



Evaluación fisicoquímica y biológica *in vitro* de radiotrazadores derivados de defensinas vegetales para imagenología en infecciones ocultas y cáncer de mama.

Micaela Morais Conti

Informe

Proyecto Específico de Título

Carrera de Licenciatura en Química

Tutoras: Dra. Mariella Terán y Dra. Ma. Emilia Tejería

Noviembre 2025

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis tutoras Mariella y Emilia por la guía, la paciencia (más duradera que la vida media del ^{68}Ga) y por acompañarme en todo este proceso, incluso en los momentos en que nada salía como esperaba. Gracias por la confianza, los consejos y por todo lo que aprendí a su lado. También un agradecimiento especial a Jessica que desde que me acerqué al área ha sido mi profe y compañera de péptidos, con largas jornadas en fq y cudim. Gracias por la ayuda con el ^{18}F .

A mis compañeros y amigos de la fq, gracias por compartir este camino lleno de experimentos, meriendas, risas y crisis existenciales. Por estar ahí cuando el hplc no cooperaba, y por recordarme que, al final, todo decanta (más o menos).

A mis amigos no químicos, gracias por bancar mis ausencias, mis explicaciones eternas sobre cosas que no necesitaban saber, y por hacerme reír cuando más lo necesitaba. Aunque no sepan bien qué hago, siempre estuvieron para darme energía (no radiactiva, pero igual de necesaria).

Gracias a Romi (o no) por haberme enseñado los ensayos en células, preparar las placas y mantener con vida a las células. Por estar conmigo mientras corría para que no decaiga el ^{18}F y por pasar horas midiendo en el centelleo sólido. Creo que tuviste una buena bienvenida al área jajajaj

A mi familia, por el apoyo incondicional, por escucharme incluso cuando hablaba en idioma químico, y por entender, o al menos fingir entender, de qué iba todo esto. Gracias por ser mi base estable en medio de tanto movimiento.

A mi novio, Gustavo, por su paciencia isotópicamente pura, por los cafés y alfajores cuando salía tarde, los ánimos en los días grises y por creer en mí incluso cuando yo dudaba. Gracias por acompañarme en cada paso, y por recordarme que la vida es más que la facultad (aunque a veces no lo pareciera 😊).

También quiero agradecer a las instituciones y entidades que hicieron posible la realización de este trabajo: a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y el centro interdisciplinario CEIBOS por el apoyo financiero. Al CUDIM por facilitar recursos, infraestructura y por abrirme las puertas a realizar todos mis ensayos con el ^{18}F . Al Centro de Medicina Nuclear del Hospital de Clínicas, al Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Italiano y al Consultorio de Medicina Nuclear Ferrari/Ferrando/Paez por sus donaciones de reactivos esenciales para el desarrollo experimental (para los amigos, el tecnecio). Sin ese apoyo conjunto, esta tesis literalmente no habría tenido la misma actividad específica.

Finalmente, gracias a todos los que, de una forma u otra, estuvieron presentes en este proceso. Cada gesto, palabra o sonrisa ayudó a que este trabajo no solo llegara a término, sino que me dejara recuerdos hermosos en el camino.

índice

1. Introducción

2. Objetivos

3. Parte experimental

3.1. Materiales

3.2. Métodos

3.2.1. Síntesis de [^{18}F]AIF-NOTA-K-EcgDf1₍₁₀₎

3.2.2. Síntesis de [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-HYNIC-EcgDf1₍₁₀₎

3.2.3. Caracterización fisicoquímica de los complejos

3.2.3.1. Estabilidad en medio de reacción

3.2.3.2. Estabilidad en plasma

3.2.3.3. Lipofilicidad

3.2.3.4. Unión a proteínas plasmáticas

3.2.4. Evaluación biológica *in vitro* de los complejos

3.2.4.1. Ensayo de unión e internalización

3.2.4.2. Ensayo de competencia

4. Resultados y discusión

4.1. Síntesis de los complejos de ^{18}F y $^{99\text{m}}\text{Tc}$

4.1.1. Síntesis de [^{18}F]AIF-NOTA-K-EcgDf1₍₁₀₎

4.1.2. Síntesis de [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-HYNIC-EcgDf1₍₁₀₎

4.2. Caracterización fisicoquímica de los complejos

4.2.1. Estabilidad en medio de reacción

4.2.2. Estabilidad en plasma

4.2.3. Lipofilicidad

4.2.4. Unión a proteínas plasmáticas

4.3. Evaluación biológica *in vitro*

4.3.1. Ensayo de unión e internalización

4.3.1.1. Unión e internalización del complejo [^{18}F]AIF-NOTA-K-EcgDf1₍₁₀₎

4.3.1.2. Unión e internalización del complejo [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-HYNIC-EcgDf1₍₁₀₎

4.3.2. Ensayo de competencia

4.3.2.1. Ensayo de competencia del complejo [^{18}F]AIF-NOTA-K-EcgDf1₍₁₀₎

4.3.2.2. Ensayo de competencia del complejo [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-HYNIC-EcgDf1₍₁₀₎

5. Conclusiones y perspectivas futuras

6. Bibliografía

Aclaración sobre modificaciones al plan de trabajo

En la propuesta original de trabajo estaba previsto utilizar ^{68}Ga , pero debido a que algunos inconvenientes técnicos dificultaron su producción en el país y por tanto su acceso se debió realizar una modificación en el plan de trabajo originalmente presentado. Si bien se mantuvieron los mismos experimentos, se abordó otra estrategia de marcación utilizando el radionucleido $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ampliamente disponible en nuestro país.

1. Introducción

Las enfermedades no transmisibles (ENT) son la principal causa de muerte en el mundo. Estas están amenazando el avance hacia el cumplimiento de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, entre cuyas metas está reducir la probabilidad de morir de cualquiera de las cuatro principales ENT (enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y enfermedades respiratorias crónicas) en las personas entre 30 y 70 años. Dentro de estos 4 grupos principales de ENT el 30% corresponde a diferentes tipos de cáncer, que es un término amplio que se refiere a un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento anormal e incontrolado de células en el cuerpo. Estas células pueden invadir tejidos adyacentes y, en algunos casos, desplazarse a otras partes del organismo, un proceso conocido como metástasis, lo que convierte a esta entidad en una neoplasia o tumor maligno. El cáncer puede surgir prácticamente en cualquier órgano o tejido del cuerpo debido a la proliferación desregulada de células anormales, que exceden sus límites habituales e invaden estructuras cercanas o se disemina a otras regiones [1, 2, 3].

En Uruguay, según el informe estadístico de la Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer (CHLCC) (mayo 2025), los tipos más frecuentes son el de mama, próstata, colorrectal y pulmón. El cáncer de mama es el más frecuente en mujeres y en el período 2016-2020 en nuestro país se registraron anualmente en promedio 1996 casos nuevos y fue la causa de muerte de 704 mujeres, en promedio y por año en el mismo período [4].

Existen diferentes tipos de cáncer de mama donde la expresión de los receptores en el tumor define el pronóstico y el tratamiento a seguir. Los cánceres de mama con receptores hormonales positivos tienen receptores para estrógeno (RE) o progesterona (RP), lo que permite un tratamiento hormonal. Suelen crecer más lentamente y son más comunes después de la menopausia. En cambio, los cánceres hormonales negativos no tienen estos receptores, por lo tanto, no responden a la terapia hormonal y tienden a crecer más rápido. Son más frecuentes en mujeres antes de la menopausia.

Los resultados del análisis del tumor pueden indicar:

- RE+/-: presencia o ausencia de receptores de estrógeno. Si son positivos, el estrógeno puede estimular el crecimiento del cáncer.
- RP+/-: indica si hay receptores de progesterona. Si son positivos, esta hormona también puede influir en el crecimiento tumoral.

- HER2+/-: refiere a una proteína que afecta el crecimiento celular. Su presencia influye en el tipo de tratamiento.

Si el tumor es triple negativo (RE-, RP- y HER2-), no responde a terapias hormonales ni a tratamientos dirigidos al HER2, por lo que requiere un enfoque diferente, la quimioterapia convencional es la herramienta terapéutica en estos casos [5].

Por otra parte, las enfermedades transmisibles (como infecciones respiratorias, VIH/SIDA, tuberculosis y enfermedades prevenibles por vacunación) siguen representando una importante carga sanitaria, especialmente en poblaciones vulnerables.

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS) las enfermedades transmisibles, aunque en retroceso gracias a los programas de prevención y vacunación, continúan generando brotes y muertes prevenibles, especialmente cuando se trata de infecciones no diagnosticadas o de difícil detección. En este sentido, las infecciones ocultas, aquellas que cursan de manera asintomática o con síntomas inespecíficos, representan un riesgo significativo, ya que pueden cronificarse, transmitirse inadvertidamente o generar complicaciones graves si no son identificadas y tratadas a tiempo. [6]

El abordaje de las infecciones ocultas y del cáncer es prioritario en las estrategias sanitarias, ya que ambos grupos comparten la necesidad de mejorar los sistemas de detección precoz. La integración de herramientas de diagnóstico avanzadas resulta clave para reducir la carga de enfermedad y mejorar los resultados en salud.

Actualmente existen múltiples estrategias para desarrollar potenciales agentes de diagnóstico de estas patologías. Una de las opciones es la Medicina Nuclear, una especialidad médica que utiliza radiofármacos con fines de diagnóstico o terapia [7]. Un radiofármaco (RF) se define como una molécula que contiene un farmacóforo específico para una determinada patología que posee un átomo radiactivo en su estructura y mediante diferentes mecanismos se acumula selectivamente en el órgano o tejido de interés. En el caso de los procedimientos diagnósticos se administra el radiofármaco que contiene un radionucleido emisor γ (gamma) o emisor β^+ (emisor de positrones) cuya radiación altamente penetrante es detectada de forma externa mediante un equipo de obtención de imágenes. Los procedimientos diagnósticos con radiofármacos permiten detectar alteraciones metabólicas asociadas con diversas enfermedades [8,9,10] y pueden contribuir a un diagnóstico preciso, rápido y eficaz de diversas patologías oncológicas e infecciosas, entre otras.

El grupo de investigación del Área Radioquímica tiene experiencia en el desarrollo de radiotrazadores como agentes de diagnóstico para infecciones ocultas. En este sentido, se está trabajando actualmente con defensinas. Estas son péptidos antimicrobianos (AMPs) de pequeño tamaño (aproximadamente 50 aminoácidos) que forman parte del sistema inmune innato en organismos tan diversos como mamíferos, insectos y plantas. Se caracterizan por su estructura anfipática, catiónica y rica en enlaces disulfuro, lo que les permite insertarse en membranas celulares cargadas negativamente, causando su desestabilización y la muerte del

microorganismo. Los AMP se producen principalmente en células inmunes como los neutrófilos, donde se almacenan en gránulos, listas para desplegar su actividad en las etapas iniciales de un proceso patológico. Su actividad antimicrobiana incluye dos mecanismos principales, la disrupción de membranas: modelos barrel-stave, toroidal pore o carpet y una acción intracelular: tras atravesar la membrana, inhibiendo ácidos nucleicos, síntesis proteica o enzimas. [11]

Los AMPs han demostrado ser excelentes candidatos para imagenología molecular, por ejemplo, el UBI (29–41) radiomarcado se ha utilizado con éxito en la detección de infecciones ocultas [12].

En el marco de la tesis doctoral de la Q.F. Jessica Osorio se ha trabajado con un análogo corto del péptido antimicrobiano EcgDf1 (EcgDf1₍₁₀₎) proveniente de la flora autóctona uruguaya, como potencial agente de diagnóstico de infecciones ocultas. EcgDf1 fue extraído a partir de *Erythrina crista-galli* (ceibo) [13]. En este trabajo se utilizó un análogo corto de 10 AA (GHCRGFRRRC) que se marcó con el radiometal emisor de positrones ⁶⁸Ga que ha presentado resultados promisorios [14].

Esta experiencia y recientes estudios de aplicaciones de AMPs de carácter antitumoral, ha motivado al grupo en este trabajo de licenciatura para desarrollar los primeros ensayos biológicos para determinar la interacción de los péptidos radiomarcados con células tumorales.

El mecanismo de acción de las AMPs estaría muy vinculado con su carga neta positiva, en primera instancia se daría una atracción electroestática hacia membranas con componentes negativos tanto en las células bacterianas como en las células cancerosas.

En el contexto oncológico, los AMPs pueden ejercer efectos antitumorales mediante:

- Citotoxicidad directa sobre células cancerosas.
- Modulación del microambiente tumoral.
- Activación de la respuesta inmune contra el tumor [15].

Asimismo, existen varios reportes de AMPs con efectos citotóxicos en diversas líneas celulares de cáncer, un caso de esta índole es el AMP humano LL-37, que se encuentra en etapa de ensayo clínico en pacientes con melanoma [16, 17, 18].

En esta tesis de licenciatura se plantea la caracterización fisicoquímica y biológica del EcgDf1₍₁₀₎ para evaluar su comportamiento frente a células de cáncer de mama. Para ello el péptido se marcará con dos radionucleidos disponibles en nuestro país, por un lado, el ¹⁸F y por otro el ^{99m}Tc.

El ¹⁸F decae por emisión de positrones el 97% del tiempo y por captura electrónica el 3% del tiempo. Ambos modos de desintegración producen ¹⁸O estable. Tiene un tiempo de semidesintegración de 109 minutos, el cual es adecuado para producción y transporte. Se obtiene mediante ciclotrón por la reacción ¹⁸O (p, n) ¹⁸F. Es especialmente utilizado dado que genera imágenes para tomografía de emisión de positrones (PET) de alta resolución debido a su emisión

de positrones de baja energía. La PET detecta la aniquilación de positrones con electrones, que genera dos rayos gamma en direcciones opuestas (figura 1).

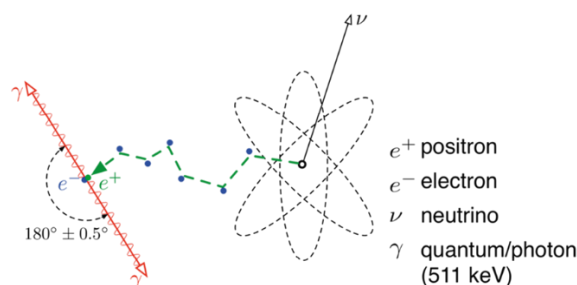


Figura 1 Aniquilación de positrones

El ^{99m}Tc tiene un periodo de semidesintegración de 6 horas, decae por emisión de radiación gamma de energía 140 keV. Se obtiene a partir de generadores de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, es un método fácil y asequible para la mayoría de radiofarmacias en el país y la región. En este caso, las imágenes que se obtienen con este radionucleido son de Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón Único (SPECT) en donde se detecta los rayos gamma emitidos directamente por un radiotrazador.

Para poder incorporar el radionucleido de interés, es necesario derivatizar el péptido EcgDf1₍₁₀₎ con un agente quelante bifuncional (BFCA) adecuado que permita la unión al radionucleido sin alterar la actividad biológica del AMP seleccionado como se muestra en la figura 2.

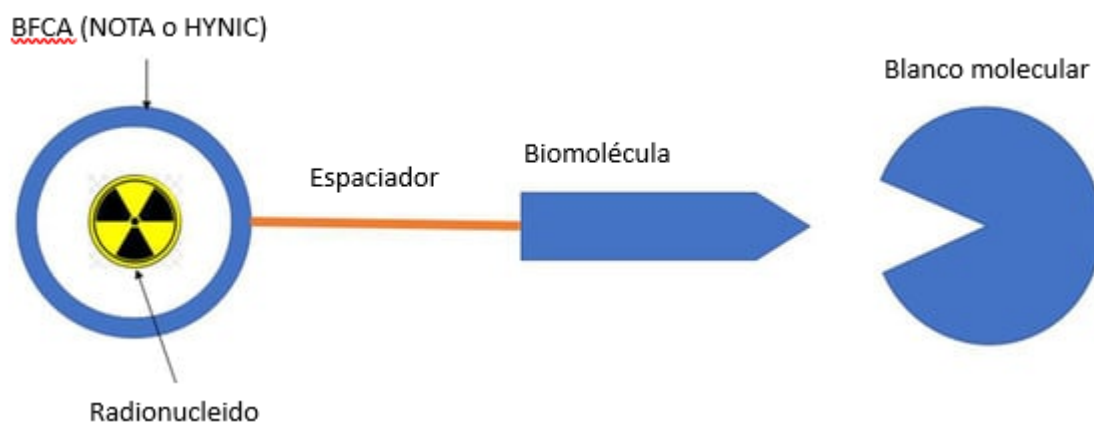


Figura 2 Estrategia de marcado BFCA

En el caso del ^{18}F el agente bifuncional seleccionado es el ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTA). El NOTA se une al péptido a través de un enlace amida formado por la reacción del grupo amino terminal del péptido con el grupo carboxilo del BFCA en una posición remota del sitio biológicamente activo, que en el caso del péptido seleccionado corresponde al extremo que contiene al grupo ácido (figura 3). De esta forma, al conservar los aminoácidos de los sitios activos y alejar el radionucleido se espera que las propiedades bioquímicas del péptido no se vean alteradas. El NOTA muestra una elevada selectividad hacia los iones metálicos como el ^{68}Ga

generando complejos muy estables, pero estudios recientes han permitido la marcación con ^{18}F de biomoléculas que contengan NOTA en su estructura gracias a la formación de un complejo $[\text{}^{18}\text{F}]\text{AlF}$, el que actúa como un pseudo metal que simulará la posición de coordinación originalmente diseñada para el ^{68}Ga [19,20,21]. Esta estrategia fue la utilizada por la Q.F. Jessica Osorio para la marcación del péptido antimicrobiano antes descrito en el marco de su tesis de doctorado. A partir de la experiencia adquirida en la optimización de la marcación con ^{18}F , durante la ejecución de esta tesis de licenciatura se realizaron estudios fisicoquímicos y biológicos *in vitro*.

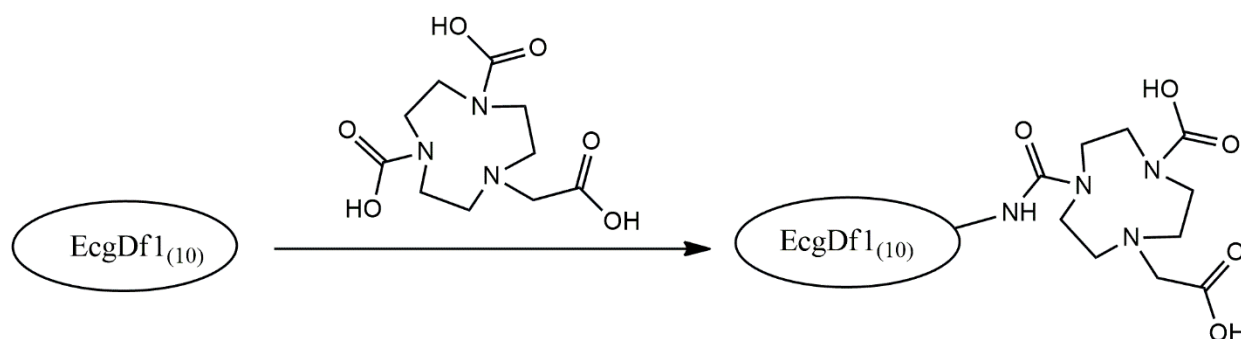


Figura 3 Derivatización del EcgDf1₍₁₀₎ con el BFCA NOTA

En el caso del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ el agente quelante bifuncional seleccionado es la 6-hidrazinonicotinamida (HYNIC). La biomolécula de interés, en este caso el EcgDf1₍₁₀₎, se derivatiza con HYNIC a través de un enlace amida formado por la reacción de las cadenas laterales de una amina de la biomolécula con un éster activo como succinimidil-HYNIC (S-HYNIC) (figura 4). La marcación con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se realiza en presencia de un agente reductor (habitualmente SnCl_2) y un coligando que complete la esfera de coordinación y estabilice el complejo como tricina, EDDA, glucoheptonato o TPPTS. Asumiendo una geometría octaédrica para el complejo el grupo hidrazina y el nitrógeno piridínico del HYNIC coordina en una única posición de coordinación quedando por completar 5 posiciones. En el caso de este trabajo la tricina ((tris(hidroximetil)metilglicina) es el coligando seleccionado resultando evidente que se requieren por lo menos 2 moléculas de tricina para completar la esfera de coordinación. Algunos estudios muestran que en este tipo de marcados se forman múltiples especies, alrededor de 10, las que se atribuyen a los múltiples isómeros posibles resultantes de las diferentes formas de unión de la tricina con el complejo Tc-HYNIC. Las distintas formas pueden interconvertirse entre sí, dependiendo de las condiciones de reacción mostrándose solo un ejemplo en la Figura 5 [22,23,24].

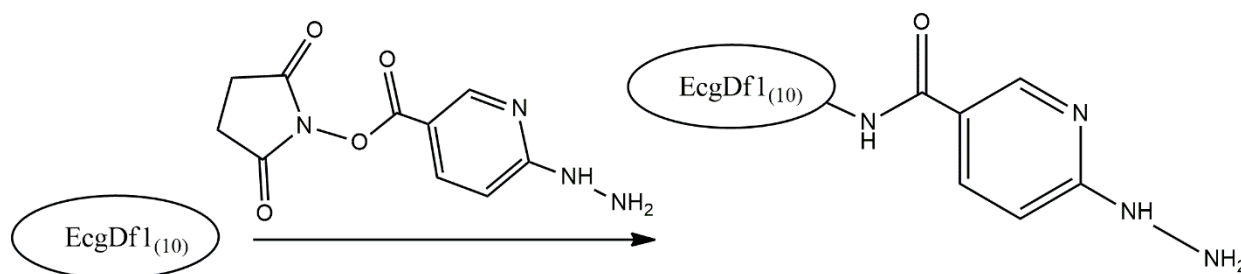


Figura 4 Derivatización del EcgDf1₍₁₀₎ con el BFCA HYNIC

El trabajo de licenciatura incluyó la optimización de la marcación con ^{99m}Tc , los estudios fisicoquímicos y los estudios biológicos *in vitro*.

Dadas las características de los agentes quelantes y su forma de unión a los radionucleidos seleccionados, se proponen las estructuras de los respectivos complejos de ^{18}F AlF-NOTA-K-EcgDf1₍₁₀₎ y de ^{99m}Tc Tc-HYNIC-EcgDf1₍₁₀₎ como potenciales agentes trazadores de unión a células de cáncer de mama (Figura 5). Para ello, se seleccionaron 2 líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 por ser las disponibles en nuestro medio.

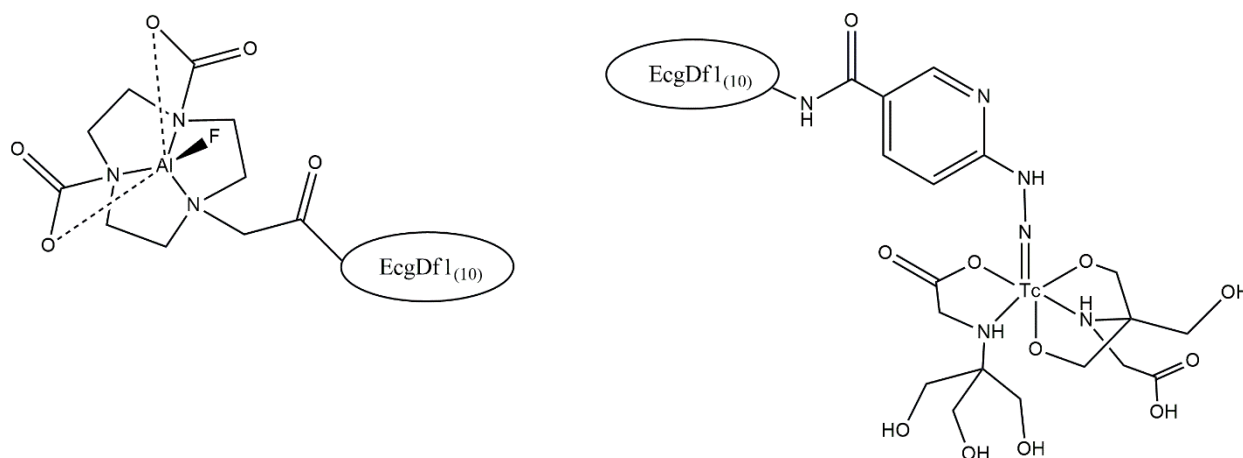


Figura 5 Estructuras propuestas de los complejos ^{18}F AlF-NOTA-K-EcgDf1₍₁₀₎ (Izquierda) y ^{99m}Tc Tc-HYNIC-EcgDf1₍₁₀₎ (Derecha)

La línea MCF-7 (ATCC® HTB-22 TM) fue aislada por primera vez en 1970 del tejido epitelial mamario de una mujer caucásica de 69 años. El nombre MCF deriva de Michigan Cancer Foundation, lugar en donde se desarrolló la línea celular y se agrega el número siete debido a que fue la séptima línea celular desarrollada por el investigador Herbert D. Soule. Esta línea celular expresa fuertemente los receptores de estrógeno (RE+).

La línea MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26 TM) fue aislada de una mujer caucásica de 51 años de un foco metastásico de derrame pleural. Es una línea celular parental de adenocarcinoma de mama y una línea celular de cáncer de mama triple negativo (RE-, RP- y HER2-) [25, 26, 27, 28].

En esta tesis se realizará una prueba de concepto a través de estudios biológicos *in vitro* para evaluar si los complejos propuestos interaccionan con células cancerígenas.

2. Objetivos

- Evaluar el perfil fisicoquímico del ^{18}F AlF-NOTA-K-EcgDf1₍₁₀₎.
- Optimizar la síntesis del ^{99m}Tc Tc-HYNIC-EcgDf1₍₁₀₎ y realizar su evaluación fisicoquímica.
- Realizar una evaluación biológica *in vitro*, que incluya unión, internalización y unión específica de los radiotrazadores ^{99m}Tc Tc-HYNIC-EcgDf1₍₁₀₎ y ^{18}F AlF-NOTA-K-EcgDf1₍₁₀₎ en células de cáncer de mama.

3. Parte experimental

3.1. Materiales

Los péptidos derivatizados fueron adquiridos comercialmente en CPC Scientific y NovoPro Labs.

El $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ empleado fue eluido de generadores $[^{99}\text{Mo}]\text{Mo}/[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ Tecnonuclear (Argentina). El ^{18}F fue producido en un Ciclotrón GENtrace o PETtrace perteneciente al Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM).

Para las determinaciones de actividad se empleó una cámara de ionización Capintec CRC-55t (Área Radioquímica) o ALFANUCLEAR ACT-15P (Propiedad de CUDIM). También se utilizó un detector de centelleo sólido conteniendo cristal de NaI(Tl) de 3x3 pulgadas, plano acoplado a tarjeta multicanal ORTEC.

El control mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) fue realizado utilizando el cromatógrafo Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 acoplado a un detector gamma Berthold HERM LB 500, para el complejo de ^{99m}Tc y el cromatógrafo Shimadzu, con horno CTO-10AS VP, detector de arreglo de diodos SPD-M20A y Bomba LC20AT, acoplado a un detector de centelleo sólido Bioscan de NaI (TI) de 1 × 1 pulgadas (propiedad de CUDIM), para el complejo de ^{18}F . Las columnas empleadas fueron C18 MachereyNage, 150×4 mm C18 NUCLEODUR 5µm, 300 Å y C18 150 x 3,9mm Waters Delta Pak, 5µm, 300 Å, respectivamente. Todos los disolventes utilizados para el análisis cromatográfico eran de grado HPLC.

Para los estudios *in vitro* se empleó una cabina de bioseguridad Thermo Scientific 1300 series A2, estufa incubadora de CO₂ Labotecgroup.com modelo BJPX-C270 de 270 L de capacidad. Centrifuga Bioevopeak. Además, se utilizó un contador de células automatizado digital Logos Biosystems LUNA-FL™.

3.2. Métodos

3.2.1. Síntesis de $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-K-EcgDf1}_{(10)}$

El $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ (50-150 mCi) se obtiene como solución acuosa, se purifica por intercambio iónico utilizando un cartucho de intercambio iónico Sep-Pak® QMA.

Se añaden 300 µL de solución F*, 350 µL de acetonitrilo, 3,5 µL de AlCl₃ 0,01M en buffer y 100 µL de solución de péptido en agua 1mg/mL en un eppendorf. Posteriormente se agrega el ^{18}F y se incuba 20 minutos a 100°C.

* Solución F: 12,5 µL de solución E + 1000 µL de acetonitrilo. Solución E: 26 mg de ácido ascórbico en 100 µL de agua destilada.

La purificación del complejo se lleva a cabo por extracción en fase sólida con columna Sep-Pak C18.

La PRQ es evaluada por HPLC, fase reversa utilizando una columna C18 MachereyNage, 150×4 mm C18 NUCLEODUR 5µm, 300 Å, a flujo 1 mL/min y ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% en agua (A) y TFA 0,1% en acetonitrilo (B) como fases móviles según el gradiente: 0 a 5 min, 98% A; 5–10 min, lineal hasta 50% B; 10–15 min 50% B; 15–20 gradiente lineal hasta 2% B.

3.2.2. Síntesis de [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-EcgDf1₍₁₀₎

Solución T: 6 mg de tricina en 10 mL de agua se purga con N₂ por 10 minutos. Disolver 6 mg de SnCl₂ en 250 µL de HCl 0,1N y rápidamente agregarlos a la solución de tricina. Ajustar pH con NaOH 1N hasta obtener pH = 4,5.

Se añaden 500 µL de solución T a 50 µL de solución de péptido 1 mg/mL y ^{99m}TcO₄ (1 – 2 mCi) y se deja incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

La PRQ es evaluada por HPLC, fase reversa utilizando una columna C18 150 x 3,9mm Waters Delta Pak, 5µm, 300 Å, a flujo 1 mL/min y ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% en agua (A) y TFA 0,1% en acetonitrilo (B) como fases móviles según el gradiente: 0 a 3 min, 2% B; 3 a 10 min, lineal hasta 35% B; 10 a 20 min, lineal hasta 50% B; 20 a 23 min, lineal hasta 70% B; 23 a 27 min, 2% B.

3.2.3. Caracterización fisicoquímica de los complejos

3.2.3.1. Estabilidad en medio de reacción

Se incuba el trazador a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo. Se extraen muestras a diferentes tiempos y se controla la pureza radioquímica por HPLC.

3.2.3.2. Estabilidad en plasma

Se incuba el trazador (200 µL) a 37°C en plasma humano (1000 µL) durante el tiempo deseado. Cuando se alcanza el mismo, se toman 200 µL del eppendorf, se agregan 200 µL de etanol absoluto frío, se agita en vortex durante 30 segundos y se deja reposar durante 5 minutos en el freezer. Luego se centrifuga 5 minutos a 0°C y 1500 rpm. El sobrenadante se inyecta en el HPLC para control de la PRQ.

3.2.3.3. Lipofilicidad

La lipofilicidad es estudiada a través de la determinación del coeficiente de partición octanol/buffer fosfato 0,1M (log P). En un tubo de centrifuga se mezclan 2 mL de octanol y 1,9 mL de buffer fosfato 0,1 M pH=7,4). Se adiciona el trazador a estudiar (100 µL) y se agita en vortex durante 2 minutos. La mezcla es centrifugada por 5 minutos a una velocidad de 5000 rpm. Se toman 2 alícuotas de cada fase (100 µL) y se mide la actividad de cada una de ellas en un contador de centelleo sólido. Se realizan 3 repeticiones de cada experiencia. La lipofilicidad se calcula como:

$$\log P = \log \left(\frac{\text{cuentas en fase orgánica}}{\text{cuentas en fase acuosa}} \right)$$

3.2.3.4. Unión a proteínas plasmáticas

La unión a proteínas plasmáticas (UPP) es determinada mediante exclusión molecular utilizando columnas ilustra MicroSpin G-50. En un baño de agua a 37°C colocar un blanco (475 µL de agua destilada + 25 µL del complejo) y la muestra de estudio (475 µL de plasma + 25 µL del complejo). Se incuba el tiempo que se considere necesario, unos minutos antes de alcanzar el tiempo deseado, tomar la columna MicroSpin G-50 y:

- Agitarla unos segundos para suspender el contenido en el buffer que contiene.
- Romper la tapa inferior de la columna y desenroscar un poco la tapa superior, colocar la columna sobre el tubo colector
- Centrifugar durante 1 minuto a 4000 rpm para remover el buffer.
- Descartar el buffer.
- Llegado el tiempo deseado incubar 25 µL del complejo o blanco según corresponda.
- Dejar reposar 2 segundos y centrifugar 1 minuto a 4000 rpm.
- Medir actividad libre y retenida en la columna.

La unión a proteínas plasmáticas se calcula como:

$$UPP = \left(\frac{\text{cuentas en fase móvil}}{\text{cuentas en fase móvil} + \text{cuentas en fase estacionaria}} \right) \times 100$$

3.2.4. Evaluación biológica *in vitro* de los complejos

La evaluación biológica de los complejos se realizó en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 disponibles en el Área Radioquímica.

Las células MCF-7 se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 2,5 mL de penicilina (100 U/mL), 2,5 mL de estreptomicina (100 µg/mL) y 25 mL de suero fetal bovino (SFB, 10%) por cada 250 mL de medio. El cultivo se realizó en estufa incubadora a 37 °C y una atmósfera con 5% de CO₂. De manera análoga, las células MDA-MB-231 se cultivaron en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute), suplementado con los mismos componentes y bajo las mismas condiciones de temperatura y CO₂.

Ambas líneas celulares se mantuvieron en frascos tipo T-75 hasta alcanzar la formación de una monocapa celular, momento en el cual fueron consideradas aptas para la realización de los ensayos experimentales.

Para la realización de los diferentes ensayos, se preparan la cantidad suficiente de placas de cultivo celular el día previo, donde se colocan $1,8 \times 10^5$ células por pocillo (placas de cultivo celular de 24 pocillos). Para la preparación de las placas de cultivo para los ensayos se sigue técnica a continuación.

- Retirar el medio de cultivo del frasco T-75.
- Realizar dos lavados con Buffer Fosfato Salino (PBS) de 10 mL cada uno.

- Agregar 3 mL de solución Tripsina/EDTA y dejar incubar 5 minutos a 37°C y 5% de CO₂.
- Agregar 3 mL de SFB, homogeneizar.
- Tomar el contenido del frasco y pasarlo a un tubo Falcon de 15 mL.
- Centrifugar el mismo 5 minutos a 1200 rpm.
- Descartar el sobrenadante y despegar el pellet de células pasando el tubo Falcon por una gradilla o en la rejilla del flujo laminar.
- Agregar 1 mL de medio completo (el acorde a la línea celular), homogeneizar y tomar 10 µL para el conteo de células.
- Contar las células en contador automatizado digital LUNA-FL™.
- Calcular el volumen a colocar en cada pocillo, y agregar las células a los pocillos correspondientes.
- Agregar a cada pocillo 800 µL del medio completo correspondiente y dejar en estufa incubadora a 37°C y 5% de CO₂.

3.2.4.1. Ensayo de unión e internalización

Retirar el medio de cultivo completo y colocar medio de cultivo no completo, 800 µL por pocillo. Luego se incuba el complejo, en cantidades a definir, en estufa a 37°C, 5% de CO₂ durante 1 hora. (Para evaluar la unión e internalización dependiente del tiempo se varía el tiempo de incubación y se sigue el mismo procedimiento).

- Retirar el medio de cultivo (fracción W1).
- Lavar dos veces con 400 µL de medio de cultivo no completo (fracción W2).
- Lavar dos veces con 400 µL de solución tampón de glicina 50 mM (pH = 2,8) y NaCl 0,1 M. En este paso se elimina el complejo unido a la membrana (fracción G).
- Lavar dos veces con solución de NaOH 1 M. En este paso las células son lisadas y podemos medir la actividad del complejo internalizado (fracción N).

Todas las fracciones son colocadas en tubos plásticos rotulados para ser medidos en el equipo de centelleo sólido. El ensayo se realiza por triplicado, al igual que las medidas de cada fracción. Además, se realiza una fracción estándar donde solo se agrega el complejo en las mismas cantidades definidas en el estudio y se completa el volumen a 800 µL con agua destilada.

Se calcula el porcentaje de complejo internalizado y unido a membrana en relación con la actividad total añadida a las células, de la siguiente manera:

$$\% \text{ unión a membrana} = \left(\frac{\text{Actividad promedio neta de las fracciones de glicina/NaCl}}{\text{Actividad promedio neta del total de fracciones}} \right) \times 100$$

$$\% \text{ internalización} = \left(\frac{\text{Actividad promedio neta de las fracciones de NaOH}}{\text{Actividad promedio neta del total de fracciones}} \right) \times 100$$

3.2.4.2. Ensayo de competencia

El estudio de competencia se realiza de forma análoga al anterior, pero agregando en cada pocillo una cantidad conocida de agente de competencia, que en este caso será el péptido derivatizado sin ser radiomarcado. Se calcula de igual forma la unión e internalización y se compara el resultado con los valores sin competencia.

4. Resultados y discusión

4.1. Síntesis de los complejos de ^{18}F y $^{99\text{m}}\text{Tc}$

4.1.1. Síntesis de $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-K-EcgDf1}_{(10)}$

Para la síntesis del $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-K-EcgDf1}_{(10)}$ se sigue la técnica descrita en 3.2.1., la cual es la optimizada por la Q.F. Jessica Osorio.

La pureza radioquímica se controló por HPLC como es descrito en 3.2.1. A pesar de la optimización realizada la PRQ obtenida es menor a 90%. En todos los casos la impureza presente es ^{18}F , que se observa con un tiempo de retención de 1,7 minutos (figura 6). Por lo tanto, para realizar los estudios fisicoquímicos e *in vitro* es necesario purificar de manera de obtener un complejo de PRQ mayor al 90%. La purificación de la especie de interés por HPLC no se logró por tanto se procedió a utilizar columnas de extracción en fase sólida con columna Sep-Pak C18 obteniendo excelentes resultados (figura 7).

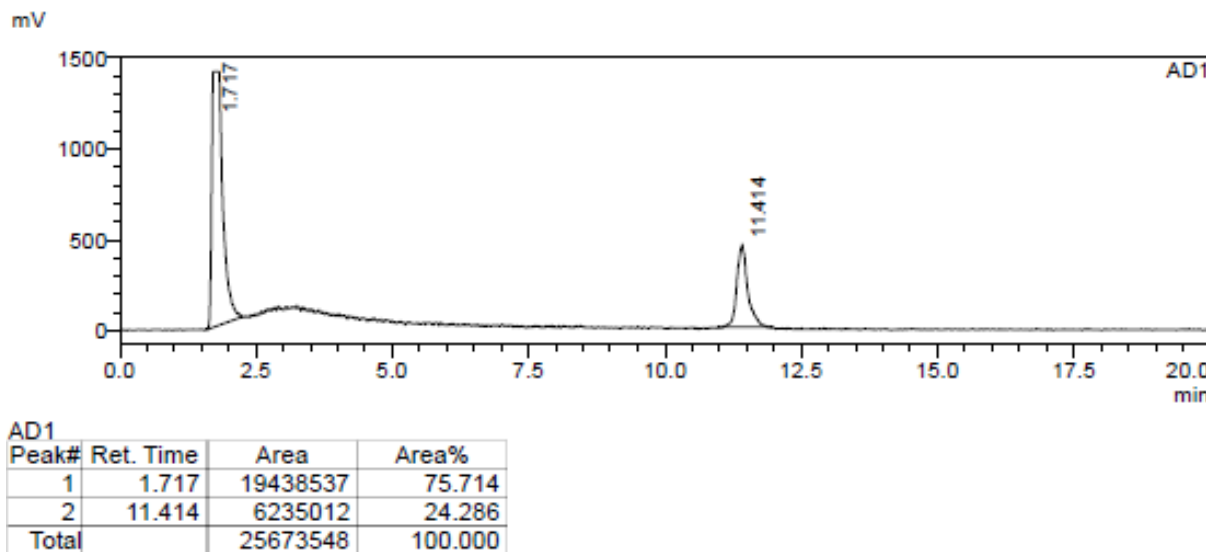


Figura 6 Cromatograma del marcado

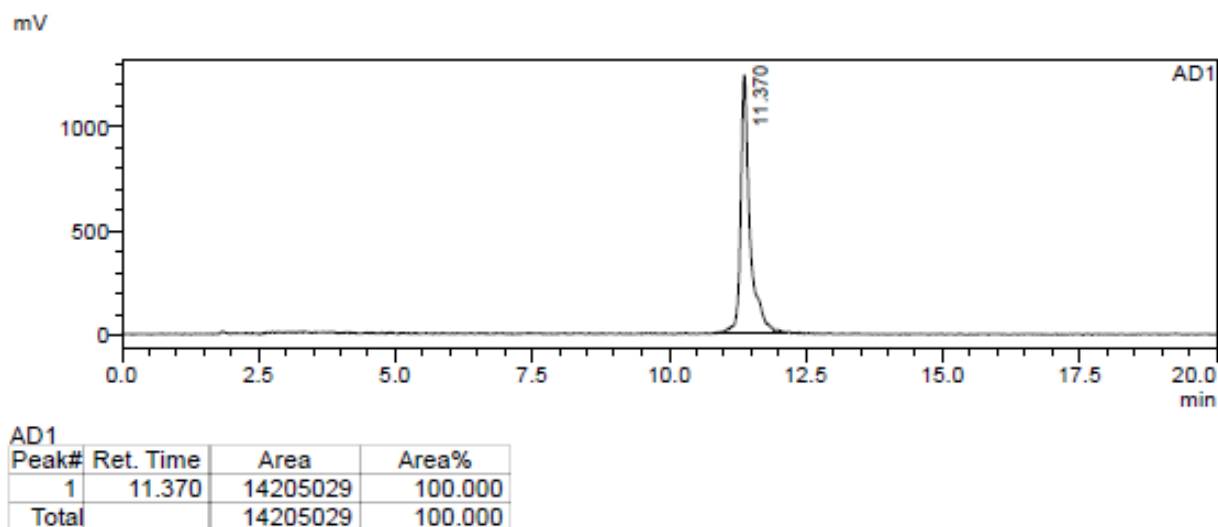


Figura 7 Cromatograma de marcado purificado por Sep-Pak C18

4.1.2. Síntesis de [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-EcgDf1₍₁₀₎

Para la obtención de este complejo se partió de la técnica publicada por el grupo para otro análogo del EcgDf1 pero de 21 aminoácidos. [22]

La técnica de partida fue la siguiente:

- Se prepara una solución (solución T) conteniendo 6 mg de tricina en 10 mL de H₂O, se le adiciona una solución de 6 mg de SnCl₂ en 250 μL de HCl 0,1N. Se ajusta el pH a 4,5 con NaOH 1N.
- Se adicionan 100 μL de solución T a 50 μL de solución de EcgDf1₍₁₀₎ (1 mg/mL).
- Inmediatamente después se agrega 100 μL de $^{99m}\text{TcO}_4^-$
- Se incuba por 30 minutos a 95°C

A partir de ella se ajustaron algunos parámetros para lograr un marcado del EcgDf1₍₁₀₎ con PRQ mayor al 90%. Con el objetivo de conocer los tiempos de retención de las posibles impurezas se inyectaron en el HPLC el pertecneciato y tricina marcada con ^{99m}Tc . El perfil cromatográfico del pertecneciato se muestra en la figura 8 que presenta un tiempo de retención de 2 minutos, mientras que la tricina marcada tiene un tiempo de retención de 6 minutos (figura 9).

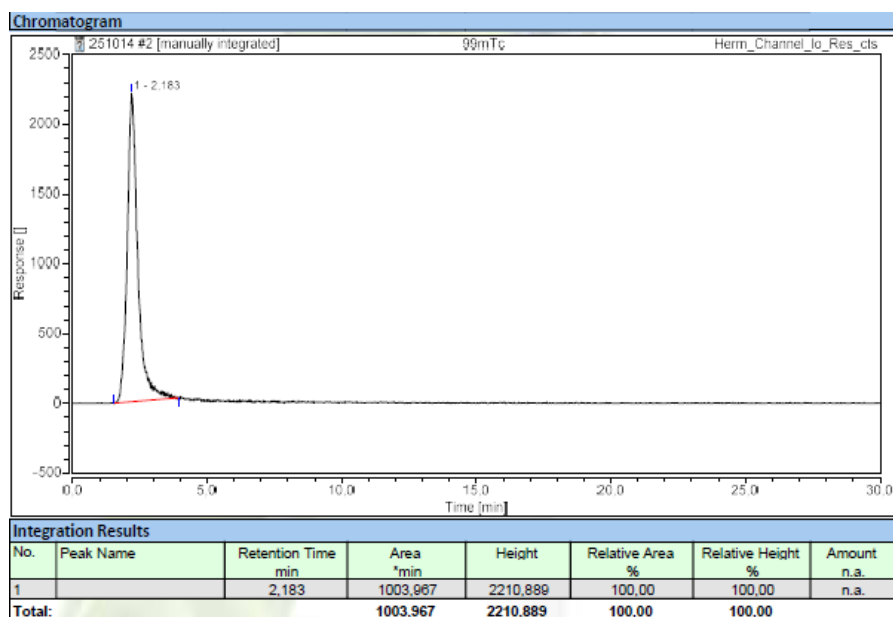


Figura 8 Cromatograma de $^{99m}\text{TcO}_4^-$

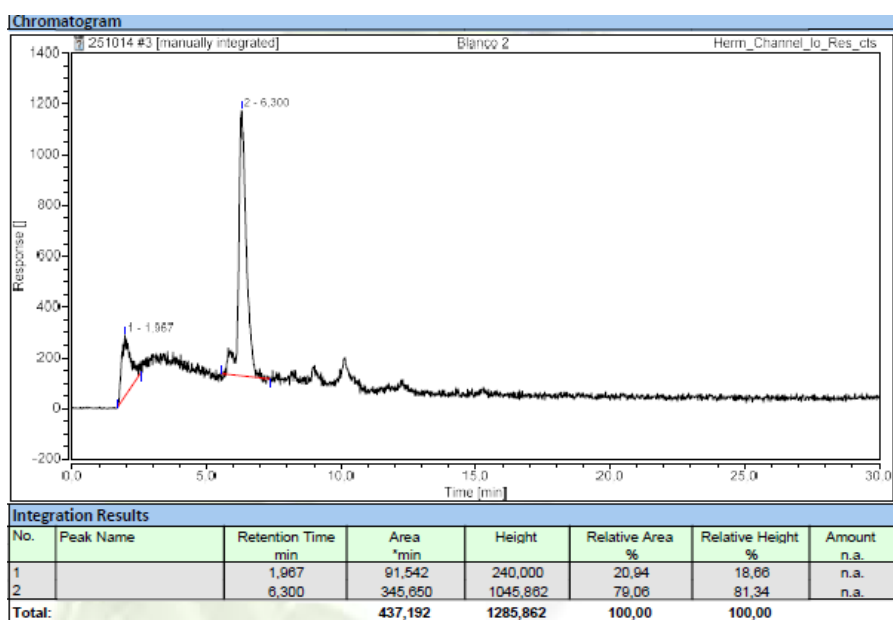


Figura 9 Cromatograma de tricina marcada

Siguiendo la técnica citada anteriormente se observa por HPLC un pico mayoritario desdoblado con tiempo de retención de 8 minutos, lo que indica la presencia de dos especies químicas con tiempos de retención muy próximos (figura 10).

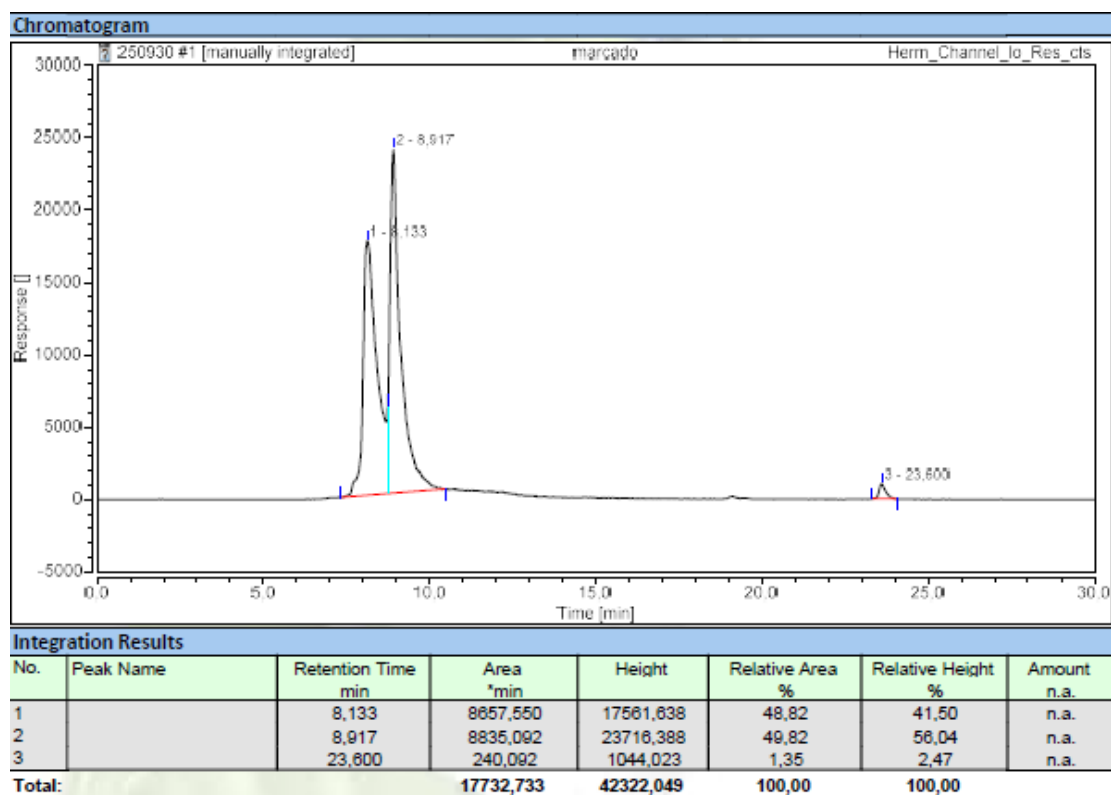


Figura 10 Cromatograma obtenido con la técnica de partida

Dado el resultado obtenido se decidió ajustar el procedimiento variando algunos parámetros como: cantidad de tricina y SnCl_2 y la temperatura de incubación (temperatura ambiente, 50, 75, 85, 95 y 105°C).

En primera instancia se varió la cantidad de tricina y SnCl_2 , manteniendo constantes la temperatura (95°C), tiempo de incubación (30 min), pH (4 - 4,5), cantidad de péptido (50 μL 1mg/mL) y actividad (1 mCi). Se resumen los resultados en la tabla 1. Como se puede observar, la cantidad óptima es el agregado de 500 μL de solución T, los cuales contienen $1,62 \times 10^{-6}$ moles de tricina y $1,52 \times 10^{-6}$ moles de SnCl_2 .

Volumen de solución T (μL)	Cantidad de tricina (mol)	Cantidad de SnCl_2 (mol)	PRQ (%)
100	$3,24 \times 10^{-7}$	$3,05 \times 10^{-7}$	71 + 28
500	$1,62 \times 10^{-6}$	$1,52 \times 10^{-6}$	100
100	$5,45 \times 10^{-8}$	$3,05 \times 10^{-7}$	61 + 38

Tabla 1 Optimización. Cantidad de tricina y SnCl_2

Una vez optimizada la cantidad de tricina y SnCl_2 , se varió la temperatura de incubación, manteniendo constantes las demás variables. Se resumen los resultados en la tabla 2. En todas las temperaturas ensayadas, se obtuvo un complejo de alta PRQ, por tanto, se decidió continuar el trabajo a temperatura ambiente, reduciendo el costo de la marcación.

Temperatura (°C)	PRQ (%)
Temperatura ambiente	100
50	100
75	98,46
85	99,62
95	97,95
105	99,65

Tabla 2 Optimización. Temperatura

En resumen, las mejores condiciones de marcación fueron las siguientes: 500 μL de solución T, 50 μg de péptido (1 mg/mL), 1 mCi de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, a temperatura ambiente por 30 minutos. El perfil cromatográfico obtenido se muestra en la figura 11 y muestra una única especie de tiempo de retención 8 minutos y PRQ superior al 90%.

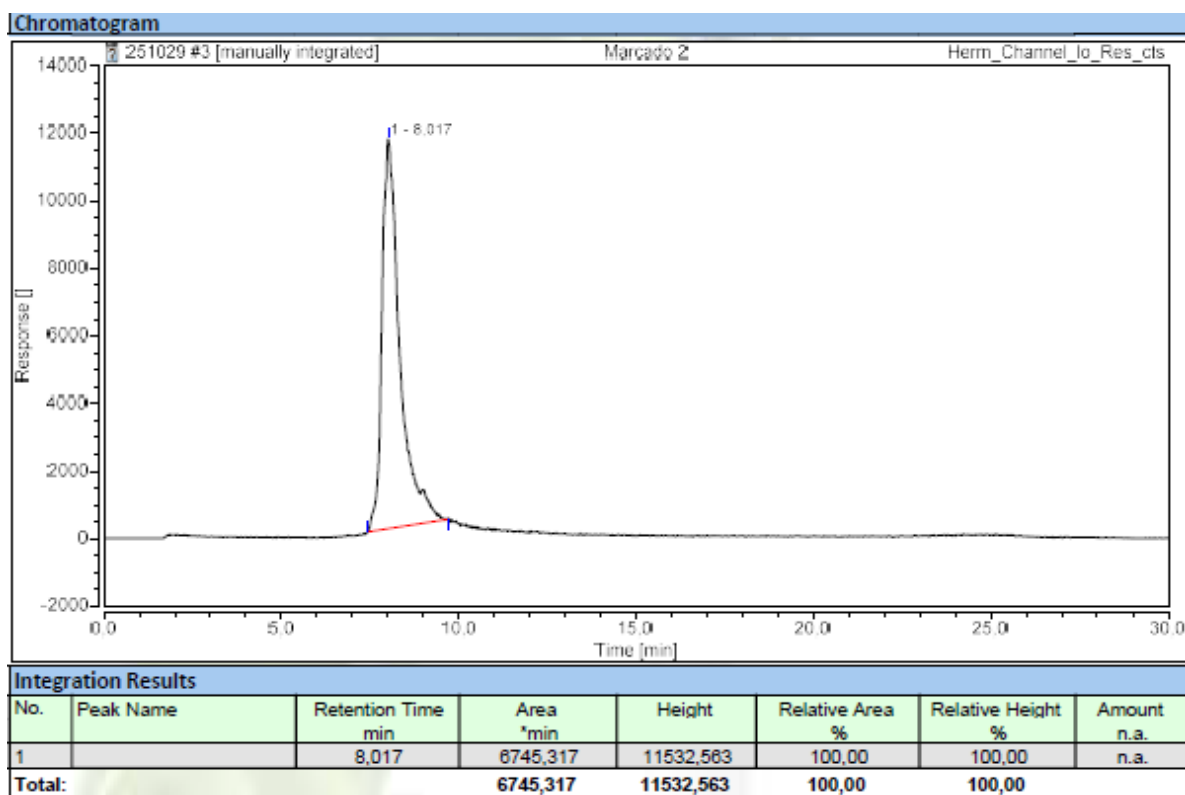


Figura 11 Cromatograma obtenido con las mejores condiciones

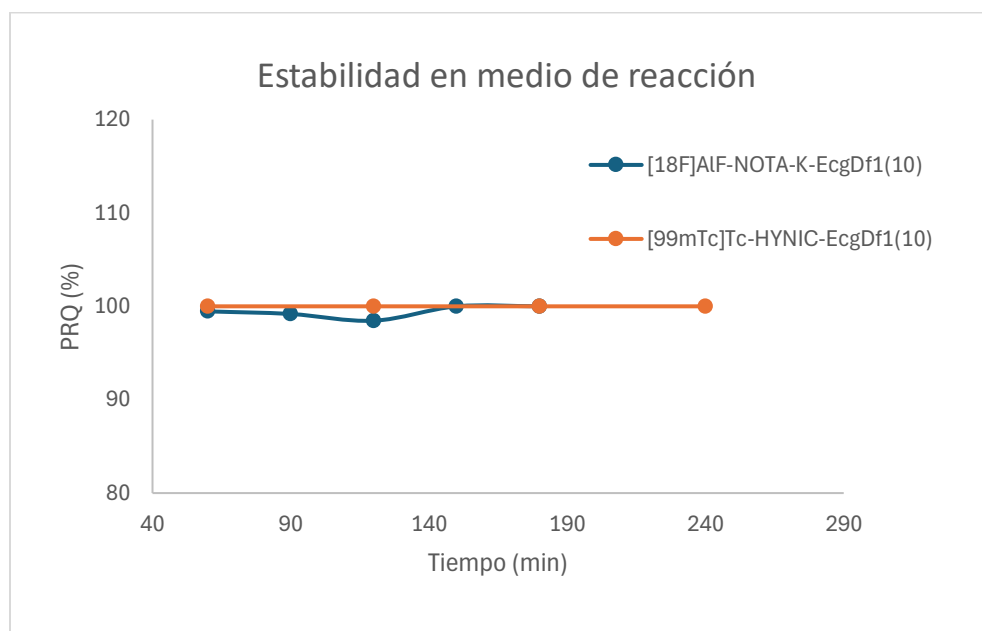
4.2. Caracterización fisicoquímica de los complejos

Se realizó una evaluación de las propiedades relevantes para la potencial aplicación diagnóstica en radiofarmacia. Durante el desarrollo de un potencial radiotrazador, la evaluación de sus propiedades fisicoquímicas es esencial para predecir su comportamiento *in vitro* e *in vivo*, así como su estabilidad y biodistribución. Una vez se optimizaron las condiciones para obtener los complejos con pureza radioquímica mayor al 90%, se determinaron las siguientes propiedades fisicoquímicas.

4.2.1. Estabilidad en medio de reacción

La estabilidad en medio de reacción se determina con el fin de comprobar que el compuesto final no sufre degradación durante el tiempo que transcurre entre su síntesis y su purificación o formulación, asegurando que la pureza radioquímica se mantenga adecuada antes de su utilización.

Tanto $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HYNIC-EcgDf1}_{(10)}$ como $[^{18}\text{F}]\text{AlF-NOTA-K-EcgDf1}_{(10)}$ presentaron una buena estabilidad en el medio de reacción, siendo el complejo de ^{99m}Tc estable por al menos 4 horas, y el de ^{18}F estable por al menos 3 horas, manteniendo ambos en estos tiempos una PRQ mayor al 90%. En la gráfica 1 se muestran los resultados obtenidos para ambos complejos.



Gráfica 1 Estabilidad en medio de reacción para ambos complejos

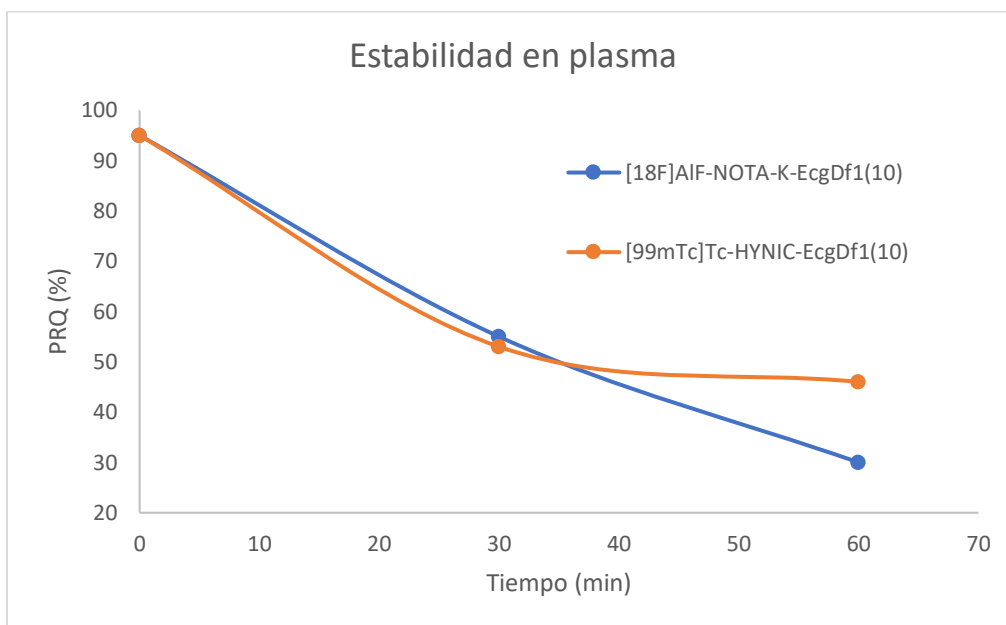
4.2.2. Estabilidad en plasma

La estabilidad en plasma permite estimar la resistencia del radiotrazador frente a la degradación metabólica y su posible interacción con enzimas o componentes plasmáticos, lo cual es

determinante para su vida media biológica y para garantizar que la señal observada en estudios *in vivo* provenga del compuesto deseado.

El método implica la incubación de la muestra con un pool de plasma humano a 37 °C y el control de la PRQ a diferentes tiempos utilizando el sistema de HPLC optimizado para cada trazador. Para esto, es necesario precipitar las proteínas plasmáticas y por lo tanto, solamente se determina la estabilidad de la fracción libre del complejo.

El complejo $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-K-EcgDf1}_{(10)}$ presentó una baja estabilidad en plasma disminuyendo rápidamente su pureza radioquímica en este medio, al igual que el complejo $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-HYNIC-EcgDf1}_{(10)}$. En la gráfica 2 se muestran los resultados obtenidos.



Gráfica 2 Estabilidad en plasma para ambos complejos

4.2.3. Lipofilicidad

El estudio de lipofilicidad (mediante la determinación del coeficiente de partición octanol/buffer fosfato pH 7.4, 0.1M, log P) brinda información sobre el equilibrio entre afinidad por medios acuosos y lipídicos; este parámetro influye directamente en la capacidad del trazador para atravesar membranas biológicas, su distribución tisular y su vía de eliminación.

El ensayo de lipofilicidad del complejo $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-K-EcgDf1}_{(10)}$ se realizó por duplicado, se realizó el promedio de ambos resultados obtenidos, teniendo así un valor de log P de:

$$\text{Log P} = -1,88 \pm 0,25$$

Este resultado nos indica que el complejo obtenido presenta un comportamiento hidrofílico.

Para el complejo $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-HYNIC-EcgDf1}_{(10)}$ se obtuvo el siguiente valor de log P:

$$\text{Log P} = -2,91 \pm 0,19$$

Un log P negativo indica que el radiotrazador presenta un carácter hidrofílico, mostrando mayor afinidad por medios acuosos que por fases lipídicas. Esta propiedad favorece su solubilidad y estabilidad en soluciones fisiológicas, y contribuye a reducir la retención inespecífica en tejidos con alto contenido graso. Asimismo, los compuestos hidrofílicos suelen presentar una eliminación rápida por vía renal, lo cual puede resultar ventajoso en términos de depuración del fondo de señal. Los valores de lipofilidad obtenidos se consideran óptimos para asegurar un buen pasaje a través de una membrana biológica y una adecuada biodistribución (log P entre -0.5 y 2 a pH = 7.4).

4.2.4. Unión a proteínas plasmáticas

La unión a proteínas plasmáticas (UPP) se evalúa para conocer qué fracción del radiotrazador permanece libre en el plasma y, por tanto, disponible para interactuar con su blanco biológico. Una elevada unión a proteínas puede reducir la fracción biodisponible y alterar su cinética de distribución, mientras que una unión baja puede favorecer un aclaramiento más rápido. Dada la baja estabilidad de ambos complejos en plasma, el estudio de UPP no se realizó.

4.3. Evaluación biológica *in vitro*

Se realizaron estudios de unión e internalización de ambos radiotrazadores en ambas líneas celulares variando condiciones como el tiempo de incubación y la actividad. Además, se realizaron ensayos de competencia para determinar si la unión es específica. Los estudios biológicos son esenciales para caracterizar el comportamiento celular de los potenciales radiotrazadores y comprender su mecanismo de interacción con los sistemas biológicos.

4.3.1. Ensayo de unión e internalización

En el caso del EcgDf1₍₁₀₎ radiomarcado, el ensayo de unión e internalización permite evaluar la afinidad del trazador por la membrana celular y su capacidad de atravesar la membrana plasmática e ingresar al interior de la célula, procesos estrechamente vinculados con la naturaleza anfipática y la carga del péptido.

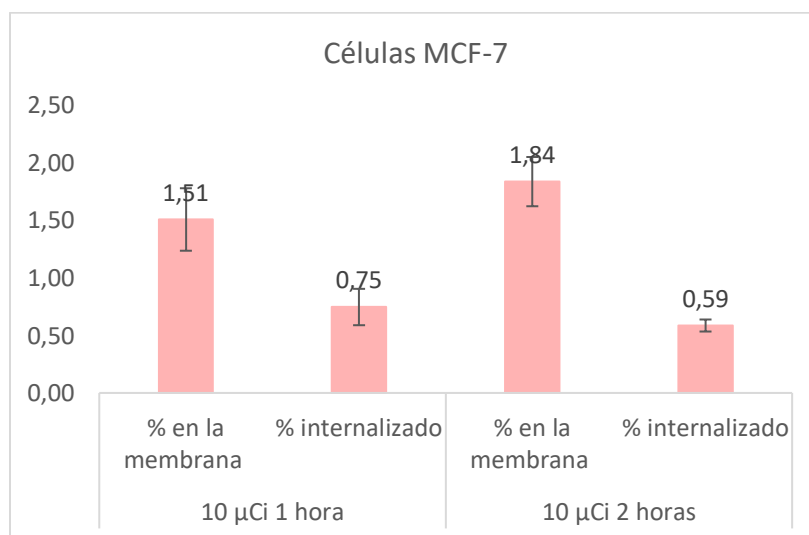
4.3.1.1. Unión e internalización del complejo [¹⁸F]AIF-NOTA-K-EcgDf1₍₁₀₎.

Para el complejo [¹⁸F]AIF-NOTA-K-EcgDf1₍₁₀₎ se realizó el ensayo de unión a membrana e internalización, en células MDA-MB-231 y MCF-7. Para ello, se incubaron 10 µCi del complejo con $1,8 \times 10^5$ células durante 1 y 2 horas, a 37°C y 5% de CO₂. Previo al ensayo, el complejo se diluye hasta triplicar su volumen. Esto se debe a que la purificación mediante Sep-Pak devuelve el complejo en una solución con un 30% de etanol, concentración que resulta tóxica para las células. La dilución reduce el contenido de etanol al 10%, que es el máximo tolerado.

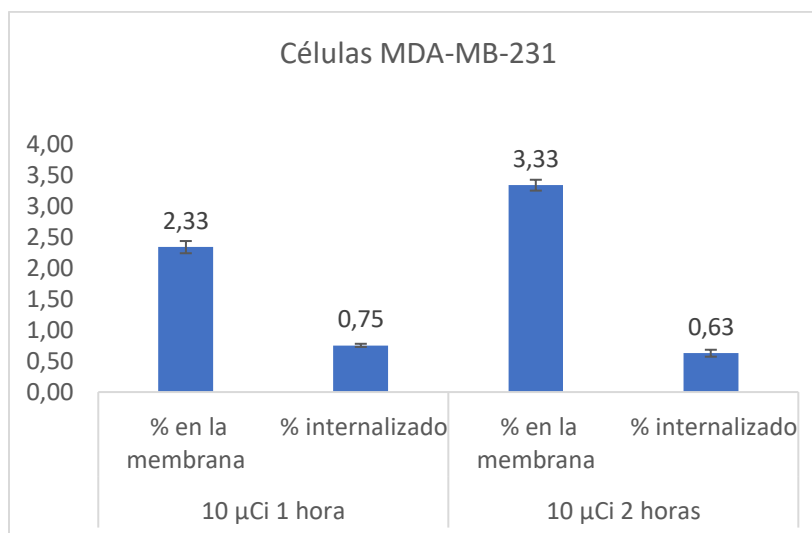
Para las células MCF-7 se obtuvo una unión de $1,51 \pm 0,27$ % en una hora de incubación, y para las 2 horas de incubación se obtuvo una unión de $1,84 \pm 0,21$ %. Con estos resultados, se puede

concluir que no hay una diferencia significativa de unión al aumentar el tiempo de incubación. En el caso de las células MDA-MB-231 se obtuvo una unión de $2,33 \pm 0,10$ % para 1 hora de incubación, y $3,33 \pm 0,09$ % para 2 horas. Se puede observar que hay un leve incremento de la unión al aumentar el tiempo de incubación, esto puede deberse a que se dieron más interacciones con la membrana por estar más tiempo en contacto.

En cuanto a la internalización se obtuvo un valor de $0,75 \pm 0,16$ % para células MCF-7 en una hora de incubación, y $0,59 \pm 0,05$ % en dos horas. Para las células MDA-MB-231 para 1 hora de incubación se obtuvo un valor de internalización de $0,75 \pm 0,03$ % y $0,63 \pm 0,06$ % para 2 horas. Para ambas líneas celulares se obtiene la misma conclusión, no hay un cambio en la internalización al variar el tiempo de incubación. Se resumen estos resultados en las gráficas 3 y 4.



Gráfica 3 Ensayo de unión e internalización en función del tiempo del complejo [^{18}F]AIF-NOTA-K-EcgDf $_{1(10)}$ en células MCF-7



Gráfica 4 Ensayo de unión e internalización en función del tiempo del complejo [^{18}F]AIF-NOTA-K-EcgDf $_{1(10)}$ en células MDA-MB-231

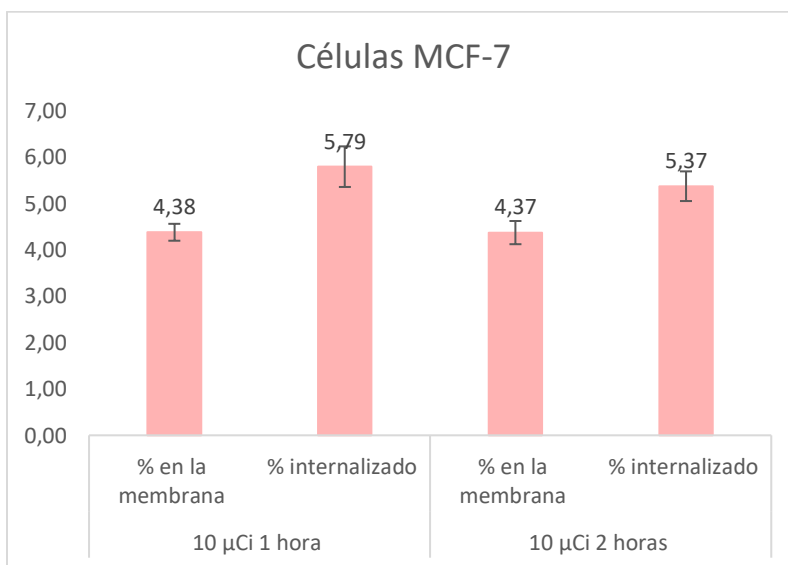
4.3.1.2. Unión e internalización del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-EcgDf1₍₁₀₎.

Para el complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-EcgDf1₍₁₀₎ se realizó el ensayo de unión a membrana e internalización, en células MDA-MB-231 y MCF-7. Para ello, se incubaron 10 μCi del complejo con $1,8 \times 10^{-5}$ células durante 1 y 2 horas, a 37°C y 5% de CO_2 .

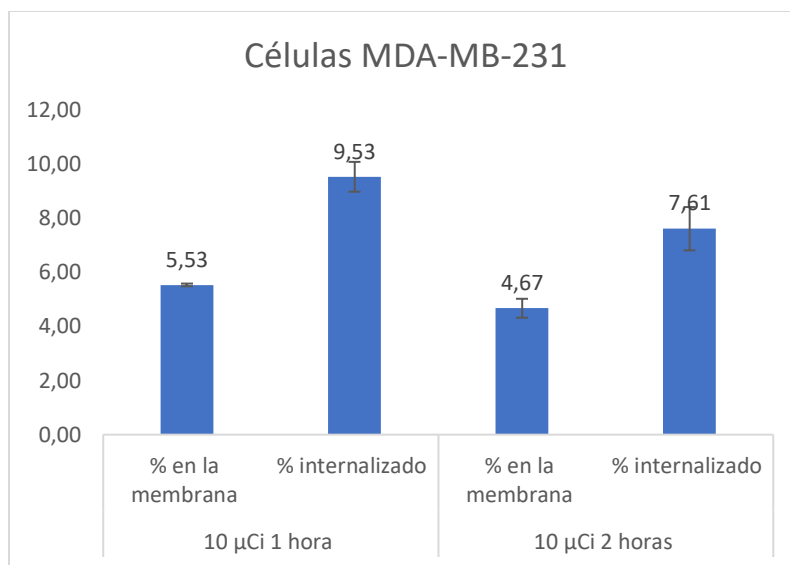
Para las células MCF-7 se obtuvo una unión a membrana de $4,38 \pm 0,18$ % en una hora de incubación que no varía con el tiempo (2 horas: $4,37 \pm 0,44$ %). En el caso de las células MDA-MB-231 se obtuvo una unión a membrana de $5,53 \pm 0,05$ % para 1 hora de incubación y $4,67 \pm 0,35$ % para 2 horas.

Para las células MCF-7 la internalización del complejo de interés no varía con el tiempo siendo de $5,79 \pm 0,44$ % a la hora y de $5,37 \pm 0,32$ % a las dos horas. En el caso de las células MDA-MB-231 el valor de internalización a la hora es de $9,53 \pm 0,55$ %, obteniéndose una internalización menor a las dos horas ($7,61 \pm 0,80$ %).

Se resumen estos resultados en las gráficas 5 y 6.



Gráfica 5 Ensayo de unión e internalización del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-EcgDf1₍₁₀₎ en células MCF-7



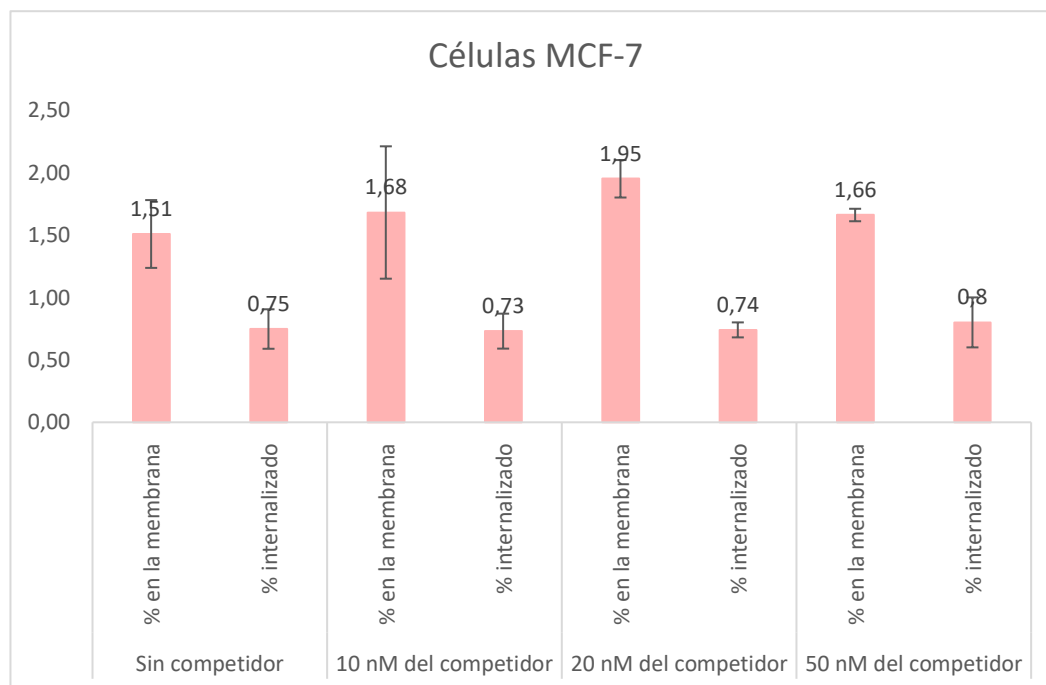
Gráfica 6 Ensayo de unión e internalización del complejo $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HYNIC-EcgDf1}_{(10)}$ en células MDA-MB-231

4.3.2. Ensayo de competencia

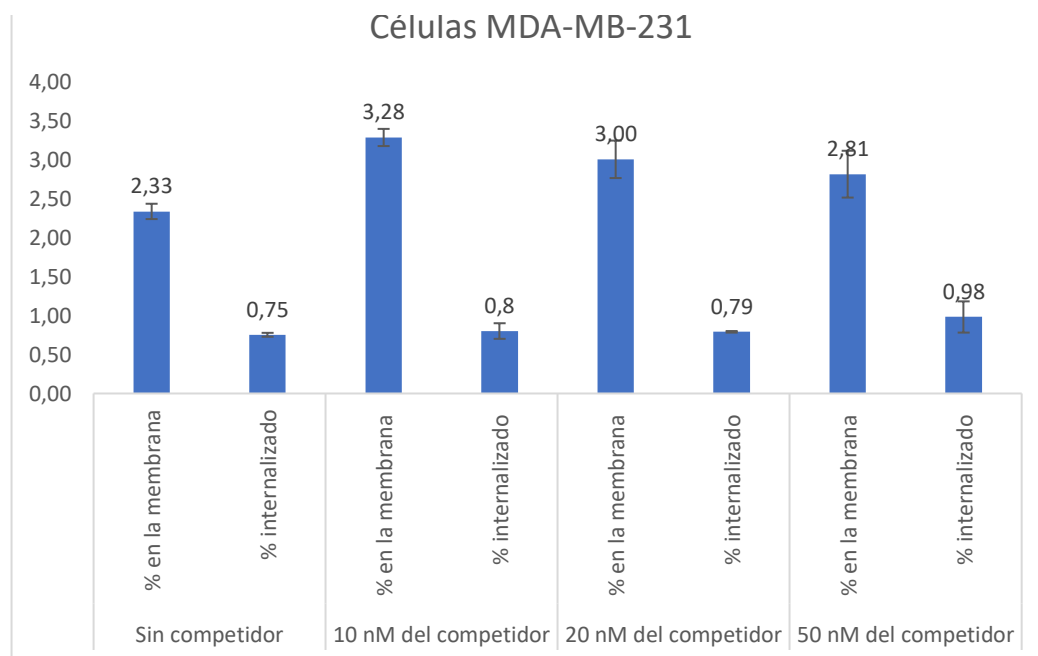
El ensayo de competencia se emplea para analizar la especificidad de la interacción, para ello se pone a competir el radiotrazador en estudio con el péptido frío derivatizado y se analiza como varia la unión y la internalización del radiotrazador. Una disminución de la unión o internalización del radiotrazador sugiere que el mismo está interaccionando específicamente con algún blanco molecular (receptor, enzima, etc.). Si la unión y la internalización del radiotrazador se mantiene constante sugiere que el mismo está interaccionando de manera no específica.

4.3.2.1. Ensayo de competencia del complejo $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-K-EcgDf1}_{(10)}$

Para el complejo $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-K-EcgDf1}_{(10)}$ se realizó el ensayo de competencia en células MDA-MB-231 y MCF-7. Para ello, se incubaron 10 µCi del complejo con $1,8 \times 10^{-5}$ células con concentraciones crecientes de competidor (EcgDf1₍₁₀₎ – NOTA sin marcar), durante 1 hora de incubación a 37°C y 5 % de CO₂. Se resumen los valores obtenidos de unión e internalización con las diferentes concentraciones de competidor en las gráficas 7 y 8.



Gráfica 7 Ensayo de competencia MCF-7



Gráfica 8 Ensayo de competencia MDA-MB-231

En las células MCF-7, los resultados obtenidos tanto en los ensayos de unión a membrana como en los de internalización no muestran diferencias estadísticamente significativas entre las incubaciones realizadas en presencia y en ausencia del agente competidor. Para reforzar esta observación y concluir que no hay diferencias significativas, se debería de realizar un análisis estadístico por ejemplo una prueba de t de student. Los resultados obtenidos sugieren que la

unión del trazador a este tipo celular es predominantemente inespecífica, dado que la unión e internalización no varía ante la presencia de concentraciones variadas de competidor. Esto es de esperar ya que se postula que los péptidos antimicrobianos con su carga neta positiva interactúan con componentes negativos de las membranas en las células cancerosas.

En el caso de las MDA-MB-231, los ensayos de internalización tampoco presentan variaciones entre las diferentes condiciones de incubación, lo que nuevamente apunta a una unión inespecífica o a un mecanismo de entrada no mediado por un receptor. Sin embargo, en los ensayos de unión a membrana se observa una situación particular: los valores obtenidos para las incubaciones con agente competidor son consistentes entre sí, pero no concuerdan con el valor de referencia obtenido en ausencia del competidor. Esta discrepancia es inesperada, ya que es de esperar dos escenarios posibles: 1) valores del mismo orden de magnitud en todas las condiciones en el caso de un proceso inespecífico, o 2) una disminución clara de la unión en presencia del competidor si existiera reconocimiento específico.

Debido a esta falta de coherencia interna en los resultados de unión a membrana para MDA-MB-231, no es posible establecer conclusiones sólidas. Por lo tanto, sería necesario repetir el ensayo bajo las mismas condiciones experimentales, incorporando mayor número de réplicas para aumentar la robustez estadística y confirmar si la diferencia observada responde a variabilidad experimental o a algún fenómeno biológico no identificado. Sin embargo, no se realizó una repetición adicional debido a limitaciones de tiempo y de disponibilidad de recursos, lo que restringe la posibilidad de profundizar en esta observación dentro del marco de este trabajo.

4.3.2.2. Ensayo de competencia del complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-EcgDf1₍₁₀₎

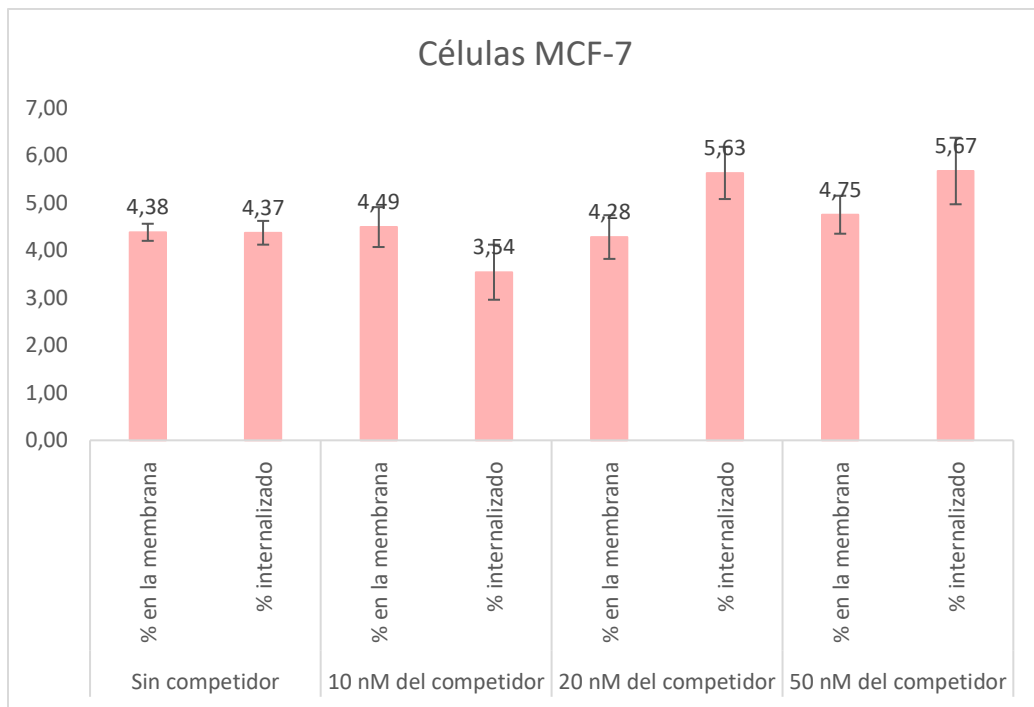
Para el complejo [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-EcgDf1₍₁₀₎ también se realizó el ensayo de competencia en células MDA-MB-231 y MCF-7. Para ello, se incubaron 10 μCi del complejo con $1,8 \times 10^{-5}$ células con concentraciones crecientes de competidor (EcgDf1₍₁₀₎ - HYNIC sin marcar), durante 1 hora de incubación a 37°C y 5 % de CO₂.

Se muestran los resultados obtenidos en las gráficas 9 y 10.

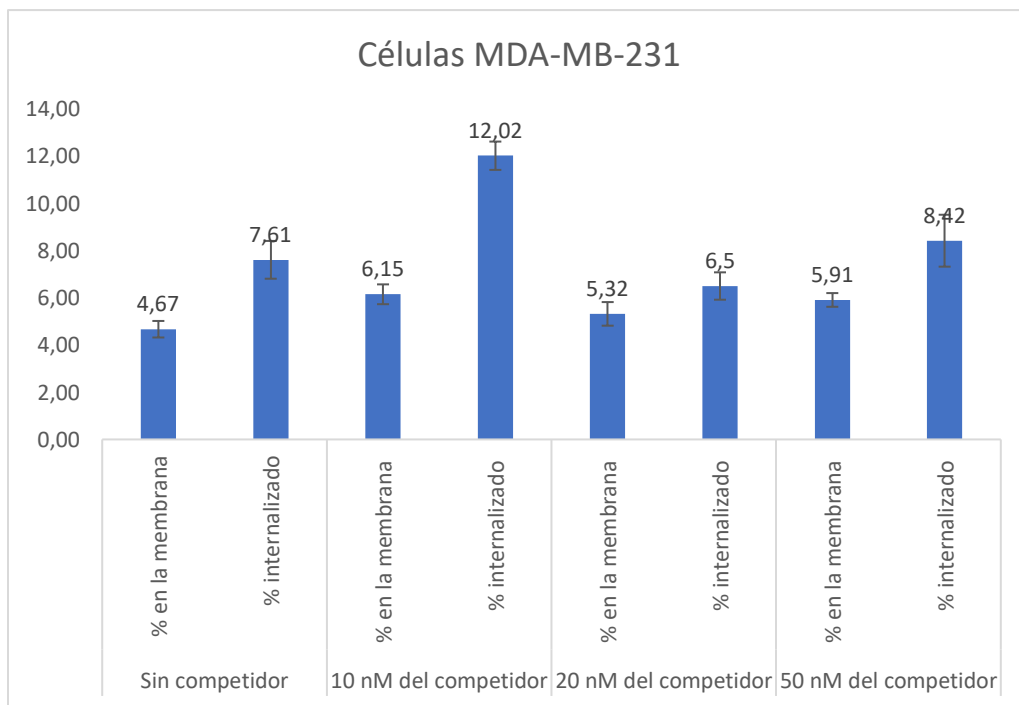
En el caso de las células MCF-7 la unión a membrana se mantiene constante al aumentar la concentración del competidor, este resultado sugiere que la unión a membrana del complejo en estudio es inespecífica de acuerdo con lo esperado. Para las células MDA-MB-231 el % de unión a membrana aumenta al aumentar la concentración del competidor lo cual no es razonable, ni esperable, por lo que no se puede concluir sobre este punto y debería repetirse el ensayo para tener certeza de este.

En el caso de internalización en MCF-7 los resultados disminuyen con 10 nM de competidor y aumentan con 20 y 50 nM de competidor con respecto a los resultados evaluados sin presencia de este. Para las MDA-MB-231 el % de internalización aumenta al aumentar la presencia de competidor. Estos resultados no son los esperados ya que se espera que si la internalización es mediada por una interacción específica el % de internalización disminuya al aumentar la

concentración del inhibidor. Y si la internalización es mediada por una interacción inespecífica el % de internalización debe mantenerse constante. En este caso ninguna de las opciones se cumple por lo que deberá estudiarse con mayor profundidad en otras instancias que escapen al desarrollo de esta tesis.



Gráfica 9 Ensayo de competencia en MCF-7



Gráfica 10 Ensayo de competencia en MDA-MB-231

5. Conclusiones y perspectivas futuras

El presente trabajo de licenciatura tuvo como objetivo principal la evaluación fisicoquímica y biológica *in vitro* de dos potenciales radiotrazadores, $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-K-EcgDf1}_{(10)}$ y $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-HYNIC-EcgDf1}_{(10)}$, derivados de un análogo corto de defensina vegetal EcgDf1, para su posible aplicación en imagenología de infecciones ocultas y cáncer de mama.

Se logró optimizar la síntesis del complejo $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-HYNIC-EcgDf1}_{(10)}$ alcanzando una PRQ mayor al 90% bajo las siguientes condiciones: 50 μg de péptido, 500 μL de solución T, 1 mCi de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ durante 30 minutos a temperatura ambiente. Ambos radiotrazadores presentaron una alta estabilidad en el medio de reacción, con una PRQ siempre mayor al 90%. El $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-HYNIC-EcgDf1}_{(10)}$ se mantuvo estable por al menos 4 horas, mientras que el $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-K-EcgDf1}_{(10)}$ se mantuvo estable por al menos 3 horas, tiempos más que excelentes teniendo en cuenta los tiempos de semidesintegración de cada radionucleido empleado.

La determinación de la lipofilicidad confirmó un carácter hidrofílico de ambos complejos con valores de log P negativos que aseguran la penetración de la membrana plasmática.

Ambos complejos presentaron una baja estabilidad en plasma humano. La pureza radioquímica disminuyó rápidamente en este medio, lo cual sugiere una rápida degradación metabólica o interacción inespecífica con componentes plasmáticos. Dado este resultado, la unión a proteínas plasmáticas no se pudo llevar a cabo.

En cuanto a la evaluación biológica *in vitro*, realizada como una prueba de concepto para evaluar en primera instancia la interacción de estos complejos con células de cáncer de mama, se pudo concluir que existe una unión e internalización de ambos complejos con ambas líneas celulares ensayadas, MCF-7 y MDA-MB-231 que se mantiene constante con el tiempo de incubación.

Para el caso de las células MCF-7 la unión a membrana de ambos complejos ($[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-K-EcgDf1}_{(10)}$, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-HYNIC-EcgDf1}_{(10)}$) se mantuvo constante a pesar del aumento del competidor lo que sugiere una unión no específica. Para el complejo $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-K-EcgDf1}_{(10)}$ el % de internalización no varió con el aumento de la concentración del competidor sugiriendo una internalización mediada por una unión no específica.

En el caso de las células MDA-MB-231 la internalización del complejo $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-K-EcgDf1}_{(10)}$ se mantuvo constante a pesar del aumento de competidor indicando una internalización mediada por una unión no específica. Para el complejo $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-HYNIC-EcgDf1}_{(10)}$ el % de unión a membrana se mantuvo constante a pesar del aumento del competidor sugiriendo una interacción no específica.

Para el caso de la internalización del complejo de $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-HYNIC-EcgDf1}_{(10)}$ y $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-K-EcgDf1}_{(10)}$ y el % de unión a membrana del complejo $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-K-EcgDf1}_{(10)}$ en células MDA-MB-231 en el estudio de competencia los resultados no fueron los esperados por lo que se deberá a futuro repetir y planear nuevos ensayos.

Además de los resultados obtenidos, este trabajo me permitió adquirir nuevas destrezas técnicas, especialmente en la realización de ensayos *in vitro*, lo que representa un avance significativo para mi formación y para futuros estudios experimentales que pueda desarrollar.

En conjunto, los resultados y conclusiones obtenidas permiten cerrar esta etapa del trabajo y, al mismo tiempo, abren nuevas preguntas que orientan el camino a seguir. En este contexto, se plantean a continuación las principales perspectivas futuras.

Como primer punto a destacar, es necesario profundizar en la obtención de una mayor estabilidad en plasma de los complejos desarrollados. En este sentido para el radiotrazador que utiliza HYNIC como agente quelante, se propone evaluar distintos coligandos, por ejemplo EDDA, para el con el objetivo de favorecer la formación de complejos más estables.

Asimismo, será imprescindible repetir los ensayos *in vitro* y complementar los resultados con análisis estadísticos adecuados, de modo de obtener conclusiones más sólidas y robustas sobre el comportamiento biológico de estos complejos. Además, realizar estos ensayos en otras líneas celulares de cáncer, así como en líneas celulares sanas no cancerosas, para diferenciar si la interacción es exclusiva de la membrana tumoral o si es un fenómeno general. A su vez, para fortalecer la fiabilidad de los ensayos *in vitro*, se propone evaluar la estabilidad de los complejos en los distintos medios celulares, con el objetivo de comprender mejor su comportamiento y confirmar que permanecen intactos en un entorno potencialmente competitivo.

Se propone probar además una evaluación *in silico* de la estabilidad de los complejos en plasma y diferentes medios, así como su interacción con membranas plasmáticas.

Las conclusiones alcanzadas y las perspectivas planteadas delinear un camino claro para consolidar y fortalecer este desarrollo. Si bien aún quedan aspectos por optimizar y validar, los avances obtenidos establecen una base sólida sobre la cual continuar trabajando, orientando futuros esfuerzos hacia la mejora de esta línea de investigación.

6. Bibliografía

- [1] (N.d.). Gub.Uy. Retrieved August 1, 2025, from <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/sites/ministerio-salud-publica/files/2022/06/FINAL%20Morbimortalidad%20por%20ENT%20y%20factores%20de%20riesgo.pdf>
- [2] Enfermedades no transmisibles. (n.d.). Who.int. Retrieved August 1, 2025, from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
- [3] Cáncer. (n.d.). Who.int. Retrieved July 28, 2025, from <https://www.who.int/es/health-topics/cancer>
- [4] el Cáncer, C. H. de L. C. (n.d.). Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer. Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer. Retrieved July 28, 2025, from <https://www.comisioncancer.org.uy/home>
- [5] Entender los tipos de cáncer de mama. (n.d.). Rockymountaincancercenters.com. Retrieved July 29, 2025, from <https://es.rockymountaincancercenters.com/breast-cancer/types-hormone-receptors>
- [6] Enfermedades transmisibles. (n.d.). Paho.org. Retrieved August 1, 2025, from <https://www.paho.org/es/temas/enfermedades-transmisibles>
- [7] Vadim et al. *Molecules*. 2015; 20:22000–22027.
- [8] Kowalski R., Falen S. *Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine*. 2nd ed. American Pharmacists Association. Estados Unidos (2004).
- [9] Yamil Chain, Luis Illanes. *Radiofármacos en Medicina Nuclear. Fundamentos y aplicación clínica*. Universidad Nacional de la Plata, Editorial de la Universidad de la Plata. (2015).
- [10] Marie Claire Cantone, Cristoph Hoeschen. *Radiation Physics for Nuclear Medicine*. Springer. Estados Unidos. (2011)
- [11] Epand, R. M., & Vogel, H. J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462(1–2), 11–28. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(99\)00198-4](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(99)00198-4)
- [12] Vilche, M., Reyes, A. L., Vasilskis, E., Oliver, P., Balter, H., & Engler, H. (2016). 68Ga-NOTAUBI-29-41 as a PET tracer for detection of bacterial infection. *Journal of Nuclear Medicine*, 57(4), 622-627.
- [13] Rodríguez-Decuadro, S.; Dans, P.; Borba, M.; Iseppon, A. Gene isolation and structural characterization of a legume tree defensin with a broad spectrum of antimicrobial activity. 2019. *Planta*. 250.

- [14] Osorio, J., Rosas, R. C., Vega, M. B., Reyes, A. L., Paolino, A., Menéndez, F., Vega-Teijido, M., Savio, E., Giglio, J., Cecchetto, G., & Terán, M. (2024). Peptide derived from plant defensins: A promising ^{68}Ga radiolabelled agent for diagnostic of infection foci in PET. *Chemical Biology & Drug Design*, 104(1), e14578. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14578>
- [15] Zare-Zardini, H., Saberian, E., Jenča, A., Ghanipour-Meybodi, R., Jenča, A., Petrášová, A., & Jenčová, J. (2024). From defense to offense: antimicrobial peptides as promising therapeutics for cancer. *Frontiers in Oncology*, 14, 1463088. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1463088>
- [16] Lu F, Zhu Y, Zhang G, Liu Z. Renovation as innovation: Repurposing human antibacterial peptide LL-37 for cancer therapy. *Front Pharmacol*. 2022 Aug 23;13:944147. doi: 10.3389/fphar.2022.944147. PMID: 36081952; PMCID: PMC9445486. 8
- [17] Roudi R, Syn NL, Roudbary M. Antimicrobial Peptides As Biologic and Immunotherapeutic Agents against Cancer: A Comprehensive Overview. *Front Immunol*. 2017 Oct 13;8:1320. doi: 10.3389/fimmu.2017.01320. PMID: 29081781; PMCID: PMC5645638.
- [18] Clinicaltrials.gov. (n.d.). Clinicaltrials.gov. Retrieved August 1, 2025, from <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02225366>
- [19] Correia J, Paulo A, Raposinho P, Santos I. Radiometallated peptides for molecular imaging and targeted therapy. *Dalton Trans*. 2011, 40, 6144-6167. <https://doi.org/10.1039/C0DT01599G>
- [20] Laverman P, McBride WJ, Sharkey RM, Eek A, Joosten L, Oyen WJ, Goldenberg DM, Boerman OC. A novel facile method of labeling octreotide with (^{18}F) -fluorine. *J Nucl Med*. 2010 Mar;51(3):454-61. doi: 10.2967/jnumed.109.066902. Epub 2010 Feb 11. PMID: 20150268; PMCID: PMC2908260.
- [21] Laverman, P., McBride, W. J., Sharkey, R. M., Goldenberg, D. M., & Boerman, O. C. (2014). Al (^{18}F) labeling of peptides and proteins: Al ^{18}F labeling of peptides and proteins. *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals*, 57(4), 219-223. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3161>
- [22] Terán, M., Osorio, J., Cardoso, E., Tejería, E., Paolino, A., Reyes, A. L., & Cecchetto, G. (2023). [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-HYNIC-EcgDf21: A defensin short analogue with potential application in infection foci imaging. *Chemical Biology & Drug Design*, 101(3), 593–604. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14149>
- [23] Rennen, H. J., Boerman, O. C., Koenders, E. B., Oyen, W. J., & Corstens, F. H. (2000). Labeling proteins with Tc-99m via hydrazinonicotinamide (HYNIC): optimization of the conjugation reaction. *Nuclear Medicine and Biology*, 27(6), 599–604. [https://doi.org/10.1016/s0969-8051\(00\)00134-7](https://doi.org/10.1016/s0969-8051(00)00134-7)
- [24] Meszaros, L. K., Dose, A., Biagini, S. C. G., & Blower, P. J. (2010). Hydrazinonicotinic acid (HYNIC) – Coordination chemistry and applications in radiopharmaceutical chemistry. *Inorganica Chimica Acta*, 363(6), 1059–1069. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2010.01.009>

[25] MCF7. (n.d.). <https://www.atcc.org>. Retrieved July 30, 2025, from <https://www.atcc.org/products/htb-22>

[26] Mda-Mb-231. (n.d.). <https://www.atcc.org>. Retrieved July 30, 2025, from <https://www.atcc.org/products/htb-26>

[27] Lee AV, Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 cells--changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *J Natl Cancer Inst*. 2015 Mar 31;107(7):djv073. doi: 10.1093/jnci/djv073. PMID: 25828948.

[28] MDA-MB-231 TGL: Human breast adenocarcinoma cell line. (n.d.). Memorial Sloan Kettering Cancer Center. Retrieved July 30, 2025, from <https://www.mskcc.org/research-advantage/support/technology/tangible-material/mda-mb-231-tgl-human-breast-adenocarcinoma-cell-line>