Malo
Tratamiento	Hormonoterapia	Hormonoterapia, QT	Hromonoterapia, QT; HER-2	QT, HER-2	QT
Respuesta a QT	Baja	Intermedia	Alta	Alta	Alta

ER: Receptor de Estrógenos. PR: Receptor de progesterona. HER2: factor epidérmico de crecimiento humano 2, CK: citoquina, HER-1: factor epidérmico de crecimiento humano 1, QT: Quimioterapia, CA: carcinoma. CDI: carcinoma ductal in situ, CLI: Carcinoma lobular invasivo.

1.1.3 Fisiopatología y Mecanismos moleculares:

Se desconoce el mecanismo exacto por el cual se desencadena el cáncer de mama. Hay dos hipótesis involucradas: *la teoría clonal*, que indica una acumulación de mutaciones, cambios epigenéticos y la sobrevida del clon óptimo y *la teoría de la célula madre cáncer (Cancer stem cell model*), en el cual una célula única tumoral precursora es la que inicia y su consecuente proliferación es la que sostiene el proceso. Ambas hipótesis parecen convivir, siendo complejizado por el hecho que las células madre de cáncer también evolucionan de forma clonal.

A nivel morfológico, hay un continuo de lesiones y modificaciones genéticas que transforman la glándula normal a una cancerígena. A nivel molecular hay evidencia de dos caminos divergentes (**Figura 4**), relacionados a la expresión de receptor de estrógenos (ER), grado tumoral y proliferación ²⁶. El primer camino lleva a un tumor de grado bajo, y se caracteriza por una ganancia de 1q, pérdida de 16q, amplificación infrecuente de 17q12 y una expresión de genes asociados al fenotipo ER y cariotipo diploide (Ej.: Luminal A, luminal B). La segunda vía lleva a un tumor de grado intermedio-alto (HER2+, TNBC) y es caracterizado por la pérdida de 13q, ganancia cromosomal en la región 11q13, amplificación de 17q12 (contine ERBB2, gen codificante de HER2) y una sobreexpresión de genes involucrados en el ciclo celular y la proliferación ^{27,28}.



Figura 4: Caminos divergentes para el desarrollo de diversos tipos de cáncer de mama. Modificado de *Bombonati et al*²⁶. ALH: hiperplasia lobular atípica; LCIS: carcinoma lobular in situ; pALH: hiperplasia lobular pleomórfica atípica; pLCIS: carcinoma in situ pleomórfico lobular; FEA: epitelio plano atípico; ADH: hiperplasia ductal atípica; mApocrine: apocrino molecular; ILC: carcinoma invasivo lobular; pILC: carcinoma invasivo lobular pleomórfico; DCIS: carcinoma ductal in situ; IDC: carcinoma ductal invasivo.

Los genes que se ven más alterados o mutados en esta patología son: TP53 (41%), PIK3CA (30%), MYC (20%), PTEN (16%), CCND1 (16%), ERBB2 (13%), FGFR1 (11%) y GATA3 (10%)²⁹; los cuales en gran parte codifican moduladores del ciclo celular, que son reprimidos (p53) u activados (Ciclina D1), causando una disfunción en el crecimiento celular. Se considera que la mayoría de los cánceres de mama espontáneos están causados por múltiples mutaciones de baja penetrancia, que actúan de forma acumulativa ³⁰.

El mayor riesgo para la aparición de cáncer de mama esporádico es la exposición a hormonas. El estrógeno, al unirse a su receptor nuclear (ESR1), actúa como promotor del crecimiento. Si bien esta acción es necesaria en el crecimiento normal (pubertad, ciclo menstrual, embarazo); se ha teorizado que un desbalance entre estrógeno y progesterona puede llevar a una proliferación excesiva, llevando a un daño acumulativo en el ADN y a la acumulación

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 26

de mutaciones malignas, que son nuevamente promovidos a crecer por la presencia de estrógenos. Esto también explica el rol de los bloqueantes de estrógenos, tanto en su unión celular (Ej.: tamoxifeno) como en su producción (Ej. inhibidores de aromatasa) en los cánceres de mama "hormono dependientes" (aquellos que presentan una expresión $ER+/PR+)^{31-33}$.

En cuanto al rol del HER2, como ya se ha mencionado, se encuentra sobre expresado en 15-20% de los cánceres de mama. Su activación ocurre al dimerizarse luego de la unión al ligando, lo cual activas vías de proliferación, sobrevida, metástasis y adhesión. El *targeting* de este receptor, y por consiguiente el bloqueo de las vías que activa, ha sido exitoso para el tratamiento de cánceres HER2+ ¹⁰. En la sección 1.4 de este documento se explorará en mayor profundidad esta molécula y su rol en el cáncer, así como su uso como blanco terapéutico e imagenológico.

1.1.4 Diagnóstico:

Es recomendable un *screening* poblacional para la búsqueda de enfermedad temprana, utilizando test no invasivos y precisos. En este sentido, la mamografía (radiografía de rayos X de baja dosis a la mama), ha sido una técnica de rutina, capaz de disminuir la mortalidad en un 20% en pacientes ³⁴. El mayor beneficio se ha vislumbrado en mujeres entre los 50-69 años, siendo de menor utilidad fuera de este rango etario ^{35–39}.

Es de vital importancia entonces, que esta técnica este implementada de forma nacional y promovida por programas de salud pública. La falta de implementación puede explicar la presentación heterogénea de esta patología, presentándose casos de cáncer de mama avanzados en las regiones que por diversos motivos no han sido capaces de aplicarla ³⁶.

Cabe destacar que esta técnica tiene sus limitaciones, como por ejemplo la incapacidad de detectar metástasis distales o una menor sensibilidad en pacientes con alta densidad mamaria⁴⁰.

En aquellas pacientes con mayor riesgo (Ej. cáncer de mama hereditario) y mujeres sintomáticas, el *screening* es más exhaustivo, con elementos complementarios a la radiografía (ej.: Resonancia magnética nuclear-MRI-, ultrasonido)⁴¹⁻⁴⁵.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 27

Además de la MRI y el ultrasonido, se encuentran en la actualidad en estudio otras técnicas complementarias, como la tomosíntesis digital, mamografía de contraste e imagenología por SPECT (tomografía computada por emisión de fotón único) o PET(tomografía de emisión de positrones para un mejor diagnóstico ^{46–48}. Mas adelante abordaremos dichas tecnologías (**Figura 5**).





1.1.5 Tratamiento:

En cuanto a la terapia local, la cirugía es la principal estrategia de tratamiento al momento del diagnóstico. Se intenta en lo posible conservar la mama, mientras se trata de extraer todo el tejido tumoral. Puede ser antes o después de la terapia sistémica, dependiendo del tamaño tumoral, biología y condiciones del paciente ^{50–54}. Puede a su vez ser utilizado para la escisión de ganglio/s centinelas ^{55,56}. La otra terapia local utilizada es la radioterapia; que

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 28

puede utilizarse tanto para el tratamiento de un ganglio centinela positivo como del tumor primario. En cuanto al tumor primario en sí, hay diferentes modalidades, como son la irradiación parcial o radioterapia hipofacionada, con el objetivo de disminuir la carga tumoral ^{57–61}. También puede ser utilizada en simultáneo con cirugía, buscando reducir los efectos secundarios y logística al paciente ^{62,63}.

Por otro lado, tenemos a la terapia sistémica. Dentro de ella, destaca principalmente la terapia endócrina; esta es considerada estándar en cáncer del tipo luminal (ER o PR +), dependiendo su resultado de la expresión de dichos receptores ^{64,65}. El medicamento de uso preferido en mujeres premenopáusicas es el tamoxifeno (20 mg/día). En pacientes premenopáusicas en riesgo de recaída, el uso de drogas supresores del ovario, como la *gonadotropin-releasing hormone agonist* [GnRH], o *leutinizing homrone releasing hormone* (LHRH)) en combinación con tamoxifeno o con inhibidores de aromatasa puede aumentar la eficacia del tratamiento; si bien la combinación con tamoxifeno parece ser más efectiva ^{66–68}. Hablaremos de esta hormona y de sus funciones más en detalle en la sección 1.2.

En pacientes postmenopáusicas, se ha utilizado tanto el tamoxifeno como inhibidores de aromatasa, ya sea en monoterapia o en secuencia⁶⁹.

Por otro lado, la quimioterapia, que puede ser utilizada tanto previo (neoadyuvante) o luego (adyuvante) de la cirugía, siendo efectiva en ambos casos ⁷⁰. Hay que considerar la carga tumoral, grado, subtipo molecular y riesgo de recaída para obtener el beneficio absoluto ⁷¹. Usualmente resulta en una cirugía más sencilla, y es altamente recomendada para tumores triple negativos y HER2+ ⁷². Las drogas de mayor uso son antraciclinas y taxanos, ya sea en combinación o en secuencia, en un periodo de 18-24 semanas.

Por último, se encuentran las terapias anti HER2. En caso de tumores HER2 positivos, agregar el anticuerpo monoclonal Trastuzumab a la terapia de antracilinas-taxanos mejora la sobrevida ^{73,74}. La terapia docetaxel-carboplatina-trastuzumab (THC) es una alternativa sin antraciclina, con menor toxicidad cardíaca pero menor eficiencia ^{75,76}. El tratamiento en pacientes con cáncer temprano es de 1 año^{77–79}. Hablaremos de esa molécula y de sus funciones más en detalle en la sección 1.3.

1.1.6 Rol de la Medicina Nuclear en diagnóstico:

La medicina nuclear es una especialidad médica, en la que se utilizan radiotrazadores o radiofármacos (fármaco transportador + isótopo radioactivo) para el diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades. En cuanto al diagnóstico, podemos diferenciar dos modalidades según el radiotrazador utilizado, técnicas de PET (Tomografía de Emisión de Positrones) o SPECT (Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón Único), usualmente combinadas con la tomografía computada o CT para brindar más información. Explicaremos ambas técnicas más en detalle en el capítulo 1.5.

a) PET-CT: el rol de la imagenología molecular ha crecido en los últimos años, debido al interés en la medicina personalizada, terapia molecular, inmunoterapia y teragnóstica (terapia + diagnóstico). Ha crecido como diciplina encontrando targets tumorales potenciales y pacientes que puedan beneficiarse de dicho radiofármaco (Ver Figura 6).



Figura 6: Radiofármacos PET para cáncer de mama. Modificado de Hadebe et al⁸⁰.

Como apreciamos, la mayoría se basa en la sobreexpresión de diversos receptores celulares, como ser los receptores hormonales ya mencionados (receptor de estrógenos, progesterona, andrógenos, PSMA), receptor HER2, de somatostatina, citoquina CXCR4, integrinas

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 30

relacionadas en los procesos angiogénicos, así como en otros procesos metabólicos (hipoxia, metabolismo de aminoácidos, metabolismo del ADN, etc.). Algunos de estos radiofármacos desarrollados, tanto en preclínica o clínica son mencionados más en detalle en la Tabla 1 del Anexo.

[¹⁸F]FDG PET/CT:

El principal radiofármaco de PET/CT, si bien es un análogo de la glucosa, no es metabolizado por completo en la célula. Se ha comprobado que las células cancerígenas tienen el metabolismo de glucosa aumentada, debido a la sobreexpresión del transportador de glucosa (GLUT-1, Ver Figura 6) y otras enzimas involucradas en el metabolismo celular.

El alto costo y la baja sensibilidad del PET/CT no lo hacen óptimos para encontrar lesiones pequeñas (5 mm), por lo que no se emplea para diagnóstico de cáncer de mama temprano según el NCCN (National Comprehensive Cancer Network). Una de las principales desventajas es que no es específico para malignidad y el uptake también se encuentra aumentado en enfermedades infecciosas y/o inflamatorias, disminuyendo su especificidad. Otras variantes que interfieren son el uptake en cerebro y tejidos. Su uso si se vuelve vital en casos de enfermedad avanzada, por lo cuales pacientes en riesgo de enfermedad metastásica serán los más beneficiados ⁸⁰.

Cabe destacar que en la actualidad, en Uruguay, el Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM), el único centro especializado en PET del país, dispone de los siguientes radiofármacos (mencionados en su mayoría en la Tabla 1 del Anexo) que podrían ser utilizados como agentes de imagen PET/CT para dicha patología: [¹⁸F]FDG (3027 estudios realizados en el año 2020), [68Ga]Ga-DOTATATE (93 estudios realizados en el 2020), [¹¹C]COL (0 estudios en 2020), [¹⁸F]NaF (20 estudios realizados en el año 2020), ¹⁸F]FMISO (0 estudios realizados en el año 2020), ¹⁸F]-FLT (0 estudios realizados en el año 2020), [⁶⁸Ga]Ga-PSMA (286 estudios realizados en el 2020), [¹⁸F]PSMA (19 estudios realizados en el 2020), [¹⁸F]PSMA 1007 (17 estudios en el 2020) ⁸¹. Se han ingresado a su vez en el 2022 el [¹⁸F]FES y el [⁶⁸Ga]Ga-FAPI. Cabe destacar que, de toda esta lista, las utilizadas de rutina para cáncer de mama son [¹⁸F]FDG y el [¹⁸F]FES.

Tesis de Doctorado en Ouímica Universidad De la República, Facultad de Química 31

b) SPECT-CT: En primer lugar, si bien el PET ha sido la metodología de preferencia y gran desarrollo en los últimos años, como se demuestra en la **Tabla 1 del Anexo**, el SPECT sigue siendo la modalidad preferencial para el centellográma óseo y por consiguiente las metástasis óseas en cáncer de mama. En comparación, estudios realizados comparando el [¹⁸F]FDG PET vs. [^{99m}Tc]Tc-HMDP SPECT demostraron una la mayor sensibilidad del SPECT frente al PET (85 % vs 17%) así como una mejor exactitud (96% vs 85% respectivamente) ⁸². También es la técnica de referencia para la detección del ganglio centinela (microcoloides marcados con [^{99m}Tc]Tc, inyectados cerca del sitio tumoral), lo que ayuda a la estadificación y a la cirugía ⁸³. Cabe mencionar que estas son las técnicas SPECT utilizadas en la actualidad en Uruguay para el diagnóstico u seguimiento del tratamiento de cáncer de mama.

En la **Tabla 2 del Anexo** se anexa una lista de radiofármacos SPECT usados para el diagnóstico de Cáncer de Mama, muchos de los cuales poseen el mismo blanco celular ya mencionado en la **Figura 6**.

1.2 Cáncer de Próstata:

El cáncer de próstata (CaP) afecta principalmente a hombres entre 45-60 años, y es la principal causa de muertes asociadas al cáncer los países occidentales (Ver **Figura 2**)⁸⁴.

El diagnóstico se basa principalmente por en biopsia, dosificación del PSA (*Prostate Specific Antigen* o antígeno prostático especifico), examinación rectal y resonancia magnética. Los factores de riesgo incluyen el familiar, etnicidad, edad, obesidad y factores ambientales.

Es una enfermedad esencialmente heterogénea, tanto genética como epigenéticamente; viéndose diferencias entre etnias y países. Hay evidencias de contribuciones genéticas, habiendo variables hereditarias, siendo la herencia uno de los factores de riesgo más importantes ⁸⁵.

En cuanto a la genética, se ha estudiado la variación genética en la síntesis y metabolismo de andrógenos ^{86,87}, ya que el crecimiento epitelial de la próstata depende de los andrógenos, principalmente la testosterona ⁸⁸.

1.2.1 Epidemiologia:

Como ya se ha mencionado previamente, el CaP es una de las neoplasias más comunes en hombres, con mayor prevalencia en países desarrollados. Se diagnostican 190000 nuevos casos por año y 80000 muertes anuales ⁸⁹. Se espera que esta cifra aumente a 1.7 millones de casos anuales y medio millón de muertes en el año 2030, principalmente debido al aumento y envejecimiento de la población ⁹⁰.

La incidencia varía según región geográfica y grupo étnico, siendo mayor en hombres afroamericanos. La mayor incidencia se encuentra en países desarrollados, donde hay una vigilancia y *screening* prevalente ^{91,92}. Se asume que esta vigilancia epidemiológica puede explicar las diferencias observadas entre países. La incidencia aumenta con la edad, siendo casi un 60% en hombres mayores de 65 años ⁸⁹.

Se distingue también una gran variación en la tasa de mortalidad, la cual aumente con la edad, siendo un 55% de las muertes en mayores de 65 años. La mayor mortalidad también se encuentra en hombres afroamericanos, lo que podría indicar una asociación genética con esta patología ⁸⁹.

1.2.2 Clasificación:

El principal criterio histológico utilizado es el *score* de Gleason, basado en la morfología. Sirve tanto para estadificación, así como factor pronóstico; a mayor *score* o puntaje, peor pronóstico de la enfermedad; si bien este no es de utilidad a momento de seleccionar la terapia. Por esto es común agrupar por estadio clínico o tratamiento. Esto ha llevado a la necesidad de salir de la clasificación morfológica tradicional y buscar una más centrada en marcadores moleculares específicos de progresión, capaces de guiar la terapia. De esta manera se ha llegado a encontrar que el receptor de andrógenos (AR), oncogenes y genes supresores de tumores y el propio microambiente tumoral son mecanismos vitales que guían la progresión de CaP y que son por lo tanto biomarcadores potenciales tanto para diagnóstico como terapia.

En especial, el receptor de AR tiene un rol central durante el proceso de progresión tumoral. La próstata es un órgano dependiente de andrógenos, por lo que la ablación androgénica es un tratamiento de rutina para el CaP. Sin embargo, la mayoría de los pacientes con cáncer avanzado siguen desarrollando la enfermedad a pesar de tener un nivel de testosterona menor a 50 ng/mL (castración), lo que se conoce como cáncer resistente a la castración o andrógeno independiente (Ver **Figura 7**).

Según la clasificación será el tratamiento de este; en caso de cáncer de riesgo bajo, se puede aplicar radiación y cirugía (prostatectomía), mientras que para cánceres metastásico y de alto riesgo (3-35%), se recomienda la terapia hormonal sumado a la radioterapia⁹³.



Figura 7: Tipos de CaP y tratamientos posibles. Modificada de Termini et al 94

Se han estudiado los mecanismos de escapes que pueden llevar a esta resistencia durante la progresión de la enfermedad. Se ha encontrado, por ejemplo, la pérdida de ciertos genes supresores de tumores, principalmente PTEN, p53 y RB es común durante la progresión de la enfermedad. La pérdida de PTEN se vincula a una menor sobrevida, si bien no tiene valor predictivo en terapia. La pérdida de p53 y RB se vincula a estadios más avanzados, si bien tampoco es predictiva en cuanto a terapia. Se ha visto también una activación de ciertos oncogenes (Src, MET, Axl, FGFR) en estadios tardíos.

Uno de los procesos más característicos del CaP es el desarrollo de metástasis óseas, lo que podría estar relacionado con el microambiente en hueso. Esto está apoyado en el uso de radionucleidos dirigidos a dicho ambiente (Ej.: [⁸⁹Sr]Sr, [²²³Ra]Ra) los cuales aumentan la sobrevida luego de la quimioterapia^{95–97}.

1.2.3 Fisiopatología y mecanismos moleculares:

La historia familiar es el factor principal para el desarrollo del CaP; hombres con familiares diagnosticados tienen un riesgo del 50% más frente a hombres sin historia familiar. Familiares de primer grado en generaciones sucesivas tienen más chance de generar CaP de forma más temprana^{87,98,99}.

Esta establecido que los genes de susceptibilidad son heredados; se han encontrado mutaciones heredables que aumentan el riesgo de desarrollar CaP. En un estudio multigenético de hombres diagnosticados con CaP o con alto riesgo de tenerlo, se observó que 5.5% de estos tienen mutaciones en genes reparadores del ADN, como ATM, BRCA1 y BRCA2. Los hombres afroamericanos, a su vez, poseen otras mutaciones genéticas que los hacen más susceptibles a dicha patología ¹⁰⁰.

Como ya se ha mencionado, el cáncer se origina debido a cambios en el ADN generado por mutaciones, polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs), y alteraciones del número de copias somáticas (SCNAs). Cabe destacar el "*turn off*" de células supresoras de tumores y la activación de oncogenes principalmente, lo que lleva a la división celular. Los genes más utilizados como biomarcadores de CaP son: genes BRCA, genes HOX, genes ATM, RNasa L (HPC1, lq22), MSR1 (8p) y ELAC2/HPC2 (17p11)^{98,101,102}.

Estos biomarcadores pueden ser usados tanto como herramienta diagnostica, de estadificación, evaluar la agresividad y la respuesta terapéutica (Ver **Figura 8**).



Figura 8: Progresión del CaP. Modificado de Sekhoacha et al⁸⁴.

1.2.4 Diagnóstico:

El diagnóstico tardío y la falla terapéutica son las dos causas principales de la mortalidad en CaP. Si bien no hay una prueba única y específica, el Gold estándar es el tacto rectal (DRE) realizado por un médico especializado, pudiendo palpar el tamaño de la glándula y anormalidades en la misma. Sin embargo, el método principal de *screening* sigue siendo realizado por medio del PSA; una glicoproteína secretada por el epitelio de la glándula prostática, presentándose tanto en semen como en sangre ¹⁰³.

Es un estudio relativamente sencillo, requiriendo solo una extracción de sangre para estudiar el nivel del biomarcador, con un *cut off* de 4 ng/mL, necesitando más ensayos al pasar ese umbral. Pacientes con un PSA entre 4-10 ng/mL tiene un 25% de probabilidad de tener CaP, mientras que pacientes con un valor mayor a 10 ng/mL tiene un riesgo del 50%. Cabe destacar que el biomarcador no es específico de CaP, y su aumento puede verse también debido a otros procesos fisiológicos, como puede ser la hiperplasia prostática benigna (BPH) y prostatitis. Es necesaria una biopsia para confirmar el diagnóstico (Ver **Figura 9**)¹⁰⁰.

En cuanto a la biopsia, usualmente se realiza de forma transrectal, localizando la glándula por medio de métodos imagenológicas como ser resonancia magnética o ultrasonido
transrectal, lo cual también ayuda a ubicar zonas anormales en la glándula prostática ^{104,105}. Una vez extraída, la biopsia es analizada, reportando: Negativo, Positivo u anormal ⁹⁹; si bien en la actualidad, debido al avance de diversas tecnologías (inteligencia artificial, MRI multiparamétrica-mpMRI-, PSMA-PET) se ha mejorado el proceso, logrando un resultado más individualizado ¹⁰⁶.





1.2.5 Tratamiento:

El factor pronostico se compone del nivel inicial de PSA, TNM (tumor, nódulos linfáticos y metástasis) y *score* de Gleason, si bien también se toma en cuenta otros factores (función renal, comorbilidades, edad) ¹⁰⁸. Los avances en el diagnóstico han llevado a una mejora en la clasificación de paciente y por consiguiente en la terapia propuesta.

En los estadios I-III se considera el seguimiento, prostatectomía y radioterapia como primera línea. En estadios de mayor riesgo, se sugiere la ablación androgénica, tanto quirúrgica como farmacológica. En caso de resistencia a la castración, caracterizada por una mutación en el receptor de andrógenos, la prognosis y tratamiento son más complicadas ^{109,110}.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 37

En total, podemos dividir a los tratamientos en:

1-Vigilancia: requiere de monitoreo, se recomienda en pacientes con cáncer de bajo riesgo o cuya esperanza de vida es corta. Se realiza seguimiento por medio de nivel de PSA, progresión clínica e histológica ^{111–113}.

2-Prostactomia: refiere a la remoción de la glándula prostática por medio de cirugía. Se recomienda en pacientes con recurrencia local sin metástasis luego de la terapia, en especial en pacientes menores a los 70 años, con alta expectativa de vida y pocas comorbilidades. Tiene el riesgo de aumentar la morbilidad, incontinencia y disfunción eréctil ^{114,115}.

3-Crioterapia: involucre el uso de criopruebas en la próstata guidas por ultrasonido. Congela entre -100 a -200°C por 10 min. Tiene a su vez efectos secundarios, como incontinencia y retención urinaria, disfunción eréctil y dolor rectal ^{116–118}.

4-Radiacion: la terapia de radiación es considerada una de las más efectivas. Se requiere tanto a braquiterapia o rayo externo. Se basa en la transferencia de partículas o rayos de alta energía al directamente al tejido afectado, sin afectar el tejido normal. Es altamente utilizado en pacientes que no son adecuados para cirugía ¹¹⁹. Puede ser tanto braquiterapia (uso directo sobre la glándula prostática) o radiación externa (dirigida hacia la próstata) ^{120,121}.

5-Terapia con [²²³**Ra**]**Ra**: el cloruro de radio 223 (Xofigo) es utilizado en pacientes con CaP metastásico resistente a la terapia hormonal. Como ya se ha mencionada, al ser similar al calcio es absorbido en el tejido óseo, mejorando la sobrevida y recuperación del cáncer metastásico ¹⁰⁸.

6-Terapia hormonal: también conocida como terapia de deprivación de andrógenos. Es usada para tratar CaP avanzado u metastásico. Se basa en el bloqueo de la producción de testosterona principalmente, previniendo su efecto proliferativo sobre las células prostáticas. La disminución de estas hormonas androgénicas lleva a la inhibición del andrógeno y de su receptor. Para esto usualmente se administran análogos o antagonistas de la hormona LHRH o GnRH, llevando a una supresión de la testosterona. Algunos de los fármacos más usados

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 38

son leuprolide, goserlina, triptorelina e histrelina (agonistas LHRH). Si bien es de amplio uso, se asocia a efectos secundarios agudos, como ser hiperlipidemia, fatiga, osteoporosis, resistencia a insulina, anemia, disfunción cardiovascular y sexual ^{122–124}. Hablaremos más en profundidad de los mecanismos de esta hormona y sus análogos en la sección siguiente.

Otras opciones de tratamiento incluyen a la flutamida, un compuesto no esteroideo con actividad antiandrogénica. El tratamiento combinado de flutamida y agonistas del LHRH ha sido promisorio, si bien puede causar disfunción hepática. Su uso puede ser promisorio en pacientes con resistencia a la castración, sin metástasis ósea o aquellos que no han reaccionado a la terapia hormonal de primera línea ^{125–128}.

El acetato de clormadiona es un esteroide oral con actividad anticancerígena, que ha probado inhibir la progresión del CaP y también como tratamiento contra la hiperplasia benigna de próstata ^{129–131}.

7-Arbiraterona: actúa inhibiendo la síntesis de andrógenos por método de la inhibición irreversible de la CYP17A. Es utilizado en cáncer resistente a la castración metastásico. Sus efectos secundarios incluyen edema, hipertensión, fatiga e hipocalcemia ^{132,133}.

8-Inmunoterapias: Se basan en suprimir o estimular el Sistema inmune, usualmente de forma personalizada para el paciente. Sipuleucel-T (Provenge) es una vacuna designada para el tratamiento de CaP avanzado y metastásico, que ha desarrollado resistencia hormonal. Se utilizan las células inmunes del propio paciente y se activan *in vitro*, luego de lo cual son reinyectadas al paciente. Tiene pocos efectos secundarios: fiebre, nausea, dolor muscular ^{134,135}

9-Quimioterapia: se basa en el uso de drogas que inhiben o matan a las células cancerígenas. Las más utilizadas en CaP son: Docetaxel, Cabazitaxel y Enxulutamida^{136–139}

También existe la posibilidad de realizar terapias combinadas, en especial en lo referente al cáncer resistente a la castración. Cabe destacar que no hay drogas a la fecha para tratar el CaP resistente a la castración, siendo las terapias recomendadas capaces únicamente de aumentar la sobrevida del paciente. Por esto se ha llevado a estudiar las terapias combinadas

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 39

como posibles alternativas, principalmente las que involucran a la deprivación androgénica con otro tipo de terapia (radiación, quimioterapia, inmunoterapia)^{140–142}.

1.2.6 Rol de la Medicina Nuclear en CaP:

a)PET-CT:

Hay una variedad de radiofármacos dirigidos al diagnóstico de CaP por metodología de PET-CT, de los que vale destacar el escaneo del PSMA (*Prostate Specific Membrana Antigen*), utilizado para el diagnóstico y estadificación del CaP. Sin embargo, este receptor esta también sobreespresada en tejido no prostático y en otras condiciones patológicas, lo cual es una limitante en su uso. Según la literatura, cerca del 5-10% de los CaP primarios son PSMA negativos por inmunohistoquímica, a pesar de tener altos niveles de PSA. A pesar de que usualmente estas presentaciones se asocian con una mejor prognosis y menor recurrencia, son un reto en cuanto al diagnóstico debido a la existencia de falsos negativos por medio del PSMA-PET, lo cual estimula en la búsqueda de nuevos agentes de imagen para esta patología ^{143,144}. A la vez, el [¹⁸F]FDG PET/CT provee de poco valor en estadios iniciales del CaP, en especial por su baja absorción, especialmente al compararlo al PSMA, si bien en caso de recurrencia bioquímica su valor aumenta. Una lista de radiofármacos PET para el diagnóstico del CaP se encuentra en Tabla 3 del Anexo.

Cabe destacar que nuevamente, en Uruguay, el único centro que ofrece estos radiofármacos es el CUDIM, ofreciendo principalmente [¹⁸F]FDG, [¹¹C]Colina y [¹⁸F] y [⁶⁸Ga]-PSMA, y [¹⁸F]NAF ⁸¹.

b)SPECT CT:

En cuanto a los radiofármacos de SPECT, tenemos a su vez mayoritariamente a los basados en PSMA para su diagnóstico, si bien no son tan utilizados como los radiofármacos PET. En la Tabla 4 del Anexo se muestra una lista de estos.

Cabe destacar que nuevamente, nuestro país solo ofrece el centellograma óseo como único radiofármaco SPEC/CT a la fecha.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 40

2-LHRH:

2.1: Funciones endógenas del decapéptido LHRH:

En el año 1971 el grupo del Dr. Schally descubre la hormona liberadora de la hormona luteinizante, LHRH (o GnRH), la cual es un decapéptido con una secuencia pGlu1 -His2 - Trp3 -Ser4 -Tyr5 -Gly6 -Leu7 -Arg8 -Pro9 -Gly10 -NH2 (**Figura 10**)¹⁴⁵⁻¹⁴⁷.



Figura 10: Esquema del decapéptido LHRH.

Su función como hormona reproductiva fue elucidada poco tiempo después de su descubrimiento ¹⁴⁸. En resumen, la LHRH es sintetizada en un pequeño grupo de neuronas en la región hipotalámica septo-preóptical. Esta es secretada a la circulación hipofisaria portal, forma por la que llega a la pituitaria anterior para estimular la síntesis y liberación de dos gonadotropinas (LH y FSH) que regulan la secreción de esteroides gonadales (Ver **Figura 11**).



Figura 11: Esquema de eje hipófisis-hipotálamo, rol del LHRH. Modificado de *LH & FSH secretion inhibitors* ¹⁴⁹.

El gen codificante de la LHRH en humanos está localizado en el cromosoma 8p11.2-p21 y se compone de 4 exones y 3 intrones. La hormona inicialmente se produce como una preprohormona de 23 aminoácidos, que es luego procesada en neuronas secretoras, siendo liberada de forma pulsátil hacia la glándula pituitaria, uniéndose a su receptor (GnRH-R o LHRH-R). Cabe destacar que hay dos tipos de receptores para esta hormona (LHRH-R 1 y LHRH-R 2), si bien el primero es el más característico ya que debido a un *frameshift* y la presencia de un codón de stop prematuro en el gen del GnRh-R tipo II, la proteína receptora completa no es funcional en humanos, por lo que se asume que el GnRH-R tipo I es por el que se ejerce el efecto biológico, mediado por proteínas G unidas a receptor (GPCR) ¹⁵⁰.

Como ya fue mencionado anteriormente, el LHRH representa uno de los principales tratamientos farmacológicos en tumores hormono dependientes (mama, próstata, ovario), basado tanto en agonistas como antagonistas. La administración constante de agonistas lleva

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 42

a una desensibilización gradual de su receptor, y por lo consiguiente la supresión del eje hipotálamo-gonadal. Por su parte, los antagonistas causan una respuesta inmediata de supresión en el eje ^{151–153}.

Cabe destacar que el diseño de agonistas/antagonistas sigue ciertos criterios debido a que:

1-La vida media de la LHRH nativa es muy corta (2-5 min).

2-La degradación ocurre principalmente en el residuo de Glicina en la posición 6.

3-Tanto el extremo NH2 como el COOH son esenciales para la unión con el receptor.

4-El extremo NH2 terminal es crucial en la activación del receptor.

Por esto, es normal el cambio del residuo de Glicina 6 y Glicina 10 en la secuencia peptídica. El análogo más utilizado es el LHRH [D-Lys6], que une LHRH-R con alta afinidad ¹⁵⁴.

2.2 LHRH en cáncer:

Ha quedado en evidencia durante las últimas tres décadas, que los receptores de LHRH están sobreexpresados en diversos tejidos cancerígenos, ya sea del tejido reproductor (próstata, mama, ovario, endometrio) o no (melanoma, glioblastoma, pulmón). La unión de agonistas (Buserlina, Goserlina, Leuprolide, Naptelina, Triptoterlina) a estos receptores se ha asociado a un efecto antitumoral (antiproliferativo, anti metastásico y anti angiogénico) (Ver **Figura 12**)^{155–159}.



Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 43

Figura 12: A nivel pituitario, el LHRH se une a su receptor e inicia la síntesis y liberación de LH/FSH. En cambio, en cáncer, tanto el LHRH y sus análogos (agonistas y antagonistas) al unirse a su receptor activan efectos antitumorales (izquierda). Representación de las vías de señalización acopladas al LHRH-R en células cancerígenas (Derecha). Modificado de *Limonta et al*¹⁵⁴.

El efecto antitumoral en células esta mediado por la proteína G acoplada al receptor $G_{\alpha i}$, cuya activación inhibe la acumulación de cAMP. La cascada de MAPK también posee efectos antiproliferativo y proapoptóticos. A su vez, la activación del receptor contrarresta los efectos de los factores de crecimiento (EGF e IGF-1) (**Figura 12**). En tejido gonadal, en contraste, la vía principal activada por la unión del LHRH a su receptor parece ser la de la $G_{\alpha q}$ /fosfolipasa C ^{160–162}. Esta diferencia en las vías de activación se ha propuesto como causante de los diversos efectos en dichos tejidos. Se ha teorizado también la posibilidad de diversas conformaciones del LHRH-R, que puede llevar a un *binding* selectivo de los análogos y las distintas vías de señalización intracelular ^{163–165}.

En cuanto al efecto antiproliferativo, los agonistas del LHRH han demostrado tener un gran efecto *in vitro* e *in vitro* tanto en células cancerígenas humanas de próstata andrógeno dependientes (LnCap) como andrógeno independientes (Du-145, PC3), así como en cultivos primarios de carcinoma prostático ^{166–168}. A su vez, también inhiben el crecimiento de células de cáncer de mama, ya sea estrógeno dependiente (MCF-7), como independiente (MDA-MB-231), tanto *in vitro* como *in vivo* ^{157,169,170}. Se teorizan diversas causas que explican este efecto, como una reducción en la proliferación tumoral, detención del ciclo celular y un aumento de la apoptosis, si bien no se ha llegado a un consenso.

Por otro lado, se han demostrado los efectos antimetastásicos del agonista leuprolide en reducir la migración en células de cáncer de próstata resistentes a la castración al interferir con los efectos del IGF-I y modificando el citoesqueleto de actina y expresión de la integrina $\alpha\nu\beta3^{171}$. Resultados similares se encontraron *in vivo* en ratas ¹⁷². Se ha también demostrado el efecto que producen al afectar a moléculas involucradas en la adhesión celular y enzimas

que degradan la matriz extracelular ^{173–175}. Resultados similares se han obtenido en cáncer de mama ¹⁷⁶.

Por último, lugar, se examinó su efecto antiangiogéncio en primer lugar en el ovario. La activación del receptor parece reducir la neovascularización al disminuir la expresión de VEGF, angiopoietina 1 y sus receptores ¹⁷⁷. Un efecto similar se ha hallado en células de melanoma ¹⁷⁸.

Todo esto hace al LHRH-R un candidato molecular óptimo para estrategias de tratamiento (agonistas, antagonistas, citotoxicidad basada en agonistas, targeting de nanopartículas, etc.) e imagenología molecular en oncología (SPECT/CT, PET/CT).

2.3 Estrategias terapéuticas basadas en el LHRH:

La alta expresión del LHRH-R en tumores sumado a su despreciable expresión en tejidos normales, lo convierten en un buen candidato para terapias moleculares, por lo cual se han generado diversos sistemas capaces de llevar drogas al tumor (Ver **Figura 13**).



Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 45

Figura 13: Estrategias terapéuticas basada en el péptido LHRH en cáncer. Modificado de *Limonta et al*¹⁵⁴.

En primer lugar, se encuentran los agonistas. Representan la primera línea en terapia para tumores hormono dependientes, debido a su habilidad de suprimir el eje pituitario-gonadal. Presentan actividades antitumorales previamente descritas. Los principales agonistas usados (leuprolide, triptotrelina, buserlina, groserlina) han demostrado su efecto antiproliferativo y antimetastasico tanto *in vitro* como *in vivo* en células derivadas del tracto reproductor ^{155,157,158}. A su vez, son capaces de afectar a células de CaP andrógeno-independientes y tumores no relacionados con el tracto reproductor, tanto *in vitro* como en modelos preclínicos ¹⁵⁸.

Por otro lado, los antagonistas son capaces de unirse al receptor sin desencadenar la cascada de señalización intracelular. Se ha encontrado que estos compuestos poseen un efecto antitumoral de forma dosis-dependiente en células tumorales LHRH-R +. El Cetrorelix (tercera generación) es capaz de inhibir el crecimiento de células de CaP andrógeno independientes *in vitro* e *in vivo*, a la vez que disminuye su capacidad migratoria ^{175,179–181}. Se ha demostrado un efecto similar del cetrorelix y el leuprolide (agonista) sobre cultivos primarios provenientes de carcinoma prostático ¹⁶⁶. Este antagonista presenta un efecto similar en las células estrógenos-dependientes de cáncer de mama MCF-7 tanto *in vitro* como *in vivo* ^{182,183}. El LHRH-R también se encuentra expresado en células tumorales triples negativas, actuando los antagonistas con un efecto antiproliferativo y anti metastásico en líneas celulares de cáncer humanas triple negativas (MDA-MB-231) *in vivo* ^{176,184}.

A su vez, el efecto antitumoral del antagonista de cuarta generación ozarelix ha sido comprobado en las líneas celulares de CaP andrógeno-independientes Du-145 y PC3, siendo capaz de retardar el ciclo celular (acumulación en fase G2/M) a la vez que es capaz de activar vías apoptóticas (relacionada a TNF y activación de Fas); otros agonistas han expresado resultados similares *in vitro* ^{185,186}.

Le expresión del LHRH-R en CaP se correlaciona con la sobrevida del paciente ¹⁷⁴ ya que persiste luego del tratamiento con agonistas, lo que puede ser útil en caso de *switch* a

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 46

independencia androgénica. A su vez, se ha demostrado una disminución significativa en la expresión de PSA en pacientes expuestos a dos agonistas de LHRH en tratamientos sucesivos (agonista-progresión-re-*challenge* con segundo análogo)¹⁸⁷.

En resumen, se podría decir que:

1-Usados en tratamiento de tumores dependiente de esteroides, además de suprimir el eje hipófisis-pituitaria, los análogos del LHRH puede ejercer un efecto antitumoral directo.

2-El tratamiento con análogos del LHRH puede ser considerados en tumores que escapan de la dependencia hormonal (ej: CaP resistente a la castración).

3-Su uso puede también ser beneficiosos para tumores fuera del tracto reproductor.

Otras estrategias terapéuticas:

Como se muestra en la Figura 13, hay estrategias combinadas, como lo son:

-**Híbridos citotóxicos**: son una estrategia de terapia promisoria. El primero fue generado por el grupo de *Schally y col.* hace 25 años. Se unió agonistas de LHRH a agentes alcalinizantes como cisplatino y metotrexato. Luego se generaron mejores compuestos, uniendo LHRH [D-Lys6] a drogas como la doxorrubicina o su análogo 2-pyrolino-doxorubicina; donde se demostró internalización y acumulación de la droga en la célula. Su efecto ha sido comprobado tanto *in vitro* como *in vivo* en diversos modelos tumorales (CaP andrógeno dependiente -LnCap y MDA-PCa-2b- e independiente -C4-2-, así como en modelos de cáncer humano de endometrio, ovario y mama). Estos resultados promisorios han llevado al pasaje clínico de dicho compuesto tanto en mujeres con cánceres ginecológicos como en hombres con CaP resistente a la castración.

-Híbridos nutracéuticos: diversos fitoquímicos, como la curcumina han sido demostrados como antiproliferativos y antiapoptiticos en modelos de cáncer tanto *in vitro* como *in vivo*.

Recientemente, se ha demostrado la eficacia del compuesto LHRH [D-Lys6]-curcumina como antiproliferativo en células de cáncer de páncreas tanto *in vitro* como *in vivo*.

-Nanopartículas como vehículo de drogas anticancerígenas: se han generado diversas nanopartículas unidas a un análogo del LHRH, como ser polímeros Tax-PEG-LHRH, dendrímeros TAX-PAMAM-LHRH y liposomas TAX-DSPE-PEG-LHRH, tanto conteniendo drogas citotóxicas (paclitaxel) como agentes de imagen ópticos (Cy5.5) han demostrado efecto *in vivo* e *in vitro* en líneas de cáncer de pulmón humanas ¹⁵⁴.

2.4 LHRH Como agente de imagenología:

Por todo lo mencionado anteriormente, no es insólito pensar en la generación de agentes de imagenología molecular basados en el empleo del decapéptido LHRH para la visualización de neoplasias. En la última década, ha habido un amplio interés en este marcador como base de imagenología tanto PET como SPECT, demostrado en la **Tabla 2**.

Agente imagen	Usos	Referencias
[¹¹¹ In] In-DOTA-TRP-	Estudios de biodistribución en ratones portadores de	188
HYD	tumores 4T1 (mama) demostraron alta captación	
	tumoral (mayor 50% ID/g), unión específica a células	
	LnCap (CaP).	
[¹⁸ F]F-D-Lys6 -GnRH	Unión a células de CaP PC3, tanto in vitro como in vivo.	189
	Imagen PET/CT en ratones portadores de tumor	
	PC3(LHRH+) y SKBR-3 (LHRH-).	
D-Lys6(Ahx-[¹⁸ F]	Ensayos in vitro en líneas celulares EFO-27, LnCap, y	190
FBOA)-GnRH-I.	MDA-MB 231, ensayos in vivo en línea celular	
[⁶⁸ Ga]Ga-DOTA-	OVCAR-3.	
GnRH-I.		
[¹²⁵ I]I-Triptorelin		

 Tabla 2: Radiofármacos basados en LHRH.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 48

[^{99m} Tc]Tc-Acdien-	Unión significativa y selectiva de los compuestos a	191
LHRH,	línea 4T1 y MDA-MB-231 in vivo.	
[¹⁸⁶ Re]Re-Acdien-		
LHRH,		
[¹⁸⁶ Re]Re-Acdien-peg-		
LHRH		
[^{99m} Tc]Tc- HYNIC	Unión específica a células LnCap, PC3 y Du-145.	192
(tricina/ EDDA)-	Ensayos in vivo en ratones portadores de tumores	
Gaba-D-Lys6GnRH	LnCap presentan resultados promisorios tanto por	
	biodistribución como SPECT/CT.	
[^{99m} Tc]Tc-LHRH1	Expresión de LHRH-R en células cancerígenas,	193
	afinidad de radioligando por receptor, perfil de BD en	
	ratas normales.	
[^{99m} Tc] Tc-	Unión especifica a células LnCap y DU-145, ensayos in	194
(tricina/EDDA)-	vivo en ratones portadores de tumores LnCap	
HYNIC-Ahx-	(biodistribución y SPECT/CT) con resultados	
[DLys ⁶]GnRH	promisorios	
[¹⁷⁷ Lu]Lu-DOTA-	Biodistribuciones y SPECT/CT en tumores 4T1	195
TRPHYD	demostraron buen uptake y relación T/M. Respuesta al	
	tratamiento una vez inyectado el radiofármaco en el	
	tumor. Buen uptake en células LnCap	
[⁶⁸ Ga]Ga-DOTA-TRP	Biodistribuciones en ratones portadores de tumores 4T1	196
	presentan altas relaciones T/M.	
[¹¹¹ In]In-DTPA-	Buen perfil de biodistribución en ratas normales, alta	197
buserelina	unión a células MCF-7.	
[¹¹¹ In] In-DOTA-Ahx- Biodistribuciones y SPECT/CT de ratones con t		198
(D-Lys(6)-GnRH1) MDA-MB-231 con buenas relaciones T/M.		
[⁶⁸ Ga]Ga-DOTA-	[⁶⁸ Ga]Ga-DOTA- Alta unión a células MCF-7, MDA-MB-231 y T47D,	
Leuprolide buenas relaciones T/M en modelo MCF-7, unión		
	específica. Detección de tumores por PET/CT.	

[¹⁷⁷ Lu]Lu-DOTA-		
Leuprolide		
Al[¹⁸ F]F-NOTA-P-	Buenos resultados en modelos tumorales de PC3 y	200
GnRH	MDA-MB-231, buenas relaciones T/M.	

3. EGFRs:

Estos refieren a una familia de receptores de membrana ampliamente caracterizada, conocida como receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor* o EGFR por sus siglas en inglés) (Ver **Figura 14**).

En condiciones fisiológicas participan en procesos vitales para la viabilidad de los organismos multicelulares como son el desarrollo, diferenciación, migración y apoptosis celular. Cuatro genes homólogos codifican para los 4 receptores de crecimiento epidérmico EGFR/erbB-1, c-erbB-2/HER2, c-erbB3-/HER3 y c-erbB4/HER4. Todos los miembros presentan estructura y características muy similares. Son proteínas transmembrana con actividad tirosina quinasa intrínseca; contienen un dominio tirosina quinasa intracelular, un dominio transmembrana y un dominio extracelular glicosilado de unión a ligando ²⁰¹.



Figura 14: Esquema de la familia de receptores EGFR, con sus cuatro dominios (I-IV) marcados. La unión a su ligando se da entre los dominios I y III, mientras que los dominios II y IV se encargan de la dimerización. Esquema extraído de *Lemmon et al*²⁰²

3.1 Ligandos de la familia:

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 50

En mamíferos, los EGFRs son activados por una familia de péptidos, que por su especificidad se los puede dividir en 3 grupos. Uno de ellos incluye al EGF, al factor de crecimiento transformante α (TGF α) y a la amfiregulina; los cuales se unen a HER1. Un grupo distinto de ligandos incluye la betacelulina, el factor de crecimiento de unión a la heparina y a epiregulina, los cuales son capaces de unirse tanto al EGFR como a HER4. El tercer grupo está compuesto por las neuregulinas se unen a los receptores HER3 y HER4. HER2, en cambio, es conocido como el "receptor huérfano" por no unir con elevada afinidad ninguno de los ligandos antes mencionados²⁰³ (Ver **Figura 15**).



Figura 15: Receptores y ligandos de la familia de los EGFR. Extraído de *Cook et al*²⁰⁴.

3.2 Rol de los EGFRs en el Cáncer:

Los factores de crecimiento son conocidos por su rol en el crecimiento y supervivencia de los tumores a través de sus efectos en la mitogénesis, debido a que la activación de las vías de señalización relacionadas con los mismos tiene gran importancia en la carcinogénesis y progresión del cáncer. En diferentes tipos de cáncer los receptores HER están constitutivamente activados como resultado de la producción autocrina de ligando, sobreexpresión del receptor o mutación.

Más de un 30% de todos los tumores sólidos se ha demostrado que expresan EGFRs. Como ya se ha discutido previamente, en cáncer de mama específicamente; la amplificación y/o sobreexpresión de HER2 ha sido demostrada en el 30% de los casos y ha sido relacionada

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 51

con una biología tumoral más agresiva ²⁰⁵. A su vez HER3 se ha visto sobreexpresado junto con HER2 en cáncer de mama invasivo, aumentando sinérgicamente el potencial transformador de HER2 ²⁰⁶.

En cuanto al cáncer de próstata, HER 2 se encuentra expresado en aproximadamente el 20 % de muestras analizadas de cáncer de próstata (estudio que involucra 2,000 muestras, de tumores primarios y metástasis ²⁰⁷). Se ha visto que, en un ambiente androgénico disminuido, HER2 es capaz de promover la supervivencia celular, suprimir la apoptosis y aumentar la motilidad celular (**Figura 16**), por lo tanto, se lo ha asociado con una enfermedad más avanzada y la etapa del tumor ^{208,209}. Permite una supervivencia selectiva en las células HER2+, causando una progresión acelerada del tumor e independencia androgénica, generando resistencia a la terapia ^{210,211}. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (**Figura 17**) es otro miembro de la familia que también juega un papel esencial debido a su dimerización con HER2. La sobreexpresión de ambos receptores son aspectos importantes en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.



Figura 16: Proliferación celular mediada por la activación de EGFRs. La heterodimerización mediada por los receptores ErbB2/3 en respuesta a la unión a sus ligandos causa la

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 52

fosforilación de tirosina en ambos receptores. Esto a su vez recluta proteínas adaptadoras como PI3K, GRB2, PLCy o Jak; activando sus cascadas de señalización, las cuales convergen en la promoción celular y por tanto la proliferación tumoral. Modificado de *Lee et al*²¹².

Por lo tanto, HER2 representa un blanco adecuado para el tratamiento, diagnóstico u seguimiento de cáncer de próstata avanzado. Actualmente existen varias terapias en uso clínico capaces de suprimir la actividad de HER2 en las células tumorales ^{213,214}.

La imagenología molecular *in vivo* de la expresión de HER2 en cáncer de próstata avanzado podría contribuir a identificar a aquellos pacientes que podrían beneficiarse de la terapia anti-HER2 y ayudar en su posterior seguimiento luego de esta. Como ya se ha discutido anteriormente, existen en la actualidad muchos agentes de imagenología molecular basados en este mecanismo, si bien su uso es extendido únicamente al cáncer de mama.

3.3 Trastuzumab como ligando de HER2:

Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal (mAb) terapéutico aprobado capaz de unirse al dominio extracelular de HER2 inhibiendo su expresión ^{215–219}. En la actualidad se emplea exitosamente en clínica para el tratamiento de cáncer de mama HER2+. Trastuzumab se une al dominio IV del segmento extracelular del receptor HER2/neu ²²⁰; causando en las células un arresto celular durante la fase G1, disminuyendo la proliferación. Se teoriza que el anticuerpo no altera la expresión de HER2 pero *downregula* la activación de AKT. También se ha visto que suprime la angiogénesis tanto por inducción de factores antiangiogénicos como reprimiendo a factores proangiogénicos. Activa a la proteína p27 (supresor tumoral) ²²¹ e inhibe el clivaje del ectodominio del receptor en células de cáncer de mama (este clivaje está relacionado con el crecimiento tumoral) ²²² (**Figura 17**).

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 53



Figura 17: Mecanismos propuestos para la acción (a) y resistencia del Trastuzumab en células tumorales (b). Modificado de *Albanell et al*²²³.

Modelos *in vitro* han demostrado que, como segundo mecanismo de acción, al unirse al anticuerpo a su ligando, se dirige al sistema inmune hacia el sitio, logrando a su vez eliminar dichas células por medio de la citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC). Se teoriza que pude haber otros mecanismos haciendo efecto, a la vez que se han encontrado y estudiado mecanismos para su resistencia.

3.4: Trastuzumab en CaP:

Si bien la expresión de HER2 en CaP ha sido discutida y diversos porcentajes se manejan según el estudio y la técnica utilizada; se ha demostrado desde el año 2000 una expresión aumentada en casos de resistencia hormonal en esta patología ²²⁴; notando en especial en su capacidad, al ser utilizado como blanco, de inhibir la proliferación de líneas de CaP andrógeno-independientes ^{225,226}.

A su vez, se ha comprobado que, si bien la expresión de esta proteína en tumores primarios no tratados es de alrededor de 20%, una sobreexpresión del 80% se observan en CaP metastásico y 67% de tumores resistentes a la deprivación androgénica ²²⁷. Como ya fue

mencionado, se teoriza que su sobreexpresión puede estar asociada a la propia deprivación hormonal, a la vez que tiene un rol en la resistencia a la radiación ^{226,228}.

Se ha demostrado sobreexpresión de HER2 en la línea celular andrógeno independiente derivada de CaP PC3, en especial luego de la exposición a radiación, llevando a la resistencia a la terapia. La sumatoria del mAb al tratamiento lleva a una disminución significativa de la sobrevida de la línea *in vitro*. A su vez, la co-administración de un antagonista del receptor del péptido liberador de la gastrina (GRPR) marcado con ¹⁷⁷Lu y Trastuzumab llevan a un aumento en la sobrevida de tumores xerografiados con PC3 ^{229,230}.

Esto llevo a su uso en dichos pacientes en un entorno clínico, si bien los resultados del anticuerpo monoclonal por sí solo no fueron favorecedores ^{231,232}, y tratamientos combinados han dado resultados contradictorios ²³³. Cabe destacar que hay diferencias significativas según la técnica evaluada para la expresión de la proteína en tejido oncológico, una de las razones que dificulta el proceso ²³⁴. La medicina nuclear podría por lo tanto ser un campo vital capaz de aportar en esta disciplina.

Resultados de agentes de imagenología molecular ([¹¹¹In]In-CHX-A"DTPA-Trastuzumab y anti-HER2 ABY-025 Affibody) también han comprobado la presencia de HER2 en diversas líneas celulares de CaP (LnCap, Du-145 y PC3) *in vitro*, dando pie a la idea de utilizar esta molécula como agente de imagenología molecular para CaP ²³⁵.

En cuanto a tratamiento, resultados prometedores se obtuvieron con el agente terapéutico [²¹²Pb]Pb-Trastuzumab en ratones xenográficos PC3MM2, observándose la reducción del tumor un 60-80% luego del tratamiento con el radiofármaco ²³⁶. También se ha comprobado el efecto del [¹⁸⁸Re]Re-Trastuzumab, que exitosamente inhibe el crecimiento de las células tumorales de CaP Du-145 *in vitro* e *in vivo* en ratones xenografiados con esta línea andrógeno negativa ²³⁷.

4-Imagenología Molecular:

La imagenología molecular (IM) comprende la visualización, caracterización y medida de procesos biológicos a nivel molecular y celular en seres vivos.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 55

Es una técnica multidisciplinaria, que comprende la realización de imágenes en 2-3 dimensiones y su cuantificación temporal. Posee la ventaja de presentar una visión única y funcional del cuerpo humano y sus procesos biológicos y patológicos, imposible de lograr por otros métodos de imagen, sin recurrir a procedimientos invasivos (biopsias, cirugías)^{238–240}

Para esto se debe considerar 3 aspectos claves: trazadores, instrumentación y patología a evaluar (Ver Figura 18).



Figura 18: Esquema modificado de *Fass et al*²⁴¹. Notar la presencia de tres elementos claves: el marcador tumoral o **blanco** (receptor, enzima, ADN, etc.), el **vector** (anticuerpo, péptido, virus) y la **molécula señal** (fluoróforo, radioisótopo, cuantum dots). En la IM es clave la correcta ingeniería de un agente de imagen, considerando todos estos elementos para obtener una imagen exacta y de calidad.

A los **trazadores** los definimos como agentes de imagen moleculares (AI), altamente específicos, siendo empleados para visualizar/caracterizar/medir procesos biológicos en sistemas vivos. En Medicina Nuclear (MN) los trazadores empleados son sustancias asociadas a un radioisótopo, permitiendo realizar su seguimiento en el organismo. En cuanto a la imagenología óptica, los trazadores se asocian a una molécula fluorescente,

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 56

especialmente aquellas que emiten en el infrarrojo cercano a modo de evitar la interacción con los tejidos. Por su parte, la imagenología por Resonancia Magnética se basa en detectar el cambio en la dirección del eje de rotación de protones que se encuentran en el agua que compone los tejidos vivos. Por último, el ultrasonido se basa en el uso de ondas sonoras a alta frecuencia, de la cual se recibe su eco para generar imágenes (Figura 19).

En cuanto a la instrumentación, la MN ofrece imágenes de la distribución del trazador, mediante los equipos ya mencionados Single Photon Emission Computer Thomography (SPECT), Positron Emission Tomography (PET) y equipos híbridos (SPECT/CT y PET/CT) combinando información funcional (brindada por SPECT o PET) con la anatómica (brindada por la tomografía computada-CT), facilitando el diagnóstico de diversas patologías (Figura **19**). El mayor impacto clínico-oncológico en la actualidad se ha visto con la aplicación de [¹⁸F]FDG trazador del que ya hemos hablado, que permite visualizar el metabolismo glucídico, incrementado en la mayoría de los tumores, permitiendo su estadificación, si bien este es un campo en alto crecimiento en los últimos años.



Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 57

Figura 19: Esquema de las diversas modalidades empleadas en imagenología molecular. Modificado de Morato *et al*²⁴². Notar en cada una las ventajas y las desventajas, en especial en cuanto a resolución y costos. US=Ultrasonido. MR=Resonancia magnética.

Entre las modalidades PET y SPECT, cabe destacar la resolución espacial del PET es mejor (0.3-3 mm vs 1-4 mm), así como su resolución temporal (segundos a min vs min) y sensibilidad (10^{11} a 10^{12} mol/L vs 10^{10} a 10^{11} mol/L). EL SPECT, por su parte es beneficioso por su bajo costo, así como por la capacidad de utilizar distintos radiotrazadores en simultáneo ²⁴³.

Por su parte, la imagenología óptica requiere el empleo de una cámara acoplada a un dispositivo de carga (CCD) y un filtro de luz; también puede ser acoplada a información anatómica (CT) y ha sido altamente utilizada por su alta disponibilidad y facilidad de conjugación a trazadores.

En cuanto a la **patología** a estudiar, si bien la IM ha sido utilizada en diversos campos; ha habido un gran énfasis en procesos oncológicos. Otra de las razones del énfasis en la IM oncológica, es el posicionamiento del cáncer como una de las principales causas de mortalidad mundial, siendo una problemática de salud pública mundial, lo cual ya ha sido discutido en la sección 1.1.

Esto es debido a que posee un rol vital en el diagnóstico temprano -y a su vez su consecuente tratamiento- por lo cual el campo de investigación y desarrollo dentro de la búsqueda de nuevos agentes de imagen o técnicas capaces de distinguir una neoplasia de forma temprana y precisa, a modo de lograr una mejora en el tratamiento y progresión del paciente ²⁴⁴.

4.1 Principios básicos de SPECT:

En SPECT (*Single Photon Emission Computer Thomography* o Tomografía computarizada por emisión de fotón único) es una modalidad de imagen utilizada principalmente en medicina diagnóstica. Básicamente, produce una imagen tridimensional de la biodistribución de un radiotrazador, que se consigue por el uso de cámaras de medicina nuclear

especializadas. Permite estudiar la funcionalidad, perfusión y expresión de ciertas moléculas en tejidos ²⁴⁵.

Se emplean radionucleidos que decaen por medio de emisión de rayos γ únicos con distinta energía (Ver **Tabla 3**).

Nucléido	Vida media	Tipo emisión	Energía de fotón	Modo
			principal (keV)	generación
^{99m} Tc	6 h	Gamma	140	Generador
¹¹¹ In	67.2 h	Auger, gamma	245,171	Ciclotrón
¹²³ I	13.2 h	Auger, gamma	159	Ciclotrón
¹²⁵ I	60.1 días	Gamma	36	Ciclotrón
¹³¹ I	8 días	Gamma (81.2%), beta	284,364,637	Ciclotrón
⁶⁷ Ga	78.3 h	Gamma	93,184.6,300,393	Ciclotrón

Tabla 3: Radionucleidos de SPECT. Modificado de Bouziotis et al ²⁴⁶.

La técnica se basa en medir esta emisión de rayos gamma por medio de una o más gamma cámaras capaz de detectarlas, que rotan alrededor del paciente para lograr reconstruir los datos en forma de cortes. Debido a la necesidad de emplear un colimador (excluir fotones que inciden diagonalmente) esto lleva a una menor sensibilidad que el PET, si bien con nuevas tecnologías se ha logrado aumentar la resolución.

Las imágenes híbridas usando técnicas SPECT/CT permite la adquisición funcional (SPECT) y anatómica (CT) al mismo tiempo, lo cual ha aumentado ampliamente las sensibilidad y especificidad de la técnica. Estos equipos disminuyen el tiempo de adquisición, dan una atenuación correcta y co-registran imágenes.

Hay muchos equipos en el mercado con capacidades variables, según la capacidad del CT. Las cámaras de baja dosis son principalmente utilizadas para corrección de atenuación y localización anatómica. Son más baratas y se asocian a una menor dosis al paciente. Por otro lado, se encuentran las cámaras con *fu*ll capacidades CT, siendo capaces de realizar una angiografía por CT ²⁴⁷.

Es una técnica ampliamente usada para obtener imágenes moleculares de diversos procesos celulares. Se utiliza radionucleidos no tóxicos y sin efectos farmacológicos. La SPECT es una técnica poderosa que se ha usado para obtener la imagen molecular de varios procesos moleculares y celulares ^{248–250}. Las principales ventajas de SPECT son su alta sensibilidad y profundidad ilimitada de penetración; además de ser una técnica poco costosa y por lo tanto más ampliamente disponible comparada al PET.

La primera cámara comercial SPECT/CT combinada fue la GE Millenium hybrid SPECT/PET/CT (GE Helathcare Haifa, Israel). El grosor del *slice* era de 1cm y con una matriz de 256*256, con una resolución espacial de 3.5 mm. Hoy en día hay más sistemas en uso (Philips Healthcare, General Electric (GE) Healthcare, Mediso Medical Systems y Siemens Medical Solutions), todos con una unidad CT de alta resolución como parte del sistema SPECT/CT ²⁵¹, denotando la gran necesidad de mejoras y uso de esta técnica.

4.2 Principios básicos de PET:

El principio básico del PET (tomografía de emisión de positrones), se basa en registrar externamente por medio de detectores, la radiación emitida por un radiofármaco emisor de positrones (Ver **Tabla 4**) inyectado de forma intravenosa. El radiofármaco se distribuye de forma específica según su *target* y emite un positrón (un electrón cargado positivamente). Este luego interactúa con los electrones libres de los alrededores, y se produce un fenómeno de aniquilación, que resulta en una producción de dos fotones de 511 kEv, emitidos a 180°C.

Se puede estimar la distribución de la radioactividad, y la direccionalidad de la aniquilación provee de mecanismos para localizar el origen del fotón y por lo tanto localizar a nuestro radiotrazador dentro del organismo (Ver **Figura 20**)²⁵².



Figura 20: Esquema de aniquilación de un positrón (izquierda). Cuando se detectan dos interacciones simultaneas en el detector PET que rodea al paciente (derecha), se asume que la aniquilación se dio en el punto intermedio entre ambas interacciones ("línea de respuesta" o LOR). Extraído de *Omami et al*²⁵².

El escáner consiste en anillos de detectores, compuestos por cristales de germanato de bismuto alrededor del paciente, que miden fotones gamma provenientes de eventos de aniquilación cada 10-20 ns; la reacción de aniquilación sucede entre la línea que une ambos detectores ²⁵².

Nucléido	Vida media	Modo generación
¹¹ C	20.3 min	Ciclotrón
$^{18}\mathrm{F}$	110 min	Ciclotrón
¹³ N	10 min	Ciclotrón
¹⁵ O	122 segundos	Ciclotrón
⁶⁸ Ga	67.7 min	Generador

Tabla 4:	Radionucleidos	para PET:
	1 catalona e le la ob	para i Di.

4.3 Agentes de imagenología molecular:

Como ya fue mencionado, distintos agentes son utilizados para visualizar caracterizar y medir procesos biológicos en sistemas vivos; pudiendo ser tanto moléculas endógenas como exógenas. Un agente de imagen está compuesto por una molécula blanco y un componente de señalización. Su objetivo es informar sobre uno o más blancos específicos de interés en el estudio. El agente de imagen elegido deberá estar diseñado de forma tal que cumpla ciertas características, como ser: alta selectividad por el blanco de interés, farmacocinética adecuada, estabilidad *in vivo*, perfil de bioseguridad, síntesis en bajo tiempo y costo, potencial para su translación clínica y principalmente una relación unión específica versus no-específica alta, asegurando que la señal refleje el proceso/blanco de interés (Relación > 2- 3)²⁵³.

4.3.1 Anticuerpos monoclonales como agentes de imagen:

Los anticuerpos monoclonales (AcMo o mAb) son moléculas de alto peso molecular (150 kDa) altamente específicas. A diferencia de los péptidos, no están restringidos en su capacidad para unirse a diversas moléculas ²⁵⁴. Gracias a su elevada afinidad y especificidad al unirse a su objetivo, estos son herramientas cruciales en terapias y diagnósticos. Actualmente, la FDA ha aprobado 20 de ellos como agentes terapéuticos y más de 8 como radiomarcadores para SPECT en imagenología.

El uso de estos anticuerpos como agentes de imagen dirigidos a antígenos asociados al tumor ha sido objeto de intensa investigación ²⁵⁵. Sin embargo, un desafío en este ámbito es lograr una alta acumulación del anticuerpo en el sitio tumoral. Esto se debe a la lenta depuración sanguínea y tisular no específica, así como a la significativa captación hepática mediada por receptores Fc en hepatocitos. Esta captación hepática dificulta la eficiente detección de metástasis hepáticas, que son bastante comunes

En un inicio, estos radiotrazadores estaban limitados por diversos factores, como ser su origen murino, la persistencia en suero, que retrasaba la obtención de la imagen, selección sub optima de targets y los límites de detección y sensibilidad de la técnica; lo cual explican su fracaso en la clínica ²⁵⁶. Sin embargo, este campo ha resurgido en la última década, debido

a avances técnicos y científicos, como ser *targets* moleculares del cáncer y su función dentro de la patología, así como la heterogeneidad tumoral ^{257,258}.

Cabe destacar que la fortaleza de la imagenología molecular depende de la alta especificidad y afinidad que tenga el trazador por la molécula de interés; lo que hace a los anticuerpos como candidatos óptimos y naturales para la generación de agentes de imagenología molecular no invasiva en cáncer.

Los avances en ingeniería de proteínas son los que hacen posibles a la fecha el desarrollo de anticuerpos radiomarcados, algunos requerimientos, como ser: origen humano o humanizado, garantizando la baja inmunidad y la dosis repetida; capacidad de generar moléculas bivalentes para mejor retención en tejido blanco; biológicamente inertes; rápida cinética *in vivo (targeting y clearance)*; conjugación sitio específica; preferiblemente no glicosilados; producción eficiente en entorno GMP; estabilidad en suero²⁵⁹.

Cabe destacar que hoy en día, puede realizarse una producción de anticuerpos con inmunogenicidad mínima, debido a técnicas como la humanización de anticuerpos murinos, la producción por tecnologías de *display* (fagos, levaduras, *in vitro*) o incluso ratones transgénicos.

Las principales ventajas de desarrollar agentes de imagen basados en anticuerpos frente a pequeñas moléculas son, principalmente que los anticuerpos son estructural y bioquímicamente muy similares, lo cual hace que realizar métodos estandarizados de conjugación y radiomarcado fáciles de establecer y optimizar, y pueden ser aplicados a cualquier anticuerpo. En segundo lugar, debido a su gran tamaño en comparación con un átomo radioactivo u otro *tag*, sus capacidades de *binding* pueden ser mantenidas *in vivo*, lo cual no es necesariamente siempre cierto con moléculas pequeñas, ya que un pequeño cambio de un simple átomo o grupo funcional puede alterar su unión, especificidad e incluso metabolismo ²⁵⁹.

4.3.2 Péptidos como agentes de imagen:

Los péptidos constituyen una categoría fundamental de agentes en imagen molecular ²⁶⁰. Estos son compuestos pequeños que contienen aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 63

Naturalmente, se producen con el propósito de estimular, regular o inhibir diversas funciones biológicas, actuando principalmente como transmisores de información y coordinadores de actividades en varios tejidos del organismo ²⁶¹.

La síntesis en fase sólida de péptidos y el uso de librerías de fagos han facilitado la producción y selección de péptidos altamente afines a distintos blancos. Esta facilidad de producción, junto con su química de coordinación sencilla, ha contribuido a su amplio uso como agentes de imagen molecular. Los péptidos, con tamaños pequeños (7 - 15 aminoácidos), son fácilmente modificables y se metabolizan rápidamente. Su principal ventaja radica en la alta selectividad, especificidad y flexibilidad en cuanto a modificaciones químicas, sin afectar sus propiedades de unión o cinética.

Aunque generalmente tienen una afinidad menor en comparación con los anticuerpos, ofrecen mayor estabilidad a temperatura ambiente y mejor capacidad de penetración en tejidos y tumores debido a su reducido tamaño ²⁶². Además, presentan menos probabilidad de causar efectos inmunológicos en comparación con los anticuerpos, y su producción es más económica.

No obstante, su empleo como agentes de imagen molecular tiene la desventaja de ser propenso a una rápida degradación proteolítica *in vivo* y poseer una corta semivida plasmática. Para aumentar la estabilidad de los péptidos, se pueden emplear diversas técnicas, como la introducción de un D-aminoácido apropiado en su cadena polipeptídica o la ciclación de los extremos NH2 con COOH, entre otras.

Como ya hemos discutido, la imagenología molecular es una técnica indispensable en el diagnostico actual, por su alta especificidad y capacidad de brindar información biológica a nivel molecular en sistemas vivos. Para esto, se ha invertido en investigar y diseñar sondas moleculares altamente sensibles y específicas. Esto ha mejorado la performance de las modalidades de imágenes, en especial la presencia de péptidos y hormonas peptídicas como agentes de imagen ^{263,264}.

Los avances en distintas tecnologías (*phage display*, química de péptido, síntesis *in vitro*) ha llevado a diversas estrategias para el diseño de péptidos como drogas, pudiendo identificar

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 64

una variedad de librerías bioactivas de ligandos peptídicos y sustratos. A la fecha existen péptidos capaces de marcar diversos receptores y procesos, como ser angiogénesis y la apoptosis, con una alta especificidad (nanomolar) y baja toxicidad. Su síntesis es sencilla, pueden ser modificados para optimizar su unión y estabilidad, vida media y permeabilidad. Los procesos de síntesis son fáciles de escalar y producen resultados con estructuras claramente definidas. Comparado con proteínas y anticuerpos, tiene una farmacocinética favorable y distribución de tejido, teniendo un *clearanc*e rápido de sangre y tejidos no blancos. Algunos tienen buena permeabilidad, pudiendo acceder rápidamente al tejido blanco. Tienen baja toxicidad e inmunogenicidad.

Es vital tener en cuenta que la estructura 3D de la cadena polipeptídica está finamente relacionada con su función biológica, por lo cual las modificaciones a los mismos deben ser cuidadosamente consideradas para no interferir con la función biológica del mismo. Por esto es común incorporar un *linker* entre el sitio activo y el motivo de imagen.

Los péptidos pueden ser marcados de forma directa o indirecta con diversas moléculas señales según la modalidad, por ejemplo, radioisótopos (^{99m}Tc, ¹⁸F, ⁶⁴Cu, ¹¹¹In, ¹²³I, ⁶⁸Ga) para PET y SPECT, fluoróforos para el infrarrojo cercano (NIR) u dots cuánticos (QDs) para imagen óptica y nanopartículas magnéticas para MRI, por medio de linkers orgánicos, macrociclos o quelantes, polímeros y nanoplataformas.

La nueva sonda creada debería tener alto uptake *in vivo* y retención en el tejido blanco, con bajo background y sin unión a tejidos no blancos. Deberían ser seguras y fáciles de preparar. Todo esto ha llevado la validación preclínica e investigación clínica de distintas sondas basadas en estas moléculas ²⁶⁵.

Algunos péptidos identificados y caracterizados para imagenología molecular han sido: somatostatina (SST), péptido liberador de la gastrina (GRPR), colecistoquina (CCK), hormona melanocito estimulante (α -MSH) y péptido similar al glucagón-1 (GLP-1)²⁶⁵.

5-Radiofármacos:

Un radiofármaco es una sustancia química definida, que contiene átomos radiactivos en su estructura, y que, por su forma farmacéutica y tipo de radiación, son aptos para ser

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 65

administrados en seres humanos con fines de diagnóstico o terapia ²⁶⁶. Según sus aplicaciones en Medicina Nuclear se los puede clasificar en radiofármacos de diagnóstico o terapia ^{267,268}. En medicina nuclear, aproximadamente el 95% de los radiofármacos son usados para fines de diagnóstico.

En general, un radiofármaco consta de dos partes bien diferenciadas: la molécula soporte a la que se une el radionucleido y que condiciona la ruta metabólica del radiofármaco dentro del organismo y el radionucleido propiamente dicho que emite radiación, permitiendo así la detección externa del radiofármaco y la valoración del proceso estudiado cualitativa y/o cuantitativamente. La mayoría son compuestos orgánicos o inorgánicos con composición definida, también pueden usarse anticuerpos monoclonales o sus fragmentos

5.1 Radiofármacos de diagnóstico:

Los radiofármacos para diagnóstico son administrados con el fin de lograr visualizar la anatomía de un órgano o sistema; evaluar el comportamiento fisiopatológico a nivel de un tejido u analizar el comportamiento bioquímico (a través de su metabolismo) para determinar cuantitativamente sus parámetros farmacocinéticos.

Son usualmente marcados con un radionucleido emisor gamma para imágenes SPECT o con un isótopo emisor de positrones para PET. Son utilizadas a muy bajas concentraciones ($10^{-6} - 10^{-8}$ M) para que no posean efectos farmacológicos. Tienen como objetivo brindar una descripción funcional de órganos y tejidos, así como de funciones fisiológicas por medio de su acumulación en un tejido blanco específico. Pueden ser tanto complejos orgánicos (como el ya mencionado [18 F]FDG, como complejos metálicos (99m Tc, 68 Ga, etc.) unidos a un agente quelante orgánico (DOTA, NOTA, HYNIC, etc.). Deben tener ciertas características intrínsecas, como ser un modo de decaimiento y energía apropiada (Ej.: gamma puros), período de semidesintegraciones (corto para minimizar dosis recibida por el paciente, pero compatible para la farmacocinética del radiofármaco) y propiedades químicas (síntesis versátil, relación blanco/no blanco lo mayor posible) 269 .

5.1.1 Tecnecio-99m:

El tecnecio, elemento 43 en la tabla periódica, es un metal perteneciente a la segunda serie de transición y al grupo VII B. Se encuentra situado entre los elementos Manganeso y Renio, compartiendo propiedades comunes con estos últimos, especialmente con el Renio. El tecnecio cuenta con 21 isótopos, desde el ⁹⁰Tc (con una semivida de 2.6 x 10⁶ años) hasta el ¹¹⁰Tc (con una semivida de 0.86 segundos), todos los cuales son radiactivos. Sin embargo, en el ámbito médico, la aplicación principal se centra en el uso del ^{99m}Tc debido a sus características particulares ²⁶⁶:

-Fácil obtención (a partir generador de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc).

 $-t_{1/2}$ corto (6.04 h, óptimo para preparar el radiofármaco, administrar y realizar imagen del paciente).

-Decaimiento por transición isométrica; por emisión de un fotón gamma de baja energía (140 Kev) al ⁹⁹Tc estable; presentando esta energía una adecuada penetración en los tejidos, y una alta eficiencia de detección (**Figura 21**).



Figura 21: Esquema de decaimiento de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc. Extraído de Abram et al ²⁷⁰.

-Facilidad para acomplejar a distintas moléculas.

La configuración electrónica del átomo neutro es [Kr 5s1], lo que indica que los orbitales 4d y 5s contribuyen a producir diversos estados de oxidación, los cuales varían desde -1 a +7, siendo los más estables el estado +7 (TcO₄ -) y +4 (TcO₂). Presenta un índice de coordinación de 4 a 9 y tiene la capacidad de formar complejos de coordinación, donde el metal (deficiente en electrones) actúa como aceptor de grupos donadores. En solución acuosa, el ^{99m}Tc está presente en su forma más estable como anión pertecneciato, [^{99m}Tc]TcO4-. Ya que el tamaño y la carga son similares a las del I-, la biodistribuciones del [^{99m}Tc]TcO4- es similar a la observada para dicho anión (acumulación en tiroides).

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 67

Como se observa en la **Figura 21**, el ^{99m}Tc es producto del decaimiento del ⁹⁹Mo ($t_{1/2} = 66$ h, β -), y es obtenido a partir de generador. Un generador ⁹⁹Mo/^{99m}Tc está basado en la adsorción del radionucleido padre (⁹⁹Mo) en una columna de alúmina, mientras que el ^{99m}Tc se obtiene en forma de [^{99m}Tc]TcO₄ - (estado de oxidación +7) por elución de la columna con una solución salina, encontrando de esta forma al ^{99m}Tc en forma de una solución estéril, apirógena y libre de portador (Ver **Figura 22**) ²⁶⁶.

La producción comercial de los generadores de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc se realiza mediante fisión nuclear de ²³⁵U o por irradiación neutrónica del ⁹⁸Mo. El suministro de ^{99m}Tc a través del generador garantiza una disponibilidad continua y económica del radionucleido en servicios de Medicina Nuclear. No obstante, debido a la estabilidad y baja reactividad del anión pertecneciato, este no puede ser directamente incorporado a una molécula, por lo cual es necesario reducir su estado de oxidación a modo de aumentar su reactividad química ²⁷¹.

Por consiguiente, la mayoría de los radiofármacos de ^{99m}Tc se producen por reducción del Tc (VII) a estados de oxidación menores (+3 - +5), pudiendo entonces unirse a una gran cantidad de molécula tanto orgánicas como inorgánicas, formando complejos de coordinación ²⁶⁷. Para acomplejarlo a distintas moléculas usualmente se utilizan agentes bifuncionales como lo es el Ácido Hidrazininicotínico (HYNIC).



Figura 22: Generador ⁹⁹Mo/^{99m}Tc. Extraído de *Camacho* ²⁵³.

Como se comentó anteriormente, es necesario el uso de agentes reductores, como puede ser acido ascórbico y, principalmente, ion estannoso (Sn^{2+}) , ya que presenta baja toxicidad, buen

poder reductor y buen rendimiento de marcación. A su vez, su puede encontrar de diversas formas químicas (cloruro, fluoruro, citrato, etc.).

En medio ácido produce la siguiente reacción:

$2 [^{99m}Tc]TcO_4^+ + 16 H^+ + 3 Sn^{2+} \rightarrow 2 [^{99m}Tc]TcO_4^+ + 3 Sn^{4+} + 8 H2O$

Esta reacción es reversible, para que el Tc reducido se mantenga estable en solución en estado de oxidación IV es necesario la agregación de un agente acomplejante.

Cabe destacar que luego de la reacción de reducción, puede haber presente una mezcla de Tc en distintos estados de oxidación (III-V), dependiendo de las condiciones de reacción la proporción de cada uno. Es importante determinar estas especies reducidas presentes en solución acuosa ya que forman las impurezas de nuestro radiomarcado: la especie $TcO_2 + se$ encuentra a pH menores a 1.2; mientras que al elevarse el pH se une un grupo OH-, estabilizándose la especie TcO (OH)+ a pH entre 1.5- 2. A valores superiores a 2 se forma la molécula neutra TcO2-.

> Sn²⁺ ligando Tc (VII) → Tc (V), Tc (IV), Tc (III) →complejo Tc(V), Tc(IV), Tc(III) ↓ hidrólisis TcO₂.H₂O (Tc reducido-hidrolizado)

Las especies hidrolizadas del Tc (TcO² óxido hidratado) son características por la formación de un coloide insoluble, disminuyendo el rendimiento del marcado e interfiriendo en procesos diagnósticos, por lo cual es necesario disminuir estas especies lo más posible, habiendo en el preparado final 3 especies a considerar en cuanto al control de calidad: ^{99m}Tc libre (en la forma de [^{99m}Tc]TcO₄-), no reducido por el agente reductor , ^{99m}Tc reducido que no reaccionó con el agente ligando y se encuentra como [^{99m}Tc]TcO₂.H₂O y compuesto de interés marcado con ^{99m}Tc.

5.1.2 Radiofármacos de ^{99m}Tc:

Podemos dividir a los radiofármacos de ^{99m}Tc en tres generaciones:

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 69

- Primera generación: el ^{99m}Tc cumple únicamente la función de radiotrazador, la distribución normal se encuentra inalterada por la inclusión del radionucleido. Son usados para funciones básicas e inespecíficas. Se formulan en viales estériles con componentes liofilizados (SnCl₂ como agente reductor, por ejemplo) que se reconstituye con el agregado de pertenciato. Ej.: Pirofosfato (estudios óseos), azufre coloidal (hepáticos)
- 2. Segunda generación: surgieron en los 1980's, siendo resultado del desarrollo del campo de la química y la inorgánica, siendo compuesto de coordinación bien caracterizados, donde un metal (Tc) se une en una geometría definida a un ligando. Su biodistribución y captación se determina por propiedades fisicoquímicas (carga, peso molecular, geometría espacial, lipofilia). Toman en cuenta la relación estructura -actividad para su uso. ej.: radiotrazadores para perfusión cerebral, miocardio. De estos surge la idea del "Agente quelante bifuncional" -ligandos que quelan al metal y que pueden, mediante otro grupo funcional unirse a otra molécula con actividad biológica.
- Tercera generación: son blancos específicos (receptores, enzimas), se componen de 3 partes: un metal, un agente quelante o ligando bifuncional y un fragmento bioactivo (anticuerpo, péptido, proteína, etc.), localizándose el agente bifuncional entre el metal y el fragmento bioactivo ²⁷².

5.1.3 Estrategias de marcación con ^{99m}Tc:

-Marcación Directa: Utilizada principalmente para proteínas, se basa en proveer grupos sulfuros reactivos a ser marcados con Tc. Se basa en reducir los puentes disulfuros nativos (interacciones cisteína-cisteína), incubando con iones estaño u otros agentes reductores (como 2-beter mercatpoetanol) (un 5%). La proteína reducida es luego purificada del exceso de reductor por una columna SEC y marcada con una alta eficiencia por transquelación (>90%) de ^{99m}Tc desde [^{99m}Tc]Tc-GHA o [^{99m}Tc]Tc-MDP, los cuales los preparados a partir de kits comerciales.

También existe el llamado enfoque integrado: Se basa en reemplazar un fragmento del ligando por un quelante no natural, intentando general las menores alteraciones posibles. El

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 70

metal representa una parte importante del motivo de unión, por lo cual la afinidad esta usualmente alterada.

Marcación indirecta: Hay diversos enfoques, como ser;

i) Agentes Bifuncionales: Como ya fue previamente mencionado, esta clase de agentes cumplen con tener un sitio de coordinación al metal y un dominio que permite unir de forma covalente la biomolécula (**Figura 23**). Se puede acoplar la molécula por dos estrategias:



Figura 23: Esquema de un agente quelante bifuncional para el marcado de moléculas bioactivas. Extraído de *Fernandez et al*²⁷³.

-Pre-conjugación: el radiometal se coordina al agente quelante, previo al paso de coordinación con la biomolécula. Permite una química de marcación bien definida, si bien usualmente requiere un paso de purificación. Es por lo general un método de múltiples etapas, lo que no lo hace óptimo para la práctica clínica.

-Post conjugación: El agente quelante se une en un primer paso a la biomolécula, y posteriormente se introduce el radiometal. Este método es más adecuado para la práctica clínica ya que permite la formulación de kits, donde el vial de marcación sólo precisa la solución con el radiometal y condiciones para generar el radiofármaco.

5.1.4 HYNIC como agente quelante bifuncional:

El grupo 6-hidrazinonicotinil o HYNIC (**Figura 23**) es un agente quelante ampliamente utilizado en medicina nuclear como agente bifuncional; este es un derivado azaheterocíclico

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 71

de 6-Hidrazinopiridina cuya reacción consiste en la formación de un complejo biomoléculaagente bifuncional, que luego es marcado directamente con [^{99m}Tc]TcO₄-, en presencia de un agente reductor (generalmente SnCl_{2.}2H₂O) y un coligando (Tricina, EDDA y acido nicotínico (NA) entre otros) ²⁷⁴. Las ventajas de utilizar HYNIC como agente bifuncional son su alta eficiencia de marcado y el hecho de que se pueden lograr altas actividades específicas.

Estudios llevados a cabo hasta el momento proponen que HYNIC actuaría como un ligando monodentado (coordinación con el átomo de N del grupo hidrazina) y/o bidentado (coordinación con los átomos de N del grupo hidrazina y anillo de piridina), siendo en ambos casos el resto de los sitios de coordinación ocupados por los átomos provenientes del co-ligando ²⁷⁵. Esto generalmente resulta en la formación de una mezcla de complejos de coordinación junto al co-ligando apropiado, mediante la formación de mezcla de isómeros.

HYNIC tiene la capacidad de coordinar el metal a través del átomo de nitrógeno en el anillo de piridina y/o el átomo de nitrógeno en el grupo hidrazino. Sin embargo, para completar la esfera de coordinación del tecnecio, se requiere el uso de coligandos adicionales, algunos de los cuales se presentan en la **Figura 24**. Dichos coligandos permiten ajustar propiedades, como ser la hidrofilicidad y la farmacocinética del compuesto. La utilización de diferentes coligados confiere versatilidad a los complejos diseñados, pero conlleva la desventaja de generar cierta incertidumbre al determinar la estructura de la esfera de coordinación y optimizar los complejos, ya que suele resultar en la formación de una mezcla de complejos de coordinación, dando lugar a una variedad de isómeros.


Figura 24: Uso de HYNIC como agente quelante bifuncional. Representación de la reacción de marcado y distintas estructuras para los radioconjugados formados utilizando tricina como coligando (arriba). Co-ligandos más utilizados para la marcación de HYNIC con ^{99m}Tc: a) Tricina; b) EDDA; c) derivado hidrosoluble de trifenilfosfina; d) ácido nicotínico (abajo). Extraído de *Camacho* ²⁵³.

5.2 Galio 68:

Es uno de los emisores de positrones metálicos más utilizados en la Medicina Nuclear, con un periodo de semidesintegración de 68 min y una Energía máxima de emisión de 1899 keV, decayendo al ⁶⁸Zn (estable). También posee una emisión gamma de baja abundancia 3.22 % de 1077 keV (Ver **Figura 25**).

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 73



Figura 25: Esquema de decaimiento de ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga. Extraído *de Marganiec-Galazka et al* ²⁷⁶.

Similar al ^{99m}Tc, se obtiene a partir de un generador de ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga bajo la forma de [⁶⁸Ga]GaCl₃. Dicho sistema contiene al radionucleido padre ⁶⁸Ge (tiempo semideintegracion 271 días) absorbido a una columna cromatográfica. Este decae mediante captura electrónica al radionucleido hijo ⁶⁸Ga, el cual puede ser eluido repetidamente durante el día, disponiendo del 94% de la actividad máxima posible cada 4 h.

La vida útil de un generador depende tanto de la marca como de la actividad inicial del mismo, pudiendo ser de 6 meses hasta 2 años según su fin (clínico o investigación). Se utiliza por lo general ácido clorhídrico como eluyente, en molaridades bajas (0.1-0.05 M), por lo cual son usualmente seguros desde un punto de vista microbiológico ^{277–279}.

5.2.1 Marcación con ⁶⁸Ga:

En solución acuosa, el estado de oxidación más estable del ⁶⁸Ga es +3, presentándose bajo la forma de catión libre hidratado en condiciones ácidas (pH< 3). A pH 3-7, se puede producir la precipitación del coloide [⁶⁸Ga]Ga(OH)₃, mientras que a pH mayores a 7 se redisuelve como [[⁶⁸Ga]Ga(OH)₄] ²⁸⁰.

Es importante destacar que existen otras impurezas en el eluido a ser consideradas, principalmente la presencia del ion metálico Fe^{3+} , que por su similitud con el [⁶⁸Ga]Ga³⁺ en cuanto a química de coordinación, puede actuar como competidor en el proceso de marcado;

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 74

por lo cual se debe evitar la presencia de metales durante la marcación, debido a esto el uso de materiales plásticos es vital.

Como ya se mencionó anteriormente, es también de vital importancia el ajuste del pH, tanto para desprotonar átomos donadores de electrones como para mantener el galio en solución. Se debe optimizar la mezcla de buffer (ej: acetato de sodio, apto para uso en radiofarmacia) y ajustar el pH para lograr un radiofármaco de alta pureza ²⁸¹.

El ⁶⁸Ga puede formar complejos con distintos quelantes, utilizando 4-6 posiciones de coordinación. Los más estables son con ligando hexadentados, que poseen átomos donadores de electrones (O, N, S), funcionado como agentes quelantes bifuncionales (Ver **Figura 25**).

5.2.3 Radiofármacos de ⁶⁸Ga:

El ⁶⁸Ga es uno de los principales radiofármacos usados para imagenología PET en el mundo. Como ya se ha comentado, su producción a partir de un generador, siendo independiente del ciclotrón, facilita y economiza su uso. Una variedad de radiofármacos basados en este radionucleido se encuentra comercialmente presentes, como ser para tumores neuroendocrinos ([⁶⁸Ga]Ga-DOTA-TATE, [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-TOC, [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-NOC, [⁶⁸Ga]Ga-NOTAGA-TOC), cáncer de próstata (en especial ligandos de PSMA, como [⁶⁸Ga]Ga-HBED-CC), contra integrinas ([⁶⁸Ga]Ga-TRAP(RGD)3), contra receptores de quimioquinas CXCR4, etc. Algunos de estos ligandos se comentan más específicamente en las **Tablas 1 y 3 del Anexo**.

No es de sorprender, que este sigue siendo un campo en crecimiento y que la necesidad de nuevos radiofármacos basados en dicho radionucleido es de alta utilidad para la salud. Cabe destacar que el ⁶⁸Ga es uno de los radionucleidos que posee localmente el CUDIM para generar radiofáramcos PET en Uruguay.

5.2.4 DOTA como agente quelante Bifuncional:

El ácido tetraacético 1, 4, 7,10-tetra-azacyclododecane –N, N', N", N''' (DOTA), es un agente quelante caracterizado por una estructura cíclica de 12 átomos que contiene un anillo quelante y 4 grupos acéticos carboxílicos (**Figura 26**). La formación de derivados a partir de

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 75

sus átomos de C o N produce un complejo capaz de unirse a proteínas y a radionucleidos metálicos, formando complejos fuertes y estables con un índice de coordinación de 8.



Figura 26: Estructura de diversos agentes quelantes bifuncionales para el Galio. Macrociclos (arriba) y acíclicos (abajo). Notar el DOTA. Extraído de *Lewis et at*²⁸².

Existen tres enfoques para unir una biomolécula a un agente bifuncional. En el primer enfoque, la unión de la biomolécula blanco es a través de un átomo de carbono del macrociclo. En el segundo enfoque, la biomolécula blanca es unida a uno o a los cuatro grupos acéticos carboxílicos. En ambos casos la conjugación no conlleva un cambio en la estabilidad de la molécula. En el tercer enfoque, la biomolécula blanca es conjugada a uno o a los cuatro grupos acéticos carboxílicos vía un enlace amida CO-NH.

La estabilidad de los complejos formados entre iones metálicos y el DOTA ha sido ampliamente estudiada ^{283,284}. Las ventajas principales de uso de DOTA es la cinética inerte y la alta estabilidad termodinámica para la quelación de lantánidos. Sin embargo, su cinética del radiomarcado es normalmente muy lenta y dependiente de las condiciones de marcación, incluyendo la concentración del complejo DOTA-Biomolécula, del pH, de la temperatura de reacción y del tiempo de calentamiento, de los buffer utilizados y su concentración; y de la presencia de otros iones metálicos, tales como Zn (II) y Fe(III). A temperatura ambiente, las purezas radioquímicas del conjugado DOTA-Biomolécula son muy bajas. Por ello, es

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 76

necesario el calentamiento a elevadas temperaturas (próximas a 50°C o mayores) para lograr una marcación exitosa. Para pequeños péptidos, la marcación a elevadas temperaturas no causa una degradación significativa del conjugado marcado, pero para anticuerpos monoclonales, sin embargo, la marcación a elevadas temperaturas a menudo causa una significativa pérdida de la inmnunoreactividad del conjugado marcado. A pesar de la alta estabilidad en solución de los complejos formados, una lenta cinética de marcación es el mayor obstáculo del amplio uso de DOTA como agente bifuncional en el desarrollo de radiofármacos terapéuticos. A pesar de ello el agente DOTA se ha utilizado ampliamente y por su alta estabilidad *in vivo* lo hace un agente atractivo para aplicaciones tanto en SPECT como en PET ^{285–287}. Tener en cuenta que una vez obtenida la conjugación estable con el agente bifuncional DOTA, este, por su fácil química de coordinación permite la unión a diversos radionucleidos (Ej. par teragnóstico ⁶⁸Ga, /¹⁷⁷Lu).

2-Objetivos

2.1: Objetivo general:

El presente trabajo tiene como objetivo el desarrollo y evaluación de dos análogos del decapéptido LHRH, LHRH(D-Lys6) marcado con ^{99m}Tc (vía HYNIC) y ⁶⁸Ga (vía DOTA), y del anticuerpo Trastuzumab marcado con ^{99m}Tc (vía HYNIC) como agentes de imagenología molecular para el diagnóstico y seguimiento de cáncer de mama y próstata.

2.2: Objetivos específicos:

1-Derivatizar las distintas biomoléculas con el agente quelante hidrazinonicotinoato de succinimidilo (HYNIC) y 1, 4, 7,10-tetraazociclodecano-1, 4,7, 10 ácido acético (DOTA) y marcarlas con ^{99m}Tc/⁶⁸Ga respectivamente.

A su vez derivatizar con el fluorocromo isocianato de fluoresceína (FITC) el anticuerpo monoclonal.

2-Evaluar fisicoquímicamente las biomoléculas marcadas para optimizar las marcaciones (controles *in vitro*).

3 -Estudiar la estabilidad temporal a nivel fisicoquímico y biológico de los radiomarcados.

4- Realizar ensayos biológicos *in vitro* e *in vivo* que permitan analizar la afinidad de las moléculas marcadas por su antígeno y/o receptor.

5.-Realizar ensayos *in vivo* de imagenología molecular en modelos tumorales inducidos y modelos normales.

Para cumplir estos objetivos, a continuación, se presentan 3 capítulos. En el primer capítulo evaluaremos al decapéptido LHRH(D-Lys6) marcado con ^{99m}Tc vía HYNIC con como potencial agente de imagen para cáncer de mama y próstata. En el segundo capítulo evaluaremos este mismo análogo marcado con ⁶⁸Ga vía DOTA como potencial agente de imagen para cáncer de mama y próstata. En el último capítulo evaluaremos al anticuerpo

monoclonal Trastuzumab marcado con ^{99m}Tc vía HYNIC como potencial agente de imagen para cáncer de próstata.

3-Generación Radiofármaco de ^{99m}Tc basado en el péptido HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)

3.1 Materiales y Métodos:

Todos los productos químicos, salvo indicación contraria, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). El agua fue purificada y desionizada (18 M Ω /cm2) mediante un sistema de filtración de agua Milli-Q (Millipore Corp., Milford, MA). Los generadores de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc fueron adquiridos de TecnoNuclear (Argentina). La actividad radiactiva se contó en un calibrador de dosis CRC7 Capintec y en un detector de contador de centelleo sólido con un cristal de NaI (Tl) de 3"x3" asociado con un analizador de un solo canal (ORTEC, Oak Ridge, TN). La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se llevó a cabo en un sistema Agilent 1200 Series Infinity Star equipado con un detector GABI, un detector UV y una columna C18 (Restek, Ultra C18, 250 mm x 4.6 x 10 micrones). La detección de radio-TLC se realizó mediante cromatografía de capa fina instantánea (ITLC) en tiras de gel de sílice (Pall Corporation, Port Washington, NY).

3.1.1 Síntesis de péptido HYNIC-LHRH(D-Lys6)-GSG:

El decapéptido HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) ($C_{72}H_{100}N_{24}O_{18}$) fue adquirido en su forma ya derivatizada con el agente quelante bifuncional Succidinimyl-hidrazinonicotinamida (HYNIC) (agente quelante sintetizado en nuestro laboratorio por la Dra. María Fernanda García ²⁸⁸ y entregado a la empresa para su derivatización), con una pureza > 95% (determinada por HPLC-UV), un peso molecular (PM) de 1589.71 g/mol (determinado por espectrometría masas). A su vez se adquirió el precursor LHRH(D-Lys6) sin HYNIC, cuyo peso molecular determinado por espectrometría de masas fue de 1454.6 g/mol. Ambos se obtuvieron en forma liofilizada (4 mg); de la empresa SIQUIMIA S.A (Uruguay).

Como ya se mencionó en la sección 1.3, se sabe que los motivos pGlu1-His2-Trp3 y Arg8-Pro9-Gly10-NH2 del decapéptido son esenciales para la unión a su receptor. A su vez, está documentado que el reemplazo de la Gly6 con un D-aminoácido (síntesis análogos u agonistas) es capaz de aumentar la afinidad de unión, disminuir el *clearance* e incrementar

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 80

la eficacia terapéutica. Por lo cual, teorizamos que la unión del agente quelante HYNIC empleando una D-Lys y un *linker* flexible (secuencia GSG) en la posición 6, no alterará la unión específica con el receptor ($C_{72}H_{100}N_{24}O_{18}$, **Figura 27**).



Figura 27: Esquema del decapéptido HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) sintetizado por la empresa SIQUIMIA S.A (Uruguay); C₇₂H₁₀₀N₂₄O₁₈; 1589.71 g/mol.

3.1 2. Marcación del péptido con [99mTc]TcO4-:

Se estudiaron distintas condiciones de marcación del HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) con ^{99m}Tc empleando como co-ligandos los compuestos: Tricina, ácido etilenodiamina-N-N'diacético (EDDA), Tricina-EDDA y Tricina-Ácido Nicotínico (NA), y cloruro de estaño (SnCl₂, J. T. Baker) como agente reductor. Todos los solventes empleados fueron previamente purgados con corriente de gas N₂.

Las purezas radioquímica fueron analizadas mediante HPLC en fase reversa (RT-HPLC) el empleo de un equipo *Agilent Serie Infinity 1200* equipado con un detector *GABI* Star y utilizando una columna de fase reversa C18 (250 mm x $4.6 \times 10 \mu$ m, Restek Ultra), el detector UV se estableció en 280 nm. El método utilizado para la determinación de la pureza radioquímica fue el siguiente: gradiente de 20 min utilizando como fase móvil H₂0/Trifluoroacético (TFA) 0.1% (A) y Acetonitrilo (ACN)/TFA 0.1% (B), 0-5 min 0-45% B, 5-10 min 45-65% B, 10-20 min 100% B.

También se evaluó por cromatografía instantánea de capa fina (*instant thin layer chromatography* (ITLC) en sílica gel (ITLC-SG). Las fases móviles utilizadas fueron: a) Acetona, para determinar la presencia de $[^{99m}Tc]TcO_4^-$ libre (Rf = 1) y metanol: acetato amonio 1M (1:1) para determinar $[^{99m}Tc]Tc$ -coloide (Rf = 0).

Para llevar a cabo las respectivas marcaciones se utilizó 20 μ g de HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) (1 μ g/ μ L) almacenado a - 20°C; al cual se le adicionaron (n=3-4):

Tabla 5: Condiciones de marcado del decapéptido HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) con [^{99m}Tc]TcO4-:

Condiciones de marcado del HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)				
Soluciones	Tricina	Tricina/Acido nicotínco (NA)	Tricina/EDDA	EDDA
Tricina (100 mg/mL en H ₂ Od, 83.7μmol)	150 μL	150 μL	150 μL	
Ácido nicotínoco (NA) (20 mg/mL en H ₂ Od, 16.2 μmol)		100 µL		
EDDA (20-40 mg/mL en H ₂ Od, 114-228 μmol)			80 μL (20 mg/mL)	100 μL (40 mg/mL)
SnCl ₂	15 μL	15 μL	15 μL	15 μL

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 82

(1 mg/mL en 0.1 M				
HCl)				
[^{99m} Tc]TcO ₄ ⁻	37-185 MBq	37-185 MBq de	37-185 MBq de	37-185
(Hasta 500 µL)				MBq

Se controla el pH (4.5-5) del marcado y se incuba durante 30 min a 50 °C en un baño seco.

Paralelamente, para la condición de solo EDDA, probamos realizando la incubación durante 1 min a 70°C en microondas, seguido del baño seco a modo de comparar resultados.

3.1.3 Purificación de los complejos [^{99m}Tc]Tc--HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) /Coligando:

El control y purificación de los complejos peptídicos marcados se realizaron mediante RT-HPLC utilizando el método que fue mencionado anteriormente. Posteriormente se diluyó la fracción purificada con aproximadamente 500 μ L de PBS 0.1 M pH 7.4 y el ACN se redujo aplicando una corriente de N₂. Finalmente, se controla pH y si es necesario se añade PBS 0.1 M pH 7.4.

3.1.4 Coeficiente de reparto o Log P:

Para evaluar los valores de Log P, en primer lugar, se purificaron por RT-HPLC los conjugados de [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) /coligando. Seguido, el disolvente fue eliminado y el conjugado marcado (0.74 MBq) fue reconstituido en PBS (pH 7.4, 0.1M, 20 mL).

Tubos conteniendo 500 μ L de Octanol y 500 μ L del conjugado marcado disuelto en PBS, fueron vigorosamente agitados durante 1 min y centrifugados a 14.000 rpm durante 10 min. Seis fracciones de 100 μ L fueron colectadas de ambas fases, para la medición de sus respectivas cuentas en un contador de pozo de NaI. El coeficiente de reparto se obtuvo como el log (cuentas por min en octanol / cuentas en fase acuosa) (n=3).

3.1.5 Estabilidad in vitro:

-Estabilidad en PBS:

Se estudió la estabilidad *in vitro* de los conjugados [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) en PBS. Para esto, se purificaron por HPLC todos los conjugados por el método previamente descripto. Se incubó una alícuota de 20 MBq de cada complejo en 500 μ L de PBS 0.1 M pH 7.4 a 37° C hasta 4 h. Cada experimento fue realizado por triplicado y controlado por HPLC e ITLC-SG (n=3).

-Unión a proteínas plasmáticas:

Se estudió la unión a proteínas plasmáticas *in vitro* de los conjugados marcados empleando los distintos co-ligandos incubando una alícuota de cada complejo peptídico marcado y purificado (500 μ L en PBS 0.1 M pH 7.4, 20 MBq) en Suero Fetal Bovino (SFB, 500 μ L) a 37° C, hasta 4 h. Las proteínas fueron precipitadas con de Acetonitrilo (ACN) y centrifugadas (1750 g, 5 min, 4° C). Se midió la actividad del precipitado y del sobrenadante en un contador de pozo de NaI. Se calculo el porcentaje del complejo en el sobrenadante y en el pellet (n=3).

-Estabilidad en suero humano:

Se estudio a su vez la estabilidad del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) /Tricina/NA en suero humano hasta 4 h, de modo similar al punto anterior (n=2).

En este caso, una vez que el sobrenadante es separado, se pasó por filtros Millipack \mathbb{B} de 0.22 µm (Merck, Alemania) y fue analizado por RT-HPLC por el método previamente descrito (n=2).

-Estabilidad en L-Cisteína:

Se estudió la estabilidad *in vitro* del conjugado [^{99m}Tc]Tc--HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA en L-Cisteína mediante el método previamente descrito por *Hnatowich et al*²⁸⁹ Para ello fue incubada una alícuota (37 MBq) del complejo marcado disuelto en 500 μ L de PBS en distintas concentraciones finales de L-Cisteína (0.1, 1.0 y 10 mM) a 37 °C,

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 84

hasta 24 h, y la pureza radioquímica fue analizada por RP-HPLC para evaluar la estabilidad del complejo (n=3).

3.1.6 Modelos celulares:

Las líneas celulares humanas de cáncer de próstata (PC3, LnCap, Du-145) y de cáncer de mama (MDA-MB-231, MDA-MB-435 y MCF-7 y BT-474, 4T1), fueron adquiridas de American Type Culture Collection (ATCC). El medio base que se utilizó para estas líneas celulares fue RPMI-1640 (Capricorn), suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) a una concentración final de 10 %, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina. La línea celular de fibroblastos normales (NIH3T3) y la línea de ovario de hámster CHO-K1, fueron adquirida de ATCC, utilizando como medio base DMEM alta glucosa (Capricorn), suplementada con Suero Fetal Bovino (SFB) a una concentración final de 10 %, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de HEPES. La línea de células humanas de próstata normales (RWPE-1) fueron obtenidas por ATCC y crecidas en medio para queratinocitos libre de suero fetal bovino (GIBCO), suplementado con extracto pituitario bovino (concentración final 0.05 mg/mL) y factor epidérmico humano recombinante (concentración final 5 ng/mL) (GIBCO).

Todos los cultivos fueron incubados a 37 °C con 5 % de CO_2 y una atmósfera del 95% de humedad.

3.1.7 Estudios biológicos in vitro de unión celular:

Se realizó un ensayo de afinidad de unión específica (*binding*) en todas las líneas celulares mencionadas. Las células fueron cultivadas en medio de cultivo durante dos semanas. Se levantaron (por medio de incubación con Tripsina 1X por 10 min, neutralizar la tripsina con el doble de volumen de medio de cultivo, seguido de centrifugado por 10 min a 4000g), se determinó el número de células y se incubaron $5x10^5$ células en placas de 24 pocillos, y se dejaron crecer toda la noche, hasta llegar a la confluencia (10^6 células en 1.0 ml de medio de cultivo, a 37° y 5% CO₂).

Esa monocapa celular se incubo luego con ~ 100 nM de [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA (100.000-300.000 cuentas/pocillo) por 15, 30, 45 y 60 min a 37 °C.

Se retira el medio de incubación con el radiomarcado (medio no unido) y se realizan dos lavados con PBS1X-0.4%BSA (500 µL)

La respectiva unión a la membrana fue determinada mediante un lavado (300 uL) con acetato de sodio (40 mM, pH 4.50), seguido por un lavado de 500 µL de PBS 1X-0.4%BSA y la internalización fue determinada mediante un segundo lavado (300 uL) de NaOH 1N por 10 min seguido por un lavado de PBS1X-0.4%BSA. La cuantificación de las respectivas cuentas por min (cpm) del péptido radiomarcado en cada lavado fue determinado mediante el empleo de un contador gamma automático (Capintec CRC-7, Montvale, N.J., EE. UU.). Cada punto se realiza por cuadruplicado (cpm unidas o internalizadas * 100/total cpm=cuentas internalizadas + unidas a membranas+ lavados + no unido).

Con el fin de confirmar el grado de unión no específica, se llevaron a cabo estudios blancos incubando el mismo número de células y [99m Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) /Tricina/NA con la adición de 20 µg (x 400) de LHRH(D-Lys6) sin marcar durante 2 h a 37 °C previo al ensayo de *binding*, y se continúa con el estudio en las mismas condiciones experimentales anteriormente mencionadas.

A su vez, realizamos ensayos de afinidad celular del radiomarcado, utilizando la línea LnCap. Las células fueron incubadas en placas de 24 pocillos $(5x10^5$ células, se dejaron crecer overnight hasta 10^6 células en 1.0 ml de medio de cultivo). El día del experimento, agregamos el complejo radiomarcado a distintas concentraciones (0.1-300 nM) en pocillos en presencia de ligando frío (20-40 µg LHRH(D-Lys6)) para la unión no específica y ausencia para la unión específica total. Incubamos por una hora a 37° C a 5% CO₂, luego de lo cual quitamos el medio, lavamos dos veces con PBS1X-0.4%BSA (500 µL) y lisamos con 300µL de NaOH 1N por 10 min seguido por un lavado de PBS1X-0.4%BSA (500µL). Cuantificamos las respectivas cuentas por min (cpm) del péptido radiomarcado (unión específica) en cada punto. Realizamos estos ensayos en dos replicas biológicas, cada uno con tres réplicas técnicas El equilibrio de disociación se calcula utilizando el software GraphPad prisma.

3.1.8 Modelos in vivo:

La evaluación biológica *in vivo* del complejo de [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) /Tricina/NA se llevó a cabo mediante la realización de estudios de biodistribución y SPECT/CT. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (protocolo #353, acta 240011-001862-16) y en caso de ser necesario, el Comité de Experimentación del Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM).

-Ratones hembra Balb/c:

Los ensayos fueron realizados en ratones normales hembras BALB/c, entre 6 - 10 semanas de edad y 18 - 24 g.

-Ratones hembra Balb/c xenográficos con tumor 4T1:

Se inyectaron de forma intramamaria, hembras Balb/c (6-10 semanas, 18-24 g) con 250.000 cel $4T1/100 \mu L$ PBS estéril, y se esperó 10-14 días para el crecimiento tumoral. Obtuvimos un crecimiento tumoral del 100%.

-Ratones Swiss macho:

Se realizó a su vez la evaluación biológica in *vivo* del complejo de [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Coligando/Tricina/NA en ratones Swiss machos (ya que estos son la base de los Nudes utilizados como modelos de cáncer de próstata). Los ensayos fueron realizados en ratones normales machos Swiss, entre 10-14 semanas de edad y 18 - 24 g.

-Ratones Nude xenográficos con PC3 y LnCap:

Se inyectaron de forma infraescapular (hombro izquierdo), en machos nude (8-12 semanas, 18-24 g), 5.000.000 cel/200 uL medio de cultivo completo estéril: geltrex (1:1), y se esperó 2-12 semanas para el crecimiento tumoral. Diariamente se le aplica androgel para fomentar el crecimiento tumoral. Obtuvimos un crecimiento tumoral del 80% para las células PC3, en un máximo de hasta 8 semanas y cercano al 60% para las LnCap en un máximo de 12 semanas.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 87

-Ratones hembra xenográficos con BT-474 y MCF-7:

Similar al punto anterior, se inyectaron de forma infraescapular (hombro izquierdo), hembras nude (8-12 semanas, 18-24 g) con 1.000.000, 2.500.000 y 4.000.000 cel/200 uL medio de cultivo completo estéril:geltrex (1:1) (n=2 por grupo), y se esperó 2-12 semanas para el crecimiento tumoral.

Diariamente se le aplica estrógeno para fomentar el crecimiento tumoral. Obtuvimos un crecimiento tumoral del 100% para las células BT-474 (2.500.000 cel/ratón), en un máximo de hasta 8 semanas y cercano al 100% para las MCF-7 (2.500.000 cel) en un máximo de hasta 12 semanas.

Estudios de estabilidad biológica in vivo:

Animales (n=3-4 por grupo) fueron inyectados por la vena de la cola con aproximadamente ~20 μ Ci (0.5-1 MBq, 0.05 – 0.15 μ g) del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA y fueron sacrificados por dislocación cervical luego de 1, 3 y 6 h (o solo 3 h en caso de menor n). Los tejidos seleccionados (tumor, corazón, hígado, pulmones, tiroides, riñones, estómago, bazo, tracto gastrointestinal y vejiga) fueron extirpados, enjuagados de la sangre residual, pesados y su radiactividad medida en un detector NaI (Tl). La sangre y orina fueron también colectados y medidos. La radioactividad en el tumor y en los tejidos normales es expresada como porcentaje de dosis inyectada (% ID) y como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g). Para los bloqueos, realizamos las biodistribuciones de la forma descrita anteriormente (n=3-4) a los mismos tiempos que los evaluados, habiendo previamente inyectado 100 µg/100 µl de LHRH(D-Lys6) no marcado 30 min antes de la inyección del radiofármaco.

3.1.9 Imágenes SPECT/CT:

Las imágenes *Single-photon emission computed tomography/computed tomography* (SPECT/CT) fueron realizadas en una nanoScan SPECT/CT (Mediso).

Una mezcla de 2-2.5% isoflurano y oxígeno se utilizó como anestesia, seguido de una inyección intravenosa de arginina (20 mg/mL) en gelofusine (únicamente tumores 4T1),

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 88

seguido a los 10 min de una inyección intravenosa en la cola de [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA, 30-75 MBq/ratón en 100-150 μL.

Para los estudios de bloqueo, 30 min previos a la inoculación del radiofármaco intravenoso, se inyecto LHRH(D-Lys6) (100 µg) sin marcar.

Luego de 1, 3 y 5 h se realizaron las imágenes SPECT, utilizando como reconstrucción el método Tera Tomo 3D normal Dynamic (filtros medios, 128 resoluciones, 48 iteraciones, 3 subsets). Las reconstrucciones de las imágenes se analizaron utilizando el software PMOD versión 3.8 (PMOD Technologies, Ltd., Zurich, Switzerland) utilizando volúmenes de interés (VOI) elipsionales 3D manuales alrededor del tumor y músculo. Se realizaron imágenes de animales completos (4T1, LnCap) o limitados únicamente al área tumoral según lo requerido en el estudio.

3.2 Resultados y Discusión

3.2.1 Síntesis de HYNIC-GSG-LHRH:

Como ya fue mencionado, el peso molecular del decapéptido LHRH(D-Lys6) fue confirmado por espectrometría masas (MS) y por UV-HPLC, proporcionados por la empresa SIQUIMIA S.A, dónde la relación m/z del LHRH(D-Lys6) para (MH)⁺ fue de 1454.6 Da y se muestra en la **Figura 28**.



Figura 28: Espectrometría de Masas (MS) (izquierda) y cromatograma HPLC-UV (derecha) de LHRH(D-Lys6) sin HYNIC (PM: 1454.6 g/mol), proporcionado por la empresa Siquimia S.A.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 89

Al realizar el proceso de conjugación al HYNIC al linker (GSG), el peso molecular del decapéptido conjugado HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) fue confirmado por espectrometría masas (MS Spectrum) y por UV-HPLC, dónde la relación m/z del LHRH para (MH)⁺ fue de 1589.71 Da y se muestra en la **Figura 29**, con una pureza >95%.



Figura 29: Espectrometría de Masas (MS) (izquierda) y cromatograma HPLD-UV (derecha) de HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) (PM:1589.71 g/mol), proporcionado por la empresa Siquimia S.A.

3.2.2 Marcación con ^{99m}Tc de HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6):

Primariamente se evaluó por HPLC-RT el perfil del péptido sin marcar mediante el empleo del detector UV en las condiciones mencionadas anteriormente, revelando un Tiempo de Retención (Tr = 7.00 min) (**Figura 30**).



Figura 30: Perfil HPLC-RT del péptido HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) empleando detector UV a 280 nm. Tiempo retención (Tr): 7.00 min.

Posteriormente se evaluó por HPLC el perfil del [^{99m}Tc]TcO₄-en las condiciones ensayadas, revelando un Tr de 3.63 min; de forma tal de establecer su posible presencia en los distintos

conjugados como impureza radioquímica. El resto de los coligandos (Tricina, Acido Nicotínico y EDDA) presentaron un espectro UV-Visible en tiempos de retención (Tr) cercanos (2.8-3.5 min), pudiéndolos entonces separar exitosamente del péptido (**Figura 31-34**).



Figura 31. Perfil de HPLC-RT de [^{99m}Tc]TcO₄⁻. Tr: 3,63 min (Detector gamma).



Figura 32. Perfil de HPLC-RT de Ácido Nicotínico (NA), Tr: 3 50 min (UV-Vis 280 nm).



Figura 33. Perfil de HPLC-RT de Tricina. Tr: 2.80 min. (UV-Vis 280 nm).



Figura 34. Perfil de HPLC-RT de EDDA. Tr: 3.40 min. (UV-Vis 280 nm).

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 91

El conjugado HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) se logró marcar con una pureza radioquímica (PRQ) de 99.52 \pm 0.26 % (HPLC-RT) utilizando Tricina como co-ligando a 50 °C durante 20 min. El complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina se logró purificar exitosamente mediante HPLC, con un Tr de aproximadamente 6.92 min, **Figura 35**.



Figura 35. Perfil de HPLC-RT del [^{99m}Tc]Tc HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina en columna C18. Arriba detector UV, Tr= 6.92 min y abajo detector gamma, Tr: 7.00 min.

Las impurezas obtenidas por ITLC-SG para este marcado fueron de 0.06 ± 0.04 para el [^{99m}Tc]TcO₄⁻y 1.5 ± 0.9 para el [^{99m}Tc]Tc.H₂O. Esto, junto a los datos de HPLC-RT indican la presencia de la impureza [^{99m}Tc]Tc-Tricina en aproximadamente 0.4%, siendo el [^{99m}Tc]Tc.H₂O la impureza principal y llevando la pureza radioquímica global cercana al 98%.

Por su parte, el conjugado HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) se logró marcar con una PRQ de $99.83 \pm 0.29 \%$ (HPLC-RT) utilizando Tricina/NA como co-ligandos a 50°C durante 20 min. El complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA se logró purificar por HPLC, presentando un Tr de 6.99 min. Podemos observar un pequeño corrimiento entre los canales de UV-Vis y detección gamma, normales debido a la configuración del sistema, **Figura 36**.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 92



Figura 36: Perfil de RT-HPLC del [99m Tc]Tc -HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA en columna C18. Arriba detector UV, Tr = 6.99 min y abajo detector gamma. Tr= 7.00 min.

Las impurezas obtenidas por ITLC-SG fueron de 0.24 ± 0.17 % para el [^{99m}Tc]TcO₄⁻y 0.26 \pm 0.01% para el [^{99m}Tc]Tc.H₂O. Esto, junto a los datos de HPLC parecerían indicar que no hay presencia de [^{99m}Tc]Tc-Coligando en el marcado, y que el [^{99m}Tc]TcO₄⁻ es la impureza principal, llevando la pureza radioquímica global cercana al 99%.

El conjugado HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) se logró marcar con una PRQ de 74.98 ± 1.87 % (HPLC-RT) utilizando Tricina/EDDA como co-ligandos a 50°C durante 20 min (**Figura 37**). El complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/EDDA se purificó por HPLC, con un Tr de 7.07 min, lográndose apreciar impurezas que pueden ser tanto [^{99m}Tc]TcO₄⁻(Tr: 3,63 min) como [^{99m}Tc]-Coligandos (EDDA; Tr: 3.40 min y Tricina; Tr: 2.80 min).



Figura 37: Perfil de HPLC-RT del [99m Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/EDDA en columna C18. Arriba detector UV, Tr = 7.00 min y abajo detector gamma. Tr= 7.07 min.

Las impurezas obtenidas por ITLC-SG fueron de 1.0 ± 0.5 % para el [^{99m}Tc]TcO₄ y 1.4 ± 0.4 % para el [^{99m}Tc]Tc.H₂O. Esto, junto a los datos de HPLC parecerían indicar una alta presencia de co-ligando marcado con ^{99m}Tc (~24%), llevando la pureza radioquímica total (PRQ) aproximadamente a un 73.5%.

Por último, el conjugado HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) se marcó con una PRQ de 70.94 \pm 1.27 % (HPLC-RT) utilizando EDDA únicamente como co-ligando a 50°C durante 20 min. El complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/EDDA se purificó por HPLC, con un Tr de 7.03 min, **Figura 38**, lográndose observar nuevamente impurezas que pueden ser tanto [^{99m}Tc]TcO₄⁻(Tr: 3,63 min) como [^{99m}Tc]Tc-Coligando (EDDA; Tr: 3.40 min) en un alto porcentaje.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 94



Figura 38: Perfil del detector gamma de HPLC-RT del [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/EDDA en columna C18. Arriba detector UV y abajo detector gamma. Tr= 7.03 min.

Las impurezas obtenidas por ITLC-SG fueron de 6.64 \pm 0.72 % para el [^{99m}Tc]TcO₄⁻y 4.16 \pm 0.24 % para el [^{99m}Tc]Tc.H₂O. Esto, junto a los datos de HPLC parecerían indicar una alta presencia de co-ligando marcado con ^{99m}Tc (25%), llevando la PRQ a 66.8%.

Intentamos a su vez optimizar el marcado iniciando la marcación con 1 min en microondas antes del baño seco a 50°C, pero esta tampoco demostró mejorar la pureza del marcado (**Figura 39**), observándose aún un alto porcentaje (~20%) de impurezas radioquímicas por HPLC-RT.



Figura 39: Perfil del detector gamma de HPLC-RT del [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH (D-Lys6)/EDDA en columna C18. Arriba detector UV y abajo detector gamma. Tr= 7.03 min.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 95

Encontramos resultados similares por ITLC-SG, comprobando por consiguiente que, de las cuatro condiciones de marcado evaluadas, las que utilizan los coligados Tricina y Tricina/NA son los que dan la mayor pureza radioquímica (>98%), siendo esta óptima para continuar los ensayos y sin necesitar de un paso de purificación previo al marcado, punto que debe ser destacado si pensamos en un futuro uso en clínica.

Confirmamos que nuestros sistemas de control de calidad seleccionados (HPLC, ITLC) fueron eficientes en lograr controlar nuestras especies marcadas ($[^{99m}Tc]Tc$ -HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) /Coligandos, $[^{99m}Tc]Tc.H_2O$ y $[^{99m}Tc]TcO_4^-$ y $[^{99m}Tc]Tc$ -coligando) y consistentes en cuanto a los resultados obtenidos entre ambos, pudiendo concluir que es un sistema más que útil para determinar la pureza radioquímica de nuestro radiofármaco.

Logramos realizar los marcados en un volumen de reacción ~300 μ L y un pH~5, lo cual lo hace óptimo para sus subsiguientes usos *in vivo*, pudiendo ser diluido en PBS u suero fisiológico de ser necesario, obteniendo un pH final óptimo (~7) y una solución incolora y límpida.

3.2.3 Coeficiente de Reparto o log P:

Se evaluó el carácter hidrofílico de los complejos peptídicos marcados con ^{99m}Tc utilizando los distintos co-ligandos, mediante el cálculo del coeficiente de reparto octanol-agua. Los valores obtenidos se muestran en la **Tabla 6**. En todos los casos el complejo estudiado mostró ser hidrofílico, si bien las especies marcadas con Tricina y Tricina/NA como coligando demostraron una mayor hidrofilicidad (menor que -2.5).

Tabla 6: Estudio del coeficiente de reparto (Log P) de [^{99m}Tc]Tc -HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/coligandos



-2.59 ± 0.05	-2.82±0.04	-1.95 ± 0.43	-1,16 ±0.07

Nuevamente observamos que los dos complejos marcados con Tricina y Tricina/AN presentan una mayor hidrofilicidad de todos los estudiados.

3.2.4 Estabilidad in vitro:

Se estudió la estabilidad *in vitro* en PBS a 37 °C de los complejos peptídicos marcados con ^{99m}Tc hasta 4 h, **Figura 40**.



Figura 40: Estudios de estabilidad *in vitro* en PBS para los complejos marcados obtenidos. (%PRQ: % Pureza radioquímica).

Si bien todos los complejos resultaron estables en las condiciones ensayadas (disminución máxima de ~15% para el complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH (D-Lys6)/EDDA), sólo los complejos marcados con los co-ligandos Tricina y Tricina/NA presentaron purezas radioquímicas mayores al 90 % hasta las 4 h evaluadas del estudio.

También la estabilidad de los radiocomplejos se analizó en SFB a 37°C hasta 4 h para determinar la unión a proteínas plasmáticas, **Figura 41**.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 97



Figura 41: Unión a proteínas plasmáticas in *vitro* en SFB para los complejos marcados. Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001, *** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.01, * en caso de P \leq 0.05 y ns en caso de P>0.05 (no significativo) (Two way-ANOVA).

Se observo que tanto el complejo marcado empleando el coligando Tricina y la mezcla Tricina/NA son los complejos que presentan una menor unión a proteínas plasmáticas (siendo por consiguiente más estables a la transquelación), aún a 4 h luego de marcados. En especial el complejo marcado utilizando la mezcla de co-ligandos Tricina/NA, que presenta diferencias significativas en cuanto a su unión a proteínas plasmáticas en al menos un punto con el resto de los marcados (Two-Way ANOVA).

Teniendo en cuenta todos los resultados anteriores, concluimos en primer lugar que, de todas las condiciones evaluadas, el complejo Tricina/NA es el que presenta mejores propiedades *in vitro* (pureza radioquímica, estabilidad, unión a proteínas plasmáticas) por lo cual decidimos continuar con dicho complejo para el resto de los estudios *in vitro* e *in vivo*. Cabe destacar que en los trabajos de *Farahani et al* ^{192,194}, el grupo marco con ^{99m}Tc dos análogo similares al presentado en el trabajo empleando tricina y EDDA como coligandos, resultados que no pudieron ser replicados en este trabajo, si bien se debe considerar que tiempos de incubación y temperatura utilizados varían (15 min a 95°C), así como el uso de mayores concentraciones de coligandos, lo que puede explicar las diferencias encontradas entre los

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 98

trabajos. Los autores indican que ambos fueron marcados con una pureza radioquímica mayor al 95% y demostraron ser estables en PBS y solución salina; si bien el log P demuestra que el complejo no es tan hidrofílico como el obtenido en esta sección utilizando Tricina/NA como coligandos (log P=-1.45¹⁹⁴ vs -2.82±0.04).

Estudiamos por consiguiente la estabilidad del complejo Tricina/NA en suero humano por medio de HPLC-RT, obteniendo una unión a proteínas plasmáticas de 4.5 ± 0.1 % y una pureza radioquímica mayor al 98% a las 4 h (HPLC-RT), similar a lo visto anteriormente en los ensayos con SFB y PBS a 37°C.

Por último, la estabilidad del radiocomplejo Tricina/NA se analizó mediante un estudio de transquelación en concentraciones diferentes de L-Cisteína (**Figura 42**).

A una hora de incubación a 37°C con las distintas concentraciones de L Cisteína ensayadas, se observó que el complejo marcado empleando la mezcla de co-ligandos Tricina/NA resultó ser estable, observando purezas radioquímicas de 100.0 ± 0.5 %, 100.0 ± 0.8 % y 100 ± 1.2 % en 0.1 mM, 1.0 mM y 10.0 mM de L Cisteína, respectivamente. A las 3 h de incubación, en las mismas condiciones, se observó que el complejo marcado aún permanece estable, observando purezas radioquímicas de 100 ± 2.9 %, 100 ± 2.3 % y 100 ± 1.7 % en 0.1 mM, 1.0 mM y 10.0 mM de L Cisteína, respectivamente. A las 24 h de incubación se observó una inestabilidad del complejo peptídico radiomarcado, disminuyendo a 93 ± 2.3 %, 85 ± 1.7 % y 76 ± 0.7 % en 0.1 mM, 1.0 mM y 10.0 mM de L Cisteína, respectivamente.



Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 99

Lic. Lucía Alfaya 2024

Figura 42: Estudios de estabilidad *in vitro* en L-Cisteína empleando el [^{99m}Tc]Tc -HYNIC-GSG-LHRH (D-Lys6)/Tricina/NA.

Los datos de los estudios de estabilidad demuestran que el complejo marcado empleando mezcla de co-ligandos Tricina/NA ([^{99m}Tc]Tc -HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA) presenta la mayor pureza radioquímicas y estabilidad. Cabe destacar que con dicho marcado logramos unas actividades específicas que rondan 1.85- 5.55 MBq/µg, y un máximo de 18.5 MBq/µg. Es por ello que tanto los ensayos *in vitro* como *in vivo* para evaluar el péptido radiomarcado fueron analizados empleando dicha mezcla de co-ligandos.

A su vez, confirmamos que no es necesario un paso de purificación previo a su uso, ya que nuestro marcado posee una alta pureza radioquímica (>98%), lo cual lo hace óptimo para uso en preclínica y clínica; y disminuye tanto su tiempo de marcado antes de ser utilizado, así como que facilita el proceso y minimiza la pérdida de actividad.

3.2.5-Estudios biológicos in vitro de unión celular en líneas de cáncer de mama:

Los estudios *in vitro* de unión y de bloqueo mediante la incubación de [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH (D-Lys6)/Tricina/NA en las líneas MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435, BT-474 (cáncer de mama humana) y 4T1-3T3 (cáncer de mama murino) se realizaron para evaluar la afinidad y la unión específica del conjugado ^{99m}Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys 6)/Tricina/NA al LHRH-R (Ver **Figura 43-45**).

A su vez, empleamos como control las líneas NIH-3T3 (fibroblastos murinos) y CHO-K1 (células de embrión de hámster, LHRH -).

En la línea empleada como control, NIH-3T3, se observó tanto una unión a membrana como internalización despreciable del complejo radiomarcado; presentando una unión a membrana menor a 0.50% en todos los tiempos evaluados; mientras que se observó una internalización menor a 0.20 %. Para la línea CHO-K1 se obtuvieron resultados similares, con uniones a membrana menores a 0.40% e internalizaciones menores a 0.10% en todos los tiempos evaluados.

En la línea celular MDA-MB-231, la unión a membrana máxima fue de 14.8 ± 2.0 % a los 30 min, y la mínima de 10.6 ± 1.6 % a los 45 min; mientras que presentó una internalización máxima de 1.7 ± 0.4 % a los 60 min y mínima de 1.06 ± 0.15 % a los 30 min.

En la línea celular MDA-MB-435, la unión a membrana máxima fue de 7.6 \pm 0.6 % a los 15 min y la mínima de 4.1 \pm 0.6 % a los 60 min; mientras que presentó una internalización máxima de 0.95 \pm 0.06 % a los min y mínima de 0.48 \pm 0.05 % a los 60 min.

En la línea MCF-7, se observó una unión a membrana máxima de 16.4 ± 2.6 % a los 60 min y una mínima de 3.9 ± 0.2 % a los 15 min, mientras que la internalización máxima fue de 2.1 ± 0.5 % a los 45 min y una mínima de 0.77 ± 0.17 % a los 15 min.

En la línea celular BT-474, la unión a membrana máxima fue de 17.8 ± 3.8 % a los 15 min, mientras que la mínima fue de 10.6 ± 1.4 % a los 60 min; mientras que la internalización máxima fue de 1.5 ± 0.2 % a los 15 min y la mínima de 0.48 ± 0.05 % a los 60 min respectivamente.

En la línea celular 4T1, la unión a membrana máxima fue de 17.6 \pm 3.2 % a los 30 min mientras que la mínima fue de 11.5 \pm 1.4 % a los 15 min; mientras que la internalización máxima fue de 1.2 \pm 0.2 % a los 45 min y la mínima de 0.68 \pm 0.16 % a los 60 min respectivamente.

Estudios estadísticos (Two-Way ANOVA) entre las uniones en membrana de los controles negativos (CHO-K1) y el resto de las líneas celulares, demostraron una diferencia significativa ($P \le 0.05$) frente a todas las líneas de cáncer de mama evaluadas, en todos los tiempos; mientras que no se encontraron diferencias frente a la línea NIH-3T3 (P > 0.05) (**Figura 43**).



Figure 43: Porcentaje de unión a membrana del complejo [99m Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) /Tricina/NA en líneas celulares CHO-K1, NIH-3T3, MDA-MB-231, MCF-7, MDA-MB-435, BT-474 y 4T1 (promedio ± SD, n=4). Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001, *** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.001, * en caso de P \leq 0.05 y ns en caso de P>0.05 (no significativo) (Two way-ANOVA).

Por su lado, en cuanto a la internalización, la mayoría de las líneas presentaron una diferencia significativa (Two-Way ANOVA) frente al control negativo en todos los tiempos, mientras que nuevamente no encontramos diferencias significativas entre las líneas CHO-K1 y NIH-3T3 en todos los tiempos evaluados (**Figura 44**).



Figura 44: Porcentaje de internalización celular del complejo [99m Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) /Tricina/NA en líneas celulares CHO-K1, NIH-3T3, MDA-MB-231, MCF-7, MDA-MB-435, BT-474 y 4T1 (promedio ± SD, n=4). Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001, *** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.001, * en caso de P \leq 0.05 y ns en caso de P \geq 0.05 (no significativo)(Two way-ANOVA).

Realizamos a su vez ensayos de bloqueo con exceso de LHRH(D-Lys6) previo a la exposición con nuestro radiofármaco, encontrando en todas las líneas evaluadas de cáncer de mama, una disminución en la unión específica (Student t), entre 40-80% respecto al ensayo no bloqueado; no observada en el control negativo CHO-K1 ni la línea NIH-3T3 (**Figura 45**).



Figura 45: Porcentaje de unión a membrana con y sin bloqueo (20 μ g LHRH (D-Lys)) para todas las líneas de cáncer de mama evaluadas (promedio \pm SD, n=4).

Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001*** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.01, * en caso de P \leq 0.05 y ns en caso de P>0.05 (no significativo) (Student t).

Considerando todos los resultados mostrados de los ensayos *in vitro* en líneas celulares de cáncer de mama, podemos concluir que todas las líneas evaluadas sobreexpresan el LHRH-R frente al control negativo (CHO-K1). Al mismo tiempo, confirmamos que esta línea no expresa dicho receptor, lo que concuerda con los estudios previos realizados por *Huang S et al*²⁰⁰. A su vez, confirmamos que dicha unión es específica y mediada por el receptor debido a los ensayos de bloqueo realizados en todas las líneas celulares evaluadas.

Cabe destacar que la unión es principalmente de membrana (\geq 70%), y la porción internalizada es significativamente menor, por lo cual no se realizaron ensayos de eflujo en dichas líneas celulares.

A su vez, es de importancia destacar que el radiofármaco se une específicamente a diversas líneas celulares, que representan distintos tipos moleculares de cáncer de mama previamente mencionados en la introducción (Ver **Tabla 1** y **Tabla 7**), lo cual demuestra la potencialidad del radiofármaco en diagnosticar diversos tipos de cáncer de mama (Triple negativo, Luminal, HER2), en vez de ser únicamente dirigido a una categoría en particular (ej.: [¹⁸F]FES no es capaz de detectar tumores triple negativos (TNBC) ya que estos no expresan el receptor de estrógenos al cual el radiofármaco está dirigido). Sería necesario a su vez investigar más en profundidad si los distintos porcentajes de bloqueo son debidos a la expresión distinta del receptor del LHRH o su afinidad por el ligando.

Como complemento, se podría agregar una línea celular de más subtipos (ej.: Luminal B) para completar este trabajo y demostrar la potencialidad de este nuevo radiofármaco en todos los subtipos moleculares de cáncer de mama.

Tipos de Líneas celulares de cáncer de mama						
Línea	Origen	ER	PR	HER2	Subtipo	Tumor
MDA-	Humano	-	-	-	TNBC	Humano
MB-						
231						
MDA-	Humano	-	-	-	TNBC	Adenocarcinoma
MB-						
435						
MCF-7	Humano	+	+	-	Luminal	Carcinoma invasivo ductal
					А	
BT-474	Humano	+	+	+	HER2+	Carcinoma invasivo ductal
					Luminal	
4T1	Murino	-	-	-	Similar	Similar Adenocarcinoma
					TNBC	

Tabla 7: Resumen de características de las líneas celulares de mama utilizadas en esta tesis. Modificado de ^{290–292}. Encontramos también que la línea NIH-3T3 (fibroblastos murinos) no sobreexpresan dicho receptor, por lo cual es posible emplearla como control negativo de la expresión del receptor del LHRH en futuros ensayos con dicho péptido.

Todos estos resultados apoyan nuestra hipótesis inicial basada en la sobreexpresión del receptor del LHRH en líneas de cáncer de mama para el potencial uso del análogo del LHRH(D-Lys6) como agente de imagenología molecular.

Es necesario destacar que, estudios previos con moléculas similares, como el realizado por el grupo por el grupo de *Okarvi SM et al*¹⁹⁹ empleado leuprolide radiomarcado con [¹⁷⁷Lu]Lu/[⁶⁸Ga]Ga, también determino uniones considerables en diversas líneas de cáncer de mama evaluadas (MCF-7, T47D y MDA-MB-231), siendo consistente con los resultados obtenidos en este trabajo. A su vez, *Calderon et al* en su trabajo con los complejos [^{99m}Tc]Tc-Acdien-LHRH y [¹⁸⁸Re]Re-Acdien-peg-LHRH también lograron demostrar una unión específica en las células MDA-MD-231 y 4T1. *Jalilian et al*¹⁹⁷ también demuestra la unión del complejo [¹¹¹In]InDTPA-buserelin a las células MCF-7 en su trabajo.

3.2.6-Estudios biodistribución en ratones hembra normales y xenográficos (4T1):

Las propiedades *in vivo* del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) /Tricina/NA fueron evaluadas en ratones Balb/c hembras normales (n=4) y ratones Balb/c portadoras de tumor de mama murino (células 4T1) hasta 6 h post inyección (p.i) (n=3).

La **Tabla 8** y **Figura 46** muestran los resultados de las biodistribuciones en ratones Balb/c normales hembra a 1, 3 y 6 h (promedio \pm SD), observándose un elevado *clearance* renal (alta actividad en riñón, vejiga y orina) y baja actividad en el resto de los órganos (<2% ID/g). Cabe destacar la poca actividad retenida en tiroides, lo que indica la alta estabilidad del compuesto en el organismo una vez suministrado.

Tabla 8: Resultados de los estudios de biodistribución (promedio \pm SD) en ratones normales Balb/c hembras a 1, 3 y 6 h post inyección (p.i). %ID/g (arriba) and %ID (abajo). ID=Dosis inyectada.

%ID/g	1 h p. i	3 h p. i	6 h p. i
Sangre	0.30 ± 0.1	0.030 ± 0.02	0.18±0.01
Hígado	0.82 ± 0.02	0.95 ± 0.03	1.2± 0.01
Corazón	1.1±0.6	0.83 ± 0.02	0.92± 0.01
Pulmones	1.9 ± 0.1	1.6 ± 0.03	1.9± 0.03
Bazo	0.97 ± 0.04	0.78 ±0.06	1.4 ± 0.02
Riñones	38 ± 3.5	59 ± 2.3	31± 0.04
Tiroides	1.1 ± 0.1	0.96 ±0.02	0.94± 0.01
Músculo	0.070 ± 0.03	0.060 ± 0.04	0.070 ± 0.01
Hueso	0.080 ± 0.05	0.010 ±0.01	0.010±0.01
Estómago	1.4 ± 0.10	1.6 ± 0.04	1.3± 0.2
%ID			
Orina+ Vejiga	47 ± 0.50	48 ± 0.10	48±1.7
TGI	1.6 ± 0.6	2.7 ± 0.2	4.8±1.6

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 107



Figura 46: %ID/g (arriba) y %ID (abajo) para los estudios de biodistribución del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA en ratones Balb/c normales hembra (promedio ± SD).

En cuanto a los ensayos en ratones portadores de tumor 4T1, podemos observar el mismo patrón de biodistribución (Ver **Tabla 9** y **Figura 47**) al visto en ratones normales (*clearance* renal, seguido por una acumulación mínima, menor al 5% ID/g en el resto de los órganos).

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 108
Hay una baja retención en sangre a las 6 h p.i (0.70 ± 0.1 %ID/g). Cabe a su vez destacar la baja actividad en pulmones (<4.1% ID/g) un típico sitio de metástasis de la línea celular 4T1²⁹³.

A su vez se destaca que al realizar comparaciones entre ambos modelos animales (normales y portadores de tumor), por medio del test de Student t, solo resultaron en diferencias significativas entre los riñones a 1 y 6 h p.i ($38 \pm 3.5\%$ ID/g vs 73 $\pm 16\%$ ID/g y 31 $\pm 0.04\%$ ID/g vs 58 $\pm 5.4\%$ %ID/g, P ≤ 0.0001 , Student t), estómago a 6 h p.i ($1.3 \pm 0.2 \%$ ID/g vs 4.1 \pm 1.3 %ID/g P ≤ 0.01 ,Student t) y orina más vejiga y TGI a 1 h p.i ($47 \pm 0.50 \%$ ID vs 10 $\pm 1.3 \%$ ID y 1.6 $\pm 0.6 \%$ ID vs 3.7 $\pm 0.6 \%$ ID, P ≤ 0.0001 , Student t).

Tabla 9: Resultados de los estudios de biodistribución (promedio \pm SD) en ratones normales Balb/c hembras portadores de tumores 4T1 a 1,3, 3 h bloqueados y 6 h post inyección. %ID/g (arriba) and %ID (abajo). ID=Dosis inyectada. Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001, *** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.01, * en caso de P \leq 0.05 y ns en caso de P>0.05 (no significativo)(Student t, 3 h p.i vs 3 h p.i block).

%ID/g	1 h p. i	3 h p. i	3 h p.i block	6 h p. i
Sangre	1.6 ± 1.1	0.73 ± 0.01	0.40 ± 0.2	0.70±0.1
Hígado	3.2 ± 1,1	1.8±0.7	2.3±1.3	2.0± 0.7
Corazón	2.5 ± 1.1	2.5± 1.4	1.7 ± 0.7	2.4± 0.6
Pulmones	4.1 ± 0.5	1.5±1.0	1.0 ± 0.7	2.8±0.3
Bazo	2.3 ± 1.2	1.4 ± 0.4	1.4 ± 0.3	1.8 ± 0.4
Riñones	73±16	55±8.6	33±12(****)	58± 5.4
Tiroides	2.5±0.6	3.6±2.1	2.3±0.5	2.2 ± 0.3

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 109

Músculo	0.10 ± 0.03	0.20±0.07	0.20±0.07	0.20± 0.03
Hueso	0.20 ± 0.09	0.20±0.2	0.30±0.1	0.30± 0.1
Estómago	4.1 ± 0.30	2.5±1.0	1.1±0.020	4.1±1.3
Tumor	5.8 ± 0.50	3.7±0.4	1.7±0.9 *	3.1±0.6
Relaciones				
Tumor/Músculo	31 ± 11	15 ± 6.6	7.8 ± 1.5	14 ± 1.4
Tumor/Sangre	2.8± 1.5	5.5 ± 3.5	6.9 ± 2.6	4.7 ± 1.1
Tumor/Hígado	$1,4 \pm 0.1$	3.0 ± 1.9	0.70±0.2	1.8 ± 0.8
%ID				
Orina + Vejiga	10 ± 1.3	54 ± 14	39 ± 22	52±9.5
TGI	3.7 ± 0.60	4.7± 0.50	6.8± 5.1	4.0± 0.50



Figura 47: %ID/g (arriba) y %ID (abajo) para los estudios de biodistribución del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) /Tricina/NA en ratones Balb/c hembra portadores de tumor 4T1 (promedio \pm SD). Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001, *** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.05 y ns en caso de P \geq 0.05 (no significativo)(Student t).

A su vez observamos una captación tumoral rápida ($5.8 \pm 0.50 \text{ \% ID/g}$, $3.7 \pm 0.40 \text{ \% ID/g}$ y $3.1 \pm 0.60 \text{ \% ID/g}$ a 1, 3 y 6 h, respectivamente). Las relaciones Tumor/Músculo fueron al

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 111

mismo tiempo altas, siendo de 31 ± 11 , 15 ± 6.6 , 14 ± 1.4 a 1, 3 y 6 h, respectivamente. Cabe destacar también que la relación tumor-sangre se mantuvo consistentemente por arriba de 2.

En último lugar, observamos que el bloqueo con el péptido frío previo a la inyección del complejo radiomarcado redujo significativamente la captación tumoral a las 3 h p.i (3.7 ± 0.4 % ID/g vs 1.7 ± 0.9 %ID/g, P ≤ 0.05 , Student t), más de un 50%, mientras que el único otro órgano afectado fue el riñón (55 ± 8.6 %ID/g vs 33 ± 12 %ID/g, P ≤ 0.0001 , Student t), demostrando por consiguiente la especificidad de nuestro radiofármaco por su blanco LHRH-R *in vivo*.

Los resultados obtenidos en estos ensayos son similares a los ya publicados por el grupo de *Zoghi et al*^{188,195} utilizando un complejo [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-GnRH-I en ratones portadores de tumores 4T1; donde los autores reportan un alto *uptake* renal rápido (90%), un uptake tumoral máximo de 13.99 \pm 1.37%ID/g a las 4 h, con altas relaciones Tumor/Músculo, así como del complejo [¹¹¹In]In-DOTA-TRP-HYD en ratones portadores de tumores 4T1, donde observan un claro clearance renal, y una captación tumoral >50%ID/g en los tiempos estudiados (0.5-24 h p.i).

3.2.7-Estudios SPECT/CT en ratones hembra xenográficos (4T1, BT-474, MCF-7):

El potencial como agente imagenológico del radiofármaco [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA fue examinado en los modelos murinos mencionados en el párrafo anterior. Hembras Balb/c portadores de tumores 4T1 (n=3) fueron examinadas por SPECT/CT a 1, 3 y 5 h p.i, habiendo anteriormente protegido el sistema renal con una mezcla de gelofusine y L-Arginina, inyectada 10 min previo al estudio.

A pesar de la alta concentración de radioactividad en los riñones y el tracto urinario, especialmente la vejiga (similar a lo observado previamente en las biodistribuciones), se pudo apreciar claramente el tumor 4T1 xeongrafico por SPECT/CT.

No se observó una alta radioactividad en el resto de los órganos no blanco (Ver Figura 48).

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 112

Las relaciones Tumor/Músculo (T/M) fueron mayores a 3 en todos los puntos evaluados $(3.8\pm0.1; 8\pm2 \text{ y } 13\pm4, \text{ a } 1, 3 \text{ y } 5 \text{ h respectivamente})$, calculadas mediante volúmenes de interés (VOIs) manuales. Cabe destacar que, si bien se observan hot spots dentro de los tumores, la inconsistencia de los mismos imposibilito su estudio por medio de VOIs de forma rigurosa.



Figura 48: SPECT/CT coronal del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) /Tricina/NA en ratones Balb/C portadores de tumores 4t1 a 1, 3, y 5 h post inyección (izquierda a derecha). Notar los VOIs del tumor (azul), hot spots (verde y celeste) y músculo (violeta).

En cuanto a los ensayos de bloqueo con péptido frío (100 µg/100 µL, administrado 30 min antes de la inyección del radiofármaco) a 1, 3 y 5 h post inyección, observamos diferencias en los tiempos de 3 y 5 h entre los tumores bloqueados y los no bloqueados (Ver **Figura 49**). Las relaciones Tumor/Músculo (T/M) demuestran una diferencia significativa a las 5 h (13±4 vs. 6.1 ± 0.8 , Student t-, P≤0.05), calculado manualmente por volumen de interés (VOIs) manuales (Ver **Figura 50**). De esta forma nuevamente confirmamos la especificidad de nuestro radiofármaco por el receptor de LHRH *in vivo* por una segunda técnica.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 113



Figura 49: SPECT/CT coronal del complejo [99m Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA en ratones Balb/C portadores de tumores 4t1 a 1, 3, y 5 h post inyección (izquierda a derecha), posterior a bloqueo con péptido frío (100 µg/100 µL). Notar los VOIs del tumor (azul), hot spots (verde y celeste) y músculo (violeta).



Figura 50: Comparación de relaciones Tumores/Músculo (T/M) entre ratones Balb/c portadores de tumores 4T1 previamente bloqueados con péptido frio o no; calculados por

VOIs manuales (SPECT/CT). Graficamos * para P≤0.05 (Student t).

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 114

Cabe destacar que *Zoghi et al* ¹⁹⁵en su estudio SPECT *dual head* con el complejo [¹⁷⁷Lu]Lu -DOTA-TRPHYD, demuestran también una clara visualización del tumor 4T1 en hembras Balbc/c portadoras del mismo, a 48 h p.i, sin observar una alta captación en el resto de los órganos.

Evaluamos a su vez el potencial como agente imagenológico del radiofármaco [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA en dos modelos de cáncer de mama humanos previamente mencionados; BT-474 (HER2 + Luminal) y MCF-7 (HER2-,Luminal A) por SPECT/CT a 1, 3 y 5 h p.i.

En la **Figura 51** (arriba) observamos un ratón portador de tumor BT-474, (n=1), mientras que abajo observamos un ratón portador de tumor MCF-7 (n=2). Observar que podemos vislumbrar claramente el tumor a nivel del hombro izquierdo (sitio de inoculación de línea celular) a su vez se observa una alta captación renal, consistente con las biodistribuciones realizadas. Tener en cuenta que, en casi todos los puntos, la relación Tumor/Músculo supera 2 para ambos modelos tumorales, con un máximo de 3.87 a 1 h p.i para el tumor BT-474 y de 3.1 ± 0.9 para el tumor MCF-7 al mismo tiempo p.i.





Figura 51: SPECT/CT coronal del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA en ratones nude hembras portadores de tumores BT-474 (arriba) y MCF-7 (abajo) a 1, 3 y 5 h post inyección, (izquierda a derecha). Notar los VOIs del tumor (azul).

Podemos por lo tanto nuevamente observar el potencial del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA en distintos tumores de cáncer de mama *in vivo* por la técnica de SPECT/CT, lo que hace a nuestro radiotrazador un candidato más que óptimo para continuar y ampliar los estudios preclínicos *in vivo*, así como considerar un futuro pasaje a la clínica.

Similares resultados se obtuvieron en el trabajo de *Okarvi et al*¹⁹⁹ en por micro PET en ratones nude hembra xenografiadas con tumores MCF-7 con el complejo [⁶⁸Ga]Galeuprolide a 45 min p.i, pudiendo detectar claramente el tumor y observando alta captación en vejiga y estómago, concordante con los estudios de biodistribuciones realizados en este mismo modelo.

A su vez, *Guo et al* ¹⁹⁸, demostró en su trabajo con el complejo [¹¹¹In]In-DOTA-Ahx-(D-Lys6 -GnRH1) en modelos de ratones hembra xenografiados con tumores MDA-MB-231 la utilidad de dicho complejo como agente de imagen, tanto por biodistribución (máxima captación tumoral de 1.76 \pm 0.58 %ID/g a 0.5 h p.i, máxima relación Tumor/Músculo de 9.67 a 2 h p.i) como por SPECT/CT, demostrando un marcado clearance renal y pudiendo vislumbrar el tumor claramente.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 116

3.2.8-Estudios biológicos in vitro de unión celular en líneas de cáncer de próstata:

Los estudios *in vitro* de unión y de bloqueo mediante la incubación de[^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA en las líneas LnCap, PC3 y Du-145 (CaP humano) se realizaron para evaluar la afinidad y la unión específica del conjugado al LHRH-R (Ver **Figura 52-54**).

Como ya mencionamos anteriormente, empleamos como control negativo las líneas NIH-3T3 (fibroblastos murinos) y CHO-K1 (células de embrión de hámster, LHRH -). A su vez, utilizamos la línea de próstata human normal RWPE-1 como control biológico de nuestro ensayo

En la línea celular RWPE-1 presentó resultados similares a las CHO-K1 (unión a membrana menor a 1.00 % e internalización celular menor a 0.30%). Estudios estadísticos confirman que no hay diferencia significativa entre esta línea y nuestro control negativo CHO-K1 (Two-way ANOVA)

En la línea celular LnCap, la unión a membrana máxima fue de 33.5 ± 0.5 % a los 45 min y la mínima de 10.3 ± 1.5 % a los 60 min, mientras que la internalización máxima fue de 3.8 ± 1.1 % a los 45 min y una mínima de 2.5 ± 0.6 %, % a los 15 min.

En la línea celular PC3, la unión a membrana máxima fue de 10.6 ± 2.1 % a los 15 min, mientras que la mínima fue de 3.8 ± 0.4 % a los 60 min; mientras que la internalización máxima fue de 1.9 ± 0.7 % a los 15 min y la mínima de 1.4 ± 0.2 % a los 45 min respectivamente.

En la línea celular Du-145, la unión a membrana máxima fue de 13.9 ± 1.8 % a los 45 min, mientras que la mínima fue de 7.1 ± 1.1 % a los 60 min; mientras que la internalización máxima fue de 1.7 ± 0.4 % a los 60 min y la mínima de 1.1 ± 0.2 % a los 30 min respectivamente.

Nuevamente, estudios estadísticos (Two-Way ANOVA) entre las uniones en membrana de los controles negativos (CHO-K1) y el resto de las líneas celulares, demostraron una

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 117

diferencia significativa (P<0.05) frente a todas las líneas de cáncer de próstata evaluadas, en todos los tiempos; mientras que no se encontraron diferencias frente a la línea NIH-3T3 ni RWPE-1. Estos mismos resultados también son vislumbrados en la internalización celular (Ver **Figuras 52-53**).

A su vez, observamos que nuevamente, hay un mayor porcentaje de unión a membrana que de internalización, consistente a lo visto anteriormente en las líneas celulares de cáncer de mama, por lo que no realizamos ensayos de eflujo celular.



Figura 52: Porcentaje de unión a membrana del complejo [99m Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) /Tricina/NA en líneas celulares CHO-K1, NIH-3T3, RWPE-1, LnCap, PC3 y Du-145 (promedio ± SD, n=4). Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001, *** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.05 y ns en caso de P \geq 0.05 (no significativo)(Two way-ANOVA).

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 118



Figura 53: Porcentaje de internalización celular del complejo [99m Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) /Tricina/NA en líneas celulares CHO-K1, NIH-3T3, RWPE-1, LnCap, PC3 y Du-145 (promedio ± SD, n=4). Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001, *** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.05 y ns en caso de P>0.05 (no significativo)(Two way-ANOVA).

Realizamos nuevamente ensayos de bloqueo con exceso de LHRH(D-Lys6) previo a la exposición con nuestro radiofármaco, encontrando diferencias significativas (Student t) en dos de las líneas de CaP evaluadas (PC3 y LnCap), denotando la alta especificidad del radiofármaco por dichas líneas; no vislumbradas en los controles negativos (NIH-3T3 y CHO-K1) ni en la línea de próstata normal RWPE-1 (Ver **Figura 54**).

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 119



Figura 54: Porcentaje de unión a membrana con y sin bloqueo (20 µg LHRH (D-Lys) para todas las líneas de cáncer de próstata evaluadas (promedio \pm SD, n=4). Se grafica **** en caso de P≤0.0001, *** en caso de P≤0.001, ** en caso de P≤0.01, * en caso de P≤0.05 y ns en caso de P>0.05 (no significativo) (Student t).

En el caso de la línea Du-145, no vislumbramos un bloqueo estadísticamente significativo con el exceso de péptido evaluado (20 µg/pocillo, 400X frente al radiofármaco). Esto puede ser debido a la menor cantidad de receptores presentes en la célula, por lo que se requiere un mayor exceso para lograr vislumbrar dicho bloqueo (500X-1000X), consistente a lo visto en los trabajos de *Farahani et al* ^{192,194}. A su vez, en su trabajo, *Zoghi et al* ^{188,195,} también demuestran una unión específica del [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-TRPHYD a la línea LnCap, y del complejo [¹¹¹In]In-DOTA-TRP-HYD a la misma.

Similar a los trabajos anteriormente realizados, observamos que nuestro radiofármaco es específico por su receptor en distintas líneas celulares de cáncer de próstata, que poseen distintos perfiles, como ser hormono sensible u andrógeno dependiente (LnCap) o resistente

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 120 a la castración (Du-145, PC3), ver **Tabla 10,** lo cual nuevamente aumenta la potencialidad de nuestro radiofármaco a la hora del diagnóstico.

Tabla 10: Resumen de características de las líneas celulares de próstata utilizadas en esta tesis. Modificado de ²⁹⁴.

Características de líneas de CaP utilizadas							
Línea celular	Origen	AR	PSMA				
Células epiteliales no	o cancerígena						
RWPE-1	Zona periférica de la próstata	+	+				
	normal						
Hormono dependien	te						
LnCap	Metástasis nodo linfático	+	+				
Resistente a la castración							
PC3	Metástasis vértebras lumbares	-	-				
Du-145	Metástasis cerebral	-	-				

Nuevamente, estos resultados apoyan nuestra hipótesis inicial basada en la sobreexpresión del receptor del LHRH en líneas de cáncer de próstata para el potencial uso del análogo del LHRH(D-Lys6) como agente de imagenología molecular.

Realizamos a su vez un ensayo de afinidad por el receptor, únicamente en las células LnCap, al ser las que presentan una mayor unión celular (Ver **Figura 55**). El valor de Kd (*One site*) fue de 108±61.9 nM, y el Bmax de 8537±2840 CPM, manteniéndose en el mismo orden de los obtenidos previamente por *Farahani et al* ^{192,194} (kd=47.9±7.47 nM, Bmax= 9378±597.6 para [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-Ahx-D-Lys6 GnRH y kd= 89.39±26.71 [^{99m}Tc]Tc-HYNIC (tricina/ EDDA)-Gaba-D-Lys6GnRH), si bien tenemos un desvío estándar muy grande, por lo cual más ensayos serían convenientes.



Figura 55: Ensayos de saturación del complejo [99m Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) /Tricina/NA en la línea celulares LnCap (promedio ± SD, n=3).

3.2.9-Estudios biodistribución en ratones macho normales y xenográficos (LnCap, PC3):

Las propiedades *in vivo* del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) /Tricina/NA también fueron evaluadas en ratones Swiss machos normales (n=4) y ratones nude (Base Swiss) portadoras de tumores LnCap (n=2) y PC3 (n=4) 3 h post inyección.

Similar a lo visto en el modelo Balb/c hembra, la acumulación de radioactividad en otros órganos no blanco fue mínima (< 3% ID/g). Se observó nuevamente un claro clearance renal, con altas actividades en riñones, orina y vejiga; y baja actividad retenida en sangre.

Se exhibe una actividad tumoral mediana-baja $(2.44 \pm 1.07 \text{ \%ID/g} \text{ en los ratones portadores de tumores LnCap y 0.82±0.12% ID/g en los ratones portadores de tumores PC3) (Ver$ **Tabla 11, Figura 56**). Nuevamente, la acumulación de radioactividad en otros órganos fue mínima. Se observó un clearance sanguíneo rápido, y baja actividad retenida en sangre a las 3 h. Las relaciones Tumor/Músculo fueron altas, de 7.1 ± 3.9 y 10 ± 2.9 para los tumores LnCap y PC3 respectivamente, a la vez que nuevamente las relaciones tumor-sangre se mantienen

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 122

>3. Notar también nuevamente la baja actividad en la tiroides, indicadora de la estabilidad del complejo.

Tabla 11: Resultados de los estudios de biodistribución (promedio \pm SD) en ratones Swiss normales y nude portadores de tumores LnCap u PC3%ID/g (arriba) and %ID (abajo). ID=Dosis inyectada. Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001, *** en caso de P \leq 0.001, * en caso de P \leq 0.001, * en caso de P \leq 0.05 y nada en caso de P>0.05 (no significativo) (Student t, comparación Swiss normales).

%ID/g	Ratón Swiss normal	Ratón nude LnCap+	Ratón nude PC3+
Sangre	0.23 ± 0.11	1.6 ± 0.19	0.20 ± 0.04
Hígado	2.2 ± 0.32	0.91 ± 0.04	2.3 ± 1.7
Corazón	Corazón 0.22 ± 0.04		0.41 ± 0.22
Pulmones 0.89 ± 0.31		1.8 ± 0.08	0.83 ± 0.51
Bazo	Bazo 1.4 ± 0.25		1.0 ±0.96
Riñones	1.5 ± 0.59	8.5 ± 5.5 (****)	4.0 ± 0.94 (****)
Tiroides	Tiroides 0.50 ± 0.12		0.31 ±0.19
Músculo	0.070 ± 0.03	0.35 ± 0.41	0.070 ± 0.04
Hueso	0.060 ± 0.008	0.89 ± 0.05	0.03 ±0.02
Estómago	2.4 ± 1.55	1.9 ± 042	0.77 ± 0.34 (**)

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 123

Tumor	-	2.4 ± 1.1	0.82 ± 0.12
Relaciones			
Tumor/Músculo	_	7.1 ± 3.9	10 ± 2.9
Tumor/Sangre	_	3.8 ± 1.3	4.2 ± 1.4
Tumor/Hígado	-	1,61 ± 1.1	0.6 ± 0.8
%ID			
Orina+ Vejiga	53 ± 18	47 ± 0.63	66 ± 13
TGI	1.4 ± 0.64	17 ± 13	2.1 ± 1.2



Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 124



Figura 56: %ID/g (arriba) y %ID (abajo) para los estudios de biodistribución del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6) /Tricina/NA en ratones Swiss macho y nude portadores de tumores LnCap y PC3 (promedio \pm SD, n=2-4). Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001, *** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.05 (no significativo) (Student t).

Podemos observar a su vez, que únicamente hay diferencias significativas entre el grupo normal (Swiss) y los portadores de tumores en el riñón $(1.5 \pm 0.59 \% \text{ ID/g vs } 8.5 \pm 5.5 \% \text{ID/g}$ (LnCap) y vs $4.0 \pm 0.94 \% \text{ID/g}$ (PC3), P ≤ 0.0001 , Student t) y el estómago entre los ratones normales Swiss y los portadores de tumor PC3 ($2.4 \pm 1.6 \% \text{ID/g}$ vs $0.77 \pm 0.34 \%$ ID/g, P ≤ 0.01 , Student t). A su vez, comparando entre ambos grupos portadores de tumores, solo apreciamos una diferencia significativa en los riñones ($8.5 \pm 5.5 \% \text{ID/g}$ (LnCap) y 4.0 $\pm 0.94 \% \text{ID/g}$ (PC3), P ≤ 0.01 Student t).

Es relevante resaltar que el patrón de biodistribución observado tanto en los modelos normales como tumorales de cáncer de próstata y mama son similares, demostrando una marcada eliminación renal y baja captación en el resto de los órganos. A su vez observamos una captación tumoral moderada-baja en todos los modelos tumorales evaluados (1-6%) y una óptima relación tumor músculo (mayor a 5 en todos los modelos evaluados).

Todos estos estudios demuestran la capacidad del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA como agente de imagenología molecular para cáncer de próstata en dos modelos celulares diferentes (PSMA+ y PSMA-, hormono dependiente y resistente a la castración), lo cual confiere a nuestra molécula una gran versatilidad en el diagnóstico de dicha patología. Nuevamente, cabe destacar que los resultados obtenidos son similares a los encontrados por *Farahani et al*¹⁹⁴ en sus estudios en modelos *in vivo* LnCap.

Para el compuesto [^{99m}Tc]Tc-(EDDA/tricina)-HYNIC-GnRH(análogo) sintetizado por *Farahani et al* ^{192,194}; en la línea LnCap citan un uptake tumoral rápido ($3.67 \pm 0.42\%$ ID/g y 1.01 ± 0.18%ID/g a 1 y 4 h p.i., respectivamente), similar al observado en este trabajo, con un claro clearance renal reducido a las 4 h ($7.01 \pm 1.88\%$ ID/g), baja actividad en sangre y relaciones Tumor/Músculo similares a las mencionadas en este trabajo (máximo de 4.14 a 1 h p.i)¹⁹⁴. Por su parte, el [^{99m}Tc]Tc HYNIC-Gaba-D-Lys6GnRH presenta un uptake tumoral máximo de 1.72±0.45\%ID/g a 1h p.i y una relación Tumor/Músculo máxima de 2.3 en este mismo tiempo ¹⁹².

3.2.10-Estudios imagenológicos SPECT/CT en ratones macho Nude portadores de tumores (LnCap, PC3):

El potencial como agente imagenológico del radiofármaco [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA fue evaluado en los modelos tumorales mencionados en la sección anterior. Machos nude portadores de tumores LnCap y PC3 (n=3) fueron evaluados por SPECT/CT 1-5 h p.i.

Similar a lo observado en los modelos anteriores, en los ratones portadores de tumores LnCap (**Figura 57**) podemos visualizar una alta concentración de actividad a nivel de riñones y tracto urinario (consistente con los estudios de biodistribución), se puede a su vez visualizar claramente los tumores xenografiados por SPECT/CT.







Resultados similares fueron observados en los ratones portadores de tumores PC3, pudiendo detectar los tumores en las imágenes SPECT/CT, a su vez se logra observar alta radioactividad en riñones y vejiga, consistente a las biodistribuciones realizadas (Ver **Figura 58**).



Figura 58: SPECT/CT coronal del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA en ratones nude macho portadores de tumores PC3, a 1, 3, y 5 h post inyección (izquierda a derecha). Notar los VOIs del tumor (azul).

Nuevamente, el resto de los órganos no blancos no tuvieron una alta radioactividad. Las relaciones Tumor/Músculo (T/M) fueron superiores a 3 en casi todos los puntos evaluados (máximo de 3.7 ± 0.1 para LnCap a 1 h p.i y 5 ± 2 a 5 h p.i para PC3, sin observarse diferencias significativas entre los dos grupos (Student t), Ver **Figura 59**), calculadas mediante volúmenes de interés (VOIs) manualmente. Cabe destacar que, nuevamente si bien se observan *hot spots* dentro de los tumores, la inconsistencia de los mismos imposibilito su estudio por medio de VOIs de forma rigurosa.



Figura 59: Comparación de relaciones Tumor/Músculo (T/M) entre ratones nude portadores de tumores LnCap y PC3; calculados por VOIs manuales (SPECT/CT) con el radiofármaco [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA.

Nuevamente observamos el potencial del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA en distintos tumores de cáncer de próstata *in vivo* por la técnica de SPECT/CT, lo cual aumenta la potencialidad de nuestro radiotrazador como un posible candidato de agente de imagenología molecular no solo de una sino de dos patologías oncológicas de sumo interés a nivel mundial.

A su vez, nuevamente observamos resultados similares a los trabajos de *Farahani et al*^{194,295}, en donde estudios SPECT en ratones portadores de tumores LnCap, lograron una clara visualización de los mismo, con patrones similares a los vistos en los ensayos de biodistribución y una baja captación por el resto de los órganos.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 129

3.3 Conclusiones:

Como ya se mencionó anteriormente, la generación de nuevos agentes de imagenología SPECT/CT para cáncer de mama y próstata nos podrían ayudar a la comprensión, monitoreo, estadificación y re-estadificación de estas enfermedades que se posicionan como una problemática de salud pública a nivel mundial. Tomando esto en cuenta, en el desarrollo de esta tesis hemos generado un nuevo agente de imagen basado en el empleo del péptido GnRH (u LHRH) modificado en su estructura con una D-Lisina en la posición 6 y unido a un linker GSG y el agente quelante HYNIC como agente de imagen SPEC/CT. Este complejo fue exitosamente radiomarcado de forma sencilla y reproducible, obteniendo altas purezas radioquímicas y preservando su actividad biológica *in vitro*.

Logramos confirmar la alta especificidad por el receptor del LHRH del agente de imagen desarrollado mediante estudios *in vitro* en distintas líneas celulares de cáncer de mama y próstata.

Tanto los ensayos de biodistribuciones como las imágenes SPECT/CT nos permitieron observar la captación tumoral del mismo y evaluar su potencial rol como agente de imagen oncológica. Esperemos que dichos agentes moleculares abran el camino, tanto global como local, a nuevas estrategias diagnósticas para dichas patologías.

Se debe tener en cuenta que, si bien el radiofármaco presenta potencial, aún son necesarios más estudios (mejorar actividad específica, escalado, métodos de control de calidad, formulación GMP) para llegar en el futuro a su posible uso en humanos.

A su vez, debe considerarse que todos los estudios presentados son considerados en cuanto a la presencia de tumor primario, sin considerar su uso en cuanto al diagnóstico de posibles metástasis generadas por dicho tumor primario.

Cabe destacar que la generación de este radiofármaco significa un aumento en las capacidades del campo de la radiofarmacia y la medicina nuclear en el país y mundialmente. Por este motivo es que parte de los resultados mostrados en este capítulo se publicaron en la revista indexadas y arbitradas, como ser la revista "Salud Militar" ("Hormona liberadora de

la hormona luteinizante (LHRH): potencial agente de oncología molecular", 2018²⁹⁶) así como en la revista "Oncology" ("Preclinical evaluation of ^{99m}Tc-labeled LHRH as GnRH receptor imaging.", 2024, en proceso de revisión a la fecha). A su vez, fueron presentados en diversos congresos tanto nacionales como internacionales (Encuentro Nacional de Química 8 2023, Terachem 2022).

Vale la pena notar que, como se comenta en la sección 1.1.6 y 1.2.6, en cuanto al uso de la metodología SPECT/CT en el diagnóstico de cáncer de mama y próstata en Uruguay, esta principalmente se usa para centellograma óseo (mama y próstata) así como la detección de ganglio centinela (mama), y no hay radiofármacos hoy en día en el mercado capaz de dirigirse a la propia célula cancerígena e identificar específicamente, por lo cual la existencia del [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA sería el primero de este tipo en el país, un logro que no es menor.

También es necesario valorar el ingreso de este radiofármaco a los ya mencionados en las Tablas 2 y 4 del anexo, siendo una herramienta más dentro de las ya existentes y las actualmente desarrolladas mundialmente para abarcar el diagnóstico de estas patologías. Como ya fue mencionado durante el capítulo 3, logramos obtener resultados similares a los presentes en la bibliografía, en particular cabe destacar los obtenidos previamente por *Farahani et al* ^{192,194} para el compuesto [^{99m}Tc]Tc-(EDDA/tricina)-HYNIC-GnRH(análogo) y [^{99m}Tc]Tc- HYNIC (tricina/ EDDA)-Gaba-D-Lys6GnRH, lo que aporta mayor validez científica a las conclusiones de esta tesis y a su vez aumenta la posibilidad del LHRH como agente de imagenología molecular en llegar a la clínica.

Es a su vez destacable que estamos tratando de un radiofármaco capaz de ser dirigido específicamente a dos patologías distintas, aumentando así su posible uso en un contexto clínico. También cabe destacar su posible uso no solo en dos patologías distintas sino en distintos subtipos de dicha patología, lo cual no es lo más común en radiofáramcos hasta la fecha.

En conclusión, el [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA presenta ser un buen candidato posible para su uso en clínica a futuro, si bien aún quedan incógnitas por resolver para dicho pasaje.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 131

4-Generación Radiofármaco de ⁶⁸Ga basado en el péptido DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6):

4.1 **Materiales** Métodos: y Como lo mencionado anteriormente, todos los productos químicos, salvo indicación contraria, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). El agua fue purificada y desionizada (18 M Ω /cm2) mediante un sistema de filtración de agua Milli-Q (Millipore Corp., Milford, MA). Los generadores de ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga fueron adquiridos de ITG (ITG Isotopoe Technologies Garching GMbH, Alemania). La actividad radiactiva se contó en un calibrador de dosis Capintec CRC-25PET o CRC-25R y en un detector de contador de centelleo sólido con un cristal de NaI(Tl) de 3"x3" asociado con un analizador de un solo canal (ORTEC, Oak Ridge, TN). La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se llevó a cabo en el mismo sistema anteriormente mencionados, un sistema Agilent 1200 Series Infinity Star equipado con un detector GABI, un detector UV y una columna C18 (Restek, Ultra C18, 250 mm x 4.6 x 10 micrones). La detección de radio-TLC se realizó mediante cromatografía de capa fina instantánea (ITLC) en tiras de gel de sílice (Pall Corporation, Port Washington, NY).

4.1.1 Síntesis del péptido DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6):

El péptido DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) (pGLU}HWSY{D-LYS(Ahx-DOTA)}LRPG) fue producido por la empresa Genscript (EEUU), en su forma derivatizada con el agente quelante bifuncional DOTA (ácido tetraacético 1, 4, 7,10-tetra-azacyclododecane –N, N`, N", N''') con una pureza química > 95%, determinada por HPLC-UV y un peso molecular de 1753 g/mol (determinado por espectrometría de masas) en forma liofilizada (14 mg). A su vez se obtuvo el péptido LHRH(D-Lys6) de forma liofilizada.

Ya se ha mencionado anteriormente la razón por la cual reemplazamos la Gly6 por una D Lys6, por lo cual esta vez utilizamos el agente espaciador Ahx (Acido 6-aminoexoico) como linker flexible para unir al agente quelante bifuncional DOTA (Ver **Figura 60**). Este linker ha sido ampliamente utilizado para modificar péptidos pequeños con actividad biológica, evitando que pierdan su afinidad por su ligando ²⁹⁷.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 132



DOTA-Ahx-(D-Lys6-LHRH)

Figura 60: Esquema del péptido DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) utilizado como precursor.

4.1 2. Marcación del péptido con [⁶⁸Ga]GaCl₃:

Se estudiaron distintas condiciones de marcación del DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) con $[^{68}Ga]GaCl_3$ empleando distinta cantidad de precursor (20-40 µg), soluciones y pH final presentados en la **Tabla 12**:

 Tabla 12: Buffers utilizados para el marcado del DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6).

Soluciones utilizados para el marcado para el péptido Ahx-DOTA-LHRH(D-Lys6) con [⁶⁸ Ga]GaCl ₃							
Soluciones Molaridad pH							
Acetato de Amonio	0.5	5.2					
Acetato de Amonio	0.5	7					

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 133

Bicarbonato de Sodio	0.1	8.5
Acetato de Sodio Trihidratado	1.14	8.4
Acetato de Sodio Trihidratado	1.25	8.2-8.4
Acetato de Sodio	1.25	8.4

En resumen, se eluye el generado de 68 Ge/ 68 Ga (ITM) con 4 mL de HCL (0.05M), y se utiliza aproximadamente 600 µL de [68 Ga]GaCl₃, se mezcla con distintas cantidades del precursor (20-40 µg) y se agregó los buffers mencionados en la **Tabla 12** (100-300 µL) hasta llevar a pH óptimo (4-5) y volumen (~1 mL). La mezcla de reacción se incubo en diferentes temperaturas (90-100 °C) por 10-20 min.

Las purezas radioquímica de los marcado fueron analizadas mediante HPLC-RT utilizando el mismo sistema mencionado en el capítulo 3 (3.1.2).

También se evaluó por *instant thin layer chromatography* (ITLC) en sílica gel (ITLC-SG). Las fases móviles utilizadas fueron: metanol y Buffer acetato de sodio 1.25 M (1:1) para denotar la presencia de [⁶⁸Ga]Ga-coloide (Rf=0) y nuestro radiofármaco (Rf=1)

4.1.3 Purificación del radiofármaco [68Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6):

El control y purificación de los complejos peptídicos marcados se realizaron mediante HPLC utilizando el método mencionado anteriormente en el capítulo 3.1.3. Posteriormente se diluyó la fracción purificada con aproximadamente 500 μ L de PBS 0.1 M pH 7.4 y el ACN se redujo aplicando una corriente de N₂. Finalmente, se controla pH y si es necesario se añade PBS 0.1 M pH 7.4.

Paralelamente, también probamos purificar el complejo por cartuchos Sep-pak C18 light (Waters), preparando el cartucho con metanol (1 mL), agua (5 mL), cargando la muestra y lavando 2 veces con agua, para luego eluir con metanol 90-100 % (1 mL).

4.1.4 Coeficiente de reparto o Log P:

Para evaluar los valores de Log P, se purificaron por Sep-Pak el radiofármaco [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) (<1mL). Tubos conteniendo 500 μ L de Octanol y 500 μ L del conjugado marcado disuelto en PBS (~30 MBq), fueron vigorosamente agitados durante 1 min y centrifugados a 14.000 rpm durante 10 min. Seis fracciones de 100 μ L fueron colectadas de ambas fases, para la medición de sus respectivas cuentas en un contador de pozo de NaI. El coeficiente de reparto se obtuvo como el log (cuentas por min en octanol / cuentas en fase acuosa) (n=3).

4.1.5 Estabilidad in vitro:

-Estabilidad en PBS:

Se estudió la estabilidad *in vitro* del [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6)

Para esto, se purificaron por Sep-Pak todos los conjugados por el método previamente descrito. Se incubó una alícuota de 10 MBq de cada complejo en 500 μ L de PBS a 37° C hasta 4 h. Cada experimento fue realizado por triplicado y controlado por HPLC e ITLC-RT (n=3).

-Unión a proteínas plasmáticas:

Se estudió la estabilidad *in vitro* del marcado incubando una alícuota del complejo (300 μ L, 10 MBq) en SFB (300 μ L) a 37° C, hasta 2 h. Las proteínas fueron precipitadas con ACN y centrifugadas (1750 g, 5 min, 4° C). Se midió la actividad del precipitado y del sobrenadante en un contador de pozo de NaI. Se calculo el porcentaje del complejo en el sobrenadante y en el pellet (n=3).

-Estabilidad en suero humano:

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 135

Se estudio a su vez la estabilidad del complejo en suero humano hasta 2 h, de modo similar al punto anterior.

En este caso, una vez que el sobrenadante es separado, se pasó por filtros Millipak \mathbb{B} de 0.22µm y fue analizado por RP-HPLC por el método previamente descrito (n=3).

-Estabilidad en EDTA, DTPA, acetato de sodio 1.25 M pH 8.2 y FeCl₃ 0.1 M:

Similar a los puntos anteriores, se tomó una alícuota del marcado purificado (200 μ L, 20 MBq) y se mezcló con una solución de: EDTA 200 mM (800 μ L), DTPA 200 μ M (800 μ L), FeCl₃ 0.1 M (800 μ L) o buffer de marcado (acetato de sodio 1.25 M pH 8.2, 800 μ L). Se incubo hasta 2 h, analizando su pureza radioquímica por HPLC e ITLC-RT.

4.1.6 Modelos celulares:

Se utilizan las líneas celulares anteriormente mencionadas en el capítulo anterior (3.1.6), con excepción de la línea celular MDA-MB-435, crecidas en las mismas condiciones ya establecidas.

4.1.7 Estudios biológicos *in vitro* de unión celular:

Se realizó un ensayo de afinidad de unión específica en todas las líneas celulares mencionadas. de la misma forma al establecido en el capítulo 3.1.7.

En este caso, con el fin de confirmar el grado de unión no específica, se llevaron a cabo estudios blancos incubando el mismo número de células y [68 Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6), esta vez con la adición de 40 µg (x 800) de LHRH(D-Lys6) sin marcar durante 2 h a 37 °C, y se continúa con el estudio en las mismas condiciones experimentales anteriormente mencionadas.

4.1.8 Modelos in vivo:

La evaluación biológica in *vivo* del complejo de [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6)se llevó a cabo mediante la realización de estudios de biodistribución y PET/CT. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (protocolo #764, acta 240011-002293) y en caso de ser necesario, el Comité de Experimentación del Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM).

Los modelos utilizados en esta sección (Balb/c hembra, Balb/c hembra portador de tumor 4T1, Swiss macho, Nude macho portador de tumor LnCap y Swiss macho portador de tumor PC3) ya fueron discutidos previamente en el capítulo anterior (3.1.8).

Estudios de estabilidad biológica in vivo

Animales (n=3-4 por grupo) fueron inyectados por la vena de la cola con aproximadamente 0.5-1 Mbq (~20 μ Ci, 0.05 – 0.15 μ g) MBq del complejo de [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) y sacrificados por dislocación cervical luego de 0.5, 1 y 2 h (o solo 1 h). Los tejidos seleccionados (tumor, corazón, hígado, pulmones, tiroides, riñones, estómago, bazo, tracto gastrointestinal y vejiga) fueron extirpados, enjuagados de la sangre residual, pesados y sus radiactividades medida en un detector NaI(Tl). La sangre y orina fueron también colectados y medidos. La radioactividad en el tumor y en los tejidos normales es expresada como porcentaje de dosis inyectada (%ID) y como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g). Para los bloqueos, realizamos las biodistribuciones de la forma descrita anteriormente (n=3) a los mismos tiempos que los evaluados en el capítulo anterior. A su vez, realizamos un punto de bloqueo, inyectado 100 μ g/100 μ l de LHRH(D-Lys6) no marcado 30 min antes de la inyección del radiofármaco.

4.1.9 Imágenes PET/CT:

Las imágenes *Positron emition tomography* (PET/CT) fueron realizadas en una nanoScan PET/CT (Mediso) para pequeños animales.

Se utilizó una mezcla de 2-2.5% isoflurano y oxigeno como anestesia, seguido de la inyección intravenosa en la cola de [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) (5-20 MBq/ratón, 100-150 µL).

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 137

Se adquirieron imágenes de un modo dinámico, comenzando a t=0 p.i y durante 60 min (1 *frame* cada 10-15 min). Las reconstrucciones de las imágenes se analizaron utilizando el software PMOD versión 3.8 (PMOD Technologies, Ltd., Zurich, Switzerland) utilizando volúmenes de interés (VOI) elipsionales 3D manuales alrededor del tumor y músculo. Se realizaron imágenes de animales completos (4T1, LnCap) o limitados únicamente al área tumoral según lo requerido en el estudio..

4.2 Resultados y Discusión:

4.2.1 Síntesis del precursor:

Los péptidos LHRH(D-Lys6) y DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) fueron obtenidos a partir de la empresa Genscript S.A, de forma liofilizada. Los estudios por espectroscopia de masas y HPLC de ambos péptidos (proporcionados por la mencionada empresa) se muestran en las **Figura 61**. Se observa que el peso molecular del LHRH(D-Lys6) fue de 1253 g/mol y del DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) fue de 1753 g/mol0.



Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 138

Figura 61: Espectrometría de Masas (MS) (derecha) y cromatograma HPLC-UV (izquierda) de los péptidos DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) (arriba) y LHRH(D-Lys) (abajo) ´proporcionados por la empresa Genescript.

4.2.2 Marcación del DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) con [⁶⁸Ga]GaCl₃:

Primariamente se evaluó por HPLC en fase versa el perfil del péptido sin marcar mediante el empleo del detector UV en las condiciones mencionadas anteriormente, revelando un Tiempo de Retención (Tr = 6.85 min) (**Figura 62**).



Figura 62: Perfil de HPLC-RT del DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) en columna C18. Detector UV-Vis, Tr = 6.85 min.

Como ya mencionamos en la sección 4.1.2, realizamos distintos marcados y evaluamos inicialmente la pureza radioquímica por HPLC-RT e ITLC (Ver **Tabla 13**).

Tabla 13: Condiciones de marcado y porcentaje de pureza radioquímica (%PRQ) resultante(n=1-2) por HPLC-RT.

Resultados de marcación con [68Ga]GaCl3						
Precursor (µg)	Soluciones	[⁶⁸ Ga]GaCl ₃ (MBq)	pH final	Temperatu ra (°C)	Tiemp o (min)	%PRQ

40	Acetato de Amonio 0.5 pH 5.2 (1000 μL)	185	5	90	15	25
40	Acetato de Amonio 0.5 pH 7 (200 µL)	185	5	90	5	40
20	Bicarbonato de Sodio 0.1 M pH 8.5 (100-300 µL)	74	5	90	10	80-90
20	Acetato de Sodio Trihidratado 1.14 M pH 8.4 (100 µL)	74	5	90	10	80
40	Acetato de Sodio Trihidratado 1.25 M pH 8.4 (100 µL)	74	5	95	10	90-95
40	Acetato de Sodio	74	5	95	10	80

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 140

	Trihidratado 1.25 M pH 8.2 (100 μL)					
40	Acetato de Sodio 1.25 M pH 8.2 (100 μL)	74	5	95	15	95-99

De la tabla anterior se puede observar que, de todas las condiciones de marcación evaluadas se observó que el conjugado DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) se logró marcar con mejor pureza radioquímica determinada por HPLC-RT (99.21% \pm 1.39%, n=3) al emplear la solución de acetato de sodio 1.25 M pH 8.2 a un pH final de 5, incubando a 95°C por 15 min y utilizando 40 µg de péptido como precursor.

El complejo [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) se logró purificar exitosamente a través de HPLC, con un Tr de aproximadamente 6.97 min, **Figura 63**.



Figura 63. Perfil de HPLC-RT del complejo [68 Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) en columna C18. Detector Gamma, Tr = 6.97 min.

De la **Figura 63 y 64** se puede apreciar que en esta marcación no hay presencia de $[^{68}Ga]GaCl_3$ (Tr=3 m) o $[^{68}Ga]GaCl_3$ -DOTA (Tr=3.5 min) como impureza dentro de la corrida.

Realizamos a su vez ensayos para disminuir la cantidad de precursor, pero encontramos que esto disminuye notoriamente la pureza radioquímica del complejo (%PRQ menor 85%), aumentando la presencia del de [⁶⁸Ga]GaCl₃ libre (**Figura 64**).



Figura 64: Perfil de HPLC-RT del [68 Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) en columna C18. Detector Gamma, Tr = 6.97 min. Observar cercano a un tiempo de retención de 3 min la presencia de [68 Ga]GaCl₃ libre.

A su vez, realizamos ITLC-SG con mezcla Metanol:Acetato de sodio 1.25 M (1:1) para determinar la presencia de [68 Ga]Ga-Coloide (Rf=0) frente a nuestro radiofármaco (Rf=1). Logramos de esta forma observar que el mercado presenta aproximadamente un 3-6% de coloide como impureza radioquímica, dando una pureza radioquímica total cercana al 95 %. Obtenemos una actividad específica máxima alrededor de 0.92-9.25 MBq/µg, limitado principalmente por la cantidad de [68 Ga]GaCl₃ obtenida del generador y el volumen final del marcado (1-1.5 mL).

Luego de purificación con cartucho Sep-Pak, logramos una pureza radioquímica del radiofármaco de >98 % (HPLC-RT,ITLC), si bien este queda en un volumen alto (500-1000 μ L) y en metanol 100% como medio final, lo que dificulta para los ensayos celulares e *in vivo* a realizar posteriormente. Es por lo tanto necesario evaporar el metanol por medio de flujo de N₂.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 142

4.2.3 Coeficiente de Reparto o log P:

Se evaluó el carácter hidrofílico del complejo peptídicos marcado con 68 Ga, mediante el cálculo del coeficiente de reparto octanol-agua, obteniendo un log P de -2.73±0.12, demostrando nuevamente la hidrofilicidad del mismo.

4.2.4 Estabilidad in vitro:

Se estudió la estabilidad *in vitro* en PBS a 37 °C del conjugado hasta 4 h, demostrando que el mismo resulta estable en dichas condiciones, con una pureza radioquímica mayor al 94 % hasta las 4 h del estudio (HPLC-RT) (**Figura 65**).



Figura 65: Estudios de estabilidad *in vitro* en PBS del [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) (%PRQ: % Pureza radioquímica) (n=3).

También se estudió la unión a proteínas plasmáticas del complejo en SFB, a 37°C hasta 2 h de incubación (**Figura 66**), observándose una baja unión a proteínas plasmáticas del complejo, menor al 10 % a las 2 h.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 143



Figura 66: Unión a proteínas plasmáticas in *vitro* en SFB para el complejo [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) (n=3).

Estudiamos también la estabilidad del complejo en suero humano por medio de HPLC-RT, obteniendo una pureza radioquímica de 86.2 \pm 1.7 % y 81.6 \pm 1.1 % a la 1 y 2 h respectivamente (n=4, HPLC-RT) y nuevamente una baja unión a proteínas plasmáticas (~10%).

Por último, la estabilidad del radiocomplejo se analizó mediante un estudio de estabilidad con EDTA, DTPA, FeCl₃ (transquelantes) y buffer de marcado hasta 2 h post marcación (**Tabla 14**).

Tabla 14: Estabilidad del marcado en función del porcentaje de pureza radioquímica(%PRQ) en distintos medios, hasta 2 h post marcación. resultante (n=4).

Medio					
EDTA 200 mM	DTPA200 mM	FeCl3 0.1 M	NaOAc 1.25 M		

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 144
1 h	86.1±0.5	95.7±2.3	85.9±0.8	96.9±0.9
2 h	85.2±1.4	94.3±1.9	84.2±1.4	96.5±0.5

Podemos concluir que logamos realizar el marcado del péptido DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) con una alta pureza radioquímica (~95%) y alta estabilidad en distintas condiciones *in vitro*, a la vez que el complejo presenta un alta hidrofilicidad y una baja unión a proteínas plasmáticas, condiciones que lo hacen un apto agente de imagenología molecular y para continuar con los estudios *in vitro* celulares e *in vivo*.

Cabe contrastar que, comparando con el complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA desarrollado anteriormente, el mayor inconveniente de este segundo radiofármaco es la necesidad de un paso de purificación debido a la posible presencia de más de un 5 % de la impureza [⁶⁸Ga]Ga-Coloide , así como la baja actividad específica y la constricción del volumen obtenido del generador ya discutidos.

Estos resultados son comparables con estudios previos del LHRH u análogos marcado con 68 Ga, como los de Schottelius et al 190 , con el complejo D-Lys6 ([68 Ga]Ga-DOTA)-GnRH-I, el que los autores observan una pureza radioquímica >99% posterior a la purificación por cartucho RP-18, con una actividad molar de 18.1 TBq/mmo y un log P de -3.703 ± 0.019 . Por el otro lado, el grupo de Zoghi et al 196 , obtuvieron resultados similares con el complejo [68 Ga]Ga-DOTA-TRP (pureza radioquímica 91-9%; >99% luego de purificación con cartucho C18 Sep-Pak), siendo estable en suero humano a temperatura ambiente y a 37°C hasta 2 h post marcado. *Okarvi et al* 199 , también lograron marcar el péptido [68 Ga]Ga-DOTA-leuprolide con una pureza radioquímica >94% (sin paso de purificación), siendo este estable hasta 4 h en buffer de marcado y en plasma humano. Cabe destacar que estos marcados fueron realizados sin el agregado de un linker entre el agente quelante y el análogo del LHRH.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 145

4.2.5-Estudios biológicos *in vitro* de unión celular en líneas de cáncer de mama:

Los estudios *in vitro* de unión y de bloqueo mediante la incubación del [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) en las líneas MCF-7, MDA-MB-231, BT-474 (cáncer de mama humana) y 4T1-3T3 (cáncer de mama murino) se realizaron para evaluar la afinidad y la unión específica del conjugado al LHRH-R (Ver **Figura 67-69**).

A su vez, empleamos nuevamente la línea CHO-K1 (células de embrión de hámster, LHRH -) como control negativo.

En la línea empleada como control, la CHO-K1, se observó tanto una unión a membrana (menor a 0.50% en todos los puntos evaluados) como internalización despreciable (menor a 0.20 % en todos los puntos evaluados) del complejo radiomarcado.

En la línea celular MDA-MB-231, la unión a membrana máxima fue de 6.2 ± 2.3 % a los 45 min, y la mínima de 2.8 ± 0.6 % a los 60 min; mientras que presentó una internalización máxima de 0.70 ± 0.10 % a los 45 min y mínima de 0.40 ± 0.17 % a los 15 min.

En la línea MCF-7, se observó una unión a membra máxima de 4.1 ± 0.6 % a los 60 min y una mínima de 2.70 ± 0.08 % a los 15 min, mientras que la internalización máxima fue de 1.20 ± 0.06 % a los 15 min y una mínima de 1.1 ± 0.1 % a los 45 min.

En la línea celular BT-474, la unión a membrana máxima fue de 8.6 ± 0.5 % a los 60 min, mientras que la mínima fue de 4.9 ± 1.5 % a los 15 min; mientras que la internalización máxima fue de 2.1 ± 0.7 % a los 60 min y la mínima de 1.6 ± 0.4 % a los 30 min respectivamente.

Por último, en la línea celular 4T1, la unión a membrana máxima fue de 5.1 ± 0.7 % a los 15 min, mientras que la mínima fue de 3.2 ± 0.3 % a los 60 min; mientras que la internalización máxima fue de 1.2 ± 0.2 % a los 45 min y la mínima de 0.51 ± 0.09 % a los 15 min respectivamente.

Nuevamente observamos que estudios estadísticos (Two-Way ANOVA) entre las uniones en membrana de los controles negativos (CHO-K1) y el resto de las líneas celulares,

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 146

demostraron una diferencia significativa (P≤0.05) frente a todas las líneas de cáncer de mama evaluadas, entre los tiempos 15-45 min, ya que no se pudo contar con células suficientes para realizar el ensayo de las CHO-K1 a los 60 min (**Figura 67**)



Figura 67: Porcentaje de unión a membrana del [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) en líneas celulares CHO-K1,MDA-MB-231, MCF-7, BT-474 y 4T1 (promedio \pm SD, n=4). Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001,*** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.01, * en caso de P \leq 0.01, * en caso de P \leq 0.05 y ns en caso de P>0.05 (no significativo)(Two way-ANOVA).

Por su lado, en cuanto a la internalización, la mayoría de las líneas presentaron una diferencia significativa (Two-Way ANOVA) frente al control negativo en los tiempos 15-45; exceptuando en el primer tiempo a la línea MDA-MB-231 (**Figura 68**).



Figura 68: Porcentaje de internalización del [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) en líneas celulares CHO-K1,MDA-MB-231, MCF-7, BT-474 y 4T1 (promedio \pm SD, n=4). Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001,*** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.01, * en caso de P \leq 0.01, * en caso de P \leq 0.05 y ns en caso de P>0.05 (no significativo)(Two way-ANOVA).

Realizamos nuevamente ensayos de bloqueo con exceso de LHRH(D-Lys6) sin marcar previo a la exposición con nuestro radiofármaco, encontrando nuevamente en todas las líneas evaluadas de cáncer de mama, una disminución en la unión específica de entre el 36-77% frente a la línea no bloqueada; no vislumbrada en el control negativo (línea CHO-K1, **Figura 69**).





Como lo visto en el capítulo anterior con el complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA, podemos reconfirmar con estos resultados *in vitro* la sobreexpresión de receptor de LHRH en las líneas evaluadas frente a nuestro control negativo CHO-K1. A su vez reconfirmamos que dicha unión es nuevamente específica y mediada por el receptor según los resultados de los ensayos de bloqueo realizados.

Cabe destacar que si bien nuevamente, la unión es principalmente de membrana, esta conlleva un porcentaje menor que en la anterior, viéndose en porcentaje una mayor internalización (cercana 25-50% en el caso de las MDA-MB-231); si bien no realizamos ensayos de eflujo celular, en este caso estos pueden ser de mayor importancia a futuro, en especial considerando el uso del par teragnóstico ¹⁷⁷Lu/⁶⁸Ga.

Nuevamente apreciamos que nuestro radiofármaco se une específicamente a ligandos de diversas líneas celulares que representan distintos modelos moleculares de cáncer de mama (Tumor Triple negativo, Luminal A, HER2+), como fue previamente mencionado en el capítulo anterior (Ver **Tabla 7**). Esto nuevamente demuestra la potencialidad de este nuevo radiofármaco de PET para la posible visualización de los distintos tipos de cáncer de mama existentes.

Nuevamente, comparando con estudios similares, S*chottelius et al* ²⁶⁴ en su trabajo, observa una unión específica total de $2.15\pm0.18\%$ a las 2 h a las células MDA-MB-231 con el complejo [¹²⁵I]I-Triptorelin. Por su parte, *Okarvi et al* ¹⁹⁹ demuestra en su trabajo que la afinidad de unión por células MCF-7 y MDA-MB-231 del complejo [⁶⁸Ga]Ga-leuprolide evaluado ronda los 11 nM.

4.2.6-Estudios biodistribución en ratones hembra normales y xenográficos (4T1):

Las propiedades *in vivo* del complejo [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) fueron evaluadas en ratones Balb/c hembras normales (n=4) y ratones Balb/c portadoras de tumor 4T1 hasta 2 h post inyección (n=3), similar a lo mostrado en el capítulo anterior (Sección 3.2.6).

En la **Tabla 15** y la **Figura 70** podemos observar los resultados de las biodistribuciones en animales Balb/c hembras normales a 0.5, 1 y 2 h p.i (promedio \pm SD). Nuevamente se observa un claro clearance renal (alta actividad en riñones, vejiga y orina), con un bajo uptake en el resto de los órganos no blancos (en su mayoría menor al 4%), y una baja actividad en sangre.

Tabla 15: Resultados de los estudios de biodistribución (promedio \pm SD) en ratones normales Balb/c hembras a 0.5,1 y 2 h post inyección (p.i). %ID/g (arriba) and %ID (abajo). ID=Dosis inyectada.



Sangre	0.42 ± 0.14	0.45 ± 0.15	0.32±0.16
Hígado	3.2± 1.2	2.3 ± 0.62	1.85 ± 0.88
Corazón	1.8± 0.7	1.3 ± 0.20	1.16± 0.11
Pulmones	4.3 ± 0.9	3.5 ± 1.25	4.18± 2.63
Bazo	1.4 ± 0.8	1.3 ±0.44	0.86± 0.09
Riñones	14 ± 4.0	14 ± 4.2	11± 2.4
Tiroides	2.4± 0.5	1.6 ±0.5	1.32± 0.41
Músculo	0.11 ± 0.04	0.060 ± 0.05	0.08 ± 0.02
Hueso	0.13 ± 0.06	0.14 ±0.06	0.15±0.05
Estómago	1.53 ± 0.42	0.79 ± 0.29	0.79± 0.21
%ID			
Orina + Vejiga	23± 6.1	22 ± 6.0	38±6.9
TGI	2.5 ± 0.7	2.1 ± 0.5	1.7± 0.4



Figura 70: %ID/g (arriba) y %ID (abajo) para los estudios de biodistribución del complejo [68 Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) en ratones Balb/c hembras (promedio ± SD, n=2-4).

En cuanto a los ensayos en ratones portadores de tumor 4T1, podemos observar el mismo patrón de biodistribución (Ver **Tabla 16** y **Figura 71**) al visto en ratones normales (clearance renal, seguido por una acumulación mínima, menor al 3% ID/g en la mayoría de los órganos). Seguimos observando una baja retención en sangre en todos los puntos (<1.5% ID/g). Cabe destacar que comparaciones entre ambos grupos (normales y portadores de tumor), por medio

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 152

del test de Student t, solo resultaron en diferencias significativas entre los riñones a 1 p.i (14 \pm 4.2% ID/g vs 8.7 \pm 3.5% ID/g P≤0.0001, Student t), y orina más vejiga a la 1 hora p.i (22 \pm 6.0 %ID vs 12 \pm 3.0 %ID, P≤0.01, Student t).Observar que nuevamente no parece haber una alta absorción en específica en pulmones, denotando que no hay metástasis hacia ese órgano.

Nuevamente observamos una captación tumoral rápida $(4.1 \pm 2.7 \text{ \% ID/g}, 2.5 \pm 0.67 \text{\% ID/g y} 3.0 \pm 0.85 \text{\% ID/g a} 0.5,1 \text{ y} 2 \text{ h} \text{ p} \text{ respectivamente})$. Se observaron nuevamente unas relaciones Tumor/Músculo altas, siendo de 27 ± 13 , $22 \pm 7.9 \text{ y} 18 \pm 5.9 \text{ a} 0.5,1 \text{ y} 2 \text{ h} \text{ p}$ respectivamente. A su vez cabe destacar que la relación tumor-sangre se mantuvo consistentemente por arriba de 2 nuevamente.

Tabla 16: Resultados de los estudios de biodistribución (promedio \pm SD) en ratones normales Balb/c hembras portadores de tumores 4T1 a 0.5,1 y 2 h post inyección (p.i). %ID/g (arriba) and %ID (abajo). ID=Dosis inyectada. Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001, *** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.05 y nada en caso de P>0.05 (no significativo)(Student t, comparación con hembras Balb/c normales).

%ID/g	0.5 h p. i	1 h p. i	2 h p. i
Sangre	1.1 ± 0.57	0.60 ± 0.22	1.4±0.99
Hígado	6.3±1.52	5.5 ± 1.72	2.2 ± 0.87
Corazón	2.7± 0.31	2.6 ± 0.96	1.8± 0.7
Pulmones	5.9 ± 0.10	3.75 ± 0.99	1.79± 0.77
Bazo	3.0 ± 1.13	1.88 ±0.58	1.87 ± 1.00

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 153

Riñones	16 ± 9.9	8.7 ± 3.5(****)	12± 2.8
Tiroides	2.2± 1.1	2.96 ±0.58	3.64± 1.89
Músculo	0.14± 0.03	0.12 ± 0.06	0.13± 0.05
Hueso	0.20 ± 0.11	0.18 ±0.07	0.11±0.05
Estómago	1.34 ± 0.30	1.12 ± 0.45	1.80± 0.58
Tumor	4.1 ± 2.7	2.5 ± 0.67	3.0 ± 0.85
Relaciones			
Tumor/Músculo	27 ± 13	22 ± 7.9	18 ± 5.9
Tumor/Sangre	4.0 ± 2.2	4.5 ± 1.6	2.6 ± 1.00
Tumor/Hígado	0.43 ± 0.11	0.47± 0.13	1.2 ± 0.7
%ID			
Orina + Vejiga	19± 10.79	12 ± 3.0 (**)	39±5.4
TGI	2.6 ± 0.44	2.3 ± 0.40	2.3± 0.16



Figura 71: %ID/g (arriba) y %ID (abajo) para los estudios de biodistribución del complejo [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) en ratones Balb/c hembras portadores de tumor 4T1 (promedio ± SD, n=4).

Los resultados obtenidos en estos ensayos son comparables a los ya publicados por el grupo de *Zoghi et al* 202 utilizando un complejo [68 Ga]Ga-DOTA-TRP en ratones hembras portadores de tumores 4T1, donde evidencian rápido uptake tumoral y relaciones Tumor/Músculo de >50 a los 60 min.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 155

A su vez, cabe destacar que el patrón de biodistribución observado (clearance renal, baja captación en el resto de los órganos), así como la captación tumoral específica y las relaciones Tumor/Músculo, son similares a las vistas para el complejo [99m Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA evaluado en el mismo modelo tumoral (Balb/c 4T1) en el capítulo 3. Los % ID/g máximos son similares (4.1 ± 2.7%ID/g para [68 Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) vs 5.8 ± 0.50 %ID/g para [99m Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA), así como las relaciones Tumor/Músculo observadas (27 ± 13 para [68 Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) vs 31 ± 11 para [99m Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA).

4.2.7-Estudios PET/CT en ratones hembra xenográficos (4T1):

El potencial como agente imagenológico del radiofármaco [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) fue examinado en los modelos murinos mencionados en el párrafo anterior. Hembras Balb/c portadores de tumores 4T1 (n=1) fueron examinadas por PET/CT hasta 1 h p.i.

A pesar de la alta concentración de radioactividad, principalmente en la vejiga, se pudo apreciar el tumor 4T1 en el ratone evaluado por PET/CT.

No se observó una alta radioactividad en el resto de los órganos no blanco (Ver **Figura 72**). Las relaciones Tumor/Músculo (T/M) superaron 2.5 en casi todos los *frames*, teniendo un máximo de 8.99 en el *frame* 3 (Ver **Tabla 17**), calculados mediante volúmenes de interés (VOIs) manuales.



Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 156

Figura 72: PET/CT coronal del complejo[⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) en ratones Balb/c portadores de tumores 4T1 a 1 h post inyección. Notar los VOIs del tumor (azul).

Tabla	17: Relaciones	Tumor/Músculo	calculadas	por PET/CT	en ratón	portador	de tumor
4T1. M	arcados los 3 fi	rames centrales a	considerar.				

Relaciones T/M calculadas por PET/CT en ratón Balb/c portador de tumor 4T1	
Frame (segundos)	T/M
0-180	1,87
180-810	2,79
810-1710	8,99
1710-2610	4,78
2610-330	3,04

Tener en cuenta que, para una mejor caracterización, se debería aumentar el n, así como optimizar el procedimiento de marcado. Como se mencionó anteriormente en la sección 4.2.2, el marcado se encuentra limitado por el volumen final, así como la actividad del generador, por lo cual no pudimos obtener un marcado de alta actividad específica en un volumen lo suficientemente pequeño (aproximadamente 100 uL) para inyectar a los ratones >10 MBq/ ratón y obtener una imagen de mayor calidad.

Podemos ver que, nuevamente, comparando con los resultados obtenidos por el radiotrazador [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA evaluado en el mismo modelo tumoral (Balb/c 4T1) en la sección 3.2.7 obtenemos un perfil de biodistribución similar, la vez que

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 157

similares relaciones Tumor/Músculo entre los dos radiotrazadores basados en el *scaffold* del LHRH(D-Lys6) (máxima relación Tumo/Músculo 8,99, n=1 para [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) y 13±3.9 n=3 para [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA).

4.2.8-Estudios biológicos in vitro de unión celular en líneas de cáncer de próstata:

Los estudios *in vitro* de unión y de bloqueo mediante la incubación del [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) en las líneas LnCap, PC3 y Du-145 (cáncer de próstata humano) se realizaron para evaluar la afinidad y la unión específica del conjugado al LHRH-R (Ver **Figuras 73-75**).

Como ya mencionamos anteriormente, empleamos como control negativo las líneas CHO-K1 (células de embrión de hámster, LHRH -). A su vez, utilizamos la línea de próstata human normal RWPE-1 como control biológico de nuestro ensayo.

La línea celular RWPE-1 presentó resultados similares a las CHO-K1 (unión a membrana menor a 0.20 % e internalización celular menor a 0.12%) en todos los tiempos evaluados. Estudios estadísticos confirman que no hay diferencia significativa entre esta línea y nuestro control negativo CHO-K1 (Two-way ANOVA).

En la línea celular LnCap, la unión a membrana máxima fue de 4.2 ± 0.6 % a los 30 min y la mínima de 3.9 ± 0.6 % a los 15 min, mientras que la internalización máxima fue de 0.80 ± 0.10 % a los 30 min y una mínima de 0.70 ± 0.01 %, % a los 45 min.

En la línea celular PC3, la unión a membrana máxima fue de 3.5 ± 0.2 %, a los 45 min, mientras que la mínima fue de 2.8 ± 0.2 % a los 15 min, mientras que la internalización máxima fue de 1.10 \pm 0.08 %, a los 45 min y la mínima de 1.1 \pm 0.1 % a los 15 min respectivamente.

En la línea celular Du-145, la unión a membrana máxima fue de 2.9 ± 0.4 %, a los 30 min, mientras que la mínima fue de 2.8 ± 0.4 % a los 45 min; mientras que la internalización

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 158

máxima fue de 1.1 \pm 0.3 %, a los 45 min y la mínima de 1.05 \pm 0.06 % a los 15 min respectivamente.

Nuevamente, estudios estadísticos (Two-Way ANOVA) entre las uniones en membrana de los controles negativos (CHO-K1) y el resto de las líneas celulares, demostraron una diferencia significativa (P<0.05) frente a todas las líneas de cáncer de próstata evaluadas, en todos los tiempos; mientras que no se encontraron diferencias frente a la línea RWPE-1. Estos mismos resultados también son vislumbrados en la internalización celular (Ver **Figuras 73-74**).



Figura 73: Porcentaje de unión a membrana del complejo [68 Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) en líneas celulares CHO-K1, RWPE-1, LnCap, PC3 y Du-145 (promedio ± SD, n=4). Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001,*** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.01, * en caso de P \leq 0.05 y ns en caso de P>0.05 (no significativo)(Two way-ANOVA).

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 159



Figura 74: Porcentaje de internalización del complejo [68 Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) en líneas celulares CHO-K1, RWPE-1, LnCap, PC3 y Du-145 (promedio ± SD, n=4). Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001,*** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.01, * en caso de P \leq 0.05 y ns en caso de P>0.05 (no significativo)(Two way-ANOVA).

Realizamos nuevamente ensayos de bloqueo con exceso de LHRH(D-Lys6) previo a la exposición con nuestro radiofármaco, encontrando esta vez diferencias significativas (Student t) en todas de las líneas evaluadas denotando la alta especificidad del radiofármaco por dichas líneas: no vislumbradas en el control negativo (CHO-K1) ni en la línea de próstata normal human RWPE-1 (Ver **Figura 75**).

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 160



Figura 75: Porcentaje de unión a membrana con y sin bloqueo (20 µg LHRH (D-Lys6) para todas las líneas de cáncer de próstata evaluadas (promedio \pm SD, n=4). Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001,*** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.01, * en caso de P \leq 0.05 y ns en caso de P>0.05 (no significativo) (Student t).

Verificamos, una vez más lo visto en los trabajos de *Farahani et al*^{198,301} así como lo realizado anteriormente en este estudio con el complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA previamente desarrollado

Nuevamente, cabe destacar que nuestro radiofármaco es específico por su receptor en distintas líneas celulares de cáncer de próstata, que poseen distintos perfiles, como andrógeno dependiente (LnCap) o independiente (Du-145, PC3), así como distinto perfil de PSMA(LnCap PSMA+, PC3 y Du 145 PSMA-) Notar que en este caso logramos una disminución significativa en los bloqueos de la línea Du-145 al bloquear con un mayor exceso de péptido frío al utilizado en la sección 3.2.8.

Comparado con estudios previos, como los de *Schottelius et al* ¹⁹⁰ con el complejo [¹²⁵I]ITriptorelin, encontrando una unión de $2.55 \pm 0.18\%$ en la línea celular LnCap. A su vez, en sus estudios, *Huang et al* ¹⁸⁹ describen uniones similares del complejo [¹⁸F]FP-D-Lys6 -GnRH a la línea PC3 (unión total ~4%) y CHO-K1 (unión total ~0.1%), observando una marcada disminución de la unión en la línea PC3 al utilizar D-Lys6 -GnRH como bloqueo.

4.2.9-Estudios biodistribución en ratones macho normales y xenográficos (LnCap, PC3):

Las propiedades *in vivo* del complejo [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) también fueron evaluadas en ratones Swiss machos normales (n=4) y ratones nude machos (Base Swiss) portadoras de tumores LnCap (n=5) y PC3 (n=5) a 1-2 h post inyección.

Similar a lo visto en el modelo Balb/c hembra, en los ratones Swiss normales, la acumulación de radiactividad en la mayoría de los otros órganos no blanco fue mínima (<3% ID/g). Se observó nuevamente un claro clearance renal, con altas actividades en riñones, orina y vejiga; y poca actividad retenida en sangre (0,19±0.02% ID/g 2 h p.i), si bien también se observa una mayor absorción en hígado y bazo en comparación con el modelo Balb/C hembra previamente estudiado (Ver **Tabla 18** y **Figura 76**) y el modelo Swiss nude previamente evaluado con el radiofármaco [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA en el capítulo 3, lo cual puede deberse a una inestabilización del marcado realizado para estos ensayos *in vivo*.

Tabla 18: Resultados de los estudios de biodistribución (promedio \pm SD) en ratones Swiss normales %ID/g (arriba) and %ID (abajo). ID=Dosis inyectada.

%ID/g	1 h p. i	2 h p. i
Sangre	0.86±0.49	0.19±0.02

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 162

Hígado	6.1±2.6	4.3±2.4
Corazón	3.8±1.3	1.0±0.15
Pulmones	3.4±1.0	1.2±0.17
Bazo	6.2±1.9	5.6±1.4
Riñones	6.4±2.0	1.9±0.3
Tiroides	3.6±1.6	1.4±0.2
Músculo	0.25±0.07	0.15±0.01
Hueso	0.32±0.09	0.16±0.01
Estómago	1.3±0.5	1.1±0.76
TGI	1.3±0.5	0.50±0.14
%ID		
Orina + Vejiga	20±6.0	59±9.3



Figura 76: %ID/g (arriba) y %ID (abajo) para los estudios de biodistribución del complejo [68 Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) en ratones Swiss macho normales 1 y 2 h post inyección (promedio ± SD, n=2-4).

En el modelo nude LnCap, observamos nuevamente un elevado clearance renal, con una actividad tumoral mediana-baja $(2.5\pm0.29 \text{ \% ID/g})$ y una alta relación Tumor/Músculo de 23 ± 4.5 y tumor/sangre de 4.0 ± 2.9 a la 1 h p.i (Ver **Tabla 19** y **Figura 77**).

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 164

Solo se observan diferencias significativas entre los ratones Swiss normales y portadores de tumores LnCap en algunos órganos como hígado, corazón, bazo y tiroides $(6.1\pm2.6\% \text{ ID/g} \text{ vs } 3.1\pm1.2\% \text{ ID/g P} \le 0.001$; $3.8\pm1.3\% \text{ID/g vs } 1.5\pm0.78\% \text{ID/g P} \le 0.001$; $6.2\pm1.9\% \text{ID/g vs } 2.1\pm0.66\% \text{ID/g P} \le 0.0001$; $3.6\pm1.6\% \text{ID/g vs } 1.3\pm0.53\% \text{ID/g P} \le 0.001\% \text{ID/g}$, respectivamente) a 1 h p.i (Student t).

Observamos a su vez un efecto del bloqueo del complejo frio preinyección del radiofármaco a nivel tumoral (2.5 ± 0.29 vs 0.87 ± 0.29 %ID/g P ≤ 0.01 , Student t) así como la relación Tumor/Músculo (23 ± 4.5 vs 7.9 ± 4.3 , P ≤ 0.0001 , Student t) y sobre los riñones e hígado (5.9 ± 0.69 %ID/g vs 16 ± 3.8 %ID/g, P ≤ 0.0001 , 3.1 ± 1.2 %ID/g vs 0.70 ± 0.08 %ID/g P ≤ 0.0001 , respectivamente Student t), verificando la especificidad del radiofármaco por su receptor.

Tabla 19: Resultados de los estudios de biodistribución (promedio \pm SD), 1 h p.i en ratones nude portadores de tumores LnCap %ID/g (arriba) and %ID (abajo). ID=Dosis inyectada. Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001,*** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.01, * en caso de P \leq 0.01, * en caso de P \leq 0.05 y nada en caso de P>0.05 (no significativo) (Student t, comparación 1 h p.i vs 1 h p.i block).

%ID/g	1 h p. i	1 h p. i Block
Sangre	0.74±0.51	0.22±0.04
Hígado	3.1±1.2	0.70±0.08 (****)
Corazón	1.5±0.78	1.1 ± 0.08
Pulmones	2.01±0.98	2.0±0.71
Bazo	2.1±0.66	0.89±0.61
Riñones	5.9±0.69	16±3.8 (****)

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 165

Tiroides	1.3±0.53	1.3±0.34
Músculo	0.11±0.027	0.12±0.3
Hueso	0.11±0.03	0.090±0.05
Estómago	0.53±0.29	0.73±0.65
TGI	0.58±0.22	0.61±0.45
Tumor	2.5±0.29	0.87±0.29 (**)
Relaciones		
Tumor/Músculo	23±4.5	7.9±4.3 (****)
Tumor/Sangre	4.01±2.94	4.23±2.18
Tumor/Hígado	1.03±0.78	1.23±0.25
%ID		
Orina+ Vejiga	26.07±12.02	28.59±2.28



Figura 77: %ID/g (arriba) y %ID (abajo) para los estudios de biodistribución del complejo [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) 1 h p.i en ratones nude portadores de

tumores LnCap, con y sin bloque previo a la inyección del radiofármaco (promedio \pm SD, n=2-4). Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001,*** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.01, * en caso de P \leq 0.05 y ns en caso de P>0.05 (no significativo) (Student t).

De forma similar en el modelo nude PC3, observamos nuevamente un elevado clearance renal, con una actividad tumoral mediana-baja $(2.0\pm0.31\%$ ID/g) y una relación tumor músculo de 8.1 ± 0.76 y tumor sangre de 5.1 ± 1.9 a la 1 h p.i (Ver **Tabla 20** y **Figura 78**).

Nuevamente se observa pocas diferencias significativas entre los ratones Swiss normales y portadores de tumores PC3. a 1 h p.i (riñones, 6.4±2.0 %ID/g vs 3.2±0.69 %ID/g P≤0.0001 y orina y vejiga 20±6.0 %ID vs 30±4.8 %ID P≤0.05, Student t).

Observamos nuevamente a su vez un efecto del bloque del complejo frío pre inyección del radiofármaco sobre el tumor $(2.0\pm0.31 \text{ \%ID/g vs } 1.2\pm0.40 \text{ \%ID/g}$, de P \leq 0.05, Student t) además de a nivel renal $(3.2\pm0.69 \text{ \%ID/g vs } 11\pm1.3 \text{ \%ID/g}$, P \leq 0.0001 Student t), bazo $(7.2\pm1.5 \text{ \%ID/g vs } 1.2\pm0.28 \text{ \%ID/g } P\leq$ 0.0001 Student t) y hepático $(5.3\pm1.4 \text{ \%ID/g vs } 0.97\pm0.51 \text{ \%ID/g } P\leq$ 0.0001 Student t), verificando la especificidad del radiofármaco por su receptor.

Tabla 20: Resultados de los estudios de biodistribución (promedio \pm SD) a 1 h p.ien ratones nude portadores de tumores PC3 %ID/g (arriba) and %ID (abajo). ID=Dosis inyectada. Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001,*** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.01, * en caso de P \leq 0.01, * en caso de P \leq 0.05 y ns en caso de P>0.05 (no significativo) (Student t, comparación 1 h p.i vs 1 h p.i block).).

%ID/g	1 h p. i	1 h p. i Block
Sangre	0.42 ± 0.07	0.65±0.11
Hígado	5.3±1.4	0.97±0.51 (****)
Corazón	2.1±0.61	1.9±0.07

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 168

Pulmones	3.0±1.14	2.7±0.45
Bazo	7.2±1.52	1.2±0.28 (****)
Riñones	3.2±0.69	11±1.3 (****)
Tiroides	1.8±0.77	1.31±0.01
Músculo	0.36±0.22	0,12±0.01
Hueso	0.36±0.18	0.22±0.01
Estómago	1.3±0.35	0.39±0.05
TGI	0.80±0.13	0.83±0.12
Tumor	2.0±0.31	1.2±0.40 (*)
Relaciones		
Tumor/Músculo	8.1±0.76	10.0±4.12
Tumor/Sangre	5.1±1.94	1.8±0.92
Tumor/Hígado	1.1±1.06	1.5±1.20
%ID		
Orina + Vejiga	30±4.9	22±3.3



Figura 78: %ID/g (arriba) y %ID (abajo) para los estudios de biodistribución del complejo [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) 1 h p.i en ratones nude portadores de tumores PC3, con y sin bloque previo a la inyección del radiofármaco (promedio \pm SD, n=2-4). Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001,*** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.01, * en caso de P \leq 0.05 y ns en caso de P>0.05 (no significativo) (Student t).

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 170

Comparando entre ambos modelos tumorales, sólo encontramos diferencias significativas únicamente en hígado, bazo y riñones $(3.1\pm1.2 \% ID/g vs 5.3\pm1.4 \% ID/g P \le 0.0001, 2.1\pm0.66 vs 7.2\pm1.5 \% ID/g P \le 0.0001 y 5.9\pm0.69 \% ID/g vs 3.20\pm0.69 \% ID/g P \le 0.0001$, respectivamente). También encontramos diferencias significativas entre la relación tumor músculo entre el modelo LnCap y PC3 (23±4.5 vs 8,1±0.76 P ≤ 0.001, Student t).

En conclusión, podemos comprobar la potencialidad del radiofármaco [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) como agente de imagenología molecular en diversos modelos de CaP.

Cabe destacar que el complejo [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) presenta nuevamente un patrón de biodistribución similar al visto anteriormente para el [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA en el mismo modelo tumoral (machos Swiss nude y machos nude portador de LnCap y PC3).

Comparando los dos radiofármacos, apreciamos en amos un marcado clearance renal y baja captación en órganos no blanco, así como una captación tumoral especifica y similar. Para los tumores LnCap, obtenemos una actividad máxima de $2.4 \pm 1.1 \,\text{\% ID/g}$ con el radiotrazador [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA vs $2.5\pm0.29\%$ ID/g con el [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6); mientras para el tumor PC3 obtenemos $0.82 \pm 0.12\%$ ID/g para el [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA mientras que el resultado en el tumor PC3 con el radiotrazador [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) es marginalmente superior, de $2.0\pm0.31\%$ ID/g.

A su vez, las relaciones Tumor/Músculo para radiotrazador [68 Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) en el modelo tumoral LnCap (23±4.5) es superior que la presentada por el radiotrazador [99m Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA (7.1 ± 3.9), mientras que las relaciones tumor/sangre se mantienes similares (3.8 ± 1.3 vs 4.01±2.94 para [99m Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA y [68 Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) respectivamente).

Por su parte, la relación Tumor/Músculo para el radiotrazador [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) en el modelo tumoral PC3 (8.1±0.76) es similar que la presentada por el

radiotrazador [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA (10 ± 2.9), mientras que las relaciones tumor/sangre también se mantienes similares (4.2 ± 1.4 vs 5.1 ± 1.94 para [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA y [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) respectivamente.

A su vez, comparando con otros trabajos similares, como el de *Huang et al* ¹⁸⁹ con el complejo [¹⁸F]FP-DLys6 -GnRH, se observa también un claro clearance renal y una captación tumoral moderada (<2% ID/g) y una relación Tumor/Músculo de 2.5.

4.2.10-Estudios PET/CT en ratones macho Nude portadores de tumores (LnCap, PC3):

El potencial como agente imagenológico del radiofármaco [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) fue examinado en los modelos murinos mencionados en el párrafo anterior. Machos nude portadores de tumores LnCap y PC3 (n=2-3) fueron examinados por PET/CT hasta 1 h p.i.

A pesar de la alta concentración de radioactividad, principalmente en la vejiga y riñones, se pudo visualizar ambos tumores xerografiado en uno de los ratones evaluados por PET/CT. No se observó una alta radioactividad en el resto de los órganos no blanco lo que concuerda con las biodistribuciones previamente descritas (Ver **Figura 79-80**).



Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 172

Figura 79: PET/CT coronal del complejo[⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) en ratones nude portadores de tumores LnCap a 1 h post inyección. Notar los VOIs del tumor (azul).



Figura 80: PET/CT coronal del complejo[⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) en ratones nude portadores de tumores PC3 a 1 h post inyección, Notar los VOIs del tumor (azul).

El resto de los órganos no blancos no tuvieron una alta radioactividad. Las relaciones Tumor/Músculo (T/M) superaron 2 en todos los *frames*, teniendo un máximo de 2.4 ± 0.3 (LnCap) y 2.4 ± 0.4 en PC3 en los *frame* 3-4 (Ver **Tabla 21**), calculados mediante volúmenes de interés (VOIs) manuales

Tabla	21:	Relaciones	Tumor/Músculo	calculadas	por	PET/CT	en	ratón	portador	de	tumor
LnCap	y P	C3.									

Relaciones T/M calculadas por PET/CT en ratón Balb/c portador de tumores						
Frames	LnCap	PC3				
Frame 2	2.1± 0.2	1.7 ± 0.1				

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 173

Frame 3	2.4± 0.3	2.0± 0.4
Frame 4	2.1±0.2	2.4 ± 0.4

Se lograron nuevamente adecuadas relaciones Tumor/Músculo por PET/CT como prueba de concepto debemos aumentar el n para tener resultados más robustos en cuanto a la caracterización imagenología del complejo, similar a lo mostrado en los tumores mamarios y nuevamente mejorar el procedimiento de marcación.

Tener en cuenta que, en este caso, obtuvimos resultados levemente superiores en cuanto a las relaciones Tumor/Músculo con el complejo [99m Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA por SPECT/CT (máximo relación T/M de 3.7±0.1 para LnCap a 1 h p.i y 4.6±1.7 a 5 h p.i para PC3 vs máximo PET/CT relación T/M de 2.4± 0.3 en el Frame 3 para LnCap y 2.4± 0.4 en el Frame 4 para PC3 con el radiotrazador [68 Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6)).

Nuevamente observamos resultados similares al trabajo de *Huang et al*¹⁸⁹ con el complejo [¹⁸F]FP-D-Lys6 -GnRH, encontrando relaciones Tumor/Músculo de 3.55 a 1 h p.i por estudios imagenológicos micro PET.

Nuevamente, estos estudios demuestran la capacidad del complejo [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) como agente de imagenología molecular para cáncer de próstata en dos modelos celulares diferentes (PSMA+ y PSMA-, hormono dependiente y resistente a la castración), lo cual confiere a nuestra molécula una gran versatilidad en el diagnóstico de dicha patología

Como se mencionó anteriormente, un marcado más concentrado, logrando actividades específicas mayores podría ser una forma de mejorar dichas relaciones, logrando valores similares a los vislumbrados por SPEC/CT.

4.3 Conclusiones:

Como se mencionó en el capítulo anterior y durante la introducción, la generación de nuevos agentes de imagenología para cáncer de mama y próstata nos podrían ayudar a mejorar tanto el diagnóstico como la conducta terapéutica del mismo, logrando de esta manera acercarnos a una medicina personalizada para cada paciente.

El desarrollo de un nuevo agente de imagenología molecular PET, que se suma al gran número de nuevos radiofármacos generados, es de vital importancia para la generación de conocimientos y mecanismos moleculares que a la larga pueden ser traducidos a la clínica.

Similar a lo visto en el capítulo pasado, hemos desarrollado un segundo novedoso agente de imagen basado en el empleo del péptido GnRH (u LHRH) modificado en su estructura con una D-Lisina en la posición 6 y unido a un linker Ahx y el agente quelante DOTA como agente de imagen PET/CT.

Este complejo fue exitosamente radiomarcado de forma sencilla y reproducible, obteniendo altas purezas radioquímicas y preservando su actividad biológica. Una dificultad de dicho marcado fue la baja actividad obtenida del generador, así como el limitador del volumen de marcado necesario para los ensayos a realizar (especialmente la realización de ensayos imagenológicos *in vivo*). Esto debe ser tenido en cuenta a la hora de querer pasa a la clínica, ya que aún se debe optimizar el marcado y rendimientos para lograr un producto apto para su uso en humanos. Vale la pena destacar que esto podría mejorarse con el uso de [⁶⁸Ga]GaCl₃ generado por ciclotrón, un procedimiento que está siendo desarrollado en el CUDIM a la fecha.

Similar a lo visto con el complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA anteriormente, pudimos confirmar la especificidad del nuevo radiofármaco [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) por las diversas líneas de cáncer de mama y próstata evaluadas, demostrando potencialidad en ambas. Es destacable nuevamente su potencialidad en cuanto al uso en dos diversas patologías de importante impacto en salud pública, así como su potencial uso en diversos modelos dentro de dichas patologías (Ej.: cáncer de mama triple negativos, cáncer de próstata PSMA- y PSMA+).

Tanto los ensayos de biodistribuciones como las imágenes PET/CT nos permitieron observar la captación tumoral en distintos modelos, así como evaluar su potencial rol como agente de imagen oncológica, logrando resultados promisorios en los que se debe seguir trabajando.

Cabe destacar que este radiofármaco se une a la lista de radiofármacos PET presentes en el país para el diagnóstico de cáncer de mama, en especial destacando el [¹⁸F]FES, desarrollado en la región por el CUDIM, capaz de unirse a aquellos canceres que expresan estradiol ²⁹⁸. A tener en cuenta es que nuestro radiofármaco podría ser usado como alternativa en aquellas patologías que no presenten dicho marcador, como lo es el ya mencionado cáncer de mama triple negativo.

Por su parte, para el cáncer de próstata, hay desarrollo local de diversos radiotrazadores, como lo son el [¹¹C]harmina, desarrollado en el CUDIM por el Dr. Kevin Zirbesseger *et al* ²⁹⁹ y la [¹¹C](S,S)-SAM desarrollada en el mismo laboratorio por la Dr. Florencia Zoppolo *et al*³⁰⁰. Todo esto es de vital importancia ya que evidencia el interés internacional y local de desarrollar nuevos radiofármacos PET específicos para dicha patología, del cual [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) es un óptimo candidato.

5-Generación Radiofármaco de ^{99m}Tc basado en el anticuerpo Trastuzumab (Herceptin):

5.1 Materiales y Métodos:

Como se mencionó anteriormente todos los productos químicos, salvo indicación contraria, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). El agua fue purificada y desionizada (18 M Ω /cm2) mediante un sistema de filtración de agua Milli-Q (Millipore Corp., Milford, MA). Los generadores de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc fueron adquiridos de TecnoNuclear (Argentina). Las medidas de actividad gamma fueron realizadas mediante el empleo de un calibrador de dosis CRC7 Capintec y en un detector de contador de centelleo sólido con un cristal de NaI(TI) de 3"x3" asociado con un analizador de un solo canal (ORTEC, Oak Ridge, TN).

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se llevó a cabo en un sistema Agilent 1200 Series Infinity Star equipado con un detector GABI, un detector UV y una columna TSK-GEL G3000 SWXL 7.8 mm x 30 cm (TOSOHAAS), modo isocrático, buffer fosfato 0.05 M, pH 7.0, flujo 0.5 mL/min.

5.1.1 Conjugación HYNIC-Trastuzumab:

En primer lugar, se masaron 10 mg del anticuerpo Trastuzumab (Herceptin®, Roche, 150 mg liofilizado, uso intravenoso luego de reconstituido y diluido) y se diluye en 10 mL PBS 1X. Purificamos esta mezcla mediante empleo de una columna Sephadex G-25 (PD-10, Amersham Biosciences) eluida con NaCl 0.9 % a flujo de 1 mL/minuto.

Recuperamos 10 fracciones y medimos la absorbancia (Spectrophotometer 4255 Scanning, Lab comercial) a 280 nm de diluciones 1/20 para calcular la concentración final de nuestro anticuerpo (Coeficiente extinción $E_{280}=1.4$).

Proteína (mg/mL) = Abs_{280} . Factor de dilución / E_{280}

El NHS-HYNIC-Tfa utilizado para llevar a cabo la conjugación fue sintetizado en nuestro laboratorio y proporcionado por la Dra. Ma. Fernanda García ³⁰¹.

En Segundo lugar, se realizó la conjugación del Trastuzumab purificado al agente quelante. Para ello fueron adicionados 33 μ L de 1M NaHCO₃ a 0.067 μ mol de Trastuzumab purificados, luego se adicionan 0.33 μ mol NHS-HYNIC-Tfa en 7.1 μ L de DMSO (J. T. Baker). Se incuba la mezcla a 18-25 °C durante 30 min en oscuridad, a pH=8. Posteriormente se purifica del HYNIC libre por el método mencionado anteriormente (columna PD-10 eluida con PBS1X a flujo 1 ml/minuto) y se calcula concentración final por absorbancia a 280 nm, de la forma descrita anteriormente.

Se alícuota en fracciones de 0.5-1 mg y se guarda el conjugado a 4°C.

5.1.2 Marcación con ^{99m}Tc de Tfa-HYNIC-Trastuzumab y controles de calidad:

Nos basamos en estudios previos realizados en el Área de Radiofarmacia del CIN del marcado de anticuerpos monoclonales ²⁵⁹. En primer lugar, realizamos soluciones de Tricina (N-[Tris(hidroximetil)-metil]glicina, Sigma) /SnCl₂ (J. T. Baker), pH=4.5 a distintas relaciones (7/9, 8/9, 8/10, 9/9, 9/10 mg/mg) buscando la relación que presenta una mayor eficiencia de marcación.

Se diluye la tricina (7-9 mg) en 0.8 mL de H_2O MQ y se ajusta el pH a 4.5-5 con 0.05 mL de HCl 2.0 M. Por otro lado, disolvemos 7-10 mg de SnCl₂.2H₂O en 0.5 mL de HCl 0.5-1 M y se toman 0.5 mL de esta solución para adicionarle al vial de la Tricina disuelta.

Posteriormente, se ajusta el volumen del vial de Tricina/SnCl₂, hasta un volumen de 10 mL con NaCl 0.9 %. Para llevar a cabo la marcación, se adicionan 10-15 μ L de esta solución a nuestro anticuerpo purificado (6.7 nmol del Tfa- HYNIC-Trastuzumab; ~0.5 mg en <500 μ L) y se adicionan 1-3 mCi de [^{99m}Tc]TcO₄- en un volumen menor de 1 mL.

Se incuba la mezcla a 25°C por 30 min y en oscuridad.

Todos los solventes empleados fueron previamente purgados con N_2 gas.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 178

La pureza radioquímica de los anticuerpos marcados fue cuantificada mediante el empleo de una columna PD-10, equilibrada y eluída con NaCl 0.9%, a un flujo de 1.0 mL/min. Se colecta el eluato en fracciones de 1 mL/ minuto, y se controla la radioactividad de cada uno calibrador de dosis.

Posteriormente se verifica la pureza radioquímica por medio de HPLC (método mencionado anteriormente) y por tres sistemas cromatográficos detallados en la **Tabla 22**.

Controles cromatográficos							
Fase estacionaria	Fase móvil	Rf	Molécula				
ITLC-SG	NaCl 0.9%	0.0	[^{99m} Tc]TcHYNIC-				
			Trastuzumab				
		1.0	[^{99m} Tc]Tc-Tricina,				
			[^{99m} Tc]TcO ₄ -				
Whatman 1	MEK	0.0	[^{99m} Tc]TcHYNIC-				
			Trastuzumab,				
			$[^{99m}Tc]TcO2.H_2O,$				
			[^{99m} Tc]Tc-Tricina,				
		1.0	[^{99m} Tc]TcO ₄ -				
ITLC-SG	EtOH: NH ₂ : H ₂ O	0.0	$[^{99m}Tc]TcO_2H_2O,$				
impregnada en BSA	(2:1:5)	1.0	[^{99m} Tc]TcHYNIC-				
			Trastuzumab,				
			[^{99m} Tc]TcO ₄ -				

Tabla 22: Controles cromatográficos realizados para la marcación del Trastuzumab.

A su vez, realizamos el marcado del conjugado Tfa-HYNIC-Trastuzumab una vez por semana durante 4 semanas a modo de evaluar la estabilidad del complejo y su efecto frente a la eficiencia de marcado.

5.1.3. Estabilidad de estabilidad *in vitro* del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-Trastuzumab:

-Estabilidad en NaCl 0.9 % y en SFB

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 179

La integridad del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-Trastuzumab purificado, fue analizada por medio de la incubación en NaCl 0.9% y en SFB (Gibco, USA) a 37°C.

Se incubo una alícuota de [99m Tc]Tc-HYNIC-Trastuzumab purificado (500 µL, 20 MBq) en SFB (500 µL) u NaCl 0.9% (500 µL) a 37° C, hasta 24 h.

Las mezclas de reacción fueron analizadas por HPLC e ITLC-SG (solo para NaCl 0.9%) hasta 24 h, evaluando la pureza radioquímica de nuestro complejo y de las impurezas presentes mencionadas en la **Tabla 22**.

-Competencia con L-Cisteína.

Se evaluó la estabilidad del complejo por medio de la incubación de 90 μ L (37 MBq) de [^{99m}Tc]Tc--HYNIC-Trastuzumab con 10 μ L de L-Cisteína (1 y 10 mM, Sigma-Aldrich, USA), cuyas concentraciones finales en la solución resultaron de 0.1 y 1 mM de L-Cisteína, respectivamente. Las mezclas fueron analizadas por HPLC hasta 24 h.

5.2.4 Conjugación de Trastuzumab con isotiocianato de fluoresceína (FITC):

La reacción de conjugación de FITC con los anticuerpos (Trastuzumab e IgG como control de isotipo) se llevó a cabo empleando una relación molar 10:1(FITC:mAb) en 50 mM de buffer borato pH 8.5, utilizando NaOH 1M para ajustar pH (pH final de 9), durante 1 h a temperatura ambiente y oscuridad.

El exceso de FITC sin reaccionar fue removido mediante centrifugación usando Amicon ULTRA 30k a 14000 rpm por 10 min (X3).

Posteriormente se calcula la concentración de proteína en mg/mL según la siguiente fórmula:

mg/mL Proteína = Abs₂₈₀ - (Abs₄₉₂ x 0.35) / E₂₈₀

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 180
Los moles de proteína y de FITC fueron calculados según la siguiente fórmula:

moles Proteína = mg/mL Proteína / 1.5 x 10⁵

moles FITC = $Abs_{492} / 0.69 \times 10^5$

Por último, se calculó la relación FITC: proteína (F: P) según la siguiente fórmula:

F: P = moles FITC / moles Proteína

5.2.5 Estudios biológicos in vitro de unión celular:

Se realizó un ensayo de afinidad de unión específica en las líneas celulares de cáncer de próstata (PC3, Du-145, LnCap) y próstata normal (RWPE-1) ya mencionadas, y en las líneas celulares humanas de cáncer de mama BT-474 (HER2 +) y MDA-MB-213 (HER2 -) como células control positivo y negativo respectivamente, crecidas de igual manera a lo explicada en la sección 3.2.5.

Los estudios biológicos in vitro fueron realizados de forma similar a lo ya mencionado en la sección 3.2.6. En este caso, confirmamos la unión específica por medio de la unión total a las líneas celulares evaluadas, de forma similar a lo ya mencionado.

Se emplearon 50 nM de Trastuzumab marcado (100.000-300.000 cuentas/pocillo) y se empleó buffer Glicina 2 M pH 2 (300 μ L) seguido de un lavado de PBS1X-BSA0.4% (500 μ L) para determinar la actividad unida a la membrana (empleado únicamente con la Línea celular LnCap). La unión total fue determinada mediante el empleo de NaOH 1 M, seguido de un lavado con PBS1X-BSA0.4% (500 μ L), realizando los ensayos hasta 4 h post incubación.

Con el fin de confirmar el grado de unión no específica, fueron incubadas todas las líneas celulares ensayadas con 40 μ g (x 100) de Trastuzumab purificado sin marcar durante 2 h a 37°C utilizando el mejor tiempo de unión para cada línea celular, y se continúa con el estudio en las mismas condiciones mencionadas en el párrafo anterior.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 181

5.2.6 Análisis por citometría de flujo:

Se realizó un ensayo de afinidad de unión específica en las líneas celulares de cáncer de próstata (PC3, Du-145, LnCap) ya mencionadas, y en las líneas celulares humanas de cáncer de mama BT-474 (HER2 +) y MCF-7 (HER2 -) células control positivo y negativo respectivamente, crecidas de igual manera a lo explicada en la sección 3.2.5.

Luego de la disgregación de las células (en crecimiento confluente) éstas fueron contadas y sembradas a una concentración de 2×10^5 céls/pocillo en placa de 96 pocillos. Posteriormente las células fueron lavadas tres veces en PBS1X-BSA 1% (5 min, 600 x g) y bloqueadas con 100 uL de Paraformaldehido al 2 % (PFA 2%) por 30 min a 4 °C.

Posteriormente las células son nuevamente lavadas con PBS1X - BSA 1% e incubadas con 2 μ g de FITC:Trastuzumabu FITC:IgG disueltos en PBS-BSA 1 %, durante 1 h y en oscuridad a 4 °C.

Por último, las células fueron lavadas tres veces con PBS 1X-BSA 1% (5 min, 600×g).

Los datos fueron adquiridos empleando el citómetro de flujo BD AccuriTM C6 (BD Biosciences, San José, CA, USA) y analizados empleando el software FlowJo Versión 7.

Como controles negativos se utilizaron controles de isotipo específico acoplados al fluorocromo, FITC:IgG1 (marcado de la misma forma que el FITC:Trastuzumab), en concentración 2 μ g para cada ensayo y células sin adición de las biomoléculas; ambos controles son empleados para determinar los niveles de auto fluorescencia o de reacciones inespecíficas.

5.2.7 Modelos in vivo:

La evaluación biológica *in vivo* del complejo de [^{99m}Tc]Tc--HYNIC-Trastuzumab se llevó a cabo mediante la realización de estudios de biodistribución y SPET/CT. Todos los

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 182

procedimientos con animales fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (protocolo #763, acta 240011-002285) y en caso de ser necesario, el Comité de Experimentación del Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM).

Los modelos tumorales inducidos utilizados en esta sección (Nude hembra BT-474+ y MCF-7 + y Nude macho PC3 y LnCap) ya fueron discutidos previamente en el capítulo 3.1.8 de este documento.

Para los estudios de biodistribución en ratones normales, se emplearon ratones Balb/c machos entre 6-10 semanas de edad y 18-24 g.

Estudios de estabilidad biológica in vivo:

Animales (Balb/c machos normales, n=3 por grupo) fueron inyectados por la vena de la cola con aproximadamente ~20 μ Ci (0.5-1 MBq) del complejo de [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-Trastuzumab purificado y sacrificados por dislocación cervical luego de 1, 4 y 24 h. Los tejidos seleccionados (corazón, hígado, pulmones, tiroides, riñones, estómago, bazo, tracto gastrointestinal y vejiga) fueron extirpados, enjuagados de la sangre residual, pesados y su radiactividad medida en un detector NaI(Tl). La sangre y orina fueron también colectados y medidos. La radioactividad en el tumor y en los tejidos normales es expresada como porcentaje de dosis inyectada (%ID) y como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g).

5.2.8 Imágenes de modelos SPECT/CT en ratones macho Nude portadores de tumores (LnCap, PC3) y ratones Nude hembras portadores de tumores (MCF-7, BT-474):

Las imágenes SPECT/CT fueron realizadas en una nanoScan SPECT/CT (Mediso).

Una mezcla de 2-2.5% isoflurano y oxigeno se utilizó como anestesia, seguido o no de una inyección intravenosa en la cola de [99m Tc]Tc-HYNIC-Trastuzumab , 70-110 MBq/ratón en 100-150 µL).

Luego de 2, 5 y 24 h se realizaron las imágenes SPECT, utilizando como reconstrucción el método Tera Tomo 3D normal Dynamic (filtros medios, 128 resoluciones, 48 iteraciones, 3 subsets). Las reconstrucciones de las imágenes se analizaron utilizando el software PMOD

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 183

versión 3.8 (PMOD Technologies, Ltd., Zurich, Switzerland) utilizando volúmenes de interés (VOI) elipsionales 3D manuales alrededor del tumor y músculo.

5.2 Resultados y Discusión:

5.1.1 Conjugación HYNIC-Trastuzumab:

En primer lugar, realizamos una corrida del anticuerpo purificado por HPLC. En la **Figura 81** se muestra el perfil SEC-HPLC de Trastuzumab purificado por PD10, obteniendo un tiempo de retención de 10.07 min.



Figura 81: Perfil de SEC-HPLC, UV 280nm del Trastuzumab en columna Tooshas. Tr= 10.07 min

Realizamos la conjugación del anticuerpo al NHS-HYNIC-Tfa un perfil por cromatografía de exclusión molecular mostrado en la **Figura 82**. Se observa que el anticuerpo conjugado eluye en la fracción 4-5, mientras que el NHS-HYNIC-Tfa libre solo eluye en la fracción 7-9, pudiendo separar ambas moléculas exitosamente. A su vez, observamos con la corrida SEC-HPLC del complejo Tfa-HYNICTrastuzumab presenta nuevamente un solo pico, con un pequeño corrimiento en cuanto al tiempo de retención (Tr=10.40).



Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 184



Figura 82: Cromatografía de exclusión molecular del HYNIC-Trastuzumab, medido a 280 nm. El anticuerpo eluye en las fracciones 4-5 mientras que el NHS-HYNIC-Tfa libre eluye en las fracciones 7-9 (arriba). Perfil de SEC-HPLC, UV 280nm del Tfa-HYNICTrastuzumab en columna Tooshas., Tr= 10.40 min

5.2.2 Marcación con [^{99m}Tc]TcO₄- de Tfa-HYNIC-Trastuzumab y controles de calidad:

El Tfa-HYNIC-Trastuzumab fue marcado con $[^{99m}Tc]TcO_4$ - (1-3 μ Ci) a temperatura ambiente. Las posibles impurezas ($[^{99m}Tc]Tc$ -Tricina, $[^{99m}Tc]TcO_4$ - y $[^{99m}Tc]TcO_2$.H₂O fueron determinadas por ITLC, HPLC y PD-10.

Como ya fue mencionado, realizamos distintos kits con distintas relaciones de Tricina/SnCl₂ y volumen variable para lograr encontrar aquella que nos diera una mayor pureza radioquímica del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-Trastuzumab (**Tabla 23 y 24**).

Tabla 23: Porcentaje de impurezas y pureza radioquímica de los distintos kits utilizados para marcar el complejo Tfa-HYNIC-Trastuzumab, variando la relación de Tricina/Cloruro de Estaño y las cantidades agregadas. (ITLC-SG) (n=2)

Condiciones de marcado con [^{99m} Tc]TcO4- del Tfa-HYNIC-Trastuzumab				
Condiciones	% [^{99m} Tc]Tc	%	%	%
	HYNIC-	[^{99m} Tc]Tc-	[^{99m} Tc]TcO	[^{99m} Tc]TcO ₂ .H ₂ O
	Trastuzumab	Tricina	4-	
Relación 7/9	77.10	9.9	1.34	11.56
(12 µL)				
Relación 8/9	58.08	18.18	0.47	23.37
(12 µL)				

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 185

Relación 8/10 (12 μL)	53.89	39.40	0.76	5.95
Relación 9/10 (10 μL)	64.4	30.94	0	23.53
Relación 9/10 (12 μL)	55.83	32.41	0.15	11.61
Relación 9/10 (15 μL)	51.45	19.05	0.17	29.33
Relación 9/9 (10 μL)	64.4	24.65	0	10.95
Relación 9/9 (12 μL)	84.55	10.62	0	4.63
Relación 9/9 (15 μL)	42.7	23.27	0	34.03

De la **Tabla 23** se puede observar que el empleo de 9 mg de Tricina y 9 mg de $SnCl_2(12uL)$ fue la que resulta la mayor pureza radioquímica (84.55% de pureza radioquímica del anticuerpo marcado).

También fue evaluado el efecto de del HCl utilizado (0.5-1M) en dichas concentraciones para verificar si podemos mejorar el rendimiento de marcado (**Tabla 24**).

Tabla 24: Porcentaje de impurezas y pureza radioquímica del kit Tricina/SnCl₂ 9/9 (12 μ L) empleando diferentes concentraciones de HCl para marcar el Tfa-HYNIC-Trastuzumab, variando el pH de la solución (n=1)

Condiciones de marcado con [99mTc]TcO4- del Tfa-HYNIC-Trastuzumab				
Condiciones	% [^{99m} Tc]Tc	% [^{99m} Tc]Tc-	%[^{99m} Tc]TcO4	%[^{99m} Tc]TcO ₂
	HYNIC-	Tricina	-	.H ₂ O
	Trastuzumab			
1 M HCL	84.55	10.62	0	4.63

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 186

0.5 M HCL 86.55	8.4	0.55	4.60
------------------------	-----	------	------

De la **Tabla 24**, se puede observar que el empleo de HCL 0.5 M resulta (mínimamente) en la mejor condición para ajuste del pH empleando el kit 9/9 mg de Tricina/SnCl₂, obteniendo una pureza radioquímica máxima de 88.19 \pm 2.84 % por ITLC-SG (n=3), por lo cual es necesario aún un paso de purificación por columna de PD-10 para lograr eliminar las impurezas principales ([^{99m}Tc]Tc-Tricina y [^{99m}Tc]Tc TcO₂.H₂O).

En el sistema de HPLC previo a la purificación por PD-10, los radiocromatogramas revelaron un valor de Tr de ~14.01 min [^{99m}Tc]TcO₄- y [^{99m}Tc]Tc-Tricina. Por su parte, el complejo [^{99m}Tc]Tc--HYNIC-Trastuzumab presenta un Tr=10.17 min (Ver **Figura 83**), similar al visto para el Trastuzumab purificado, obteniendo un %PRQ ~90%, similar a lo visto en las ITLCS-SG.



Figura 83: Perfil de SEC-HPLC, UV 280nm (arriba) y Gamma (abajo) del [99m Tc]Tc--HYNIC-Trastuzumab en columna Tooshas. Marcado con kit 9/9 12 µL, 0.5 M HCL., [99m Tc]Tc-HYNIC-Trastuzumab (Tr= 10.17 min) e impurezas ([99m Tc]TcO4- y [99m Tc]Tc-Tricina Tr=14.01).

Utilizando el kit seleccionado y marcando con ~2 mCi, se obtuvo el siguiente grafico de exclusión molecular por PD-10 (**Figura 84**). Se observa la efectiva purificación del Trastuzumab radiomarcado (volumen de retención de 3-5 mL), libre de impurezas (volumen de retención 7 mL). La pureza radioquímica del purificado resultó ser de 96.94 \pm 0.64% por

ITLC y ~95% (HPLC) (**Tabla 25** y **Figura 82**), logrando actividades específicas de 129.63 \pm 9.04 MBq/mg (máximo 296 MBq/mg). Estos resultados coinciden con los estudios previos realizados en el laboratorio por *Calzada V et al* ³⁰².



Figura 81: Cromatografía de exclusión molecular para el [99m Tc]Tc-HYNIC-Trastuzumab (Relación Tricina/SnCl₂ 9/9, 12µl). Volumen de Retención del complejo (3-5 mL). [99m Tc]Tc-Tricina y [99m Tc]TcO₂.H₂O con un volumen de retención ~7 mL.

Tabla 25: Pureza	a radioquímica de	l marcado pre	PD-10 y post	PD-10
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			-

Condiciones de marcado con [^{99m} Tc]TcO ₄ - del HYNIC-Trastuzumab (ITLC)				
Condiciones	% [^{99m} Tc]Tc	% ^{99m} Tc-	[^{99m} Tc]TcO4-	[^{99m} Tc]Tc.H ₂ O
	HYNIC-	Tricina		
	Trastuzumab			
PRE-PD-10	88.19 ±2.84	10.95±1.16	0.67±1.15	5.42±1.11
POST PD-10	96.94 ±0.64	2.41±1.48	0	1.62±0.33



Figura 82: Perfil SE-HPLC, columna TSK-GEL G3000 SWXL del complejo [^{99m}Tc]Tc--HYNIC-Trastuzumab. Espectros de UV (arriba, Tr=10.17 min) y detector gamma (abajo) post PD-10.

A su vez, estudiamos la estabilidad del complejo Tfa-HYNIC-Trastuzumab en el tiempo, almacenado a 4°C por un mes (**Figura 83**), encontrando que resulta ser estable durante dicho tiempo. Pasado el mes, el complejo parece desestabilizarse, llevando a eficiencias de marcado menor (%PRQ pre-PD-10 <60%), si bien luego de purificarlo obtenemos purezas radioquímicas mayores a 90%.



Figura 83: Marcación de [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-Trastuzumab almacenado a 4°C por un mes, previo a la purificación por columna PD-10. %PRQ=Pureza Radioquímica.

5.2.3. Estabilidad de estabilidad in vitro del complejo [^{99m}Tc]Tc--HYNIC-Trastuzumab:

En la **Figura 84**, se observa La estabilidad in vitro de [^{99m}Tc]Tc--HYNIC-Trastuzumab purificado por PD-10 en NaCl 0,9% y SFB así como contra distintas concentraciones de L-Cisteína a 37°C hasta 24 h post marcado.





De la **Figura 84** se puede observar que aún transcurridas 24 h de la marcación, el complejo resulta ser estable, con una pureza radioquímica mayor al 80%, incluso frente al competidor (transquelante) la L-cisteína, lo que lo hace óptimo para su uso *in vivo*.

5.3.4 Conjugación de Trastuzumab con isotiocianato de fluoresceína (FITC):

La concentración de FITC-Trastuzumab en mg/ml obtenido fue de 1.69 ± 0.51 mg/mL, cuya relación de moles FITC/moles Trastuzumab fue de 7.77 ± 1.73 ; logamos a su vez obtener una relación similar en cuanto FITC/IgG (7.43 ± 0.45), y una concentración de 0.2-1 mg/mL.

5.3.5 Estudios biológicos in vitro de unión celular:

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 190

Fueron realizados ensayos en líneas celulares de cáncer de próstata humanas (PC3, Du-145, LnCap) para analizar la respectiva unión específica del anticuerpo Trastuzumab por su receptor; empleando como control negativo se empleó una línea celular de próstata humana normal (RWPE-1). A su vez se emplearon las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-213 (HER2 -) como control negativo de la expresión del receptor HER2 y BT-474 (HER2 +) como control positivo de expresión del HER2. En todos los ensayos realizados se emplearon 50 nM del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-Trastuzumab . En las **Figuras 85** y **86** se observa el porcentaje de unión total del complejo ^{99m}Tc-HYNIC-Trastuzumab en las líneas celulares analizadas.

Se logró observar que la línea celular LnCap (**Figura 85 y 86**) presentó un porcentaje de unión a membrana de $2.8 \pm 0.6 \%$, $4.0 \pm 0.70 \%$ y $5.9 \pm 1.2 \%$ a 1, 2, 4 h respectivamente. El porcentaje de internalización a su vez fue de $0.40 \pm 0.03 \%$, $0.92 \pm 0.06 \%$ y $1.46 \pm 0.01 \%$ a 1, 2, 4 h. Por lo anterior, podríamos confirmar que el anticuerpo una vez unidos al receptor HER2 presenta una baja internalización, al menos en los tiempos estudiados en este ensayo.

Por otra parte, en la línea celular Du-145, se observó un porcentaje de unión total de 1.9 \pm 0.2 %, 3.4 \pm 0.1 % y 4.0 \pm 0.6 % a las 1, 2 y 4 h respectivamente. Mientras La línea PC3 presenta un porcentaje de unión total de 0.75 \pm 0.03 %, 2.9 \pm 0.4 % y 4.2 \pm 0.4 a las 1, 2 y 4 h respectivamente. Por su parte la línea celular normal de próstata RWPE-1 poseen un porcentaje de unión total de 0.6 \pm 0.1 %, 0.65 \pm 0.04 % y 0.86 \pm 0.03 % a las 1, 2 y 4 h respectivamente.

Por último, la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 (HER2 -) presentan un porcentaje unión total de 0.73 ± 0.06 %, 0.58 ± 0.07 % y 0.81 ± 0.19 % a las 1, 2 y 4 h respectivamente. Mientras que la línea celular BT-474 (HER2 +) presenta un porcentaje de unión total del 9.2 ± 0.6 %, 7.81 ± 0.03 % y 12.9 ± 0.3 % a las 1, 2 y 4 h respectivamente (Ver **Figura 85**).

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 191



Figura 85: Porcentaje de unión celular total del complejo [99m Tc]Tc--HYNIC-Trastuzumab en líneas celulares RWPE-1, LnCap, PC3 y Du-145, MDA-MB-435 y BT-474 (promedio ± SD, n=4). Se grafica **** en caso de P \leq 0.0001,*** en caso de P \leq 0.001, ** en caso de P \leq 0.004, ** en caso de P \leq 0.05 y ns en caso de P \leq 0.05 (no significativo)(Two way-ANOVA).



Figura 86: Porcentaje de unión, internalización y total del complejo [^{99m}Tc]Tc--HYNIC-Trastuzumab a la línea celular LnCap.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 192

Observamos que estudios estadísticos (Two-Way ANOVA) entre las uniones totales de los controles negativos (MDA-MB-231) y el resto de las líneas celulares, demostraron una diferencia significativa (P≤0.05 o mayor) frente a todas las líneas de cáncer de próstata evaluadas, entre los tiempos 2-4 h; por su parte, no apreciamos diferencias significativas entre el control negativo y la línea de próstata normal humana RWPE-1 en ninguno de los tiempos evaluados, indicando que el receptor HER2 este efectivamente sobreexpresado en las líneas de cáncer de próstata evaluadas, según lo hipotetizado en este trabajo.

Para realizar los ensayos de bloqueos, se procedió a incubar con 50 µg de anticuerpo sin marcar previo a incubar todas las líneas celulares con el complejo del anticuerpo radiomarcado para realizar el estudio. Para esto se eligió el tiempo de 4 h de incubación debido a que fue el tiempo que presento la mayor unión total. En la **Figura 87** se puede observar que en la mayoría de las líneas de CaP evaluadas el anticuerpo sin marcar bloquea aproximadamente \geq 50% de la unión, demostrando la alta especificidad de dicha unión (Student t). Por su parte, tanto el control negativo como la línea de próstata human normal RWPË-1no presenta un bloque significativo (Student t).

En dicha figura se puede apreciar que la línea celular LnCap presento un bloqueo aproximado del 78% de la unión, mientras que las Du-145 presentaron un 46%. Por su parte la línea PC3 fueron bloqueadas un 54 %; mientras que las RWPE-1 y MDA-MB-231 se apreció un bloqueo de 10.5 % y 6.3% respectivamente. Por último, las BT-474 presentaron un bloqueo de ~90%.

Notar nuevamente que diversas líneas celulares de CaP humanas (Ej: PSMA – y PSMA+, Ver **Tabla 10**) logran unirse específicamente al radiofármaco desarrollado; aumentando la potencialidad de este como agente de imagen para esta patología.



Figura 87: Porcentaje de unión total con y sin bloqueo (50 µg Trastuzumab) para todas las líneas evaluadas (promedio \pm SD, n=3). **** graficado si P <0.0001, *** si P≤0.001, * si P≤0.05 y ns en caso P>0.05 (no significativo).(Student t).

Los resultados obtenidos son consistentes a los publicados por *Malmberg et al*²³⁵. En este trabajo de demostró la unión específica del complejo [¹¹¹In]CHX-A"DTPA-Trastuzumab a las tres líneas celulares de CaP evaluadas, donde evidencia la presencia de mayor número de receptores en la línea LnCap, y una mayor captación del anticuerpo en la misma. Cabe destacar que en dicho estudio se realizaron ensayos hasta 24 h de unión celular, observándose un aumento en la unión total e internalización proporcional al tiempo, si bien la internalización a las 4 h sería cercana a la observada vista en este estudio (~20%), por lo cual tampoco realizamos estudios de eflujo. Sería aconsejable en un futuro realizar ensayos celulares de mayor tiempo de internalización (>8 h). Ya ha sido comprobado que el Trastuzumab produce una internalización lenta de su receptor específico^{303,304}, por lo cual aumentar las horas del estudio evidenciaría este proceso.

También en su trabajo, *Tan Z et al*²³⁶ demostraron la expresión del receptor en las líneas LnCap, Du -145 por *inmunoblot*, y la presencia del receptor en la línea LnCap por inmunohistoquímica, resultados consistentes con lo vislumbrado en este trabajo.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 194

5.3.6 Análisis por citometría de flujo:

Se realizaron estudios por citometría de flujo en las líneas celulares ya mencionadas a modo evaluar el nivel de expresión la expresión del HER2 a nivel de membrana (**Figuras 88-94**).

En primer lugar, realizamos el estudio en la línea celular LnCap (**Figuras 88-89**), diferenciando la autoflourecencia de las células solas de la unión del anticuerpo al receptor HER2.



Figura 88: Análisis por citometría de flujo de la línea celular LnCap, rojo (células solas). Azul (control isotipo, IgG-FITC) y amarillo (Trastuzumab-FITC).



Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 195

Figura 89: Comparación de MFI (intensidad media de fluorescencia) de las células LnCap.). **** graficado si P <0.0001, *** si P \leq 0.001, * si P \leq 0.05 y ns en caso P>0.05 (no significativo).(Student t).

Observamos que para el caso de las células LnCap, el 95% de estas resultan ser HER2 positivas, habiendo una diferencia significativa de la MFI (Median Fluroescent Index) entre las células marcadas con el control isotipo FITC-IgG y el FITC-Trastuzumab, lo cual confirma la sobreexpresión de dicho receptor en la membrana de esta línea celular.

Repetimos para la línea Du-145 (Figura 90).



Figura 90: Análisis por citometría de flujo de la línea celular Du-145, rojo (células solas). Azul (control isotipo) y amarillo (Trastuzumab-FITC).

Por su parte, en la **Figura 90** se observa que para el caso de las células Du-145, el 70% de estas parece ser HER2 positivas, a la vez que parece haber una distribución bimodal de dichas células (parte positiva débil y otra positiva), por lo cual no realizamos estudios de MFI, ya que no es recomendado en estas circunstancias al obtener dos grupos definidos. Resta aún estudiar si esto puede ser debido a una saturación del receptor o simplemente al comportamiento de la línea en sí. Estrategias de *backgating* para ambas poblaciones descartan la presencia de dobletes o diferencias morfológicas que pueden causar dicho espectro. Variamos también la concentración del anticuerpo a modo de descartar fenómenos como el efecto Hook, obteniendo el mismo resultado.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 196

Repetimos el mismo proceso para las células PC3 (Figura 91).



Figura 91: Análisis por citometría de flujo de la línea celular PC3, rojo (células solas). Azul (control isotipo) y amarillo (Trastuzumab-FITC)

En la **Figura 91** se observa que para el caso de las células PC3, el 35% de estas parece ser HER2 positivas, nuevamente apreciamos una distribución bimodal de dichas células (parte positiva débil y otra positiva) similar a lo visto para la línea Du-145, por lo cual nuevamente no realizamos comparación de MFI. Ensayos con menor cantidad de anticuerpo dieron el mismo resultado, por lo cual parece ser un efecto de la línea en sí (ej.: mutación por exceso de pasajes) y no artefacto del anticuerpo. Similar a lo visto con las células Du-145, estrategias de *backgating* descartaron la presencia de dobletes o diferencias morfológicas que puedan explicar este fenómeno.

Repetimos nuevamente el análisis para las células MDA-MB-231 (control negativo) (**Figura** 92-93).



Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 197

Figura 92: Análisis por citometría de flujo de la línea celular MDA-MB -231, rojo (células solas). Azul (control isotipo) y amarillo (Trastuzumab-FITC).



Figura 93: Comparación de MFI (Intensidad media de fluorescencia) de las células MDA-MB-231.

En las **Figuras 92 y 93** se observa que en el caso de la línea celular MDA-MB-231 la expresión de HER2 es negativa (~5% expresión), lo cual es consistente a los estudios previamente realizados en la sección anterior por *binding*. A su vez, no apreciamos una diferencia significativa de la MFI entre las células marcadas con el control isotipo FITC-IgG y el FITC-Trastuzumab, lo cual confirma la falta de dicho receptor en la membrana de esta línea celular.

Por último, repetimos el estudio para la línea celular BT-474 (control positivo) (Figura 94).



Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 198

Figura 94: Análisis por citometría de flujo de la línea celular BT-474, rojo (células solas). Azul (control isotipo) y amarillo (Trastuzumab-FITC).

En la **Figura 94**, se observa que la expresión de HER2 en la línea BT-473 es moderada-alta (~73%), nuevamente siendo consistente con los resultados observados en los estudios de unión celular realizados en la sección anterior.

Podemos entonces confirmar la expresión moderada del receptor en las líneas celulares de CaP evaluadas en comparación con el control negativo (MDA-MB-231); la expresión diferencial del receptor podría explicar los resultados observados en los ensayos de *binding* celular previamente realizados.

5.3.7 Modelos in vivo:

En la **Tabla 26** y **Figura 95** se observa el estudio de biodistribución del compuesto [99m Tc]Tc-HYNIC-Trastuzumab en ratones Balb/c machos normales. Los niveles de radiactividad en sangre de los ratones fueron de 12.96±2.09 %ID/g, 23.44±2.86 %ID/g y 20.82±2.53 %ID/g a 1, 4 y 24 h p.i, lo cual indica una lenta eliminación de la sangre del anticuerpo marcado. Se observó una apreciable absorción hepática de 4.39 ±1.27 %ID/g, 8.26±2.38 %ID/g y 10.30±2.79 %ID/g y renal de 7.24±3.82 %ID/g 6.56±0.38 %ID/g, 7.83±0.10 %ID/g , a 1, 4 y 24 h p.i relacionada a la eliminación del anticuerpo marcado, también una baja actividad gastrointestinal del mismo (aumenta a las 24 h, relacionado con la eliminación).

A su vez, notar la baja absorción en tiroides $(1.4\pm0.4 \text{ \% ID/g a las } 24 \text{ h})$, lo cual es indicativo de la estabilidad del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-Trastuzumab en un sistema biológico, lo cual lo hace óptimo como potencial agente de imagenología molecular.

Tabla 26: Biodistribuciones del [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-Trastuzumab en ratones Balb/c machos normales. %ID/g (%dosis inyectada/gramo, n=4)

%ID/g	1 h	4h	24 h
Sangre	13±2.0	23±2.9	21±2.53

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 199

Hígado	4.4 ±1.3	8.3±2.4	10±2.8
Corazón	3.1±0.5	6.2±3.1	14±2.2
Pulmón	3.3±1.8	12±4.7	14±0.4
Bazo	8.6±2.0	9.8±2.8	12±2.4
Riñón	7.2±3.8	6.6±0.4	7.8±0.1
Tiroides	5.6±2.7	4.9±1.6	1.4±0.4
Músculo	$1.7{\pm}1.0$	0.22±2.5	5.9±1.1
Hueso	2.6±0.7	1.9±2.4	4.1±0.7
Estómago	4.9±3.5	7.1±2.0	5.5±3.0
TGI	2.0±0.8	2.7±0.3	9.1±1.5
vejiga +orina	5.9±4.2	6.3±0.6	7.4±1.4





5.3.8 Imágenes SPECT/CT:

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 200

Las imágenes SPECT/CT fueron realizadas en los modelos: BT-474 (HER2 +), MCF-7 (HER2 -), LnCap (HER 2 moderada) y PC3 (HER2 baja), a 2, 5 y 24 h p.i (**Figuras 96-99**).



Figura 96: Imagen SPECT/CT coronal del [^{99m}Tc]Tc--HYNIC-Trastuzumab en ratones nude hembras portadores de tumores BT-474 a 2, 5 y 24 h p.i (izquierda a derecha). Notar el tumor marcado en azul (VOI).



Figura 97: Imagen SPECT/CT coronal del [^{99m}Tc]Tc--HYNIC-Trastuzumab en ratones nude hembras portadores de tumores MCF-7 a 2, 5 y 24 h p.i (izquierda a derecha). Notar el tumor marcado en azul (VOI).

Cabe destacar que ambos ensayos con los modelos tumorales BT-474 (HER2 +) y MCF-7 (HER2-) sirven a su vez como control de calidad de nuestro radiofármaco [^{99m}Tc]Tc--HYNIC-Trastuzumab, confirmando que no se altera la unión específica de nuestro anticuerpo

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 201

monoclonal por su molécula blanco, a la vez que observamos una biodistribución consistente con las mostrada anteriormente la sección anterior (**Figuras 96-97**).



Figura 98: Imagen SPECT/CT coronal del del [^{99m}Tc]Tc--HYNIC-Trastuzumab en ratones nude machos portadores de tumores LnCap a 2, 5 y 24 h p.i (izquierda a derecha). Notar el tumor marcado en azul (VOI).



Figura 99: Imagen SPECT/CT coronal del del [^{99m}Tc]Tc--HYNIC-Trastuzumab en ratones nude machos portadores de tumores PC3 a 2, 5 y 24 h p.i (izquierda a derecha). Notar el tumor marcado en azul (VOI).

En cuanto a las relaciones Tumor/Músculo, calculadas por VOI, observamos que los tumores BT-474 tienen la máxima relación a las 24 h (8.84±2.45, n=2), seguidas por los tumores LnCap a las 1 h (4.82±0.82 n=3). Por el otro lado, los tumores MCF-7 se mantienen debajo

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 202

de 2 (máximo 1.48 a las 5 h n=1) y los tumores PC3 poseen un máximo de 3.0 a las 5 h, n=1 (ver Figura 100).



Figura 100: Relación Tumor/Músculo (T/M) del [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-Trastuzumab en ratones nude con diversos modelos tumorales (n=1-2) ya mostrados.

Podemos confirmar lo observado en los estudios *in vitro* realizados en líneas celulares en las imágenes SPECT/CT obtenidas, en donde la línea celular de cáncer de próstata humana LnCap presenta la mayor afinidad frente al Trastuzumab de las tres líneas de cáncer de próstata evaluadas en este trabajo. A su vez, observamos que las imágenes SPECT/CT son consistentes a los resultados obtenidos en las biodistribuciones, observándose unas altas captaciones en hígado, bazo, sangre y estómago, y observando una clara disminución de esta absorción no específica a las 24 h.

A pesar de obtener estos resultados promisorios, estos no concuerdan con la hipótesis propuesta en la introducción, que teoriza que el switch a la independencia androgénica está acompañado de una sobreexpresión del receptor ERB2/neu, ya que de ser así esperaríamos que las células andrógeno independientes (PC3, Du-145) presenten una mayor proporción del receptor que las andrógenas dependientes (LnCap). Cabe destacar que más ensayos de biodistribuciones con estas líneas tumorales, así como un mayor número de animales para

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 203

realizar estudios de imagenología SPECT/CT son necesarios para lograr una conclusión más robusta.

Sin embargo, hay que considerar que estamos trabajando con modelos tumorales, por lo que en la práctica clínica el panorama puede ser distinto y más favorable y coherente con la hipótesis establecida.

Comparando con el complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA estudiado previamente, apreciamos que las relaciones Tumor/Músculo calculadas por SPECT/CT del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-Trastuzumab en ratones portadores de tumores LnCap son similares para ambos radiotrazadores (máximo 4.82±0.82 y 3.7±0.050, n=3 para el [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA y [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-Trastuzumab respectivamente). Se aprecia también un comportamiento similar en el caso de ratones portadores de tumores PC3 (4.6±1.7 (n=3) vs 3.0 (n=1) para [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA y [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-Trastuzumab respectivamente), si bien el limitado número de ratones analizados no permite un resultado más robusto.

Podemos a su vez decir que el compuesto parecería comportarse mejor por SPECT/CT que el complejo [68 Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) (máxima relación Tumor/Músculo obtenida en los modelos tumorales LnCap y PC3 de 2.4 ± 0.3 y 2.4 ± 0.4 (n=3) por PET/CT), si bien ya se han discutido los limitantes de dicha técnica que pudieron haber llevado a resultados subóptimos ya discutidos previamente el capítulo 4. También cabe considerar el numero limitado de animales por estudio, necesitando expandir dichos grupos para lograr conclusiones más sólidas.

5.3 Conclusiones:

Como se mencionó en el capítulo previo, la generación de nuevos agentes de imagenología para cáncer de próstata nos podría ayudar a mejorar el diagnóstico y tratamiento del mismo, logrando por consiguiente disminuir la mortalidad.

Teniendo esto en cuenta, desarrollamos un potencial radiotrazador basado en el anticuerpo monoclonal Trastuzumab, utilizando el agente quelante Tfa-HYNIC y el ^{99m}Tc como agente de imagen SPECT/CT.

Logramos una conjugación y marcación exitosa y sencilla, si bien es necesario un paso de purificación por columna PD-10, lo que podría dificultar su posible uso clínico. El complejo preserva su actividad biológica, y posee una biodistribución normal para este tipo de molécula en ratones macho Balb/c normales.

Las imágenes SPECT/CT nos permitieron observar la captación tumoral del mismo y evaluar su potencial rol como agente de imagen oncológica, si bien aún quedan estudios por hacer para estar seguros de su empleo en esta patología.

Cabe destacar nuevamente, que todos los estudios realizados fueron hechos en tumores primarios, por lo cual la posible identificación de metástasis tumorales por este radiotrazador no fue tenida en cuenta en este trabajo.

La aplicación del anticuerpo Trastuzumab marcado con ^{99m}Tc como agente de imagenología molecular en el cáncer de próstata ofrece una perspectiva novedosa y prometedora en la detección y seguimiento de la enfermedad. Esta estrategia combina la especificidad del Trastuzumab para el receptor HER2/neu con la capacidad de imagen del tecnecio-99m, lo que permite una visualización precisa de la localización y extensión del cáncer de próstata.

Los estudios preliminares realizados en esta tesis sugieren que esta técnica podría emplearse para la detección temprana de la enfermedad en ciertos subgrupos de pacientes, así como guiar la selección de tratamientos específicos y evaluar la respuesta terapéutica de manera más efectiva. Sin embargo, se requieren más investigaciones clínicas para validar su eficacia y establecer su utilidad clínica en la práctica diaria. En resumen, el Trastuzumab

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 205

marcado con ^{99m}Tc representa una herramienta prometedora en la gestión del cáncer de próstata, que podría mejorar el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes en el futuro.

A su vez, vale la pena destacar el desarrollo de recursos humanos, así como de una plataforma para la marcación de anticuerpos monoclonales de alta calidad y alta pureza radioquímica, que puede a futuro ser aplicada en otras moléculas y radioisótopos similares, sumando conocimiento científico y formación al área de la Medicina Nuclear en crecimiento local.

6-Conclusiones finales:

En resumen, mediante el presente trabajo logramos sintetizar y caracterizar tres nuevos radiofármacos con alta potencialidad en cuanto a su aplicación clínica para el diagnóstico de cáncer de mama y próstata. Demostramos la estabilidad de dichos complejos en condiciones *in vitro*, así como su especificidad selectiva *in vitro* en diversas líneas celulares.

Pudimos confirmar por ensayos *in vivo* los perfiles de biodistribución , característicos de dichas moléculas y comparables a lo ya visto en la bibliografía. A su vez, podemos en su mayoría comprobar *in vivo* en modelos tumorales la acumulación de nuestro radiofármaco en el tumor, y sus altas relaciones Tumor/Músculo.

Todos los radiofármacos generados demostraron ser buenos agentes de imagenología molecular, ya sea para SPECT o PET, logrando en todos los casos visualizar los tumores estudiados.

El primer radiofármaco, denominado [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-GSG-LHRH(D-Lys6)/Tricina/NA ha demostrado una gran facilidad de marcado, así como estabilidad y alta afinidad por receptores específicos en célula tumorales, tanto de cáncer de mama como de próstata. Los ensayos de biodistribuciones han demostrado una captación tumoral específica, así como una buena visión de distintos tumores representativos de estas patologías en modelos murinos, lo que sugiere su utilidad prometedora en la detección temprana y el seguimiento de la progresión del cáncer de mama y próstata.

El segundo radiofármaco, el complejo [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Ahx-LHRH(D-Lys6) nuevamente demostró una facilidad en cuanto a su marcado, si bien hubo limitantes en cuanto al volumen del mismo y la actividad específica obtenida para realizar ensayos de imagenología PET/CT. Aun así, demostró una alta especificidad por las diversas líneas celulares estudiadas, así como óptimos perfiles de biodistribución y captación tumoral específica. A pesar de las dificultades del marcado, se lograron obtener imágenes PET-CT donde se evidencia específicamente la captación del tumor.

Finalmente, el tercer radiofármaco [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-Trastuzumab demostró nuevamente un alta pureza radioquímica, si bien es necesario un paso previo de purificación por columna PD-10, a la vez que es nuevamente estable y demuestra una unión específica a las células de próstata evaluadas. Los ensayos SPEC/CT permitieron vislumbrar tumores LnCap y PC3 en modelos murinos, pero su utilidad en clínica aún está en duda debido a su difícil marcado y desconocimiento aún del rol del receptor de membrana HER2 en dicha patología.

Si bien es necesario más estudios y pruebas, el presente trabajo demuestra un estudio riguroso y amplio de dos blancos moleculares soobreexpresados en dos patologías oncológicas; y distintas estrategias del empleo de dichas biomoléculas para generar nuevos agentes de diagnóstico y -quizás a futuro-tratamiento en Medicina Nuclear.

Cabe a su vez destacar la generación de conocimiento y recursos humanos del país, así como la creación de nuevos vínculos entre instituciones (ej.: CIN-CUDIM) para la realización del trabajo presentado.

7-Perspectivas a futuro:

Como perspectivas, cabe destacar la generación de diversos proyectos de investigación basados en el LHRH como agente de imagenología molecular (Proyecto CSIC 2020 y FMV-ANII 2022 financiados a la Dra. Ximena Camacho) los cuales están en marcha a la fecha.

A su vez, como ya fue mencionado, se puede aún continuar y seguir optimizando los radiofármacos presentados en este trabajo, ya sea tanto *in vitro* como *in vivo*. Por diversos motivos (de tiempo u recursos), muchos ensayos no pudieron ser realizados o quedaron limitados en cuanto al número réplicas.

8-Producción bibliográfica durante el período del Doctorado.

Artículos publicados en proceso- Completos-Arbitrados

-Hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH): potencial agente de oncología molecular. Alfaya L, Camacho X, Cabrera M, García MF, Fernández M, Gambini JP, *et al. Salud Militar*. ;37(2):10-2 (2018)

- Preclinical evaluation of 99mTc-labeled LHRH as GnRH receptor imaging. Alfaya L, *et al.* Manuscirto enviado a la revista "Oncology" en febrero del 2024 y actualmente en proceso de *peer review*.

Presentaciones en eventos:

-SNMMI Annual Meeting; junio 2017; Denver, Colorado, EEUU. Presentacion del poster de tercera autora "Development and evaluation of ^{99m}Tc-HYNICLHRH petpide as potential tumor imaging agent", a cargo del Dr. Juan Pablo Gambini.

Trabajo ganador del premio "International Best Abstract Award".

-Encuentro Nacional de Química 5, octubre 2017, Torre de las Telecomunicaciones, Montevideo, Montevideo, Uruguay. Presentación del poster de primera autora "Desarrollo y Evaluación de ^{99m}Tc-HYNICLHRH como potencial agente de imagen tumoral".

-Encuentro Nacional de Química 6, octubre 2019, Torre de las Telecomunicaciones, Montevideo, Montevideo, Uruguay. Presentación del poster de primera autora "Hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH): potencial agente de oncología molecular".

 - XXVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear; noviembre 2019, Lima, Perú. Presentación oral primera autora: "Potencial empleo de análogo LHRH coma agente de imagen en cáncer de próstata".

 VIII Latin American Meeting on Biological and Inorganic Chemistry; abril 2020, Montevideo, Uruguay. Presentación "Student Oral Presentation" del trabajo de primera autora "Trastuzumab as a novel prostate imaging agent". - EANM'21 Virtual - Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine. Octubre 2021. Aceptado para "Top Rated Oral Presentation" del trabajo de primera autora "^{99m}Tc-HYNIC-LHRH analog as novel breast cancer imaging agent".

- SNMMI 2022 Annual Meeting. Abril 2022. Presentación poster de primera autora "^{99m}Tc-HYNIC-LHRH analogue as a novel prostate cancer imaging agent.

- Terachem 2022 Septiembe 2022. Presentación poster "[⁶⁸Ga]Ga/[^{99m}Tc]Tc labeled-LHRH analog as new potential breast cancer imaging agents.

-Encuentro Nacional de Química 8, octubre 2023, Torre de las Telecomunicaciones, Montevideo, Montevideo, Uruguay. Presentación del poster de primera autora "Desarrollo local de nuevos agentes SPECT basados en ^{99m}Tc para cáncer de próstata".

- XXIX ALASBIMN/XXIII AABYMN, Noviembre2023, Buenos Aires, Argentina. Presentación del poster de primera autora "[^{99m}Tc]Tc-HYNIC-Trastuzumab: Nueva perspectiva en cáncer de próstata."

Anexos:

Bases moleculares	Radiofármacos	Usos	Referencias
FAP	[⁶⁸ Ga]Ga-FAPI	Tiene un rol en la biología tumoral, su expresión se asocia a la proliferación tumoral y peor prognosis.	306–316
PSMA	[⁶⁸ Ga]Ga - PSMA	Posible uso en pacientes refractarios a terapia estándar.	317–319
CXCR4	[⁶⁸ Ga]Ga - Pentixafor	Se encuentra sobreexrpresada en cáncer de mama invasivo, teniendo rol en la migración, invasividad, metástasis y proliferación.	320–322
ER	F16a-[¹⁸ F] fluoro-17b- estradiol (¹⁸ F-FES)	Análogo del estradiol, su uptake se correlación con la concentración de ER. Alta afinidad, utilizado para imagen de tumor primario y metástasis, seguimiento de terapia endócrina.	323–327
PR	[¹⁸ F]- fluorofuranyl norprogesterone ([¹⁸ F]-FFNP)	Da idea del estatus del PR en tumor primario y metastásico, predice respuesta a la terapia endócrina.	328-330
HER2	[⁶⁴ Cu]/[⁶⁸ Ga]/[⁸⁹ Zr]- Trastuzumab/F(ab) '2[⁶⁸ Ga]GaA BY-002	Estudiar expresión de HER2 en tumor primario, nódulos linfáticos y metástasis pulmonares, evaluar respuesta a la terapia.	324,331,332
AR	16β-[¹⁸ F]fluoro- 5α- dihydrotestoster one ([¹⁸ F]FDHT)	Alternativa a la biopsia, detección de metástasis. Evaluar respuesta a terapia selectiva a receptores de andrógenos (SARM).	328,333–335
Receptor Somatostatina	[⁶⁸ Ga]Ga- DOTATATE	Tumores ER/PR + tienen un menor uptake de FDG, por lo que podría ser una alternativa y guía para la terapia hormonal.	336,337

Tabla 1: Lista de radiofármacos PET utilizados u desarrollados para la detección para el cáncer de mama. Modificado de *Hadebe et al y Balma et al*^{80,305}.

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 212

Angiogénesis.	[¹⁸ F]-AlF- NOTA-PRGD2 ([¹⁸ F]-alfatide) [⁶⁸ Ga]Ga-TRAP (RGD)3 [⁶⁸ Ga]Ga- Bevacizumab.	Péptidos ciclos de RGD de alta afinidad y selectividad por integrina avb3. El anticuerpo Bevacizumab ha sido utilizado en terapia por su capacidad de inhibir la vía de VEGF, por lo cual su uso es bueno en diagnóstico y predicción del tratamiento anti VEGF.	338–340
GRPR	[⁶⁸ Ga]Ga-RM2	Se encuentran sobre expresados en Cáncer de mama y asocia a metástasis en nódulos linfáticos. Su expresión se correlaciona con la expresión de ER. Presenta una mejor relación tumor- background, lo cual da una mejor especificidad que la ¹⁸ F-FDG	341,342
PARP-1	[¹⁸ F]-PARPi (Poly(ADP- ribose) polymerase-1) ¹⁸ F-FTT	Los inhibidores de PARP inhiben su actividad catalítica, y promueven la apoptosis celular. ¹⁸ F-PARPi and ¹⁸ F- FTT han entrado en ensayos clínicos en cáncer de mama, cerebro y ovario.	343,344
Hipoxia	[¹⁸ F]- fluoromisonidaz ole ([¹⁸ F]MISO	TNBC demuestra un mayor uptake que los tipos Luminal A y se correlaciona con un mayor tamaño tumoral y ER-/PR Ayuda a detectar pacientes con recurrencia temprana y aquellos que se benefician con terapia angiogénica.	345
Metabolismo Colina	[¹¹ C]-Colina	Utilizado en individuos con cáncer de mama primario o metastásico ER+	346,347
Proliferación celular	[¹⁸ F]fluorotimid ina (FLT), [¹⁸ F]F-FMAU, [¹⁸ F]F-ISO-1	Utilizado en individuos con cáncer de mama temprano ER+, metástasis regionales. Mayor absorción de FFLT vs FMAU en tumores agresivos (TNBC). Absorción de FISO correlative a expressiónn ki-67.	348–353
Análogos de la leucina.	[¹⁸ F]F-FACBC (3-[¹⁸ F]- fluorocyclo- butane1- carboxylic acid)	Estudios demuestran que el uptake de [18F]F-FACBC es mayor en cáncer de mama que en tejido normal y lesiones malignas, correspondiente al grado tumoral. También es capaz de detector metástasis a distancia. Alto uptake hepático	354–356

Metabolismo cisteína	[¹⁸ F]F-FASu, L- [¹¹ C]C-tirosina, [¹⁸ F]FFGln, [¹⁸ F]F-FSPG	Uptake varía según tipo histológico o molecular de cáncer de mama.	357–360
Inmuno checkpoint (Anti PD-L1)	[⁸⁹ Zr]Zr- atezolizumab	Alto uptake en médula ósea, intestino, riñones e hígado, bajo en cerebro y resto de tejidos. Uptake tumoral alto pero con grado de variabilidad.	361
Metástasis óseas.	[¹⁸ F]-NaF [⁶⁸ Ga]-Ga Zoledronate ([⁶⁸ Ga]Ga- DOTA ^{ZOL})	Baja especificidad. Utilizado en conjunto con [¹⁸ F]-FDG para mejor detección de lesiones esqueléticas y en médula ósea. Posible uso terapéutico con [¹⁷⁷ Lu]Lu- DOTA ^{ZOL} and [²²⁵ Ac]Ac-DOTA ^{ZOL}	362–367
EGFR	[¹¹ C]- PD153035, [¹¹ C]-ML03, [¹⁸ F]-ML04	Desarrollo en preclínica hasta la fecha	368

FAP: Proteína activadora de fibroblastos; proteína transmembrana sobreexrpresada en fibroblastos asociados al cáncer (CAFs), PSMA: antígeno prostático específico de membran; una proteína de membrana sobre expresada en cáncer de próstata y neovasculatura de tumores malignos, incluido mama. AR: receptor de andrógenos ,se co expresa 75-95% de los cánceres ER+:Receptor de estrógenos.PR: Receptor de Progesterona. TNBC: Cáncer de mama triple negativo. GRPR: Recetor del péptido liberador de la gastrina un tipo de receptor de bombesina, capaz de unir a su ligando, el péptido liberador de gastrina (GRPR). PARP-1: Poli [ADP-ribosa] polimerasa 1 es una enzima encargada de la reparación del ADN. EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico. (proteína de membrana de la familia del HER2, sobreexrpresada en muchos cánceres epiteliales).

Tabla 2: lista de radiofármacos SPECT utilizados para el cáncer de mama. Modificado de *Sergieva. et al*³⁶⁹.

Bases	Radiofármacos	Usos	Referencias
moleculares			
HER2	[^{99m} Tc]Tc-NM-O2, [^{99m} Tc]/[¹⁸⁸ Re]/[¹¹¹ In]- Trastuzumab,[¹¹¹ In]In-	Uso en cáncer HER2+	370–373

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 214

	Affibody, [^{99m} Tc]Tc-HYNIC- H10F		
Anti- angiogénesis	$[^{99m}$ Tc]Tc-RWY (anti integrina α6), $[^{99m}$ Tc]Tc-RP- RGD2 (anti integrina ανβ3-)	Uso en preclínica a la fecha, uso en detección de metástasis óseas.	374,375
EGFR	[¹²³ I]I-EGF, [¹¹¹ In]In-DTPA- hEGF	Desarrollo en preclínica y uso clínico en distintos tipos tumorales	368
Presencia de lesiones celulares.	[^{99m} Tc]Tc- methoxyisobutylisonitrile (MIBI), [^{99m} Tc]Tc- tetrofosmin (TF)	Puede llegar a diferenciar tumores primarios y metástasis,	376,377
Metabolismo óseo	[^{99m} Tc]Tc- diphosphonate [^{99m} Tc]Tc-HDP (MDP),	Uso en metástasis óseas	369
Ganglio Centinela	[^{99m} Tc]Tc-sulfuro micro- coloides	Detección de ganglio centinela para cirugía	378
Receptor somatostatin a	[¹¹¹ In]In-pentetreotide, [¹¹¹ In]In- Ocrteoscan/[^{99m} Tc]Tc- Tektrotyd	Unión especifica al receptor de somatostatina.	369,379–382

Tabla 3: Radiofáramcos PET para el diagnóstico del CaP. Modificado de Li. et al y Das et al ^{383,384}.

Bases moleculares	Radiofármacos	Usos	Referencias
Síntesis de membrana	[¹¹ C]-Colina [¹⁸ F]-Colina	Metástasis, pronostico, respuesta a tratamiento, seguimiento de nodos.	383
Metabolismo de la glucosa	[¹⁸ F]-FDG	Nodos y metástasis, pronostico, tratamiento y respuesta en cáncer de próstata resistente a la castración	384
Inhibidores PSA	[¹⁸ F] y [⁶⁸ Ga]- PSMA, [¹⁸ F]- DCFPyL, [¹⁸ F]- DCFBC	Diagnóstico, metástasis, nodos. Uso teragnóstico del par ⁶⁸ Ga- ¹⁷⁷ Lu	383
Metabolismo óseo	[¹⁸ F]-NaF	Uso en metástasis óseas en CaP primario y recaídas	383

Receptor andrógenos	[¹⁸ F]-FDHT	Pronostico, respuesta al tratamiento del CaP resistente a la castración y metastásico.	384
Análogo L- Leucina, uptake aumentado por transportadores ASCT y LAT1	[¹⁸ F]-FACBC	Bueno para ver metástasis. Uptake especifico por tejido prostático benigno inflamado	383
Proliferación tumoral	[¹¹ C]-Metionina	La metionina se acumula en células tumorales debido al aumento en el trasporte y la síntesis proteica Mejor al detector metástasis óseas que 18F-FDG	385
Procesos de hipoxia	[¹⁸ F]-FMISO	Un tercio de los pacientes en el estudio fueron positivos al radiotrazador	386
Metabolismo de citrato	[¹¹ C] y [¹⁸ F]- Derivados de acetatos	No es secretado por la vía urinaria, buen contraste tumor/background.	385

 Tabla 4: Radiofármacos de SPECT para el diagnóstico de CaP.

Bases moleculares	Radiofármacos	Usos	Referencias
Centellograma óseo	[^{99m} Tc]Tc-MDP, etc.	Uso estudio de metástasis óseas, 70% urólogos ordenan escanear huesos al tener un alto nivel de PSA luego de la terapia. Examina el cuerpo entero.	385
Inhibidores PSA	[¹¹¹ In]In- Caproab pentide , [^{99m} Tc]Tc-PSMA	Sensibilidad 60%, especificidad de 70%, valor predictivo positivo de 60% y valor predictivo negativo de 70%. 99Tc-PSMA con mejor sensibilidad y especificidad que 99mTc-MDP,	385,387
Bibliografía

- 1. de León, J. & Pareja, A. Inmunología del cáncer II: bases moleculares y celulares de la carcinogénesis. *Horizonte Médico (Lima)* **19**, 84–92 (2019).
- 2. Hanselmann, R. G. & Welter, C. Origin of Cancer: Cell work is the Key to Understanding Cancer Initiation and Progression. *Front Cell Dev Biol* **10**, 787995 (2022).
- 3. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* **12**, 31–46 (2022).
- 4. Mattiuzzi, C. & Lippi, G. Current cancer epidemiology. *J Epidemiol Glob Health* **9**, 217–222 (2019).
- 5. RESUMENES ESTADISTICOS para los cánceres más frecuentes. https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/RESUMENES-ESTADISTICOS-para-los-canceres-mas-frecuentes--uc264.
- 6. Weigelt, B. & Reis-Filho, J. S. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nature Reviews Clinical Oncology 2009* 6:12 6, 718–730 (2009).
- 7. Vajpeyi, R. WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. *J Clin Pathol* **58**, 671 (2005).
- 8. Weiss, R. B. *et al.* Natural history of more than 20 years of node-positive primary breast carcinoma treated with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil-based adjuvant chemotherapy: a study by the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol* **21**, 1825–1835 (2003).
- 9. Harbeck, N. & Gnant, M. Breast cancer. *The Lancet* **389**, 1134–1150 (2017).
- 10. Harbeck, N. et al. Breast cancer. Nat Rev Dis Primers 5, (2019).
- Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394–424 (2018).
- 12. Bray, F. *et al.* Cancer Incidence in Five Continents: Inclusion criteria, highlights from Volume X and the global status of cancer registration. *Int J Cancer* **137**, 2060–2071 (2015).
- 13. Ren, J. X., Gong, Y., Ling, H., Hu, X. & Shao, Z. M. Racial/ethnic differences in the outcomes of patients with metastatic breast cancer: contributions of

demographic, socioeconomic, tumor and metastatic characteristics. *Breast Cancer Res Treat* **173**, 225–237 (2019).

- 14. Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M. & Jemal, A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **25**, 16–27 (2016).
- 15. Bhoo Pathy, N. *et al.* Breast cancer in a multi-ethnic Asian setting: Results from the Singapore-Malaysia hospital-based breast cancer registry. *Breast* **20**, (2011).
- 16. Leong, S. P. L. *et al.* Is breast cancer the same disease in Asian and Western countries? *World J Surg* **34**, 2308–2324 (2010).
- 17. Wong, F. Y., Tham, W. Y., Nei, W. L., Lim, C. & Miao, H. Age exerts a continuous effect in the outcomes of Asian breast cancer patients treated with breast-conserving therapy. *Cancer Commun (Lond)* **38**, (2018).
- 18. Shiovitz, S. & Korde, L. A. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Annals of Oncology* **26**, 1291 (2015).
- 19. Beral, V. *et al.* Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* **358**, 1389–1399 (2001).
- Brewer, H. R., Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Ashworth, A. & Swerdlow, A. J. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat* 165, 193–200 (2017).
- 21. Huen, M. S. Y., Sy, S. M. H. & Chen, J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 2009 11:2* **11**, 138–148 (2009).
- 22. Kuchenbaecker, K. B. *et al.* Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA* **317**, 2402–2416 (2017).
- 23. Fox, S., Speirs, V. & Shaaban, A. M. Male breast cancer: an update. *Virchows Arch* **480**, 85–93 (2022).
- 24. Perou, C. M. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. Oncologist 15 Suppl 5, 39–48 (2010).
- 25. Horvath, E. & Horvath, E. Subtipos moleculares del cáncer mamario lo que el radiólogo dedicado a imágenes mamarias debe saber. *Revista chilena de radiología* **27**, 17–26 (2021).

- 26. Bombonati, A. & Sgroi, D. C. The molecular pathology of breast cancer progression. *J Pathol* **223**, 308–318 (2011).
- Lopez-Garcia, M. A., Geyer, F. C., Lacroix-Triki, M., Marchió, C. & Reis-Filho, J. S. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology* 57, 171–192 (2010).
- 28. Ellis, M. J. *et al.* Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature* **486**, 353–360 (2012).
- 29. Nik-Zainal, S. *et al.* Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature 2016 534:7605* **534**, 47–54 (2016).
- Yates, L. R. & Desmedt, C. Translational Genomics: Practical Applications of the Genomic Revolution in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 23, 2630–2639 (2017).
- 31. Santen, R. J. Clinical review: Effect of endocrine therapies on bone in breast cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, 308–319 (2011).
- 32. Levin, E. R. & Pietras, R. J. Estrogen receptors outside the nucleus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **108**, 351–361 (2008).
- 33. Williams, C. & Lin, C. Y. Oestrogen receptors in breast cancer: basic mechanisms and clinical implications. *Ecancermedicalscience* **7**, (2013).
- 34. Marmot, M. *et al.* The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review. *Lancet* **380**, 1778–1786 (2012).
- 35. Houssami, N. Overdiagnosis of breast cancer in population screening: does it make breast screening worthless? *Cancer Biol Med* **14**, 1 (2017).
- 36. Lauby-Secretan, B. *et al.* Breast Cancer Screening. *New England Journal of Medicine* **372**, 2353–2358 (2015).
- 37. Mayor, S. Benefits of mammography in women aged 50-69 outweigh risks, says expert panel. *BMJ* **350**, h3055 (2015).
- 38. Krager, S. C. & Prochazka, A. V. Review: In women 50 to 69 y of age at average risk, mammography screening reduces breast cancer mortality. *Ann Intern Med* **164**, JC38–JC39 (2016).
- Nelson, H. D. *et al.* Effectiveness of Breast Cancer Screening: Systematic Review and Meta-analysis to Update the 2009 U.S. Preventive Services Task Force Recommendation. *Ann Intern Med* 164, 244–255 (2016).

- 40. Buist, D. S. M., Porter, P. L., Lehman, C., Taplin, S. H. & White, E. Factors contributing to mammography failure in women aged 40-49 years. *J Natl Cancer Inst* **96**, 1432–1440 (2004).
- 41. Sardanelli, F. *et al.* Magnetic resonance imaging of the breast: recommendations from the EUSOMA working group. *Eur J Cancer* **46**, 1296–1316 (2010).
- 42. Phi, X. A. *et al.* Magnetic resonance imaging improves breast screening sensitivity in BRCA mutation carriers age ≥ 50 years: evidence from an individual patient data meta-analysis. *J Clin Oncol* **33**, 349–356 (2015).
- 43. Saslow, D. *et al.* American Cancer Society guidelines for breast screening with MRI as an adjunct to mammography. *CA Cancer J Clin* **57**, 75–89 (2007).
- 44. Irwig, L., Macaskill, P. & Houssami, N. Evidence relevant to the investigation of breast symptoms: The triple test. *Breast* **11**, 215–220 (2002).
- 45. Barba, D. *et al.* Breast cancer, screening and diagnostic tools: All you need to know. *Crit Rev Oncol Hematol* **157**, 103174 (2021).
- Marinovich, M. L., Hunter, K. E., Macaskill, P. & Houssami, N. Breast Cancer Screening Using Tomosynthesis or Mammography: A Meta-analysis of Cancer Detection and Recall. *J Natl Cancer Inst* 110, 942–949 (2018).
- 47. Avril, N. *et al.* Breast imaging with positron emission tomography and fluorine-18 fluorodeoxyglucose: use and limitations. *J Clin Oncol* 18, 3495–3502 (2000).
- 48. Simanek, M. & Koranda, P. SPECT/CT imaging in breast cancer current status and challenges. *http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2016.036.html* **160**, 474–483 (2016).
- 49. Bhushan, A., Gonsalves, A. & Menon, J. U. Current State of Breast Cancer Diagnosis, Treatment, and Theranostics. *Pharmaceutics 2021, Vol. 13, Page 723* **13**, 723 (2021).
- 50. Morrow, M., Harris, J. R. & Schnitt, S. J. Surgical margins in lumpectomy for breast cancer--bigger is not better. *N Engl J Med* **367**, 79–82 (2012).
- Yazar, S. K., Altinel, D., Serin, M., Aksoy, Ş. & Yazar, M. Oncoplastic Breast Conserving Surgery: Aesthetic Satisfaction and Oncological Outcomes. *Eur J Breast Health* 14, 35 (2018).
- Buchholz, T. A., Mittendorf, E. A. & Hunt, K. K. Surgical Considerations After Neoadjuvant Chemotherapy: Breast Conservation Therapy. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2015, 11–14 (2015).

- 53. Margenthaler, J. A. & Ollila, D. W. Breast Conservation Therapy Versus Mastectomy: Shared Decision-Making Strategies and Overcoming Decisional Conflicts in Your Patients. *Ann Surg Oncol* **23**, 3133–3137 (2016).
- 54. McLaughlin, S. A. Surgical management of the breast: breast conservation therapy and mastectomy. *Surg Clin North Am* **93**, 411–428 (2013).
- 55. Krag, D. N. *et al.* Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* **11**, 927–933 (2010).
- 56. Dengel, L. T. *et al.* Axillary dissection can be avoided in the majority of clinically node-negative patients undergoing breast-conserving therapy. *Ann Surg Oncol* **21**, 22–27 (2014).
- 57. Whelan, T. J. *et al.* Long-term results of hypofractionated radiation therapy for breast cancer. *N Engl J Med* **362**, 513–520 (2010).
- 58. Barry, M., Ho, A. & Morrow, M. The evolving role of partial breast irradiation in early-stage breast cancer. *Ann Surg Oncol* **20**, 2534–2540 (2013).
- 59. Donker, M. *et al.* Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer (EORTC 10981-22023 AMAROS): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol* **15**, 1303–1310 (2014).
- 60. Haviland, J. S. *et al.* The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) trials of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: 10-year follow-up results of two randomised controlled trials. *Lancet Oncol* **14**, 1086–1094 (2013).
- 61. Marta, G. N. *et al.* Accelerated partial irradiation for breast cancer: systematic review and meta-analysis of 8653 women in eight randomized trials. *Radiother Oncol* **114**, 42–49 (2015).
- 62. Maluta, S., Dall'Oglio, S., Goer, D. A. & Marciai, N. Intraoperative Electron Radiotherapy (IOERT) as an Alternative to Standard Whole Breast Irradiation: Only for Low-Risk Subgroups? *Breast Care (Basel)* **9**, 102–106 (2014).
- 63. Sedlmayer, F. *et al.* Boost IORT in Breast Cancer: Body of Evidence. *Int J Breast Cancer* **2014**, (2014).
- 64. Chia, S. K. & Wolff, A. C. With maturity comes confidence: EBCTCG tamoxifen update. *The Lancet* **378**, 747–749 (2011).

- 65. Abe, O. *et al.* Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* **378**, 771–784 (2011).
- 66. Francis, P. A. *et al.* Adjuvant ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* **372**, 436–446 (2015).
- 67. Pagani, O. *et al.* Adjuvant exemestane with ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* **371**, 107–118 (2014).
- 68. Gnant, M. *et al.* Zoledronic acid combined with adjuvant endocrine therapy of tamoxifen versus anastrozol plus ovarian function suppression in premenopausal early breast cancer: final analysis of the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group Trial 12. *Ann Oncol* **26**, 313–320 (2015).
- 69. Bradley, R. *et al.* Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet* **386**, 1341–1352 (2015).
- 70. Rastogi, P. *et al.* Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol* **26**, 778–785 (2008).
- 71. Albain, K. *et al.* Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet* **379**, 432–444 (2012).
- 72. Cortazar, P. *et al.* Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* **384**, 164–172 (2014).
- 73. Perez, E. A. *et al.* Sequential versus concurrent trastuzumab in adjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol* **29**, 4491–4497 (2011).
- 74. Perez, E. A. *et al.* Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J Clin Oncol* **32**, 3744–3752 (2014).
- 75. Jones, S. E. *et al.* Phase III trial comparing doxorubicin plus cyclophosphamide with docetaxel plus cyclophosphamide as adjuvant therapy for operable breast cancer. *J Clin Oncol* **24**, 5381–5387 (2006).
- 76. Slamon, D. *et al.* Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* **365**, 1273–1283 (2011).
- 77. Mavroudis, D. *et al.* Six versus 12 months of adjuvant trastuzumab in combination with dose-dense chemotherapy for women with HER2-positive

breast cancer: a multicenter randomized study by the Hellenic Oncology Research Group (HORG). *Ann Oncol* **26**, 1333–1340 (2015).

- 78. Earl, H. M. *et al.* 6 versus 12 months of adjuvant trastuzumab for HER2positive early breast cancer (PERSEPHONE): 4-year disease-free survival results of a randomised phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet* **393**, 2599– 2612 (2019).
- 79. Goldhirsch, A. *et al.* 2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2positive breast cancer (HERA): an open-label, randomised controlled trial. *Lancet* **382**, 1021–1028 (2013).
- 80. Hadebe, B., Harry, L., Ebrahim, T., Pillay, V. & Vorster, M. The Role of PET/CT in Breast Cancer. *Diagnostics 2023, Vol. 13, Page 597* **13**, 597 (2023).
- 81. Estudios CUDIM 2010-2020. Memoria Anual 2020 (2020).
- 82. Uematsu, T. *et al.* Comparison of FDG PET and SPECT for detection of bone metastases in breast cancer. *American Journal of Roentgenology* **184**, 1266–1273 (2005).
- 83. Vaz, S. C. *et al.* The current role of nuclear medicine in breast cancer. *Br J Radiol* **96**, (2023).
- 84. Sekhoacha, M. *et al.* Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. *Molecules* **27**, (2022).
- 85. Hjelmborg, J. B. *et al.* The heritability of prostate cancer in the Nordic twin study of cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **23**, 2303–2310 (2014).
- 86. Cittadini, A., Isidori, A. M. & Salzano, A. Testosterone therapy and cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* **118**, 2039–2057 (2022).
- 87. Wen, S. *et al.* Stromal androgen receptor roles in the development of normal prostate, benign prostate hyperplasia, and prostate cancer. *Am J Pathol* **185**, 293–301 (2015).
- 88. Bluemn, E. G. & Nelson, P. S. The androgen/androgen receptor axis in prostate cancer. *Curr Opin Oncol* 24, 251–257 (2012).
- 89. Rawla, P. Epidemiology of Prostate Cancer. World J Oncol 10, 63–89 (2019).
- 90. Taitt, H. E. Global Trends and Prostate Cancer: A Review of Incidence, Detection, and Mortality as Influenced by Race, Ethnicity, and Geographic Location. *Am J Mens Health* **12**, 1807–1823 (2018).

- 91. Barbieri, C. E. *et al.* The mutational landscape of prostate cancer. *Eur Urol* **64**, 567–576 (2013).
- 92. Haas, G. P., Delongchamps, N., Brawley, O. W., Wang, C. Y. & de la Roza, G. The Worldwide Epidemiology of Prostate Cancer: Perspectives from Autopsy Studies. *Can J Urol* **15**, 3866 (2008).
- 93. Takayama, K. I. Splicing Factors Have an Essential Role in Prostate Cancer Progression and Androgen Receptor Signaling. *Biomolecules 2019, Vol. 9, Page 131* **9**, 131 (2019).
- 94. Termini, D., Den Hartogh, D. J., Jaglanian, A. & Tsiani, E. Curcumin against Prostate Cancer: Current Evidence. *Biomolecules* **10**, 1–40 (2020).
- 95. Shelley, M. D. & Mason, M. D. Radium-223 for men with hormone-refractory prostate cancer and bone metastases. *Lancet Oncol* **8**, 564–565 (2007).
- 96. Tu, S. M. *et al.* Bone-targeted therapy for advanced androgen-independent carcinoma of the prostate: a randomised phase II trial. *Lancet* **357**, 336–341 (2001).
- 97. Nilsson, S. *et al.* A randomized, dose-response, multicenter phase II study of radium-223 chloride for the palliation of painful bone metastases in patients with castration-resistant prostate cancer. *Eur J Cancer* **48**, 678–686 (2012).
- 98. Moran, A. *et al.* Risk of cancer other than breast or ovarian in individuals with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Fam Cancer* **11**, 235–242 (2012).
- 99. Chopra, S. *et al.* Comparing oxygen-sensitive MRI (BOLD R2*) with oxygen electrode measurements: a pilot study in men with prostate cancer. *Int J Radiat Biol* **85**, 805–813 (2009).
- 100. Adhyam, M. & Gupta, A. K. A Review on the Clinical Utility of PSA in Cancer Prostate. *Indian J Surg Oncol* **3**, 120–129 (2012).
- 101. Bardis, M. D. *et al.* Applications of Artificial Intelligence to Prostate Multiparametric MRI (mpMRI): Current and Emerging Trends. *Cancers* (*Basel*) **12**, (2020).
- 102. Turanli, B. *et al.* Drug Repositioning for Effective Prostate Cancer Treatment. *Front Physiol* **9**, (2018).
- Matshela, R. F., Maree, J. E. & Van Belkum, C. Prevention and detection of prostate cancer: a pilot intervention in a resource--poor South African community. *Cancer Nurs* 37, 189–197 (2014).
- Lamy, P. J. *et al.* Prognostic Biomarkers Used for Localised Prostate Cancer Management: A Systematic Review. *Eur Urol Focus* 4, 790–803 (2018).

- 105. Meyer, A. R. *et al.* Initial Experience Performing In-office Ultrasound-guided Transperineal Prostate Biopsy Under Local Anesthesia Using the PrecisionPoint Transperineal Access System. *Urology* **115**, 8–13 (2018).
- 106. Kasivisvanathan, V. *et al.* MRI-Targeted or Standard Biopsy for Prostate-Cancer Diagnosis. *N Engl J Med* **378**, (2018).
- 107. Boehm, B. E., York, M. E., Petrovics, G., Kohaar, I. & Chesnut, G. T. Biomarkers of Aggressive Prostate Cancer at Diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences 2023, Vol. 24, Page 2185* **24**, 2185 (2023).
- 108. Trewartha, D. & Carter, K. Advances in prostate cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 823–824 (2013).
- 109. Lima, Z. S. *et al.* Recent advances of therapeutic targets based on the molecular signature in breast cancer: genetic mutations and implications for current treatment paradigms. *J Hematol Oncol* **12**, (2019).
- 110. Dunn, M. W. & Kazer, M. W. Prostate cancer overview. *Semin Oncol Nurs* 27, 241–250 (2011).
- van den Bergh, R. C. N. *et al.* Outcomes of men with screen-detected prostate cancer eligible for active surveillance who were managed expectantly. *Eur Urol* 55, 1–8 (2009).
- 112. Costello, A. J. Considering the role of radical prostatectomy in 21st century prostate cancer care. *Nature Reviews Urology 2020 17:3* **17**, 177–188 (2020).
- 113. Luzzago, S. *et al.* Multiparametric MRI represents an added value but not a substitute of follow-up biopsies in patients on active surveillance for low-risk prostate cancer. *European Urology Supplements* **16**, e1395–e1396 (2017).
- 114. Mohan, R. & Schellhammer, P. F. Treatment Options for Localized Prostate Cancer. *Am Fam Physician* 84, 413–420 (2011).
- 115. Mellman, I., Coukos, G. & Dranoff, G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* **480**, 480–489 (2011).
- 116. Ahmed, S., Lindsey, B. & Davies, J. Salvage cryosurgery for locally recurrent prostate cancer following radiotherapy. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **8**, 31–35 (2005).
- 117. Marberger, M. *et al.* New Treatments for Localized Prostate Cancer. *Urology* **72**, (2008).
- 118. Mouraviev, V. & Polascik, T. J. Update on cryotherapy for prostate cancer in 2006. *Curr Opin Urol* **16**, 152–156 (2006).

- 119. Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R. & Yeoh, K. W. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci* **9**, 193–199 (2012).
- 120. Wallner, K., Henry, L., Wasserman, S. & Dattoli, M. Low risk of urinary incontinence following prostate brachytherapy in patients with a prior transurethral prostate resection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **37**, 565–569 (1997).
- 121. Potosky, A. L. *et al.* Health outcomes after prostatectomy or radiotherapy for prostate cancer: results from the Prostate Cancer Outcomes Study. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1582–1592 (2000).
- 122. Heidenreich, A. *et al.* EAU guidelines on prostate cancer. *Eur Urol* **53**, 68–80 (2008).
- 123. Seidenfeld, J. *et al.* Single-therapy androgen suppression in men with advanced prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* **132**, 566–577 (2000).
- 124. Crawford, E. D., Higano, C. S., Shore, N. D., Hussain, M. & Petrylak, D. P. Treating Patients with Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer: A Comprehensive Review of Available Therapies. *J Urol* **194**, 1537–1547 (2015).
- 125. Brogden, R. N. & Chrisp, P. Flutamide. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in advanced prostatic cancer. *Drugs Aging* **1**, 104–115 (1991).
- 126. Goldspiel, B. R. & Kohler, D. R. Flutamide: an antiandrogen for advanced prostate cancer. *DICP* 24, 616–623 (1990).
- 127. Iguchi, T. *et al.* Enzalutamide versus flutamide for castration-resistant prostate cancer after combined androgen blockade therapy with bicalutamide: the OCUU-CRPC study. *Int J Clin Oncol* **25**, 486–494 (2020).
- 128. Miyake, H., Hara, I. & Eto, H. Clinical outcome of maximum androgen blockade using flutamide as second-line hormonal therapy for hormone-refractory prostate cancer. *BJU Int* **96**, 791–795 (2005).
- 129. Sugimoto, M., Kakehi, Y., Horie, S., Hirao, Y. & Akaza, H. A randomized controlled trial evaluating the effect of low-dose chlormadinone in patients with low-risk prostate cancer: PROSAS study. *Jpn J Clin Oncol* **52**, 187–196 (2022).
- 130. Kubota, Y. *et al.* The prognosis of stage A patients treated with the antiandrogen chlormadinone acetate. *Int Urol Nephrol* **31**, 229–235 (1999).
- 131. Koike, H. *et al.* Chlormadinone acetate is effective for hot flush during androgen deprivation therapy. *Prostate Int* **1**, 113–116 (2013).

- 132. Molina, A. & Belldegrun, A. Novel therapeutic strategies for castration resistant prostate cancer: inhibition of persistent androgen production and androgen receptor mediated signaling. *J Urol* **185**, 787–794 (2011).
- 133. Obligacion, R., Murray, M. & Ramzan, I. Drug-metabolizing enzymes and transporters: expression in the human prostate and roles in prostate drug disposition. *J Androl* 27, 138–150 (2006).
- 134. Gardner, T. A., Elzey, B. D. & Hahn, N. M. Sipuleucel-T (Provenge) autologous vaccine approved for treatment of men with asymptomatic or minimally symptomatic castrate-resistant metastatic prostate cancer. *Hum Vaccin Immunother* **8**, 534–539 (2012).
- Cheever, M. A. & Higano, C. S. PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin Cancer Res* 17, 3520– 3526 (2011).
- 136. Jain, K. K. Personalised medicine for cancer: from drug development into clinical practice. *Expert Opin Pharmacother* **6**, 1463–1476 (2005).
- 137. Zhu, Y. *et al.* Inhibition of ABCB1 expression overcomes acquired docetaxel resistance in prostate cancer. *Mol Cancer Ther* **12**, 1829–1836 (2013).
- 138. Abidi, A. Cabazitaxel: A novel taxane for metastatic castration-resistant prostate cancer-current implications and future prospects. *J Pharmacol Pharmacother* **4**, 230–237 (2013).
- 139. Cookson, M. S. *et al.* Castration-resistant prostate cancer: AUA Guideline. *J* Urol **190**, 429–438 (2013).
- Gerritsen, W. R. & Sharma, P. Current and emerging treatment options for castration-resistant prostate cancer: a focus on immunotherapy. *J Clin Immunol* 32, 25–35 (2012).
- Nishiyama, T. Androgen deprivation therapy in combination with radiotherapy for high-risk clinically localized prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 129, 179–190 (2012).
- 142. Singh, P., Pal, S. K., Alex, A. & Agarwal, N. Development of PROSTVAC immunotherapy in prostate cancer. *Future Oncol* **11**, 2137–2148 (2015).
- 143. Farolfi, A. *et al.* Current and Emerging Clinical Applications of PSMA PET Diagnostic Imaging for Prostate Cancer. *J Nucl Med* **62**, 596–604 (2021).
- Shetty, D., Patel, D., Le, K., Bui, C. & Mansberg, R. Pitfalls in Gallium-68 PSMA PET/CT Interpretation-A Pictorial Review. *Tomography* 4, 182–193 (2018).

- 145. Schally, A. V. *et al.* Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* **43**, 393–399 (1971).
- 146. Baba, Y., Matsuo, H. & Schally, A. V. Structure of the porcine LH- and FSHreleasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses. *Biochem Biophys Res Commun* **44**, 459–463 (1971).
- 147. Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R. M., Arimura, A. & Schally, A. V. Structure of the porcine LH-and FSH-releasing Hormone.: I. The proposed amino acid sequence0110 0. *J Urol* 167, 1011–1014 (2002).
- 148. Conn, P. M. & Crowley, W. F. Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annu Rev Med* **45**, 391–405 (1994).
- 149. LH & FSH secretion inhibitors. https://www.d.umn.edu/~jfitzake/Lectures/DMED/Antineoplastics/Antihormo nes/LHFSHInhibitors.html.
- Kakar, S. S., Musgrove, L. C., Devor, D. C., Sellers, J. C. & Neill, J. D. Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 189, 289–295 (1992).
- 151. Engel, J. B. & Schally, A. V. Drug Insight: clinical use of agonists and antagonists of luteinizing-hormone-releasing hormone. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism 2007 3:2* **3**, 157–167 (2007).
- 152. Schultze-Mosgau, A. *et al.* New developments in the use of peptide gonadotropin-releasing hormone antagonists versus agonists. *Expert Opin Investig Drugs* **14**, 1085–1097 (2005).
- 153. Vickery, B. H. Comparison of the potential for therapeutic utilities with gonadotropin-releasing hormone agonists and antagonists. *Endocr Rev* **7**, 115–124 (1986).
- 154. Limonta, P. *et al.* GnRH Receptors in Cancer: From Cell Biology to Novel Targeted Therapeutic Strategies. *Endocr Rev* **33**, 784–811 (2012).
- 155. Kang, S. K., Choi, K. C., Yang, H. S. & Leung, P. C. K. Potential role of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH)-I and GnRH-II in the ovary and ovarian cancer. *Endocr Relat Cancer* **10**, 169–177 (2003).
- 156. Gründker, C., Günthert, A. R., Westphalen, S. & Emons, G. Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers. *Eur J Endocrinol* 146, 1–14 (2002).

- 157. Miller, W. R., Scott, W. N., Morris, R., Fraser, H. M. & Sharpe, R. M. Growth of human breast cancer cells inhibited by a luteinizing hormone-releasing hormone agonist. *Nature* **313**, 231–233 (1985).
- 158. Limonta, P., Moretti, R. M., Marelli, M. M. & Motta, M. The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: Role in the control of tumor growth and progression in humans. *Front Neuroendocrinol* **24**, 279–295 (2003).
- 159. Moretti, R. M., Montagnani Marelli, M., Van Groeninghen, J. C., Motta, M. & Limonta, P. Inhibitory activity of luteinizing hormone-releasing hormone on tumor growth and progression. *Endocr Relat Cancer* **10**, 161–167 (2003).
- 160. Gründker, C., Schlotawa, L., Viereck, V. & Emons, G. Protein kinase Cindependent stimulation of activator protein-1 and c-Jun N-terminal kinase activity in human endometrial cancer cells by the LHRH agonist triptorelin. *Eur J Endocrinol* 145, 651–658 (2001).
- 161. Imai, A., Horibe, S., Takagi, H., Fuseya, T. & Tamaya, T. Signal transduction of GnRH receptor in the reproductive tract tumor. *Endocr J* **43**, 249–260 (1996).
- 162. Gründker, C., Günthert, A. R., Millar, R. P. & Emons, G. Expression of gonadotropin-releasing hormone II (GnRH-II) receptor in human endometrial and ovarian cancer cells and effects of GnRH-II on tumor cell proliferation. J *Clin Endocrinol Metab* 87, 1427–1430 (2002).
- 163. Millar, R. P. & Pawson, A. J. Outside-In and Inside-Out Signaling: The New Concept that Selectivity of Ligand Binding at the Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Is Modulated by the Intracellular Environment. *Endocrinology* 145, 3590–3593 (2004).
- 164. Millar, R. P. *et al.* Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev* 25, 235–275 (2004).
- Millar, R. P., Pawson, A. J., Morgan, K., Rissman, E. F. & Lu, Z. L. Diversity of actions of GnRHs mediated by ligand-induced selective signaling. *Front Neuroendocrinol* 29, 17–35 (2008).
- 166. Castellón, E. *et al.* Effect of leuprolide and cetrorelix on cell growth, apoptosis, and GnRH receptor expression in primary cell cultures from human prostate carcinoma. *Cancer Invest* **24**, 261–268 (2006).
- Limonta, P. *et al.* Expression of luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the human prostatic cancer cell line LNCaP. *J Clin Endocrinol Metab* 76, 797–800 (1993).
- 168. Limonta, P., Dondi, D., Moretti, R. M., Maggi, R. & Motta, M. Antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone agonists on

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 229

the human prostatic cancer cell line LNCaP. *Journal of Clinical Endocrinology* and Metabolism **75**, 207–212 (1992).

- 169. Kéri, G., Balogh, A., Szöke, B., Teplán, I. & Csuka, O. Gonadotropin-Releasing Hormone Analogues Inhibit Cell Proliferation and Activate Signal Transduction Pathways in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cell Line. *Tumor Biology* 12, 61–67 (1991).
- Vincze, B. *et al.* Influence of luteinizing hormone-releasing hormone agonists on human mammary carcinoma cell lines and their xenografts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 38, 119–126 (1991).
- 171. Marelli, M. M., Moretti, R. M., Mai, S., Procacci, P. & Limonta, P. Gonadotropin-releasing hormone agonists reduce the migratory and the invasive behavior of androgen-independent prostate cancer cells by interfering with the activity of IGF-I. *Int J Oncol* **30**, 261–271 (2007).
- 172. Hierowski, M., Wettler, O., & A. S.-B. & 1984. Plasminogen activator and nuclear androgen receptor in rat prostate tumors after treatment with D-Trp-6-LH-RH. *europepmc.orgMT Hierowski, O Wettler, AV SchallyBiomedicine & Pharmacotherapy= Biomedecine & Pharmacotherapie, 1984-europepmc.org.*
- 173. Yates, C., Wells, A. & Turner, T. Luteinising hormone-releasing hormone analogue reverses the cell adhesion profile of EGFR overexpressing DU-145 human prostate carcinoma subline. *Br J Cancer* **92**, 366–375 (2005).
- 174. Gnanapragasam, V. J. *et al.* Evidence that prostate gonadotropin-releasing hormone receptors mediate an anti-tumourigenic response to analogue therapy in hormone refractory prostate cancer. *J Pathol* **206**, 205–213 (2005).
- 175. Dondi, D., Festuccia, C., Piccolella, M., Bologna, M. & Motta, M. GnRH agonists and antagonists decrease the metastatic progression of human prostate cancer cell lines by inhibiting the plasminogen activator system. *Oncol Rep* 15, 393–400 (2006).
- 176. Schubert, A., Hawighorst, T., Emons, G. & Gründker, C. Agonists and antagonists of GnRH-I and -II reduce metastasis formation by triple-negative human breast cancer cells in vivo. *Breast Cancer Res Treat* **130**, 783–790 (2011).
- Parborell, F., Irusta, G., Celín, A. R. & Tesone, M. Regulation of ovarian angiogenesis and apoptosis by GnRH-I analogs. *Mol Reprod Dev* 75, 623–631 (2008).
- 178. Moretti, R. M. *et al.* Dual targeting of tumor and endothelial cells by gonadotropin-releasing hormone agonists to reduce melanoma angiogenesis. *Endocrinology* **151**, 4643–4653 (2010).

Tesis de Doctorado en Química Universidad De la República, Facultad de Química 230

- 179. Lamharzi, N., Schally, A. V. & Koppán, M. Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) antagonist Cetrorelix inhibits growth of DU-145 human androgen-independent prostate carcinoma in nude mice and suppresses the levels and mRNA expression of IGF-II in tumors. *Regul Pept* **77**, 185–192 (1998).
- 180. Jungwirth, A., Galvan, G., Pinski, J., ... G. H.-T. & 1997, undefined. Luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix (SB-75) and bombesin antagonist RC-3940-II inhibit the growth of androgen-independent PC-3. Wiley Online LibraryA Jungwirth, G Galvan, J Pinski, G Halmos, K Szepeshazi, RZ Cai, K Groot, AV SchallyThe Prostate, 1997•Wiley Online Library.
- 181. Jungwirth, A. *et al.* Inhibition of growth of androgen-independent DU-145 prostate cancer in vivo by luteinising hormone-releasing hormone antagonist cetrorelix and bombesin antagonists RC-3940-II and RC-3950-II. *European Journal of Cancer Part A* **33**, 1141–1148 (1997).
- 182. Yano, T. *et al.* Inhibition of growth of MCF-7 MIII human breast carcinoma in nude mice by treatment with agonists or antagonists of LH-RH. *Breast Cancer Res Treat* **21**, 35–45 (1992).
- 183. Segal-Abramson, T., Kitroser, H., Levy, J., Schally, A. V. & Sharoni, Y. Direct effects of luteinizing hormone-releasing hormone agonists and antagonists on MCF-7 mammary cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2336 (1992).
- 184. Buchholz, S. *et al.* Triple-negative breast cancers express receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and respond to LHRH antagonist cetrorelix with growth inhibition. *Int J Oncol* **35**, (2009).
- 185. Festuccia, C. *et al.* Ozarelix, a fourth generation GnRH antagonist, induces apoptosis in hormone refractory androgen receptor negative prostate cancer cells modulating expression and activity of death receptors. *Prostate* **70**, 1340– 1349 (2010).
- 186. Kraus, S., Levy, G., Hanoch, T., Naor, Z. & Seger, R. Gonadotropin-releasing hormone induces apoptosis of prostate cancer cells: Role of c-Jun NH2-terminal kinase, protein kinase B, and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Cancer Res* **64**, 5736–5744 (2004).
- 187. Lawrentschuk, N., Fernandes, K., Bell, D., Barkin, J. & Fleshner, N. Efficacy of a second line luteinizing hormone-releasing hormone agonist after advanced prostate cancer biochemical recurrence. *J Urol* **185**, 848–854 (2011).

- 188. Zoghi, M., Nosrati, S. A., Rogni, F. & Rajabifar, S. Preparation of a radiolabeled GnRH-I analogue derivative with 111 In as a new anti-proliferative agent. *J Labelled Comp Radiopharm* **61**, 903–911 (2018).
- 189. Huang, S. *et al.* Synthesis and Evaluation of 18F-Labeled Peptide for Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Imaging. *Contrast Media Mol Imaging* **2019**, (2019).
- 190. Schottelius, M., Berger, S., Poethko, T., Schwaiger, M. & Wester, H. J. Development of novel 68Ga- and 18F-labeled GnRH-I analogues with high GnRHR-targeting efficiency. *Bioconjug Chem* **19**, 1256–1268 (2008).
- 191. Calderon, L. E. *et al.* Synthesis of Radiolabeled Technetium- and Rhenium-Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (99mTc/Re-Acdien-LHRH) Conjugates for Targeted Detection of Breast Cancer Cells Overexpressing the LHRH Receptor. ACS Omega 6, 1846–1856 (2021).
- 192. Farahani, A. M. *et al.* Evaluation of a New 99mTc-labeled GnRH Analogue as a Possible Imaging Agent for Prostate Cancer Detection. *Anticancer Agents Med Chem* 20, 1695–1703 (2020).
- 193. Hao, D., Sun, L., Hu, X. & Hao, X. 99mTc-LHRH in tumor receptor imaging. *Oncol Lett* 14, 569 (2017).
- Masteri Farahani, A. *et al.* 99m Tc-(EDDA/tricine)-HYNIC-GnRH analogue as a potential imaging probe for diagnosis of prostate cancer. *Chem Biol Drug Des* 96, 850–860 (2020).
- 195. Zoghi, M., Attar Nosrati, S., Rogni, F., Shirvani, G. & Johari Daha, F. Preclinical evaluation of new GnRH-I receptor radionuclide therapy with 177 Lu-peptide tracer. *J Labelled Comp Radiopharm* **62**, 310–320 (2019).
- 196. Zoghi, M. *et al.* Development of a (68)Ga-peptide tracer for PET GnRH1imaging. *Ann Nucl Med* **30**, 400–408 (2016).
- 197. Jalilian, A. R., Shanehsazzadeh, S., Akhlaghi, M., Kamali-Dehghan, M. & Moradkhani, S. Development of [111In]-DTPA-buserelin for GnRH receptor studies. *Radiochim Acta* **98**, 113–119 (2010).
- 198. Guo, H. *et al.* Synthesis and evaluation of novel gonadotropin-releasing hormone receptor-targeting peptides. *Bioconjug Chem* **22**, 1682–1689 (2011).
- 199. Okarvi, S. M. & Al-Jammaz, I. Synthesis, Radiolabeling, and Preclinical Evaluation of 68Ga/177Lu-Labeled Leuprolide Peptide Analog for the Detection of Breast Cancer. *Cancer Biother Radiopharm* **37**, 372–383 (2022).

- 200. Huang, S. *et al.* Automated radiosynthesis and preclinical evaluation of Al[18F]F-NOTA-P-GnRH for PET imaging of GnRH receptor-positive tumors. *Nucl Med Biol* **82–83**, 64–71 (2020).
- 201. Bazley, L. A. & Gullick, W. J. The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer* **12 Suppl 1**, (2005).
- 202. Lemmon, M. A. Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp Cell Res* **315**, 638 (2009).
- 203. Schneider, M. R. & Wolf, E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J Cell Physiol* **218**, 460–466 (2009).
- 204. Cook, N., Frese, K. K. & Moore, M. Assessing the role of the EGF receptor in the development and progression of pancreatic cancer. *Gastrointest Cancer* 23 (2014) doi:10.2147/GICTT.S58925.
- 205. Slamon, D. J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**, 182–191 (1987).
- 206. Naidu, R., Yadav, M., Nair, S. & Kutty, M. K. Expression of c-erbB3 protein in primary breast carcinomas. *Br J Cancer* **78**, 1385–1390 (1998).
- 207. Minner, S. *et al.* Low level HER2 overexpression is associated with rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **16**, 1553–1560 (2010).
- 208. Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 2001 2:2* **2**, 127–137 (2001).
- 209. Saraon, P., Drabovich, A. P., Jarvi, K. A. & Diamandis, E. P. Mechanisms of Androgen-Independent Prostate Cancer. *EJIFCC* **25**, 42 (2014).
- 210. Bacus, S. S. *et al.* AKT2 is frequently upregulated in HER-2/neu-positive breast cancers and may contribute to tumor aggressiveness by enhancing cell survival. *Oncogene* **21**, 3532–3540 (2002).
- 211. Hynes, N. E. & Lane, H. A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* **5**, 341–354 (2005).
- 212. Lee, Y. *et al.* Role of erbB3 receptors in cancer therapeutic resistance. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **46**, 190–198 (2014).
- 213. Vacchelli, E. *et al.* Trial Watch: Tumor-targeting monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology* **3**, (2014).
- 214. Sharma, P., Sharma, R. & Tyagi, T. Receptor tyrosine kinase inhibitors as potent weapons in war against cancers. *Curr Pharm Des* **15**, 758–776 (2009).

- 215. Fendly, B. *et al.* Characterization of murine monoclonal antibodies reactive to either the human epidermal growth factor receptor or HER2/neu gene product. *Cancer Res* (1990).
- 216. Harwerth, I. M., Wels, W., Schlegel, J., Müller, M. & Hynes, N. E. Monoclonal antibodies directed to the erbB-2 receptor inhibit in vivo tumour cell growth. *Br J Cancer* **68**, 1140–1145 (1993).
- 217. Pegram, M. D., Konecny, G. & Slamon, D. J. The molecular and cellular biology of HER2/neu gene amplification/overexpression and the clinical development of herceptin (trastuzumab) therapy for breast cancer. *Cancer Treat Res* **103**, 57–75 (2000).
- Vogel, C. L. *et al.* Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in firstline treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20, 719–726 (2002).
- 219. Tokunaga, E. *et al.* Trastuzumab and breast cancer: developments and current status. *Int J Clin Oncol* **11**, 199–208 (2006).
- 220. Cho, H. S. *et al.* Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature 2003 421:6924* **421**, 756–760 (2003).
- 221. Kute, T. *et al.* Development of Herceptin resistance in breast cancer cells. *Cytometry A* **57**, 86–93 (2004).
- 222. Le, X. F., Pruefer, F. & Bast, R. C. HER2-targeting antibodies modulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 via multiple signaling pathways. *Cell Cycle* **4**, 87–95 (2005).
- 223. Albanell, J., Codony, J., Rovira, A., Mellado, B. & Gascón, P. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. *Adv Exp Med Biol* **532**, 253–268 (2003).
- 224. Signoretti, S. *et al.* Her-2-neu expression and progression toward androgen independence in human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1918–1925 (2000).
- 225. Agus, D. B. *et al.* Response of Prostate Cancer to Anti-Her-2/neu Antibody in Androgen-dependent and-independent Human Xenograft Models 1. *Cancer Res* **59**, 4761–4764 (1999).
- 226. Craft, N., Shostak, Y., Carey, M. & Sawyers, C. L. A mechanism for hormoneindependent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nat Med* **5**, 280–285 (1999).

- Osman, I. *et al.* HER-2/neu (p185neu) Protein Expression in the Natural or Treated History of Prostate Cancer1. *Clinical Cancer Research* 7, 2643–2647 (2001).
- 228. Duru, N. *et al.* HER2-associated radioresistance of breast cancer stem cells isolated from HER2-negative breast cancer cells. *Clin Cancer Res* **18**, 6634–6647 (2012).
- Andersson, J., Rosestedt, M. & Orlova, A. Imaging of HER2 may improve the outcome of external irradiation therapy for prostate cancer patients. *Oncol Lett* 9, 950–954 (2015).
- 230. Mitran, B. *et al.* Trastuzumab cotreatment improves survival of mice with PC-3 prostate cancer xenografts treated with the GRPR antagonist 177 Lu-DOTAGA-PEG2 -RM26. *Int J Cancer* 145, 3347–3358 (2019).
- 231. Ziada, A. *et al.* The use of trastuzumab in the treatment of hormone refractory prostate cancer; phase II trial. *Prostate* **60**, 332–337 (2004).
- 232. Lara, P. N. *et al.* Trastuzumab plus docetaxel in HER-2/neu-positive prostate carcinoma: final results from the California Cancer Consortium Screening and Phase II Trial. *Cancer* **100**, 2125–2131 (2004).
- 233. SMALL, E. Docetaxel, estramustine, plus trastuzumab in patients with metastatic androgen-independent prostate cancer. *Semin Oncol* 28, 71–76 (2001).
- 234. Morris, M. J. *et al.* HER-2 profiling and targeting in prostate carcinoma: A phase II trial of trastuzumab alone and with paclitaxel. *Cancer* **94**, 980–986 (2002).
- 235. Malmberg, J., Tolmachev, V. & Orlova, A. Imaging agents for in vivo molecular profiling of disseminated prostate cancer: Cellular processing of [1111n]-labeled CHX-A"DTPA-trastuzumab and anti-HER2 ABY-025 Affibody in prostate cancer cell lines. *Exp Ther Med* 2, 523–528 (2011).
- 236. Tan, Z. *et al.* Significant systemic therapeutic effects of high-LET immunoradiation by 212Pb-trastuzumab against prostatic tumors of androgenindependent human prostate cancer in mice. *Int J Oncol* **40**, 1881–1888 (2012).
- 237. Wang, H. Y. *et al.* Inhibitory effects of Rhenium-188-labeled Herceptin on prostate cancer cell growth: a possible radioimmunotherapy to prostate carcinoma. *Int J Radiat Biol* **89**, 346–355 (2013).
- 238. Weissleder, R. & Mahmood, U. Molecular Imaging. *Radiology* **219**, 316–333 (2001).

- 239. Nichol, C. & Kim, E. E. Molecular Imaging and Gene Therapy*. *Journal of Nuclear Medicine* **42**, 1368–1374 (2001).
- 240. Mankoff, D. A. A Definition of Molecular Imaging. Journal of Nuclear Medicine 48, 18N–21N (2007).
- 241. Fass, L. Imaging and cancer: A review. Mol Oncol 2, 115–152 (2008).
- 242. Morato, Y. L., Marciello, M., Chamizo, L. L., Paredes, K. O. & Filice, M. Hybrid magnetic nanoparticles for multimodal molecular imaging of cancer. *Magnetic Nanoparticle-Based Hybrid Materials: Fundamentals and Applications* 343–386 (2021) doi:10.1016/B978-0-12-823688-8.00008-9.
- 243. Barsanti, C., Lenzarini, F. & Kusmic, C. Diagnostic and prognostic utility of non-invasive imaging in diabetes management. *World J Diabetes* **6**, 792 (2015).
- 244. Weber, J., Haberkorn, U. & Mier, W. Cancer stratification by molecular imaging. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 16 4918–4946 Preprint at https://doi.org/10.3390/ijms16034918 (2015).
- 245. Israel, O. *et al.* Two decades of SPECT/CT the coming of age of a technology: An updated review of literature evidence. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **46**, 1990–2012 (2019).
- 246. Bouziotis, P., Psimadas, D., Tsotakos, T., Stamopoulos, D. & Tsoukalas, C. Radiolabeled iron oxide nanoparticles as dual-modality SPECT/MRI and PET/MRI agents. *Curr Top Med Chem* **12**, 2694–2702 (2012).
- 247. Bhargava, P., He, G., Samarghandi, A. & Delpassand, E. S. Pictorial review of SPECT/CT imaging applications in clinical nuclear medicine. *Am J Nucl Med Mol Imaging* **2**, 221 (2012).
- 248. Morrison, A. R. & Sinusas, A. J. Advances in radionuclide molecular imaging in myocardial biology. *J Nucl Cardiol* **17**, 116–134 (2010).
- 249. Sinusas, A. J., Thomas, J. D. & Mills, G. The Future of Molecular Imaging. *JACC Cardiovasc Imaging* **4**, 799–806 (2011).
- 250. Dobrucki, L. W., de Muinck, E. D., Lindner, J. R. & Sinusas, A. J. Approaches to Multimodality Imaging of Angiogenesis. *J Nucl Med* **51**, 66S-79S (2010).
- 251. Ljungberg, M. & Pretorius, P. H. SPECT/CT: an update on technological developments and clinical applications. *Br J Radiol* **91**, (2018).
- 252. Omami, G., Tamimi, D. & Branstetter, B. F. Basic principles and applications of 18F-FDG-PET/CT in oral and maxillofacial imaging: A pictorial essay. *Imaging Sci Dent* 44, 325 (2014).

- 253. Ximena Aida Camacho Damata. Desarrollo y Evaluación de Nuevos Agentes de Imagen Moleculares Para Mieloma Múltiple y Linfoma No Hodgkin". (2018).
- 254. Wu, A. M. & Olafsen, T. Antibodies for molecular imaging of cancer. *Cancer* J 14, 191–197 (2008).
- 255. Liddell, J. M. Production Strategies for Antibody Fragment Therapeutics. *Biopharm Int* 2009 Supplement, (2009).
- 256. Olafsen, T. & Wu, A. M. Antibody vectors for imaging. *Semin Nucl Med* 40, 167–181 (2010).
- 257. Knowles, S. M. & Wu, A. M. Advances in immuno-positron emission tomography: antibodies for molecular imaging in oncology. *J Clin Oncol* **30**, 3884–3892 (2012).
- 258. Kaur, S. *et al.* Recent trends in antibody-based oncologic imaging. *Cancer Lett* **315**, 97–111 (2012).
- 259. Wu, A. M. Engineered antibodies for molecular imaging of cancer. *Methods* **65**, 139 (2014).
- 260. Sato, A. K., Viswanathan, M., Kent, R. B. & Wood, C. R. Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Curr Opin Biotechnol* **17**, 638–642 (2006).
- 261. Liu, S., Ziegler, M. C. & Edwards, D. S. Radio-LC-MS for the characterization of 99mTc-labeled bioconjugates. *Bioconjug Chem* **11**, 113–117 (2000).
- 262. Malviya, G. *et al.* Molecular imaging of rheumatoid arthritis by radiolabelled monoclonal antibodies: new imaging strategies to guide molecular therapies. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **37**, 386–398 (2010).
- 263. Zaccaro, L., Gatto, A., Pedone, C. & Saviano, M. Peptides for tumour therapy and diagnosis: current status and future directions. *Curr Med Chem* **16**, 780–795 (2009).
- 264. Schottelius, M. & Wester, H. J. Molecular imaging targeting peptide receptors. *Methods* **48**, 161–177 (2009).
- 265. Lee, S., Xie, J. & Chen, X. Peptides and Peptide Hormones for Molecular Imaging and Disease Diagnosis. *Chem Rev* **110**, 3087 (2010).
- 266. Kowalsky, R. J., Falen, S. & Kowalsky, R. Radiopharmaceuticals in nuclear pharmacy & nuclear medicine. 58212 (2003).

- Ferro-Flores, G., Arteaga de Murphy, C. & Melendez-Alafort, L. Third Generation Radiopharmaceuticals for Imaging and Targeted Therapy. *Curr Pharm Anal* 2, 339–352 (2006).
- 268. Kowalsky, R. J. & Weatherman, K. D. Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine, 4e. *Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine, 4e* (2020) doi:10.21019/9781582122830.
- 269. Reichert, D. E., Lewis, J. S. & Anderson, C. J. Metal complexes as diagnostic tools. *Coord Chem Rev* 184, 3–66 (1999).
- 270. Abram, U. & Alberto, R. Technetium and rhenium: coordination chemistry and nuclear medical applications. *J Braz Chem Soc* **17**, 1486–1500 (2006).
- 271. Saleh, T. B. Radiopharmacy: Basics. *Basic Sciences of Nuclear Medicine* 25–39 (2011) doi:10.1007/978-3-540-85962-8_2/COVER.
- 272. Mukiza, J. et al. A Review on Technetium and Rhenium Based Radiopharmaceuticals for Diagnostic Imaging and Therapeutic Nuclear Medicine. Rwanda Medical Journal / Revue Médicale Rwandaise RMJ vol. 75 https://www.researchgate.net/publication/327837451 (2018).
- 273. Fernández, S., Giglio, J., Laborda, I., Incerti, M. & Rey, A. Marcación de un derivado de glucosa con 99mTc mediante la formación de un complejo Tc(V)nitruro: estudios preliminares. *Rev. med. nucl. Alasbimn j* (2011).
- 274. Meszaros, L. K., Dose, A., Biagini, S. C. G. & Blower, P. J. Synthesis and evaluation of analogues of HYNIC as bifunctional chelators for technetium. *Dalton Transactions* **40**, 6260–6267 (2011).
- 275. Abrams, M. J. *et al.* Technetium-99m-Human Polyclonal IgG Radiolabeled via the Hydrazino Nicotinamide Derivative for Imaging Focal Sites of Infection in Rats. *Journal of Nuclear Medicine* **31**, (1990).
- 276. Marganiec-Gałązka, J., Nähle, O. J. & Kossert, K. Activity determination of 68Ge/68Ga by means of $4\pi\beta(\check{C})$ - γ coincidence counting. *Applied Radiation and Isotopes* **134**, 240–244 (2018).
- Velikyan, I. 68Ga-Based Radiopharmaceuticals: Production and Application Relationship. *Molecules 2015, Vol. 20, Pages 12913-12943* 20, 12913–12943 (2015).
- 278. Rösch, F. Past, present and future of 68Ge/68Ga generators. *Applied Radiation and Isotopes* **76**, 24–30 (2013).
- 279. Petrik, M. *et al.* Microbial challenge tests on nonradioactive TiO2-based 68Ge/68Ga generator columns. *Nucl Med Commun* **33**, 819–823 (2012).

- 280. Hacht, B. Gallium(III) Ion Hydrolysis under Physiological Conditions. *Bull Korean Chem Soc* **29**, 372–376 (2008).
- 281. Bauwens, M., Chekol, R., Vanbilloen, H., Bormans, G. & Verbruggen, A. Optimal buffer choice of the radiosynthesis of (68)Ga-Dotatoc for clinical application. *Nucl Med Commun* **31**, 753–758 (2010).
- 282. Lewis, J. S., Windhorst, A. D. & Zeglis, B. M. Radiopharmaceutical Chemistry.
- 283. Liu, S. & Edwards, S. D. Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. *Bioconjug Chem* **12**, 7–34 (2001).
- 284. Cutler, C. S. *et al.* Current and potential therapeutic uses of lanthanide radioisotopes. *Cancer Biother Radiopharm* **15**, 531–545 (2000).
- 285. Prantner, A. M., Sharma, V., Garbow, J. R. & Piwnica-Worms, D. Synthesis and Characterization of a Gd-DOTA-D-Permeation Peptide for Magnetic Resonance Relaxation Enhancement of Intracellular Targets.
- 286. Panwar, P. *et al.* Radiolabeling and biological evaluation of DOTA-Ph-Al derivative conjugated to anti-EGFR antibody ior egf/r3 for targeted tumor imaging and therapy. *Cancer Biol Ther* **4**, 854–860 (2005).
- 287. Ocak, M. *et al.* Full automation of (68)Ga labelling of DOTA-peptides including cation exchange prepurification. *Appl Radiat Isot* **68**, 297–302 (2010).
- 288. Garcia, M. F. *et al.* Microwave-assisted synthesis of HYNIC protected analogue for 99mTc labeled antibody. *Curr Radiopharm* **7**, 84–90 (2014).
- 289. Hnatowich, D. J., Virzi, F., Fogarasi, M., Rusckowski, M. & Winnard, P. Can a cysteine challenge assay predict the in vivo behavior of 99mTc-labeled antibodies? *Nucl Med Biol* **21**, 1035–1044 (1994).
- 290. Dai, X., Cheng, H., Bai, Z. & Li, J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J Cancer* **8**, 3131 (2017).
- 291. Schrörs, B. *et al.* Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model. *Front Oncol* **10**, 530424 (2020).
- 292. Pulaski, B. A. & Ostrand-Rosenberg, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Curr Protoc Immunol* **39**, 20.2.1-20.2.16 (2000).
- 293. Yang, S., Zhang, J. J. & Huang, X. Y. Mouse Models for Tumor Metastasis. *Methods Mol Biol* **928**, 221 (2012).
- 294. Saranyutanon, S. *et al.* Cellular and Molecular Progression of Prostate Cancer: Models for Basic and Preclinical Research. *Cancers (Basel)* **12**, 1–26 (2020).

- 295. Farahani, A. M. *et al.* Evaluation of a New 99m Tc-labeled GnRH Analogue as a Possible Imaging Agent for Prostate Cancer Detection. *Anticancer Agents Med Chem* **20**, 1695–1703 (2020).
- 296. Alfaya, L. *et al.* Hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH): potencial agente de oncología molecular. *Salud Militar* **37**, 10–26 (2018).
- 297. Markowska, A., Markowski, A. R. & Jarocka-Karpowicz, I. The Importance of 6-Aminohexanoic Acid as a Hydrophobic, Flexible Structural Element. *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
- 298. Pereira, M. P. *et al.* Radiosynthesis and validation of [18 F]fluoroestradiol in a Synthra plus research platform for use in routine clinical practice. *J Labelled Comp Radiopharm* **65**, 292–297 (2022).
- Zirbesegger, K. *et al.* Molecular Imaging of Monoamine Oxidase A Expression in Highly Aggressive Prostate Cancer: Synthesis and Preclinical Evaluation of Positron Emission Tomography Tracers. *ACS Pharmacol Transl Sci* 6, 1734– 1744 (2023).
- 300. Zoppolo, F., Porcal, W., Oliver, P., Savio, E. & Engler, H. Automated One-pot Radiosynthesis of [11C]S-adenosyl Methionine. *Curr Radiopharm* **10**, (2017).
- 301. Maria Fernanda Garcia *et al.* Evaluation of tricine and EDDA as co-ligands for 99mTc-labeled HYNICMSH analogs for melanoma imaging. *Anticancer Agents Med Chem* **15**, 122–130 (2015).
- 302. Calzada, V. *et al.* Labeling and Biological Evaluation of 99mTc-HYNIC-Trastuzumab as a Potential Radiopharmaceutical for In Vivo Evaluation of HER2 Expression in Breast Cancer. *World J Nucl Med* 12, 27 (2013).
- Austin, C. D. *et al.* Endocytosis and Sorting of ErbB2 and the Site of Action of Cancer Therapeutics Trastuzumab and Geldanamycin. *Mol Biol Cell* 15, 5268 (2004).
- 304. Cheng, J. *et al.* Molecular Mechanism of HER2 Rapid Internalization and Redirected Trafficking Induced by Anti-HER2 Biparatopic Antibody. *Antibodies* **9**, 1–21 (2020).
- 305. Balma, M. *et al.* Non-conventional and Investigational PET Radiotracers for Breast Cancer: A Systematic Review. *Front Med (Lausanne)* **9**, 881551 (2022).
- 306. Kalluri, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer 2016 16:9* **16**, 582–598 (2016).
- 307. Hamson, E. J., Keane, F. M., Tholen, S., Schilling, O. & Gorrell, M. D. Understanding fibroblast activation protein (FAP): substrates, activities,

expression and targeting for cancer therapy. *Proteomics Clin Appl* **8**, 454–463 (2014).

- 308. Gascard, P. & Tlsty, T. D. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev* **30**, 1002–1019 (2016).
- 309. Jansen, K. *et al.* Selective inhibitors of fibroblast activation protein (FAP) with a (4-quinolinoyl)-glycyl-2-cyanopyrrolidine scaffold. *ACS Med Chem Lett* **4**, 491–496 (2013).
- 310. Garin-Chesa, P., Old, L. J. & Rettig, W. J. Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7235–7239 (1990).
- 311. Lindner, T. *et al.* Development of Quinoline-Based Theranostic Ligands for the Targeting of Fibroblast Activation Protein. *J Nucl Med* **59**, 1415–1422 (2018).
- 312. Heesch, A. *et al.* Development of Radiotracers for Breast Cancer-The Tumor Microenvironment as an Emerging Target. *Cells* **9**, (2020).
- 313. Kömek, H. *et al.* 68Ga-FAPI-04 PET/CT, a new step in breast cancer imaging: a comparative pilot study with the 18F-FDG PET/CT. *Ann Nucl Med* **35**, 744–752 (2021).
- Elboga, U. *et al.* Superiority of 68Ga-FAPI PET/CT scan in detecting additional lesions compared to 18FDG PET/CT scan in breast cancer. *Ann Nucl Med* 35, 1321–1331 (2021).
- 315. Hu, K. *et al.* [18F]FAPI-42 PET imaging in cancer patients: optimal acquisition time, biodistribution, and comparison with [68Ga]Ga-FAPI-04. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **49**, 2833–2843 (2022).
- 316. Loktev, A. *et al.* A Tumor-Imaging Method Targeting Cancer-Associated Fibroblasts. *J Nucl Med* **59**, 1423–1429 (2018).
- Li, Z., Aboian, M. S., Zhu, X. & Marquez-Nostra, B. Clinical Evaluation of Nuclear Imaging Agents in Breast Cancer. *Cancers 2022, Vol. 14, Page 2103* 14, 2103 (2022).
- 318. Sathekge, M. *et al.* 68Ga-PSMA-HBED-CC PET imaging in breast carcinoma patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **44**, 689 (2017).
- 319. Sathekge, M. *et al.* ⁶⁸Ga-PSMA imaging of metastatic breast cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **42**, 1482–1483 (2015).
- 320. Vag, T. *et al.* PET imaging of chemokine receptor CXCR4 in patients with primary and recurrent breast carcinoma. *EJNMMI Res* **8**, (2018).

- 321. Lapidot, T., Dar, A. & Kollet, O. How do stem cells find their way home? *Blood* **106**, 1901–1910 (2005).
- 322. Weiss, I. D. & Jacobson, O. Molecular imaging of chemokine receptor CXCR4. *Theranostics* **3**, 76–84 (2013).
- 323. Goldhirsch, A. *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* **24**, 2206–2223 (2013).
- 324. Reis-Filho, J. S. & Pusztai, L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet* **378**, 1812–1823 (2011).
- 325. Van Kruchten, M. *et al.* PET imaging of estrogen receptors as a diagnostic tool for breast cancer patients presenting with a clinical dilemma. *J Nucl Med* **53**, 182–190 (2012).
- 326. Piccardo, A., Fiz, F., Treglia, G., Bottoni, G. & Trimboli, P. Head-to-Head Comparison between 18F-FES PET/CT and 18F-FDG PET/CT in Oestrogen Receptor-Positive Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med* **11**, (2022).
- 327. Kurland, B. F. *et al.* Estrogen Receptor Binding (18F-FES PET) and Glycolytic Activity (18F-FDG PET) Predict Progression-Free Survival on Endocrine Therapy in Patients with ER+ Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 23, 407–415 (2017).
- 328. Mammatas, L. H. *et al.* Visual and quantitative evaluation of [18F]FES and [18F]FDHT PET in patients with metastatic breast cancer: an interobserver variability study. *EJNMMI Res* **10**, (2020).
- 329. Dehdashti, F. *et al.* Association of PET-based estradiol-challenge test for breast cancer progesterone receptors with response to endocrine therapy. *Nat Commun* **12**, (2021).
- 330. Lebron, L., Greenspan, D. & Pandit-Taskar, N. PET Imaging of Breast Cancer: Role in Patient Management. *PET Clin* **10**, 159–195 (2015).
- 331. Mortimer, J. E. *et al.* Tumor Uptake of 64Cu-DOTA-Trastuzumab in Patients with Metastatic Breast Cancer. *J Nucl Med* **59**, 38–43 (2018).
- Laforest, R. *et al.* [89Zr]Trastuzumab: Evaluation of Radiation Dosimetry, Safety, and Optimal Imaging Parameters in Women with HER2-Positive Breast Cancer. *Mol Imaging Biol* 18, 952–959 (2016).

- 333. Venema, C. M. *et al.* Androgen and Estrogen Receptor Imaging in Metastatic Breast Cancer Patients as a Surrogate for Tissue Biopsies. *J Nucl Med* 58, 1906– 1912 (2017).
- Jacene, H. *et al.* Imaging Androgen Receptors in Breast Cancer with 18F-Fluoro-5α-Dihydrotestosterone PET: A Pilot Study. *J Nucl Med* 63, 22–28 (2022).
- 335. Overmoyer, B. *et al.* First stage of an on-going phase 2, open label, international, randomized, parallel design study investigating efficacy + safety of GTx-024 for advanced ER+/AR+ breast cancer (BC). *Annals of Oncology* 28, i7–i8 (2017).
- 336. Nguyen, A. *et al.* Diagnostic value of 68 Ga-DOTATATE PET-CT imaging for staging of ER+ /PR+ HER2- breast cancer patients with metastatic disease: Comparison with conventional imaging with bone scan, diagnostic CT and 18 F-FDG PET-CT in a prospective pilot trial. *J Med Imaging Radiat Oncol* 66, 731–737 (2022).
- 337. Lee, H. *et al.* A pan-cancer analysis of the clinical and genetic portraits of somatostatin receptor expressing tumor as a potential target of peptide receptor imaging and therapy. *EJNMMI Res* **10**, (2020).
- 338. Kazmierczak, P. M. *et al.* 68Ga-TRAP-(RGD)3 Hybrid Imaging for the In Vivo Monitoring of αvβ3-Integrin Expression as Biomarker of Anti-Angiogenic Therapy Effects in Experimental Breast Cancer. *PLoS One* **11**, (2016).
- 339. Wu, J. *et al.* 18F-Alfatide II PET/CT for Identification of Breast Cancer: A Preliminary Clinical Study. *J Nucl Med* **59**, 1809–1816 (2018).
- 340. Miladinova, D. Molecular Imaging in Breast Cancer. *Nucl Med Mol Imaging* **53**, 313–319 (2019).
- Stoykow, C. *et al.* Gastrin-releasing Peptide Receptor Imaging in Breast Cancer Using the Receptor Antagonist (68)Ga-RM2 And PET. *Theranostics* 6, 1641– 1650 (2016).
- 342. Chao, C., Ives, K., Hellmich, H. L., Townsend, C. M. & Hellmich, M. R. Gastrin-releasing peptide receptor in breast cancer mediates cellular migration and interleukin-8 expression. *J Surg Res* **156**, 26–31 (2009).
- 343. Wang, Q. & Zhang, J. Current status and progress in using radiolabelled PARP-1 inhibitors for imaging PARP-1 expression in tumours. *Eur J Med Chem* **242**, (2022).
- 344. Zimmer, A. S., Gillard, M., Lipkowitz, S. & Lee, J. M. Update on PARP Inhibitors in Breast Cancer. *Curr Treat Options Oncol* **19**, 21 (2018).

- 345. Asano, A. *et al.* Intracellular hypoxia measured by 18F-fluoromisonidazole positron emission tomography has prognostic impact in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res* **20**, (2018).
- 346. Contractor, K. B. *et al.* [11C]choline positron emission tomography in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clinical Cancer Research* **15**, 5503–5510 (2009).
- 347. Contractor, K. B. *et al.* Biological basis of [11C]choline-positron emission tomography in patients with breast cancer: Comparison with [18F]fluorothymidine positron emission tomography. *Nucl Med Commun* **32**, 997–1004 (2011).
- 348. Tehrani, O. S., Douglas, K. A., Lawhorn-Crews, J. M. & Shields, A. F. Tracking cellular stress with labeled FMAU reflects changes in mitochondrial TK2. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **35**, 1480–1488 (2008).
- 349. Sun, H. *et al.* Imaging DNA synthesis with [18F]FMAU and positron emission tomography in patients with cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **32**, 15–22 (2005).
- 350. McDonald, E. S. *et al.* Breast Cancer 18F-ISO-1 Uptake as a Marker of Proliferation Status. *J Nucl Med* **61**, 665–670 (2020).
- 351. Dehdashti, F. *et al.* Assessment of Cellular Proliferation in Tumors by PET Using 18F-ISO-1. *J Nucl Med* **54**, 350 (2013).
- 352. Al-Nabulsi, I. *et al.* Effect of ploidy, recruitment, environmental factors, and tamoxifen treatment on the expression of sigma-2 receptors in proliferating and quiescent tumour cells. *Br J Cancer* **81**, 925–933 (1999).
- 353. Romine, P. E. *et al.* 18F-fluorodeoxyglucose (FDG) PET or 18Ffluorothymidine (FLT) PET to assess early response to aromatase inhibitors (AI) in women with ER+ operable breast cancer in a window-of-opportunity study. *Breast Cancer Research* **23**, 1–11 (2021).
- 354. Ulaner, G. A. *et al.* Initial Results of a Prospective Clinical Trial of 18F-Fluciclovine PET/CT in Newly Diagnosed Invasive Ductal and Invasive Lobular Breast Cancers. *J Nucl Med* **57**, 1350–1356 (2016).
- 355. Tade, F. I. *et al.* Anti-3-18F-FACBC (18F-Fluciclovine) PET/CT of Breast Cancer: An Exploratory Study. *J Nucl Med* **57**, 1357–1363 (2016).
- 356. Ulaner, G. A. *et al.* Prospective Clinical Trial of 18F-Fluciclovine PET/CT for Determining the Response to Neoadjuvant Therapy in Invasive Ductal and Invasive Lobular Breast Cancers. *J Nucl Med* **58**, 1037–1042 (2017).

- 357. Baek, S. *et al.* Exploratory clinical trial of (4S)-4-(3-[18F]fluoropropyl)-Lglutamate for imaging xC- transporter using positron emission tomography in patients with non-small cell lung or breast cancer. *Clin Cancer Res* **18**, 5427– 5437 (2012).
- 358. Yang, H. *et al.* 18F-5-Fluoroaminosuberic Acid as a Potential Tracer to Gauge Oxidative Stress in Breast Cancer Models. *J Nucl Med* **58**, 367–373 (2017).
- 359. Kole, A. C. *et al.* Standardized Uptake Value and Quantification of Metabolism for Breast Cancer Imaging with FDG and L-[1-11C]Tyrosine PET. *Journal of Nuclear Medicine* **38**, 692–696 (1997).
- 360. Zhou, R. *et al.* [18F](2 S,4 R)4-Fluoroglutamine PET Detects Glutamine Pool Size Changes in Triple-Negative Breast Cancer in Response to Glutaminase Inhibition. *Cancer Res* **77**, 1476–1484 (2017).
- Bensch, F. *et al.* 89Zr-atezolizumab imaging as a non-invasive approach to assess clinical response to PD-L1 blockade in cancer. *Nat Med* 24, 1852–1858 (2018).
- Dadgar, H. *et al.* Comparison of 18 F-NaF Imaging, 99m Tc-MDP Scintigraphy, and 18 F-FDG for Detecting Bone Metastases. *World J Nucl Med* 21, 001–008 (2022).
- 363. Piccardo, A. *et al.* 18F-FDG PET/CT is a prognostic biomarker in patients affected by bone metastases from breast cancer in comparison with 18F-NaF PET/CT. *Nuklearmedizin* **54**, 163–172 (2015).
- 364. Roop, M. J. *et al.* Incremental Value of Cocktail 18F-FDG and 18F-NaF PET/CT Over 18F-FDG PET/CT Alone for Characterization of Skeletal Metastases in Breast Cancer. *Clin Nucl Med* **42**, 335–340 (2017).
- 365. Lin, F. I. *et al.* Prospective comparison of combined 18F-FDG and 18F-NaF PET/CT vs. 18F-FDG PET/CT imaging for detection of malignancy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **39**, 262–270 (2012).
- 366. Khawar, A. *et al.* Preliminary results of biodistribution and dosimetric analysis of [68Ga]Ga-DOTAZOL: a new zoledronate-based bisphosphonate for PET/CT diagnosis of bone diseases. *Ann Nucl Med* **33**, (2019).
- 367. Lawal, I. O. *et al.* A prospective intra-individual comparison of [68Ga]Ga-PSMA-11 PET/CT, [68Ga]Ga-NODAGAZOL PET/CT, and [99mTc]Tc-MDP bone scintigraphy for radionuclide imaging of prostate cancer skeletal metastases. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **48**, 134–142 (2021).
- 368. Cai, W., Niu, G. & Chen, X. Multimodality imaging of the HER-kinase axis in cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **35**, 186–208 (2008).

- 369. Sergieva, S., Mihaylova, I., Alexandrova, E., Dimcheva, M. & Mansi, L. SPECT-CT in Radiotherapy Planning, with Main Reference to Patients with Breast Cancer. *Curr Radiopharm* **8**, 9–18 (2015).
- Zhao, L. *et al.* Development of a 99mTc-Labeled Single-Domain Antibody for SPECT/CT Assessment of HER2 Expression in Breast Cancer. *Mol Pharm* 18, 3616–3622 (2021).
- 371. McGale, J. *et al.* PET/CT and SPECT/CT Imaging of HER2-Positive Breast Cancer. *J Clin Med* **12**, 12 (2023).
- 372. Wu, Y. *et al.* Imaging and monitoring HER2 expression in breast cancer during trastuzumab therapy with a peptide probe 99mTc-HYNIC-H10F. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **47**, 2613–2623 (2020).
- 373. Miladinova, D. Molecular imaging of HER2 receptor: Targeting HER2 for imaging and therapy in nuclear medicine. *Front Mol Biosci* **10**, 1144817 (2023).
- 374. Gao, S. *et al.* First-in-human pilot study of an integrin α6-targeted radiotracer for SPECT imaging of breast cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy 2020 5:1* **5**, 1–3 (2020).
- 375. Zhou, Y., Shao, G. & Liu, S. Monitoring Breast Tumor Lung Metastasis by U-SPECT-II/CT with an Integrin αvβ3-Targeted Radiotracer 99mTc-3P-RGD2. *Theranostics* 2, 577 (2012).
- 376. Schillaci, O., Danieli, R., Romano, P., Santoni, R. & Simonetti, G. Scintimammography for the detection of breast cancer. *Expert Rev Med Devices* 2, 191–196 (2005).
- 377. Spanu, A. *et al.* Planar scintimammography and SPECT in neoadjuvant chemo or hormonotherapy response evaluation in locally advanced primary breast cancer. *Int J Oncol* **32**, 1275–1283 (2008).
- 378. Benda, R. K. *et al.* Should decisions on internal mammary lymph node irradiation be based on current lymphoscintigraphy techniques for sentinel lymph node identification? *Cancer* **100**, 518–523 (2004).
- 379. Bajc, M., Ingvar, C. & Palmer, J. Dynamic Indium-111-Pentetreotide Scintigraphy in Breast Cancer. *Journal of Nuclear Medicine* **37**, (1996).
- Albérini, J. L. *et al.* Somatostasin receptor in breast cancer and axillary nodes: Study with scintigraphy, histopathology and receptor autoradiography. *Breast Cancer Res Treat* 61, 21–32 (2000).

- 381. Prevóst, G., Hosford, D. & Thomas, F. Receptors for Somatostatin and Somatostatin Analogues in Human Breast Tumors. Ann N YAcad Sci 733, 147– 154 (1994).
- 382. O'Byrne, K. J. & Carney, D. N. Radiolabelled somatostatin analogue scintigraphy in oncology. *Anticancer Drugs* **7**, 33–44 (1996).
- 383. Li, R. *et al.* The use of PET/CT in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **21**, 4–21 (2018).
- 384. Das, C. J., Razik, A. & Sharma, S. Positron emission tomography in prostate cancer: An update on state of the art. *Indian J Urol* **34**, 172 (2018).
- 385. Beheshti, M., Langsteger, W. & Fogelman, I. Prostate cancer: role of SPECT and PET in imaging bone metastases. *Semin Nucl Med* **39**, 396–407 (2009).
- 386. Supiot, S. *et al.* Evaluation of tumor hypoxia prior to radiotherapy in intermediate-risk prostate cancer using 18F-fluoromisonidazole PET/CT: a pilot study. *Oncotarget* **9**, 10005–10015 (2018).
- 387. Zhang, Y. *et al.* Head-to-head comparison of 99mTc-PSMA and 99mTc-MDP SPECT/CT in diagnosing prostate cancer bone metastasis: a prospective, comparative imaging trial. *Scientific Reports 2022 12:1* **12**, 1–11 (2022).