

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS



**“MARCACIÓN Y EVALUACIÓN
BIOLÓGICA DE TIO- β -D-GLUCOSAS
CON ^{99m}Tc COMO AGENTES DE IMAGEN
TUMORAL”**

María Romina Castelli Pedriel

Tutores:

Dr. Williams Porcal (Laboratorio de Química Orgánica, IQB, Facultad de Ciencias-
Facultad de Química, UdelaR).

Dr. Pablo Cabral (Departamento de Radiofarmacia, CIN, Facultad de Ciencias,
UdelaR).

ÍNDICE

I. Introducción	4
1.1 Medicina Nuclear	5
1.1.1 Imagenología Molecular	9
1.2 Radiofarmacia	10
1.2.1 Radiofármacos.....	10
1.2.2 Radiofármacos de terapia.....	11
1.2.3 Radiofármacos de diagnóstico.....	13
1.2.4 Química del Tecnecio.....	15
1.2.5 Radiofármacos de Tecnecio	18
II. Fundamentación	23
2.1 Radiofármacos derivados de Glucosa	24
2.1.1 ¹⁸ F ¹⁸ FDG.....	24
2.2 Cáncer	27
2.2.1 Incidencia y Mortalidad.....	29
2.2.2 Melanoma.....	29
2.3 Transportadores de Glucosa	33
2.3.1 En células tumorales.....	37
III. Antecedentes	39
IV. Objetivos	43
4.1 Objetivo general	44
4.2 Objetivos específicos	44
V. Materiales y Métodos	45
5.1 ^{99m}Tc-1-tio-β-D-glucosa	46
5.1.1 Síntesis Radioquímica	46
5.1.2 Caracterización biológica <i>in vitro</i> : captación celular.....	52
5.1.3 Caracterización biológica <i>in vivo</i>	53
5.2 ^{99m}Tc-Derivados de glucosa	55
5.2.1 Síntesis Orgánica.....	55
5.2.2 Síntesis Radioquímica	61
VI. Resultados y Discusión	63

6.1	^{99m}Tc-1-tio-β-D-glucosa	64
6.1.1	Síntesis Radioquímica	64
6.1.2	Caracterización biológica <i>in vitro</i> : captación celular	72
6.1.3	Caracterización biológica <i>in vivo</i>	74
6.2	^{99m}Tc-Derivados de glucosa	77
6.2.1	Síntesis Orgánica	77
6.2.2	Síntesis Radioquímica	87
VII.	Conclusiones	93
VIII.	Proyecciones	95
IX.	Bibliografía	97
X.	Abreviaturas	106
XI.	Agradecimientos	110

I. INTRODUCCIÓN

1.1 MEDICINA NUCLEAR

La Medicina Nuclear comienza su desarrollo como especialidad a finales de los años 40. A partir de ese momento se resuelve utilizar la energía nuclear con fines médicos. En 1946 se construye el primer reactor productor de radionucleidos, es por esto que es una fecha histórica en la cronología de la Medicina Nuclear en el mundo (Tabla 1).¹⁻³

Tabla 1. Cronología de la Medicina Nuclear.

Año	Desarrollo de la Medicina Nuclear en el mundo
1895	Descubrimiento de los Rayos X – Roenteng
1896	Descubrimiento de la radioactividad de uranio – Becquerel
1898	Descubrimiento de la radioactividad natural – Marie Curie
1913	Desarrollo del concepto de isotopía – Soddy
1923	Primera utilización de los trazadores en la exploración biológica – Hevesey
1927	Puesta a punto de un detector de radiaciones – Geiger y Müller
1931	Construcción del primer ciclotrón
1934	Descubrimiento radioactividad artificial – Curie y Joliot
1938	Primeros estudios de la fisiología de tiroides (¹³¹ I)
1939	Primeras aplicaciones terapéuticas
1946	Construcción del primer reactor de radionucleidos
1951	Construcción del Scanner con cristal de centelleo de yoduro sódico, permitiendo realizar las primeras gammagrafías – Reed y Libby
1952	Se sustituye el término “Medicina Atómica” utilizado hasta ese momento por el de “Medicina Nuclear”
1956	Desarrollo del Radio Inmuno Análisis
1962	Aparición de los generadores de ^{99m} Tc, con cualidades idóneas como trazadores y posibilidades de unión a diversos fármacos
1963	Construcción de la cámara de centelleo - Anger

A partir de la década del 60 el desarrollo de la Medicina Nuclear es constante. Siendo de gran importancia la puesta a punto en la década del 70 la técnica de Tomografía Computarizada de Emisión de Fotón Único (SPECT) cerebral y en la década del 80 la Tomografía de Emisión de Positrones (PET).

Según la *División para la Alta Educación e Investigación del Consejo de Europa, en las conclusiones de la reunión de 1984*, la Medicina Nuclear “es la especialidad médica que se dedica al diagnóstico, tratamiento, investigación y prevención de las enfermedades haciendo uso de sustancias radiactivas no encapsuladas y de las propiedades de los núcleos estables”.⁴ A su vez la *Organización Mundial de la Salud* la define como “ la especialidad médica que con fines asistenciales, docentes e investigadores, emplea las fuentes radiactivas no encapsuladas”. La Medicina Nuclear ofrece numerosas técnicas, tanto *in vivo* como *in vitro*, en donde la mayoría de ellas se relacionan estrechamente con aspectos funcionales y bioquímicos de la enfermedad.⁵⁻⁶

En cuanto a las áreas de aplicación de la Medicina Nuclear, las técnicas más comunes se centran en dos áreas médicas: diagnóstico y terapia.

Dichas técnicas de imagen son intrínsecamente moleculares, en donde su uso clínico en la actualidad se encuentra ampliamente extendido y aceptado.

Como características fundamentales, las técnicas de aplicación en Medicina Nuclear:

- No son invasivas, ya que generalmente basta con una inyección endovenosa y a diferencia de otras técnicas de diagnóstico no implica cirugía o introducción de aparatos en el cuerpo.
- Son funcionales debido a que no estudian solamente la morfología del organismo como sí lo estudian las técnicas estructurales (escáner, ecografía, resonancia magnética).
- No generan molestias durante la aplicación ya que la radiación, en sí, es indolora para el paciente.
- Manipulan dosis con bajos niveles de radiación pues las dosis de radiaciones, para el diagnóstico, son similares o inferiores a otras técnicas radiológicas y cada día tienden a ser menores.

Las radiaciones más útiles en la Medicina Nuclear en cuanto a diagnóstico, son los rayos gamma (γ), emisión de positrones (β^+) y los rayos X generados a partir de las emisiones secundarias de captura electrónica. En el plano terapéutico las emisiones β^- son las más utilizadas.

Las técnicas de obtención de imágenes consisten en administrarle al paciente determinado radiofármaco y efectuar la localización del emisor radioactivo dentro del organismo. La más usada para generar imágenes en Medicina Nuclear es la gammagrafía o centellograma, la cual se basa en la detección de la actividad de los rayos gamma emitidos por el radionucleido en los órganos a estudiar, manifestándose por medio de centelleos, proporcionando una imagen bidimensional. A modo genérico, la gammagrafía ayuda al diagnóstico de padecimientos que afectan la fisiología y la morfología de los órganos. En los últimos años las técnicas en Medicina Nuclear mejoran y se diversifican, las principales técnicas de aplicación en la actualidad se resumen en la Tabla 2.¹

Tabla 2. Principales técnicas de aplicación en Medicina Nuclear.

Gammagrafía Ósea	<p>Permite detectar mínimas alteraciones funcionales antes que se puedan ver con una radiografía.</p> <p>Se utiliza también para detectar lesiones provocadas por maltratos a menores</p>
Gammagrafía Pulmonar de Perfusión	<p>Se realiza para conocer la existencia de obstrucciones o trombos en las arterias.</p> <p>Método de diagnóstico para detección de embolia pulmonar</p>
Gammagrafía Renal	<p>Permite estudiar la morfología de los riñones y conocer el porcentaje de funcionalidad de cada uno de ellos.</p> <p>Generalmente se utiliza para detectar infecciones renales pediátricas.</p>

Gammagrafía Tiroidea	Se utiliza para observar la morfo-funcionalidad de la glándula tiroides, pudiéndose detectar aumento de tiroides y existencia de nódulos en su interior
PET	Permite la detección de la extensión de los tumores y la evaluación a respuesta de tratamientos (Radio o Quimioterapia)
Renograma Isotópico	Estudia el funcionamiento renal, destacando que es el único método no invasivo
SPECT Cardíaco	Evalúa la repercusión funcional de las alteraciones anatómicas y para seleccionar pacientes que deben someterse a un cateterismo
SPECT Cerebral	Detecta áreas del cerebro que no funcionan correctamente, se utiliza para diagnosticar enfermedad de Alzheimer, demencias y epilepsias.

La investigación clínica en la Medicina Nuclear ha realizado grandes avances en la dirección de la imagenología molecular y la terapia dirigida. En los últimos años, ha habido un crecimiento exponencial de nuevos agentes para imagen molecular.

1.1.1 IMAGENOLÓGÍA MOLECULAR

La imagenología molecular es la visualización, caracterización y medición de procesos biológicos a nivel celular y molecular en los seres humanos y en otros seres vivos. Incluye normalmente imágenes 2D ó 3D teniendo la posibilidad de cuantificar las variaciones que ocurren en el tiempo. Las técnicas usadas incluyen el Ultrasonido (ecografía), Tomografía Computarizada (CT), Resonancia Magnética (MRI), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), PET y la Imagenología óptica.⁷⁻⁸ Las mismas han hecho posible que el diagnóstico temprano sea una realidad cada vez más alcanzable.

Estos estudios tradicionales se basan fundamentalmente en propiedades físicas y fisiológicas como fuente principal de contraste para la detección y caracterización de las enfermedades. La imagenología molecular está basada sobre estas y otras técnicas imagenológicas como la Medicina Nuclear y la tomografía óptica con la ayuda del desarrollo de marcadores específicos como fuente de contraste.

Las técnicas imagenológicas utilizadas en Medicina Nuclear incluyen SPECT, PET y PET-CT.⁹⁻¹⁴ Estas técnicas son utilizadas para estudiar trastornos bioquímicos como ser señales tempranas de la enfermedad, sus mecanismos y asociación con estados patológicos (cáncer, enfermedades cerebrales, enfermedades cardiovasculares y trastornos mentales) y de esta forma poder encontrar un diagnóstico temprano y seguimiento de la eficacia del tratamiento seleccionado.

En la actualidad, están siendo investigadas en fase pre-clínica otras modalidades de imágenes como ser la bioluminiscencia (Técnica Óptica), imágenes de fluorescencia óptica de ultra alta resolución micro-PET y micro-CT. Los agentes radiomarcados para imágenes se denominan por lo general sondas o trazadores moleculares. Cuando se inyecta la sonda molecular en un paciente, se localiza la misma ya que esta puede quedar unida a la superficie celular, atravesar la membrana celular o encontrarse atrapada intracelularmente por unión o interacción específica a un determinado receptor o blanco molecular y luego ser detectada por una gamma cámara (mediante detección γ en un rango de 60-400 keV) o cámara de PET (mediante detección de fotones de 511 keV por aniquilación de positrones) (Figura 1).

Luego se procesa la información obteniendo imágenes de todo el cuerpo o del órgano en estudio, teniendo básicamente la imagen molecular dos aplicaciones: el diagnóstico y la terapia.

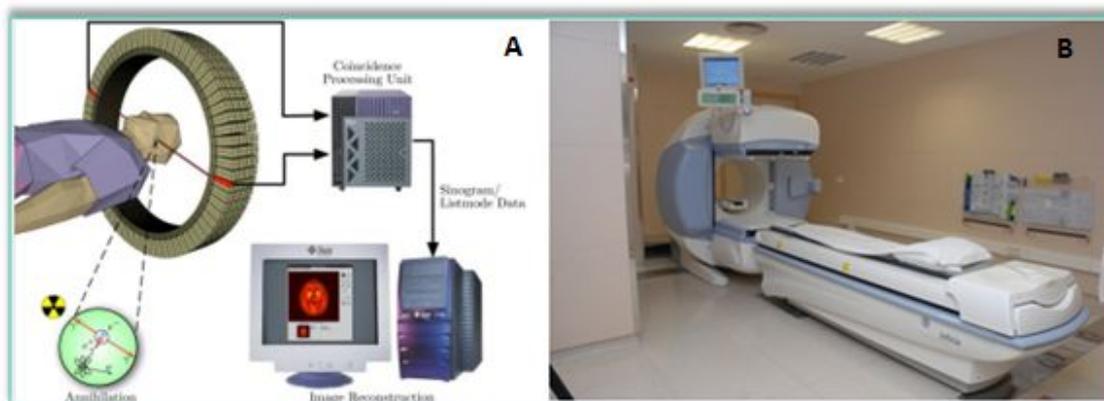


Figura 1. (A) Ilustración esquemática del funcionamiento de PET.¹⁴ (B) Imagen de una Gammacámara.

1.2 RADIOFARMACIA

La radiofarmacia es una especialidad de las ciencias farmacéuticas que se ocupa del diseño, producción, preparación, control de calidad y dispensación de los radiofármacos, tanto en su utilización en Medicina Nuclear – diagnóstica y terapéutica – como en investigación.¹⁵⁻¹⁶ Por lo cual involucra el estudio de aspectos farmacéuticos, físicos, bioquímicos y biológicos de los radiofármacos.

1.2.1 RADIOFÁRMACOS

Un radiofármaco puede definirse como una sustancia química que contiene átomos radiactivos en su composición y que por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de la radiación emitida, es adecuada para su administración en seres humanos con fines diagnósticos y terapéuticos.¹⁷ Un radiofármaco puede ser tanto un elemento radiactivo o que lo contenga a este en casos como a) solución de una sal inorgánica, b) suspensión de partículas, c) complejo de coordinación o d) molécula orgánica. La principal diferencia que tienen los fármacos con un radiofármaco, es que estos últimos no tiene efecto

farmacológico comprobable y si lo poseen, no se pone de manifiesto porque se utilizan en cantidades trazas en las cuales no se observa ninguna reacción dosis-respuesta.

Los radiofármacos se pueden clasificar en radiofármacos para terapia y radiofármacos para diagnóstico.¹⁵ Los radiofármacos de terapia son sustancias radiactivas que se administran a pacientes con el propósito de tratar afecciones malignas, haciendo uso de los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes. Los radiofármacos para diagnóstico son trazadores (sustancia química que contiene átomos radiactivos en su interior) radiactivos que se administran a pacientes con el fin de poder diferenciar un proceso bioquímico, anatómico o fisiológico normal de uno anormal, ya sea por técnicas de obtención de imágenes o de análisis de muestras.

1.2.2 RADIOFÁRMACOS DE TERAPIA

Los radiofármacos para el diagnóstico por imágenes son ampliamente utilizados y han tenido un rápido crecimiento en los últimos años en la terapia radionucleídica sistémica.¹⁸ La misma se basa en la radioterapia molecular (RTM) que es la captación selectiva del radiofármaco por una molécula “target”. Los radiofármacos para terapia tienen por objetivo destruir las células causantes de la enfermedad por acción de la radiación emitida por un radiofármaco administrado en forma sistémica. Las principales aplicaciones clínicas son: cáncer de tiroides, hipotiroidismo, paliación de metástasis ósea, radiovasectomía y radioinmunoterapia (RIT).

La energía y tipo de emisión de los radiofármacos para terapia deben correlacionarse con el tamaño, geometría y localización del tumor. Este tipo de radiofármacos deben presentar emisión de fotones y su radionucleido es un emisor beta (β). Una vez administrado sistemáticamente y localizado en la célula o zona patológica de interés, la energía cedida provoca el efecto terapéutico deseado, en donde la irradiación de otros órganos depende de la selectividad de captación y energía de emisión.

Debido que la RTM requiere de la administración de actividades significativamente más elevadas que para las aplicaciones diagnósticas, se exige un mayor número de requisitos:

elevada unión a la molécula “target” (alta pureza radioquímica (PRQ)), distribución uniforme en la molécula “target” en correlación con las propiedades físico-químicas, deseable presencia de emisión de fotones, irradiación mínima en órganos críticos, efectiva relación dosis biológica-respuesta, baja toxicidad, estabilidad “*in vitro*” e “*in vivo*”, estimación precisa de la dosimetría de la radiación y posibilidad de esquemas de reiteración de dosis (dosis múltiples), protección radiológica, etc. Siendo un radiofármaco constituido por tres componentes: molécula vector, radionucleido y una molécula que enlace a ambos. Para que la RTM tenga éxito, diversos parámetros físicos, fisiológicos y biológicos tienen que ser cuidadosamente estudiados con el fin de optimizar la elección de los radionucleidos. La elección del radionucleido está esencialmente relacionada con la dosis absorbida de radiación que debe ajustarse al efecto biológico deseado, es decir, entregar una dosis de radiación citotóxica y evitar la dosis de radiación innecesaria a los tejidos sanos cercanos.

La mayoría de los radionucleidos usados en RIT son emisores β aunque también pueden utilizarse emisores alfa y electrón Auger. Las partículas β son electrones emitidos desde el núcleo de un átomo inestable. El Yodo-131 (^{131}I) y el Ytrium-90 (^{90}Y) son los emisores β más usados en RIT.¹⁹⁻²² El Renio-186 (^{186}Re), Renio-188 (^{188}Re), Cobre-67 (^{67}Cu) y Lutecio-177 (^{177}Lu) son emisores β más recientemente considerados para la RIT. Estos radionucleidos difieren entre ellos con respecto a la vida media, la emisión o no de rayos γ y la energía de las partículas β (Tabla 3).

Tabla 3. Características físicas de diversos RN para terapia.

ELEMENTO	RADIONUCLEIDO	VIDA MEDIA (h)	EMISIÓN	RANGO MÁXIMO
Yodo	^{131}I	192.0	β/γ	2.4 mm
Lutecio	^{177}Lu	164.0	β	2.0 mm
Renio	^{186}Re	64.4	β/γ	5.0 mm
	^{188}Re	17.0	β/γ	10.0 nm
Cobre	^{67}Cu	61.9	β/γ	2.2 mm
Ytrium	^{90}Y	64.0	β	12.0 mm

1.2.3 RADIOFÁRMACOS DE DIAGNÓSTICO

Este tipo de radiofármacos está compuesto por un radionúclido emisor de radiación procedente del núcleo del átomo (gamma o positrones) unido a una molécula cuyo comportamiento biológico dentro del organismo es el adecuado para el estudio morfológico y funcional de un órgano o tejido.²³⁻²⁵ Luego de administrado el radiofármaco se distribuye en el paciente generalmente vía intravenosa, en donde la emisión radiactiva es medida externamente al paciente con un equipamiento adecuado existente en los servicios de Medicina Nuclear. El patrón de distribución de la actividad en el órgano en estudio, permite diagnosticar diversas patologías. Las características químicas y el comportamiento biológico dentro del organismo de cada radiofármaco confieren la especificidad al método. Su farmacocinética puede ser valorada en muestras biológicas de sangre y/u orina o bien mediante su visualización en imágenes desde el exterior del paciente, siendo el sistema utilizado para el diagnóstico, control y evolución de numerosas enfermedades. Algo a resaltar es que los elementos radioactivos que se emplean generalmente son de corta vida media, por lo que desaparecen del organismo al cabo de horas o días.

En las clínicas de Medicina Nuclear se usa de forma sistémica la administración de radiofármacos emisores gamma o de positrones, como herramienta de diagnóstico para obtener imágenes del cuerpo humano.²⁶ Siendo los radiofármacos emisores gamma los más utilizados en la práctica debido a la disponibilidad del radionucleido, la amplia variedad de radionucleidos y a la accesibilidad del hardware necesario. En la Tabla 4 se muestra una lista de los radionucleidos emisores gamma y de positrones más utilizados, siendo el isótopo más utilizado en Medicina Nuclear el ^{99m}Tc.

Para la elección de los radiofármacos de diagnóstico se debe tener en cuenta factores como el modo de decaimiento/emisión del radionucleido y energía/s del fotón, la vida media, la disponibilidad (producción y transporte al hospital) y costo. Además se debe tener en cuenta los procedimientos químicos que se deben realizar para la síntesis del radiofármaco de forma rápida, simple, estéril, libre de pirógenos, permitiendo que sea rutinaria y con los menores inconvenientes posibles. Los principales radiofármacos para diagnóstico y uso primario se detallan en la Tabla 5.

Tabla 4. Características físicas de diversos RN para diagnóstico.

ELEMENTO	RADIONUCLEIDO	VIDA MEDIA (h)	EMISIÓN
Tecnecio	^{99m}Tc	6.0	γ
Galio	^{67}Ga	78.3	γ
Talio	^{201}Tl	73.1	γ
Flúor	^{18}F	1.8	β
Yodo	^{131}I	192.0	β/γ
	^{123}I	13	γ

Tabla 5. Lista de radiofármacos de diagnóstico usados en Medicina Nuclear.²⁷

RADIONUCLEIDO	RADIOFÁRMACO	USO PRIMARIO
^{99m}Tc	^{99m}Tc -MDP	Imagen ósea
	^{99m}Tc -HDP	Imagen ósea
	^{99m}Tc -ECD	Imagen de perfusión cerebral
	^{99m}Tc -HMPAO	Imagen de perfusión cerebral
	^{99m}Tc -DMSA	Imagen renal
	^{99m}Tc -DTPA	Imagen renal y estudios funcionales
	^{99m}Tc -DISIDA	Imagen hepatobiliar
	^{99m}Tc -HIDA	Imagen hepatobiliar
^{67}Ga	^{67}Ga	Imagen de tejidos blandos y procesos inflamatorios
^{201}Tl	^{201}Tl	Imagen de perfusión miocárdica, paratiroidea y tumoral

^{18}F	^{18}F FDG	Imagen de metabolismo celular y utilización de glucosa como sustrato
^{131}I	^{131}I -MIBG	Imagen de neuroblastoma
	^{131}I -NP-59	Imagen adrenal
	^{131}I -yoduro de sodio	Imagen y terapia de captación en tiroides
^{123}I	^{123}I -yoduro de sodio	Imagen y terapia de captación en tiroides

1.2.4 QUÍMICA DEL TECNECIO

Los radiofármacos utilizados en diagnóstico deben reunir una serie de características básicas desde el punto de vista del radionucleido, del compuesto marcado y de las exigencias farmacéuticas. Es importante aprovechar al máximo la eficiencia de detección manteniendo la dosis absorbida por el organismo tan baja como sea posible para obtener la información buscada. Por lo tanto, los radionucleidos de elección, con excepción de los emisores de positrones, deben ser emisores gamma puros siendo los más aceptados los que decaen por transición isomérica (isómeros nucleares metaestables) o por captura electrónica. Se considera óptimo un radionucleido emisor gamma puro con una energía de 30 a 300 keV, y un período de semidesintegración corto pero que permita la preparación del radiofármaco y la toma de imágenes. El radioisótopo usado a nivel biomédico por excelencia es el $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

El tecnecio es el elemento número 43 de la tabla periódica y se encuentra en el grupo VII B, entre los elementos Mn y Re, con quienes comparte ciertas características.²⁸⁻³⁰ Presenta propiedades físicas altamente favorable, como su período de semi-desintegración de 6.04 horas, la ausencia de emisor β^- y su emisión gamma cuya energía es de 142 KeV. Es importante conocer que el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ decae a ^{99}Tc , el cual es un radionucleido emisor β^- , inestable, que presenta un período de semidesintegración de 2×10^5 años, lo cual no implica riesgo para el paciente (Figura 2). Presenta estados de oxidación que van desde -1 a +7, en

donde los estados inorgánicos más estables son el +7 (anión pertecneciato, TcO_4^-) y +4 (dióxido de tecnecio, TcO_2).

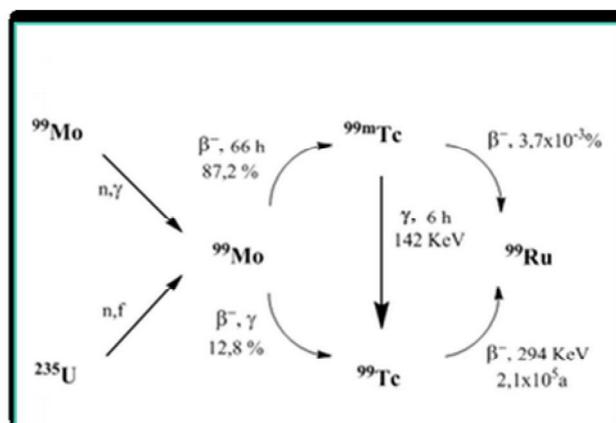


Figura 2. Esquema de generación y decaimiento de ^{99m}Tc .

El $^{99m}\text{TcO}_4^-$ es la especie más estable en solución acuosa, y es la forma química bajo la cual se obtiene el ^{99m}Tc fácilmente a partir del generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ bajo la forma de pertecneciato en solución estéril, libre de pirógenos y sin portador. Los métodos de separación del generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ pueden ser: extracción por solvente, sublimación y cromatográficos. Este último es el más utilizado en la actualidad debido a la obtención de alta actividad específica (definida como la radiactividad por unidad de masa o cantidad de materia (mol)). A su vez, los generadores cromatográficos de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ pueden ser de lecho seco o húmedo. La diferencia se encuentra que en el primero se seca la columna con vacío una vez terminada la elución, y en el segundo el Tc es eluido por un vial con vacío, pero la columna queda siempre húmeda ya que el reservorio del NaCl 0.9% está conectado al generador (Figura 3). Se deben realizar ciertos controles de calidad al eluido del generador, como ser: eficiencia de elución, perfil de elución, pureza química, pureza radionucleídica, pH del eluido, esterilidad y apirogenicidad.

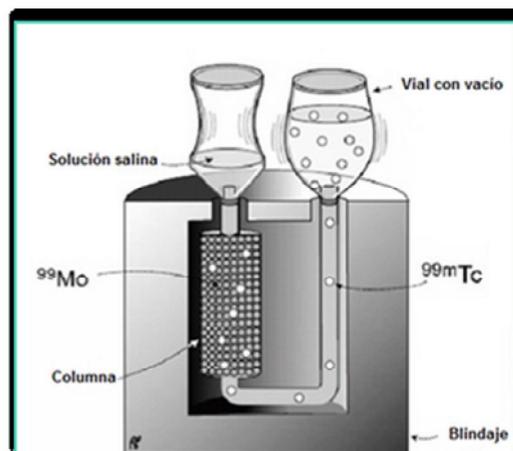


Figura 3. Esquema de un generador cromatográfico de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$.

La química del tecnecio es dominada por la formación de complejos en los cuales el metal deficiente de electrones actúa como aceptor de electrones provenientes de átomos o grupos funcionales capaces de donar una par de electrones. Para la reducción del pertechnetato el ion estannoso (Sn^{+2}) es el más utilizado para el marcado de radiofármacos con $^{99\text{m}}\text{Tc}$. El Sn^{+2} presenta baja toxicidad, buen poder reductor y obtención del marcado con buenos rendimientos. Se puede usar bajo la forma de haluro (cloruro o fluoruro) o de complejo con ligandos (como ser el gulcoheptonato, pirofosfato, tartrato). En el preparado final pueden encontrarse por lo menos tres especies radiactivas del $^{99\text{m}}\text{Tc}$: en mayor proporción el compuesto de interés marcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, luego las fracciones libres de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ e hidrolizable $^{99\text{m}}\text{TcO}_2^-$, las cuales son indeseables ya que disminuyen el porcentaje de marcación. Para que esto no suceda es necesario diseñar formulaciones y metodologías de marcación que aseguren su reducción a un nivel mínimo para que no interfieran significativamente en el procedimiento diagnóstico. Es por esto que para la preparación de un juego de reactivos es necesario la adición de una solución de SnCl_2 en medio ácido sobre la molécula de interés, junto a otros componentes de la formulación y sustancias estabilizantes como ser el ácido genticico y ácido ascórbico a un determinado pH.

Otra causante de formación de impurezas, es la radiólisis, que es el fenómeno de formación de radicales libres debido a la radiación. Dicho fenómeno puede disminuir la concentración del ion estannoso en el medio de reacción y a su vez generar interacción entre los radicales y

el complejo de ^{99m}Tc -ligando, provocando la liberación del ligando y la reoxidación del tecnecio.

1.2.5 RADIOFÁRMACOS DE TECNECIO

El ^{99m}Tc fue seleccionado para la investigación de moléculas marcadas con aplicación biomédica por sus propiedades físicas altamente favorable, como su período de semidesintegración de 6,04 horas, la ausencia de emisor β^- y su emisión gamma cuya energía es de 142 keV. Esto permite la administración de dosis del orden de mCi (mili Curie) sin que signifique una dosis de radiación significativa para el paciente.³¹ A su vez, los fotones gamma de 142 keV penetran los tejidos, siendo detectados con alta eficiencia por los detectores de Na(Tl) (presentes en la gamma cámara o equipo SPECT) y permiten la obtención de imágenes centellográficas con buena resolución. Estas características lo hacen óptimo para un procedimiento diagnóstico según el principio de "ALARA", el cual postula que se debe aprovechar al máximo la eficiencia de detección, manteniendo la dosis de radiación absorbida por el organismo tan baja como sea posible para obtener la información buscada.³³⁻³⁴

A los radiofármacos de ^{99m}Tc se le realizan una serie de controles para evaluar su calidad, los cuales se clasifican en: físicos y fisicoquímicos, químicos y biológicos. Dentro de los controles físicos y fisicoquímicos, se encuentran los controles que se deben realizar durante la marcación, como ser el aspecto visual, en donde se debe verificar la ausencia de partículas en solución y espuma, verificar transparencia o color según corresponda. Se debe controlar el número y tamaño de las partículas en el caso de suspensiones, soluciones coloidales, macroagregados y microesferas; se debe determinar la cantidad de radiactividad presente en una preparación. Se debe controlar pH e isotonicidad, para su posible administración vía endovenosa o intrarraquídea, es importante determinar el pH para conocer la estabilidad del radiofármaco.

A su vez se debe controlar la pureza radionucleídica (PRN) del radiofármaco, la cual se calcula como: $\% \text{ PRN} = (\text{Act RN}) / (\text{Act Total}) \times 100$, en donde para trabajar con material radiactivo en cualquier ámbito, ya sea clínico o pre-clínico debe ser mayor a 99%, dicha

exigencia debe ser controlada por proveedor del radionucleido. Las impurezas radionucleídicas pueden deberse a la presencia de radioisótopos de un mismo elemento, como radionucleidos de diferentes elementos. Por ejemplo el ^{99}Mo es una impureza radionucleídica en solución de $^{99\text{m}}\text{Tc}$, por lo general se generan según el método de producción del radionucleido o debido a una separación incompleta de padre-hijo.

Los controles químicos son: pureza química y pureza radioquímica. El control de la pureza química se basa en determinar especies indeseables ya sea en el radionucleido o en el radiofármaco. La pureza radioquímica es el porcentaje de la actividad del RN en la forma química establecida en relación con la actividad total de dicho RN (en radiofármacos inyectables >90% y soluciones-cápsulas >95%). Se busca determinar la posible presencia de reacciones competitivas o descomposiciones químicas ya sea mediante controles cromatográficos (HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia), ITLC-SG (Cromatografía Instantánea en Capa Fina – Sílica Gel) o papel) o por gel permeación. La presencia de $\text{TcO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y de TcO_4^- libre en el preparado, constituyen las impurezas radioquímicas, las cuales son muy importantes ya que presentan patrones de biodistribución distintos al radiofármaco deseado, interfiriendo en la calidad de la imagen y en la interpretación diagnóstica.

Entre los controles biológicos se encuentran: esterilidad, apirogenicidad y biodistribución en animales de laboratorio. Los controles de esterilidad se realizan para observar presencia/ausencia de microorganismos viables, por lo cual se procede a filtrar la solución. La apirogenicidad se controla por el test de endotoxinas bacterianas, se debe trabajar con soluciones estériles y preparadas recientemente, con reactivos de alta pureza y material libre de pirógenos y una correcta manipulación. Los controles de biodistribución en animales de laboratorio sirven para evaluar la PRQ. Para el establecimiento y eficacia de agente diagnóstico, para determinar su potencial uso en humanos a partir de modelos biológicos, siempre teniendo en cuenta la anatomía y fisiología del mismo para elección del modelo.³⁵⁻³⁷

Los radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pueden clasificarse en: radiofármacos de primera, segunda y tercera generación (Figura 4).³⁷

- Los **radiofármacos de primera generación** son moléculas simples marcadas con ^{99m}Tc para determinar funciones básicas e inespecíficas. Presentan simple absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME). El marcado es realizado por reducción directa. (Posibles radiofármacos ^{99m}Tc : S-coloidal (hepato biliar), MDP (óseo), DTPA (renal)).

- Los **radiofármacos de segunda generación** son compuestos que fueron diseñados tomando en consideración los conocimientos acerca de la química del Tc y la relación estructura-actividad, para optimizar la marcación. (Posibles radiofármacos ^{99m}Tc : MIBI (miocardio), HMPAO y EC (cerebral)). La segunda generación de radiofármacos emergió en la década de los 80's como resultado del desarrollo de compuestos que tenían un radiometal unido con ligantes y con una geometría bien definida, como los complejos Tc(V)-oxo. Su biodistribución se establecía por sus características fisicoquímicas como tales como carga total, peso molecular, forma y lipofilia. De este trabajo surgió el concepto de agentes quelantes bifuncionales (AQBF), que son ligantes que no sólo enlazan al radiometal, sino que también pueden unirse por otro extremo de la molécula a receptores biológicos. El concepto fue expandido en los años 90 para incluir el acoplamiento de radiometales con fragmentos bioactivos usando AQBF y se iniciaron así los estudios en el diseño de radiofármacos de tercera generación.

- Los **radiofármacos de tercera generación** son compuestos que imitan un sustrato bioquímico y su diseño requiere el desarrollo de nuevas estrategias de marcado que apunten al mantenimiento de la actividad biológica. (Posible radiofármacos ^{99m}Tc : HYNIC). Los radiofármacos diagnósticos de tercera generación se utilizan en medicina nuclear para obtener imágenes de blancos moleculares específicos, y son únicos en su capacidad para detectar *in vivo* sitios bioquímicos determinados tales como receptores y enzimas. El AQBF de encuentra ubicado entre el radionúclido y la molécula blanco, este coordina firmemente al ión metálico y está covalentemente enlazado con la molécula específica del receptor de forma directa o con una molécula de unión. El fragmento bioactivo sirve como un transportador que lleva al radionúclido al sitio receptor en las células o moléculas blanco. Las moléculas bioactivas específicas de los receptores que pueden ser fracciones de

anticuerpos, péptidos, péptido miméticos, análogos de ADN, aminoácidos y carbohidratos entre otros.

La investigación básica en biología molecular, ha llevado a una comprensión de los mecanismos fundamentales de los procesos biológicos asociados a las enfermedades en los niveles molecular y celular y en consecuencia, hay cientos de moléculas que podrían considerarse posibles “targets” moleculares. Los “targets” moleculares, a menudo se expresan diferencialmente, por ejemplo, muestran un nivel significativamente incrementado de expresión tanto en tejido tumoral como sano ofreciendo un espectro de posibilidades para estudiar nuevas biomoléculas-“targets”.

La captación selectiva del radiofármaco por un “target”, utilizando un vehículo molecular, que es localizado sobre la superficie de la célula o es acumulado dentro de ella, podría considerarse basada en dos mecanismos principales: (i) receptores específicos extracelulares de superficie y (ii) procesos metabólicos intracelulares o captación metabólica. Biomoléculas específicas de receptor de superficie extracelular son en su mayoría anticuerpos monoclonales, sus fragmentos y péptidos y hormonas. Algunos procesos metabólicos de captación selectiva de radiofármacos son: a) ^{131}I (ya que la tiroides requiere aproximadamente 1 mg de yodo por semana, el ^{131}I es rápidamente incorporado), b) ^{89}Sr en forma de cloruro, que se captado por la matriz mineral ósea y es selectivamente concentrado en zonas de actividad osteoblástica con un comportamiento biológico que asemeja al del calcio y bifosfonatos radiomarcados que también son captados por la matriz mineral ósea y c) moléculas que siguen rutas metabólicas y se asocian con el metabolismo no controlado de proliferación celular: carbohidratos, aminoácidos y nucleótidos.

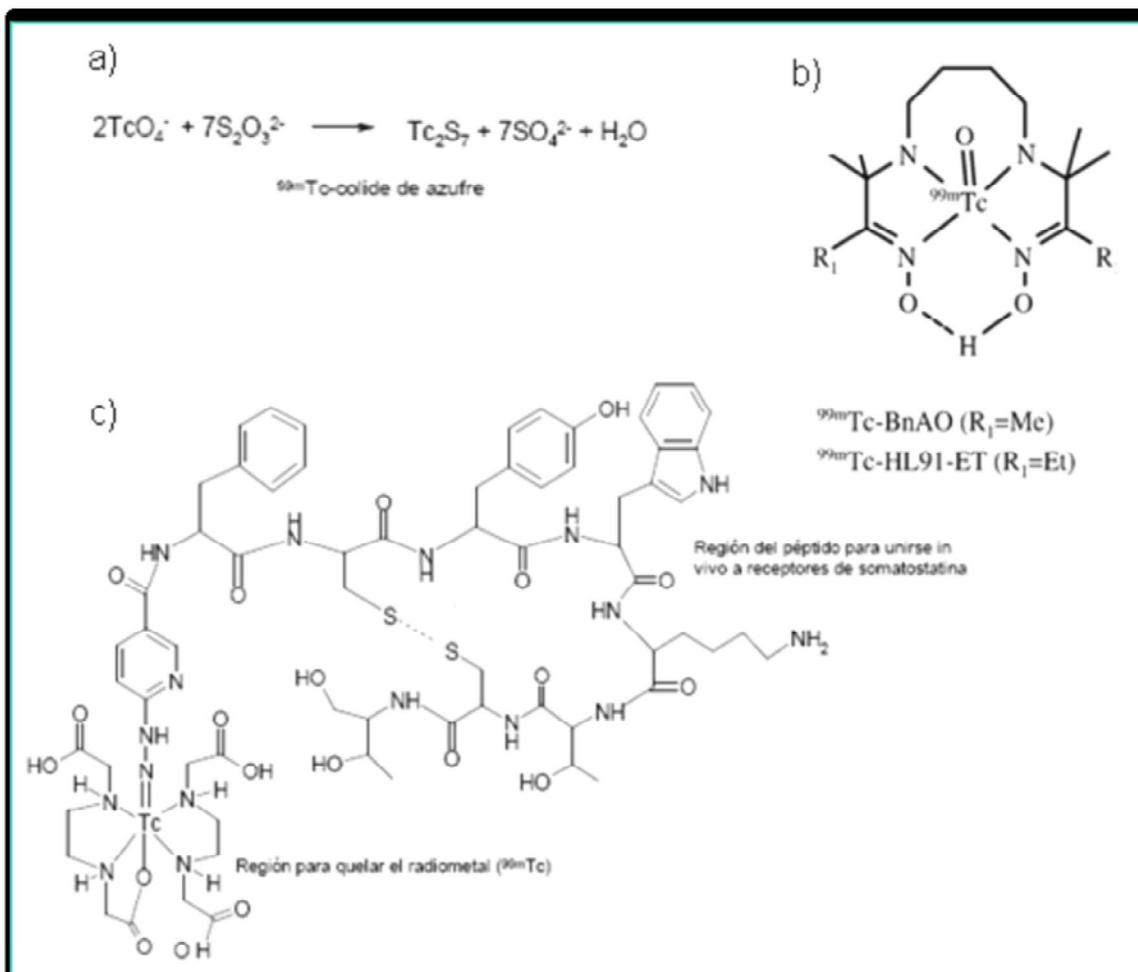


Figura 4. (a) Representación esquemática de radiofármacos de primera generación, (b) segunda generación y (c) tercera generación.

II. FUNDAMENTACIÓN

2.1 RADIOFÁRMACOS DERIVADOS DE GLUCOSA

La propuesta llevada a cabo en el presente trabajo involucró la investigación y el desarrollo de nuevos potenciales radiofármacos de diagnóstico oncológico basados en una propiedad biológica particular que presentan los tumores: el aumento del metabolismo glucídico y el consecuente incremento en el consumo de glucosa.³⁸⁻⁴³ Esto provoca que las células tumorales sobreexpresen las proteínas transportadoras de glucosa presentes en las membranas celulares de modo de internalizar altas cantidades de glucosa para satisfacer sus altas demandas metabólicas. Además emplean un metabolismo preferentemente anaeróbico que incrementa la acción de las proteínas transportadoras de glucosa. También se ha observado que los niveles y actividad de hexoquinasa en las células tumorales son superiores que los de las células normales, y que la tasa de metabolismo de la glucosa, especialmente la glicólisis, es más intensa que en las células normales. Son estas propiedades que permitieron proponer el diseño de un trazador tumor-específico que pueda acumularse en éste para permitir su detección.

2.1.1 ¹⁸FDG

El uso de ¹⁸FDG (2-deoxi-2-¹⁸F-D-glucosa), un derivado de D-glucosa, con PET es uno de los radiofármacos de mayor uso para la detección oncológica en clínicas de Medicina Nuclear.⁴⁴⁻⁴⁶ Es uno de los radiofármacos PET más importantes, no solo por su uso en diversas patologías, sino también por sus características metabólicas y sintéticas (Figura 5). La ¹⁸FDG se utiliza para el estudio del metabolismo de la glucosa en pulmones, corazón y cerebro; también su uso se enfoca en el diagnóstico, estudio metabólico y monitorización de tratamiento contra el cáncer, especialmente en cáncer colorrectal, linfoma (Hodgkin), linfoma no-Hodkin, cáncer de mama y melanoma (dependiendo estadificación y recurrencia).⁴⁷⁻⁴⁹

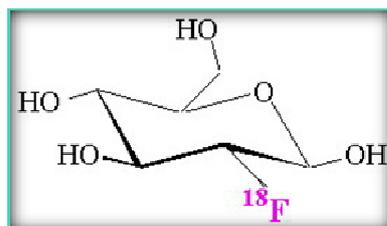


Figura 5. Radiofármaco PET ^{18}F FDG

Tanto la glucosa como la ^{18}F FDG atraviesan rápidamente y fácilmente la barrera hematoencefálica. Luego del ingreso en la célula, ambas moléculas son fosforiladas a nivel del hidroxilo en el carbono 6 (C-6), por la enzima hexoquinasa iniciando la vía glicolítica (Figura 6).⁵⁰ El siguiente paso es la isomerización por acción de la enzima glucosa-6-fosfato isomerasa para la formación de fructosa-6-fosfato (ya que esta molécula se encuentra en forma de ciclo, requiere la apertura del anillo, luego la isomerización y finalmente el cierre del nuevo anillo furanosa). El grupo hidroxilo posicionado en C-2 es fundamental para que pueda llevarse a cabo la isomerización por la acción de la glucosa-6-fosfato isomerasa. La ^{18}F -2-deoxiglucosa-6-fosfato carece de dicho grupo funcional, por lo que no es un buen sustrato para esta enzima. Por lo cual, la ^{18}F FDG sufre únicamente el primer paso de la vía glicolítica, por lo tanto la molécula queda retenida en el interior celular al no poder ser metabolizada.

La reacción de desfosforilación de los derivados fosforilados (glucosa-6-fosfato y ^{18}F -2-deoxiglucosa-6-fosfato) es catalizada por la enzima glucosa-6-fosfatasa, cuya actividad es significativa en el hígado, dado que este órgano no emplea glucosa como fuente principal de energía y es además el encargado de regular la concentración de glucosa en sangre liberando la glucosa obtenida en la reacción de defosforilación referida.

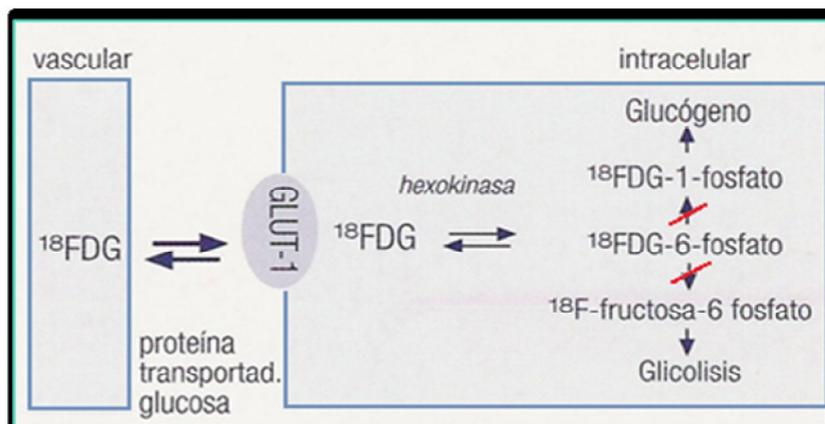


Figura 6. Esquema de metabolización de ^{18}F DG

La hexoquinasa tiene una elevada afinidad por la glucosa y es inhibida por el producto de la reacción que cataliza. La ^{18}F DG entra en la célula y queda en su interior por atrapamiento metabólico mediante conversión a ^{18}F DG-6-fosfato, lo cual impide su difusión atravesando la membrana celular. Cuando esta molécula se encuentra en la forma fosforilada, no puede ser metabolizada, por lo que el resultado final del proceso es el acumulo progresivo del derivado fosforilado en el interior de la célula.

Debido a lo mencionado anteriormente, la ^{18}F DG es utilizada como un marcador del metabolismo glucídico celular y es por ello que se utiliza como radiofármaco en el estudio oncológico.

En las células tumorales, la concentración de ^{18}F DG es un reflejo del aumento del metabolismo glucídico para mantener una elevada tasa de crecimiento y/o proliferación. La necesidad de ATP para los procesos anabólicos referidos se traduce en un incremento de la captación de glucosa. Por lo tanto, la utilización de la ^{18}F DG en oncología se fundamenta en la observación de que las células tumorales muestran una glicólisis aumentada, debido al incremento en el número de transportadores de membrana para la glucosa (GLUT-1 y GLUT-9) debido al incremento de la expresión de sus genes. Otra causa de la glicólisis aumentada es el incremento de la actividad de varias enzimas de la vía glicolítica ya sea por modificaciones alostéricas como por intensificación de la expresión de sus genes. A su vez la degradación de la glucosa en las células tumorales tiene lugar mediante una vía anaeróbica, en la que el rendimiento energético es de 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa,

mientras que mediante la oxidación aeróbica de la glucosa a CO_2 y H_2O se obtienen 38 ATP. El motivo de que la célula tumoral utilice preferentemente el metabolismo anaeróbico (a pesar de su menor rendimiento energético) se debe fundamentalmente a la velocidad con que se obtiene la energía en uno y otro caso, siendo ésta casi 100 veces mayor en la fermentación que en el catabolismo oxidativo. Es por ello y siempre que el aporte del sustrato energético sea suficiente, las células tumorales en crecimiento compensan el menor rendimiento energético del proceso anaeróbico con su mayor velocidad, siendo el consumo de glucosa es muy elevado.

El empleo de la ^{18}F FDG en imagenología molecular se encuentra limitado por distintos factores. Por un lado por la necesidad de contar con un ciclotrón de modo de producir los radionucleidos emisores de positrones utilizados en PET y además porque éstos poseen periodos de semidesintegración muy cortos lo que hace que los tiempos de síntesis del radiofármaco se acorten. La producción de un radiofármaco PET además conlleva un alto costo en comparación con la síntesis de radiofármacos emisores gamma utilizados en la técnica de SPECT. En este sentido, en los últimos años han sido descritos en la literatura varios derivados de glucosa marcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ con el objetivo de desarrollar un equivalente a ^{18}F FDG como radiofármaco SPECT para diagnóstico oncológico.

2.2 CÁNCER

El cáncer abarca una gran diversidad de enfermedades que pueden ocurrir en cualquier sistema de órganos en todo el reino animal. El cáncer es una enfermedad genética que se origina a partir de una mutación somática.⁵¹ Las células de varios tipos de cánceres presentan una anomalía en la secuencia de su ADN, que las distingue de las células normales circundantes al tumor. A su vez, muchos de los agentes causantes de cáncer (carcinógenos químicos, radiaciones ionizantes y virus) también provocan cambios genéticos. De esta forma, la carcinogénesis (generación de cáncer) se relaciona con la mutagénesis (producción de un cambio de en la secuencia del ADN). Las células cancerosas se caracterizan por dos propiedades hereditarias, ellas y su progenie: 1) se reproducen a pesar de las restricciones normales y 2) invaden y colonizan regiones normalmente reservadas para otras células.

Estas dos características hacen que las mismas sean especialmente peligrosas. Si la proliferación de estas células es mayor que las células normales y está fuera de control, se producirá un tumor o neoplasma (masa de células anormales que crece de forma inexorable). Se denomina tumor benigno cuando las células neoplásicas se encuentran agrupadas en una masa única y tumor canceroso (maligno) cuando las células tienen la capacidad de invadir el tejido circundante. De esta forma entran en el torrente sanguíneo o en los vasos linfáticos, formando tumores secundarios o metástasis en otros lugares del cuerpo.

Los cánceres se clasifican de acuerdo al tejido y al tipo celular a partir del cual se originan. Los tumores sólidos que derivan de células epiteliales se denominan carcinomas y los que derivan de tejido conjuntivo o de fibras musculares se denominan sarcomas. En otra categoría se encuentran tumores líquidos que incluyen leucemia que surge de células hematopoyéticas y linfomas que surgen de las células del sistema inmunitario.

Cada cáncer tiene algunas características que reflejan su origen. Como por ejemplo, las células de un carcinoma de células basales epidérmicas, derivadas de una estirpe de células queratinocíticas de piel, generalmente continúan sintetizando filamentos de células queratinocíticas de piel. Mientras que las células de un melanoma, derivadas de una célula pigmentaria de la piel, a menudo continuarán produciendo gránulos de pigmento. El carcinoma de células basales, sólo es invasivo de forma local y raramente produce metástasis, mientras que el melanoma, si no es extirpado en una etapa temprana, es mucho más maligno y produce un número mucho mayor de metástasis.

Un tumor se produce a partir de una sola célula anormal la cual transfiere su anomalía a su progenie, en donde ésta debe ser hereditaria. Para comprender el cáncer hay que descubrir si la anomalía hereditaria es debido a un cambio genético o si el cambio genético es debido a agentes causantes de cáncer.

2.2.1 INCIDENCIA Y MORTALIDAD

En los últimos años la incidencia y mortalidad del cáncer ha ido incrementando tanto a nivel mundial como en Uruguay. Según los datos reportados por la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer el 24,8% de las muertes en Uruguay se deben al cáncer.⁵² Un tipo de cáncer que ha tomado particular interés es el melanoma, el cual ha presentado un incremento notable en la incidencia de esta enfermedad y a su vez es conocido como uno de los tumores más agresivos en los seres humanos. Es por estos motivos que es un problema serio para la salud en varios países del mundo, sobre todo en la raza blanca en las áreas de alta exposición al sol.⁵²⁻⁵³ Cabe destacar que en Uruguay también se ha observado un incremento en la incidencia y mortalidad, principalmente en mujeres. Este cáncer da cuenta del 4% de todos los cánceres de piel, sin embargo es el responsable de la mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer de piel debido a que es la forma más agresiva de este tipo de cáncer.⁵⁴⁻⁵⁶ Representa entre un 4-5 % de los tumores malignos en los países desarrollados y es muy frecuente en jóvenes. Consiste en una transformación maligna de los melanocitos, los melanomas confinados a la epidermis son curables con una supervivencia mayor de 95% a los 5 años. Sin embargo, pacientes con tumores primarios mayores de 4 mm de grosor tienen una tasa de supervivencia del 50%. Por lo tanto, a menos que los tumores sean detectados en estadios tempranos la enfermedad presenta un muy mal pronóstico. Por lo tanto la identificación precoz y resección del melanoma primario ofrecen las mejores posibilidades de cura, mientras que el melanoma metastásico es casi siempre fatal.

2.2.2 MELANOMA

El melanoma es una proliferación neoplásica maligna de los melanocitos. Por lo general los melanomas primarios se originan de *novo*, solamente entre un 15-20 % de los melanomas se originan a partir de melanomas preexistentes.⁵³ Si no es extirpado en una etapa temprana genera más rápida metástasis que el carcinoma de células basales, que sólo es invasivo de forma local y raramente produce metástasis.⁵¹

2.2.2.1 CLASIFICACIÓN

El melanoma puede clasificarse según sus características macroscópicas en cuatro patrones de crecimiento:

- **Melanoma de extensión superficial (MES):** es plano e irregular en forma y color, con sombras variables de negro y marrón. Este tipo de melanoma es el más común y puede manifestarse a cualquier edad y en cualquier región del cuerpo, siendo más frecuente en la raza blanca (Figura 7).



Figura 7. Melanoma de extensión superficial en la pared anterior del abdomen.

- **Melanoma léntigo maligno (LMM):** las áreas de piel anormal son grandes, planas y de color bronceado con manchas marrones entremezcladas. Ocurre comúnmente en la piel dañada por el sol en la cara, el cuello y los brazos, apareciendo generalmente en las personas de edad avanzada (Figura 8).



Figura 8. Melanoma Léntigo maligno en la cara de una persona del sexo femenino de edad avanzada.

- **Melanoma lentiginoso arcal (MAL):** Generalmente inicia como una mancha de color desigual y bordes irregulares. Se localiza en las palmas de las manos, las plantas de los pies o por debajo de las uñas y es más común en la raza negra. Este tipo de melanoma es la forma menos común. Es agresivo y rápidamente genera ulceración y metástasis en corto tiempo (Figura 9).



Figura 9. Melanoma lentiginoso arcal en el primer dedo del pie.

- **Melanoma nodular (MN):** presenta un área elevada de color azul-negro oscuro o rojo-azulado o incoloro. La diseminación metastásica es rápida. Puede aparecer en cualquier localización y siendo más frecuente en el sexo masculino (Figura 10).



Figura 10. Melanoma nodular en la cara de una persona de sexo masculino.

2.2.2.2 FACTORES DE RIESGO

Debido al aumento en la incidencia de melanoma maligno en la población, se ha intentado identificar los factores de riesgo asociados al mismo. El melanoma es una enfermedad compleja que muestra diferencias entre los grupos étnicos. Varios estudios señalan que tanto las influencias genéticas como las ambientales incrementan los casos de melanoma.⁵⁵ El sol es la principal fuente de las radiaciones ultravioletas (UV), estas pueden atravesar la capa de ozono y ponerse en contacto con la piel, generando de este modo daños agudos y crónicos, acumulativos e irreversibles. De este modo la exposición al sol es un factor de riesgo que se va incrementando con el tiempo, observándose una mayor frecuencia en mujeres de todas las edades. A su vez las personas con antecedentes familiares de melanoma, el cabello rubio o rojo, la piel clara, pecas en la parte superior de la espalda y marcas de nacimiento, tienen estrecha relación con dicha patología, es por esto que hay que tener extremas precauciones ante la exposición solar.

2.2.2.3 INCIDENCIA Y MORTALIDAD

El melanoma representa el 4% de todos los tumores malignos de la piel, siendo este el más maligno debido a su alto poder metastásico. Es el responsable del 80% de todas las muertes por cáncer en la piel. En los países desarrollados representa entre un 4-5% de los tumores malignos, presentándose frecuentemente en los jóvenes. La supervivencia a 5 años en estadio I es de 93% y en el estadio IV la supervivencia es del 11%. La mortalidad a nivel mundial de este tipo de cáncer es de 0,56 en 100.00 en mujeres y 0,75 por 100.000 en hombres.⁵² El melanoma es el ejemplo más claro de cáncer en donde la detección temprana del mismo juega un rol fundamental en la supervivencia, debido que los pacientes con diagnóstico en los estadios más tempranos tienen una probabilidad del 100% de sobrevivir de su enfermedad. Opuesto a los que sucede en pacientes que se detecta el melanoma en estadios avanzados en los cuales la enfermedad presenta un muy mal pronóstico. Por lo tanto la identificación precoz y resección del melanoma primario ofrecen las mejores posibilidades de cura, mientras que el melanoma metastásico es casi siempre fatal.⁵⁵ Se han empleado varias modalidades de imagen en el melanoma, teniendo un rol importante la linfocentellografía y la biopsia del ganglio centinela así como el PET-CT con ¹⁸FDG

proporcionando información en el manejo del melanoma cutáneo. Las distintas modalidades de imagen poseen roles complementarios dependiendo de la situación clínica. La ^{18}F FDG no es específica de melanoma, determinando su rol en pacientes de alto riesgo de metástasis a distancia y para la evaluación de enfermedad recurrente, como se ha mencionado anteriormente.⁵⁶⁻⁵⁸ Es así que sería deseable el desarrollo de nuevas modalidades de imágenes moleculares específicas, adaptadas para la evaluación *in vivo* y no invasiva de pacientes con melanoma en el diagnóstico de extensión lesional y monitoreo terapéutico.

2.3 TRANSPORTADORES DE GLUCOSA

La glucosa es el sustrato principal utilizado por las células para la producción de energía, por lo cual es comprensible su importancia para la vida, ya sea en la fisiología celular normal o en condiciones de enfermedad. Por lo tanto un punto clave es el estudio del metabolismo de la glucosa para su ingreso en el interior de las células, para ello requiere de proteínas transportadoras en la membrana celular. Los dos sistemas de transporte para la glucosa y otros monosacáridos son: los transportadores de sodio y glucosa llamados SGLTs y los transportadores de glucosa llamados GLUTs.⁵⁹⁻⁶¹

La diferencia fundamental entre estos dos tipos de transportadores es su dependencia en el uso de energía para realizar el transporte, en el caso de los GLUTs el mismo se realiza a través de un mecanismo de energía independiente, mientras que los SGLTs aprovechan el transporte del ion sodio (Na^+) a favor de su gradiente de concentración para generar una corriente electroquímica que produce cambios conformacionales necesarios para la translocación de la glucosa a través de la membrana plasmática.

Se han identificado seis transportadores SGLTs (SGLT 1, SGLT 2, SGLT 3, SGLT 4, SGLT 5 y SGLT 6), que se diferencian en aspectos tales como la afinidad por la glucosa y el sodio, el grado de inhibición frente a la florizina, la capacidad para transportar glucosa o galactosa y la ubicación tisular.⁶² Los transportadores SGLTs presentan conformación secundaria similar constituida por catorce dominios transmembranales en orientación alfa-hélice (Figura 11).⁶³

Los SGLT 1 y SGLT 2 se localizan en el intestino delgado y en la nefrona proximal, cumpliendo con la función de absorción de nutrientes y reabsorción de glucosa respectivamente. Ambos transportadores efectúan un transporte acoplado con Na^+ . Por el SGLT 1 ingresan a la célula 2 moléculas de Na^+ , 1 de glucosa y 260 moléculas de agua y por el SGLT 2 ingresa 1 molécula por molécula de glucosa.

El SGLT 3 se cree es un sensor de glucosa, presenta baja afinidad por la glucosa y estudios recientes han demostrado que no transporta glucosa. Este transportador se localiza en la membrana plasmática de las neuronas colinérgicas, del tejido muscular liso y estriado.⁶⁴

El SGLT 4 se encuentra en el intestino y riñón, posee actividad transportadora de glucosa. El SGLT 5 se encuentra fundamentalmente en el intestino delgado y riñón, aún no se conocen cuales son los sustratos a transportar. El SGLT 6 presenta gran homología con SGLT 1 y a su vez es un transportador multivitamínico.⁶⁵

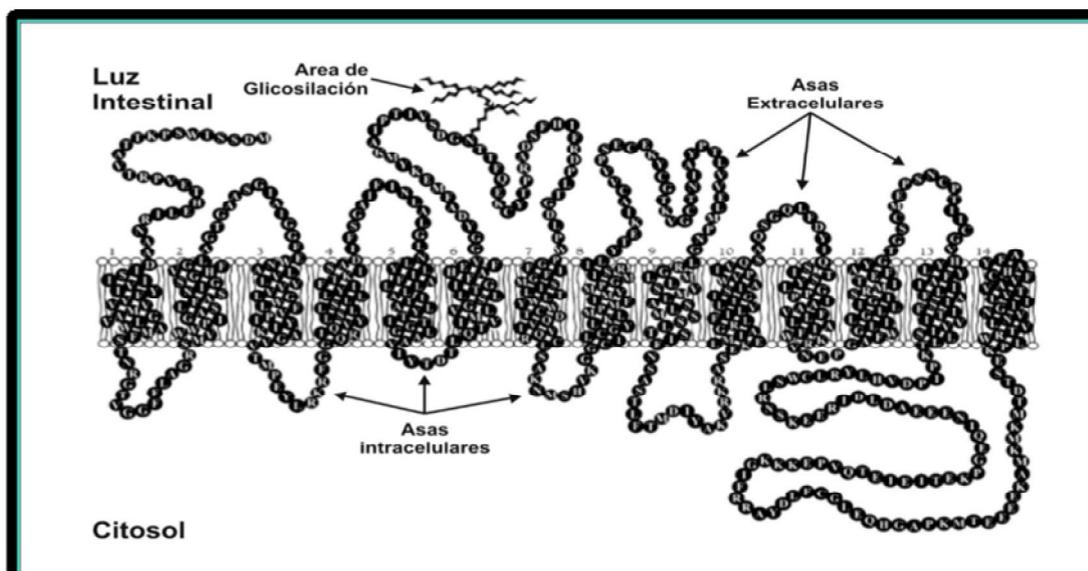


Figura 11. Organización del transportador SGLT 1, en forma de 14 alfa-hélice que cruza la membrana plasmática la misma cantidad de veces.⁶³

Los transportadores GLUTs están encargados del ingreso de los monosacáridos a todas las células del organismo. Se han identificado catorce tipos, enumerados desde GLUT 1 hasta GLUT 14, que a su vez se clasifican en 3 clases. Cada una de las isoformas de los GLUT tiene ubicación y características cinéticas propias, adaptadas a las necesidades metabólicas de los distintos tejidos. Los GLUT presentan una conformación proteica similar, con doce dominios transmembranales alfa-hélice, en donde los extremos amino y carboxilo terminal se localizan en el citoplasma (Figura 12).⁶¹

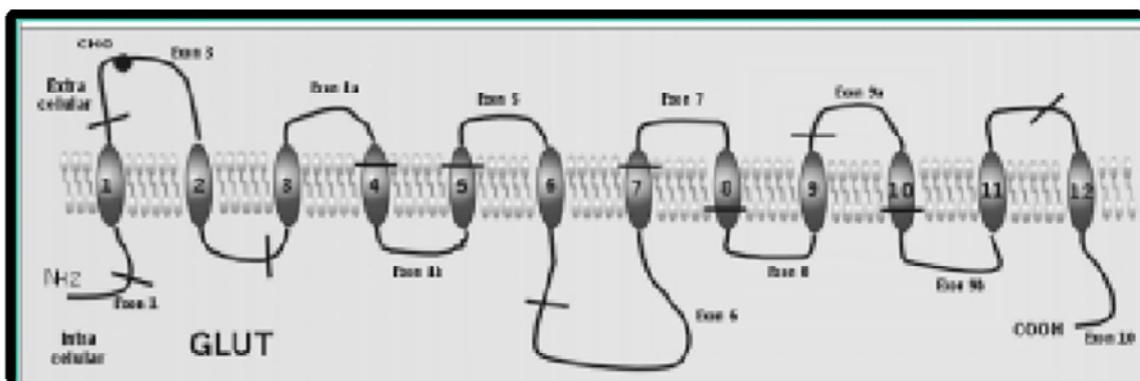


Figura 12. Organización de transportadores GLUT, con 12 dominios transmembranales alfa-hélice.⁶⁰

La glucosa ingresa a la célula en cuatro etapas: en primer lugar se une al transportador en la cara externa de la membrana, luego el transportador cambia la conformación y por lo tanto la glucosa y su sitio de unión quedan localizados en la cara interna de la membrana, posteriormente la glucosa es liberada por el transportador hacia el citoplasma y finalmente el transportador libre cambia nuevamente su conformación, expone el sitio de unión a la glucosa en la cara externa y regresa a su estado inicial (Figura 13).

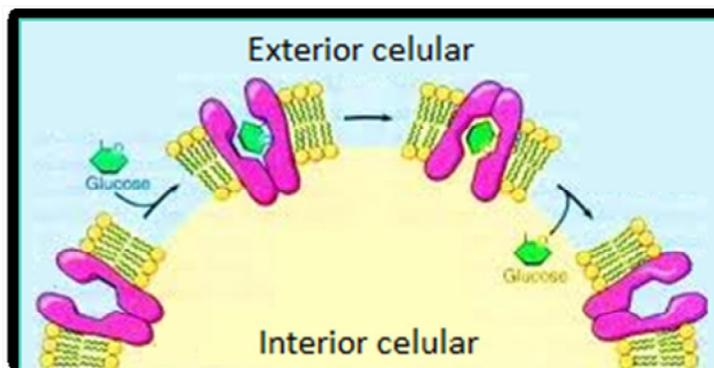


Figura 13. Mecanismo propuesto para el ingreso de la glucosa a la célula a través de los transportadores de glucosa (GLUT).

Clase I: Formada por GLUT 1-4 y GLUT 14.

GLUT 1 se expresa en todos los tejidos, principalmente en eritrocitos, barreras hematoencefálica, placentaria y de la retina, astrocitos y nefrona. Su función es el ingreso basal de la glucosa, transporta también manosa, galactosa y aminoglucosa. GLUT 2 presenta baja afinidad por la glucosa y transporta además galactosa, manosa y fructosa. Se encuentra en las células B pancreáticas, en el hígado, en el intestino delgado y la nefrona proximal. Este transportador es el sensor de glucosa en el páncreas y es el responsable del transporte de glucosa en la membrana basolateral de intestino y riñón. GLUT 3 transporta glucosa con alta afinidad, se encuentra principalmente en cerebro, placenta, hígado, riñón y corazón. GLUT 4 se expresa en los tejidos en donde el transporte de glucosa es dependiente de insulina, como ser en tejido adiposo, músculo cardíaco y esquelético. GLUT 14 se expresa en testículos.

Clase II: Formada por GLUT 5, 7, 9 y 11.

GLUT 5 se localiza en el yeyuno, espermatozoides, riñón y células de microglía. Su función es el transporte de fructosa, este transportador no muestra afinidad por la glucosa ni galactosa. GLUT 7 muestra elevada afinidad por glucosa y fructosa, encontrándose en el intestino delgado en donde actúa en conjunto con los transportadores GLUT 5 y SGLT 1. GLUT 9 se localiza en riñón e hígado y su función es el transporte de glucosa. GLUT 11 se encuentra en

músculo esquelético y corazón principalmente y se encarga del transporte de glucosa y fructosa, pero no de galactosa.

Clase III: Formada por GLUT 6, 8, 10, 12 y HMIT.

GLUT 6 se localiza en cerebro, bazo y leucocitos periféricos, este transportador presenta baja afinidad por la glucosa. GLUT 8 se encuentra principalmente en testículos, placenta y cerebro. Presenta elevada afinidad por la glucosa, la cual es inhibida por fructosa y galactosa. GLUT 10 se encuentra en hígado y páncreas, se encarga del transporte de glucosa; alteraciones en el gen de GLUT 10 se encuentran relacionadas con anomalías del tipo diabetes y síndromes arteriales. GLUT 12 se localiza en músculo esquelético, tejido adiposo, intestino delgado y placenta. Este transportador puede translocarse a la membrana plasmática en presencia de insulina. HMIT ó GLUT 13 es un transportador de glucosa y mioinositol, se expresa en cerebro en donde transporta inositol fosfato y contribuye en diversos procesos relacionados con la función neuronal.⁶⁶⁻⁶⁷

2.3.1 EN CÉLULAS TUMORALES

Se conoce que las células malignas tienen un acelerado metabolismo, alto requerimiento de glucosa e incremento en la captación de la misma. Cada uno de los transportadores de glucosa posee diferente afinidad por la glucosa y otras hexosas, como la fructosa.

En los tumores, se producen alteraciones en los GLUT, estas alteraciones provienen de eventos carcinogénicos afectando en forma simultánea varios procesos, entre ellos la absorción de azúcar. La proteína supresora de tumores p53 presenta importantes funciones en la promoción de la apoptosis y detección del ciclo celular en respuesta a cualquier agresión o daño que pueda sufrir la célula. Se cree que ésta proteína puede conducir a la carcinogénesis ya que es capaz de reprimir la expresión de los genes de los transportadores GLUT 1 y GLUT 4.

Por otra parte eventos carcinogénicos que afectan a los receptores de factores de crecimiento epidérmico (EGFR) pueden estar relacionados con el aumento de la captación

de glucosa y supervivencia de las células cancerosas a través de la estabilización del transportador SGLT 1.

Todas estas alteraciones conducen a un aumento constante en el consumo de glucosa, característica de las células tumorales. Generalmente éstas presentan una serie de anomalías genéticas, metabólicas y fisiológicas que hacen imposible la fosforilación oxidativa mitocondrial. De esta manera la glicólisis es una vía ineficiente utilizada por las células cancerosas para obtener energía. Por lo cual se puede evidenciar que existe una relación entre las cantidades de los transportadores de glucosa y el pronóstico del cáncer.⁶⁸

III. ANTECEDENTES

Numerosos grupos de investigación a nivel mundial llevan a cabo la investigación y el desarrollo de nuevos radiofármacos de diagnóstico oncológico basados en dos características de las células cancerosas: el aumento del metabolismo glucídico y el incremento en el consumo de glucosa. Ambos sucesos conllevan a que las células tumorales sobreexpresen los transportadores GLUTs, internalizando altas cantidades de glucosa para satisfacer sus necesidades metabólicas, vía glicólisis.⁶⁹ Conjuntamente la enzima hexoquinasa en las células tumorales aumenta su actividad respecto a la misma en células normales.⁵¹

La D-glucosa es una molécula clave para el metabolismo y, por lo tanto contar con derivados de glucosa marcados con ^{99m}Tc como potenciales radiofármacos SPECT análogos del [¹⁸F] FDG, es de gran interés en el campo de la Imagenología Molecular. La radiosíntesis de análogos de glucosa marcados con ^{99m}Tc que mantengan el reconocimiento por los transportadores GLUT 1 es difícil, ya que este tipo de transporte es altamente específico. Al realizar variaciones en la estructura de la glucosa luego ésta puede no ser reconocida por los transportadores. Por lo cual el primer paso para la investigación y el desarrollo de análogos de glucosa, es la adecuada síntesis de los mismos. Se han sintetizado diferentes derivados de glucosa principalmente funcionalizados en las posiciones C-1, C-2, C-3 y C-6, ya sea con linkers de diferentes longitudes o sistemas quelantes.

Los primeros investigadores en desarrollar análogos de glucosa planteaban que al ser sustituidas estas moléculas en C-1, C-5 o C-6 por halógenos, las mismas o bien son inestables o no eran reactivos frente a la enzima hexoquinasa, principalmente por razones estructurales.³⁸

El diseño de estos ligandos se restringió, para algunos investigadores, a derivados de glucosa modificados en C-2, ya que se pensaba era un lugar adecuado debido al poco cambio estructural. A su vez se cree que tanto la D-glucosa como derivados de glucosa sustituidos en C-2 son las moléculas que se fosforilan por la acción de la hexoquinasa, teniendo en cuenta que los sustituyentes en C-2 no sean muy voluminosos.

Los resultados de muchos estudios han demostrado que la expresión de los transportadores de glucosa se encuentra aumentada en una variedad de tumores malignos.⁷⁰

En particular, el transportador GLUT 1 humano se encuentra sobreexpresado en muchos tumores. La tasa de metabolismo de la glucosa, especialmente la glicólisis, es significativamente mayor que el de las células normales. De esta forma, diversos derivados de glucosa marcados con ^{99m}Tc pueden ser utilizados para diagnóstico tumoral, debido su acumulación en las células tumorales. Técnicas de imagen funcional *in vivo* podrían ayudar al diagnóstico y clasificación de tumores. Existen varias modalidades de imagen, entre ellas la imagen plana (gammagrafía), SPECT y PET, siendo cada vez más utilizadas para poder evaluar la estadificación y seguir el tratamiento de los pacientes con cáncer. Las distintas técnicas de imagen poseen roles complementarios dependiendo de la situación clínica.

Debido a los resultados alentadores en el desarrollo de nuevos derivados de glucosa tanto en el desarrollo sintético así como en radiosíntesis, se cree que éstos podrían ser utilizados como posibles agentes de imagenología molecular.³⁹⁻⁴²

En este sentido, diversos grupos han investigado análogos de glucosa y desoxiglucosa marcada con ^{99m}Tc . Los resultados han mostrado un aumento en la captación en el tejido tumoral y menor absorción en los tejidos musculares. Derivados de glucosa como la 1-tio- β -D-glucosa (1-TG) la cual es estructuralmente similar a la D-glucosa, puede ser transportado por GLUT 1 y de esta forma ingresar a las células tumorales. El radioconjugado ^{99m}Tc -1-TG hasta el momento se ha investigado principalmente para el diagnóstico oncológico y en procesos infecciosos.⁷¹⁻⁷³ Entre otros derivados de glucosa desarrollados, se han encontrado resultados interesantes y prometedores con la 1-tio- β -D-glucosa 2,3,4,6-tetraacetilada, la cual puede ser utilizada para la detección tumores y para procesos infecciosos.⁷³

A partir del año 2009 el grupo de trabajo en el cual desarrolle el presente trabajo comenzó una nueva línea de investigación orientada al diseño, la síntesis orgánica y desarrollo de derivados de glucosa marcados con el radionucleido ^{99m}Tc como potenciales radiofármacos para diagnóstico oncológico.

En el marco de esta línea de investigación y desarrollo se vienen desarrollando diversos proyectos de investigación, tesis de graduación y postgrado y publicación de trabajos científicos.⁷⁴⁻⁸⁰ El diseño de los potenciales radiofármacos de ^{99m}Tc se ha basado en el uso de estructuras derivadas de D-glucosa capaces de incorporar el átomo de tecnecio a la

biomolécula sin afectar su conformación biológica. En este caso para que el complejo ^{99m}Tc -Glucosa pueda ser reconocido por los transportadores de glucosa presentes en la membrana celular.

El contar con nuevos agentes de imagenología oncológica tendría una incidencia directa tanto en la sobrevivencia de pacientes, como también un impacto positivo sobre el sistema de salud. Una de las aplicaciones en la salud humana, es la marcación de estas biomoléculas para su uso como radiofármacos en Medicina Nuclear.⁵⁴⁻⁵⁸

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente trabajo se basa en el diseño y síntesis orgánica de derivados de glucosa y posterior radiosíntesis de éstos con ^{99m}Tc para su aplicación como potenciales radiofármacos de diagnóstico oncológico en modelo de melanoma.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos planteados en el marco de la presente tesis de grado son:

- a) Estudiar y optimizar estrategias de marcación con ^{99m}Tc del derivado comercial 1-tio- β -D-glucosa
- b) Diseño y síntesis de un derivado de glucosa portando un grupo funcional tiol para su marcación con ^{99m}Tc .
- c) Caracterización espectroscópica de las moléculas orgánicas sintetizadas.
- d) Controles fisicoquímicos de los radiomarcados obtenidos.
- e) Caracterización biológica *in vitro* e *in vivo*.
 - Estudios de captación en modelo tumoral celular con la línea de melanoma murino B16F1.
 - Estudios de biodistribución en ratones normales y con melanoma inducido.
 - Obtención de imágenes centellográficas en modelo tumoral de melanoma inducido.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ^{99m}Tc -1-TIO- β -D-GLUCOSA

5.1.1 SÍNTESIS RADIOQUÍMICA

5.2.2.1 CONSIDERACIONES GENERALES

- Reactivos y productos químicos: 1-tio- β -D-glucosa (1-TG) como sal sódica hidratada ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5\text{SNa}$, PM 218 Da) fue adquirida de Sigma-Aldrich (Miliwaukee, EE.UU) con pureza > 98%. D-glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, PM 180.16 Da) se obtuvo de Fluka (Buchs, Suiza). $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y ácido clorhídrico (HCl 36.5 - 38.0 %) de JT Baker, cloruro de sodio (NaCl) de Fluka y metil etil cetona (MEK) de Merck. $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ fue obtenido a partir del generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (TecnoNuclear).
- ITLC-SG, se adquirieron de Pall Corporation.
- HPLC Varian 500 Liquid Cromatograph, integrador 4290 Varian, Detector ORTEC, utilizando una Columna C18 (10 μm , 250 mm x 4,6 mm), Resteck Ultra.
- Liofilizador (HETO).
- Calibrador de dosis Carpintec CRC7.
- Contador de centelleo sólido de pozo: detector de cristal NAI (TI) de 3'' x 3'' asociado a un analizador monocanal (ORTEC).

5.2.2.2 MARCACIÓN CON ^{99m}Tc

Procedimiento general:

- Se agrega 1-TG disuelto en HCl 0,1 M en un vial.
- Se mezclan con solución recién preparada de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Se agrega 370 MBq/0,5 mL de $^{99m}\text{TcO}_4^-$.
- Se controla el pH deseado (agregando diferentes volúmenes de NaOH 0.1 M).
- Finalmente, la solución se agita a temperatura ambiente.

En base a este procedimiento general se realizó en primer lugar una formulación (*Formulación I*) para ser estudiada como posible radiofármaco de diagnóstico.

Procedimiento *Formulación I*:

- Se pesan 4 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, se agrega 1 gota de HCl cc y se lleva a 2 mL con HCl 0.1 M. De allí se realiza una toma de 40 μL , conteniendo 80 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- Se pesan 2.6 mg de 1-TG y se toman en 200 μL .
- Se agregan 40 μL de la solución preparada anteriormente de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- Se agrega 370 MBq/0.5 mL de $^{99m}\text{TcO}_4^-$.
- Se controla el pH deseado (agregando diferentes volúmenes de NaOH 0.1 M).
- Finalmente, la solución se agita a temperatura ambiente.

Los pH estudiados fueron 2, 5 y 8. El pH de la solución inicial es 2. Para ajustar a pH 5 se agregan 0.3 mL de NaOH 0.1 M a la solución inicial y para ajustar a pH 8 se adicionan 0.6 mL de NaOH 0.1 M a la solución inicial.

Luego de observar los buenos resultados (ver capítulo de resultados), se decide utilizar pH 2 para no modificar las condiciones iniciales en la radiosíntesis.

Se continúa realizando estudios con la *Formulación I*. Se realizan estudios de estabilidad en el tiempo, ensayos *in vitro* e *in vivo*. A su vez, se propone realizar cuatro formulaciones, en las que realizan modificaciones (Tabla 6) respecto al procedimiento de la *Formulación I*, con el fin de obtener una PRQ cercana al 100% y posterior preparación de kits liofilizados (cómo los radiofármacos utilizados en Medicina Nuclear) para estudiar su estabilidad en el tiempo.

Procedimiento Formulación II:

- Se pesan 4 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, se agrega 1 gota de HCl cc y se lleva a 2 mL con HCl 0.1 M. De allí se realiza una toma de 40 μL , conteniendo 80 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- Se pesan 5.2 mg de 1-TG y se toman en 200 μL .
- Se agregan 40 μL de la solución preparada anteriormente de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- Se agrega 370 MBq/0.5 mL de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$.
- Se controla el pH 2.
- Finalmente, la solución se agita a temperatura ambiente.

Procedimiento Formulación III:

- Se pesan 4 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, se agrega 1 gota de HCl cc y se lleva a 2 mL con HCl 0.1 M. De allí se realiza una toma de 40 μL , conteniendo 80 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- Se pesan 2.6 mg de 1-TG y se toman en 200 μL .
- Se agregan 40 μL de la solución preparada anteriormente de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- Se pesan 5 mg de manitol y se disuelven en 1 mL de H_2O destilada.
- Se agrega 370 MBq/0.5 mL de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$.
- Se controla el pH 2.
- Finalmente, la solución se agita a temperatura ambiente.

Procedimiento Formulación IV:

- Se pesan 4 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, se agrega 1 gota de HCl cc y se lleva a 2 mL con HCl 0.1 M. De allí se realiza una toma de 50 μL , conteniendo 100 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- Se pesan 2.6 mg de 1-TG y se toman en 200 μL .
- Se agregan 50 μL de la solución preparada anteriormente de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- Se agrega 370 MBq/0.5 mL de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$.
- Se controla el pH 2.
- Finalmente, la solución se agita a temperatura ambiente.

Procedimiento Formulación V:

- Se pesan 4 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, se agrega 1 gota de HCl cc y se lleva a 2 mL con H_2O destilada. De allí se realiza una toma de 40 μL , conteniendo 80 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- Se pesan 2.6 mg de 1-TG y se toman en 200 μL .
- Se agregan 40 μL de la solución preparada anteriormente de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- Se agrega 370 MBq/0.5 mL de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$.
- Se controla el pH 2.
- Finalmente, la solución se agita a temperatura ambiente.

Procedimiento para la preparación de los kits de las cinco formulaciones:

- Se preparan las 5 formulaciones sin marcar radiactivamente, por decuplicado en viales ámbar estériles.
- Se liofilizan los 50 viales y se precintan.
- Se almacenen en heladera a 4°C.

Tabla 6. Formulaciones estudiadas para la marcación de 1-TG con $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Formulación	I	II	III	IV	V
Composición					
1-TG (mg)	2.6	5.2	2.6	2.6	2.6
SnCl_2 (μg)	80*	80*	80*	100*	80**
Manitol (mg)	---	---	5	---	---

* Solución en HCl 0.1 M, ** Solución en H_2O destilada.

5.2.2.3 CONTROL DE LA MARCACIÓN

La PRQ de las cinco formulaciones se cuantifica a través de controles cromatográficos ITLC-SG, para poder diferenciar las impurezas radioquímicas posibles en la marcación. Las dos impurezas radioquímicas son $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y $^{99m}\text{TcO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, de las cuales se conocen los Rf (Relación de frentes) en los disolventes utilizados (Tabla 7). El Rf es el cociente entre la distancia recorrida por el soluto y la distancia recorrida por el disolvente. La PRQ del radioconjugado se obtiene a partir de estos valores y del Rf del compuesto marcado radiactivamente en los disolventes utilizados (Tabla 7).

Tabla 7. Controles cromatográficos mediante ITLC-SG de las Formulaciones I-V de $^{99m}\text{Tc-1-TG}$.

Control	Fase estacionaria	Fase móvil	Rf	Molécula
1	ITLC-SG	NaCl 0.9%	0.0	$^{99m}\text{TcO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$
			1.0	$^{99m}\text{Tc-1-TG}$
			1.0	$^{99m}\text{TcO}_4^-$
2	ITLC-SG	MEK	0.0	$^{99m}\text{TcO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$
			0.0	$^{99m}\text{Tc-1-TG}$
			1.0	$^{99m}\text{TcO}_4^-$

Debido a los buenos y similares resultados obtenidos en la marcación y estabilidad en el tiempo de las cinco formulaciones, se considera seguir realizando estudios con la *Formulación I* ya que fue con la que se inició el presente trabajo. Por lo tanto luego de la adquisición de un HPLC con detección gamma por el Área de Radiofarmacia de Facultad de Ciencias – CIN, se cuantifica la PRQ de la *Formulación I*. Para la cuantificación de la PRQ se utiliza un HPLC con detección gamma, empleando una columna C18 de fase reversa; los gradientes y disolventes utilizados se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8. Especificaciones de disolventes, gradientes y flujo para control cromatográfico mediante HPLC con detector gamma de la *Formulación I*.

Fase móvil	t = 0 min	t = 20min	t = 25 min
H ₂ O/TFA 0.1%	100 %	0 %	100 %
ACN/TFA 0.1%	0 %	100 %	0 %
Flujo (mL/min)	1	1	0

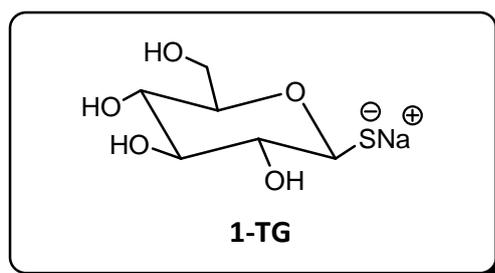
5.2.2.4 ESTABILIDAD DEL MARCADO

La estabilidad del marcado de las cinco formulaciones se evalúa mediante la fase estacionaria ITLC-SG, fases móviles NaCl 0.9% y MEK (Tabla 6). La actividad en las tiras cromatográficas se determinó con un detector de cristal NAI (TI) asociado a un analizador monocanal (ORTEC). La estabilidad de las distintas formulaciones se verificó luego de la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente y a 1, 2, 3 y 24 horas. A su vez se realizaron controles de estabilidad de estas formulaciones (liofilizadas y almacenadas a 4 °C) inmediatamente y a 1, 15, 30, 45, 60, 75, 90 y 105 días.

5.2.2.5 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

Estudios de caracterización química del complejo 1-TG-^{99m}Tc mediante reacciones con precursores no radioactivos:

1-tio-β-D-glucosa (1-TG): ¹H-RMN (MeOH): δ= 4.52 (d, J= 8.8 Hz, 1H; H-1), 3.83 (dd, J= 2.8 Hz, 1H; H-6a), 3.63 (m, 1H; H-6b), 3.37 (m, 2H; H-3; H-4), 3.28 (m, 1H; H-5), 2.98 (m, 1H; H-2).



Reacciones de 1-TG con precursores de ^{187}Re :

a) Reacción entre 1-TG y $^{187}\text{ReOCl}_4$: en un balón se coloca una mezcla de $^{187}\text{ReOCl}_4$ (10.0 mg, 0.017 mmol) y **1-TG** (15.0 mg, 0.14 mmol) en MeOH seco (5 mL) con agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Seguidamente se detiene el avance de reacción y se destila el disolvente a presión reducida, obteniéndose un sólido de color bordó (24.0 mg)

b) Reacción entre 1-TG y $^{187}\text{ReO}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_3$: en un balón se agrega $^{187}\text{ReO}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_3$ (30.0 mg, 0.036 mmol) y **1-TG** (31.5 mg, 0.29 mmol) disuelto en MeOH seco (3 mL) bajo corriente positiva de N_2 y calentamiento a reflujo durante 2 h. Seguidamente se apaga el calentamiento y se destila el disolvente a presión reducida, obteniéndose un sólido de color amarillo pálido (22.8 mg). Con dicha mezcla de reacción se realiza un espectro de masa (MALDI-TOF)

5.1.2 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA *IN VITRO*: CAPTACIÓN CELULAR

Los estudios de captación se realizan en la línea celular de melanoma murino B16F1, la cual fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC) y las mismas se mantuvieron en medio de cultivo Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Australia) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Laboratories GmbH) y 2 mM de glutamina (Applichem GmbH, Darmstadt, Alemania).

Las células se obtienen en un medio libre de glucosa. Las suspensiones de las células fueron preparadas en PBS (pH 7.4) a una concentración de 1×10^6 células/mL. En un eppendorf de 1.5 mL se añade 1 mL de esta suspensión y 20 μL del complejo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -1-TG (*Formulación I*) utilizando 400.000 cuentas por minuto (CPM) por tubo y se agita suavemente. Para ensayos de competencia se añaden 0.5 mM de D-glucosa y 0.5 mM de 1-TG. A su vez se realiza un control conteniendo 20 μL de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -1-TG (400.000 CPM/tubo) en PBS. Se incuban las células con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -1-TG a 37°C durante 10, 30, 60 y 120 minutos. Los estudios se realizan por triplicado. Luego los tubos se centrifugan a 3500 rpm durante 3 minutos y se elimina el sobrenadante. Se lavan las células de cada ensayo con PBS (500 μL) para remover la

actividad remanente fuera de la célula. Este procedimiento de centrifugación y lavado se repite por triplicado. Finalmente se mide la actividad en un contador de centelleo (ORTEC) en CPM. La actividad obtenida por muestra se divide por la del control, obteniéndose un porcentaje de la actividad asociada a la suma de la internalización y unión a membrana del complejo ^{99m}Tc -1-TG en las células de melanoma murino B16F1.

5.1.3 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA *IN VIVO*

5.1.3.1 ESTUDIO DE BIODISTRIBUCIÓN

La evaluación biológica *in vivo* de ^{99m}Tc -1-TG (*Formulación I*) se lleva a cabo mediante la realización de estudios de biodistribución en ratones normales y portadores de melanoma, a 1 hora (n=3) y 4 horas (n=3). Para el presente estudio se utilizan ratones de 20-24 g y 8-10 semanas C57BL/6 (DILAVE, Uruguay). Los protocolos utilizados fueron aceptados por el Comité Honoraria de Experimentación Animal (CHEA código 04-02-09, Responsable Pablo Cabral). Los melanomas son inducidos vía subcutánea inyectando 2.5×10^5 células B16F1 en 0.1 mL de PBS. Luego de dos semanas el tumor ya es palpable y los ratones pueden ser utilizados para estudios de biodistribución y toma de imágenes.

Para la realización de los estudios de biodistribución se siguen los siguientes pasos:

1. Se administra ^{99m}Tc -1-TG por vía intravenosa con una actividad de aproximadamente 1 MBq.
2. Luego de transcurrido el tiempo de biodistribución 1 y 4 horas, se sacrifican los animales por dislocación cervical.
3. Se extraen los órganos de interés, se pesan y se mide la actividad de los mismos en detector de centelleo sólido.
4. Se calcula el porcentaje de dosis inyectada por gramo (% ID/g) y el porcentaje de dosis inyectada (% ID) por órgano.

5.1.3.2 IMÁGENES CENTELLOGRÁFICAS

Los estudios centellográficos se realizan 2 horas post-inyección con 15 MBq de ^{99m}Tc -1-TG (*Formulación I*) en la vena de la cola de ratones normales y portadores de melanoma.

Los ratones fueron inmovilizados mediante anestesia general por un tratamiento farmacológico (100 mg/kg ketamina – 10 mg/kg xilacina), posteriormente bajo anestesia general son sacrificados por dislocación cervical. Se adquieren imágenes centellográficas en una gamma cámara Sopha DXR rectangular conectada en serie a un procesador Mirage Segami, en el Centro de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas, UdelaR. Posteriormente las imágenes se analizan con el Software Amide.

5.2 ^{99m}Tc -DERIVADOS DE GLUCOSA

5.2.1 SÍNTESIS ORGÁNICA

5.2.1.1 CONSIDERACIONES GENERALES

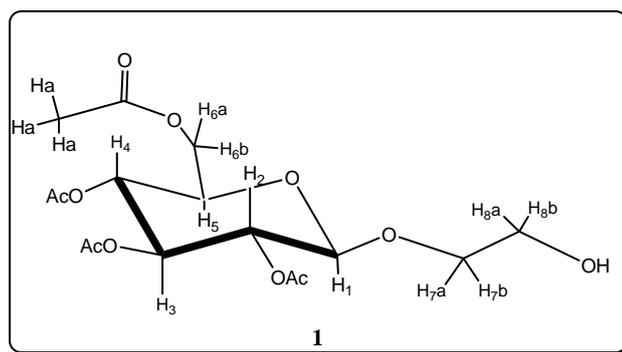
- Reactivos y productos químicos adquiridos de Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, entre otros.
- Los disolventes comerciales poseen una pureza > 98 % o se destilan previo a su uso para aquellos que poseen una pureza menor.
- El avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinan por cromatografía en capa fina (CCF). Para esto se utiliza sílica gel con indicadores fluorescente en placas de poliéster. Los cromatogramas se revelan por alguno de los siguientes métodos:
 - ❖ Exposición a la luz ultravioleta a 254 nm.
 - ❖ Asperjado con mezcla de etanol: ácido sulfúrico: anisaldehído (95:4:1) (v/v/v) y posterior quemado.
 - ❖ Exposición a vapores de yodo.
- Para las cromatografías en columnas (CC) se utiliza: Sílicagel (SAI, 63 – 200 mm) y Sílica flash (SAI, 32 – 63 mm).
- Los espectros de RMN (Resonancia Magnética Nuclear) de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se realizan en un equipo BRUKER DPX-400 (400 MHz y 100MHz, respectivamente) utilizando los disolventes indicados en cada caso y Tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico son descriptos en unidades de δ (ppm) y las multiplicidades según s: singulete, d: doblete, dd: doble de doblete, t: triplete, c: cuarteto, q: quinteto, m: multiplete, sa: señal ancha. La completa caracterización se realiza con la combinación de experimentos COSY (por las siglas en inglés: CORelated Spectroscopy),

HSQC (por las siglas en inglés: Heteronuclear Single Quantum Coherence) y HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation).

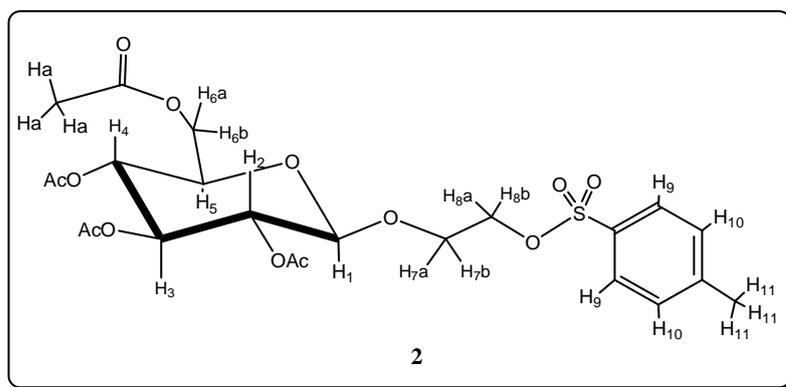
- La espectroscopia Infrarroja (IR) se realiza en un equipo SHIMADZU DR-8031.

5.2.1.2 SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS DE GLUCOSA

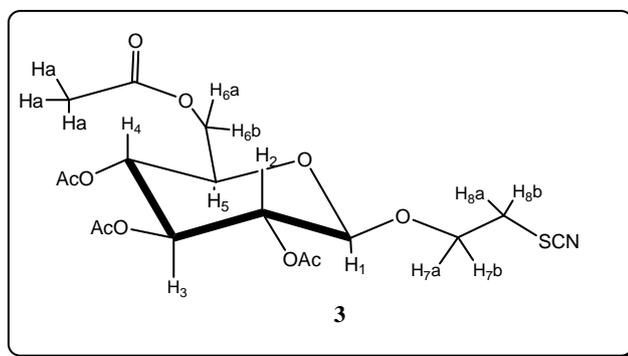
1-O-(2-Hidroxietil)-2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosido (1): Se añaden tamices moleculares y etilenglicol (6.8 mL, 120 mmol) a una disolución de 1-Bromo-2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosido (Aldrich, 5 g, 12 mmol) en CH₂Cl₂ seco (63 mL). La mezcla se deja en agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos y seguidamente se agrega bromuro de mercurio (4.4 g, 12 mmol) y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla se diluye con CH₂Cl₂ (100 mL) y se filtra a través de celite. La fase orgánica se lava con una solución acuosa de KI al 5 % (3 x 30 mL) y agua (3 x 30 mL) y se seca con Na₂SO₄. El disolvente se destila a presión reducida y el crudo de reacción se purifica mediante CC (Sílica Flash, Hexano (EP): Acetato de etilo (AE) (3:7)) obteniéndose el producto de interés como un aceite amarillo claro (2.6 g, 55 %). ¹H-RMN (CDCl₃): δ= 5.27 (t, J= 9.6 Hz, 1H; H-3), 5.10 (m, 2H; H-4 H-2), 4.58 (d, J= 8,0 Hz, 1H; H-1), 4.22 (dd, J= 4.0 Hz, 2H; H-6a H-6b), 3.88 (t, J= 4.4 Hz, 2H; H-7a H-7b), 3.79 (m, 3H; H-5 H-8a H-8b), 2.12, 2.08, 2.06, 2.03 (s, 12H, H-A). IR (cm⁻¹): ν= 3500 (δ O-H), 1030 (δ O-C-O acetal), 1225 (δ C-O acetal).



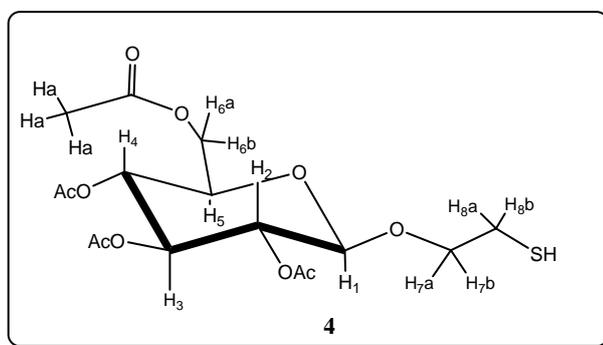
1-O-(2-*p*-Toluilsulfoniloetil)-2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosido (2): Una mezcla del alcohol **1** (2.6 g, 6.8 mmol), CH₂Cl₂ seco (26 mL) y piridina (1.6 mL) se enfría a 0 °C. Posteriormente, se agrega cloruro de *p*-toluensulfonilo (1.3 g, 6.67 mmol) y la reacción se deja en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. Finalizado este tiempo, la mezcla de reacción se lava con HCl 1N y solución saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ y el disolvente se destila a presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante CC (SiO₂, mezcla de polaridad creciente EP: AE (1:1, 4:6, 3:7, 1:9)). Se obtiene el producto deseado como un sólido blanco (1.5 g, 48 %). ¹H-RMN (CDCl₃): δ = 7.80 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H; H-9), 7.39 (d, *J*= 8.0 Hz, 2H; H-10), 5.23 (t, *J*= 9.6 Hz, 1H; H-3), 5.09 (t, *J*= 9.6 Hz, 1H; H-4), 4.98 (dd, *J*= 7.6 Hz, *J'*= 8,0 Hz, 1H; H-2), 4.54 (d, *J*= 8.0 Hz, 1H; H-1), 4.27 (dd, *J*= 4.8 Hz, *J'*= 4,8 Hz, 1H; H-6a), 4.11-4.18 (m, 3H; H-6b; H-8; H-8b), 4.0 (m, 1H; H-7a), 3.85 (m, 1H; H-7b), 3.71 (m, 1H; H-5), 2.48 (s, 3H; H-11), 2.10, 2.07, 2.05, 2.03 (s, 12H, H-A). IR (cm⁻¹): ν = 1040 (δ O-C-O acetal), 1230; 1180 (δ C-O acetal), 1360 (δ O=S=O), 815; 720 (δ C-S).



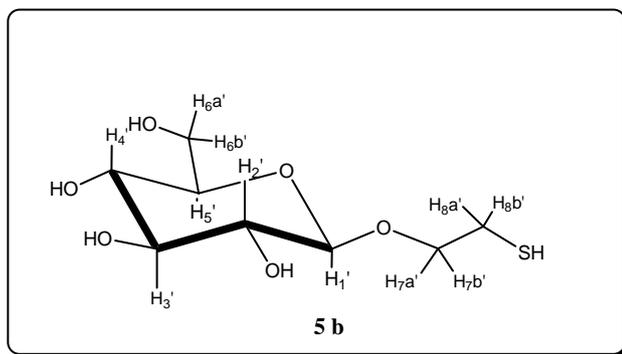
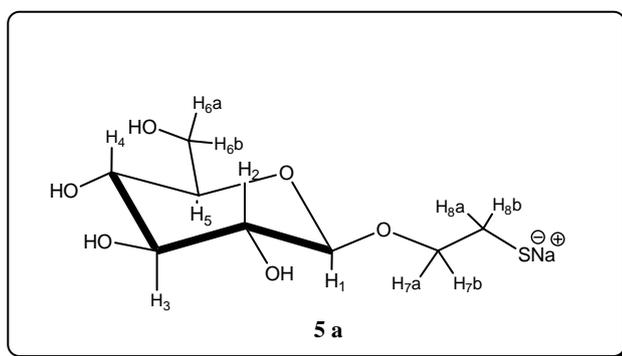
1-O-(2-Tiocianatoetil)-2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosido (3): Se agrega a un balón el derivado tosilado **2** (0.5 g, 0.9 mmol), tiocianato de potasio (0.5 g, 5.5 mmol), una punta de espátula de éter corona (18-crown-6) y dimetilformida (DMF) seca (9.4 mL). Se coloca la reacción en agitación a 100 °C durante 7 horas. Seguidamente, a la mezcla se añade agua (80 mL) y se extrae con éter etílico (4 x 40 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ y el disolvente se destila a presión reducida. Se obtiene el producto de interés como un sólido blanco (0.4 g, 90 %) y se utiliza sin otra purificación en la siguiente etapa. ¹H-RMN (CDCl₃): δ= 5.26 (t, *J*= 9.2 Hz, 1H; H-3), 5.13 (t, *J*= 10.0 Hz, 1H; H-4), 5.08 (dd, *J*= 8.0 Hz, *J*'= 8.0 Hz, 1H; H-2), 4.62 (d, *J*= 8.0 Hz, 1H; H-1), 4.29 (dd, *J*= 4.8 Hz, *J*'= 4.8 Hz, 1H; H-6a), 4.17-4.25 (m, 3H; H-7a H-6b), 3.89 (m, 1H; H-7b), 3.77 (m, 1H; H-5), 3.27 (m, 1H; H-8a), 3.16 (m, 1H; H-8b), 2.12, 2.09, 2.05, 2.03 (s, 12H, H-A). ¹³C-RMN (CDCl₃): δ= 170.62, 170.17, 169.40, 169.37 (4C; CH₃C=O), 111.63 (C≡N), 100.85 (C-1), 72.54 (C-3), 72.02 (C-5), 70.93 (C-2), 68.17 (C-4), 67.29 (C-7), 61.73 (C-6), 33.59 (C-8), 20.97, 20.72, 20.68, 20.57 (4C; C₂H₅C=O). IR (cm⁻¹): ν= 2250 (δ C≡N), 1200; 1160 (δ C-O acetal), 1030 (δ O-C-O acetal), 810; 780 (δ C-S tiocianato).



1-O-(2-Mercaptoetil)-2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosido (4): Se prepara una mezcla de reacción que contiene ácido acético glacial (2.93 mL), zinc activado (0.15 g, 2.3 mmol) y el derivado **3** (0.083 g, 0.19 mmol). Se deja la reacción en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente se diluye la mezcla con CH_2Cl_2 (10 mL) y se filtra sobre celite lavando con suficiente CH_2Cl_2 . La mezcla se lava con agua (10 mL) y solución saturada de NaHCO_3 , ajustando el pH a 7. Se seca la fase orgánica con Na_2SO_4 . El disolvente se destila a presión reducida y el crudo de reacción se purifica mediante CC (Sílica Flash, EP: AE (1:1)) obteniéndose el producto deseado como un aceite incoloro (0.058 g, 73.5 %). ^1H -RMN (CDCl_3): δ = 5.26 (t, J = 9.2 Hz, 1H; H-3), 5.14 (t, J = 10.0 Hz, 1H; H-4), 5.05 (dd, J = 8.0 Hz, J' = 8.0 Hz, 1H; H-2), 4.58 (d, J = 8.0 Hz, 1H; H-1), 4.31 (dd, J = 4.8 Hz, J' = 4.8 Hz, 1H; H-6a), 4.18 (dd, J = 2.4 Hz, J' = 2.4 Hz, 1H; H-6b), 4.07 (m, 1H; H-7b), 3.74 (m, 1H; H-5), 3.66 (m, 1H; H-7a), 2.79 (m, 1H; H-8a), 2.70 (m, 1H; H-8b), 2.11, 2.09, 2.05, 2.03 (s, 12H, H-A). ^{13}C -RMN (CDCl_3): δ = 170.30, 169.42, 162.58, (4C; $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$), 100.91 (C-1), 72.70 (C-3), 71.88 (C-5), 71.65 (C-7), 71.21 (C-2), 68.35 (C-4), 61.90 (C-6), 24.28 (C-8), 20.76, 20.63, 20.61 (4C; $\text{C}=\text{O}$). IR (cm^{-1}): ν = 2500 (δ S-H), 1220 (δ C-O), 1020 (δ O-C-O), 780; 720 (δ C-S).



1-O-(2-Mercaptoetil)-β-D-glucopiranosido (5): A una disolución del tiol **4** (20 mg, 0.05 mmol) en 1 mL de MeOH seco, se añade Na⁰ (2 mg, 0.10 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. Se deja la reacción en agitación bajo atmósfera de N₂ durante 2 horas. Luego de observar la desaparición de **4** mediante TLC se agrega ácido acético glacial (6 μL) y se deja reaccionar durante 5 minutos. Seguidamente se destila a presión reducida el disolvente de reacción. Se obtiene el producto deseado como un aceite incoloro (0.011 g, 99 %), como mezcla del tiolato de sodio (**5a**) y tiol (**5b**). ¹H-RMN (D₂O): δ= 4.43 (d, *J*= 7.6 Hz, 1H; H-1'), 4.42 (d, *J*= 8.0 Hz, 1H; H-1), 4.11 (m, 1H; H-7a'), 3.95 (m, 2H; H-7a; H-7b'), 3.84 (d, *J*= 12.0 Hz, 2H; H-6a'; H-6a), 3.76 (m, 1H; H-7b), 3.65 (m, 2H; H-6b'; H-6b), 3.43 (m, 4H; H-3'; H-3; H-5'; H-5), 3.32 (d, *J*= 8.8 Hz, 2H; H-4'; H-4), 3.22 (t, *J*= 8.8 Hz, 2H; H-2'; H-2), 2.94 (t, *J*= 2.4 Hz, 2H; H-8a'; H-8b'), 2.70 (*J*= 6.4 Hz, 2H; H-8a; H-8b). ¹³C-RMN (CDCl₃): δ= 102.00 (1C; C-1'), 102.20 (1C; C-1), 76.00 (2C; C-5'; C-5), 75.50 (2C; C-3'; C-3), 72.90 (2C; C-2'; C-2), 71.50 (2C; C-7'; C-7), 69.10 (2C; C-4'; C-4), 60.50 (2C; C-6'; C-6), 37.00 (1C; C-8'), 23.60 (1C; C-8).



5.2.2 SÍNTESIS RADIOQUÍMICA

5.2.2.1 MARCACIÓN CON ^{99m}Tc

Para la marcación de **4** y **5** con ^{99m}Tc se siguen los siguientes procedimientos:

Procedimiento A:

- Se agregan 25 μL de la solución de tartrato disódico (1mg/mL de buffer fosfato pH 7).
- Posteriormente se agregan 370 MBq/0.05 mL de $^{99m}\text{TcO}_4^-$.
- Se agregan 5 μL de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1mg/mL de HCl 0.1M) y se controla el pH de la solución final (pH 6).
- Al vial de reacción se agregan 100 μL de **4** ó **5** (1mg/mL de buffer fosfato (pH 7.0): ACN (1:1) (v/v)).
- La solución se agita a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Procedimiento B:

- A un vial de reacción se agregan 100 μL de **4** ó **5** (1mg/mL de buffer fosfato (pH 7.0): ACN (1:1) (v/v))
- Posteriormente se agregan 370 MBq/0.05 mL de $^{99m}\text{TcO}_4^-$.
- Se agregan 5 μL de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1mg/mL de HCl 0.1M) y se controla el pH de la solución final (pH 6).
- La solución se agita a temperatura ambiente durante 10 minutos.

5.2.2.2 CONTROL DE LA MARCACIÓN

Para la cuantificación de la PRQ del compuesto **4** y **5** marcados mediante los procedimientos A y B, se utiliza un HPLC con detección gamma, empleando una columna C18 de fase reversa; los gradientes y disolventes utilizados se detallan en la Tabla 9.

Tabla 9. Especificaciones de disolventes, gradientes y flujo para control cromatográfico mediante HPLC con detector gamma para los conjugados resultantes de la marcación con ^{99m}Tc de los derivados de glucosa **4** y **5**.

Fase móvil	t = 0 min	t = 30min	t = 35 min
H ₂ O/TFA 0.1%	100 %	0 %	100 %
ACN/TFA 0.1%	0 %	100 %	0 %
Flujo (mL/min)	1	1	0

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 ^{99m}Tc -1-TIO- β -D-GLUCOSA

6.1.1 SÍNTESIS RADIOQUÍMICA

La marcación de 1-TG con ^{99m}Tc se realizó en base a modificaciones de técnicas ya reportadas.⁶⁹ Las modificaciones de la técnica fueron: aumento de la concentración de 1-TG y estudios a pH 2, 5 y 8. Se estudió a pH 2 y 8 con el fin de conocer qué sucedía con la formulación en estas condiciones, ya que no habían sido descriptos hasta el momento. Se estudió a pH 5 para poder compararla con trabajos previos.⁶⁹

Se efectuó las radiosíntesis de 1-TG con $^{99m}\text{TcO}_4^-$, el cual fue reducido mediante el agente reductor $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en condiciones ácidas. La PRQ de la marcación de 1-TG con ^{99m}Tc se cuantificó a través de controles cromatográficos ITLC-SG, para poder diferenciar las impurezas radioquímicas posibles en la marcación. Las dos impurezas radioquímicas son $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, de las cuales se conocen los Rf en los disolventes utilizados (Tabla 7, sección experimental). Mediante el uso de la fase móvil MEK se pudo distinguir en el origen (Rf=0) la presencia de $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y ^{99m}Tc -1-TG, y en el frente (Rf=1) de corrida la presencia de $^{99m}\text{TcO}_4^-$. En cuanto al sistema con NaCl 0.9% se observó la presencia de $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en el origen (Rf=0) y $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y ^{99m}Tc -1-TG en el frente (Rf=1) de corrida. La pureza radioquímica se determinó restándole al 100% los porcentajes de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Los resultados de la PRQ para la marcación a pH 2, 5 y 8, controlado luego de 10 minutos de incubación y a 1, 2, 3 y 24 horas, mostraron un porcentaje de marcación mayor al 96 % en todos los casos (Figura 14). Se observó una buena PRQ para todos los pH. En base a ello, se decidió trabajar en la radiosíntesis de 1-TG con ^{99m}Tc a pH=2, para no modificar las condiciones iniciales en la radiosíntesis. La formulación para este marcado se denominó *Formulación I*.

En las condiciones de marcación, el átomo de azufre en la 1-TG es un excelente grupo donador de electrones y por lo tanto forma compuestos de coordinación muy estables con diversos metales, tanto *in vivo* como *in vitro*.

En cuanto a la química de coordinación con el ^{99m}Tc , los complejos formados en presencia de este tipo de ligandos azufrados son del tipo Tc(V)O^{3+} , los cuales resultan muy estables en solución (Figura 15, Representación esquemática de los complejos esperados).

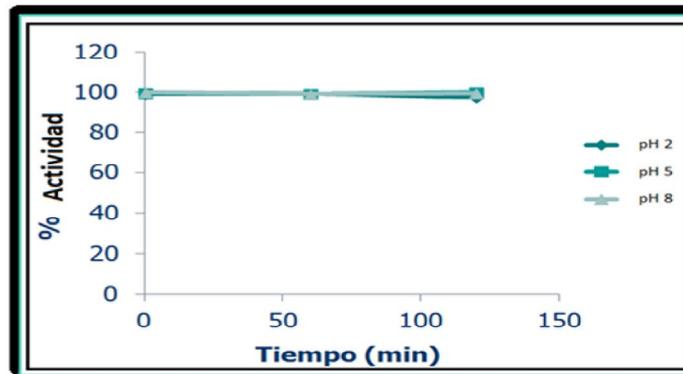


Figura 14. Estudio de estabilidad para distintos valores de pH de $^{99m}\text{Tc-1-TG}$.

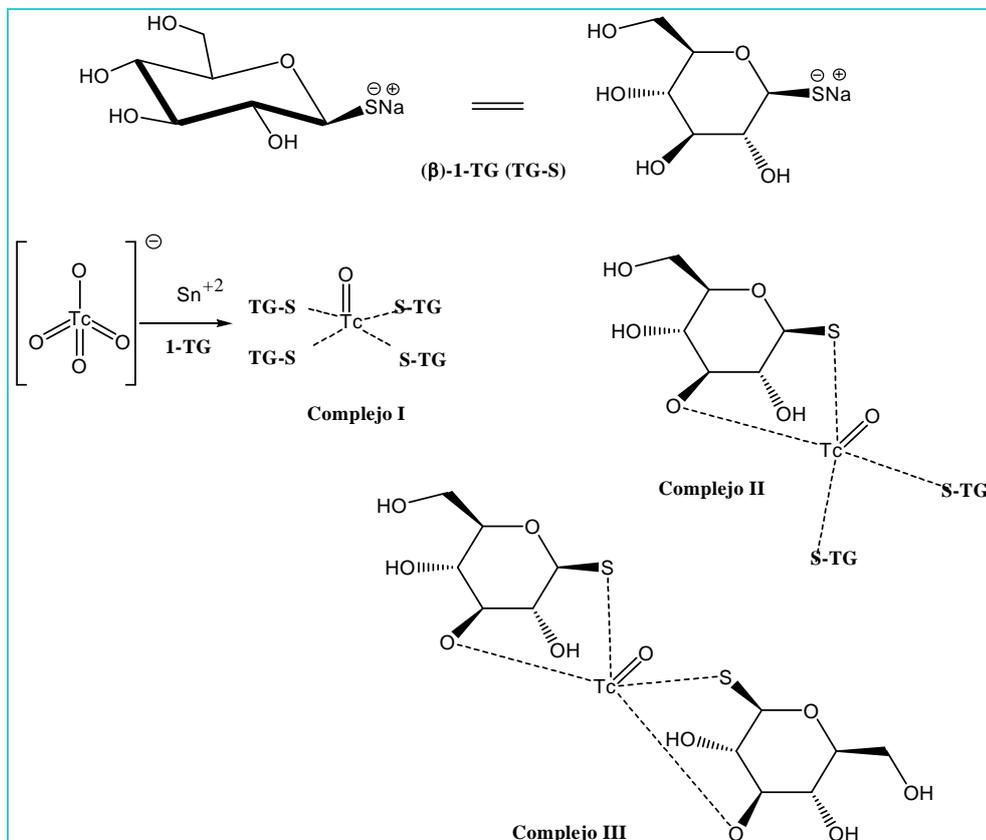


Figura 15. Esquema propuesto para los posibles complejos formados de $^{99m}\text{Tc-1-TG}$.

Asimismo la cuantificación de la PRQ se realizó con un HPLC con detección gamma, empleando una columna C18 de fase reversa; los gradientes y disolventes utilizados se detallan en la Tabla 8 (sección experimental). En los controles se observó el mismo patrón de 3-4 picos en un rango de 6.1 – 7.5 minutos con una pureza radioquímica mayor al 96 % (Figura 16). Esto podría estar indicando la posibilidad de formación de más de un complejo para el radioconjugado obtenido.

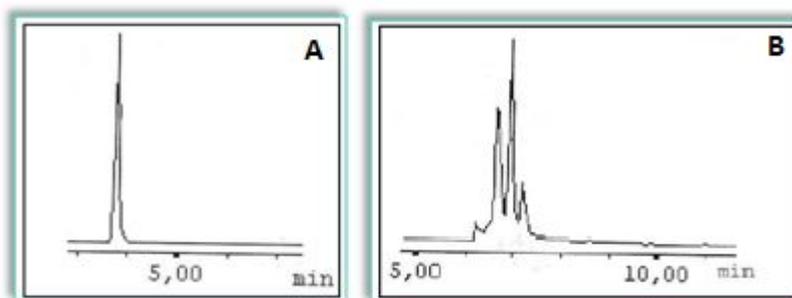


Figura 16. (A) Control por HPLC de $^{99m}\text{TcO}_4^-$. (B) *Formulación I* de $^{99m}\text{Tc-1-TG}$ a tiempo 60 min.

A su vez, se estudiaron cuatro formulaciones, en las que se realizaron modificaciones (Tabla 6, ver sección experimental) respecto al procedimiento de la *Formulación I*, con el fin de obtener una PRQ cercana al 100% y posterior preparación de kits liofilizados (al igual que los kits de radiofármacos utilizados en Medicina Nuclear) para estudiar su estabilidad en el tiempo. Se efectuó la radiosíntesis de la *Formulación II-V* con $^{99m}\text{TcO}_4^-$, el cual fue reducido mediante el agente reductor $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en condiciones ácidas. Posteriormente se controló la PRQ del marcado inmediatamente y a 1, 2, 3 y 24 horas. La misma se controló mediante ITLC-SG, utilizando como fases móviles NaCl 0,9% y MEK (Tabla 7, ver sección experimental), cuantificándose de la misma forma que para la *Formulación I*. La PRQ del radiomarcado $^{99m}\text{Tc-1-TG}$ de las distintas formulaciones en todos los casos fue superior al 95 % (Figura 17).

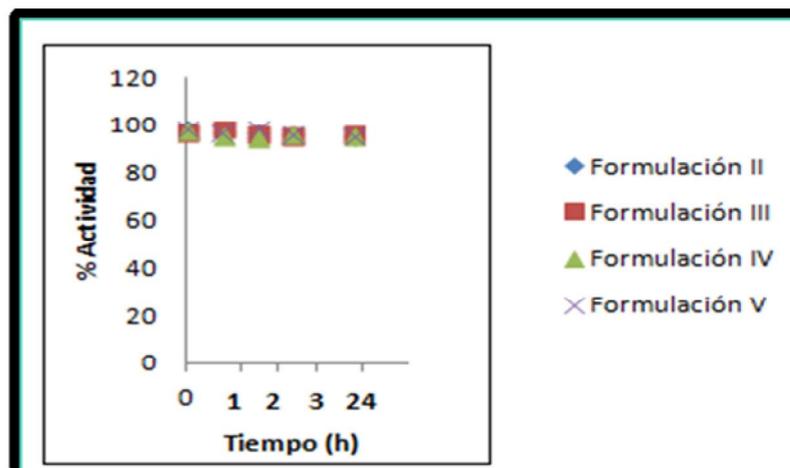


Figura 17. Estudio de estabilidad de ^{99m}Tc -1-TG de 0 a 24 h (Formulación II-V).

A su vez se realizaron controles de estabilidad de las *Formulaciones I-V* (liofilizadas y almacenadas a 4°C) inmediatamente y a 1, 15, 30, 45, 60, 75, 90 y 105 días (Figura 18). La PRQ se controló mediante ITLC-SG, utilizando como fases móviles NaCl 0,9% y MEK (Tabla 7). La estabilidad de las cinco formulaciones liofilizadas se mantuvo a lo largo del tiempo con una buena PRQ, siendo en promedio mayor al 95 %. Lo que quiere decir que preliminarmente servirían para ser utilizados como “kits” debido a su buena estabilidad en el tiempo. Por lo tanto, se continuó trabajando con la *Formulación I* ya que entre las cinco formulaciones siempre dio cercana al 99 % y este valor siempre fue estable.

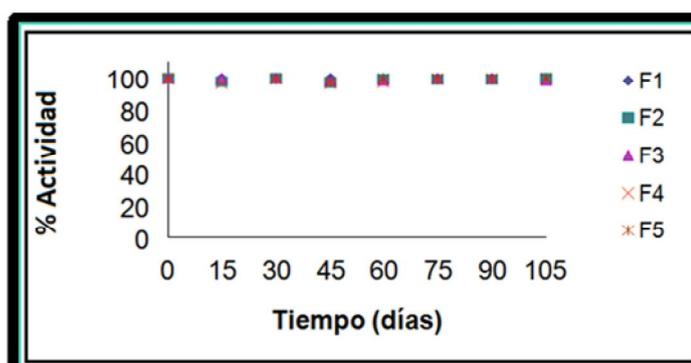


Figura 18. Estudio de estabilidad de ^{99m}Tc -1-TG de 0 a 105 días (Formulación I-V)

Aunque no se ha descrito en literatura la caracterización estructural de este radioconjugado, parece razonable suponer una coordinación bidentada, tridentada o tetradentada de β -Tioglucosa sobre el core de $Tc(V)=O$ a través de una geometría piramidal (Figura 15, complejos I-III).⁷² Es bien sabido que los ligandos tiolatos estabilizan fuertemente en centro $[Tc = O]^{3+}$ como se muestra en muchos modelos químicos de reactividad. En nuestro caso hemos visto que la marcación y formación del radioconjugado se realizó eficientemente a través de la reducción directa de pertecneciato.

Otra posibilidad a manejar en la formación de posibles complejos es una coordinación bidentada de la 1-TG mediante el grupo tiolato y algún átomo de oxígeno del grupo hidroxilo presente en el anillo glicosídico. En base a lo expuesto anteriormente, se llevó a cabo estudios iniciales de caracterización química del complejo ^{99m}Tc -1-TG mediante reacciones con precursores no radioactivos ($^{187}ReOCl_4$ o $^{187}ReO(PPh_3)_2Cl_3$)⁸¹⁻⁸² y su análisis por espectroscopia de RMN (Figura 19 y 20) y espectrometría de masas (Figura 21).

En primera instancia, se llevo a cabo la reacción entre 1-TG y el derivado tetracloroorozenio ($^{187}ReOCl_4$), el cual presenta una geometría piramidal y 4 sustituyentes cloro susceptibles de ser intercambiados por adecuados átomos donores de electrones. Con esta reacción se busca elucidar el o los posibles complejos organometálicos formados entre la 1-TG y ^{99m}TcO , dado la similitud de reactividad química entre ^{99m}Tc y ^{187}Re . La reacción mencionada anteriormente fue estudiada mediante RMN, donde como se puede observar en la figura 19A, correspondiente al experimento 1H-RMN, se pueden apreciar diversas señales de protones en la zona del espectro entre 3-4 ppm. Si este resultado lo comparamos con el espectro de 1H-RMN obtenido para la 1-TG (Figura 19), los resultados darían lugar a la formación de más de un tipo de complejo en la reacción, lo cual es concordante con los planteamientos mencionados anteriormente.

En la Figura 20A se pueden observar tres dobletes en la región entre 4.2 y 4.7 ppm (marcados con un asterisco rojo), los cuales serían los H1 (protón del carbono anomérico) correspondientes a cada uno de los complejos, lo cual se deduce de comparar con el espectro de 1H-RMN de la 1-TG (Figura 19). Dado que la mayoría de las señales en el

espectro 20A se encuentran solapadas (región entre 3 y 4 ppm), decidimos realizar un experimento de RMN llamado TOCSY-1D, con el objetivo de poder aislar las señales correspondiente a cada complejo, correlacionadas con su protón 1H (marcados con asterisco rojo).

El experimento TOCSY 1D es muy útil para la determinación de conectividades entre los protones de una molécula. En este tipo de experimento es posible observar picos de correlación cruzada para núcleos que están acoplados directamente, y entre los núcleos que están conectados por una cadena de acoplamiento. Esto se consigue mediante la inserción de una serie repetitiva de pulsos en donde se irradia un único protón, en nuestro caso fueron seleccionados los protones 1H (marcados con asterisco en rojo, Figura 20), dado que se encuentran suficientemente separadas las señales entre si en el espectro. En las Figuras 20B-D se pueden observar los resultados del TOCSY 1D. En estos espectros se pueden observar las señales de protones que se encuentran conectados en la molécula para cada uno de los protones 1H irradiados (asterisco rojo figura 20B-D). Tanto la secuencia del TOCSY 1D, como la utilizada para el ajuste de las condiciones de los pulsos no presentan ninguna dificultad operativa. La creación de los pulsos se efectúa con facilidad y rapidez mediante el software del equipo de RMN. En nuestro caso, el tiempo de spinlock utilizado en el experimento de las Figuras 20B-D fue de 70 ms.

Por otra parte, otros hechos a resaltar con mayor claridad luego de realizados los experimentos TOCSY 1D, son los corrimientos en desplazamientos químicos de ciertos protones del anillo de glicosídico. Si comparamos las señales de los protones 1H (asteriscos rojos Figura 20) que corresponderían a diferentes complejos organometálicos con respecto al protón 1H en el espectro de 1H-RMN de la 1-TG (Figura 19), ambos realizados en el mismo disolvente deuterado (CD_3OD), se observan claros corrimientos. Esto estaría indicando que el grupo tiolato ubicado en el carbono 1 de 1-TG, estaría actuando como ligando en todos los casos. En el mismo sentido, se observan corrimientos de señales para otros protones del anillo glicosídico, lo que podría sugerir que grupos hidroxilos del anillo también podrían estar actuando como ligando.

Otro estudio llevado a cabo como aproximación inicial de caracterización química de el/los complejo/s ^{99m}Tc -1-TG, fue la reacción entre 1-TG y el precursor tricloro-oxo-bis-trifenilfosfina renio (V) ($^{187}\text{ReO}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_3$), y su caracterización mediante espectrometría de masa. Este precursor es muy utilizado como agente intercambiador de ligandos en la formación de complejos organometálicos de oxorenio con estructuras tanto piramidal como octaédrica. En el espectro de masa obtenido para esta reacción se pueden observar tres picos que podrían corresponder con tres complejos de 1-TG- ^{187}Re (Figura 21, asteriscos *, **, ***). El pico correspondiente a una relación m/z de 1313 se corresponde con un posible complejo con tres unidades de 1-TG (como ligando monodentado) y dos de trifenilfosfina unidas al sistema oxorenio, formando así un complejo de estructura octaédrica (complejo *, Figura 21). El posible complejo **, con una relación m/z de 1117, con dos unidades de trifenilfosfina y dos de 1-TG, la cual podría actuar como ligando monodentado o bidentado, formando así complejos de oxorenio con estructuras piramidal y octaédrica, respectivamente. Finalmente, se observa en el espectro de masa un pico m/z=843 (asterisco ***), el cual correspondería a un complejo de oxorenio de geometría piramidal, presentando dos moléculas de trifenilfosfina y una de 1-TG, la cual actuaría como ligando bidentado.

En resumen, de los resultados obtenidos en los estudios hacía una aproximación a la caracterización química del complejo 1-TG- ^{99m}Tc , se puede plantear la formación de más de un complejo mediante el uso de precursores no radiactivos y la posibilidad de coordinación vía átomo de azufre e hidroxilo del anillo de D-glucosa, tanto como ligando mono y/o bidentado.

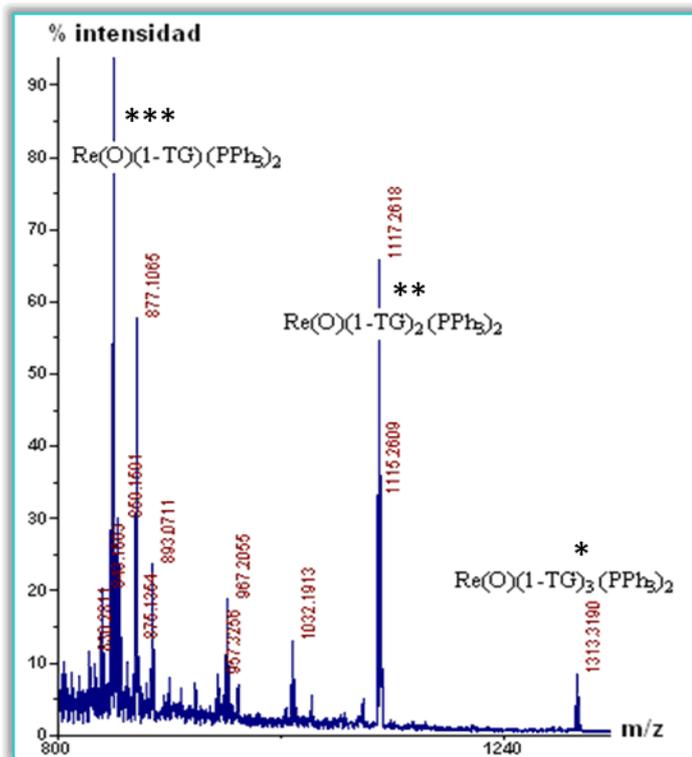


Figura 21. Espectro de masa (MALDI-TOF) obtenido de la reacción entre 1-Tio- β -D-Glucosa y $^{187}\text{ReO}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_3$.

6.1.2 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA *IN VITRO*: CAPTACIÓN CELULAR

El complejo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -1-TG se incubó con la línea celular B16F1 mantenida en un medio libre de D-glucosa, para estudiar *in vitro* la acumulación a través de los transportadores GLUT, del complejo en las células de melanoma murino. Por otra parte, con el objetivo de estudiar la selectividad del transporte mediado por los transportadores Glut se realizó un ensayo de competencia en presencia de D-glucosa (sustrato natural) y 1-TG (sustrato sintético).

En la Figura 22 se representa la actividad en CPM, la cual corresponde a la actividad remanente en las células luego de tres lavados con PBS, en donde las células se centrifugaron, se descartó el sobrenadante (descartando la actividad que no ingresó al interior celular) y el pellet se lavó en cada ciclo.

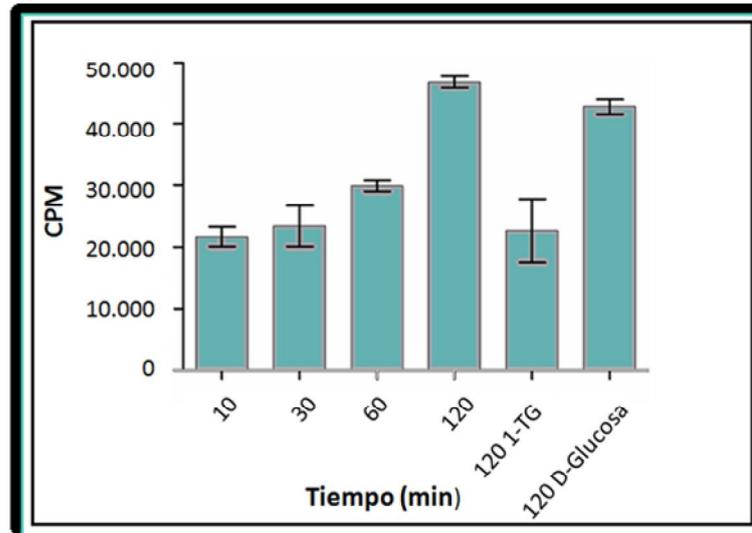


Figura 22. Estudio de internalización de ^{99m}Tc -1-tio- β -D-glucosa en células B16F1 a 37 °C a 10, 30, 60 y 120 minutos. Los períodos de incubación de los bloqueos son de 120 minutos con 1-tio- β -D-glucosa y D-Glucosa. Las cuentas totales de radiactividad son expresadas como CPM.

La captación celular de ^{99m}Tc -1-tio- β -D-glucosa es 5.2%, 5.6%, 7.2% y 11.3% a los 10, 30, 60 y 120 minutos respectivamente, lo que sugiere que ^{99m}Tc -1-tio- β -D-glucosa se transporta a las células. Por otro lado, el bloqueo realizado con D-glucosa se llevó a cabo para determinar si la captación celular es GLUT 1 específica. En esta condición, el porcentaje fue de 10.3 % a 120 minutos.

El bloqueo con 1-TG mostró una captación del 5.5% de la actividad total respecto a la actividad de glucosa libre, es decir 1-TG bloquea a la mitad la captación. El porcentaje de captación a 120 minutos en presencia de D-glucosa fue similar al porcentaje de captación sin D-glucosa. Estos resultados sugieren que se usan distintas vías para el ingreso a las células. Resultados similares se observaron con ^{99m}Tc -1-tio- β -D-glucosa con otras líneas celulares de cáncer.⁶³ Acumulación por otros transportadores GLUT, difusión pasiva o asociación a la membrana celular pueden ser los responsables de los resultados obtenidos.

6.1.3 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA *IN VIVO*

6.1.3.1 ESTUDIO DE BIODISTRIBUCIÓN

Los estudios de biodistribución se resumen en la Tabla 10 y 11. Los estudios de biodistribución de ^{99m}Tc -1-TG a 1 y 4 horas post-inyección mostraron una rápida distribución tanto en ratones normales (Tabla 10) como en ratones portadores de melanoma (Tabla 11). La captación de radiactividad en órganos normales fue superior en los riñones ($8.62 \pm 1.99\%$ y $7.30 \pm 1.61\%$ a 1 y 4 horas respectivamente) y en el hígado ($8.02 \pm 2.60\%$ y $8.60 \pm 2.24\%$ a 1 y 4 horas respectivamente). Los ratones portadores de melanoma mostraron un patrón de biodistribución similar (Tabla 11). Se observó una significativa captación a nivel tumoral 1 hora post-inyección ($3.09 \pm 0.96\%$), aumentando a 4.70% en 4 horas (Tabla 11).

Tabla 10. Biodistribución de ^{99m}Tc -1-tio- β -D-glucosa (% DI / g \pm SD, n = 3) en ratones C57BL/6 normales a 1 y 4 horas.

Ratón C57 BL/6 normal		
Órgano	1 h	4 h
% de Dosis inyectada/gramo (%ID/g)		
Sangre	1.66 \pm 0,10	0.51 \pm 0,19
Hígado	2.14 \pm 0,70	3.36 \pm 0,04
Corazón	0.53 \pm 0,03	0.98 \pm 0,52
Pulmones	1.07 \pm 0,51	1.38 \pm 0,36
Bazo	0.44 \pm 0,16	0.75 \pm 0,21
Riñones	8.24 \pm 2,79	9.14 \pm 0,62
Tiroide	0.15 \pm 0,07	0.07 \pm 0,02
Músculo	0.25 \pm 0,06	0.35 \pm 0,05
Hueso	0.15 \pm 0,15	0.10 \pm 0,12
Estómago	0.62 \pm 0,31	0.99 \pm 0,29
Cerebro	0.07 \pm 0,05	0.09 \pm 0,03
% de Dosis inyectada (%ID)		
Intestino	14.20 \pm 1,75	21.59 \pm 4,05
Vejiga y Orina	37.96 \pm 2,38	72.88 \pm 3,64

Tabla 11. Biodistribución de ^{99m}Tc -1-tio- β -D-glucosa (% DI / g \pm SD, n = 3) en ratones C57BL/6 portador de melanoma a 1 y 4 horas.

Órgano	Ratón C57 BL/6 portador de melanoma	
	1 h	4 h
% de Dosis inyectada/gramo (%ID/g)		
Sangre	3,76 \pm 1,12	1,48 \pm 0,12
Hígado	3,85 \pm 0,52	4,22 \pm 0,08
Carazón	0,45 \pm 0,07	1,41 \pm 0,42
Pulmones	0,42 \pm 0,12	0,46 \pm 0,2
Bazo	0,64 \pm 0,26	0,94 \pm 0,20
Riñones	12,24 \pm 2,79	15,6 \pm 0,5
Tiroide	0,43 \pm 0,21	0,56 \pm 0,13
Músculo	0,85 \pm 0,19	1,01 \pm 0,09
Hueso	0,39 \pm 0,15	1,07 \pm 0,15
Estómago	0,22 \pm 0,11	2,25 \pm 0,40
Cerebro	0,05 \pm 0,01	0,15 \pm 0,09
Tumor	3,09 \pm 0,96	4,70 \pm 1,80
% de Dosis inyectada (%ID)		
Intestino	7,65 \pm 2,23	16,42 \pm 3,50
Vejiga y Orina	35,15 \pm 3,38	64,88 \pm 5,42

Los resultados de las biodistribuciones mostraron una alta captación en los riñones y la vejiga en los tiempos estudiados, indicando que el radiofármaco es removido de la sangre por eliminación renal. La captación más baja se observó en el cerebro, lo cual refleja que ^{99m}Tc -1-tio- β -D-glucosa no es análogo de ^{18}F FDG. La captación en ratones portadores de melanoma en hígado es $3.85 \pm 0.52\%$ ID/g y $4.22 \pm 0.08\%$ ID/g a 1 y 4 horas post-inyección respectivamente. ^{99m}Tc -1-TG mostró una buena captación en tumor de melanoma siendo $3.09 \pm 0.96\%$ ID/g y $4.70 \pm 1.80\%$ ID/g, a 1 y 4 horas respectivamente. La relación tumor-músculo (órgano no blanco) para ^{99m}Tc -1-TG a 1 y 4 horas fue 3.6 y 4.6 respectivamente. Estos valores representan un resultado prometedor para ser considerado el radioconjugado ^{99m}Tc -1-TG un potencial radiofármaco de diagnóstico. La alta eliminación renal es favorable para la remoción rápida del radiotrazador dentro del organismo.

6.1.3.2 IMÁGENES CENTELLOGRÁFICAS

Las imágenes se tomaron 2 horas post-inyección, luego de la administración por vía endovenosa del compuesto marcado. Las imágenes mostraron alta captación en riñones (Figura 23, B). Los tumores de los ratones C57BL/6 portadores de melanoma inducidos vía subcutánea son palpables fácilmente (Figura 23). Los resultados obtenidos concuerdan con los estudios de biodistribución (Tabla 10). La baja captación observada en los tejidos de los músculos que los rodean otorga un buen contraste para la imagen del ratón portador de melanoma.

El hecho que en las imágenes centellográficas no se observe captación hepática ni en ratones normales ni en portadores de melanoma, puede deberse a la diferencia en la cantidad de ^{99m}Tc -1-TG inyectada en los ratones (1 MBq para estudios de biodistribución y 15 MBq para toma de imágenes centellográficas). Es posible que al inyectar una masa mayor de 1-TG para estudios de imágenes centellográficas, enmascaren uniones no específicas a proteínas de la sangre y otros tejidos normales.

También es de interés que no hay captación significativa en hígado, corazón ni cerebro en las imágenes a dos horas, tanto en ratones normales como en portadores de melanoma, como sí sucede con la ^{18}F FDG.

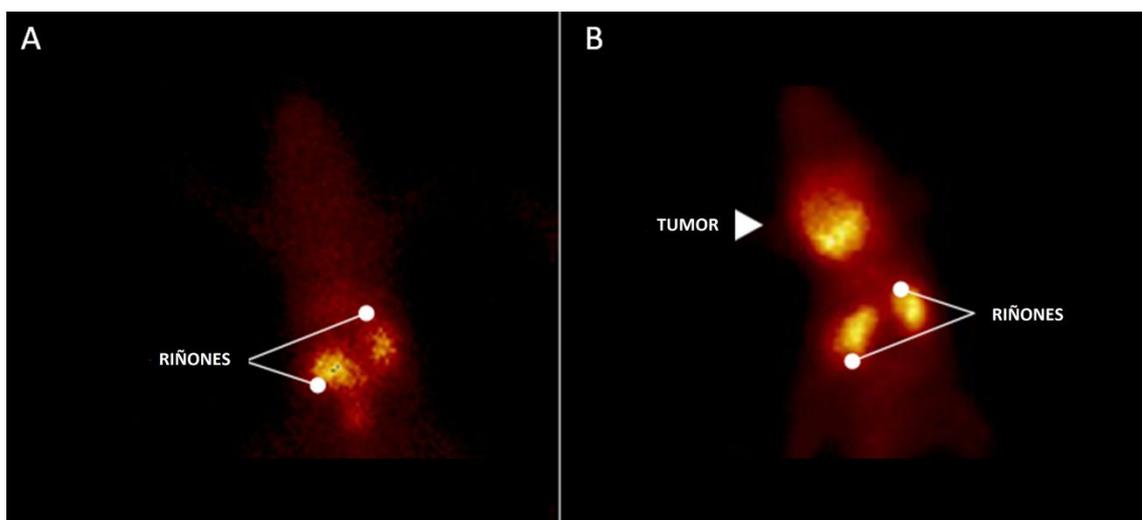
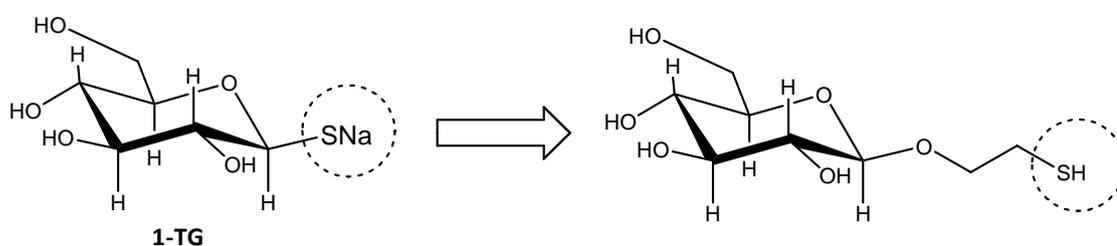


Figura 23. (A) Imagen centellográfica de un ratón C57/6 normal luego de 2 horas post-inyección de ^{99m}Tc -1-tio- β -D-glucosa. (B) Imagen centellográfica de un ratón (inoculado subcutáneamente dos semanas previas al estudio con 2.5×10^5 células B16F1 en 0.1mL de buffer fosfatos salino) a 2 horas post-inyección intravenosa de ^{99m}Tc -1-tio- β -D-glucosa.

6.2 ^{99m}Tc -DERIVADOS DE GLUCOSA

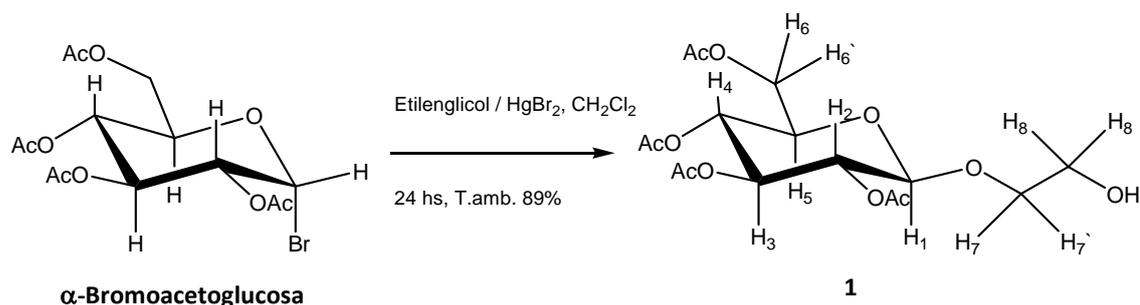
6.2.1 SÍNTESIS ORGÁNICA

Dentro de los objetivos planteados en el presente trabajo, se encuentra el diseño y síntesis orgánica de un derivado de glucosa portando un grupo funcional tiol para su marcación con ^{99m}Tc . Así, se pretende desarrollar una estructura derivada de D-glucosa que pueda incorporar ^{99m}Tc , manteniendo la estructura fundamental de la misma para asegurar el efectivo pasaje a través de los transportadores específicos de esta y así poder ser captada por células neoplásicas con aumento del metabolismo de la D-glucosa. Así, se plantea un derivado de D-glucosa modificado en el carbono anomérico (C1), con un espaciador que pueda aportar un ligando tiolato para su unión al ^{99m}Tc y adecuadas propiedades lipofílicas / hidrofílicas según la aplicación (Esquema 1). Para la obtención de la estructura planteada se ensayaron metodologías convencionales en síntesis orgánica.



Esquema 1. Diseño de un derivado de glucosa portando un grupo funcional tiol

En un primer paso de reacción, para la obtención del derivado de glucosa **1** se partió del 1-Bromo-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glucopiranosido (reactivo comercial) como reactivo de partida. Este primer paso involucra una glicosidación de Koenigs-Knorr utilizando bromuro de mercurio (II) y etilenglicol, obteniéndose el producto deseado con excelente rendimiento (Esquema 2).^{56,59}



Esquema 2. Reacción de Koenigs-Knorr para la obtención del O-Glicósido **1**.

El derivado **1** se caracteriza mediante experimentos de IR y RMN. En particular, en el experimento de ^1H -RMN se evidenció la presencia de un único anómero (Figura 24. La constante de acoplamiento (J) del protón H-1 (4.58 ppm) del anillo glicosídico con respecto al protón H-2 (5.10 ppm) presentó un valor de 8 Hz, nos estaría indicando un acoplamiento H1-H2 axial-axial, confirmando la presencia del anómero β . La asignación de los protones del derivado **1** se realizó mediante experimentos de ^1H -RMN y COSY (correlación bidimensional H-H vecinos). En el espectro COSY para el alcohol **1** se observó que las señales de los protones H-6a y H-6b presentan un patrón característico de protones diasterotópicos, con un solapamiento de señales a 4.22 ppm. Los entornos de estos hidrógenos en un grupo metilénico ($-\text{CH}_2-$) ni son idénticos ni son imágenes especulares entre si, por lo que no son equivalentes y presentan una señal de ^1H -RMN para cada uno de ellos. La asignación de la señal del protón metílico H-1 en 4.58 ppm se confirmó ya que presenta correlación únicamente con un solo protón, H-2. Los protones de la cadena lateral H-7a y H-7b mostraron un patrón característico de protones diasterotópicos, con un solapamiento de las señales a 3.88 ppm.

El IR realizado al glicósido **1** confirmó la presencia del grupo alcohol presentando una señal característica de enlace O-H libre de intensidad fuerte (aguda) con frecuencia de estiramiento (ν) en el rango de $3200 - 3400 \text{ cm}^{-1}$. A su vez se puede observar la frecuencia de deformación (δ_{ip}) en el rango $1260-1410 \text{ cm}^{-1}$ con intensidad media para el enlace OH. Por otro lado se observó la señal característica del grupo acetal (C-O-C-O-C) dentro del rango

1040 – 1200 cm^{-1} , y enlace C-O del grupo acetal con de intensidad fuerte, en el rango de 1020 - 1250 cm^{-1} .

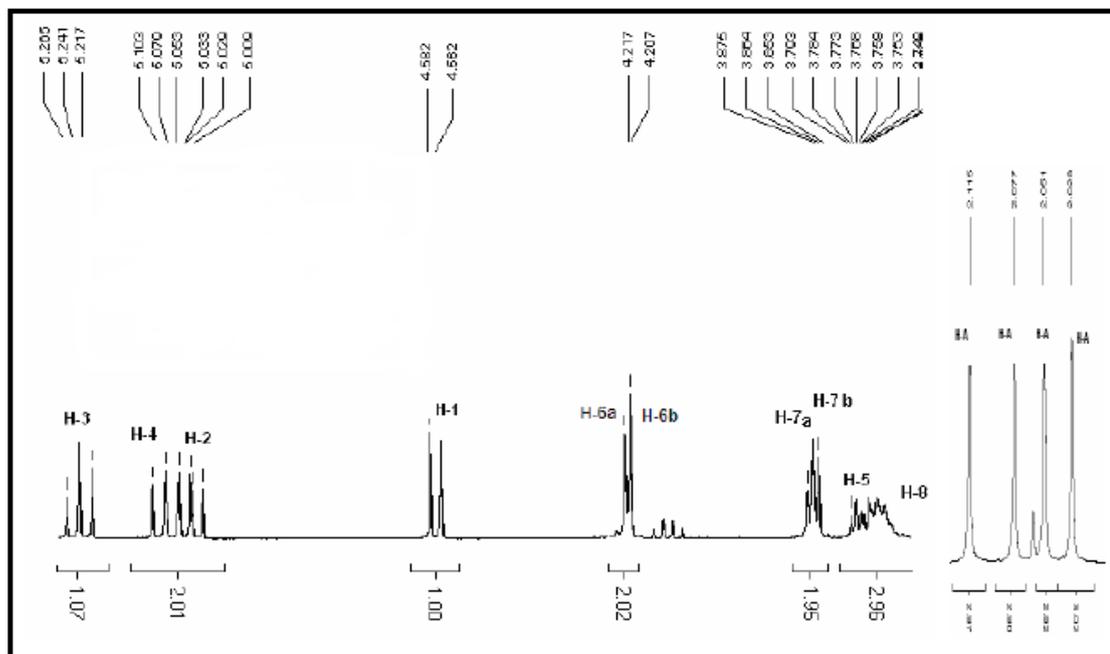
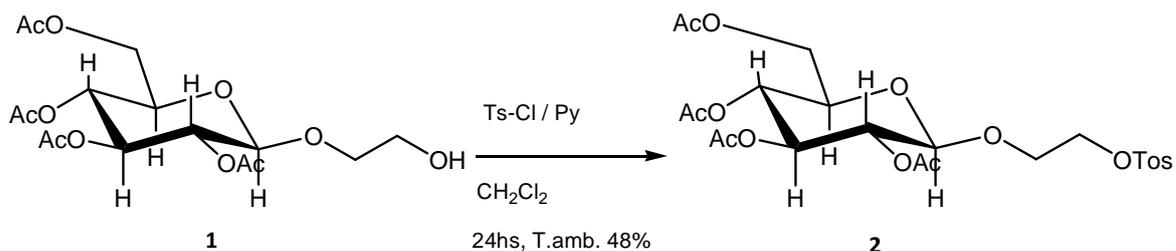
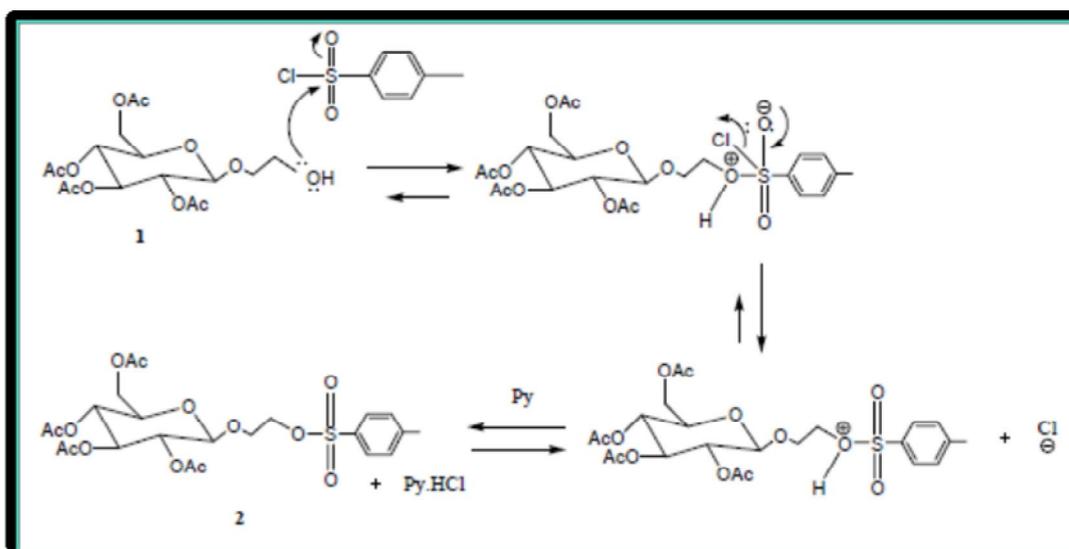


Figura 24. Regiones ampliadas del espectro de ^1H -RMN en CDCl_3 obtenido para alcohol **1**.

A partir del compuesto **1** se llevó a cabo una reacción de tosilación sobre el grupo hidroxilo para convertirlo en un buen grupo saliente (Esquema 3). Para ello se utilizó cloruro de *p*-toluensulfonilo en presencia de piridina generando el derivado **2**, obteniéndose el mismo con un rendimiento moderado. En el Esquema 4 se plantea el mecanismo para la obtención del derivado **2**. El espectro de ^1H -RMN confirma la presencia de las señales características de protones aromáticos del grupo tosilo. Por otra parte, el espectro infrarrojo (IR) realizado presenta una señal característica del enlace $\nu \text{S=O}$ (agrupamiento sulfónico) en el rango de 1300-1375 cm^{-1} intensidad fuerte y se observa la ausencia de la señal característica del enlace O-H en el reactivo de partida. Confirmando la presencia del acetal se observan señales del enlace C-O-C-O-C dentro del rango 1040 – 1200 cm^{-1} , y enlace C-O con de intensidad fuerte, en el rango de 1020 - 1250 cm^{-1} .

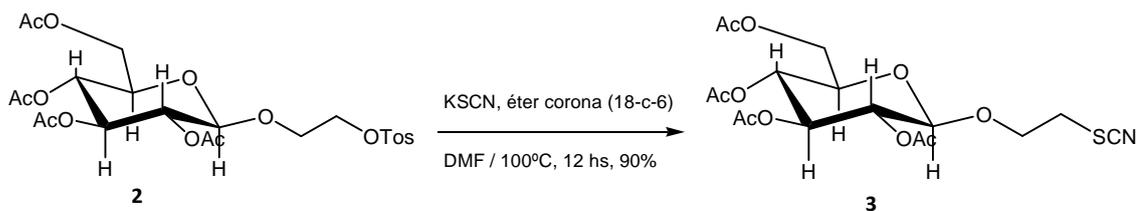


Esquema 3. Reacción de tosilación para la obtención del derivado **2**.



Esquema 4. Mecanismo propuesto para la obtención del derivado tosilado **2** a partir del derivado **1**.

Seguidamente la obtención del tiocianato **3** se lleva a cabo mediante una reacción de sustitución nucleofílica sobre el derivado tosilado **2** en presencia de tiocianato de potasio y éter corona, utilizando DMF seca como disolvente de reacción (Esquema 5). El éter corona cíclico utilizado (con los átomos de oxígeno orientados al interior) presenta un tamaño adecuado para una buena quelación del catión potasio, haciendo que anión tiocianato este más disponible para la sustitución nucleofílica deseada. Bajo estas condiciones de reacción el derivado **3** se obtiene con excelente rendimiento bajo condiciones de calentamiento por varias horas.



Esquema 5. Reacci\u00f3n de sustituci\u00f3n nucleof\u00edlica para la obtenci\u00f3n del derivado **3**.

En las Figuras 25 y 26 se muestran los espectros de $^1\text{H-RMN}$ y HSQC (correlaci\u00f3n bidimensional de $^1\text{H-C}_1$), respectivamente, para el derivado **3**. En el espectro de $^1\text{H-RMN}$ se observa que tanto las se\u00f1ales de los protones H-6 como de los protones H-7 y H-8 presentan un patr\u00f3n caracter\u00edstico de protones diasterot\u00f3picos. En estos dos \u00faltimos protones seguramente su efecto diasterot\u00f3pico sea debido a la presencia del centro estereog\u00e9nico del carbono anom\u00e9rico (C1). En el espectro HSQC se observa que efectivamente las se\u00f1ales de H-6a y H-6b se correlacionan con el carbono C-6, mientras que las se\u00f1ales de H-7a y H-7b se correlacionan con el carbono C-7. Tambi\u00e9n, como era de esperarse, se observan las correlaciones de H-8a y H-8b con C-8. Otra se\u00f1al relevante que se puede observar del HSQC para el derivado de tiocianato **3** es la se\u00f1al a 112 ppm (espectro de $^{13}\text{C-RMN}$, eje y). Esta no presenta acoplamiento con ning\u00fan H de la mol\u00e9cula, indicando que no presenta ning\u00fan tipo de prot\u00f3n vecino a un enlace de distancia. Esta se\u00f1al si se compara con valores de Tablas para se\u00f1ales caracter\u00edsticas de grupos funcionales, resulta ser la se\u00f1al de carbono del grupo tiocianato, confirmado as\u00ed la asignaci\u00f3n del derivado **3**.

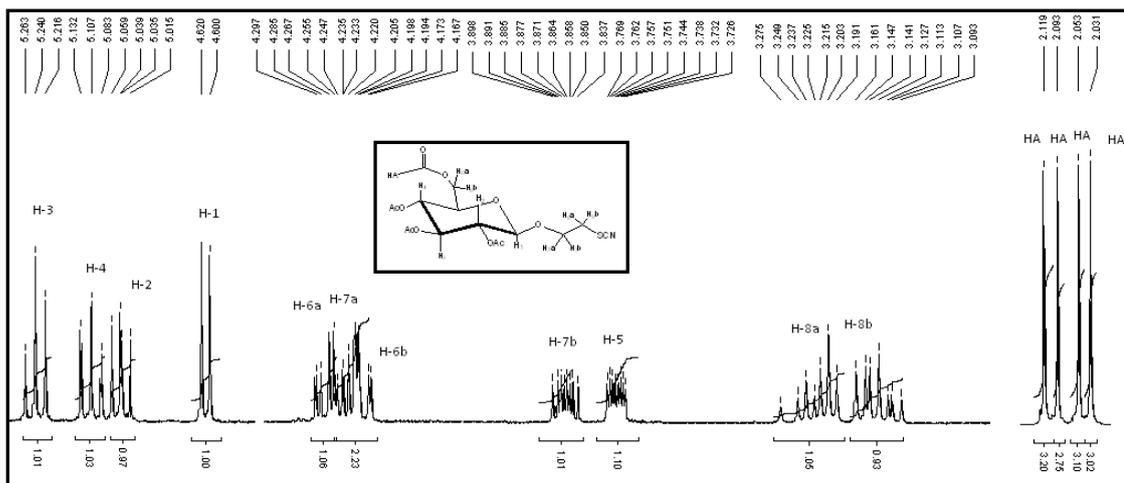


Figura 25. Espectro ^1H -RMN del derivado 3 en CDCl_3 .

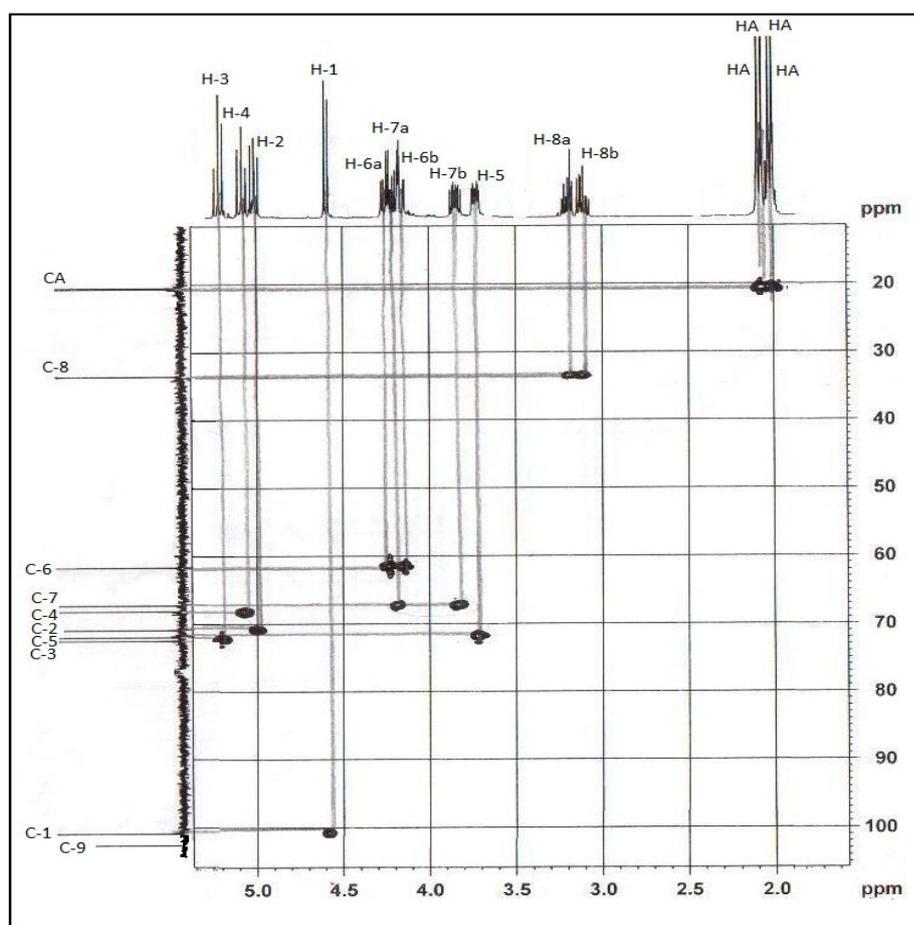
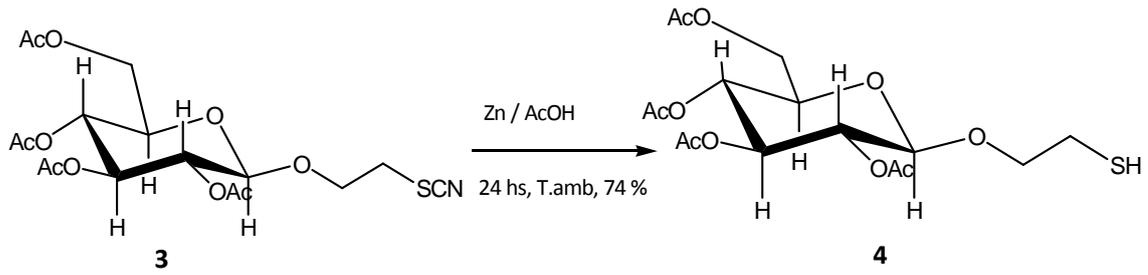


Figura 26. Espectro HSQC del derivado 3 en CDCl_3 .

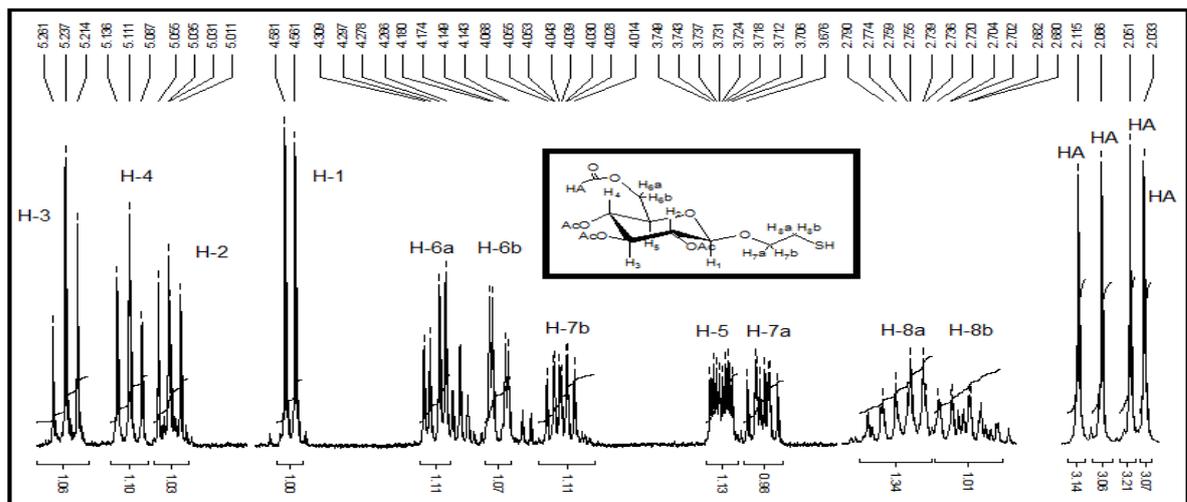
Por otra parte, el IR realizado confirma la presencia del grupo tiocianato al observarse las señales características $\nu \text{C}\equiv\text{N}$, en el rango de $2240 - 2260 \text{ cm}^{-1}$ de intensidad media y $\nu \text{C-S}$ en el rango de $600-800 \text{ cm}^{-1}$ con intensidad débil. A su vez se puede confirmar la presencia del agrupamiento acetal, observándose señales para $\nu \text{C-O-C-O-C}$ dentro del rango $1040 - 1200 \text{ cm}^{-1}$, y $\nu \text{C-O}$ con de intensidad fuerte, en el rango de $1020 - 1250 \text{ cm}^{-1}$. Por otra parte se confirma la ausencia del grupo sulfona ($\text{O}=\text{S}=\text{O}$) de **2**, debido a la desaparición de la señal en 1360 cm^{-1} .

Seguidamente, para la obtención del tiol **4** se llevo a cabo una reacción de reducción del agrupamiento tiocianato en el derivado **3** utilizando Zinc activado como agente reductor en medio ácido (Esquema 6). El Zn^0 utilizado presentaba un tamaño de partícula de 4 \AA y fue tratado con una solución ácida previo a su utilización para la eliminación de los óxidos formados en su superficie. Bajo estas condiciones de reducción el producto de interés **4** se obtiene con un muy buen rendimiento.

Los resultados del espectro infrarrojo realizado confirmaron la presencia del grupo tiol al observarse las señales características para $\nu \text{C-S}$ en el rango de $600 - 800 \text{ cm}^{-1}$ y $\nu \text{S-H}$ en el rango de $2550 - 2600 \text{ cm}^{-1}$. Con los espectros de $^1\text{H-RMN}$ (Figura 27) y COSY (Figura 28) para el derivado **4** se pudieron asignar inequívocamente todas las señales de protones para este compuesto. En el espectro COSY para el tiol **4** se observa que las señales de los protones H-6a y H-6b presentan un patrón característico de protones diasterotópicos, con una clara correlación entre ellos. La asignación de la señal del protón metínico H-1 en 4.56 ppm es confirmada además ya que presenta correlación únicamente con un solo protón, H-2 (5.01 ppm). Los protones de la cadena lateral H-7a y H-7b muestran también el patrón característico de protones diasterotópicos, además de presentar interacción con H-8 en 2.79 ppm.



Esquema 6. Reacción para la obtención del derivado 4.

Figura 27. Ampliación de zonas del espectro ^1H -RMN del derivado 4 en CDCl_3 .

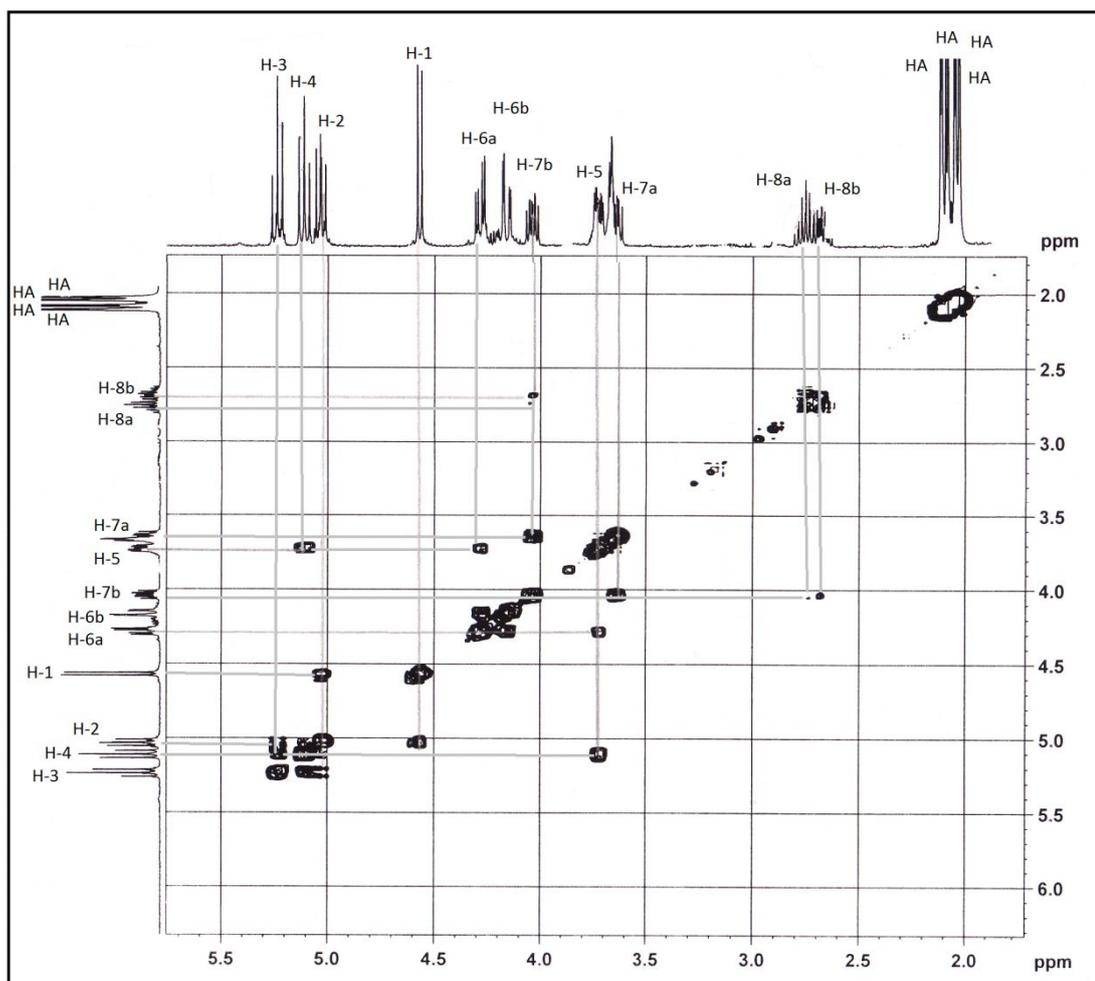


Figura 28. Espectro COSY del derivado **4** en CDCl_3 .

Finalmente se realiza la desprotección de los grupos hidroxilo del derivado de glucosa **4** con metóxido de sodio y posterior neutralización con ácido acético rinde el derivado de glucosa **5** deseado (Esquema 7). Bajo las condiciones experimentales de trabajo el derivado **5** se aísla como una mezcla de tiolato /tiol ($X=\text{Na}$ o H , Esquema 7), en una relación 4:3, resultado obtenido a partir de las relaciones de integración para protones característicos en el espectro de ^1H -RMN (relación $\text{H}8/\text{H}8'$, Figura 29). Con los espectros de ^1H -RMN (Figura 29) y COSY para el derivado **5** se pudieron asignar inequívocamente todas las señales de protones para este compuesto. En el espectro ^1H -RMN (Figura 29) se observan señales correspondientes a una mezcla de los compuestos **5a/5b**. La asignación de los protones H-8a y H-8b correspondientes a **5a**, los cuales se encuentran más blindados que los H-8a' y H-8b'

en **5b**, se debe al efecto electrónico del anión tiolato. A su vez, se evidencia la desaparición de los grupos acetilo (región del espectro no mostrada), por lo cual podemos afirmar que el producto obtenido es el deseado.



Esquema 7. Reacción de desprotección para la obtención del derivado **5**.

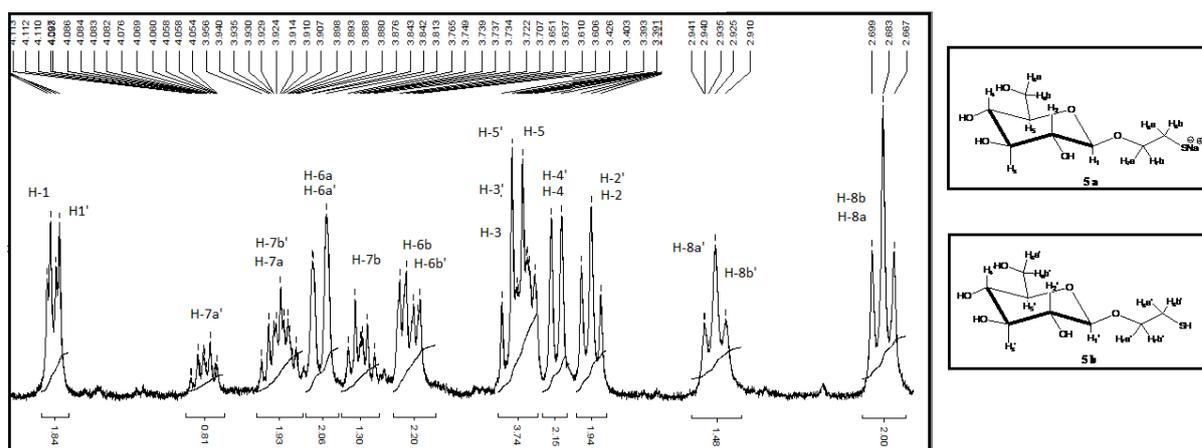


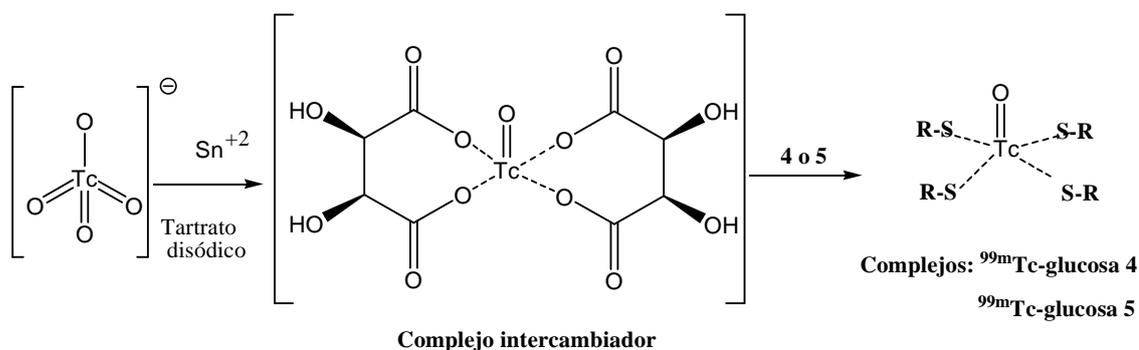
Figura 29. Espectro ¹H-RMN del derivado **5** en D₂O.

6.2.2 SÍNTESIS RADIOQUÍMICA

En esta etapa del trabajo y siguiendo con los objetivos específicos planteados, se procede a estudiar condiciones de radiosíntesis o marcación del derivado de glucosa **5** con ^{99m}Tc . Por otra parte, dado que la funcionalidad éster cuando incorpora un agrupamiento acetilo, puede fácilmente hidrolizarse en un medio biológicos (por esterasas por ejemplo), y que el derivado de 1-beta-Tioglucosa tetraacetilado mostró previamente que puede ser utilizado para la detección tumores,⁷³ se selecciono además al derivado de glucosa **4** portando el agrupamiento tiol, para su marcación con ^{99m}Tc . En este contexto, se seleccionaron dos estrategias para estudiar la marcación:

Procedimiento A

Se realizó la radiosíntesis de los derivados **4** y **5** con ^{99m}Tc . Se utilizó el agente quelante tartrato disódico, posteriormente se agregaron 370 MBq/0.05 mL de $^{99m}\text{TcO}_4^-$, y seguidamente el agente reductor $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en condiciones neutras, y así formar un complejo intercambiador para su reacción con los derivados **4** y **5** (Esquema 8). Para los derivados **4** y **5** se realizó la radiosíntesis en condiciones neutras, evitando así las típicas condiciones ácidas de marcación como forma de evitar que los derivados puedan ser desglucosidados.



Esquema 8. Estrategia A de marcación para los derivados de glucosa **4** y **5** con ^{99m}Tc .

Para la cuantificación de la marcación de los compuesto **4** y **5** marcados mediante la adición del agente quelante (tartrato de sodio), se utilizó un HPLC con detección gamma, empleando una columna C18 de fase reversa. Los gradientes y disolventes utilizados se detallan en la Tabla 9.

Tabla 9. Especificaciones de disolventes, gradientes y flujo para control cromatográfico mediante HPLC con detector gamma para los conjugados resultantes de la marcación con ^{99m}Tc de los derivados de glucosa **4** y **5**.

Fase móvil	t = 0 min	t = 30min	t = 35 min
H ₂ O/TFA 0.1%	100 %	0 %	100 %
ACN/TFA 0.1%	0 %	100 %	0 %
Flujo (mL/min)	1	1	0

En la Figura 30 se observa el perfil cromatográfico para el derivado **4**, controlado inmediatamente luego de realizada la radiosíntesis. A tiempo de retención 15.97, 16.33 y 16.82 minutos se obtuvo un porcentaje de marcación de 55.52 %, 16.33 % y 11.29 %, respectivamente. El 16.33 % corresponde al complejo intercambiador ^{99m}Tc -tartrato ya que en estudios previos, al controlar la marcación del ^{99m}Tc con tartrato (resultados no mostrados), el tiempo de retención era de 16.33 minutos (Figura 30, estrella azul). Los otros picos corresponderían a la formación de dos complejos de ^{99m}Tc -derivado **4** (Figura 30, asteriscos rojos). Cabe destacar que en el perfil cromatográfico no se observó una de las dos posibles impurezas radioquímicas, el $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (tiempo de retención 3 - 5 min, Figura 16A). La otra posible impureza, el $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, no se observa en el cromatograma debido a que queda retenido en la columna. Igualmente, al sumar los porcentajes de marcación y restárselos a la actividad inyectada en el HPLC, se conoce el porcentaje de $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ que pudo haberse formado en la radiosíntesis. En este caso se obtuvo un valor de 26.86 %. En estas condiciones de trabajo y con estos resultados obtenidos el derivado **4** no podría ser

utilizado como radiofármaco de diagnóstico (sin una purificación previa), ya que no supera el 95 % de PRQ.

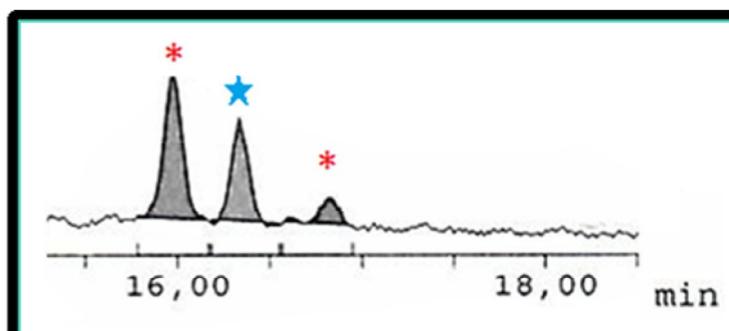


Figura 30. Cromatograma HPLC con detección gamma de la marcación de ^{99m}Tc del derivado **4**, mediante el uso del agente quelante tartrato de sodio (estrategia A). Control realizado inmediatamente luego de la radiosíntesis.

Luego de los 60 minutos de realizada la radiosíntesis se controló el perfil de marcación mediante HPLC con detección gamma. En la Figura 32 se puede observar el cromatograma de dicho control. En la misma se aprecia un cambio en el perfil cromatográfico. Anteriormente (Figura 30) se observaban tres radioconjugados y en la reacción gran presencia de $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Al cabo de 1 hora de la radiosíntesis se puede apreciar en la Figura 31 las presencia de dos picos (asteriscos rojos), a tiempo de retención 16.90 y 17.28 minutos, para ellos se obtuvo un porcentaje de marcación de 89.59 % y 10.41 %, respectivamente. Estos resultados sugieren la existencia de dos tipos de complejos $^{99m}\text{Tc-4}$, y la ausencia tanto del intercambiador tartrato- ^{99m}Tc como de impurezas radioquímicas.

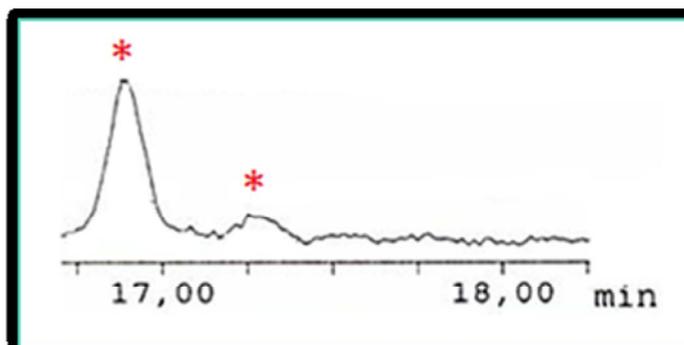


Figura 31. Cromatograma HPLC con detección gamma de la marcación del derivado **4** con ^{99m}Tc , mediante el uso del agente quelante tartrato de sodio (estrategia A). Control realizado a tiempo 60 min.

Posteriormente se realizaron los controles correspondientes a la radiosíntesis de ^{99m}Tc con el derivado **5**. El perfil de los cromatogramas de los controles realizados mediante HPLC con detección gamma para la marcación del derivado **5**, no fueron reproducibles. En los mismos se obtuvieron varios picos correspondientes a impurezas. Por lo tanto, luego de estos resultados, se procedió a realizar la marcación directa (Procedimiento B) de los derivados **4** y **5**.

Procedimiento B

En primer lugar se buscaba estudiar si el intercambio del agente quelante tartrato disódico por el derivado **4** inducía una unión particular al pertechnetato. Por lo cual, se realizó la marcación directa del derivado **4** con ^{99m}Tc . En segundo lugar se quería estudiar la posibilidad que el derivado **5** se pudiese marcar mediante esta metodología.

Se realizó la radiosíntesis de los derivados **4** y **5** con ^{99m}Tc . Se agregó 370 MBq/0.05 mL de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ a cada derivado y luego se añadió el agente reductor $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en condiciones neutras. Se mantienen las condiciones de pH por lo mencionado en el Procedimiento A.

Para la cuantificación de la marcación de los compuestos **4** y **5**, se utilizó un HPLC con detección gamma, empleando una columna C18 de fase reversa; los gradientes y disolventes utilizados se detallan en la Tabla 9.

En la Figura 32 se observa el perfil cromatográfico para el derivado **4**, controlado luego de los 60 minutos de realizada la radiosíntesis. Se controló también la radiosíntesis inmediatamente luego de realizada la radiosíntesis, y el perfil cromatográfico y los porcentajes de marcación fueron similares. En el cromatograma de la Figura 32 se observa la formación de dos picos. A tiempo de retención 16.90 y 4.27 minutos se obtuvo un porcentaje de marcación de 96.31 % y 3.46 %, respectivamente. El 3.46 % corresponde a $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (Figura 32, flecha azul), ya que el tiempo de retención se encuentra entre 3 - 5 minutos (Figura 16A). El pico de 16.90 minutos corresponde a la formación del complejo $^{99m}\text{Tc-4}$ (Figura 32, asterisco rojo) con un muy buen porcentaje de marcación. Se calculó el porcentaje de $^{99m}\text{TcO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ y el mismo fue de 0.23 %. Por lo tanto, el control de la marcación directa al cabo de 1 hora muestra un buen porcentaje de marcación del derivado **4** con ^{99m}Tc , obteniéndose un único complejo.

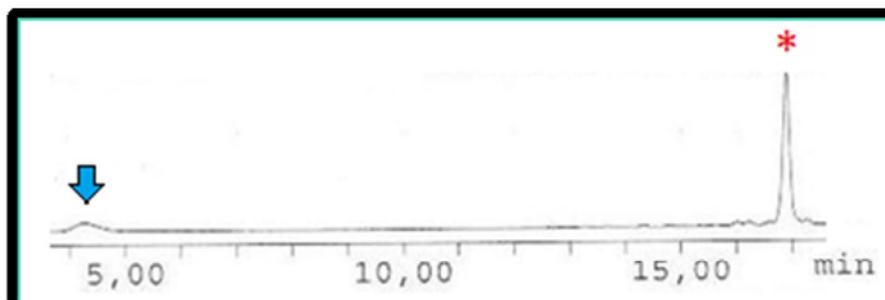


Figura 32. Cromatograma HPLC con detección gamma de la marcación de **4** con ^{99m}Tc , mediante marcación directa (estrategia B). Control realizado a tiempo 60 min.

Por lo tanto se ha visto que la marcación y formación del radioconjugado del derivado **4** se realiza eficientemente tanto a través de preformación del complejo ^{99m}Tc -tartrato mediante intercambio de ligando como a través de la reducción directa de pertecneciato, luego de una

hora de radiosíntesis. Posteriormente, se realizaron los controles correspondientes a la radiosíntesis de ^{99m}Tc con el derivado **5**. Los resultados obtenidos fueron similares a los del procedimiento A.

El perfil de los cromatogramas de los controles realizados mediante HPLC con detección gamma para la marcación del derivado **5**, no fueron reproducibles. Se obtuvieron nuevamente varios picos correspondientes a impurezas y no al compuesto marcado.

VII. CONCLUSIONES

El derivado de glucosa, 1-TG, fue exitosamente marcado con ^{99m}Tc y el radioconjugado obtenido fue evaluado química y biológicamente, utilizando tanto modelos *in vitro* como *in vivo*. En este contexto, se realizaron biodistribuciones e imágenes en ratones C57BL/6 normales y portadores de melanoma murino. Estos estudios mostraron gran selectividad del radioconjugado 1-TG- ^{99m}Tc en los tumores y una rápida eliminación renal. Dado estos resultados, se puede concluir que este radioconjugado es un agente prometedor para el diagnóstico de melanoma, y podría ser considerado como un potencial radiofármaco.

Como aproximación a la caracterización química del complejo ^{99m}Tc -1-TG se pudo confirmar la formación de más de un complejo mediante el uso de precursores no radiactivos y la posibilidad de coordinación vía átomo de azufre e hidroxilo del anillo de D-glucosa como ligando bidentado.

Se sintetizaron 5 derivados de glucosa mediante la aplicación de metodologías convencionales en síntesis orgánica, obteniéndose los mismos con moderados y excelentes rendimientos. Se llevaron a cabo las caracterizaciones espectroscópicas mediante IR y RMN. Dentro de esta última metodología, se aplicaron diferentes experimentos para la elucidación de las moléculas, como ser ^1H -RMN y ^{13}C -RMN (experimentos monodimensionales) y experimentos bidimensionales de correlación H-H vecinos (COSY) y H-C a un enlace (HSQC) y a más de un enlace (HMBC). Por otra parte, el derivado **4** el cual presenta un agrupamiento tiol en su estructura fue exitosamente marcado con ^{99m}Tc .

Todos los resultados alentadores obtenidos en este período han permitido al grupo de trabajo la elaboración de una publicación científica en una revista arbitrada internacional en la temática de trabajo, así como el envío de resúmenes a eventos científicos nacionales e internacionales.

VIII. PROYECCIONES

Debido a los resultados obtenidos y a los aspectos químicos, bioquímicos y biológicos relacionados a la temática del presente trabajo, han surgido nuevas ideas como ser:

- Estudiar qué tipos de complejos se forman para el derivado de glucosa **4** con el ^{99m}Tc . Esto se podría realizar mediante síntesis química utilizando ^{187}Re (isótopo no radioactivo), el cual es un elemento que presenta características químicas similares al tecnecio.
- Desarrollar nuevas metodologías de radiosíntesis para el derivado **5**. Esto podría llevarse a cabo mediante “sistemas 3 + 1” para generar la unión de un ligando que presente tres grupos con excelente afinidad por el tecnecio y de este modo inducir la unión del derivado **5** mediante el agrupamiento tiol presente en su estructura.
- Estudiar la internalización en una línea celular de melanoma murino, y realizar biodistribuciones e imágenes en ratones C57BL/6 portadores de melanoma murino para el radioconjugado ^{99m}Tc -derivado **4**.
- Estudiar el nivel de expresión de los GLUTs en la línea celular de melanoma murino B16F1.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.semnim.es> Sociedad Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular. Lunes 29 de Octubre 2012.
2. OMS. Uso de radiaciones ionizantes y de isotopos radiactivos en medicina, **1972**.
3. OIEA, OMS. Medicina Nuclear, **1975**.
4. <http://www.madrid.org> Hospital Universitario Ramon y Cajal. Lunes 29 de Octubre 2012.
5. Imam, S.K. Molecular Nuclear Imaging: The Radiopharmaceuticals (Review). *Cancer Biotherapy & Radioph.*, 20, 163-172, **2005**.
6. Blasberg, R. Molecular Imaging and Cancer (Minireview). *Molec. Cancer Therapeutics*, 2, 335–343, **2003**.
7. Weissleder, R; Mahmood, U. Molecular Imaging (Special Review). *Radiology*, 219, 316–333, **2001**.
8. Ametamey, S.; Honer, M.; Schubiger, A. Molecular Imaging with PET. *Chem. Rev.*, 108, 1501–1516, **2008**.
9. Franc, B.L.; Acton, P.D.; Mari, C.; Hasegaway B.H. Small-Animal SPECT and SPECT/CT: Important Tools for Preclinical Investigation. *J. Nucl. Med.*, 49, 1651-1663, **2008**.
10. www.radiofarmacia.org Sociedad Española de Radiofarmacia. Jueves 20 de Diciembre de 2012.
11. Fass, L. Imaging and cáncer: A review. *Molec. Oncol.*, 2, 115-152, **2008**.
12. Beyer, T.; Antoch, G.; Müller, S.; Egelhot, T.; Fraudenberg, L.; Debatin, S.; Bockisch, A. Acquisition Protocol Considerations for Combined PET/CT Imaging. *J. Nucl. Med.*, 45, 25S-35S, **2004**.

13. Reza, M.; Sarkar, S. Computed Tomography Based Attenuation Correction in PET/CT: Principles, Instrumentation, Protocols, Artifacts and Future Trends. *J. Nucl. Med.*, 45, 25S-35S, **2004**.
14. Degrosi, E.; Gariti, M.; Kavasima, M. Nomenclador de Medicina Nuclear, **2006**.
15. González, G.; Rabri, C. Para entender las radiaciones. Energía nuclear, medicina, industria, DIRAC-Facultad de Ciencias, **2011**.
16. Kowalsky, R.; Falen, S.W. Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine. American Pharmacists Association DC, **2004**.
17. Sasha, G.B. Radiopharmaceuticals and methods of radiolabeling, Fundamentals of Nuclear Pharmacy, 5ª Edición, Springer, **1986**.
18. Tubis, M.; Wolf, W. Radiopharmacy. John Wiley and Sons, Inc., U.S.A, **1990**.
19. Neves, M. Diseño de radiofármacos terapéuticos. Asociación Latinoamericana de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear, **2007**.
20. Jacene, H.; Filice, R.; Kasecamp, W.; Wah, R. Comparison of ^{90}Y -Ibritumomab Tiuxetan and ^{131}I -Tositumomab in Clinical Practice. *J. Nucl. Med.*, 48, 1767-1776, **2007**.
21. <http://www-naweb.iaea.org/napc/iachem/meetings/F2-TM-36930/announcement.html> Technical Meeting (TM 36930) on Therapeutic Radiopharmaceuticals IAEA HQ, **2009**. Jueves 20 de Diciembre 2012.
22. Yu, J.F.; Häfeli, U. O.; Dong, Y.; Sands, M. J.; Li, Y.H.; Failing, S.; Leakakos, T.; Tapolsky, G. Radiolabeling of magnetic targeted carriers with several therapeutic and imaging radioisotopes. *Europ. Cells Mat.*, 3, 16-18, **2002**.
23. IAEA. Therapeutic radionuclide generators: $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ and $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ generators, **2009**.

24. Mallol J. Radiofarmacia. Trazadores radiactivos de uso clínico. Interamericana-McGraw-Hill, **1989**.
25. Kowalsky, R.; Perry, J. Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine Practice, **1987**.
26. Türker, S.; Ózer, Y. Diagnostic Radiopharmaceutical Agents. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 29, 145-154, **2004**.
27. <http://nuclearpharmacy.uams.edu/RPLIST.html>. Jueves 20 de Diciembre de 2012.
28. Knapp, F.; Butler, T. Radionuclide Generators, **1984**.
29. ALASBIMN. Handbook of radiopharmaceutical quality control. **1989**.
30. Theobald, A. Radiopharmaceuticals. Using Radioactive Compounds in Pharmaceuticals and Medicine, **1989**.
31. Jurisson, S.; Berning, D.; Jia, W.; Ma, D. Coordination Compounds in Nuclear Medicine. *Chem. Rev.*, 93, 1137-1156, **1993**.
32. IAEA. Technetium-99m Radiopharmaceuticals: Status and Trends. IAEA Radioisotopes and Radiopharmaceuticals Series No 1, **2009**.
33. Yoshihara, K.; Omori, T. Technetium and Rhenium. **1996**.
34. Saha, G. Fundamentals of Nuclear Pharmacy, **1978**.
35. Spencer, R. Radiopharmaceuticals: Structure-Activity Relationships. **1981**.
36. Zolle, I. Technetium-99m Pharmaceuticals. Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine. Springer, **2007**.
37. IAEA. Preparation of kits for 99mTc radiopharmaceuticals. IAEA, **2007**.
38. Sols A, Crane RK. Substrate specificity of brain hexokinase. *J Biol. Chem.*, 210, 581-595, **1954**.

39. Labelling of small biomolecules using novel technetium-99m cores: IAEA Technical Report Series 459 Book Review and Important Research Outputs of a Coordinated Research Project. *J. Label Compd. Radiopharm.*, 51, 329–335, **2008**.
40. Gatley, J. Labeled Glucose Analogs in the Genomic Era. *J. Nucl. Med.*, 44, 1082-1086, **2003**.
41. Schibli, R.; Dumas, C.; Petrig, J.; Spadola, L.; Scapozza, L.; Garcia, E.; Schubiger, P. Synthesis and in Vitro Characterization of Organometallic Rhenium and Technetium Glucose Complexes against Glut 1 and Hexokinase. *Bioconjugate Chem.*, 16, 105-112, **2005**.
42. Ferreira, C.; Bayly, S.; Green, D.; Storr, T.; Barta, C.; Steele, J.; Adam, M.; Orvig, M. Carbohydrate-Appended 3-Hydroxy-4-pyridinone Complexes of the $[M(CO)_3]^+$ Core (M = Re, ^{99m}Tc , ^{186}Re). *Bioconjugate Chem.*, 17, 1321-1329, **2006**.
43. Bayly, S.; Fisher, C.; Storr, T.; Adam, M.; Orvig, C. Carbohydrate Conjugates for Molecular Imaging and Radiotherapy: ^{99m}Tc (I) and ^{186}Re (I) Tricarbonyl Complexes of *N*-(2'-Hydroxybenzyl)-2-amino-2-deoxy-D-glucose. *Bioconjugate Chem.*, 15, 923-926, **2004**.
44. Stas, M.; Stroobants, S.; Dupont, P.; Gysen, M.; Hoe, L.; Garmyn, M.; Mortelmans, L.; Wever, I. ^{18}F -FDG PET scan in the staging of recurrent melanoma: additional value and therapeutic impact. *Melanoma Res.*, 12, 479-490, **2002**.
45. Sánchez, I. Radiofármacos PET. *Rev. Esp. Med. Nucl.*, 20, 477-498, **2001**.
46. He, Y.; Guo, Q. Clinical applications and advances of positron emission tomography with fluorine-18-fluorodeoxyglucose (^{18}F -FDG) in the diagnosis of liver neoplasms (Review). *Postgrad. Med. J.*, 8, 246-251, **2008**.

47. Carrera, D.; Fernandez, A.; Estrada, J.; Comin, J.; Gámez, C. Detección de melanoma maligno oculto mediante PET –TC con ^{18}F -FDG y sonda gammadetectora. *Rev. Esp. Med. Nucl.*, 26, 410-413, **2005**.
48. Karantanis, D.; Durski, J.; Lowe, V.; Nathan, M.; Mullan, B.; Georgiou, E.; Johnston, P.; Wiseman, G. ^{18}F -FDG and PET/CT in Burkitt's lymphoma. *Europ. J. Radiol.*, 75, e68-e73, **2010**.
49. Delbeke, D. Oncological Applications of FDG PET Imaging: Brain Tumors, Colorectal Cancer, Lymphoma and Melanoma. *J. Nucl. Med.*, 40, 591-603, **1999**.
50. Gritters, L.; Francis, I.; Zasadny, K.; Wahl, R. Initial Assessment of Positron Emission Tomography Using 2-Fluorine-18-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose in the Imaging of Malignant Melanoma. *J. Nucl. Med.*, 34, 1420-1427, **1993**.
51. Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. *Biología Molecular de la Célula*, 4ª Edición, **2004**.
52. Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, Estadística cáncer período **2002-2006**.
53. Miao, Y.; Whitener, D.; Feng, W.; Owen, N.K.; Chen, J.; Quinn, T.P. Evaluation of the Human Melanoma Targeting Properties of Radiolabeled Melanocyte Stimulating Hormone Peptide Analogues. *Bioconjugate Chem.*, 14, 1177-1184, **2003**.
54. Oliveria, S.A.; Saraiya, M.; Geller, A.C.; Heneghan, M.K.; Jorgensen, C. Sun exposure and risk of melanoma. *Arch. Dis. Child.*, 91, 131-138, **2006**.
55. Barrios, E.; Vasallo, J.; De Stéfani, E. Patterns of cutaneous malignant melanoma incidence and mortality in Uruguay. *Melanoma Res.*, 11, S138, **2001**.

56. García, A.; Scarone, M.; Delgado, L.; Núñez, J.; Laporte, M.; Fernández, G.; Bazzano, C.; Martínez, M. Predisposición hereditaria de padecer melanoma en familias uruguayas. *Rev. Med. Urug.*, 23, 109-115, **2007**.
57. Acosta, E.; Fierro, E.; Velásquez, V.E.; Rueda, X. Melanoma: patogénesis, clínica e histopatología. *Rev. Asoc. Col. Dermatol.*, 17, 87-408, **2009**.
58. Ho Shona, I.A.; Chungc, D.K.V.; Sawd, R.P.M.; Thompsond, J.F. Imaging in cutaneous melanoma. *Nucl. Med. Commun.*, 29, 847-876, **2008**
59. Wahl, L. Targeting Glucose Transporters for Tumor Imaging:"Sweet" Idea, "Sour" Result. *J. Nucl. Med.*, 37, 1038-1041, **1996**.
60. Díaz, D.; Burgos, L. ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular? *Iatreia*, 15, 179-189, **2002**.
61. Su, S. Sodium-Glucose Transporter (Mini-Review). *Formos J. Endocrin. Metab.*, 1, 1-5, **2009**.
62. Bermúdez,V.; Bermúdez,F.; Arraiz,N.; Leal, E.; Linares, S.; Mengual, E.; Valdelamar, L.; Angulo, V.; Martins, G. Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 28, 1-11, **2007**.
63. Díez-Sampedro, A.; Barcelona, S. Sugar Binding Residue Affects Apparent Na⁺ Affinity and Transport Stoichiometry in Mouse Sodium/Glucose Cotransporter Type 3B. *J. Bio. Chem.*, 286, 7975–7982, **2011**.
64. Tazawa, S.; Yamato, T.; Fujikura, H.; Hiratochi, M.; Itoh, F.; Isogai, T.; Isaji, M. SLC5A9/SGLT 4, a new Na⁺-dependent glucose transporter, an essential transporter for mannose, 1,5-anhydro-D-glucitol, and fructose. *Life Science*. 76, 1039-1050, **2005**.
65. Macheda, M.; Rogers, S.; Best, J. Molecular and Cellular Regulation of Glucose Transporter (GLUT) Proteins in Cancer. *J. of Cell. Phy.*, 202, 654–662, **2005**.

66. Airley, R.; Loncaster, J.; Raleigh, J.; Harris, A.; Davidson, S.; Hunter, R.; West, C.; Stratford, I. GLUT-1 and caix as intrinsic markers of hypoxia in carcinoma of cervix: relationship to pimonidazole binding. *Int. J. Cancer*, 104, 85–91, **2003**.
67. Gonzales, G.; Gonzales, C.; Espinosa, D.; Rojas, C. Overexpression of genes of glycolytic pathway enzymes in cancer cells. *Acta Med. Per.*, 24, 187-197, **2007**.
68. Mobasheri, A.; Bondy, C.; Ferreira, A.; Shakibaei, M. Facilitative Glucosa Transporter en Articular Condrocytes. Springer. **2008**.
69. Oh, S.J.; Ryu, J.S.; Yoon, E.J.; Bae, M.S.; Choi, S.J.; Park, K.B.; Moon, D.H. ^{99m}Tc-labeled 1-thio-β-D-glucose as a new tumor-seeking agent: Synthesis and tumor cell uptake assay. *Appl. Radiat. Isotopes*, 64, 207-215, **2006**.
70. Blanco, M.; Figueroa, A.; Grande, E.; García, R.; Antón, L. Potential Role of Sugar Transporters in Cancer and Their Relationship with Anticancer Therapy (Review). *Int. J. of Endoc.*, 1-14, **2010**.
71. Chen, X.; Li, L.; Liu, F.; Liu, B. Synthesis and biological evaluation of technetium-99m-labeled deoxyglucose derivatives as imaging agents for tumor. *Bioorganic & Medicinal Chem. Letters*, 16, 5503–5506, **2006**.
72. Welling, M.M; Alberto, R; Performance of a ^{99m}Tc-labelled 1-thio-b-D-glucose 2,3,4,6-tetra-acetate analogue in the detection of infections and tumours in mice: a comparison with [¹⁸F]FDG. *Nucl. Med. Communications*, 31, 239–248, **2010**.
73. Brasileiro, C.; Fonseca, C.; Martins, C.; deLima, C.; Silva, J.; Ribeiro, T. ^{99m}Tc-labeled-1-thio-b-D-glucosa as a new tool to temporomandibular joint inflammatory disorders diagnosis. *App. Rad. and Isotope*. 1-7, **2010**.
74. Katz, A; Castelli, R; Fernández, M; Gambini, J.P.; Porcal, W; Cabral, P. Marcación y evaluación biológica de 1-Tio-β-D-Glucosa con ^{99m}Tc, estudios preliminares. *Congreso de la Federación Farmacéutica Sudamericana*. **2008**.

75. Katz, A; Castelli, R; Fernández, M; Gambini, J.P.; Porcal, W; Cabral, P. ^{99m}Tc 1-Thio- β -D-glucosa aplicaciones en el diagnostico de melanoma. *Congreso de la Sociedad Uruguaya de Medicina Nuclear*. **2008**.
76. Castelli, R; Cabral, P; Gambini, J.P; Porcal, W. Desarrollo de derivados de Glucosa marcados con ^{99m}Tc como agentes de imagen tumoral. *Segundo encuentro Nacional de Ciencias Químicas, ENAQUI*. **2011**.
77. Riva, E; Castelli, R; Fernandez, M; Chabalgoity J.A; Moreno, M; Porcal, W; Cabral, P. Desarrollo de ^{99m}Tc -Tioglucosa como potencial agente de imagen en LNH. *III Congreso de Ciencias Farmacéuticas*. **2011**.
78. Tesina de graduación. Rosina Dapuetto. **2010**.
79. Dapuetto, R.; Castelli; R.; Fernández, M.; Chabalgoity, A.; Moreno, M.; Gambini, J.P.; Cabral, P.; Porcal, W. Biological evaluation of Glucose and Deoxyglucose derivatives radiolabeled with $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ core as potential melanoma imaging agents. *Bioo & Med Chem Letters*, 21, 7102 - 7106, **2011**.
80. Castelli; R.; Fernández, M.; Porcal, W.; Gambini, J.P.; Alonso, O.; Chabalgoity, A.; Moreno, M.; Cabral, P. Preparation and Primary Bioevaluation of ^{99m}Tc -labeled-1-thio- β -D-Glucose as Melanoma Targeting Agent. *Curren.t Radiopharm.*, 4, 355-360, **2011**.
81. Petrig, J.; Schibli, R.; Dumas, C.; Alberto R.; Schubiger P.A. Derivatization of glucose and 2-deoxyglucose for transition metal complexation: susbsitution reactions with organometallic ^{99m}Tc y Re precursors and fundamental NMR investigations. *Chem. Eur. J.* 7, 1868-1873, **2001**.
82. Alberto R.; Schibli R.; Egli A.; Metal carbonil synteses XXII. Low pressure carbonylation of $[\text{MOCl}_4]^-$ and $[\text{MO}_4]^-$. The technetium (I) and rhenium (I) complexes $[\text{Net}_4]_2[\text{MECl}_3(\text{CO})_3]$. *J. Org. Chem.* 492, 217-224, **1995**.

X. ABREVIATURAS

% ID/g: Porcentaje de dosis inyectada por gramo (por las siglas en inglés de *Injected Dose per Gram of Tissue*)

% ID: Porcentaje de dosis inyectada (por las siglas en inglés de *Injected Dose*)

18-crown-6: Éter corona

¹⁸F-DG: 2-deoxi-2-¹⁸F-D-glucosa

1-TG: 1-tio-β-D-glucosa

ACN: Acetonitrilo

Act: Actividad

AE: Acetato de Etilo

AQBF: Agentes Quelantes Bifuncionales

ATCC: American Type Culture Collection

CC: Cromatografías en Columna

CCF: Cromatografía en Capa Fina

CHEA: Comité Honoraria de Experimentación Animal

COSY: por las siglas en inglés de *COrelated Spectroscopy*

CT: Tomografía Computarizada

D₂O: Óxido de Deuterio (por las siglas en inglés de *Deuterium oxide*)

DMEM: Dulbecco modificado de Eagle (por las siglas en inglés de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

DMF: Dimetilformida (*N,N*-dimetilformamida)

EGFR: Receptores de Factores de Crecimiento Epidérmico (por las siglas en inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*)

EP: Éter de Petróleo (Hexano)

GLUTs: Transportadores de glucosa (por las siglas en inglés de *glucose transporters*).

HMBC: por las siglas en inglés de *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

HSQC: por las siglas en inglés de *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

IR: Espectroscopia Infrarroja

ITLC-SG: Cromatografía Instantánea en Capa Fina – Sílica Gel

J: Constante de acoplamiento

LMM: Melanoma léntigo maligno

MAL: Melanoma lentiginoso arcal

mCi: mili – Curie

MEK: Metil Etil Cetona

MES: Melanoma de extensión superficial

MN: Melanoma nodular

MRI: Resonancia Magnética

PET: Tomografía de Emisión de Positrones (por las siglas en *Positron Emission Tomography*)

PRN: Pureza Radionucleídica

PRQ: Pureza Radioquímica

Rf: Relación de frentes

RIT: Radioinmunoterapia

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RN: Radionucleido

RTM: Radioterapia molecular

SGLTs: Transportadores de sodio y glucosa (por las siglas en ingles de *sodium-glucose transporters*)

SPECT: Tomografía Computarizada de Emisión de Fotón Único (por las siglas en inglés de *Single Photon Emission Computerized Tomography*)

TMS: Tetrametilsilano

TOCSY: por las siglas en inglés *Total Correlation Spectroscopy*

v: Frecuencia de estiramiento

XI. AGRADECIMIENTOS

A mis tutores de tesis Williams Porcal y Pablo Cabral, por guiarme en la realización de mi tesis.

Al Centro de Medicina Nuclear del Hospital de Clínicas, en especial a Juan Pablo Gambini, Fátima Coppe y Andrea López.

A María Moreno y Alejandro Chabalgoity, por brindarnos las células.

A mis compañeros del CIN.

A mis amigas, pareja y familiares.